QF

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21 **EXPEDIENTE No.** 07-44403

54 **TÍTULO** "METABOLITOS DE CIERTOS DERIVADOS DE [1,4] DIAZEPINO [6,7,1-IJ] QUINOLINA Y MÉTODOS DE PREPARACION Y USO DE LOS MISMOS"

51 **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** C07D 471/06, A61K 31/551

71 **SOLICITANTE** WYETH

DOMICILIO NUEVA JERSEY, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74 **APODERADO** ALVARO CORREA ORDOÑEZ
T.P. NO 20 281

22 **BOGOTÁ, D. C.,** 04 de Mayo de 2007

FN 05-06-2007
Publicación

(FORMA P-10)

SS

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
[redacted]
No. 07-044403- -00000-0000
Fecha: 2007-05-04 16:03:04 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 391

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

(1) SOLICITUD DE :

[X] Patente de Invención [ ] Patente de Modelo de Utilidad
[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

(2) SOLICITANTE (71)

Nombre: WYETH
Dirección: Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940, Estados Unidos de América
Nacionalidad o Domicilio: Nueva Jersey, Estados Unidos de América
Lugar de Constitución: Delaware, Estados Unidos de América
Teléfono: Fax:
E-Mail

IDENTIFICACION
C.C. [ ] NIT [ ]
C.E. [ ] Otro [ ]
Cual
Número

(3) REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ
Dirección: Avenida 82 No.10-62 Piso 6
Teléfono: 634 1500 Fax: 376 2211
E-Mail: office.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION
C.C. [X] NIT [ ]
C.E. [ ] Otro [ ]
Cual
Número 79.143.366 de Usaquén TP 20.281

(4) INVENTOR (ES) (72)

Nombre: BACH II, Alvin C.; RAMAMOORTHY, P. Sivaramakrishnan; TONG, Zean; WANG, Jim; DEMAIO, William; JORDAN, Ronald A.; STACK, Gary Paul y WANG, Youchu
Dirección: 213 Cinnaminson Street, Riverton, New Jersey 08077, Estados Unidos de América; 1605 Aspen Drive, Plainsboro, New Jersey 08536, Estados Unidos de América; 3629 Vincent Drive, Collegeville, Pennsylvania 19426, Estados Unidos de América; 133 Margaret Lane, Malvern, Pennsylvania 19355, Estados Unidos de América; 4 Wynnwood Drive, Collegeville, Pennsylvania 19426, Estados Unidos de América; 51 Carol Lane, Richboro, Pennsylvania 18954, Estados Unidos de América; 525 Brookfield Lane, Ambler, Pennsylvania 19002, Estados Unidos de América y 1100 rue Goulet, Apt. 101, Ville Saint-Laurent, Quebec H4R 2C6, Canadá, respectivamente.
Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense, India, estadounidense, china, estadounidense, estadounidense, estadounidense y china, respectivamente.

(5) PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/040289 Fecha 04-NOV-05
Publicación Internacional No. WO 2006/052886 Fecha 18-MAY-06

(6) Título (54) METABOLITOS DE CIERTOS DERIVADOS DE [1,4]DIAZEPINO[6,7,1-IJ]QUINOLINA Y METODOS DE PREPARACION Y USO DE LOS MISMOS

(7) Clasificación Internacional (51) C07D 471/06, A61K 31/551, A61K 31/7024 , A61K 31/704, C07H 15/26

(8) Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI [X] NO [ ]	US	05-NOV-04	60/625,335

(9) Comprobante de pago No. 07-27513 **Fecha** 04-ABR-07

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

(10) **ANEXOS**

00092

- [X] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- [ ] Poderes, si fuere el caso
- [X] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- [ ] Declaraciones
- [X] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [X] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- [ ] Arte final 12 x 12
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [X] Otros: Extractos, "PCT Request y notificación de documento de prioridad

(11) **FIGURA CARATERISTICA**

(12) **Solicito la concesión de la patente,**

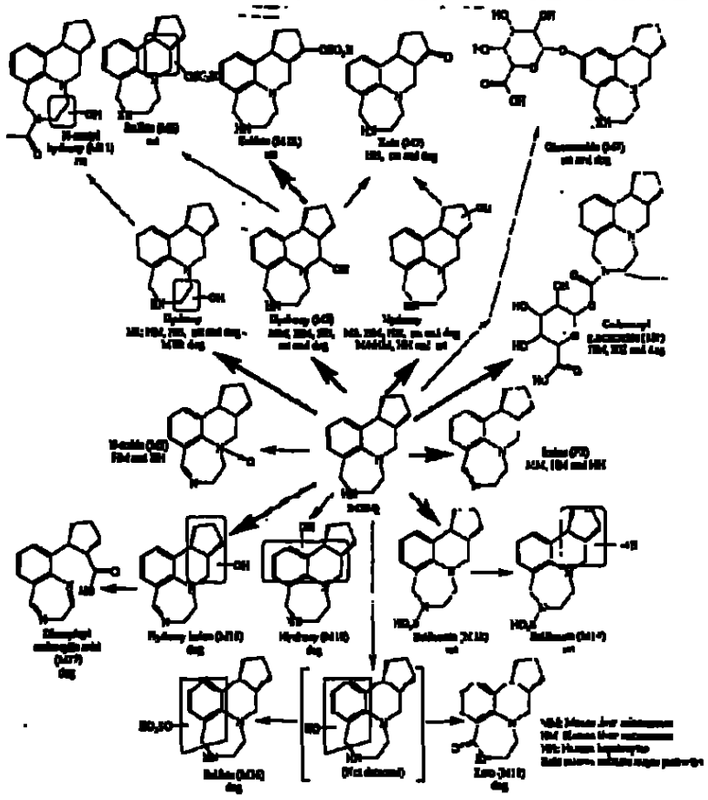
NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquén T.P. 20.281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

FIG. 1: TRAYECTORIAS METABOLICAS PROPUESTAS PARA LA DCIQ PARA EL ESTUDIO IN VITRO Y LOS ESTUDIOS IN VIVO EN RÁTAS Y PERROS



formula I

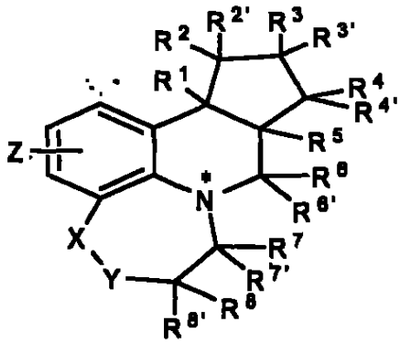


FIGURA 1

PROPOSED METABOLIC PATHWAYS FOR DCDQ FOR IN VITRO STUDY AND IN VIVO ESTUDIES IN RATS AND DOGS – TRAYECTORIAS METABOLICAS PROPUESTAS PARA LA DCDQ PARA EL ESTUDIO IN VITRO Y LOS ESTUDIOS IN VIVO EN RATAS Y PERROS

N-ACETYL HIDROXI (M11) RAT- N-ACETIL HIDROXI (M11) RATA

SULFATE (M8) RAT – SULFATO (M8) RATA

SULFATE (M13) RAT – SULFATO (M13) RATA

KETO (M7) HH, RAT AND DOG – CETO (M7) HH, RATA Y PERRO

GLUCURONIDE (M7) RAT AND DOG – gLUCURÓNIDO (M7) RATA Y PERRO

HYDROXY M1: HM, HH, RAT AND DOG, M10, DOG – HIDROXI M1: HM, HH, RATA Y PERRO, M10, PERRO

HYDROXY (M2) MM, HM, MM, RAT AND DOG – HIDROXI (M2) MM, HM, MM, RATA Y PERRO

HYDROXY M3: HM, HH, RAT AND DOG, M4: HM, HH AND RAT – HIDROXI M3: HM, HH, RATA Y PERRO, M4: HM, HH Y RATA

CARBAMOYL GLUCURONIDE (M6) HM, HH AND DOG – CARBAMOIL GLUCURÓNIDO (M6) HM, HH Y PERRO

N-OXIDE (M5) HM AND HH – N-OXIDO (M5) HM Y HH

IMINE (P3) MM, HM AND HH – IMINA (P3) MM, HM Y HH

DIAZEPINYL CARBOXYLIC ACID (M17) DOG – ACIDO DIACEPINIL CARBOXILICO (M17) PERRO

HYDROXY IMINE (M15) DOG – HIDROXI IMINA (M15) PERRO

HYDROXY (M19) DOG – HIDROXI (M19) PERRO

SULFAMATE (M12) RAT – SULFAMATO (M12) RATA

SULFAMATE (M14) RAT – SULFAMATO (M14) RATA

SULFAMATE (M16) DOG – SULFAMATO (M16) PERRO

(NOT DETECTED) – NO DETECTADO

MM: MOUSE LIVER MICROSOMES – MM: MICROSOMAS DE HIGADO DE RATON

HM: HUMAN LIVER MICROSOMES – HM: MICROSOMAS DE HIGADO DE HUMANO

HH: HUMAN HEPATOCYTES – HEPATOCITOS HUMANOS

BOLD ARROWS INDICATE MAJOR PATHWAYS – LAS FLECHAS EN NEGRILLAS INDICAN LAS PRINCIPALES TRAYECTORIAS

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

[redacted]

No. 07-044403- -00000-0000

Fecha: 2007-05-04 16:03:04 Dep: 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 391

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 27,513
FECHA : ABRIL 4 DE 2007

C O N S I G N A C I O N

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAG	Vr. PAGO
RAISBECK LARA RODRIGUEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	64322757	04/04/2007	62,090,000.00

C O N C E P T O

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.
		TOTAL : $	482,000.

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Traducción oficial del ingles por Marlén Neira Castro, resolución 2117 del Min-Justicia Colombia. 00007

APOSTILLA EN PODER DE WYETH

APOSTILLA –

(Convención De La Haya del 5 octubre de 1961)

2. País: Estados Unidos de América

5. Este documento Público ha sido firmado por Michelle L. MC Gowan

6. Quien ejerce funciones de notario público de Nueva Jersey

7. Lleva el sello del Michelle L. MC Gowan, notario

CERTIFICADO

5 En Trenton, Nueva York,

6. El 21 de marzo 2007.

7 Por Bradley Abelow- tesorero de Nueva Jersey

8. Bajo el No. A286433

11. Sello en relieve del estado de Nueva Jersey.

12. Firma de Bradely Abelow-

PODER DE ABOGADO

Bilingüe inglés y español de Wyeth en relación a solicitudes de patente PCT/US2005/040289 titulada "Metabolitos de ciertos [1,4] diazepino[6,71-IJ] derivados de quinolina y métodos de preparación y uso de los mismos".

Firmado el 19 de marzo de 2007

por William H. Calnan – sub-Secretario.

CERTIFICADO NOTARIAL

Bilingüe inglés y español de William H. Calnan como subsecretario de Wyeth.

Firma de Michelle L. McGowan-

Sello de Michelle L. Mc. Gowan- notario público, de estado de Nueva Jersey. No. 2108903, calificada en el condado Morris. Su cargo vence el 9 de febrero de 2011.

—

Es traduccion conforme con copia para confrontar- Bogotá, Abril 18, 2007.

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

00003

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA

2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
MICHELLE L MC GOWAN

3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY

4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
MICHELLE L MC GOWAN, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY

6. THE 21ST DAY OF MARCH 2007

7. BY: Bradley Abelow, NEW JERSEY TREASURER

8. NO. A286433

9. SEAL/STAMP:

10. SIGNATURE

Bradley Abelow

BAKER & MCKENZIE

M101367/Colombia

Raisbeck, Lara, Rodriguez & Rueda
Av. 82 No. 10 - 62 6th Floor
Bogotá, Colombia

NIT: 860.066.840-3
Tel: +57 1 634 1500
Fax: +57 1 376 2211
www.bakernet.com

00009

POWER OF ATTORNEY

The undersigned.

WYETH

with offices at

Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
United States of America

declares that it hereby grants to

ALVARO CORREA-ORDOÑEZ and/or
OLGA GEORGETTE OTERO and/or
RICARDO METKE and/or
JUAN PABLO CONCHA

all members of the law firm Raisbeck, Lara, Rodriguez & Rueda, with domicile at Av. 82 No. 10 – 62, 6Th floor, of Bogotá D. C., Colombia, and for so long as they remain members of the law firm, a full and sufficient power of attorney with respect to Colombian patent application(s) based on PCT/US2005/040289 and entitled "METABOLITES OF CERTAIN [1,4]DIAZEPINO[6,7,1-IJ]QUINOLINE DERIVATIVES AND METHODS OF PREPARATION AND USE THEREOF" and to obtain patent protection thereof, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of a patent(s) based upon said patent application(s), including filing of assignments, change of name or address, voluntary cancellation; and defending oppositions, cancellations, nullity, writ mandamus, and in general the civil, penal, an administrative processes relating to those rights.

I hereby ratify all lawful actions previously taken on behalf of this company by the aforementioned attorneys with respect to the mentioned matters.

Done and subscribed in

On the 19th day of March, 2007

Signature of the person issuing the Power

WYETH

William H. Calnan
Assistant Secretary

PODER DE ABOGADO

La abajo firmada,

WYETH

con oficinas en

Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
Estados Unidos de América

declara por el presente que otorga a

ALVARO CORREA-ORDOÑEZ y/o
OLGA GEORGETTE OTERO y/o
RICARDO METKE y/o
JUAN PABLO CONCHA

Todos miembros dé la firma de abogados Raisbeck, Lara, Rodríguez & Rueda, con domicilio en la Av. 82 No. 10 – 62 Piso 6 en Bogotá D. C., Colombia, y hasta tanto ellos continúen siendo miembros de la firma, poder especial amplio y suficiente con respecto a la solicitud(es) de patente en Colombia basada(s) en PCT/US2005/040289 y titulada "_____", y para obtener la protección de patente de la misma, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera autoridades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de la(s) patente(s) de invención basada(s) en la mencionada solicitud de patente, incluyendo presentación de traspasos, cambio de nombre o dirección, cancelación voluntaria; y defensa en oposiciones, cancelaciones, nulidades, la tutela, y en general procesos civiles, penales, administrativos relacionados con estos derechos.

Igualmente, ratifico todo lo actuado en derecho hasta el momento en nombre de esta compañía por cualquiera de los mencionados apoderados en los casos mencionados.

Dado y firmado en

A los 19 días del mes de marzo de 2007

Firma de la persona que firma el Poder

NOTARIAL CERTIFICATION

On this 19th day of March 2007, the undersigned Notary

CERTIFIES

1. That William H. Calnan set his hand on the foregoing document.
2. That the grantor is to me personally known and that he/she has legal capacity to execute the instrument.
3. That the grantor has executed the foregoing document as

   Assistant Secretary

   of the judicial person WYETH
4. That the judicial person WYETH having its home office in Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940, United States of America

   is duly organized, has present legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.
5. That the grantor has in fact the referred to authority and that his/her representation is legal.
6. That I have based certifications 3, 4 and 5 above on the following authentic documents for such purpose exhibited to me and which I mention specifically, giving their dates and their origin or source:

   Minutes of the Borrad of Directors Meeting held on April 26, 2006.

CERTIFICACION NOTARIAL

A los 19 días del mes de marzo de 2007, el suscrito Notario

DA FE

1 Que william H. Calnan suscribió de su puño y letra el documento que antecede.

2. Que conozco al otorgante y que éste tiene capacidad legal para el otorgamiento.

3 Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de Subsecretario de la persona jurídica WYETH

4 Que la persona jurídica WYETH con sede en Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940, Estados Unidos de América está legalmente constituida, que tiene existencia legal actual y que el acto para el cual se otorga el poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.

5 Que el otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta y que ésta es legítima.

6. Que he basado las certificaciones 3, 4 y 5 anteriores en los siguientes documentos auténticos que al efecto se me exhibieron y que menciono específicamente con expresión de sus fechas y de su origen o procedencia:

Actas de la reunión de Junta Directiva celebrada el 26 de abril de 2006!

Michelle L. McGowan
Notary Public

El Notario Público

MICHELLE L. McGOWAN
Notary Public, State of New Jersey
No. 2108993
Qualified in Morris County
Commission Expires Feb. 9, 2011

D2007 :00121
Book 7556

MICHELLE L. McGOWAN
Notary Public, State of New Jersey
No. 2108903
Qualified in Morris County
Commission Expires Feb. 9, 2011

Traducción oficial del ingles por Marlén Neira Castro, resolución 2117 del Min-Justicia Colombia.

APOSTILLA EN TRASPASO DE PATENTE DE LOS ESTADOS UNIDOS A WYETH

APOSTILLA 00011

(Convención De La Haya del 5 octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
2. Este documento Público ha sido firmado por P. Swain
3. Quien ejerce funciones de oficial de certificaciones
4. Lleva el sello de la oficina de marcas registradas y patentes de los Estados Unidos

CERTIFICADO

5 En Washington, D.C.:

6. El 28 de marzo 2007.
7 Por el oficial de autenticaciones asistente, departamento de Estado de los Estados Unidos
8. Bajo el No. 07017765-7
9. Sello en relieve del departamento de estado.
10. Firma de Patrick O. Hatchett-

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS

A QUIEN PUEDA INTERESAR

Oficina de marcas registradas y patentes de los Estados Unidos

23 de marzo de 2007.

Por el presente certifico que anexo se encuentra una copia verdadera de los registros de esta oficina de un documento registrado el 16 de mayo de 2005.

Por autoridad de

Sub-secretario de Comercio para la Propiedad intelectual

Y Director de la Oficina de marcas registradas y patentes de los Estados Unidos.

Firma y nombre de P. Swain-

Oficial certificador...

TRASPASO DE PATENTE

Versión electrónica v1.1. Versión de hoja de estilo v1.1

Tipo de entrega	Traspaso nuevo
Naturaleza de la transferencia	Traspaso / Cesión

DATOS DE LA PARTE CEDENTE

Nombre	Fecha de suscripción- mes-DIA-año
Zeen Tong	4-14- 2005
Jim Wang	4-12- 2005
William DeMaio	4-13- 2005
Alvin C. Bach, II	4-18- 2005
Ronald A. Jordan	4-13- 2005
Youchu Wang	5-03- 2005
P. Sivaramakrishnan Ramamoorthy	4-20- 2005
Gary P. Stack	4-18- 2005

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1997

DATOS DE LA CESIONARIA

nnn12 75

Nombre	Wyeth
Dirección- calle	Five Giralda Farms
Ciudad	Madison
Estado - país	Nueva Jersey
Código postal	07940

Total número de propiedades : 1

Tipo de propiedades	Número
Número de solicitud	60625335

DATOS DE CORRESPONDENCIA

Número de fax Debe enviar por correo de EEUU cuando falla el fax	(215) 665-2013
Teléfono	215-665-2000
Correo electrónico	jjulianti@cozen.com
Nombre del corresponsal	Cozen O'Connor
Dirección línea 1	1900 Market St.
Dirección Línea 2	Filadelfia, Pensilvania 19103.
Nombre de quien presenta	Michael P. Straher

5000314456 Rollo: 016017 Cuadro: 0264

Total anexos: 6

Fuente= 60625335 traspaso#pagina1.tif Fuente= 60625335 traspaso#pagina2.tif

Fuente= 60625335 traspaso#pagina3.tif Fuente= 60625335 traspaso#pagina4.tif

Fuente= 60625335 traspaso#pagina5.tif Fuente= 60625335 traspaso#pagina6.tif

Patente-Rollo: 016017 Cuadro: 0265

Casillero No. WYTH0113-001 (AM101867L1) Patente

Traspaso de Invención

Considerando el pago de la Cesionaria a la Cedente de una contraprestación buena y valiosa, cuyo recibo se reconoce por el presente

CEDENTE

(1) Nombre completo de inventor: Zeen Tong

Residencia: 3829 Vincent Drive, Collegeville, Pensilvania 19426

Ciudadanía: estadounidense

(2) Nombre completo: Jim Wang

Residencia: 133 Margaret Lane, Malvern, Pensilvania 19355

Ciudadanía: R.P. China

(3) Nombre completo: William DeMaio

Residencia: 4 Wynnewood Drive, Collegeville, Pensilvania 19426

Ciudadanía: estadounidense

(4) Nombre completo de inventor: Alvin C. Bach, II

Residencia: 213 Cinnaminson St, Riverton, Nueva Jersey 08077

Ciudadanía: estadounidense

(5) Nombre completo de inventor: Ronald A. Jordan

Residencia: 51 Carol Lane, Richboro, Pensilvania 18954

Ciudadanía: estadounidense

Haluteva C

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

(6) Nombre completo de inventor: Youchu Wang 000113

Residencia: 1100 rue Goulet Apt. 101 Cille Saint Laurent- Québec H4R 2C6 Canadá

Ciudadanía: R.P. China

(7) Nombre completo de inventor: P. Silvaramakrishnan Ramamoorthy

Residencia: 1605 Aspen Drive, Plainsboro, Pensilvania 19002

Ciudadanía: India

(8) Nombre completo de inventor: Gary P. Stack

Residencia: 525 Brookfield lane, Ambler, Pensilvania 19002

Ciudadanía: estadounidense

Por el presente vende, traspasa y transfiere a la CESIONARIA

WYETH

Five Giralda Farms

Madison, Nueva Jersey 07940

Y a sus sucesores, cesionarios y representantes legales de la cesionaria la totalidad de los derechos, título e interés para los Estados Unidos y sus posesiones territoriales y en todos los países extranjeros, que incluye todos los derechos a reclamar prioridad, en y sobre la invención titulada: "Metabolitos de ciertos [1,4] diazepino[6,71-IJ] derivados de quinolina y métodos de preparación y uso de los mismos".

E inventada por los Cedentes y los inventores adicionales siguientes, si los hay:

Y que se encuentra en la Solicitud provisional US No. 60/625/335 presentada el 5 de noviembre de 2004.

[También verifique si las solicitudes extranjeras también están siendo traspasadas]

[x] y cualquier equivalente legal de los mismos en un país extranjero.

Si se conoce la fecha de presentación y el número de solicitud de dicha solicitud US, debe insertarse arriba, incluyendo el derecho a reclamar prioridad, que incluye todas y cada una de las mejoras reveladas allí, y todas y cada una de las Patentes de Invención que se obtendrán para dicha invención por la solicitud anterior o en una presentación provisional presentada posteriormente, no provisional, continuación, división, renovación o sustituto de la misma, y en cuanto a Patentes de Invención toda reexpedición o re-examinación de las mismas.

Por el presente, la Cedente declara que ninguna cesión, venta, contrato o gravamen han sido hechos o se harán y que puedan entrar en conflicto con este traspaso.

La Cedente autoriza a la Cesionaria a presentar solicitudes y a recibir Patentes de invención para dicha invención en cualquiera de los países mencionados en su propio nombre, o en el nombre de la Cesionario, por elección propia.

La Cedente acuerda y se compromete a ejecutar o a presentar cualquier garantía adicional del título de tal invención y cualquier Patente de Invención que pueda expedir sobre ella y, en cualquier momento por solicitud y a expensas de la Cesionaria, entregar un testimonio en alguna interferencia, litigio o proceso referente a la misma y a suscribir todos los papeles que puedan ser necesarios o deseables para perfeccionar el título de tal

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés

invención o cualquier Patente de Invención que se pueda otorgar en consecuencia a la Cesionario, a sus sucesores, cesionarios u otros representantes legales, y para ello, en cualquier momento, por solicitud y a expensas de la Cesionaria suscribirá cualquier continuación, continuación parcial, de división, renovación o sustitución de la misma, y de Patentes de Invención y re-expedirá o volverá a examinar las mismas, o cualquier otra solicitud adicional de patentes de invención para dicha invención o para una parte de ella, y todas las solicitudes y patentes de invención expedidas referentes a la misma quedan por el presente traspasadas a la Cesionaria, y hará todas las declaraciones juradas legales y todos los actos legales requeridos para procurar las mismas, sin otra contraprestación adicional, pero a expensas de la Cesionaria, sus sucesores, cesionarios u otros representantes legales.

La Cedente autoriza y solicita al Comisionado de Patentes que expida todas y cada una de las Patentes de Invención de los Estados Unidos para tal invención, resultante de alguna de las solicitudes mencionadas a su Cesionaria.

Firma ilegible de Zen Tong Fecha: 14 abril 2005.

Reconocimiento

Estado Pensilvania- Condado Montgomery

El 14 de abril de 2005, Zeen Tong, compareció personalmente ante mí, conocido por mí como la misma persona descrita y quien suscribió el instrumento anterior, y reconoció que el mismo lo suscribió, por su propia voluntad y para los fines establecidos.

Firma y sello de Notario público Roxanne L. Kelly- Upper Province. Condado Montgomery Su cargo vence el 23-11- 2006.

Firma ilegible de Jim Wang Fecha: 12 de abril 2005.

Reconocimiento

Estado Pensilvania- Condado Montgomery

El 12 de abril de 2005, Jim Wang, compareció personalmente ante mí, conocido por mí como la misma persona descrita y quien suscribió el instrumento anterior, y reconoció que el mismo lo suscribió, por su propia voluntad y para los fines establecidos.

Firma y sello de Notario público Bubinea D. Owens- Upper Province. Condado Montgomery Su cargo vence el 17- 4- 2007.

Firma ilegible de William DeMaio Fecha: 13 de abril 2005.

Reconocimiento

Estado Pensilvania- Condado Montgomery

El 13 de abril de 2005, William Demaio, compareció personalmente ante mí, conocido por mí como la misma persona descrita y quien suscribió el instrumento anterior, y reconoció que el mismo lo suscribió, por su propia voluntad y para los fines establecidos.

Firma y sello de Notario público Bubinea D. Owens- Upper Province. Condado Montgomery Su cargo vence el 17- 4- 2007.

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

Firma ilegible de William Alvin C. Bach Fecha: 18 de abril 2005.

Reconocimiento

Estado Pensilvania- Condado Montgomery

El 18 de abril de 2005, Albin C. Bach compareció personalmente ante mí, conocido por mí como la misma persona descrita y quien suscribió el instrumento anterior, y reconoció que el mismo lo suscribió, por su propia voluntad y para los fines establecidos.

Firma y sello de Notario público Barbara L. Lences- notario de Nueva Jersey Su cargo vence el 14-12- 2007

Página 4 de 6 Traspaso de invención Solicitud provisional Patente Rollo: 016017 Cuadro: 0269 Casillero No. WYTH0113-001 (AM101867L1) Patente

Firma ilegible de Ronald A. Jordan Fecha: 13 de abril 2005.

Reconocimiento

Estado Pensilvania- Condado Montgomery

El 13 de abril de 2005, Ronald A. Jordan compareció personalmente ante mí, conocido por mí como la misma persona descrita y quien suscribió el instrumento anterior, y reconoció que el mismo lo suscribió, por su propia voluntad y para los fines establecidos.

Firma y sello de Notario público Nubinea Owens- Upper Providence condado Montgomery. Su cargo vence el 7 abril- 2007

Firma ilegible de Youchu WANG Fecha: 3 de mayo 2005.

Reconocimiento

Estado de Canadá- Provincia de Québec

El 3 de mayo de 2005, Youchu WANG compareció personalmente ante mí, conocido por mí como la misma persona descrita y quien suscribió el instrumento anterior, y reconoció que el mismo lo suscribió, por su propia voluntad y para los fines establecidos.

Firma y sello de Notario público Line Martin- Canadá- Provincia de Québec. Su cargo es vitalicio.

Página 5 de 6 Traspaso de invención Solicitud provisional Patente Rollo: 016017 Cuadro: 0270

Casillero No. WYTH0113-001 (AM101867L1) Patente

Firma ilegible de P. Sivaramakrishnan Ramamoorthy Fecha: 20- 4- 2005.

Reconocimiento

Estado Nueva Jersey- Condado Middlesex- localidad Monmouth

El 20 de abril de 2005, P. Sivaramakrishnan Ramamoorthy compareció personalmente ante mí, conocido por mí como la misma persona descrita y quien suscribió el instrumento anterior, y reconoció que el mismo lo suscribió, por su propia voluntad y para los fines establecidos.

Firma y sello de Notario público Barbara Lences- de Nueva Jersey. Su cargo vence el 14 diciembre 2007

Firma ilegible de Gary P. Stack Fecha: 18 – 4- 2005.

Reconocimiento

Estado de Nueva Jersey- Condado Middlesex- Localidad Monmouth

El 18 de abril de 2005, Gary P. Stack compareció personalmente ante mí, conocido por mí como la misma persona descrita y quien suscribió el instrumento anterior, y reconoció que el mismo lo suscribió, por su propia voluntad y para los fines establecidos.

Firma y sello de Notario público Barbara Lences. Notario publico de Nueva Jersey Su cargo va hasta el 14 diciembre 2007. Página 6 de 6 Traspaso de invención Solicitud provisional Patente Rollo: 016017 Cuadro: 0271. Registrado el 5- 16- 2005.

Es traducción completa con copia para confrontar. Bogota. Abril 19-07

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

00016

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: *United States of America*

This public document

2. has been signed by P. Swain

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of U.S. Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

6. the twenty-eighth of March, 2007

7. by *Assistant Authentication Officer, United States Department of State*

8. No. 07017765-7

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Patrick O. Hatchett

A 1589793

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office

March 23, 2007

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON May 16, 2005.

By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office

P. SWAIN
Certifying Officer

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.1

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT

CONVEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
Zaen Tong	04/14/2005
Jim Wang	04/12/2005
William DeMaio	04/13/2005
Alvin C. Bach, II	04/18/2005
Ronald A. Jordan	04/13/2005
Youchu Wang	05/03/2005
P. Sivaramakrishnan Ramamoorthy	04/20/2005
Gary P. Stack	04/18/2005

RECEIVING PARTY DATA

Name:	Wyeth
Street Address:	Five Giralda Farms
City:	Madison
State/Country:	NEW JERSEY
Postal Code:	07940

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
Application Number:	60625335

60625335 CH $40.00

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (215)665-2013
Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.
Phone: 215-665-2000
Email: jjiulianti@cozen.com
Correspondent Name: Cozen O'Connor
Address Line 1: 1900 Market Street
Address Line 4: Philadelphia, PENNSYLVANIA 19103

NAME OF SUBMITTER:	Michael P. Straher

Total Attachments: 6
source=60825335 assign#page1.tif
source=60825335 assign#page2.tif
source=60825335 assign#page3.tif
source=60825335 assign#page4.tif
source=60825335 assign#page5.tif
source=60825335 assign#page6.tif

016017

Assignment of Invention

In consideration of the payment by ASSIGNEE to ASSIGNOR of good and valuable consideration, the receipt of which is hereby acknowledged,
ASSIGNOR:

(1) Full Name of Inventor: Zeen TONG
Residence: 3829 Vincent Drive, Collegeville, Pennsylvania 19426
Citizenship: United States of America

---

(2) Full Name of Inventor: Jim WANG
Residence: 133 Margaret Lane, Malvern, Pennsylvania 19355
Citizenship: PR China

---

(3) Full Name of Inventor: William DeMAIO
Residence: 4 Wynnewood Drive, Collegeville, Pennsylvania 19426
Citizenship: United States of America

---

(4) Full Name of Inventor: Alvin C. BACH, II
Residence: 213 Cinnaminson Street, Riverton, New Jersey 08077
Citizenship: United States of America

---

(5) Full Name of Inventor: Ronald A. JORDAN
Residence: 51 Carol Lane, Richboro, Pennsylvania 18954
Citizenship: United States of America

---

(6) Full Name of Inventor: Youchu WANG
Residence: 1100 rue Goulet, Apt. 101, Ville Saint-Laurent, Quebec H4R 2C6, Canada
Citizenship: PR China

---

(7) Full Name of Inventor: P. Sivaramakrishnan RAMAMOORTHY
Residence: 1605 Aspen Drive, Plainsboro, New Jersey 08536
Citizenship: India

---

(8) Full Name of Inventor: Gary P. STACK
Residence: 525 Brookfield Lane, Ambler, Pennsylvania 19002
Citizenship: United States of America

---

hereby by sells, assigns and transfers to ASSIGNEE:

Wyeth
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940

and the successors, assigns and legal representatives of the ASSIGNEE the entire right, title and interest for the United States and its territorial possessions and in all foreign countries, including all rights to claim priority, in and to the invention entitled:
METABOLITES OF CERTAIN [1,4]DIAZEPINO[6,7,1-IJ]QUINOLINE DERIVATIVES AND METHODS OF PREPARATION AND USE THEREOF

and invented by ASSIGNOR and the following additional inventors, if any:

and which is found in U.S. Provisional Application No. 60/625,335 filed on: November 5, 2004
[also check if foreign application(s) is(are) also being assigned]

☒ and any legal equivalent thereof in a foreign country,

the date of filing and application number of said U.S. application when known, to be inserted above, including the right to claim priority, including any and all improvements disclosed therein, and in and to all Letters Patent to be obtained for said invention by the above application or any subsequently filed provisional, nonprovisional, continuation, divisional, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patent any reissue or re-examination thereof.

ASSIGNOR hereby covenants that no assignment, sale, agreement or encumbrance has been or will be made or entered into which would conflict with this assignment.

ASSIGNOR authorizes ASSIGNEE to make applications for and to receive Letters patent for said invention in any of said countries in its own name, or in ASSIGNOR's name, at its election.

ASSIGNOR covenants and agrees to execute or procure any further necessary assurance of the title to said invention and any Letters Patent which may issue therefore and to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE deliver any testimony in any interference, litigation or proceeding related thereto and execute all papers that may be necessary or desirable to perfect the title to said invention or any Letters Patent which may be granted therefore in ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives, and that to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE execute any continuation, continuation-in-part, divisional, renewal or substitute thereof, and as to Letters Patent and reissue or re-examination thereof, or any other additional applications of Letters Patent for said invention or any part thereof, all of which applications and any Letters Patent issuing thereon are hereby assigned to ASSIGNEE, and will make all rightful oaths or declarations, and do all lawful acts requisite for procuring the same therein, without further compensation, but at the expense of ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives.

ASSIGNOR authorizes and requests the Commissioner of Patents to issue any and all Letters Patent of the United States for said invention, resulting from any of the aforesaid applications to its ASSIGNEE.

Zeen TONG — Date: April 14-2005

ACKNOWLEDGMENT

State of Pennsylvania }
ss:
County of Montgomery }

On the 14th day of April 2005, Zeen TONG personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

Notary Public

NOTARIAL SEAL
ROXANNE L. KELLY, Notary Public
Upper Providence Twp., Montgomery County
My Commission Expires May 29, 2005

Jim WANG — Date: April-12-2005

ACKNOWLEDGMENT

State of Pennsylvania }
ss:
County of Montgomery }

On the 12th day of April 2005, Jim WANG personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

NOTARIAL SEAL
BUBNEA D. OWENS, Notary Public
Upper Providence Twp., Montgomery County
My Commission Expires April 7, 2007

Notary Public

Docket No: WYTH0113-001(AM101867L1)
Patent

William DeMaio
William DeMAIO

13 April 2005
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of Pennsylvania }
ss:
County of Montgomery }

On the 13th day of April 2005, William DeMAIO personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

NOTARIAL SEAL
BUBNEA D. OWENE Notary Public
Upper Providence Twp., Montgomery County
My Commission Expires April 7, 2007

Bubnea D. Owene
Notary Public

Alvin C. Bach II
Alvin C. BACH, II

April 18, 2005
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of New Jersey }
ss: Monmouth Junction
County of Middlesex }

On the 18th day of April 2005, Alvin C. BACH, II personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

Barbara L. Lences
Notary Public
BARBARA L. LENCES
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
My Commission Expires Dec. 14, 2007

Ronald A. Jordan — April 13, 2005
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of Pennsylvania }
ss:
County of Montgomery }

On the 13th day of April 2005, Ronald A. Jordan personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

NOTARIAL SEAL
BUBINEA D. OWENS, Notary Public
Upper Providence Twp., Montgomery County
My Commission Expires April 7, 2007

Bubinea D. Owens
Notary Public

Youchu WANG — May 3, 2005
Date

ACKNOWLEDGMENT

~~State of~~ CANADA }
ss:
~~County of~~ PROVINCE OF QUEBEC }

On the 3rd day of May 2005, Youchu WANG personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

Notary Public

Lina MARTIN, notary
for the Province of Quebec, Canada
My commission is for life

Docket No: WYTH0113-001(AM101667L1)
Patent

P. Sivaramakrishnan Ramamoorthy — 4/20/2005
P. Sivaramakrishnan RAMAMOORTHY — Date

ACKNOWLEDGMENT

State of New Jersey } ss: Monmouth Junction
County of Middlesex }

On the 20th day of April 2005, P. Sivaramakrishnan RAMAMOORTHY personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

Barbara C. Leuces
Notary Public
BARBARA C. LEUCES
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
My Commission Expires Dec. 14, 2007

Gary P. Stack — 4/18/05
Gary P. STACK — Date

ACKNOWLEDGMENT

State of New Jersey } ss: Monmouth Junction
County of Middlesex }

On the 18th day of April 2005, Gary P. STACK personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

Barbara C. Leuces
Notary Public
BARBARA C. LEUCES
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
My Commission Expires Dec. 14, 2007

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

PCT

(43) International Publication Date
18 May 2006 (18.05.2006)

(10) International Publication Number
WO 2006/052886 A1

(51) International Patent Classification:
C07D 471/06 (2006.01) *A61K 31/7024* (2006.01)
C07H 15/26 (2006.01) *A61K 31/704* (2006.01)
A61K 31/551 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2005/040289

(22) International Filing Date:
4 November 2005 (04.11.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/625,335 5 November 2004 (05.11.2004) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: WYETH [US/US]; Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940 (US).

(72) Inventors; and

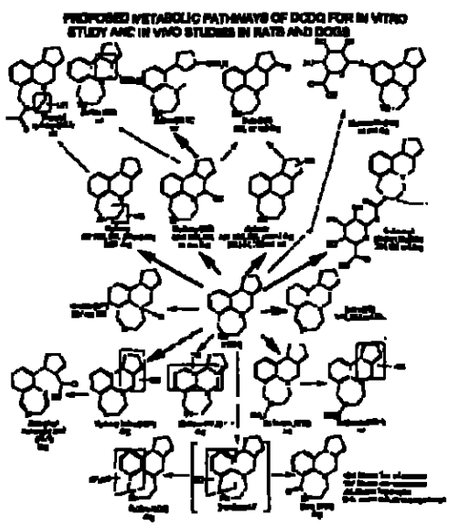
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: BACH II, Alvin, C. [US/US]; 213 Cinnaminson Street, Riverton, New Jersey 08077 (US). RAMAMOORTHY, Sivaramakrishnan [IN/US]; 1605 Aspen Drive, Plainsboro, New Jersey 08536 (US). TONG, Zeen [US/US]; 3829 Vincent Drive, Collegeville, Pennsylvania 19426 (US). WANG, Jim [CN/US]; 133 Margaret Lane, Malvern, Pennsylvania 19355 (US). DEMAIO, William [US/US]; 4 Wynnwood Drive, Collegeville, Pennsylvania 19426 (US). JORDAN, Ronald, A. [US/US]; 51 Carol Lane, Richboro, Pennsylvania 18954 (US). STACK, Gary, Paul [US/US]; 526 Brookfield Lane, Ambler, Pennsylvania 19002 (US). WANG, Youchu [CA/CA]; 51 Elmo Deslauriers, Sainte-Anne-de-Bellevue, Quebec H9X 4C5 (CA).

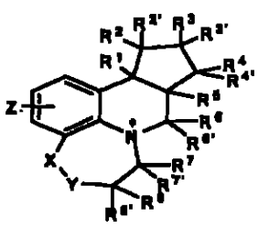
(74) Agents: STRAHER, Michael, P. et al.; Cozen O'Connor, 1900 Market Street, Philadelphia, PA 19103-3508 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI,

[Continued on next page]

(54) Title: METABOLITES OF CERTAIN [1,4]DIAZEPINO[6,7,1-*IJ*]QUINOLINE DERIVATIVES AND METHODS OF PREPARATION AND USE THEREOF





(I)

(57) Abstract: The invention relates to metabolites of certain [1,4]diazepino[6,7,1-*ij*-]quinoline derivatives and methods of preparation and use thereof. Specifically, the invention relates to compounds of formula I wherein the various substituents are defined herein. The invention also provides pharmaceutical compositions including compounds of formula I, methods of making such compounds, and methods of using such compounds.

WO 2006/052886 A1

NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Designated States** *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *with international search report*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

METABOLITES OF CERTAIN [1,4]DIAZEPINO[6,7,1-*IJ*]QUINOLINE DERIVATIVES AND METHODS OF PREPARATION AND USE THEREOF

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to metabolites of certain [1,4]diazepino[6,7,1-*ij*]quinoline derivatives, which are useful as antipsychotic and antiobesity agents, to processes for their preparation, to pharmaceutical compositions containing them, and to methods of using them.

BACKGROUND OF THE INVENTION

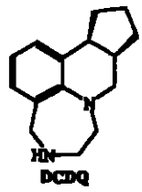
Schizophrenia affects approximately 5 million people. At present, the most widespread treatments for schizophrenia are the 'atypical' antipsychotics, which combine dopamine (D2) receptor antagonism with serotonin ($5\text{-}HT_{2A}$) receptor antagonism. Despite the reported advances in efficacy and side-effect liability of atypical antipsychotics over typical antipsychotics, these compounds do not adequately treat all of the symptoms of schizophrenia and are accompanied by problematic side effects including weight gain (Allison, D. B., et. al., Am. J. Psychiatry, 156: 1686-1696, 1999; Masand, P. S., Exp. Opin. Pharmacother. I: 377-389, 2000; Whitaker, R., Spectrum Life Sciences. Decision Resources. 2:1-9, 2000). Novel antipsychotics which are effective in treating the mood disorders or the cognitive impairments in schizophrenia without producing weight gain would represent a significant advance in the treatment of schizophrenia.

$5\text{-}HT_{2C}$ agonists and partial agonists represent a novel therapeutic approach toward the treatment of schizophrenia. Several lines of evidence support a role for $5\text{-}HT_{2C}$ receptor agonism as a treatment for schizophrenia. Studies with $5\text{-}HT_{2C}$ antagonists suggest that these compounds increase synaptic levels of dopamine and may be effective in animal models of Parkinson's disease (Di Matteo, V., et. al., Neuropharmacology 37: 265-272, 1998; Fox, S. H., et. al., Experimental Neurology 151: 35-49, 1998). Since the positive symptoms of schizophrenia are associated with increased levels of dopamine, compounds with actions opposite those of $5\text{-}HT_{2C}$

antagonists such as 5-HT_{2C} agonists and partial agonists should reduce levels of synaptic dopamine. Recent studies have demonstrated that 5-HT_{2C} agonists decrease levels of dopamine in the prefrontal cortex and nucleus accumbens (Millan, M. J., et. al., Neuropharmacology 37: 953-955, 1998; Di Matteo, V., et. al., Neuropharmacology 38: 1195-1205, 1999; Di Giovanni, G., et. al., Synapse 35: 53-61, 2000), brain regions that are thought to mediate critical antipsychotic effects of drugs like clozapine. In contrast, 5-HT_{2C} agonists do not decrease dopamine levels in the striatum, the brain region most closely associated with extrapyramidal side effects. In addition, a recent study demonstrates that 5-HT_{2C} agonists decrease firing in the ventral tegmental area (VTA), but not in substantia nigra. The differential effects of 5-HT_{2C} agonists in the mesolimbic pathway relative to the nigrostriatal pathway suggests that 5-HT_{2C} agonists will have limbic selectivity and will be less likely to produce extrapyramidal side effects associated with typical antipsychotics.

Atypical antipsychotics bind with high affinity to 5-HT_{2C} receptors and function as 5-HT_{2C} receptor antagonists or inverse agonists. Weight gain is a problematic side effect associated with atypical antipsychotics such as clozapine and olanzapine and it has been suggested that 5-HT_{2C} antagonism is responsible for the increased weight gain. Conversely, stimulation of the 5-HT_{2C} receptor is known to result in decreased food intake and body weight (Walsh et. al., Psychopharmacology 124: 57-73, 1996; Cowen, P. J., et. al., Human Psychopharmacology 10: 385-391, 1995; Rosenzweig-Lipson, S., et. al., ASPET abstract, 2000). As a result, 5-HT_{2C} agonists and partial agonists will be less likely to produce the body weight increases associated with current atypical antipsychotics. Indeed, 5-HT_{2C} agonists and partial agonists are of great interest for the treatment of obesity, a medical disorder characterized by an excess of body fat or adipose tissue and associated with such comorbidities as Type II diabetes, cardiovascular disease, hypertension, hyperlipidemia, stroke, osteoarthritis, sleep apnea, gall bladder disease, gout, some cancers, some infertility, and early mortality.

The compound (9aR,12aS)-4,5,6,7,9,9a,10,11,12,12a-decahydro-cyclopenta[c][1,4]diazepine[6,7,1-*ij*]quinoline (hereafter DCDQ):

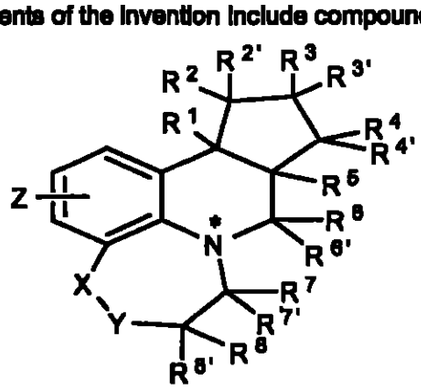


DCDQ

is a potent 5-HT_{2C} agonist. See related published applications WO03/091250 and US2004/0009970, each of which is incorporated by reference herein in its entirety. DCDQ can also be effective in treating the mood disorders or the cognitive impairments associated with schizophrenia. DCDQ is converted, in several in vitro and in vivo models, into several metabolites. It can be seen that these metabolites are of interest in treating those diseases, disorders, or conditions treatable by DCDQ, itself as is or as a prodrug which converts to DCDQ. These metabolites could also be useful for further studying the effects of DCDQ. This invention is directed to these, as well as other, important ends.

SUMMARY OF THE INVENTION

Some embodiments of the invention include compounds formula I



I

wherein:

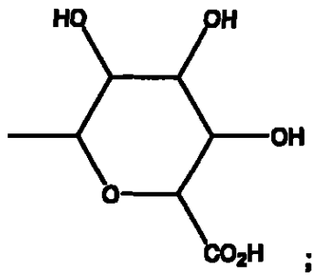
for each R^n and $R^{n'}$, where n is 1 through 8:

each R^n and $R^{n'}$ is independently hydrogen, hydroxy, $CH_3C(O)$-O-, -OSO_3H, or -O-G; or

R^n and the corresponding $R^{n'}$, where n is 2, 3, 4, 6, 7, or 8, taken together with the carbon to which they are attached, form C=O; or

R^n along with the corresponding R^{n+1}, where n is 1, 2, 3, 4, 5, or 7, taken together form a double bond between the carbons to which they are attached, and each corresponding $R^{n'}$ and $R^{(n+1)'}$ is independently hydrogen, hydroxy, $CH_3C(O)$-O, $-OSO_3H$, or -O-G;

G has the formula:



;

wherein the nitrogen denoted with the symbol * can optionally form an N-oxide;

X-Y is CH=N, CH=N(O), $CH_2N(O)$, C(O)NH or CR^9HNR^{10};

R^9 is hydrogen, hydroxyl, or $-OSO_3H$;

R^{10} is hydrogen, acetyl, $-SO_3H$, -G, or -C(O)-OG;

Z is hydrogen, hydroxy, $-OSO_3H$, or -O-G;

with the proviso that when Z is hydroxy, then either (a) one of R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, and R^{10} is not hydrogen; or (b) X-Y is not CR^9HNR^{10}; and

with the further proviso that when X-Y is CHR^9NR^{10}, then at least one of Z, R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, and R^{10} is not H.

In some embodiments, the invention provides compounds according to Formula I, wherein at least one of Z and R^1 through R^6 is –OH.

In some embodiments, the invention provides compounds according to Formula I wherein at least one of R^1 through R^6, R^9, R^{10}, and Z is –C(O)-O-G, –O-G, or -G.

In some embodiments, the invention provides compounds according to Formula I, wherein at least one of R^1 through R^9, and Z is $-OSO_3H$.

In some embodiments, the invention provides compounds according to Formula I, wherein X-Y is CR^9HNR^{10}, where R^9 is H and R^{10} is $-SO_3H$.

In some embodiments, the invention provides compounds according to Formula I, wherein R^n and corresponding $R^{n'}$ taken together with the carbon to which they are attached form C=O.

In some embodiments, the invention provides compounds according to Formula I, wherein X-Y is C(O)NH.

In some embodiments, the invention provides compounds according to Formula I, wherein X-Y is CH=N.

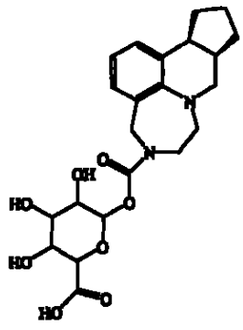
In some embodiments, the invention provides compounds according to Formula I, wherein at least one of R^n and its corresponding R^{n+1}, where n = 1-5, together form a double bond between the carbons to which they are attached and each R^n and $R^{(n+1)}$ is independently hydrogen, hydroxy, $CH_3C(O)$-O, -OSO_3H, or -O-G.

In some embodiments, the invention provides isolated or substantially pure forms of compounds of Formula I, having at least 75% purity. In other embodiments, the invention provides compounds of Formula I having at least 80% purity. In other embodiments, the invention provides compounds of Formula I having at least 85% purity. In other embodiments, the invention provides compounds of Formula I having at least 90% purity. In other embodiments, the invention provides compounds of Formula I having at least 95% purity.

In some embodiments, the invention provides pharmaceutical compositions including compounds of formula I.

In some embodiments, the invention provides methods of treating conditions, diseases, or disorders associated with $5HT_{2C}$ by administering compounds of Formula I or pharmaceutical compositions comprising compounds of Formula I to a patient in need thereof.

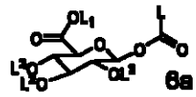
In some embodiments, the invention provides a method of preparing a compound of formula M8:



M8

comprising:

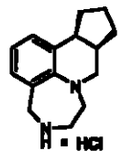
reacting Compound 6a:



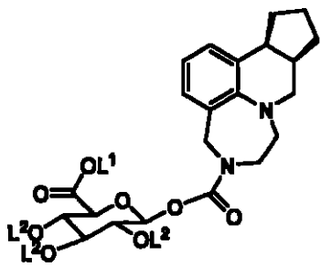
6a

where each L, L^1, and L^2 is a leaving group;

with DCDQ:



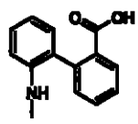
in the presence of a coupling reagent under conditions sufficient to yield compound 7:



7 ;

and removing said leaving groups L^1 and L^2 to form compound M6.

In some embodiments, the invention provides methods wherein L has the formula:



In some embodiments, the invention provides methods wherein L^1 and L^2 are independently selected from lower alkyl and acetyl, such as when L^1 is methyl and each L^2 is acetyl.

Preferred coupling reagents are (Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP), N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC), and 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC).

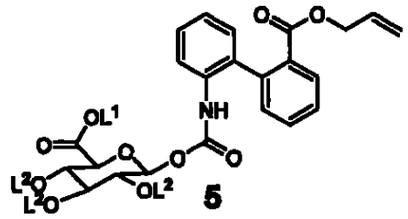
In some embodiments, the invention provides a method further comprising deprotecting compound 7 by removing the L^1 and L^2 protecting groups of the glucuronyl moiety of compound 7, thereby forming the M6 metabolite. In some embodiments, the deprotecting step is performed in alcohol, preferably a lower alkyl alcohol, in the presence of a base, preferably NaOH, LiOH, or KOH. In some preferred embodiments, $LiOH \cdot H_2O$ in $MeOH/H_2O/THF$ is used in a preferred ratio of approximately 2.5:1.0:0.5. In some embodiments, the deprotection reaction is carried out at 0 °C for 1 hour.

In some embodiments, the reaction of compound 6 with the coupling reagent and DCDQ is carried out in the presence of an amine, preferably Hünig's base. This reaction is preferably performed in a solvent, such as CH_2Cl_2.

In some embodiments, compound 7 is subjected to column chromatography purification prior to deprotection.

In some embodiments, the invention further provides for purifying the M6 metabolite.

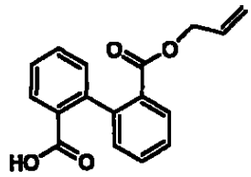
In some embodiments, the invention provides methods where compound 6a is prepared by removing the allyl protecting group of compound 5:



5

using a catalyst and a nucleophile, preferably morpholine. In some embodiments, the catalyst is $Pd(PPh_3)_4$.

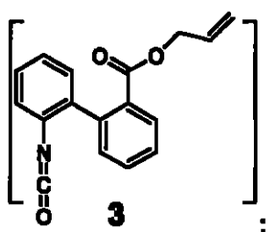
In some embodiments, the invention provides methods wherein compound 5 is prepared by reacting carboxylic acid 2:



2

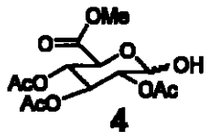
with DPPA under conditions sufficient to yield an acyl azide intermediate;

heating resultant acyl azide intermediate under conditions sufficient to yield isocyanate 3:



3 ; and

treating result of said heating step with 2,3,4,-triacetyl-1-hydroxyglucoronic ester 4:



4

under conditions sufficient to yield compound 5. In some embodiments, the reacting step is carried out in the presence of a base, preferably Et_3N.

In some embodiments, the invention provides methods wherein compound 2 is prepared by reacting diphenic anhydride with excess allyl alcohol, preferably prop-2-en-1-ol, in the presence of a catalyst , preferably DMAP.

These and other embodiments of the invention will be apparent to those of skill in the art upon reading this disclosure.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 is a flowchart of proposed metabolic pathways of DCDQ identified in the in vitro and in vivo studies.

FIG. 2 is a further flowchart of proposed metabolic pathways of DCDQ identified in rat biliary excretion studies.

FIG. 3 is a further flowchart of proposed metabolic pathways of DCDQ identified in mice.

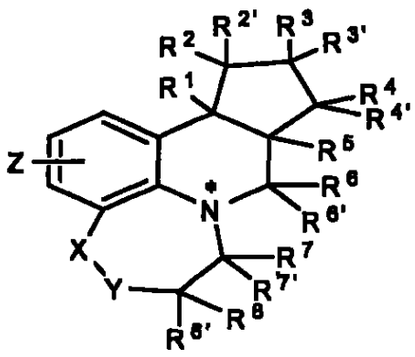
FIG. 4 is a further flowchart of proposed metabolic pathways of DCDQ identified in human plasma.

FIG. 5 depicts structures and NMR numbering schemes for DCDQ, M7, M9 and M13 as identified in the rat biliary excretion studies.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

In some aspects, this invention relates to metabolites of DCDQ, methods of preparing them, and methods of using them to treat various disorders.

In some aspects, the present invention provides compounds of formula (I)



I

wherein:

for each R^n and $R^{n'}$, where n is 1 through 8:

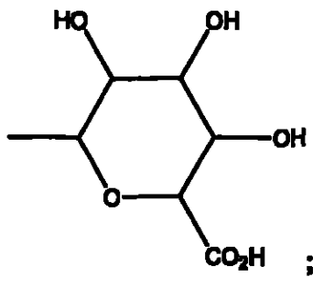
each R^n and $R^{n'}$ is independently hydrogen, hydroxy, $CH_3C(O)$-O, $-OSO_3H$, or -O-G; or

R^n and the corresponding $R^{n'}$, where n is 2, 3, 4, 6, 7, or 8, taken together with the carbon to which they are attached, form C=O; or

R^n along with the corresponding R^{n+1}, where n is 1, 2, 3, 4, 5, or 7, taken together form a double bond between the carbons to which they are attached, and each corresponding $R^{n'}$ and $R^{(n+1)'}$ is independently hydrogen, hydroxy, $CH_3C(O)$-O, $-OSO_3H$, or -O-G;

wherein the nitrogen denoted with the symbol * can optionally form an N-oxide;

G has the formula:



;

X-Y is CH=N, CH=N(O), $CH_2N(O)$, C(O)NH or CR^9HNR^{10};

R^9 is hydrogen, hydroxyl, or $-OSO_3H$; and

R^{10} is hydrogen, acetyl, $-SO_3H$, -G. or -C(O)-OG;

Z is hydrogen, hydroxy, $-OSO_3H$, or -O-G, with the proviso that when Z is hydroxy, then either (a) one of R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, and R^{10} is not hydrogen; or (b) X-Y is not CR^9HNR^{10};

with the further proviso that when X-Y is CHR^9NR^{10}, then at least one of Z, R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, and R^{10} is not H.

Methods for the preparation of DCDQ (i.e., the compound of Formula I where X-Y is CHR^9NR^{10} and each of Z, and R^1 through R^{10} is H) is disclosed in U.S. Patent Application Publication No. US2004/0009970, hereby incorporated by reference herein in its entirety. DCDQ itself is not intended to be within the compounds of Formula I disclosed herein.

In some embodiments, the invention provides hydroxy compounds of formula I. Preferably, at least one of Z and R^1 through R^8 is hydroxy.

In some embodiments, the invention further provides hydroxy compounds of formula I where X-Y is CR^9HNR^{10}. Some examples of such hydroxy compounds include those where:

R^9 and R^{10} are each H;

at least one of R^7 and R^8 is –OH;

R^8 is –OH;

at least one of R^3 and R^4 is –OH; or

at least one of R^1, R^5, R^6, R^7, and Z is –OH.

In other embodiments, the invention provides hydroxy compounds of formula I where X-Y is CR^9HNR^{10} and R^{10} is acetyl. Some preferred examples of such hydroxyl compounds include those where:

at least one of R^7 and R^8 is –OH;

In other embodiments, the invention provides hydroxy compounds of formula I wherein X-Y is C=N. In some preferred embodiments, at least one of R^1 through R^6 is -OH. In other preferred embodiments, at least one of R^2 through R^4 is -OH.

In other embodiments, the invention provides glucuronyl compounds according to formula I, wherein at least one of R^1 through R^6, R^9, R^{10}, and Z is -C(O)-O-G, -O-G, or -G.

In some preferred embodiments, the invention provides glucuronyl compounds where X-Y is CR^9HNR^{10}. In some preferred embodiments, R^9 and R^{10} are H. In other preferred embodiments, at least one of Z, R^3, and R^4 is -O-G. In other preferred embodiments, at least one of R^1 through R^6, R^9, and Z is –O-G.

In still further embodiments, the invention provides glucuronyl compounds of formula I where R^2 along with R^3 taken together form a double bond between the carbons to which they are attached, and at least one of $R^{3'}$ and R^4 is –O-G.

In other embodiments, the invention provides glucuronyl compounds of formula I where R^{10} is -C(O)O-G or -G. In some embodiments, such compounds are further provided where R^4 and $R^{4'}$ together with the carbon to which they are attached form C=O.

In some embodiments, the invention provides glucuronyl compounds where X-Y is $–CHR^9NR^{10}$ where R^{10} is –C(O)-O-G.

In some preferred embodiments, the invention provides compounds of formula I wherein Z, each R^n and $R^{n'}$ is H, X-Y is $–CHR^9NR^{10}$. In some such embodiments, R^9 is H. In preferred embodiments, R^9 is H and R^{10} is –C(O)-O-G.

In other embodiments, the invention provides glucuronyl compounds of formula I, where R^{10} is acetyl. In a preferred embodiment, such derivatives are further provided where at least one of R^1 through R^6, R^9, and Z is –O-G. In still other embodiments, at least one of R^7 and R^8 is –O-G.

In some embodiments, the invention provides sulfate compounds according to formula I where at least one of R^1 through R^9, and Z is $-OSO_3H$.

In some preferred embodiments, the invention provides such sulfate compounds where X-Y is $–CHR^9NR^{10}$. In some such embodiments, R^9 and R^{10} each are H. In some such embodiments, at least one of R^1 through R^6 is $–OSO_3H$. In further embodiments, at least one of R^2 and R^3 is $-OSO_3H$. In some embodiments, R^3 is $–OSO_3H$.

In some embodiments, the invention provides sulfate compounds of formula I, where at least one of R^9 and Z is $-OSO_3H$.

In some embodiments, the invention provides sulfamate compounds according to formula I. In some embodiments, the invention provides such sulfamate compounds where X-Y is CR^9HNR^{10}, and R^{10} is $-SO_3H$. In other embodiments, the invention provides such sulfamate compounds where at least two of R^n and its corresponding R^{n+1}, where n = 1-5, form a double bond between the carbons to which they are attached.

In some embodiments, the invention provides keto compounds according to formula I, where R^n and its corresponding $R^{n'}$ taken together with the carbon to which they are attached form C=O. In some preferred embodiments, n = 4. In further preferred embodiments, X-Y is CR^9HNR^{10} and preferably R^{10} is –G. In other embodiments, R^9 and R^{10} are H.

Other embodiments of keto compounds according to formula I provide compounds where X-Y is C(O)NH.

In some embodiments, the invention provides imine compounds according to formula I. In some embodiments, X-Y is CH=N. In some such embodiments, at least one of R^1 through R^8 is -OH. In other such embodiments, at least one of R^2 through R^4 is -OH. In still other such embodiments, the compound may be an N-oxide, wherein the nitrogen between the carbons to which R^6 and R^7 are attached forms an N-oxide.

In still further embodiments, the invention provides dehydro compounds of formula I, containing one or more double bonds. In these embodiments, such compounds are provided wherein at least one of R^n and its corresponding R^{n+1}, where n = 1-5, together form a double bond between the carbons to which they are attached and each $R^{n'}$ and $R^{(n+1)'}$ is independently hydrogen, hydroxy, $CH_3C(O)$-O, $-OSO_3H$, or -O-G. In some preferred embodiments, n = 2. In further preferred embodiments, *n*=2, $R^{2'}$ = H, and $R^{3'}$ or R^4 is -O-G. In still further embodiments, X-Y is CHR^9NR^{10}, where R^9 and R^{10} are preferably H.

In other embodiments, di-dehydro compounds of formula I are provided, where for at least two R^n, each said R^n and its corresponding R^{n+1}, where n = 1-5, together form a double bond between the carbons to which they are attached. In some preferred embodiments, the invention further provides that X-Y = CHR^9NR^{10}.

In further embodiments, R^{10} is H; and Z or R^9 is $-OSO_3H$. In still other embodiments, X-Y = CHR^9NR^{10} and $R^9 = R^{10} = H$.

In some embodiments, the invention provides such di-dehydro compounds of formula I where R^{10} is $-SO_3H$, or acetyl.

In some aspects of the invention, the compounds of formula I are provided in isolated form.

In other aspects of the inventions, the compounds of formula I are provided is substantially pure form of at least 75% purity. In other aspects, the compounds are at least 80% pure. In other aspects, the compounds are at least 85% pure. In other aspects, the compounds are at least 90% pure. In other aspects, the compounds are at least 95% pure.

Acetyl, as used herein, refers to CH_3-C(=O)-.

Alkyl, as used herein, refers to an aliphatic hydrocarbon chain, e.g., of 1 to 8 carbon atoms, and includes, but is not limited to, straight and branched chains such as methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, sec-butyl, t-butyl, n-pentyl, isopentyl, neo-pentyl, n-hexyl, and isohexyl. Lower alkyl refers to alkyl having 1 to 3 carbon atoms.

BOP refers to (Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate.

Carbamoyl, as used herein, refers to the group, -C(=O)N<.

DCC refers to N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide.

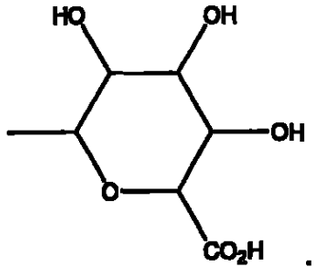
DIBAH and DIBAL refer, interchangeably, to diisobutylaluminum hydride.

DMAP refers to 4-dimethylaminopyridine.

DPPA refers to diphenylphosphoryl azide.

EDC refers to 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride.

Glucuronyl, as used herein, refers to the group:



Halogen (or halo) as used herein refers to chlorine, bromine, fluorine and iodine. Hünig's Base is N,N-diisopropylethylamine, also indicated herein as *i*-Pr_2NEt.

PyBOP refers to (Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate.

The compounds of this invention contain asymmetric carbon atoms and thus give rise to optical isomers and diastereoisomers. The present invention includes such optical isomers and diastereoisomers; as well as the racemic and resolved, enantiomerically pure R and S stereoisomers; as well as other mixtures of the R and S stereoisomers and pharmaceutically acceptable salts thereof.

Where an enantiomer is preferred, it may, in some embodiments be provided substantially free of the corresponding enantiomer. Thus, an enantiomer substantially free of the corresponding enantiomer refers to a compound which is isolated or separated via separation techniques or prepared free of the corresponding enantiomer. "Substantially free," as used herein, means that the compound is made up of a significantly greater proportion of one enantiomer. In preferred embodiments, the compound is made up of at least about 90% by weight of a preferred enantiomer. In other embodiments of the invention, the compound is made up of at least about 99% by weight of a preferred enantiomer. Preferred enantiomers may be isolated from racemic mixtures by any method known to those skilled in the art, including high performance liquid chromatography (HPLC) and the formation and crystallization of chiral salts or prepared by methods described herein. See, for example, Jacques, et al., Enantiomers, Racemates and Resolutions (Wiley Interscience, New York, 1981); Wilen, S.H., et al., Tetrahedron 33:2725 (1977); Eliel, E.L. Stereochemistry of Carbon Compounds (McGraw-Hill, NY, 1962); Wilen, S.H. Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions p. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN 1972).

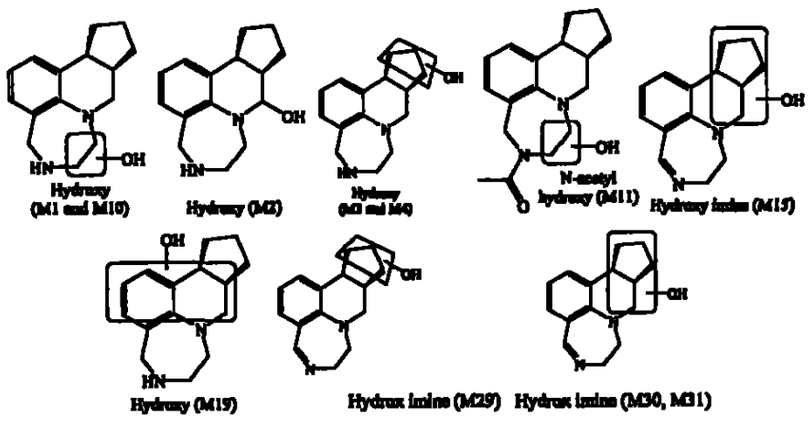
One skilled in the art will also recognize that it is possible for tautomers to exist of formula (I). The present invention includes all such tautomers even though not shown in formula (I).

The compounds useful in the present invention also include pharmaceutically acceptable salts of the compounds of formula (I). By "pharmaceutically acceptable salt", it is meant any compound formed by the addition of a pharmaceutically acceptable base and a compound of formula (I) to form the corresponding salt. By

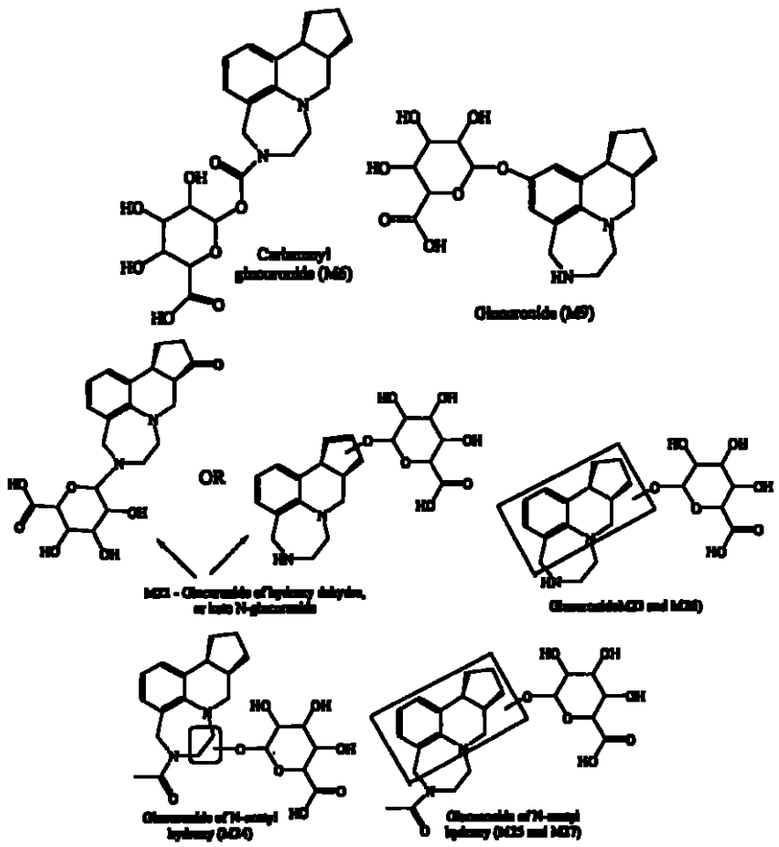
the term "pharmaceutically acceptable" it is meant a substance that is acceptable for use in pharmaceutical applications from a toxicological perspective and does not adversely interact with the active ingredient. Pharmaceutically acceptable salts, including mono- and bi- salts, include, but are not limited to, those derived from such organic and inorganic acids such as, but not limited to, acetic, lactic, citric, cinnamic, tartaric, succinic, fumaric, maleic, malonic, mandelic, malic, oxalic, propionic, hydrochloric, hydrobromic, phosphoric, nitric, sulfuric, glycolic, pyruvic, methanesulfonic, ethanesulfonic, toluenesulfonic, salicylic, benzoic, and similarly known acceptable acids.

Non-limiting, examples of compounds of Formula I include those identified through the in vitro and in vivo studies detailed herein, and shown in the metabolic pathways depicted in Figs. 1-4. Such examples include those shown below. Where the attachment of a given substituents is described by a box, it is intended that the indicated substituent can be attached to any one or more available carbon atoms within the box.

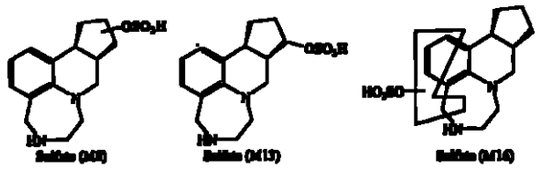
Hydroxy metabolites



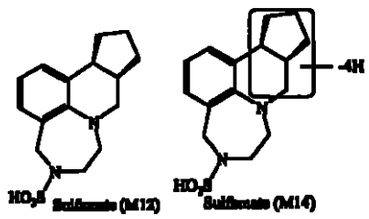
Glucuronyl metabolites



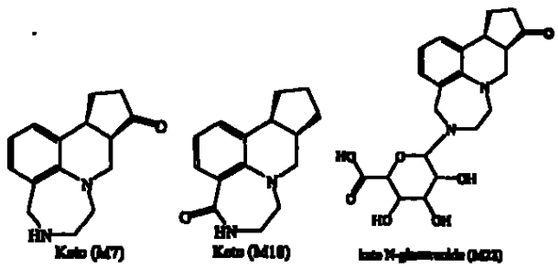
Sulfate compounds



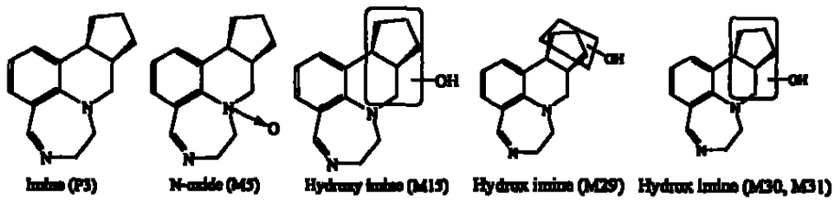
Sulfamate compounds



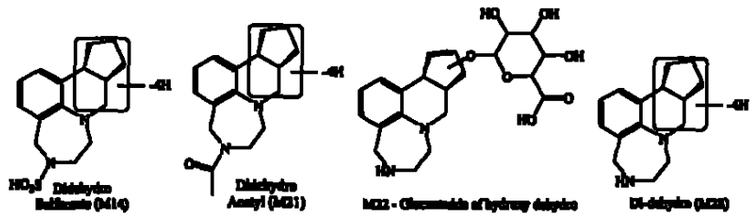
Keto Compounds



Imine compounds

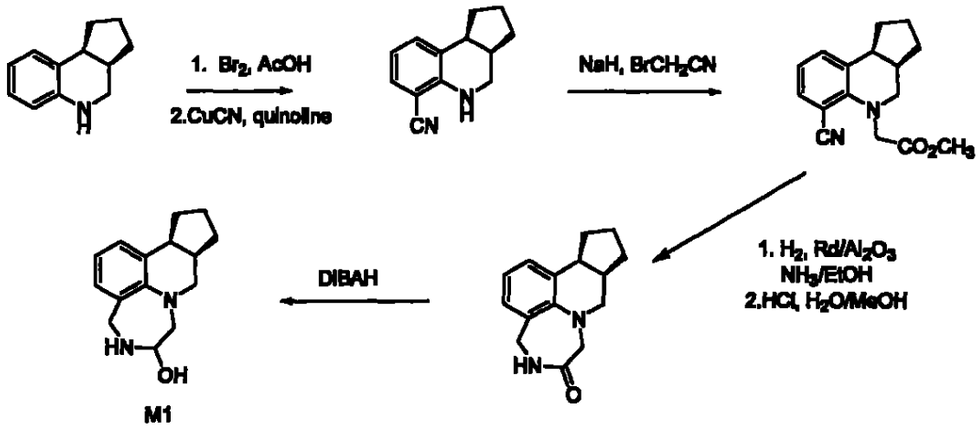


Dehydro compounds

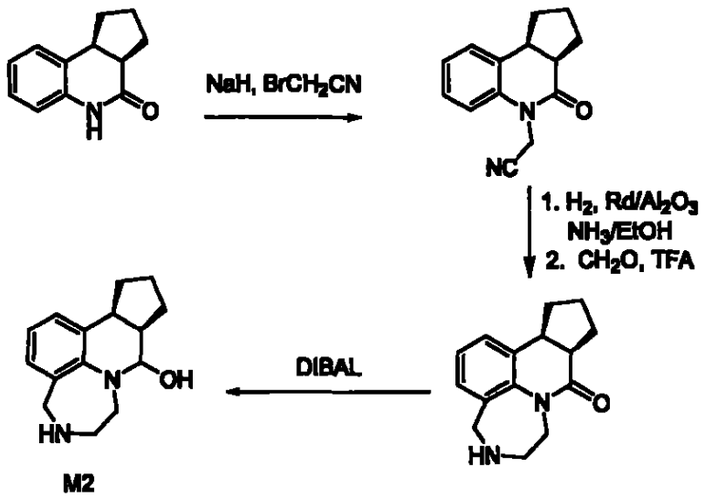


EXEMPLARY SYNTHESES

Proposed Synthesis For Hydroxy Metabolite M1

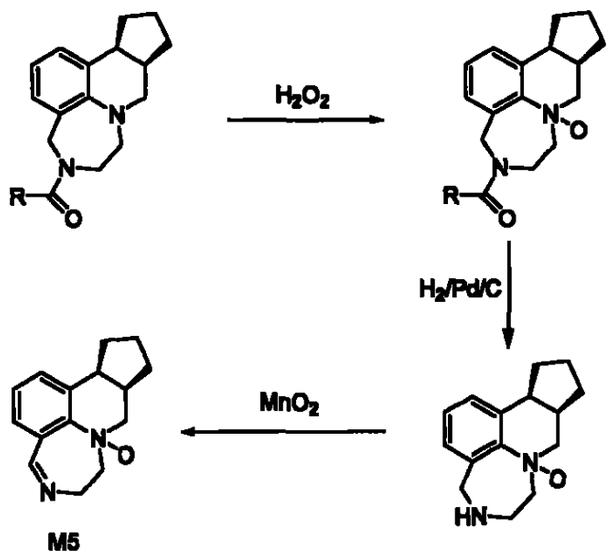


Proposed Synthesis Of Hydroxy Metabolite M2



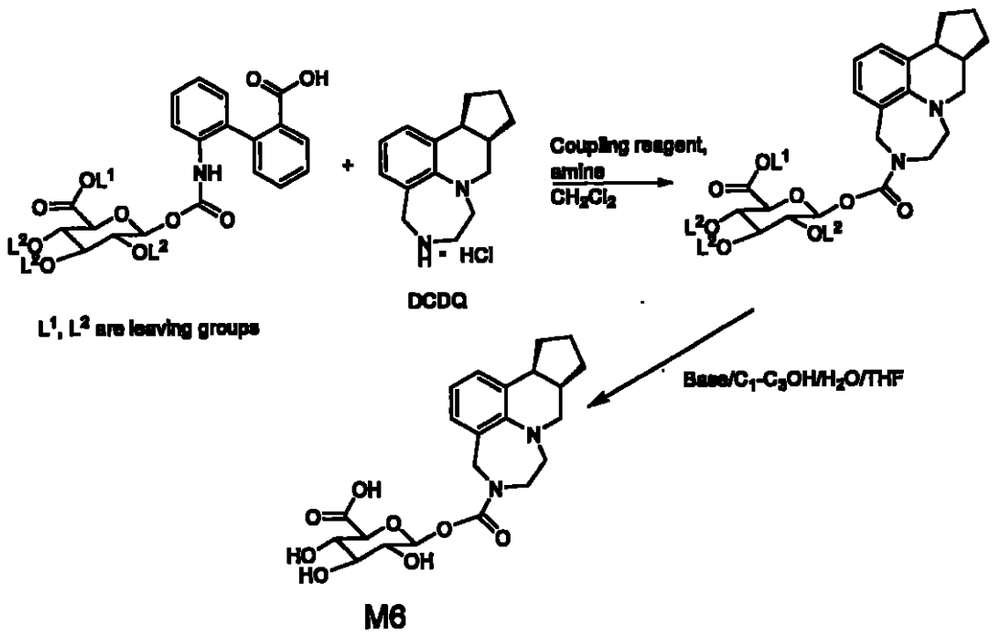
M2

Proposed Synthesis Of N-Oxide Metabolite M5

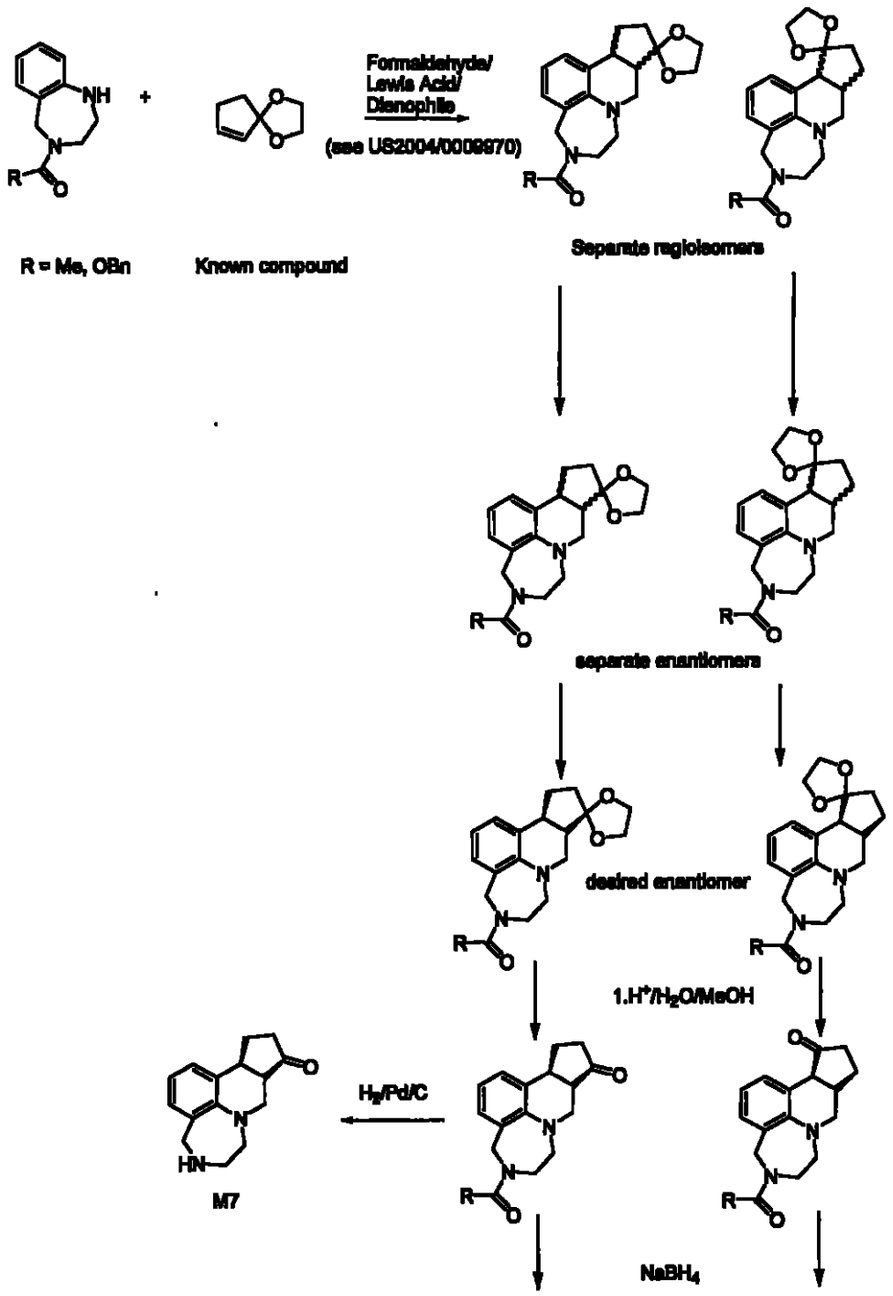


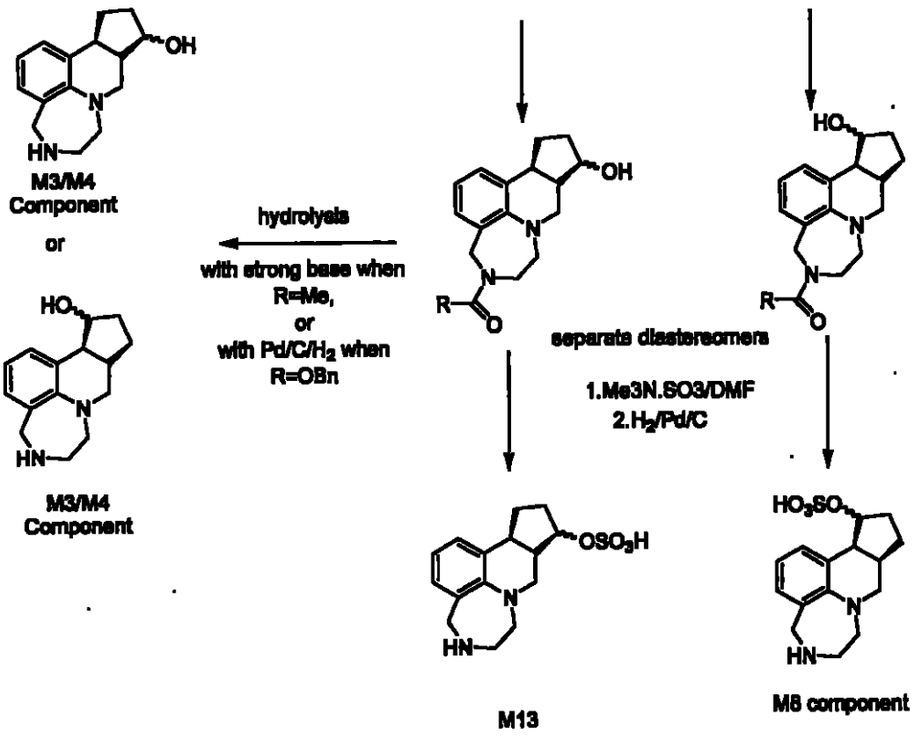
M5

Synthesis For Carabamoyl Glucuronyl Metabolite M6

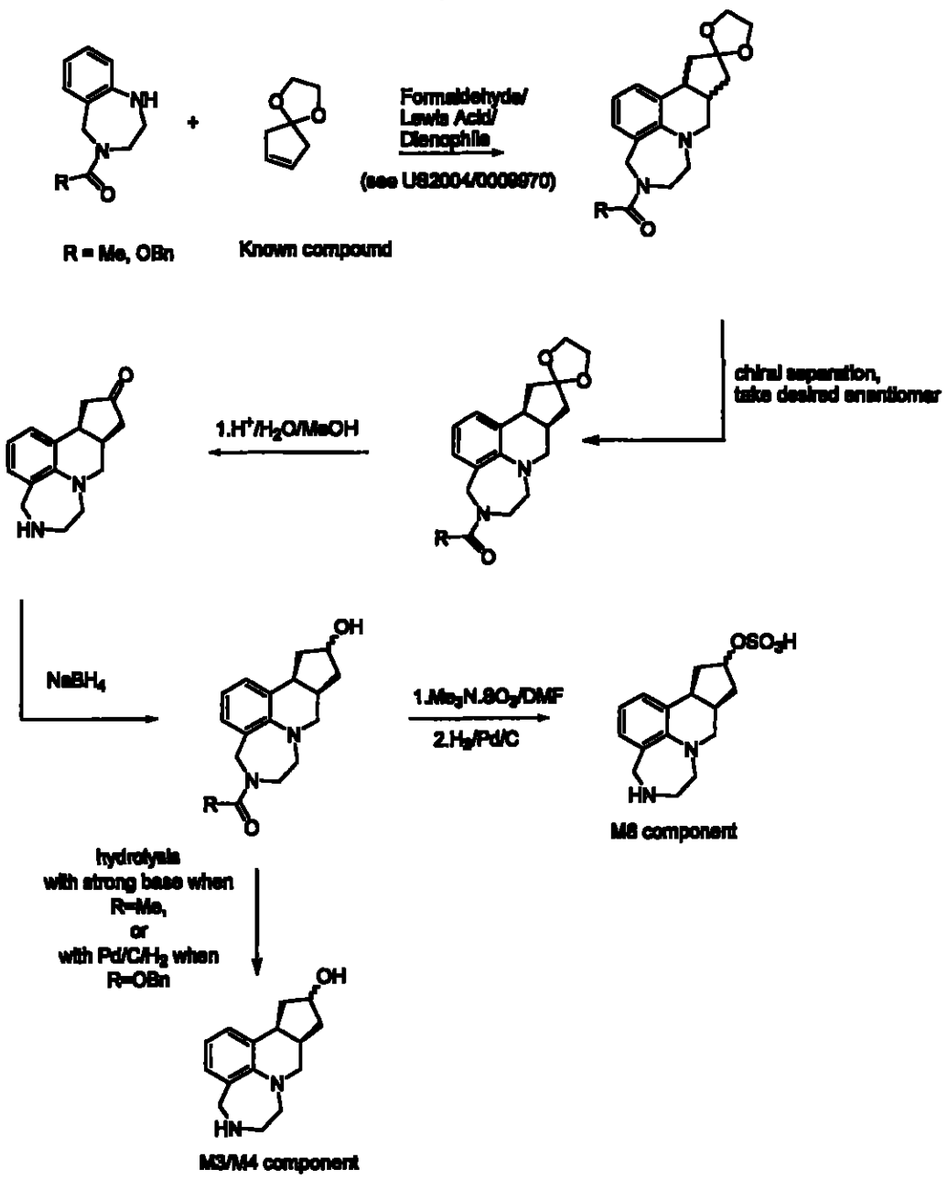


Proposed Syntheses For Hydroxy Metabolites M3 And M4, Keto Metabolite M7, And Sulfate Metabolites M8 And M13

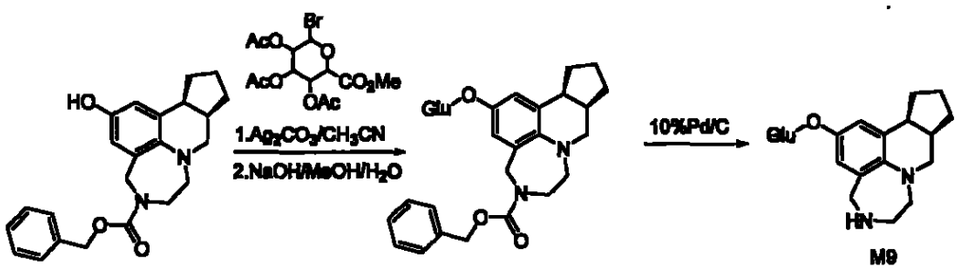



M3/M4
Component
or
M3/M4
Component
hydrolysis
with strong base when
R=Me,
or
with Pd/C/H2 when
R=OBn
separate diastereomers
1.Me3N.SO3/DMF
2.H2/Pd/C
M13
M8 component

Proposed Synthesis Of Additional Component Of Sulfate Metabolite M8

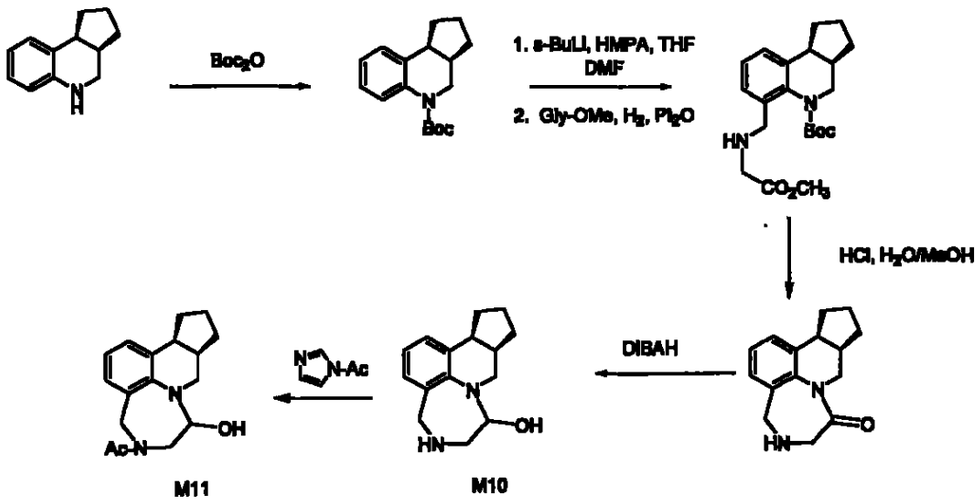


Proposed Synthesis Of Glucuronyl Metabolite M9



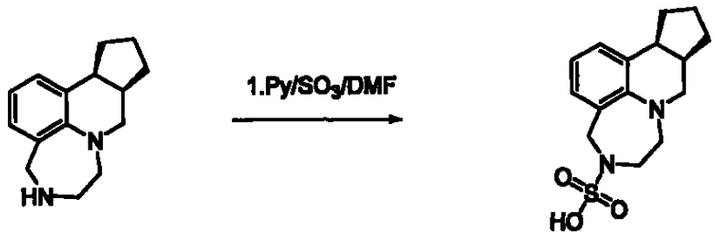
M9

Proposed Synthesis Of Hydroxy Metabolite M10 And N-Acetyl Hydroxy Metabolite M11



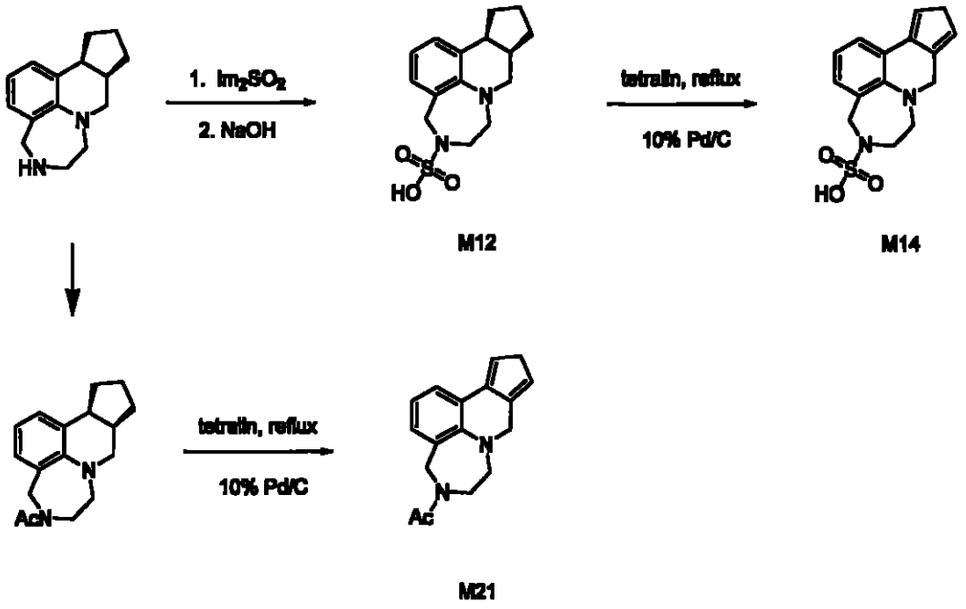
M11 M10

Proposed Synthesis Of Sulfamate Metabolite M12

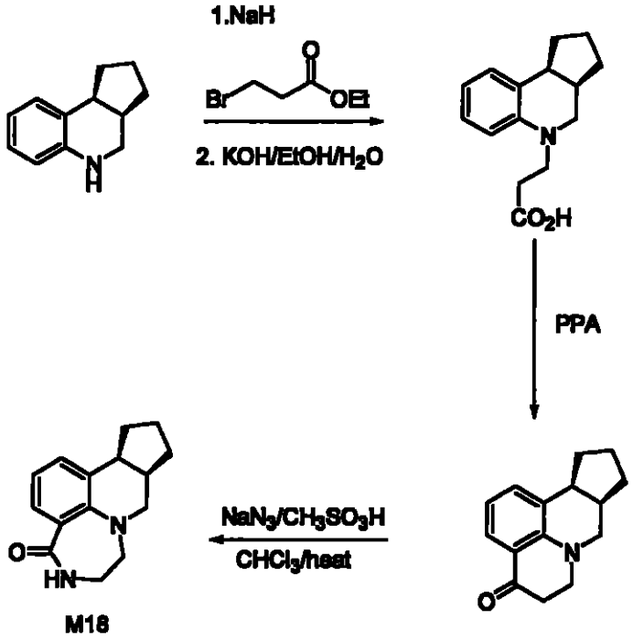


M12

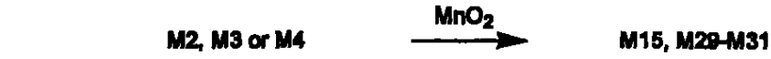
Proposed Syntheses For Sulfamate Metabolite M12, Di-Dehydro Sulfamate M14, And N-Acetyl Di-Dehydro Metabolite M21



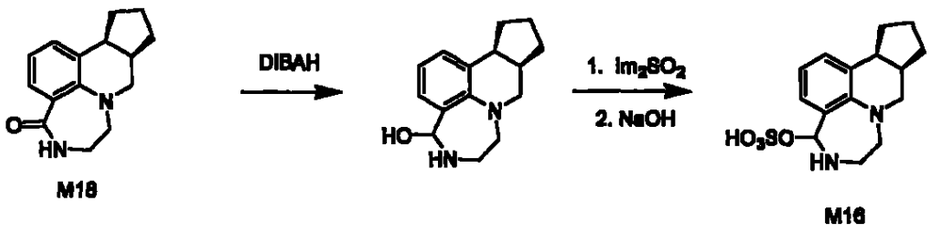
Proposed Synthesis Of Keto Metabolite M18



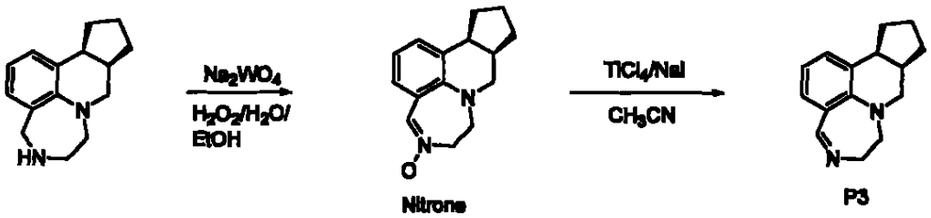
Proposed Syntheses For Hydroxy Imine Metabolites M15, And M29-M31



Proposed Synthesis For Sulfamate Metabolite M16



Proposed Synthesis Of Imine Metabolite P3



These proposed syntheses are exemplary only. Those of skill in the art will recognize that other syntheses may be used to make the various compounds of the invention. Additionally, those of skill in the art will recognize that an intermediate in any the schemes described above may be a compound according to Formula I and may be collected and purified, if necessary, without going to the next step. For example, the nitrone above may be isolated and purified. Furthermore, those of skill in the art will recognize that these syntheses may be modified to yield related compounds which are described by Formula I, herein. These and other variations or modifications of these methods, compounds, and intermediates are considered with the scope and spirit of the invention disclosed herein.

METHODS OF TREATMENT

The binding affinity of DCDQ, and related compounds, is well-documented in the related published applications WO03/091250 and US2004/0009970, each of which is incorporated by reference. Accordingly, the metabolites, which form after administration of DCDQ, can also be used similarly to DCDQ in treating psychotic and other disorders.

The compounds of this invention are agonists and partial agonists at the 2C subtype of brain serotonin receptors and are thus of interest for the treatment of mental disorders, including psychotic disorders such as schizophrenia including paranoid type, disorganized type, catatonic type, and undifferentiated type, schizophreniform disorder, schizoaffective disorder, delusional disorder, substance-induced psychotic disorder, and psychotic disorder not otherwise specified; L-DOPA-induced psychosis; psychosis associated with Alzheimer's dementia; psychosis associated with Parkinson's disease; psychosis associated with Lewy body disease; bipolar disorders such as bipolar I disorder, bipolar II disorder, and cyclothymic disorder; depressive disorders such as major depressive disorder, dysthymic disorder, substance-induced mood disorder, and depressive disorder not otherwise specified; mood episodes such as major depressive episode, manic episode, mixed episode, and hypomanic episode; anxiety disorders such as panic attack, agoraphobia, panic disorder, specific phobia, social phobia, obsessive compulsive disorder, posttraumatic stress disorder, acute stress disorder, generalized anxiety disorder, separation anxiety disorder, substance-induced anxiety disorder, and anxiety disorder not otherwise specified; adjustment disorders such as adjustment disorders with anxiety and/or depressed mood; intellectual deficit disorders such as dementia, Alzheimer's disease, and memory deficit; eating disorders (e.g., hyperphagia, bulimia or anorexia nervosa) and combinations of these mental disorders that may be present in a mammal. For example, mood disorders such as depressive disorders or bipolar disorders often accompany psychotic disorders such as schizophrenia. A more complete description of the aforementioned mental disorders can be found in the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition, Washington, DC, American Psychiatric Association (1994).

The compounds of the present invention are also of interest for the treatment of epilepsy; migraines; sexual dysfunction; sleep disorders; gastrointestinal disorders, such as malfunction of gastrointestinal motility; and obesity, with its consequent comorbidities including Type II diabetes, cardiovascular disease, hypertension, hyperlipidemia, stroke, osteoarthritis, sleep apnea, gall bladder disease, gout, some cancers, some infertility, and early mortality. The compounds of the present invention can also be used to treat central nervous system deficiencies associated, for example, with trauma, stroke, and spinal cord injuries. The compounds of the

present invention can therefore be used to improve or inhibit further degradation of central nervous system activity during or following the malady or trauma in question. Included in these improvements are maintenance or improvement in motor and motility skills, control, coordination and strength.

Thus the present invention provides methods of treating each of the maladies listed above in a mammal, preferably in a human, the methods comprising providing a therapeutically effective amount of a compound of this invention to the mammal in need thereof. By "treating", as used herein, it is meant partially or completely alleviating, inhibiting, preventing, ameliorating and/or relieving the disorder. For example, "treating" as used herein includes partially or completely alleviating, inhibiting or relieving the condition in question. "Mammals" as used herein refers to warm blooded vertebrate animals, such as humans. "Provide", as used herein, means either directly administering a compound or composition of the present invention, or administering a derivative or analog which will form an equivalent amount of the active compound or substance within the body.

PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

Also encompassed by the present invention are pharmaceutical compositions for treating or controlling disease states or conditions of the central nervous system comprising at least one compound of Formula I, mixtures thereof, and or pharmaceutical salts thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier therefore. Such compositions are prepared in accordance with acceptable pharmaceutical procedures, such as described in Remingtons Pharmaceutical Sciences, 17th edition, ed. Alfonoso R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA (1985). Pharmaceutically acceptable carriers are those that are compatible with the other ingredients in the formulation and biologically acceptable.

The compounds of this invention may be administered orally or parenterally, neat or in combination with conventional pharmaceutical carriers, the proportion of which is determined by the solubility and chemical nature of the compound, chosen route of administration and standard pharmacological practice. The pharmaceutical carrier may be solid or liquid.

Applicable solid carriers can include one or more substances which may also act as flavoring agents, lubricants, solubilizers, suspending agents, fillers, glidants,

compression aids, binders or tablet-disintegrating agents or an encapsulating material. In powders, the carrier is a finely divided solid which is in admixture with the finely divided active ingredient. In tablets, the active ingredient is mixed with a carrier having the necessary compression properties in suitable proportions and compacted in the shape and size desired. The powders and tablets preferably contain up to 99% of the active ingredient. Suitable solid carriers include, for example, calcium phosphate, magnesium stearate, talc, sugars, lactose, dextrin, starch, gelatin, cellulose, methyl cellulose, sodium carboxymethyl cellulose, polyvinylpyrrolidine, low melting waxes and ion exchange resins.

Liquid carriers may be used in preparing solutions, suspensions, emulsions, syrups and elixirs. The active ingredient of this invention can be dissolved or suspended in a pharmaceutically acceptable liquid carrier such as water, an organic solvent, a mixture of both or pharmaceutically acceptable oils or fat. The liquid carrier can contain other suitable pharmaceutical additives such as solubilizers, emulsifiers, buffers, preservatives, sweeteners, flavoring agents, suspending agents, thickening agents, colors, viscosity regulators, stabilizers or osmo-regulators. Suitable examples of liquid carriers for oral and parenteral administration include water (particularly containing additives as above, e.g. cellulose derivatives, preferably sodium carboxymethyl cellulose solution), alcohols (including monohydric alcohols and polyhydric alcohols e.g. glycols) and their derivatives, and oils (e.g. fractionated coconut oil and arachis oil). For parenteral administration the carrier can also be an oily ester such as ethyl oleate and isopropyl myristate. Sterile liquid carriers are used in sterile liquid form compositions for parenteral administration. The liquid carrier for pressurized compositions can be halogenated hydrocarbon or other pharmaceutically acceptable propellant.

Liquid pharmaceutical compositions which are sterile solutions or suspensions can be administered by, for example, intramuscular, intraperitoneal or subcutaneous injection. Sterile solutions can also be administered intravenously. Oral administration may be either liquid or solid composition form.

The compounds of this invention may be administered rectally or vaginally in the form of a conventional suppository. For administration by intranasal or intrabronchial inhalation or insufflation, the compounds of this invention may be formulated into an aqueous or partially aqueous solution, which can then be utilized

in the form of an aerosol. The compounds of this invention may also be administered transdermally through the use of a transdermal patch containing the active compound and a carrier that is inert to the active compound, is non toxic to the skin, and allows delivery of the agent for systemic absorption into the blood stream via the skin. The carrier may take any number of forms such as creams and ointments, pastes, gels, and occlusive devices. The creams and ointments may be viscous liquid or semisolid emulsions of either the oil-in-water or water-in-oil type. Pastes comprised of absorptive powders dispersed in petroleum or hydrophilic petroleum containing the active ingredient may also be suitable. A variety of occlusive devices may be used to release the active ingredient into the blood stream such as a semipermeable membrane covering a reservoir containing the active ingredient with or without a carrier, or a matrix containing the active ingredient. Other occlusive devices are known in the literature.

Preferably the pharmaceutical composition is in unit dosage form, e.g. as tablets, capsules, powders, solutions, suspensions, emulsions, granules, or suppositories. In such form, the composition is sub-divided in unit dose containing appropriate quantities of the active ingredient; the unit dosage forms can be packaged compositions, for example packeted powders, vials, ampoules, prefilled syringes or sachets containing liquids. The unit dosage form can be, for example, a capsule or tablet itself, or it can be the appropriate number of any such compositions in package form.

The dosage requirements vary with the particular compositions employed, the route of administration, the severity of the symptoms presented and the particular subject being treated. Based on the results obtained in the standard pharmacological test procedures, projected estimated daily dosages of active compound would be approximately 0.02 µg/kg – approximately 4000 µg/kg, or up to approximately 500mg/day. It is to be understood that these dosage ranges are merely estimates and those of skill in the art will be able to ascertain appropriate doses depending on many factors, including patient weight, severity of symptoms, and other factors. Treatment will generally be initiated with small dosages less than the optimum dose of the compound. Thereafter the dosage is increased until the optimum effect under the circumstances is reached; precise dosages for oral,

parenteral, nasal, or intrabronchial administration will be determined by the administering physician based on experience with the individual subject treated.

EXAMPLES

Metabolite Compounds

The metabolism of DCDQ was investigated in several in vitro and in vivo models by using a radio-labeled version of DCDQ, [^{14}C]DCDQ. The studies revealed several metabolic pathways and several significant metabolites. These studies are explained in further detail in the Experimental section, below.

The metabolism of [^{14}C]DCDQ was investigated by incubation with liver microsomes from male and female CD-1 mice, Sprague Dawley rats, beagle dogs and human liver microsomes pooled across sexes, and cryopreserved male human hepatocytes. DCDQ was converted to oxidative metabolites, including M1, M2, M3, M4, M5, and a carbamoyl glucuronide (M6) in microsomal incubations and human hepatocytes.

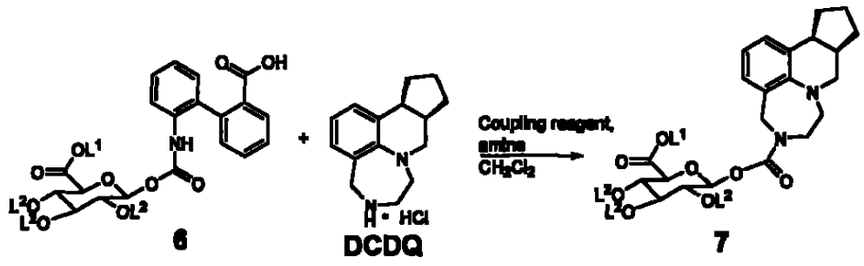
The in vivo metabolism of [^{14}C]DCDQ was further investigated in four male beagle dogs following a single administration of 14.1 to 16.7 mg/kg of [^{14}C]DCDQ hydrochloride in an enteric coated capsule. The major metabolites observed in plasma included hydroxy DCDQ (M1, M2 and M3), an N-oxide DCDQ (M5), a keto DCDQ (M7), a hydroxy DCDQ imine (M15), a hydroxy DCDQ glucuronide (M9) and the carbamoyl glucuronide of DCDQ (M6). A sulfate conjugate of hydroxy DCDQ (M16) and a diazepinyl DCDQ carboxylic acid (M17), which were not detected in plasma, were observed in urine samples. Hydroxy DCDQ metabolites (M2, M3 and M19), a keto DCDQ (M18) and the hydroxy DCDQ imine (M15) were detected in fecal extracts. DCDQ was extensively metabolized in dogs, with the oxidative metabolism as the major metabolic pathway, although formation of a DCDQ carbamoyl glucuronide (M6) was also observed.

The in vivo metabolism of [^{14}C]DCDQ was further studied in male and female Sprague-Dawley rats after a single oral administration (5 mg/kg). Metabolites detected in plasma included hydroxy DCDQ metabolites (M1, M2, M3, M4 and M10), keto DCDQ (M7), and the phase II metabolites DCDQ sulfamate (M12), di-dehydro DCDQ sulfamate (M14), hydroxy DCDQ sulfates (M8 and M13), hydroxy DCDQ

glucuronide (M9) and acetylated hydroxy DCDQ (M11). DCDQ was extensively metabolized in rats to predominantly oxidative metabolites.

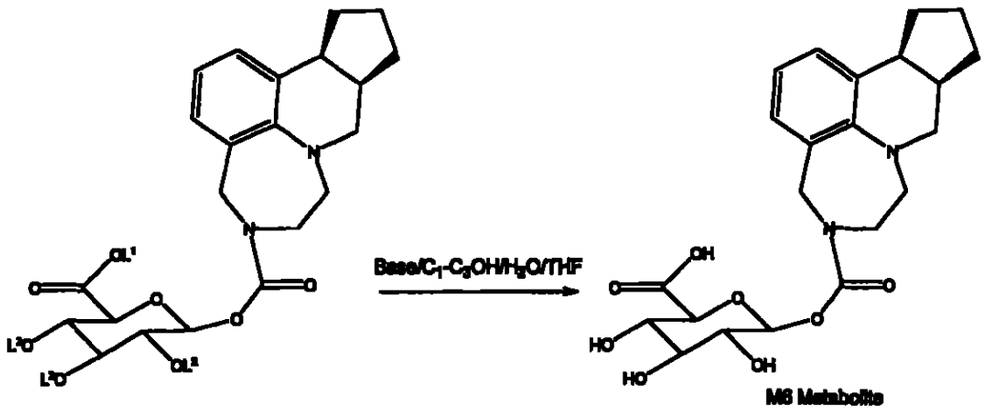
Thus, metabolites of DCDQ are created through several metabolic pathways, some of which are common across several species. Such metabolites can be useful in treating disorders and diseases affected by the $5HT_{2C}$ receptor and/or those that can be treated by administration of DCDQ.

SYNTHESIS OF THE CARBAMOYL GLUCURONYL METABOLITE (M6)



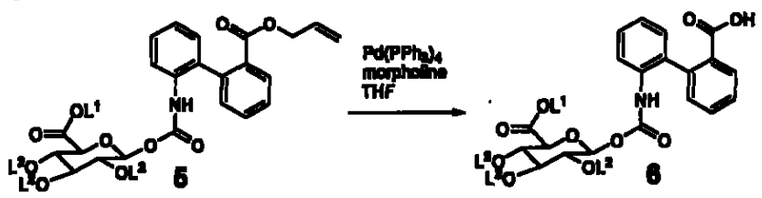
Metabolite M6 can be obtained by coupling DCDQ with a glucuronyl carrier 6 in the presence of a coupling reagent and an amine in CH_2Cl_2 to yield compound 7. The product, compound 7 can be purified according to methods known in the art, and preferably by column chromatography purification, preferably with EtOAc/heptane as an eluent. The coupling reagent can be selected from any suitable coupling reagent, including but not limited to BOP, DCC, and EDC. BOP is the preferred coupling agent. Suitable amines include, but are not limited to Et_3N, pyridine, and Hünig's base. Hünig's base is preferred. The glucuronyl carrier 6 can be prepared by methods known to those of skill in the art. L^1 is an aliphatic leaving group, such as, but not limited to, C_1 to C_6 alkyl, methyl, ethyl, and propyl, preferably methyl. Each L^2 is a leaving group which is independently selected from an acetyl group and a benzylic group. Acetyl groups are preferred. The glucuronyl carrier 6 is preferably a secondary amine glucuronyl carbamate 6 such as those that can be designed on the basis of the Scheeren's protocol discussed in Ruben G. G. Leeders, Hans W. Scheeren, *Tetrahedron Letters* 2000, 41, 9173-9175.

Glucuronyl Carbamoyl Metabolite M6



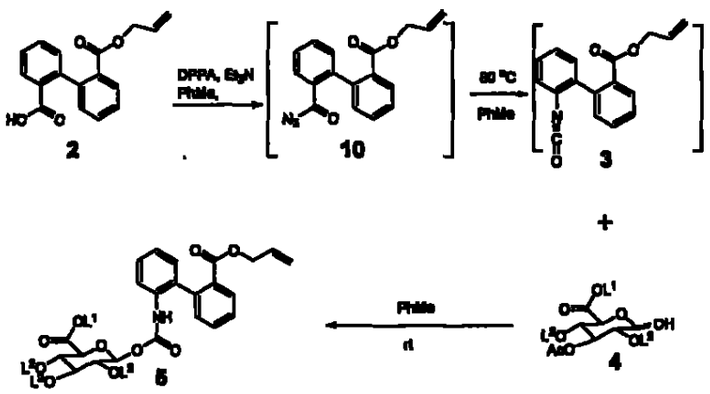
Compound 7 is then subjected to basic hydrolysis resulting in deprotection of all leaving groups, L^2, on 2,3,4-position of sugar moiety as well as L^1 to yield the final product M6 metabolite. Basic hydrolysis is carried out using base, such as NaOH, LiOH, and KOH in C_1-C_3 aliphatic alcohol. LiOH is the preferred base and MeOH is the preferred alcohol. . Removal of organic solvents and lyophilization can be used to yield crude product M6 in a quantitative yield. Purification of the crude M6 can then be carried out by methods known to those of skill in the art.

Glucuronyl Carrier, Compound 6



Compound 6 can be prepared by deprotection of the allyl group in compound 5 catalyzed preferably by using $Pd(PPh_3)_4$, and morpholine as a nucleophile. Fresh catalyst is preferred. Additionally N_2 may optionally be bubbled through the reaction solution before adding catalyst. In this way, the crude glucuronyl carrier 6 is obtained in a quantitative yield without further purification.

Compound 5



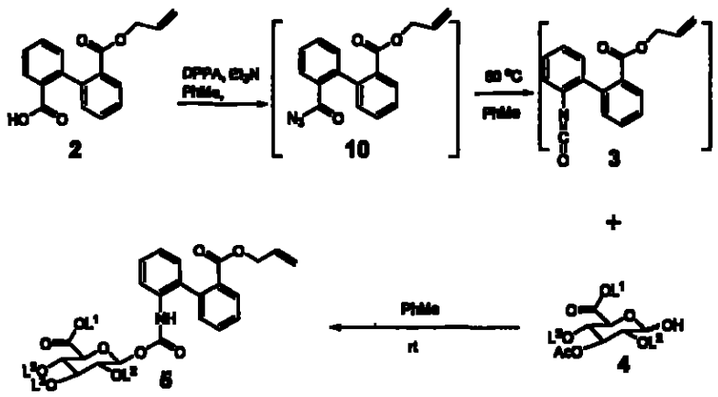
Compound 5 can be prepared in high yield in a one-pot reaction. Treatment of compound 2 with one of DPPA, NaN_3, or $TMSN_3$ in the presence of Et_3N in toluene *in situ* produces an acyl azide 10, which is heated, preferably to 80 °C for 1.5 hour, to yield isocyanate 3. The compound 3 need not be isolated and is subsequently treated with a 1-hydroxyglucuronic ester 4, preferably at room temperature overnight to obtain the title compound 5 (Scheme 3). Compound 4 can be prepared by following the procedure described US6,380,166B1, which is hereby incorporated by reference. ^1H NMR at 30°C shows that all signals are double due to restricted rotation around the Ar-Ar bond.

In compound 4, L^1 is an aliphatic leaving group, such as, but not limited to, C_1 to C_8 alkyl, methyl, ethyl, and propyl, preferably methyl. Each L^2 is a leaving group which is independently selected from an acetyl group and a benzylic group. Acetyl groups are preferred.

Compound 2

In order to prepare monoallyl ester 2, diphenic anhydride was chosen as a starting material and treated with excess of allyl alcohol in the presence of catalyst. Suitable catalysts include Et_3N, Hünig's base, pyridine, amines, NaOH, LiOH, KPH, and other inorganic bases. Quantitative yields for compound 2 can be achieved.

Compound 5

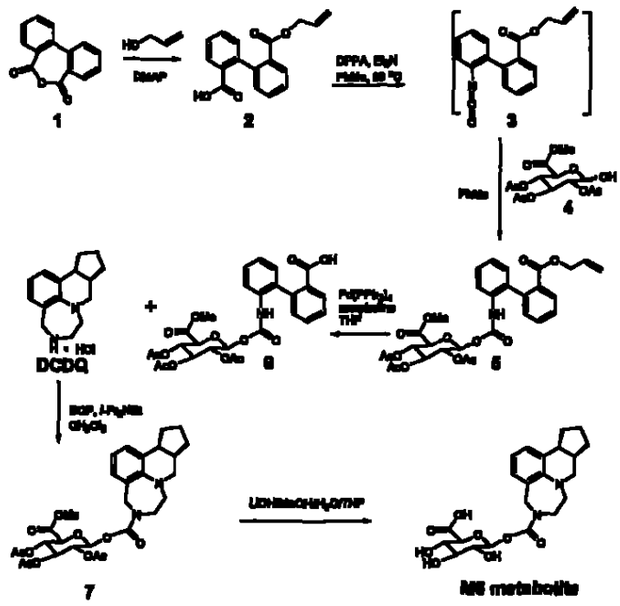


Compound 5 can be prepared in high yield in a one-pot reaction. Treatment of compound 2 with one of DPPA, NaN_3, or $TMSN_3$ in the presence of Et_3N in toluene *in situ* produces an acyl azide 10, which is heated, preferably to 80 °C for 1.5 hour, to yield isocyanate 3. The compound 3 need not be isolated and is subsequently treated with a 1-hydroxyglucuronic ester 4, preferably at room temperature overnight to obtain the title compound 5 (Scheme 3). Compound 4 can be prepared by following the procedure described US6,380,166B1, which is hereby incorporated by reference. ^1H NMR at 30°C shows that all signals are double due to restricted rotation around the Ar-Ar bond.

In compound 4, L^1 is an aliphatic leaving group, such as, but not limited to, C_1 to C_8 alkyl, methyl, ethyl, and propyl, preferably methyl. Each L^2 is a leaving group which is independently selected from an acetyl group and a benzylic group. Acetyl groups are preferred.

EXEMPLARY SYNTHESIS OF THE CARBAMOYL GLUCURONYL METABOLITE (M6)

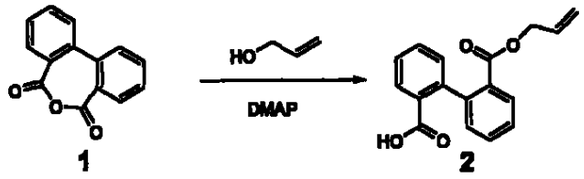
An exemplary synthesis of DCDQ carbamoyl glucuronide metabolite (M6) is shown in Scheme 1:



General

NMR spectra were recorded on a Varian Inova 300 at 300 MHz (^1H and ^{13}C) and chemical shifts were identified in ppm relative to TMS internal standard. Analytical and preparative TLCs were performed on Silica Gel 60 F-254 pre-coated plates obtained from EM Science. Compounds were visualized using UV at 254 nm or 10% aq. $KMnO_4$ indicator. HPLC analysis was determined on a Waters Alliance 2695 HPLC instrument equipped with a PDA (Model 2996) UV detector. Mass spectra were recorded on a Finnigan mass spectrometer.

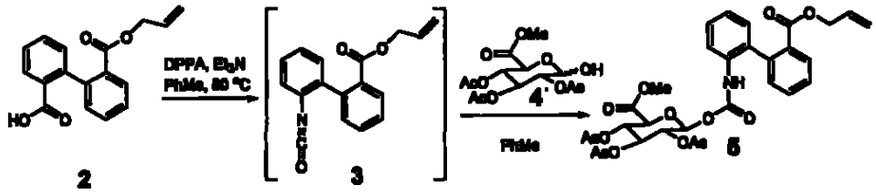
BIPHENYL-2,2'-DICARBOXYLIC ACID 2'-ALLYL ESTER 2



To a 1-L flask was charged diphenic anhydride (40 g, 178 mmol), allyl alcohol (300 mL) and DMAP (2.18 g, 17.8 mmol, 10 mol%). The reaction mixture was stirred for 12 h. The excess of allyl alcohol was evaporated under reduced pressure at 40 °C. The residue was redissolved in EtOAc (400 mL) and washed with aq. $NaHSO_4$ (0.5 N, 200 mL), brine (200 mL × 3) and water (200 mL × 3). The organic layer was

dried with anhydrous Na_2SO_4, passed through a silica gel pad (500 g), washed the pad with EtOAc (1 L), concentrated under reduced pressure to dryness. Traces of allyl alcohol were removed by distillation with heptane to give the mono allyl ester 2 (50 g, 100%) as a colorless oil. ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): 8.03-7.99 (m, 2H), 7.58-7.39 (m, 4H), 7.19-7.16 (m, 2H), 5.74-5.61 (m, 1H), 5.17-5.06 (m, 2H), 4.52-4.49 (m, 2H).

3,4,5-TRIACETOXY-6-(2'-ALLYLOXYCARBONYLBIPHENYL-2-YLCARBAMOYLOXY) TETRAHYDRO-PYRAN-2-CARBOXYLIC ACID METHYL ESTER 5

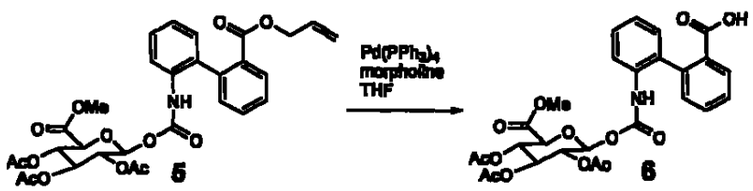


2 3 4 5

To a 500 mL-flask was charged biphenyl-2,2'-dicarboxylic acid 2'-allyl ester 2 (5.2 g, 18.4 mmol), toluene (100 mL), DPPA (4.8 mL, 22.1 mmol, 1.2 eq) and Et_3N (3.1 mL, 22.1 mmol, 1.2 eq) under nitrogen atmosphere. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature, then heated to 85 °C for 1.5 h to generate in situ intermediate isocyanate 3. The mixture was cooled to room temperature. To this mixture was added methyl 2,3,4-triacetyl-1-hydroxyglucuronic ester 4 (3.7 g, 11 mmol, 0.6 eq) and stirred overnight. The mixture was diluted with EtOAc (500 mL), washed subsequently with aq. $NaHSO_4$ (0.5 N, 200 mL), saturated $NaHCO_3$ (200 mL), brine (200 mL × 2) and water (200 mL). The organic layer was dried over anhydrous $NaSO_4$ and concentrated under reduced pressure. The residue (11 g), mixed with silica gel (22 g), was loaded on a column (4.5 × 50 cm) which was packed with silica gel (500 g). The column was washed with EtOAc/heptane (2:8, 6 L; 3:7, 4 L; 4:6, 4 L). Fractions (60 mL/fraction) were collected and solvent was evaporated to give compound 5 (5.5 g, 82%). HPLC, RT=7.73 min, purity: 81.44%. ^{1}HNMR (300 MHz, $CDCl_3$), all signals are double due to restricted rotation around the Ar-Ar bond, 8.03-7.93 (m, 2H), 7.64-7.48 (m, 2H), 7.40-7.23 (m, 2H), 7.18-7.05 (m, 2H), 6.49, 6.42 (2s, ^{1}H, NH), 5.74, 5.73 (2d, J = 8.1 Hz, ^{1}H, β-anomer), 5.70-5.57 (m, ^{1}H), 5.33-

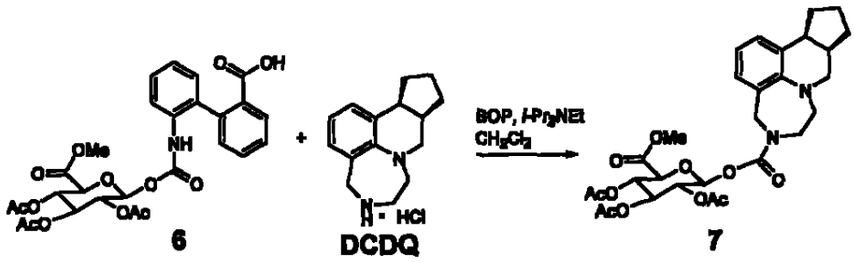
5.01 (m, 5H), 4.54-4.48 (m, 2H), 4.16 (d, J = 9.9 Hz, ^{1}H), 3.73, 3.72 (2s, 3H), 2.04-1.95 (3s, 9H). MS: m/z:[638 M+Na]$^+$.

3,4,5-TRIACETOXY-6-(2'-CARBOXYLBIPHENYL-2-YLCARBAMOYLOXY) TETRAHYDROPYRAN-2-CARBOXYLIC ACID METHYL ESTER 6



To a 500-mL flask was charged 3,4,5-Triacetoxy-6-(2'-allyloxycarbonylbiphenyl-2-ylcarbamoyloxy)tetrahydro-pyran-2-carboxylic acid methyl ester 5 (5.3 g, 8.65 mmol), THF (400 mL) and morpholine (3.8 mL, 43.3 mmol, 5 eq). The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature while bubbling nitrogen through the solution. After that, Pd(PPh$_3$)4 (300 mg, 0.26 mmol, 3 mol%) was added. The reaction mixture was further stirred for 15 min, diluted with Et$_2$O (1L), and washed with NaHSO$_4$ (0.5 N, 300 mL), brine (300 mL x 2), water (400 mL x 2). The organic layer was dried over MgSO$_4$ and evaporated to obtain compound 6 (5.3 g, 100%, HPLC: 84% purity). This compound was used without further purification in the next step. ^{1}HNMR (300 MHz, CDCl$_3$): all signals are double due to restricted rotation around the Ar-Ar bond, 8.05-7.15 (m, 8H), 5.72, 5.70 (2d, J = 8.1 Hz,^{1}H), 5.36-5.02 (m, 2H), 4.16, 4.13 (2d, J = 9.9 Hz, ^{1}H), 3.77-3.73 (m, ^{1}H), 3.72 (s, 3H), 2.03-1.98 (3s, 9H). MS: m/z: 572 [M-H]$^-$.

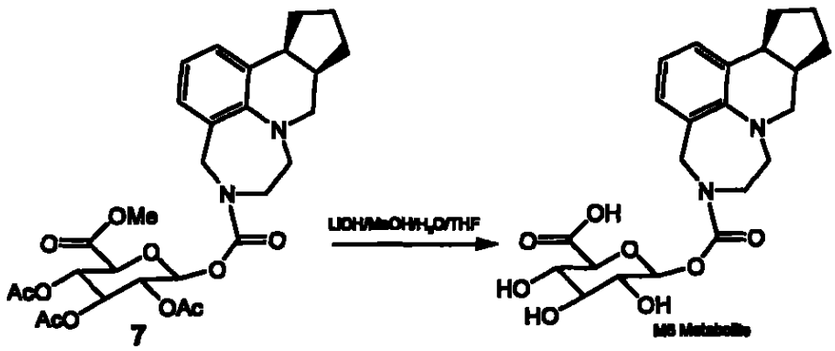
COMPOUND 7



To a 500-mL flask was charged 3,4,5-Triacetoxy-6- (2'-carboxylbiphenyl-2-ylcarbamoyloxy) tetrahydropyran-2-carboxylic acid methyl ester 6 (5.0 g, 8.7 mmol), CH_2Cl_2 (200 mL) and BOP (4.2 g, 9.6 mmol, 1.1 eq). The mixture was stirred at room

temperature under nitrogen atmosphere to become a solution. To this solution was added dropwise a solution of DCDQ (2.5 g, 9.6 mmol, 1.1 eq) and N,N-diisopropyl-N-ethyl amine (7.6 mL, 43.5 mmol, 5 eq) in CH_2Cl_2 (200 mL) in 10 min. The reaction mixture was stirred overnight and filtered through celite. The organic layer was washed with water (200 mL), dried over $MgSO_4$ and evaporated. The residue was purified by column chromatography (column: 4.5 × 50 cm, silica gel: 500 g, solvent: EtOAc/heptane (2/8, 4 L), (3/7, 8 L), 50 mL/fraction) to obtain compound 7 (4.0 g, HPLC: 74%), further slurry in CH_2Cl_2 to give compound 7 (3.52 g, 68.8%, HPLC: 96%). ^{1}HNMR (300 MHz, DMSO-d6): 7.12-7.08 (m, ^{1}H), 6.98-6.96 (m, ^{1}H), 6.86-6.77 (m, ^{1}H), 5.81, 5.79 (2d, J = 8.1 Hz, ^{1}H, β-anomer), 5.10-4.90 (m, 2H), 4.63-4.36 (m, 2H), 4.17-4.12 (m, ^{1}H), 3.88-3.68 (m, ^{1}H), 3.64, 3.59 (2s, 3H), 3.40-3.21 (m, ^{1}H),. 3.04-2.59 (m, 4H), 2.30-2.14 (m, ^{1}H), 2.05-1.95 (3s, 9H), 1.70- 1.20 (m, 5H). MS: m/z 589 $[M + H]^+$.

M6 Metabolite of DCDQ



7

A solution of compound 7 (5.0 g, 8.5 mmol) in THF (64 mL) was added MeOH (319 mL) and H_2O (70 mL). The solution was cooled to 0-5 °C (ice-water bath). And a solution of $LiOH•H_2O$ (2.1 g, 51 mmol, 6 eq) in H_2O (58 mL) [0.1 N LiOH/MeOH/THF/H_2O] was added dropwise in 20 min. The reaction mixture was stirred at 0-5 °C for 2 hours under N_2 atmosphere. Progress of the deprotection was monitored on reversed-phase TLC (SiO_2-C_{18} MeCN/H_2O, 3/7). The reaction mixture was diluted with H_2O (500 mL) and neutralized by adding HOAc (3.1 g, 51 mmol) at 20 °C. The solvent was concentrated under reduced pressure at 22 °C and the resultant aqueous suspension was lyophilized to give crude M6 metabolite (6.2 g, 100%). Further purification of the crude compound (1.2 g) using Biotage silica gel

column chromatography (Horizon),2 $CHCl_3$/MeOH/H_2O as an eluent provided M6 (400 mg) with 95% purity (HPLC). ^{1}HNMR (300 MHz, DMSO-d6, D_2O exchange): 7.13-6.99 (m, 2H), 6.87-6.80 (m, ^{1}H), 5.09 (d, J = 7.8 Hz, ^{1}H, β-anomer), 4.77-4.58 (m, ^{1}H), 4.19-4.12 (m, ^{1}H), 3.93 (m, ^{1}H), 3.40-2.87 (9m, 9H), 2.68-2.60 (m, ^{1}H), 2.24-1.99 (m, 3H), 1.63-1.20 (m, 4H); 13C (75 MHz, DMSO-d6): 173.3, 173.1, 154.6, 154.0, 147.3, 132.5, 132.4, 130.9, 130.6, 130.1, 127.9, 127.7, 121.4, 121.1, 98.9, 96.3, 77.1, 76.9, 75.3, 73.2, 72.9, 72.6, 56.9, 56.1, 55.6, 50.9, 50.4, 48.7, 41.7, 35.0, 34.9, 32.5, 32.3, 29.8, 24.1; LC/MS (ESI), m/z 449 $[M+H]^+$.

REFERENCES

1. HPLC equipment: Waters 2690

Sample preparation: add 2–3 drops of the reaction mixture to 2 mL of acetonitrile, shake well to a solution and subject to HPLC analysis.

HPLC conditions:

Column: Alltima C_{18} 3μm 7 x 53 mm

Column temperature: 25 °C

Mobile phases: Solvent A = 1900 mL H_2O, 100 mL CH_3CN, 1 mL H_3PO_4;
Solvent B = 1900 mL CH_3CN, 100 mL H_2O, 1 mL H_3PO_4

TABLE 1: W2690 Gradient table

Time (min.)	Flow Rate (mL/min)	% A	% B	curve
	2.50	100	0	
2	2.50	100	0	6
9	2.50	0	100	6
11	2.50	0	100	6
12	2.50	100	0	6
16	2.50	100	0	6

UV: 215 nm

Injection volume: 10 μL

2. Biotage Flash-12 (Horizon) Method for the Final Purification of M6

Mobile phases:

A: $CHCl_3$: MeOH : H_2O (8: 2 : 0.2)

B: $CHCl_3$: MeOH : H_2O (7 : 3 : 0.5)

Gradient by Column Volume (CV, 120 mL/CV):

2 (CV): A 100%

5 (CV): A 100% → B 100%

3 (CV): B 100%

Sample loading: Dissolve 1.2 g of the crude M6 in 8 mL of mobile phase A and pour into the sampler.

Flow rate: 40 mL/min

UV: 254 nm

Fraction: 12 mL/fraction, total 96 fractions

IN VITRO / IN VIVO METABOLITE STUDIES

DCDQ is a potent 5-HT_{2C} agonist and is effective in several animal models predictive of antipsychotic activity, with an atypical antipsychotic profile. The behavioral profile of DCDQ in these models is consistent with atypical antipsychotic-like activity with diminished extrapyramidal side-effect liability. The 5-HT_{2C} agonist DCDQ may also be effective in treating the mood disorders or the cognitive impairments associated with schizophrenia.

Several metabolites of DCDQ were identified through in vivo and in vitro models. Without being bound to the theory behind the pathways, FIGS. 1-4 show proposed metabolic pathways leading to these compounds.

IN VITRO METABOLISM OF [^{14}C]DCDQ IN LIVER MICROSOMES OF MICE, RATS, DOGS AND HUMANS, AND IN CRYOPRESERVED HUMAN HEPATOCYTES

The metabolism of [^{14}C]DCDQ was investigated by incubation with liver microsomes from male and female CD-1 mice, Sprague Dawley rats, beagle dogs and human liver microsomes pooled across sexes, and cryopreserved male human

hepatocytes. Using human liver microsomes, the K_m values for the formation of the major oxidative metabolite M1 and the carbamoyl glucuronide M6 were 10.8 and 56.1 μM, respectively.

Species differences were observed in DCDQ metabolism. Oxidative metabolism was the major metabolic pathway for DCDQ in hepatic microsomal incubations. Several hydroxy metabolites (M1, M2, M3 and M4) of DCDQ were detected with human liver microsomes in the presence of NADPH. Metabolite M1 was not detected in other species. Metabolites M2 and M3 were also observed with dog and rat. Metabolite M4 was also detected in rat, but not in mouse or dog. Mouse appeared to have less extensive metabolism than other species, and M2 was the only metabolite detected with mouse liver microsomes. An N-oxide of DCDQ imine (M5) was detected with dog and human, but not with mouse or rat liver microsomes. Formation of DCDQ imine (P3) and currently unidentified products P1 and P2 in liver microsomes from all species was not NADPH-dependent, and requires further investigation. Sex differences were not observed in microsomal incubations for mice, rats and dogs.

In the presence of UDPGA, the carbamoyl glucuronide of DCDQ (M6) was detected with dog and human, but not with mouse or rat liver microsomes. While formation of the hydroxy metabolites was the major metabolic pathway with human liver microsomes in the presence of both NADPH and UDPGA, the carbamoyl glucuronide was the major metabolite in human hepatocytes at 50 μM DCDQ concentration.

In summary, DCDQ was converted to oxidative metabolites and a carbamoyl glucuronide in microsomal incubations and human hepatocytes.

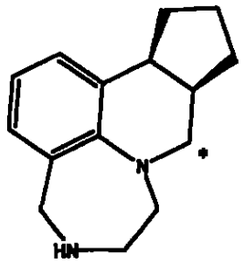
INTRODUCTION

This study investigated the in vitro biotransformation of DCDQ in liver microsomes and human hepatocytes. Cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase dependent pathways were examined and DCDQ metabolites were characterized by LC/MS.

MATERIALS AND METHODS

MATERIALS

[^{14}C]DCDQ hydrochloride (Lot L25073-42) was synthesized by the radio-synthesis group of Wyeth Research (Pearl River, NY). The radiochemical purity of [^{14}C]DCDQ was 98.9% and the chemical purity was 99.9% by UV detection. The specific activity of the [^{14}C]DCDQ was 222.9 μCi/mg as a hydrochloride salt. The chemical structure of [^{14}C]DCDQ is shown with the position of the ^{14}C label. The non-labeled DCDQ hydrochloride (Lot PB3312) with a chemical purity of 98.6% was synthesized by Wyeth Research (Pearl River, NY). Unless otherwise indicated, when referring to DCDQ or [^{14}C]DCDQ, the hydrochloride salt is assumed.



DCDQ
$C_{15}H_{20}N_2$
Monoisotopic MW of
unlabeled free base = 228.2
*site of ^{14}C label

Cryopreserved human hepatocytes, hepatocyte suspension media and hepatocyte culture media were obtained from In Vitro Technologies (Baltimore, MD). The hepatocytes were from two male individuals (Lot 070, 57 year old and Lot DRL, 44 year old) with testosterone 6β-hydroxylase activity of 55 and 43 pmol/106 cells/min, respectively, as determined by In Vitro Technologies. Liver microsomes listed in the following Table 2 from CD-1 mice, Sprague Dawley rats and beagle dogs were also obtained from In Vitro Technologies.

TABLE 2

Characteristics Of Mouse, Rat And Dog Liver Microsomes

Species	Sex	Lot No.	Number of Animals for Pool	P450 Content (nmol/mg protein)
Mouse	Male	100005	20	0.40

TABLE 2

Characteristics Of Mouse, Rat And Dog Liver Microsomes

Species	Sex	Lot No.	Number of Animals for Pool	P450 Content (nmol/mg protein)
	Female	100005	18	0.54
Rat	Male	111	23	0.79
	Female	108	50	0.55
Dog	Male	M100006	5	0.57
	Female	108	4	0.43

Human liver microsomes from subjects 3, 6, 15, 17, 18 and 19 were prepared from livers received from IIAM (Exton, PA). These microsomes were prepared and characterized by Dr. Andrew Parkinson and are described in Parkinson A. Preparation and characterization of human liver microsomes. Wyeth-Ayerst Research GTR-25617, 1994, which is hereby incorporated by reference. Microsomal preparations were stored at approximately -70°C in aliquots of 250-500 µL until use. The following Table lists the characteristics of the human liver microsomes used in this study.

TABLE 3

Characteristics Of The Individual Human Liver Microsomes

Individual Number	Date Prepared	Sex	P450 Content (nmol/mg protein)
3	3/12/93	F	0.52
6	3/15/93	M	0.56
15	3/19/93	F	0.53
17	3/29/93	F	0.38
18	3/29/93	M	0.36
19	3/29/93	F	0.71
Mean value of pooled microsomes (N=6)			0.51

Ultima Gold, Ultima Flo, Permafluor E+-scintillation cocktails, and Carbo-Sorb E carbon dioxide absorber were purchased from Perkin Elmer (Wellesley, MA). High performance liquid chromatography (HPLC) grade water and acetonitrile were obtained from EMD Chemicals (Gibbstown, NJ). Uridine 5'-diphosphoglucuronic acid triammonium salt (UDPGA) and EDTA were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Ammonium acetate and magnesium chloride were obtained from Mallinckrodt Baker Inc. (Phillipsburg, NJ). All other reagents were analytical grade or better.

METHODS

INCUBATION OF [^{14}C]DCDQ WITH LIVER MICROSOMES OF MICE, RATS, DOGS AND HUMANS

[^{14}C]DCDQ was mixed with non-radiolabeled DCDQ (1:3 or 1:5) in the incubations. Microsomal incubations consisted of [^{14}C]DCDQ, magnesium chloride (10 mM) and liver microsomes incubated in 0.5 mL of 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4. [^{14}C]DCDQ (20 µL) in water was added to the incubation tubes containing buffer, magnesium chloride solution and microsomes. After mixing, the tubes were pre-incubated for 2 minutes in a shaking water bath at 37°C. The reactions were initiated by the addition of UDPGA or the NADPH regenerating system. UDPGA was added to incubations as a 50 µL aliquot of a 20 mM solution in water, to give a final concentration of 2 mM. An NADPH regenerating system (30 µL) was added to incubations to evaluate CYP450-mediated metabolism. The NADPH regenerating system consisted of glucose-6-phosphate (2 mg/mL), glucose-6-phosphate dehydrogenase (0.8 units/mL) and $NADP^+$ (2 mg/mL). Control incubations were conducted under the same conditions, but without the NADPH generating system, UDPGA or microsomes. All incubations were performed in duplicate. Incubations were stopped by the addition of 0.5 mL ice-cold methanol. Samples were vortex-mixed. Denatured proteins were separated by centrifugation at 4300 rpm and 4°C for 10 minutes (Model T21 super centrifuge, Sorvall). The protein pellets were extracted with 0.5 mL of methanol. The supernatant was combined for each sample, mixed and evaporated to a volume of about 0.3 mL under a nitrogen stream in a Zymark TurboVap LV evaporator (Caliper Life Science, Hopkinton, MA). The concentrated sample was centrifuged and aliquots were radioassayed and

analyzed by HPLC. This method recovered an average of 92.1% of the radioactivity from the reaction mixture.

Initial rate conditions were determined for DCDQ metabolism in incubations with human liver microsomes in the presence of NADPH or UDPGA. Incubations for the time course study contained 20 μM of [^{14}C]DCDQ and 0.5 mg/mL of microsomal proteins, and were incubated at 37°C with mild shaking for 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 minutes. The protein dependence study was conducted with 20 μM of [^{14}C]DCDQ incubated for 20 minutes with 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 and 1.0 mg/mL of microsomal proteins.

The K_m values were determined with 0.5 mg/mL of human liver microsomes incubated with [^{14}C]DCDQ for 20 minutes with the NADPH regenerating system or for 10 minutes with UDPGA. [^{14}C]DCDQ concentrations used were 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 75 and 100 μM.

To evaluate species differences in cytochrome P450- and UGT-mediated metabolism, [^{14}C]DCDQ was incubated for 20 minutes with 0.5 mg/mL liver microsomal proteins from mice, rats, dogs or humans in the presence of the NADPH regenerating system or UDPGA. The assay conditions were the same as described above, and DCDQ concentrations were 12 μM and 56 μM for cytochrome P450- and UGT-mediated metabolism, respectively.

Samples were analyzed for metabolites by radioactivity flow detection and by LC/MS.

PREPARATION OF HUMAN HEPATOCYTES

Vials containing cryopreserved human hepatocytes were thawed in a 37°C water bath with gentle shaking until the ice was almost melted. The vials were removed from the water bath and gentle shaking continued at room temperature for 30-60 seconds until completely thawed. The hepatocyte suspensions from each vial were immediately transferred to pre-cooled 50 mL beakers on ice. To each beaker, 12 mL of ice-cold hepatocyte suspension media was added dropwise over one minute, with occasional, gentle shaking by hand to prevent the cells from settling. The cell suspensions were transferred to a 15 mL tube and centrifuged at 100 g force for 3 min at 4°C (Model T21 super centrifuge, Sorvall). The supernatant was discarded and the pellets were re-suspended in 4 mL of ice-cold hepatocyte culture media. The cell suspensions contained approximately 3.1 x 106 viable

hepatocytes/mL. The average viability was 76.0% as determined using Trypan Blue exclusion and a hemacytometer.

INCUBATION OF [^{14}C]DCDQ WITH HUMAN HEPATOCYTES

The cell suspensions were distributed into 12-well plates at 1.0 mL per well. Incubations were performed using pooled hepatocytes from two donors. [^{14}C]DCDQ in water was added to the hepatocyte suspension at a final concentration of 10 or 50 μM. Incubations were carried out at 37°C for 4 hours in an incubator supplied with 5% CO_2. At the end of the incubation, the reaction was stopped by the addition of 200 μL cold methanol to each well. The content of each well was transferred to a 15 mL centrifuge tube and sonicated for 30 seconds. After vortex mixing with 6 mL methanol and then centrifugation, the supernatant was transferred to a clean tube and evaporated to about 0.5 mL in a TurboVap evaporator. The residue was analyzed by HPLC and LC/MS.

HPLC ANALYSIS

A Waters model 2690 HPLC system (Waters Corp., Milford, MA) with a built-in autosampler was used for analysis. Separations were accomplished on a Phenomenex Luna C_{18}(2) column (2x150 mm, 5 μm) (Phenomenex, Torrance, CA) coupled with a filter (4x2 mm) cartridge. A variable wavelength UV detector set to monitor 250 nm and Flo-One β Model A525 radioactivity flow detector (Perkin Elmer) with a 250 μL LQTR flow cell were used for data acquisition. The flow rate of Ultima Flow M scintillation fluid was 1 mL/min, providing a mixing ratio of scintillation cocktail to mobile phase of 5:1. The sample chamber in the autosampler was maintained at 4°C, while the column was at ambient temperature of about 20°C. The mobile phase consisted of 10 mM ammonium acetate, pH 4.5 (A) and methanol (B) and was delivered at 0.2 mL/min. The linear gradient conditions were as follows:

TABLE 4

Time (min)	A (%)	B (%)
0	90	10
3	90	10
25	60	40
45	15	85

50 15 85

LIQUID CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY

An Agilent Model 1100 HPLC system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) including an autosampler and diode array UV detector was used for LC/MS analysis. The UV detector was set to monitor 200 to 400 nm. For selected LC/MS analysis, radiochromatograms were acquired using a β-Ram model 3 radioactivity flow detector (IN/US Systems Inc., Tampa, FL) equipped with a solid scintillant flow cell. Separations were accomplished on a Phenomenex Luna C18(2) column (2x150 mm, 5 μm) under the same conditions as described above.

The mass spectrometer used for metabolite characterization was a Micromass Q-TOF-2 quadrupole time-of-flight hybrid mass spectrometer (Nature Corp.). The mass spectrometer was equipped with an electrospray ionization (ESI) interface and operated in the positive ionization mode. Collision energy settings of 5 and 30 eV were used for full MS and MS/MS scans, respectively. Settings for the mass spectrometer are listed below.

TABLE 5

Micromass Q-TOF-2 Mass Spectrometer Settings	
Capillary Voltage	3.0 kV
Cone	30 V
Source Block Temperature	100°C
Desolvation Gas Temperature	250°C
Desolvation Gas Flow	550 L/hr
Cone Gas Flow	50 L/hr
CID Gas Inlet Pressure	13-14 psig
TOF-MS resolution (m/Δm)	8000

DATA ANALYSES

Flo-One analytical software (Perkin Elmer, version 3.6) was utilized to integrate the radioactive peaks. The computer program Microsoft Excel® 97 was used to calculate means and standard deviations and to perform the Student t-test. Micromass MassLynx software (Waters, version 4.0) was used for collection and analysis of LC/MS data.

RESULTS

DETERMINATION OF K_m VALUES WITH HUMAN LIVER MICROSOMES

Initial rate conditions and K_m values for metabolite formation from [^{14}C]DCDQ were determined for human liver microsomes. In the time-dependency studies, NADPH-dependent formation of the major oxidative metabolites (M1, M2, M3 and M4) was linear for 20 minutes and formation of the carbamoyl glucuronide (M6) was linear for 10 minutes (data not shown). In the protein-dependency studies, oxidative metabolism and carbamoyl glucuronide formation were linear up to 0.5 mg/mL microsomal protein. The K_m values for the formation of the major oxidative metabolite M1 and the carbamoyl glucuronide M6 in human liver microsomes were 10.8 and 56.1 μM, respectively. The K_m values for formation of metabolites M2, M3 and M4 in human liver microsomes ranged from 8.9 to 13.8 μM. The K_m value for metabolite M5 formation in human liver microsomes was 36.2 μM.

[^{14}C]DCDQ METABOLISM BY LIVER MICROSOMES OF MICE, RATS, DOGS, AND HUMANS

For species comparison in microsomal incubations, DCDQ concentrations for P450- and UGT-mediated metabolism were 12 and 56 μM, respectively, which were about the K_m values. In the presence of the NADPH regenerating system, four hydroxy metabolites (M1, M2, M3 and M4) were detected with human microsomes. Metabolite M1 was not detected in other species. Metabolites M2 and M3 were observed with dog and rat. Metabolite M4 was also detected in rat, but not in mouse or dog. Mouse appeared to have less extensive metabolism than other species, and M2 was the only metabolite detected with mouse liver microsomes. An N-oxide of DCDQ imine (M5) was detected with dog and human, but not mouse or rat. Three other peaks (P1, P2 and a DCDQ imine P3) were also observed in microsomal incubations. Formation of P1, P2 and P3 were not NADPH-dependent. Since these products were not formed in the control incubations without microsomes (data not shown), their formation may be catalyzed by non-P450 enzymes.

In the presence of UDPGA, formation of carbamoyl glucuronide of DCDQ (M6) was detected with liver microsomes of dog and human, but not mouse or rat. When DCDQ (20 μM) was incubated with human liver microsomes in the presence of both NADPH and UDPGA, formation of the hydroxy metabolites was the major

metabolic pathway, and only minor amounts of the carbamoyl glucuronide were detected. Gender differences were not observed in microsomal incubations for mouse, rat and dog.

[^{14}C]DCDQ METABOLISM BY HUMAN HEPATOCYTES

When DCDQ was incubated with human hepatocytes, the carbamoyl glucuronide (M6) was the most prominent metabolite at 50 μM DCDQ concentration. Oxidative metabolites were also observed at 50 μM DCDQ concentration, although less abundant relative to the carbamoyl glucuronide. Incubations containing 10 μM DCDQ with human hepatocytes produced oxidative metabolites at levels approaching those of the carbamoyl glucuronide. In addition to the metabolites formed in human microsomal incubations, another metabolite (M7) was detected. The DCDQ imine (P3), which was formed in microsomes, was also observed in the hepatocyte incubations.

METABOLITE CHARACTERIZATION BY LC/MS ANALYSIS

Mass spectra were obtained by LC/MS and LC/MS/MS analysis for DCDQ and its metabolites. Structural characterization of these compounds is summarized in Table 6.

TABLE 6

Metabolites Of Dcdq Generated By Liver Microsomes And Hepatocytes

Products	$[M+H]^+$	Site of Metabolism	Source
M1, hydroxy DCDQ	245	Diazepane ring	HM, HH
M2, hydroxy DCDQ	245	Pyridine ring	MM, RM, DM, HM, HH
M3, hydroxy DCDQ	245	Cyclopentane ring	MM, RM, DM, HM, HH
M4, hydroxy DCDQ	245	Cyclopentane ring	MM, RM, DM, HM, HH
M5, DCDQ imine oxide	243	Diazepane ring	DM, HM, HH
M6, carbamoyl glucuronide of DCDQ	449	Diazepane ring	DM, HM, HH
M7, keto DCDQ	243	Pyridine or cyclopentane ring	HH
P3, DCDQ imine	227	Diazepane ring	MM, RM, DM, HM, HH

TABLE 6

Metabolites Of Dcdq Generated By Liver Microsomes And Hepatocytes

Products	$[M+H]^+$	Site of Metabolism	Source
DCDQ	229		MM, RM, DM, HM, HH

MM: Mouse liver microsomes
RM: Rat liver microsomes
DM: Dog liver microsomes
HM: Human liver microsomes
HH: Human hepatocytes

The mass spectral characterization of DCDQ and its metabolites identified in each of the studies are discussed further below.

DISCUSSION

Species differences were observed in DCDQ metabolism. Oxidative metabolism was the major metabolic pathway for DCDQ in hepatic microsomal incubations. Several hydroxy metabolites (M1, M2, M3 and M4) of DCDQ were detected with human liver microsomes in the presence of NADPH (Figure 1). Metabolites M2 and M3 were also observed with dog and rat liver microsomes. Mouse had less extensive metabolism than other species, and M2 was the only metabolite detected with mouse liver microsomes. An N-oxide of DCDQ imine (M5) was detected in microsomal incubations for dog and human, but not mouse or rat liver microsomes. In the presence of UDPGA, the carbamoyl glucuronide of DCDQ (M6) was detected with dog and human, but not mouse or rat. While formation of the hydroxy metabolites was the major metabolic pathway with human liver microsomes in the presence of both NADPH and UDPGA, the carbamoyl glucuronide M6 was the major metabolite in human hepatocytes at 50 μM DCDQ concentration. Enzyme systems other than P450 may also contribute to DCDQ metabolism by formation of a DCDQ imine (P3) and other products (P1 and P2). Formation of products P1, P2 and P3 was not NADPH-dependent, and requires further investigation since they were generally present in all incubations with liver microsomes and hepatocytes. Sex differences were not observed for mice, rats or dogs in microsomal incubations.

In summary, DCDQ was converted to oxidative metabolites and a carbamoyl glucuronide in microsomal incubations and human hepatocytes.

IN VIVO METABOLISM OF [^{14}C]DCDQ IN MALE AND FEMALE SPRAGUE-DAWLEY RATS FOLLOWING A SINGLE (5 MG/KG) ORAL GAVAGE ADMINISTRATION

SYNOPSIS

The present study investigated the in vivo metabolism of [^{14}C]DCDQ in male and female Sprague-Dawley rats after a single oral administration (5 mg/kg). Blood, plasma and brain were collected at 2, 4, 8 and 24 hour post-dose from male rats and at 2 and 8 hour post-dose from female rats. Urine and feces were collected from male rats at intervals of 0-8 and 8-24 hours post-dose.

In male rats, plasma radioactivity concentrations were 632 ± 144, 659 ± 16.5, 465 ± 43.1, and 46.9 ± 8.30 ng equivalents/mL at 2, 4, 8 and 24 hour post-dose, respectively. For female rats, the mean plasma radioactivity concentration of 658 ± 189 ng equivalents/mL at 2 hour post-dose was similar to male rats, but the average radioactivity concentration of 338 ± 60.7 ng equivalents/mL at 8 hour post-dose was lower than male rats. The average blood-to-plasma ratio was about 1.1 between 2 and 8 hour post-dose, indicating limited partitioning of DCDQ and its metabolites into blood cells.

DCDQ represented an average of 13% to 20% of plasma radioactivity between 2 and 8 hour post-dose. The 24 hour plasma samples were not analyzed for profiles due to low radioactivity concentrations. Changes in metabolite profiles were not apparent over time. Metabolites detected in plasma included hydroxy DCDQ metabolites (M1, M2, M3, M4 and M10), keto DCDQ (M7), and the phase II metabolites DCDQ sulfamate (M12), di-dehydro DCDQ sulfamate (M14), hydroxy DCDQ sulfates (M8 and M13), hydroxy DCDQ glucuronide (M9) and acetylated hydroxy DCDQ (M11). Plasma metabolite profiles exhibited sex-related differences. While the hydroxy DCDQ metabolites (M1, M2 and M3), the keto DCDQ (M7) and the hydroxy DCDQ glucuronide (M9) were the major metabolites in male rat plasma, the hydroxy DCDQ metabolite (M3), the hydroxy DCDQ sulfate (M8), the hydroxy DCDQ glucuronide (M9) and DCDQ sulfamate (M12) were the major metabolites in female rats. The primary sex difference was in the formation of sulfates or sulfamates.

Urinary excretion was a major route of elimination of orally administered DCDQ and accounted for 66.7% of the dose. The major metabolites observed in plasma samples were also detected in urine, where DCDQ accounted for less than 1% of the dose. The hydroxy metabolites (M1 and M3), the keto DCDQ (M7) and the glucuronide (M9) were the major metabolites in urine. An average of 21.1% of the dosed radioactivity was recovered in feces. Metabolites M3, M8, M9, M10, M11 and only trace amounts of DCDQ were detected in male rat feces.

Radioactivity in brain tissue was significantly higher than in plasma at 2, 4 and 8 hour post-dose. Brain radioactivity concentrations were 5.12 ± 1.28, 4.94 ± 0.44, 3.25 ± 0.99 and 0.037 ± 0.002 μg equivalents/g tissue at 2, 4, 8 and 24 hour post-dose for male rats, respectively, while concentrations were 6.38 ± 2.22 and 2.85 ± 0.68 μg equivalents/g tissue at 2 and 8 hour post-dose for female rats, respectively. The average brain-to-plasma radioactivity ratios between 2 and 8 hour post-dose ranged from 6.9 to 9.6, indicating significant uptake by brain tissue. By 24 hour post-dose, the average brain-to-plasma radioactivity ratio decreased to 0.8. DCDQ accounted for an average of greater than 90% of brain radioactivity for male and female rats between 2 and 8 hour post-dose. Based on the radioactivity concentrations and chromatographic distribution of brain radioactivity, it was estimated that the average brain-to-plasma DCDQ ratios ranged from 49.9 to 56.1. There were no significant gender differences or changes over time between 2 and 8 hour post-dose. Only minor amounts of metabolites M1, M3, M7, M10 and M11 were detected in male or female rat brain. These data indicated that DCDQ readily crossed the blood brain barrier, while uptake of metabolites into brain tissue was limited. The brain-to-plasma radioactivity ratios also suggested that clearance from brain occurred rapidly after 8 hour post-dose, since the ratios decreased from 6.9 to 0.8 by 24 hour post-dose.

In summary, DCDQ was extensively metabolized in rats to predominantly oxidative metabolites. Plasma profiles for male and female rats differed in sulfate and sulfamate conjugates of DCDQ and its oxidative metabolites. DCDQ was the predominant drug related component in brain while only minor amounts of metabolites were observed, and gender difference was not apparent. DCDQ readily crossed the blood brain barrier while uptake of metabolites was limited to minor amounts of oxidative metabolites.

INTRODUCTION

A previous mass balance study showed that urine was the major route of excretion in rats, with an average of 84.3% of the dosed radioactivity recovered in urine. An in vitro study with liver microsomes showed that oxidative metabolism was the major metabolic pathway for DCDQ in rats. (Iwasaki K, Shirage T, Tada K, Noda K, Noguchi H. Age- and sex-related changes in amine sulphoconjugation in Sprague-Dawley strain rats. Comparison with phenol and alcohol sulphoconjugations. Xenobiotica. 1986;16:717-723.) The present study investigated the metabolism of [^{14}C]DCDQ in rats following a single 5 mg/kg oral dose.

MATERIALS AND METHODS

MATERIALS

[^{14}C]DCDQ hydrochloride was synthesized by the radiosynthesis group of Wyeth Research (Pearl River, NY) as described in the in vitro study discussed above. Ultima Gold, Ultima Flo, Permafluor E+-scintillation cocktails, and Carbo-Sorb E carbon dioxide absorber were purchased from Perkin Elmer (Wellesley, MA). Polysorbate 80 was obtained from Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, NJ) and methylcellulose was from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI). Solvents used for extraction and for chromatographic analysis were HPLC or ACS reagent grade from EMD Chemicals (Gibbstown, NJ).

METHODS

DRUG ADMINISTRATION AND SPECIMEN COLLECTION

Dose preparation, animal dosing, and specimen collection were performed at Wyeth Research, Collegeville, PA. The dose vehicle contained 2% (w/w) Tween 80 and 0.5% methylcellulose in water. On the day of dosing, [^{14}C]DCDQ (12.2 mg) and non-labeled DCDQ (36.5 mg) were dissolved in the vehicle to a final concentration of approximately 2 mg/mL.

Male rats weighing from 318 to 345 grams and female rats weighing from 227 to 255 grams at the time of dosing were purchased from Charles River Laboratories, Wilmington, MA. Non-fasted rats were given a single 5 mg/kg (~300 µCi/kg) dose of

DCDQ at a volume of 2.5 mL/kg via intragastric gavage. Animals were provided Purina rat chow and water ad libitum, and were kept individually in metabolism cages. Male rats were sacrificed at 2, 4, 8 and 24 hour after dose administration. Female rats were sacrificed at 2 and 8 hour after dose administration.

At sacrifice, blood samples were collected by cardiac puncture into tubes containing EDTA as the anticoagulant and placing them on ice. Aliquots of 50 µL were removed for combustion and determination of radioactivity content. Plasma was immediately obtained from the remaining blood by centrifugation at 4°C. Brains were excised after perfusion with 50 mL of chilled sterile saline. Urine samples were collected on dry ice at intervals of 0-8 and 8-24 hour post-dosing. Feces were collected at intervals of 0-8 and 8-24 hr post-dosing at room temperature and were homogenized as described previously. The biological specimens and aliquots of the dosing solution at pre- and post-dose were stored at approximately -70°C until analyzed.

RADIOACTIVITY DETERMINATIONS

Plasma (20 µL) and urine (50 µL) aliquots were analyzed for radioactivity concentrations. Radioactivity determinations of dose, plasma and urine were made with a Tri-Carb Model 3100 TR/LL liquid scintillation counter (LSC) (Perkin Elmer) using 10 mL of Ultima Gold as the scintillation fluid.

Brain and fecal samples were weighed and homogenized in water at volume-to-weight ratios of about 1:1 and 5:1, respectively. Blood aliquots (50 µL), brain homogenates (0.1 gram) and fecal homogenates (0.2 gram) were placed on Combusto-cones with Combusto-pads and combusted. A model 307 Tri-Carb Sample Oxidizer, equipped with an Oximate-80 Robotic Automatic Sampler (Perkin Elmer), was used for combustion. The liberated $^{14}CO_2$ was trapped with Carbo-Sorb E carbon dioxide absorber, mixed with PermaFluor® E+ liquid scintillation cocktail, and counted in a Tri-Carb Model 3100 TR/LL liquid scintillation counter (Perkin Elmer). The oxidation efficiency of the oxidizer was 98.2%.

A Flo-One β Model A525 radioactivity detector (Perkin Elmer) with a 250 µL LQTR flow cell was used for in-line radioactivity detection for HPLC. The flow rate of Ultima Flow M scintillation fluid was 1 mL/min, providing a mixing ratio of scintillation cocktail to mobile phase of 5:1. The limits of detection were approximately 1 ng.

equivalent/g for brain, 2 ng equivalents/mL for plasma, 5 ng equivalents/g for feces and 10 ng equivalents/mL for urine.

DOSE ANALYSIS

Aliquots of the pre- and post-dose solutions were diluted with 25% methanol in water and analyzed for radioactivity concentrations as described above. Approximately 100,000 DPM in 10 µL of the diluted solution was analyzed by HPLC for radiochemical purity and chemical purity. To determine the specific radioactivity of the dose suspension, non-radiolabeled DCDQ was dissolved in methanol, diluted with 25% methanol in water, and concurrently analyzed by HPLC to generate a standard curve. Aliquots (10 µL) of the diluted dose solution were injected onto the HPLC column and fractions were collected at 1 minute intervals after UV detection. Radioactivity in each fraction was determined. Fractions were also collected from a blank injection to obtain the background level of radioactivity.

PLASMA METABOLITE PROFILES

Plasma samples were analyzed for metabolite profiles by HPLC. Aliquots of 1.5 mL plasma were mixed with 3.0 mL methanol, placed on ice for about 10 minutes, and then centrifuged. The supernatant was transferred to a clean tube. The protein pellets were extracted once with 3.0 mL methanol. The supernatants from precipitation and extraction of each sample were pooled, mixed, and evaporated at 22°C under nitrogen in a Zymark TurboVap LV (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA) to about 0.3 mL. The concentrated extract was centrifuged, the supernatant volume measured and extraction efficiency was determined by analyzing duplicate 10 µL aliquots for radioactivity. An aliquot of the supernatant (50-200 µL) was analyzed by HPLC with radioactivity flow detection. Plasma extracts were also analyzed by LC/MS.

ANALYSIS OF FECES AND URINE

Fecal homogenates were analyzed for metabolite profiles. Aliquots of 1 gram of fecal homogenates were mixed with 2 mL methanol, placed on ice for about 10 minutes and centrifuged. The supernatant was transferred to a clean tube. The residue was extracted three times with 2 mL of a water:methanol (3:7) mixture. The

supernatants of each sample were combined, evaporated to about 1 mL, and centrifuged. Extraction efficiency was determined by analyzing aliquots of 10 µL of the supernatant for radioactivity. An aliquot (50-200 µL) of the supernatant was analyzed by HPLC with radioactivity flow detection for profiling. Samples were also analyzed by LC/MS to characterize the radioactive peaks.

Urine was analyzed for radioactivity concentration as and analyzed for metabolite profiles by direct injection onto the HPLC column. LC/MS analyses for metabolite identification were also carried out with urine samples.

METABOLITE PROFILES IN BRAIN

Brain homogenates were analyzed for metabolite profiles. Aliquots of 1 gram of brain homogenates were mixed with an equal volume of methanol, placed on ice for about 10 minutes and centrifuged. The supernatant was transferred to a clean tube. The residue was extracted three times with 1 mL methanol. The supernatants of each sample were combined, evaporated to about 0.5 mL, and centrifuged. Extraction efficiency was determined by analyzing aliquots of 10 µL of the supernatant for radioactivity. An aliquot (100-200 µL) of the supernatant was analyzed by HPLC with radioactivity flow detection for profiling. Samples were also analyzed by LC/MS to characterize the radioactive peaks.

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

A Waters model 2690 HPLC system (Waters Corp., Milford, MA) with a built-in autosampler was used for analysis. Separations were accomplished on a Phenomenex Luna $C_{18}(2)$ column (150 × 2.0 mm, 5µm) (Phenomenex, Torrance, CA). The sample chamber of the autosampler was maintained at 4°C, while the column was at ambient temperature of about 20°C. A variable wavelength UV detector set to monitor 250 nm and a Flo-One β Model A525 radioactivity detector described above were used for data acquisition. The HPLC mobile phase consisted of 10 mM ammonium acetate, pH 4.5 (A) and methanol (B), and was delivered at 0.2 mL/min. Chromatographic condition A was used for dose analysis, while condition B was used for analysis of urine and plasma, brain and fecal extracts.

TABLE 7

CONDITION A		
Time (min)	A (%)	B (%)
0	90	10
3	90	10
25	60	40
CONDITION B		
Time (min)	A (%)	B (%)
0	90	10
6	90	10
35	60	40
65	15	85
70	15	85

LC/MS ANALYSES

An Agilent Model 1100 HPLC system (Agilent Technologies, Wilmington, DE) including an autosampler and diode array UV detector was used for LC/MS analysis of plasma and urine samples. The UV detector was set to monitor 200 to 400 nm. For selected LC/MS analyses, radiochromatograms were acquired using a β-Ram model 3 radioactivity flow detector (IN/US Systems Inc., Tampa, FL) equipped with a solid scintillant flow cell. Fecal samples were also analyzed using a Waters Alliance model 2690 HPLC system. It was equipped with a built-in autosampler and a model 996 diode array UV detector set to 210-350 nm. The HPLC flow was split between a Radiomatic model 150TR flow scintillation analyzer (Perkin Elmer) and the mass spectrometer. Other HPLC conditions were the same as condition B described above.

The mass spectrometer used for metabolite characterization for plasma and urine was a Micromass Q-TOF-2 quadrupole time-of-flight hybrid mass spectrometer (Waters). The mass spectrometer was equipped with an electrospray ionization (ESI) interface and operated in the positive ionization mode. Collision energy settings of 5 and 30 eV were used for full MS and MS/MS scans, respectively. Settings for the mass spectrometer are listed below.

TABLE 8

MICROMASS Q-TOF-2 MASS SPECTROMETER SETTINGS	
Capillary Voltage	3.0 Kv
Cone	30 V
Source Block Temperature	100°C
Desolvation Gas Temperature	250°C
Desolvation Gas Flow	550 L/hr
Cone Gas Flow	50 L/hr
CID Gas Inlet Pressure	13-14 psig
TOF-MS resolution (m/Δm)	8000

A Micromass Quattro Micro mass spectrometer (Waters) was also used to analyze the fecal samples. It was equipped with an electrospray ionization (ESI) interface and operated in the positive ionization mode. Settings for the mass spectrometer are listed below.

TABLE 9

MICROMASS TRIPLE QUADRUPLE MASS SPECTROMETER SETTINGS	
ESI spray	2.75 KV
Cone	30 V
MS1 Mass Resolution	1-1.5 Da width at half height
MS2 Mass Resolution	0.7 Da ± 0.2 Da width at half height
Desolvation gas flow	875-950 L/hr
Cone Gas flow	20-35 L/hr
Source block temp.	80 °C
Desolvation gas temp.	250 °C
Collision gas pressure	1.3-1.5 x 10-3 mBar
Collision energy	25 eV

LC/MS/MS in the selected reaction-monitoring (SRM) mode (LC/SRM) was conducted with the triple quadruple mass spectrometer to monitor DCDQ and its metabolites in fecal samples. The transitions monitored are listed below.

TABLE 10

Precursor Ion (m/z)	Product Ion (m/z)	Compound

229	186	DCDQ
243	200	M7
245	144	M3, M4, and M10
245	184	M3, M4, and M10
287	186	M11
325	245	M8, M13
421	245	M9

DATA ANALYSIS AND STATISTICAL EVALUATION

Flo-One analytical software (Packard, version 3.6) was utilized to integrate the radioactive peaks. The computer program Microsoft Excel® 97 was used to calculate means and standard deviations and to perform the student t-test. Micromass MassLynx software (Waters, version 4.0) was used for collection and analysis of LC/MS data.

RESULTS

DOSE ANALYSIS

The radiochemical purity and estimated chemical purity (by ultraviolet detection) of [^{14}C]DCDQ in the dose solution were 99.0 ± 0.3% and 99.6 ± 0.1%, respectively. The pre- and post-dose aliquots had the same purity. The specific activity of [^{14}C]DCDQ in the dosing solution was 48.2 μCi/mg as the hydrochloride salt. The average drug concentration was 2.48 mg/mL as the hydrochloride salt or 2.14 mg/mL as the free base. The actual dose of DCDQ administered ranged from 5.2 to 5.4 mg/kg as the free base, or 6.1 to 6.3 mg/kg as the hydrochloride salt.

PLASMA RADIOACTIVITY CONCENTRATIONS AND METABOLITE PROFILES

The concentrations of radioactivity in blood and plasma after a single oral dose of [^{14}C]DCDQ are summarized in Table 11.

TABLE 11

Rat Blood And Plasma Concentrations (ng equivalents/mL) Of Radioactivity Following A Single Oral 5 Mg/Kg Administration Of [^{14}C]DCDQ

Time	Blood		Plasma	
(hr)	Individuals	Mean ± SD	Individuals	Mean ± SD
Male				

2	606	624	888	706 ± 158	567	531	797	632 ± 144
4	698	725	689	704 ± 18.7	678	652	647	659 ± 16.5
8	538	475	562	525 ± 45.3	487	415	492	465 ± 43.1
24	66.5	58.9	78.7	68.0 ± 10.0	50.5	37.4	52.8	46.9 ± 8.30
Female								
2	661	932	499	697 ± 219	635	857	481	658 ± 189
8	413	292	406	307 ± 68.4*	362	269	383	338 ± 60.7*

*: Significantly lower than male at 8 hour, $p<0.05$

In male rats, the average plasma radioactivity concentrations were 632, 659, 465 and 46.9 ng equivalents/mL at 2, 4, 8 and 24 hour post-dose, respectively. In female rats, the average plasma radioactivity concentration of 658 ng equivalents/mL at 2 hour was similar to male rats, but the average plasma concentration of 338 ng equivalents/mL at 8 hour post-dose was significantly lower than in male rats. Blood samples had slightly higher radioactivity concentrations than plasma at all time points. The average blood-to-plasma radioactivity ratios ranged from about 1.1 for male and female rats at 2, 4 and 8 hour post-dose to about 1.5 for male rats at 24 hour post-dose, indicating limited partitioning of DCDQ or its metabolites into blood cells (Table 12).

TABLE 12

Rat Blood-To-Plasma Radioactivity Ratios Following A Single Oral 5 Mg/Kg Administration Of [^{14}C]DCDQ

Time (hr)	Blood/Plasma Ratios Individuals			Mean ± SD
Male				
2	1.07	1.18	1.11	1.12 ± 0.06
4	1.03	1.11	1.07	1.07 ± 0.04
8	1.10	1.14	1.14	1.13 ± 0.02
24	1.32	1.58	1.49	1.46 ± 0.13
Female				
2	1.04	1.09	1.04	1.06 ± 0.03
8	1.14	1.08	1.06	1.09 ± 0.04

Plasma extracts contained an average of 82 to 96% of total plasma radioactivity for the 2, 4 and 8 hour samples. Metabolite profiles were not obtained from the 24 hour plasma samples due to low radioactivity concentrations. DCDQ was extensively metabolized in rats. The parent drug represented an average of 13 to 20% of total radioactivity in plasma extracts with no apparent differences between males and females or over time (Tables 13 and 14). Several hydroxy DCDQ metabolites (M1, M2, M3, M4 and M10) and keto DCDQ (M7) were detected in plasma (Figure 1). Phase II metabolites observed in plasma included DCDQ sulfamate (M12, major in female plasma only), di-dehydro DCDQ sulfamate (M14, major in female plasma only), hydroxy DCDQ sulfates (M8 and M13), hydroxy DCDQ glucuronide (M9) and acetylated hydroxy DCDQ (M11) (Figure 1). Percent distribution of plasma radioactivity did not change significantly over time, except for metabolite M8, which was markedly lower at 8 hour post-dose. Metabolites M1, M2, M3, M7 and M9 were the major metabolites in male rats, while M3, M8, M9 and M12 were the major metabolites in female rats, indicating sex differences in metabolite profiles (Tables 13 and 14). A number of relatively minor metabolites detected in plasma extracts were not characterized, although when combined represented 19-38% of the plasma radioactivity. Plasma concentrations of the individual metabolites based on their percent distribution are presented in Table 4. DCDQ concentrations generally equaled or exceeded the concentrations of each individual metabolite in male and female rat plasma. In male rats, metabolites M1, M3+M9 and M7 exhibited the highest concentrations while in female rats, metabolites M3+M9 and M8 were the more prominent metabolites.

Table 13

Chromatographic Distribution (%) of Radioactivity in Rat Plasma Following Oral Administration of [^{14}C]DCDQ (5 mg/kg)

Time (hr)	M1	M2	M3+M9	M4	M7	M8	M10	M11	M12	M13	M14	DCDQ	Others[a]
Male													
2	14	5.2	12	4.4	10	2.4	3.6	6.0		1.9		14	26
	(2.7)[b]	(2.3)	(4.8)	(0.85)	(1.3)	(1.5)	(0.83)	(2.2)	BQL[c]	(0.65)	BQL	(4.9)	(4.8)
4	9.1	3.4	16	4.3	9.4	4.6	1.5	5.2		2.2		14	31
	(0.6)	(0.81)	(3.1)	(0.47)	(2.3)	(0.83)	(2.6)	(0.96)	BQL	(0.36)	BQL	(3.4)	(1.3)
8	8.9	4.3	14	2.5	12		3.0	3.6		1.4		13	38
	(2.3)	(0.40)	(2.0)	(2.4)	(4.5)	BQL	(2.7)	(1.2)	BQL	(1.2)	BQL	(2.4)	(2.6)
Female													
2	2.0[d]		14	2.4[e]	5.4[d]	14[d]	5.2	6.1	5.2[e]	2.6	4.0[d]	20	20
	(0.77)	BQL	(2.7)	(0.48)	(0.50)	(2.2)	(0.90)	(1.1)	(1.8)	(2.4)	(0.77)	(6.5)	(5.7)
8	1.9[d]	1.5[e]	16[e]	2.7	5.6	10[d]	5.6	4.9	3.3	1.6	4.9[d]	15	25
	(0.55)	(1.5)	(0.83)	(0.84)	(4.9)	(0.10)	(0.70)	(0.10)	(1.9)	(1.7)	(1.6)	(2.4)	(6.2)

a: Includes over ten other unidentified minor metabolites

b: Standard deviation (n=3)

c: BQL, Below quantitation limit (2 ng equivalents/mL for plasma)

d: Significantly different from male, $p<0.01$

e: Significantly different from male, $p<0.05$

Table 14

Estimated Plasma CONCENTRATIONS (Ng Equivalents/Ml) Of DCDQ And Metabolites In Rats Following Oral Administration Of [^{14}C]DCDQ (5 Mg/Kg)[a]

Time (hr)	M1	M2	M3+M9	M4	M7	M8	M10	M11	M12	M13	M14	DCDQ
Male												
2	88.4	32.3	76.4	28.3	63.8	15.1	23.7	37.2		11.6		86.9
	(1.77)[b]	(12.1)	(31.6)	(9.26)	(6.12)	(9.12)	(10.5)	(10.5)	BQL[c]	(3.66)	BQL	(35.2)
4	59.7	22.6	105	28.3	62.1	30.3	9.81	34.5		14.2		90.8
	(4.86)	(5.01)	(18.6)	(3.39)	(18.7)	(4.81)	(16.7)	(6.82)	BQL	(2.02)	BQL)	(22.8)
8	41.9	20.0	64.0	12.4	53.0		13.2	16.3		6.33		58.7
	(13.7)	(2.96)	(3.77)	(11.4)	(20.6)	BQL	(11.7)	(3.75)	BQL	(5.50)	BQL	(15.5)
Female												
2	12.6[d]		92.5	15.9	35.6[e]	91.1[e]	35.2	41.0	33.8[e]	16.6	25.1[d]	132
	(2.14)	BQL	(28.6)	(7.65)	(12.2)	(37.5)	(16.2)	(17.0)	(12.6)	(15.4)	(2.28)	(61.2)
8	6.52[d]	4.40[d]	61.8	8.96	17.5	34.4[d]	18.9	16.6	11.8	5.62	16.5[e]	49.4
	(2.16)	(4.15)	(8.84)	(1.52)	(15.3)	(8.44)	(3.69)	(2.95)	(7.79)	(6.75)	(6.51)	(12.6)

a: Concentrations were estimated based on the total plasma radioactivity concentrations (Table 14) and the percent distribution of plasma radioactivity (Table 13).

b: Standard deviation (n=3)

c: BQL, Below quantitation limit (2 ng equivalents/mL for plasma)

d: Significantly different from male, $p<0.01$

e: Significantly different from male, $p<0.05$

URINARY EXCRETION AND METABOLITE PROFILES

Urine was a major route of excretion, with 66.7 ± 5.0% of the radioactive dose recovered in urine samples in the first 24 hours post-dose, with 32.5% in the 0-8 hour period and 34.2% in the 8-24 hour period. Most of the major plasma metabolites were also detected in urine (Table 15). The major metabolites in urine from male rats included hydroxy DCDQ metabolites (M1, M2, M3 and M4), keto DCDQ (M7) and hydroxy DCDQ glucuronide (M9) (Table 15). The individual metabolites in the 0-24 hour urine represented about 2 to 16% of the administered dose (Table 16), while DCDQ represented less than 1% of the dose. The distribution of metabolites was similar for the 0-8 hour and 8-24 hour collections.

Table 15

Chromatographic Distribution (%) Of Radioactivity in male Rat Urine Following Oral Administration of [^{14}C]DCDQ (5 mg/kg)

Time (hr)	M1	M2	M3 + M9	M4	M7	M8	M10	DCDQ	Others[a]
0-8	26.9	9.51	18.8	3.73	9.68	3.56	3.32	1.29	23.2
	(3.43)[b]	(3.66)	(0.95)	(1.15)	(1.06)	(0.32)	(0.18)	(0.12)	(1.28)
8-24	22.5	5.83	18.8	3.08	10.1	4.36	2.70	1.46	31.2
	(2.96)	(3.09)	(2.13)	(1.05)	(0.22)	(0.60)	(0.52)	(0.63)	(0.85)

a: At least ten additional minor metabolites

b: Standard deviation (n=3)

Table 16

Percentage of dose for urinary metabolites in Rats Following Oral Administration of [^{14}C]DCDQ (5 mg/kg)

Time (hr)	M1	M2	M3 + M9	M4	M7	M8	M10	DCDQ
0-8	8.67	3.16	6.13	1.21	3.16	1.15	1.08	0.42
	(0.64)[a]	(1.53)	(0.91)	(0.37)	(0.57)	(0.00)	(0.14)	(0.02)
8-24	7.74	1.94	6.45	1.03	3.44	1.47	0.91	0.51
	(1.87)	(0.85)	(1.45)	(0.29)	(0.45)	(0.13)	(0.07)	(0.28)
0-24	16.4	5.09	12.6	2.24	6.60	2.62	1.99	0.93
	(2.45)	(2.35)	(1.83)	(0.27)	(0.31)	(0.13)	(0.15)	(0.29)

a: Standard deviation (n=3)

FECAL EXCRETION AND METABOLITE PROFILES

Fecal elimination accounted for 21.1 ± 2.1% of the dosed radioactivity recovered in the first 24 hours post-dosing for male rats. Extraction efficiency for the 8-24 hour fecal samples was 64.3%, while an average of 89.5% of the radioactivity was extracted from incubations of [^{14}C]DCDQ in control fecal homogenate. Hydroxy DCDQ metabolites (M3 and M4), the hydroxy DCDQ sulfate (M8), the hydroxy DCDQ glucuronide (M9) and the acetylated hydroxy DCDQ (M11) were the major metabolites in the 8-24 hour fecal extracts, with only trace amounts of parent drug detected. Metabolite profiles were not obtained from the 0-8 hour fecal samples because of low radioactivity (less than 0.1% of dosed radioactivity). Incubation of [^{14}C]DCDQ in fecal homogenate at 37°C for 24 hours showed no detectable degradation.

RADIOACTIVITY CONTENT AND METABOLITE PROFILES IN BRAIN

An average of 84.5% of the radioactivity in brain tissue was extracted. Brain radioactivity concentrations were higher than plasma through 8 hours post-dose, and DCDQ was the predominant drug-related component in rat brain. DCDQ accounted for an average of greater than 90% of the radioactivity in brain extracts for male rats at 2, 4 and 8 hour post-dose, and greater than 94% at 2 and 8 hour post-dose for female rats

(Table 17). The average radioactivity concentrations in male and female rat brain were similar and only decreased slightly from 2 hour (5.1 and 6.4 μg equivalents/g for male and female, respectively) to 8 hour (3.2 and 2.8 μg equivalents/g for male and female rats, respectively). By 24 hour, the brain concentration, at an average of 0.04 μg equivalents/g for male rats, was lower than in plasma. The average brain-to-plasma radioactivity ratios between 2 and 8 hour post-dosing were 6.9 to 8.2 for male rats and 8.7 to 9.6 for female rats, and decreased to 0.6 at 24 hour for male rats. There were no significant differences in brain radioactivity content or brain-to-plasma radioactivity ratios between male and female rats. The brain-to-plasma DCDQ ratios were much higher than the radioactivity ratios (Table 17). The average brain-to-plasma DCDQ ratio was between 49.9 and 56.1 independent of time or sex. Only minor amounts of metabolites M7, M10 and M11 were detected in male and female rat brain, and each metabolite represented an average of less than 4.5% of brain radioactivity. Two additional minor metabolites (M1 and M3) were observed in male rat brain. By 8 hour post-dose, most metabolites were not detectable and only DCDQ was observed.

Table 17

Brain Concentrations Of Radioactivity And DCDQ Relative To Plasma Concentrations Following Oral Administration Of [^{14}C]DCDQ (5 Mg/Kg) To Rats[a]

Time (hr)	Concentration of Radioactivity (μg equivalents/g)		% DCDQ of Brain Radioactivity	Brain/Plasma Ratio	
	Total	DCDQ[b]		Total	DCDQ
Male					
2	5.12 ± 1.28	4.63 ± 1.18	90.4 ± 0.9	8.20 ± 1.95	56.4 ± 11.5
4	4.94 ± 0.44	4.47 ± 0.42	90.4 ± 0.5	7.49 ± 0.62	50.5 ± 6.88
8	3.25 ± 0.99	2.93 ± 0.93	90.0 ± 1.2	6.92 ± 1.62	50.5 ± 11.4
24	0.04 ± 0.00	NA[c]	NA	0.60 ± 0.12	NA
Female					
2	6.38 ± 2.22	6.08 ± 2.17	95.2 ± 1.0	9.57 ± 0.68	49.9 ± 14.3

Table 17

Brain Concentrations Of Radioactivity And DCDQ Relative To Plasma Concentrations Following Oral Administration Of [^{14}C]DCDQ (5 Mg/Kg) To Rats[a]

Time (hr)	Concentration of Radioactivity (µg equivalents/g)		% DCDQ of Brain Radioactivity	Brain/Plasma Ratio	
8	2.85 ± 0.68	2.68 ± 0.66	94.1 ± 0.7	8.69 ± 2.66	58.1 ± 17.8

a: Data are presented as mean ± S.D., N=3

b: DCDQ concentrations were estimated on the total radioactivity concentrations in brain and percent distribution of brain radioactivity.

c: Not available, concentration below level for profiling

METABOLITE CHARACTERIZATION BY LC/MS ANALYSES

Mass spectra were obtained by LC/MS and LC/MS/MS analysis for DCDQ and its metabolites. Structural characterization of these compounds is summarized in Table 18. The mass spectral characterization of DCDQ and its metabolites are discussed below with the characterization from the other studies described herein.

TABLE 18

Metabolites Of Dcdq Identified In Rats By LC/MS Analysis

Metabolite	Retention Time (min)[a]	$[M+H]^+$	Site(s) of Metabolism	Metabolite Name	Matrix[b]
M1	24.9	245	Diazepane ring	Hydroxy DCDQ	P, U, B
M2	28.8	245	Pyridine ring	Hydroxy DCDQ	P, U
M3	35.3	245	Cyclopentane ring	Hydroxy DCDQ	P, U, B, F
M4	37.1	245	Cyclopentane ring	Hydroxy DCDQ	U, F
M7	32.2	243	Cyclopentane or pyridine ring	Keto DCDQ	P, U, B

TABLE 18

Metabolites Of Dcdq Identified In Rats By LC/MS Analysis

Metabolite	Retention Time (min)[a]	$[M+H]^+$	Site(s) of Metabolism	Metabolite Name	Matrix[b]
M8	22.0	325	Pyridine ring	Hydroxy DCDQ Sulfate	P, U, F
M9	35.4	421	Cyclopentane ring	Hydroxy DCDQ Glucuronide	P, U, F
M10	41.7	245	Diazepane ring	Hydroxy DCDQ	U, B, F
M11	48.7	287	Diazepane ring	Acetylated hydroxy DCDQ	P, B, F
M12	60.4	309	Diazepane ring	DCDQ Sulfamate	P, U
M13	35.6	325	Pyridine ring	Hydroxy DCDQ Sulfate	
M14	15.8	305	Pyridine and diazepane ring	Di-dehydro DCDQ Sulfamate	P, U
DCDQ	53.8	229			P, U, F

a: LC/MS retention times were normalized to LC/MS data file GU_071803_0003, and GU_081303_0002.

b: P=plasma; U=urine; B=brain; F=feces. Fecal metabolites were detected by selective reaction monitoring.

DISCUSSION

DCDQ was extensively metabolized in rats following a single oral 5 mg/kg administration and oxidative metabolism was the major metabolic pathway. DCDQ represented an average of 13% to 20% of plasma radioactivity between 2 and 8 hour post-dose and less than 2% of total urinary radioactivity at 0-8 and 8-24 hour post-dose. Metabolites observed in plasma included hydroxy DCDQ metabolites (M1, M2, M3, M4 and M10), keto DCDQ (M7), and phase II metabolites such as DCDQ sulfamate (M12), di-dehydro DCDQ sulfamate (M14), hydroxy DCDQ sulfates (M8 and M13), hydroxy DCDQ glucuronide (M9) and acetylated hydroxy DCDQ (M11) (Figure 1). Percent

distribution of radioactivity in plasma did not change significantly over time, except for metabolite M8, which was significantly lower at 8 hour than 2 and 4 hour post-dose. Plasma metabolite profiles exhibited differences in male and female rats. While the hydroxy DCDQ metabolites (M1, M2 and M3), the keto DCDQ (M7) and the hydroxy DCDQ glucuronide (M9) were the major metabolites in male rat plasma, the hydroxy DCDQ metabolite (M3), the hydroxy DCDQ sulfate (M8), the hydroxy DCDQ glucuronide (M9) and DCDQ sulfamate (M12) were the major metabolites in female rats. The primary sex difference was in the formation of sulfates or sulfamates. These sex differences were predictable since sulfotransferase activity toward alcohol and alicyclic amines has been reported to be markedly higher in female rats than in male rats. (Naritomi Y, Niwa T, Shiraga T, Iwasaki K, Noda K. Isolation and characterization of an alicyclic amine N-sulfotransferase from female rat liver. Biological & Pharmaceutical Bulletin. 1994;7:1008-1011.)

Most of the major plasma metabolites were also detected in urine. Similar profiles were obtained for the 0-8 hour and the 8-24 hour urine samples. The major metabolites in urine from male rats included hydroxy DCDQ metabolites (M1, M2, M3 and M4), keto DCDQ (M7) and hydroxy DCDQ glucuronide (M9). Each individual metabolite in the 0-24 hour urine represented about 2 to 16% of the administered dose, while DCDQ represented less than 1% of the dose. In the 8-24 hour fecal samples, the hydroxy DCDQ metabolites (M3 and M4), the hydroxy DCDQ sulfate (M8), the hydroxy DCDQ glucuronide (M9) and the acetylated hydroxy DCDQ (M11) were the major metabolites observed, with only trace amounts of parent drug detected.

Radioactivity in brain tissue was significantly higher than in plasma at 2, 4 and 8 hour post-dose. DCDQ accounted for an average of greater than 90% of brain radioactivity for male and female rats. The average brain-to-plasma radioactivity ratios between 2 and 8 hour post-dose ranged from 6.9 to 9.6, indicating uptake by brain tissue. By 24 hour post-dose, the average brain-to-plasma radioactivity ratio decreased to 0.8. There were no significant differences in brain radioactivity content or brain-to-plasma radioactivity ratios between male and female rats. The average brain-to-plasma DCDQ ratios ranged from 49.8 to 56.1, with no sex differences or changes over time

between 2 and 8 hour post-dose. Minor amounts of metabolites M7, M10 and M11 were detected in male and female rat brain. These data indicated that DCDQ readily crossed the blood brain barrier, while uptake of metabolites into brain tissue was limited. The brain-to-plasma radioactivity ratios also suggested that clearance from brain occurred rapidly after 8 hour post-dose, since the ratios decreased from 6.9 to 0.8 by 24 hour post-dose. While partitioning of radioactivity into brain was apparent, partitioning into blood cells was limited with blood-to-plasma ratios of only about 1.1 between 2 and 8 hour post-dose.

Metabolism of DCDQ appeared more extensive in the present study compared with a previous in vitro metabolism study with rat liver microsomes. Only three oxidative metabolites (M2, M3 and M4) were observed with rat liver microsomes and sex differences were not observed. However, sex differences in formation of sulfates and sulfamates, which were observed in rat, were not investigated in any in vitro system. In addition to the metabolites M2, M3 and M4 detected with rat liver microsomes, other oxidative metabolites (M1, M7 and M10) and several phase II metabolites (M8, M11, M12, M13 and M14) were also observed in rats (Figure 1).

In summary, DCDQ was extensively metabolized in rats to predominantly oxidative metabolites. Plasma profiles for male and female rats differed in sulfate and sulfamate conjugates of DCDQ and some oxidative metabolites. DCDQ was the predominant drug related component in brain while only minor amounts of metabolites were observed, and sex differences were not apparent. DCDQ readily crossed the blood brain barrier while uptake of metabolites was limited to minor amounts of oxidative metabolites.

IN VIVO METABOLISM OF [^{14}C]DCDQ IN MALE DOGS FOLLOWING A SINGLE 15 MG/KG ORAL CAPSULE ADMINISTRATION

SYNOPSIS

The present study investigated metabolism of [^{14}C]DCDQ in four male beagle dogs following a single administration of 14.1 to 16.7 mg/kg of [^{14}C]DCDQ hydrochloride

in an enteric coated capsule. Plasma samples were collected at 2, 4, 8, 24 and 48 hour post-dose. Feces and urine were collected at intervals of 0-8, 8-24 and 24-48 hour post-dose. Samples were analyzed for radioactivity content and metabolite profiles.

Plasma concentrations of radioactivity were 422 ± 573, 564 ± 748, 528 ± 566, 1340 ± 508 and 507 ± 135 ng equivalents/mL at 2, 4, 8, 24 and 48 hour post-dose, respectively. Large individual variations were observed in plasma radioactivity concentrations, ranging from 4 to 1640 ng equivalents/mL at 2, 4 and 8 hour post-dose. The highest plasma radioactivity concentrations occurred at 24 hour except dog 2, where concentrations were the highest at 4 hour post-dose. The data are consistent with variations in excretion of radioactivity observed in the first 24 hours post-dose. The variability may be associated with slow and prolonged absorption of DCDQ in some dogs, and the enteric-coated capsules. The average blood-to-plasma radioactivity ratio for dog was approximately 0.72.

DCDQ was extensively metabolized in dogs. Oxidative metabolism was the major metabolic pathway, while formation of a DCDQ carbamoyl glucuronide was also observed. DCDQ represented 1.9% to 21% of plasma radioactivity at 2 and 4 hour, less than 3% at 8 and 24 hour, and was not detected at 48 hour post-dose. DCDQ accounted for an average of less than 11% of urinary radioactivity at all time periods. In fecal extracts, 54% to 97% of the radioactivity was attributed to the parent drug. The major metabolites observed in the 2 and 4 hour plasma included hydroxy DCDQ (M1, M2 and M3), an N-oxide DCDQ (M5), a keto DCDQ (M7), a hydroxy DCDQ imine (M15), a hydroxy DCDQ glucuronide (M9) and the carbomoyl glucuronide of DCDQ (M6) (Figure 1). Metabolites M3 and M9 accounted for the majority of plasma radioactivity at 8, 24 and 48 hour post-dose. Metabolites M2, M3, M5 and M6 were also observed in the in vitro incubation of DCDQ with dog liver microsomes in the presence of NADPH. Metabolites observed in dog plasma were also detected in dog urine except for the metabolite M7. A sulfate conjugate of hydroxy DCDQ (M16) and a diazepinyl DCDQ carboxylic acid (M17), which were not detected in plasma, were observed in urine samples. Hydroxy DCDQ metabolites (M2, M3 and M19), a keto DCDQ (M18) and the hydroxy DCDQ imine (M15) were detected in fecal extracts. Extensive metabolism and

prolonged oral absorption of DCDQ probably accounted for the relatively low oral bioavailability of approximately 25.4% in dogs.

Metabolism of DCDQ in dog exhibited some differences from rats. Some different oxidative metabolites were observed in rats and dogs. Oxidative metabolites M15, M16, M17, M18 and M19 were not observed in rats, while a hydroxy metabolite M4, which was observed in rats, was not detected in dogs. More phase II metabolites were observed in rats than in dogs. The sulfates M8 and M13, and sulfamates M12 and M14 were observed in rats, but not in dogs. The sulfate M16 was observed in dogs, but not in rats. The carbamoyl glucuronide of DCDQ, which was detected in dog plasma and urine, was not observed in rat plasma or urine.

In summary, DCDQ was extensively metabolized in dogs, with the oxidative metabolism as the major metabolic pathway, although formation of a DCDQ carbamoyl glucuronide was also observed.

INTRODUCTION

Mass balance studies showed that an average of 64.3% of the oral dose was excreted in rat urine, while 32.7% of the dose was recovered in dog urine following administration of an enteric-coated capsule. When incubated with dog liver microsomes in the presence of NADPH and UDPGA, [^{14}C]DCDQ was converted to several oxidative metabolites and a carbamoyl glucuronide. A previous metabolism study rats showed that DCDQ was extensively metabolized and oxidative metabolism was the major metabolic pathway in rats. The present study investigated metabolism of [^{14}C]DCDQ following a single oral capsule administration to dogs.

MATERIALS AND METHODS

MATERIALS

[^{14}C]DCDQ hydrochloride was synthesized by the radiosynthesis group of Wyeth Research (Pearl River, NY) as described above in the in vivo studies. Ultima Gold, Ultima Flo, Permafluor E+-scintillation cocktails, and Carbo-Sorb E carbon dioxide absorber were purchased from Perkin Elmer (Wellesley, MA). EDTA was obtained from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI). Solvents used for extraction and for chromatographic analysis were HPLC or ACS reagent grade from EMD Chemicals (Gibbstown, NJ).

METHODS

CAPSULE PREPARATION AND ANALYSIS

About 11 mg of [^{14}C]DCDQ hydrochloride and 940 mg of non-labeled DCDQ hydrochloride were dissolved in methanol and then evaporated under a nitrogen stream to dryness. Capsules (#2) were filled with accurate amounts (126.7-138.1 mg) of the mixed drug substance according to animal weights. The filled gelatin capsules were then enteric-coated manually.

The drug substance in an extra capsule was analyzed for radiochemical purity and specific activity. An aliquot of the drug substance was dissolved in DMSO, diluted in water, and analyzed by HPLC with radioactivity flow detection and UV detection at 250 nm. To determine the specific activity, non-labeled DCDQ solutions at five different concentrations were prepared by diluting a stock solution in methanol, and analyzed by HPLC to generate a standard curve. The UV peak of [^{14}C]DCDQ was integrated to calculate the amount of DCDQ against the standard curve. Fractions around the [^{14}C]DCDQ peak were collected at 1 minute intervals after UV detection. Radioactivity in each fraction was determined by liquid scintillation counting (LSC). Fractions were also collected from a blank injection to obtain the background level of radioactivity.

DRUG ADMINISTRATION AND SPECIMEN COLLECTION

Four male beagle dogs, weighing from 7.6 to 9.8 kg at the time of dosing, were from an in-house colony. Each dog was given one enteric-coated capsule containing [^{14}C]DCDQ as the hydrochloride salt. Animals were fed two hours prior to dosing and provided Purina dog chow and water *ad libitum*, and were housed individually in metabolic cages.

Blood samples were collected from the jugular vein at 2, 4, 8, 24 and 48 hour after dose administration into tubes containing potassium EDTA as the anticoagulant and then placed on ice. Aliquots of 50 µL were removed for combustion and determination of radioactivity content. Plasma was immediately obtained from the remaining blood by centrifugation at 4°C. Urine samples were collected into tubes on

dry ice at intervals of 0-8, 8-24 and 24-48 hour post-dose. Fecal samples were collected at intervals of 0-8, 8-24 and 24-48 hour post-dose at room temperature, and were homogenized. The biological specimens were stored at approximately -70°C until analysis.

RADIOACTIVITY DETERMINATIONS

Aliquots of 50 µL of plasma and 100-200 µL of urine were analyzed for radioactivity concentrations. Radioactivity determinations of dose, plasma, and urine were made with a Tri-Carb Model 3100 TR/LL LSC using 5-10 mL of Ultima Gold as the scintillation fluid.

Feces were weighed and homogenized in water at a volume-to-weight ratio of about 5:1. Aliquots of blood (200 µL) and fecal homogenates (0.25-0.53 gram) were placed on Combusto-cones with Combusto-pads and combusted. A model 307 Tri-Carb sample oxidizer, equipped with an Oximate-60 robotic automatic sampler (Perkin Elmer), was used for combustion of blood and fecal samples. The liberated $^{14}CO_2$ was trapped with Carbo-Sorb E carbon dioxide absorber, mixed with PermaFluor® E+ liquid scintillation cocktail, and counted on a Tri-Carb Model 3100 TR/LL liquid scintillation counter (Perkin Elmer). The efficiency of combustion was 98.9%.

For plasma profiles, a TopCount NXT radiometric microplate reader (Perkin Elmer) was used to analyze the radioactivity in collected HPLC fractions. The limit of detection by TopCount was about 1 ng equivalent/mL. A Flo-One β Model A525 radioactivity detector (Perkin Elmer) with a 250 µL LQTR flow cell was used to acquire data for urine and fecal samples. The flow rate of Ultima Flow M scintillation fluid was 1 mL/min, providing a mixing ratio of scintillation cocktail to mobile phase of 5:1. The limits of detection by Flo-One detector were about 200 ng equivalents/mL for urine and 12 ng equivalents/g for feces.

PLASMA METABOLITE PROFILES

Plasma samples were analyzed for metabolite profiles by HPLC. Aliquots of plasma were mixed with two volumes of cold methanol containing 0.1% trifluoroacetic

acid (TFA), placed on ice for about 2 minutes and then centrifuged. The supernatant fluid was transferred to a clean tube and evaporated at 22°C under nitrogen in a Zymark TurboVap LV (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA) to a volume of about 0.3 mL. The residue was centrifuged, the supernatant volume measured and extraction efficiency determined by analysis of duplicate 20 µL aliquots for radioactivity. A 200 µL aliquot of the supernatant was injected onto the HPLC column and the effluent was collected at 20 second intervals into 96-well Lumaplates (Perkin Elmer). The plates were dried overnight in an oven at 40°C and analyzed by a TopCount. Plasma extracts were also analyzed by LC/MS.

ANALYSIS OF FECES AND URINE

Fecal homogenates were analyzed for metabolite profiles. Aliquots of 1 gram of fecal homogenate were mixed with 2 mL methanol, placed on ice for about 10 minutes and centrifuged. The supernatant was transferred to a clean tube. The residue was extracted three times with 2 mL of a water:methanol (3:7) mixture. The supernatants from each sample were combined, evaporated to about 1 mL, and centrifuged. Extraction efficiency was determined by analyzing aliquots of 10 µL of the supernatant for radioactivity. An aliquot (50-200 µL) of the supernatant was analyzed by HPLC with radioactivity flow detection for metabolite profiles. Samples were also analyzed by LC/MS to characterize the radioactive peaks.

Urine was analyzed for radioactivity concentration and analyzed by HPLC with radioactivity flow detection for metabolite profiles by direct injection to the HPLC column. LC/MS analyses for metabolite identification were also carried out with urine samples.

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

A Waters model 2690 HPLC system (Waters Corp., Milford, MA) with a built-in autosampler was used for analysis. Separations were accomplished on a Phenomenex Luna $C_{18}(2)$ column (150 x 2.0 mm, 5 µm) (Phenomenex, Torrance, CA). The sample chamber of the autosampler was maintained at 4°C, while the column was at ambient temperature of about 20°C. A variable wavelength UV detector set to monitor 250 nm

and a Flo-One β Model A525 radioactivity detector were used for data acquisition. The HPLC mobile phase consisted of 10 mM ammonium acetate, pH 4.5 (A) and acetonitrile (B), and was delivered at 0.2 mL/min. Chromatographic condition A was used for dose analysis, while condition B was used for analysis of urine and plasma, brain and fecal extracts.

TABLE 19

CONDITION A

Time (min)	Mobile Phase A (%)	Mobile Phase B (%)
0	90	10
3	90	10
25	60	40
45	15	85
50	15	85

CONDITION B

Time (min)	Mobile Phase A (%)	Mobile Phase B (%)
0	90	10
6	90	10
35	60	40
65	15	85
70	15	85

LC/MS ANALYSIS

An Agilent Model 1100 HPLC system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) including an autosampler and diode array UV detector was used for LC/MS analysis. The UV detector was set to monitor 200 to 400 nm. For selected LC/MS analysis, radiochromatograms were acquired using a β-Ram model 3 radioactivity flow detector (IN/US Systems Inc., Tampa, FL) equipped with a solid scintillant flow cell. LC conditions were the same as the condition B described above.

The mass spectrometer used for metabolite characterization was a Micromass Q-TOF-2 quadrupole time-of-flight hybrid mass spectrometer (Waters). The mass

spectrometer was equipped with an electrospray ionization (ESI) interface and operated in the positive ionization mode. Collision energy settings of 5 and 30 eV were used for full MS and MS/MS scans, respectively. Settings for the mass spectrometer are listed below.

TABLE 20

Micromass Q-TOF-2 Mass Spectrometer Settings	
Capillary Voltage	3.0 kV
Cone	30 V
Source Block Temperature	100°C
Desolvation Gas Temperature	250°C
Desolvation Gas Flow	550 L/hr
Cone Gas Flow	50 L/hr
CID Gas Inlet Pressure	13-14 psig
TOF-MS resolution (m/Δm)	8000

DATA ANALYSIS AND STATISTICAL EVALUATION

Flo-One analytical software (Perkin Elmer, version 3.6) was utilized to integrate the radioactive peaks. DataFlo Software Utility (Perkin Elmer, beta version 0.55) was used to convert ASCII files from the TopCount NXT microplate counter into CR format for processing in Flo-One Analysis software. The computer program Microsoft Excel® 97 was used to calculate means and standard deviations and to perform the student t-test. Micromass MassLynx software (Waters, version 4.0) was used for collection and analysis of LC/MS data.

RESULTS

ANALYSIS OF CAPSULE CONTENT

The [^{14}C]DCDQ loaded in capsules had an average radiochemical purity of about 98.9% and a chemical purity (by ultraviolet detection) of greater than 99%. The specific activity of [^{14}C]DCDQ in the capsules was 2.18 μCi/mg as the hydrochloride salt. The actual DCDQ dose administered ranged from 12.2 to 14.4 mg/kg as the free base.

Plasma Radioactivity Concentrations and Metabolite Profiles

The concentrations of radioactivity in blood and plasma after a single capsule dose of [^{14}C]DCDQ are summarized in Table 21.

TABLE 21

Blood And Plasma Concentrations (Ng Equivalents/Ml) Of Radioactivity In Dogs Following A Single 15 Mg/Kg Oral Dose Of [^{14}C]DCDQ In An Enteric-Coated Capsule

Time	Blood					Plasma				
(hr)	1[a]	2	3	4	Mean ± SD	1	2	3	4	Mean ± SD
2	161	840	48.6	0.00	262 ± 391	360	1250	74.4	4.13	422 ± 573
4	319	1100	66.7	0.90	372 ± 505	500	1640	112	4.13	564 ± 748
8	331	878	176	5.41	347 ± 378	541	1310	256	4.13	528 ± 566
24	980	782	1360	556	920 ± 341	1530	1110	1940	769	1340 ± 508
48	333	434	364	241	343 ± 79.9	504	669	517	339	507 ± 135

a: Dog number

The average plasma radioactivity concentrations ranged from 423 ng equivalents/mL at 2 hour to 1340 ng equivalents/mL at 24 hour post-dose. The highest radioactivity concentration generally occurred at 24 hour post-dose except for dog 2, where concentrations were the highest at 4 hour post-dose. Large individual variations were observed in plasma radioactivity concentrations, ranging from 4 to 1640 ng equivalents/mL at 2, 4 and 8 hour post-dose. The data are in agreement with the large variations in excretion of radioactivity observed in the first 24 hours post-dose. These variations may be attributed to slow and prolonged absorption of DCDQ in some dogs. Blood radioactivity concentrations were lower than plasma radioactivity levels, and the average blood-to-plasma radioactivity ratios ranged between 0.68 and 0.79 (Table 22).

Partitioning of DCDQ and its metabolites into blood cells was limited based on these ratios.

TABLE 22

Blood-To-Plasma Radioactivity Ratios In Dogs Following A Single 15 Mg/Kg Oral Dose Of [^{14}C]DCDQ In An Enteric-Coated Capsule

Time	Blood-to-Plasma Ratios				
(hr)	1[a]	2	3	4	Mean ± SD
2	0.51	0.77	0.75	NA[b]	0.68 ± 0.14
4	0.73	0.77	0.69	NA[b]	0.73 ± 0.04
8	0.70	0.77	0.79	NA[b]	0.75 ± 0.05
24	0.73	0.81	0.80	0.83	0.79 ± 0.04
48	0.76	0.74	0.81	0.82	0.78 ± 0.04

a: Dog number

b: Data not available due to the low radioactivity concentrations.

The extraction recovery was greater than 71% of the plasma radioactivity. DCDQ was extensively metabolized in dogs (Tables 23 and 24). At 2 and 4 hour post-dose, DCDQ represented 1.9% to 21% of plasma radioactivity. DCDQ represented less than 3% of plasma radioactivity at 8 and 24 and was not detectable at 48 hour post-dose (Tables 23 and 24). The major metabolites observed in the 2 and 4 hour plasma included hydroxy DCDQ metabolites (M2 and M3), an N-oxide DCDQ (M5), a keto DCDQ (M7), an imine of hydroxy DCDQ (M15), a glucuronide of hydroxy DCDQ (M9) and a carbamoyl glucuronide of DCDQ (M6). Similar profiles were obtained for the 8, 24 and 48 plasma samples, although the majority of radioactivity at these later time points was attributed to the hydroxy metabolite M3 and the glucuronide M9, which were not chromatographically separated. A number of relatively minor metabolites accounted for 6.2% to 42% of plasma radioactivity in the 2 and 4 hour samples. These metabolites were not characterized due to low concentrations.

TABLE 23

Chromatographic Distribution (Percentage) Of Radioactivity In Dog Plasma Following A Single 15 mg/kg Oral Dose Of [^{14}C]DCDQ In An Enteric-Coated Capsule[a]

Time (hr)	Dog No.	M1	M2	M3+M9	M5	M6	M7	M15	DCDQ	Others[b]
2	1	8.4	ND[c]	11	12	ND	ND	17	11	41
	2	2.6	8.0	21	2.9	19	ND	2.8	1.9	42
4	1	8.0	6.6	28	6.6	ND	6.9	8.5	11	25
	2	4.9	12	20	5.3	13	7.8	9.6	21	6.2
8	1	8.0	ND	43	4.0	7.0	ND	8.3	2.7	27
	2	4.7	ND	79	ND	ND	ND	7.3	ND	8.8
	3	9.7	ND	85	ND	ND	ND	ND	ND	5.1
24	1	6.8	ND	61	ND	17	13	ND	2.6	0.0
	2	2.1	5.0	73	ND	5.6	6.7	ND	ND	7.7
	3	6.4	7.0	62	ND	ND	ND	ND	2.3	22
48	1	12	ND	66	ND	ND	ND	ND	ND	22
	2	6.7	ND	85	2.8	ND	ND	ND	ND	5.6
	3	ND	ND	95	ND	ND	ND	ND	ND	4.7

a: Profiles for the 2 and 4 hour samples for dog 3 and 4, and the 8, 24 and 48 hour samples for dog 4 were not obtained.

b: Includes non-characterized metabolites

c: Not detected

TABLE 24

Estimated Plasma Concentrations (ng equivalents/mL) Of DCDQAnd Metabolites In Dogs Following A Single 15 Mg/Kg Oral Dose Of [^{14}C]DCDQ In An Enteric-Coated Capsule[a]

Time (hr)	Dog No.	M1	M2	M3+M9	M5	M6	M7	M15	DCDQ
2	1	30.1	BQL[b]	37.8	43.1	BQL	BQL	62.2	39.6
	2	32.9	99.5	264	36.4	239	BQL	35.6	23.2
4	1	40.0	33.1	142	33.1	BQL	34.5	42.7	52.5
	2	80.9	192	335	88.6	215	127	157	345
8	1	43.3	BQL	234	21.7	37.9	BQL	45.1	14.5
	2	61.9	BQL	1030	BQL	BQL	BQL	95.3	BQL
	3	24.8	BQL	218	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
24	1	104	BQL	929	BQL	258	202	BQL	39.6
	2	23.0	55.3	808	BQL	62.1	73.6	BQL	BQL
	3	125	135	1210	BQL	BQL	BQL	BQL	43.8
48	1	58.0	BQL	333	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
	2	44.7	BQL	588	18.9	BQL	BQL	BQL	BQL
	3	BQL	BQL	492	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL

a: Data for the 2 and 4 hour samples for dog 3 and 4, and the 8, 24 and 48 hour samples for dog 4 were not obtained due to low concentrations of circulating radioactivity; concentrations were estimated based on the total plasma radioactivity concentrations (Table 21) and the chromatographic distribution of the radioactivity (Table 23).

b: Below quantitation limit (1 ng equivalent/mL for plasma).

URINARY METABOLITE PROFILES

Urine was a major route of elimination of DCDQ in dog, although fecal excretion was greater than urinary excretion. Numerous metabolites were detected in urine. DCDQ represented an average of less than 11% of the urinary radioactivity for all time points (Table 25). The major metabolites included hydroxy DCDQ metabolites (M2 and M3), an N-oxide DCDQ (M5), an imine of hydroxy DCDQ (M15), a hydroxy DCDQ sulfate (M16), a diazepinyl DCDQ carboxylic acid (M17), a hydroxy DCDQ glucuronide (M9) and a carbamoyl glucuronide of DCDQ (M6) (Figure 1).

TABLE 25 Chromatographic Distribution (Percentage) Of Radioactivity In Dog Urine Following Administration Of An Enteric-Coated Capsule Containing [^{14}C]DCDQ[a]

Time (hr)	Dog No.	M1	M2	M3+M9	M5	M6	M7	M15	M16	M17	DCDQ	Others[c]
0-8		ND[b]	10	10	5.9	13	ND	11	16	11	ND	24
	1	8.3	21	11	ND	6.1	ND	9.2	9.3	4.1	9.5	22
	2	4.7	26	14	ND	7.6	ND	4.1	3.3	2.8	ND	36
8-24	3	6.7	26	16	ND	3.6	ND	2.3	3.7	3.8	11	26
	Mean	6.6	24	13	NA[d]	5.8	NA	5.2	5.5	3.5	NA	29
	SD	1.8	2.8	2.3	NA	2.0	NA	3.6	3.3	0.7	NA	8.4
	1	4.4	25	11	8.5	5.8	5.0	ND	8.4	ND	3.8	26
	2	7.6	18	14	4.0	3.5	6.2	ND	5.0	3.4	ND	39
	3	7.6	22	14	ND	4.3	9.2	ND	3.2	ND	3.0	37
24-48	4	3.2	21	13	ND	5.9	3.4	3.5	5.5	5.7	6.9	32
	Mean	5.7	22	13	NA	4.7	5.9	NA	5.5	NA	3.4	34
	SD	2.3	2.8	1.2	NA	1.2	2.5	NA	2.2	NA	2.8	4.8

TABLE 25 Chromatographic Distribution (Percentage) Of Radioactivity In Dog Urine Following Administration Of An Enteric-Coated Capsule Containing [^{14}C]DCDQ[a]

Time (hr)	Dog No.	M1	M2	M3+M9	M5	M6	M7	M15	M16	M17	DCDQ	Others[c]

a: The 0-8 hour samples for dogs 2, 3 and 4, and the 0-24 hour sample for dog 4 did not have enough radioactivity for profiling.

b: ND, not detected

c: It includes a number of non-characterized metabolites

d: Not available

FECAL METABOLITE PROFILES

An average of 70.2% of the fecal radioactivity was extracted, while an average of 88.2% of the radioactivity was extracted from incubations of [^{14}C]DCDQ in blank fecal homogenate. In fecal extracts, DCDQ was major radioactive component, representing 54.4% to 96.7% of the total radioactivity. The metabolites detected in feces included hydroxy DCDQ (M2, M3 and M19), a keto DCDQ (M18) and an uncharacterized peak (M20). The most abundant metabolite M18 represented up to 16.4% of the total radioactivity in fecal extracts. The glucuronide of hydroxy DCDQ (M9) and the carbamoyl glucuronide of DCDQ (M6) were not detected in feces. Incubation of [^{14}C]DCDQ in fecal homogenate at 37°C for 24 hours showed no obvious degradation (data not shown).

METABOLITE CHARACTERIZATION BY LC/MS ANALYSES

Mass spectra were obtained by LC/MS and LC/MS/MS analysis for DCDQ and its metabolites. Structural characterization of these compounds is summarized in Table 26. The mass spectral characterization of DCDQ and its metabolites, from each of the studies described herein are discussed further below.

TABLE 26

Metabolites Of DCDQ Identified In Dogs By LC/MS Analysis

Metabolite	Retention Time (min)[a]	$[M+H]^+$	Site(s) of Metabolism	Metabolite Name	Matrix[b]
M1	26.26	245	Diazepane ring	Hydroxy DCDQ	P, U
M2	29.46	245	Pyridine ring	Hydroxy DCDQ	P, U, F
M3	35.95	245	Cyclopentane ring	Hydroxy DCDQ	P, U, F
M6	59.80	449	Diazepane ring	Carbamate glucuronide DCDQ	P, U
M7	33.74	243	Cyclopentane or pyridine ring	Keto DCDQ	P, U
M9	36.12	421	Cyclopentane ring	Hydroxy DCDQ	P, U

TABLE 28

Metabolites Of DCDQ Identified In Dogs By LC/MS Analysis

Metabolite	Retention Time (min)[a]	$[M+H]^+$	Site(s) of Metabolism	Metabolite Name	Matrix[b]
M15	42.42	243	Cyclopentane or pyridine ring	Glucuronide Hydroxy DCDQ Imine	P, U, F
M16	44.26	325	Pyridine and diazepane ring	Hydroxy DCDQ Sulfate	U
M17	48.00	257	Pyridine and diazepane ring	Diazepinyl DCDQ carboxylic acid	U
M18	41.72	243	Diazepane ring	Keto DCDQ	F
M19	45.24	245	Pyridine or Benzene ring	Hydroxy DCDQ	F
DCDQ	53.84	229			P, U, F

a: LC/MS retention times were normalized to LC/MS data file GU_072303_0004, GU_072403_0004, and GU_081403_0005

b: Matrix where metabolites were detected and characterized by LC/MS, P=plasma; U=urine; B=brain; F=feces

DISCUSSION

Large individual variations were observed in plasma radioactivity concentrations, ranging from 4 to 1640 ng equivalents/mL at 2, 4 and 8 hour post-dose. The data are consistent with the variations in excretion of radioactivity observed in the first 24 hours post-dose. Urinary excretion varied from 0 to 25% while fecal excretion ranged from 0 to 23% of the dosed radioactivity in the first 24 hours post-dose. The highest plasma radioactivity concentrations occurred at 24 hour except dog 2, where concentration were the highest at 4 hour post-dose. The variability may be associated with slow and prolonged absorption of DCDQ in some dogs, and possibly the enteric-coated capsules.

The average blood-to-plasma radioactivity ratio for dog was approximately 0.72 compared with about 1.1 for rat between 2 and 8 hour post-dose, indicating less uptake of DCDQ and its metabolites into blood cells of dog than of rat.

DCDQ was extensively metabolized in dogs as seen in rats, following administration of an enteric-coated capsule containing [^{14}C]DCDQ (Figure 1). Oxidative metabolism was the major metabolic pathway, while formation of a DCDQ carbamoyl glucuronide, which was not observed in rats, was also observed. DCDQ represented 1.9% to 21% of plasma radioactivity at 2 and 4 hour, less than 3% at 8 and 24 hour, and was not detected at 48 hour post-dose. DCDQ accounted for an average of less than 11% of urinary radioactivity at all time points. In fecal extracts, 54.4% to 96.7% of the radioactivity was attributed to the parent drug. Plasma metabolites at 2 and 4 hour post-dose included hydroxy DCDQ (M1, M2 and M3), an N-oxide DCDQ (M5), a keto DCDQ (M7), a hydroxy DCDQ imine (M15), a hydroxy DCDQ glucuronide (M9) and the carbomoyl glucuronide of DCDQ (M6). The majority of radioactivity at 8, 24 and 48 hour post-dose was attributed to the hydroxy metabolite M3 and the glucuronide M9, which were not chromatographically separated. Metabolites M2, M3, M5 and M6 were also observed in the in vitro incubation of DCDQ with dog liver microsomes in the presence of NADPH. Metabolites observed in dog plasma were also detected in dog urine except for the metabolite M7. A sulfate conjugate of hydroxy DCDQ (M16) and a diazepinyl DCDQ carboxylic acid (M17), which were not detected in plasma, were observed in urine samples. Hydroxy DCDQ metabolites (M2, M3 and M19), a keto DCDQ (M18) and a hydroxy DCDQ imine were detected in fecal extracts. Formation of metabolite M6 may be underestimated due to possible hydrolysis in the GI tract. Extensive metabolism and prolonged oral absorption of DCDQ probably accounted for the relatively low oral bioavailability of approximately 25.4% in dogs.

Metabolism of DCDQ in dog exhibited some differences from rats (Figure 1). Some different oxidative metabolites were observed in rats and dogs. Oxidative metabolites M15, M16, M17, M18 and M19 were not observed in rats, while a hydroxy metabolite M4, which was observed in rats, was not detected in dogs. More phase II metabolites were observed in rats than in dogs. The sulfates M8 and M13, and sulfamates M12 and M14 were observed in rats, but not in dogs. The sulfate M16 was

observed in dogs, but not in rats. The carbamoyl glucuronide of DCDQ, which was detected in dog plasma and urine, was not observed in rat plasma or urine.

In summary, DCDQ was extensively metabolized in dogs, with the oxidative metabolism as the major metabolic pathway, although formation of a DCDQ carbamoyl glucuronide was also observed.

METABOLITE CHARACTERIZATION BY LC/MS ANALYSES

Mass spectra were obtained by LC/MS and LC/MS/MS analysis for DCDQ and its metabolites identified in the studies above. The mass spectral characterization of DCDQ and its metabolites, from each of the studies, are discussed below.

DCDQ

The mass spectral characteristics of DCDQ standard were examined for comparison with the metabolites. In the LC/MS spectrum of DCDQ, a protonated molecular ion, $[M+H]^+$, was observed at m/z 229. The product ions of m/z 229 mass spectrum of DCDQ obtained from collision-induced dissociation (CID), and the proposed fragmentation scheme indicated loss of methyleneamine, ethylideneamine, and ethylidene-methyl-amine from the molecular ion generated the product ions at m/z 200, 186, and 171, respectively. Loss of the propene group from the molecular ion generated the fragment at m/z 187 and further loss of methyleneamine and ethylideneamine generated the fragments ions at m/z 158 and 144. Loss of the cyclopentyl-methyleneamine group generated the fragment ion at m/z 132.

METABOLITE M1: FROM IN VITRO, AND IN VIVO RAT AND DOG STUDIES

The $[M+H]^+$ for M1 was observed at m/z 245. The product ions of m/z 245 mass spectrum of M1 and the proposed fragmentation scheme indicated an increase of 16 Da, suggesting monohydroxylation. Loss of propene from the molecular ion generated the fragment at m/z 203, which was 16 Da higher than the corresponding ion at m/z 187 for DCDQ. The fragment ions at m/z 171 and 186 were the same as in the product ion spectrum of DCDQ, indicating that the hydroxylation occurred in the diazepane portion of the molecule as shown. Therefore, M1 was proposed to be hydroxy DCDQ.

METABOLITE M2: FROM FROM IN VITRO, AND IN VIVO RAT AND DOG STUDIES

The $[M+H]^+$ for M2 was observed at m/z 245. The product ions of m/z 245 mass spectrum of M2 and the proposed fragmentation scheme indicated an increase of 16 Da, suggesting monohydroxylation. Loss of propene from the molecular ion generated the fragment at m/z 203, which was 16 Da higher than the corresponding ion at m/z 187 for DCDQ. This indicated that the cyclopentane ring was not the site of biotransformation. The fragment ion at m/z 132 was the same for DCDQ indicating that the diazepane portion was not the site of biotransformation. The fragment ions at m/z 169 and 184 were 2 Da less than the corresponding ions for DCDQ at m/z 171 and 186, respectively, indicating loss of H_2O from the pyridine ring as a result of hydroxylation. Therefore, M2 was proposed to be hydroxy DCDQ.

METABOLITE M3: FROM IN VITRO, AND IN VIVO RAT AND DOG STUDIES

The $[M+H]^+$ for M3 was observed at m/z 245. The product ions of m/z 245 mass spectrum of M3 and the proposed fragmentation scheme indicated an increase of 16 Da, suggesting monohydroxylation. Loss of ethylideneamine generated the fragment at m/z 202, which was 16 Da higher than the corresponding ion at m/z 186 for SAX-187. The fragment ions at m/z 158 and 144 were the same as in the product ion spectrum of DCDQ. This indicated that the hydroxylation occurred in the cyclopentane portion of the molecule as shown. Therefore, M3 was proposed to be hydroxy DCDQ.

METABOLITE M4: FROM IN VITRO AND IN VIVO RAT STUDIES

The $[M+H]^+$ for M4 was observed at m/z 245. The product ions of m/z 245 mass spectrum of M4 and the proposed fragmentation scheme indicated an increase of 16 Da, suggesting monohydroxylation. Loss of H_2O from the molecular ion generated the fragment at m/z 227. The product ion at m/z 144 was also observed for DCDQ, indicating that the hydroxylation occurred in the cyclopentane portion of the molecule as shown. This was also consistent with the presence of the m/z 184 product ion, generated by loss of ethylideneamine and H_2O from the corresponding ion at m/z 186 for

DCDQ. The measured accurate mass for this ion was 184.1120 Da, which was within 3.6 ppm of the theretical mass for $C_{13}H_{14}N$. Therefore, M4 was proposed to be hydroxy DCDQ.

METABOLITE M5: FROM IN VITRO STUDIES

The $[M+H]^+$ for M5 was observed at m/z 243. The measured accurate mass for M5 was 243.1478 Da, which was within 7.9 ppm of the theoretical mass for $C_{15}H_{19}N_2O$. This corresponded to the addition of one oxygen and loss of two hydrogen atoms compared with the molecular formula for DCDQ. A fragment ion at m/z 130 was 2 Da less than the corresponding ion for DCDQ, suggesting the formation of the imine. LC/MS with D_2O substituted for H_2O in the mobile phase confirmed that no exchangeable protons existed for M5, indicating that M5 was an N-oxide. Therefore, M5 was proposed to be the N-oxide of DCDQ imine.

METABOLITE M6: FROM IN VITRO AND IN VIVO DOG STUDIES

The $[M+H]^+$ for M6 was observed at m/z 449. The product ions of m/z 449 mass spectrum of M6 and the proposed fragmentation scheme indicated a loss of 176 Da from the molecular ion generated a fragment at m/z 273, indicating that M5 was a glucuronide conjugate. Further loss of 44 Da from m/z 273 generated m/z 229, which was also the molecular ion for DCDQ. Therefore, M6 was proposed to be the carbamoyl glucuronide of DCDQ.

METABOLITE M7: FROM IN VITRO AND IN VIVO RAT AND DOG STUDIES

The $[M+H]^+$ for M7 was observed at m/z 243. The product ions of m/z 243 mass spectrum of M7 and the proposed fragmentation scheme indicated loss of methyleneamine, ethylideneamine from the molecular ion generated the product ions at m/z 214 and 200, which were 14 Da more than the corresponding ions at m/z 200 and 186, respectively, for DCDQ. This suggested the addition of one oxygen atom and loss of two hydrogen atoms from DCDQ. The product ions at m/z 132, 144 and 158 were the same as DCDQ, which indicated that the biotransformation occurred in the pyridine and cyclopentane rings. LC/MS with D_2O substituted for H_2O in the mobile phase confirmed

that there was only one exchangeable proton for M7, which was from the NH group in the diazepane ring. Therefore, M7 was proposed to be a keto DCDQ.

METABOLITE M8: FROM IN VIVO RAT STUDIES

The $[M+H]^+$ for M8 was observed at m/z 325. The product ions of m/z 325 mass spectrum of M8 and the proposed fragmentation scheme indicated a loss of propene from the molecular ion generated the product ion at m/z 283, indicating the biotransformation did not occur on the cyclopentane ring. Loss of methyleneamine, ethylideneamine from the product ion at m/z 283 and subsequent loss of sulfate group generated the product ions at m/z 158 and 144, respectively. Loss of ethylideneamine from the molecular ion generated the product ion at m/z 282 and subsequent loss of the sulfonate group and H_2O generated the product ions at m/z 202 and 184, respectively. The fragment ion at m/z 132 was the same as for DCDQ indicating that the diazepane portion was not the site of biotransformation. Therefore, M8 was proposed to be sulfate conjugate of hydroxy DCDQ.

METABOLITE M9: FROM IN VIVO RAT AND DOG STUDIES

The $[M+H]^+$ for M9 was observed at m/z 421. The product ions of m/z 421 mass spectrum of M9 and the proposed fragmentation scheme indicated a loss of 176 Da from the molecular ion generated the fragment ion at m/z 245, which indicated glucuronidation of hydroxy DCDQ. Loss of ethylideneamine and glucuronic acid generated the fragment at m/z 202, which was 16 Da higher than the corresponding ion at m/z 186 for DCDQ. The fragment ion at m/z 187 suggested that the biotransformation occurred in the cyclopentane ring. Therefore, M9 was proposed to be a glucuronide of hydroxy DCDQ.

METABOLITE M10

The $[M+H]^+$ for M10 was observed at m/z 245. The product ions of m/z 245 mass spectrum of M10 and the proposed fragmentation scheme indicated an increase of 16 Da, suggesting monohydroxylation. The fragment ions at m/z 171 and 186 were the same as in the product ion spectrum of DCDQ, indicating that the hydroxylation occurred

In the diazepane portion of the molecule as shown. Therefore, M10 was proposed to be hydroxy DCDQ.

METABOLITE M11: FROM IN VIVO RAT STUDIES

The $[M+H]^+$ for M11 was observed at m/z 287. The product ions of m/z 287 mass spectrum of M11 and the proposed fragmentation scheme indicated a loss of H_2O from the molecular ion generated the fragment ion at m/z 269. Further loss of 42 Da generated m/z 227, which indicated acetylation. The fragment ions at m/z 171 and 186 were the same as in the product ion spectrum of DCDQ, indicating that the biotransformations occurred in the diazepane portion of the molecule as shown. Therefore, M11 was proposed to be acetylated hydroxy DCDQ.

METABOLITE M12: FROM IN VIVO RAT STUDIES

The $[M+H]^+$ for M12 was observed at m/z 309. The product ions of m/z 309 mass spectrum of M12 indicated a loss of 80 Da generated the product ion at m/z 229, which is the molecular ion of DCDQ. This indicated sulfation. Further loss of methyleneamine, ethylideneamine generated the product ions at m/z 200 and 186, which were the same for DCDQ. Therefore, M12 was proposed to be the N-sulfate of DCDQ.

METABOLITE M13: FROM IN VIVO RAT STUDIES

The $[M+H]^+$ for M13 was observed at m/z 325. The product ions of m/z 325 mass spectrum of M13 and the proposed fragmentation scheme indicated a loss of 80 Da from $[M+H]^+$ yielded m/z 245 which was 16 Da larger than the $[M+H]^+$ for DCDQ. This indicated that M13 was a sulfate conjugate of hydroxy DCDQ. Therefore, M13 was proposed to be sulfate conjugate of hydroxy DCDQ.

METABOLITE M14: FROM IN VIVO RAT STUDIES

The $[M+H]^+$ for M14 was observed at m/z 305. The product ions of m/z 305 mass spectrum of M14, the product ions of m/z 225 mass spectrum and the proposed fragmentation scheme for M14 indicated a loss of 80 Da from the molecular ion

generated the ion at m/z 225, which indicated that M14 was a sulfate. Further loss of ethylideneamine, and ethylidene-methyl-amine generated the product ions at 182 and 167, respectively, which were 4 Da less than the corresponding ions for DCDQ at m/z 186 and 171, respectively, which indicated metabolism of the cyclopentane group. Therefore, M14 was proposed to be the sulfate conjugate of di-dehydro DCDQ.

METABOLITE M15: FROM IN VIVO DOG STUDIES

The $[M+H]^+$ for M15 was observed at m/z 245. The product ions of m/z 245 mass spectrum of M15 and the proposed fragmentation scheme indicated a fragment ion at m/z 187 was 16 Da more than the corresponding ion at m/z 171 for DCDQ, indicating hydroxylation of the cyclopentane or the pyridine ring. The fragment ion at m/z 130 was 2 Da less than the corresponding ion for DCDQ indicating the formation of imine. LC/MS with D_2O substituted for H_2O in the mobile phase confirmed that there was only one exchangeable proton for M15. Therefore, M15 was proposed to be hydroxy DCDQ imine.

METABOLITE M16: FROM IN VIVO DOG STUDIES

The $[M+H]^+$ for M16 was observed at m/z 325. The product ions of m/z 325 mass spectrum of M13 and the proposed fragmentation scheme indicated a loss of 80 Da from the molecular ion generated the product ion at m/z 245, indicating sulfation. Loss of propene from the molecular ion generated the product ion at m/z 283, indicating the biotransformation did not occur on the cyclopentane ring. Loss of ethylideneamine generated the product ion at m/z 282 and subsequent loss of sulfate group and H_2O generated the product ions at m/z 202 and 184 respectively. The product ion at m/z 148, 16 Da more than the corresponding ion at 132 for DCDQ, and the m/z 282 product ion indicated that the hydroxylation occurred in the benzyl group of the molecule as shown. Therefore, M16 was proposed to be sulfate conjugate of hydroxy DCDQ.

METABOLITE M17: FROM IN VIVO DOG STUDIES

The $[M+H]^+$ for M17 was observed at m/z 257. The measured accurate mass of $[M+H]^+$ was 257.1292 Da, which was within 0.8 ppm of the theoretical mass for

$C_{18}H_{17}N_2O_2$. This corresponded to the addition of two oxygen atoms and loss of 4 hydrogen atoms compared to the molecular formula of DCDQ. Loss of 44 Da from the molecular ion generated the fragment at m/z 213. The measured accurate mass of this fragment was 213.1376 Da, which was within 7.6 ppm of the theoretical mass for $C_{14}H_{17}N_2$. This confirmed that the loss of 44 was from the neutral loss of CO_2, indicating that M17 was a carboxylic acid. Further loss of cyclopentene, pentane, propene and HCN from m/z 213 generated the fragments at m/z 145, 171 and 186 respectively. The product ion at m/z 130 was 2 Da less than the corresponding ion at m/z 132 for DCDQ indicating the formation of an imine. LC/MS with D_2O substituted for H_2O in the mobile phase confirmed that there was only one exchangeable proton for M17, which was from the carboxylic acid group. Therefore, M17 was proposed to be Benzo-diazepinyl-cyclopentanecarboxylic acid (diazepinyl DCDQ carboxylic acid).

METABOLITE M18: FROM IN VIVO DOG STUDIES

The $[M+H]^+$ for M18 was observed at m/z 243. The product ions of m/z 243 mass spectrum of M18 and the proposed fragmentation scheme indicated a loss of propene and ethylideneamine groups from the molecular ion generated the product ion at m/z 158. Loss of methyleneamine, ethylideneamine from the molecular ion generated the product ions at m/z 214 and 200, which were 14 Da more than the corresponding ions at m/z 200 and 186, respectively, for DCDQ. This suggested the addition of one oxygen atom and loss of two hydrogen atoms from DCDQ. The product ion at m/z 146, 14 Da more than the corresponding ion at m/z 132 for DCDQ, and the m/z 200 product ion indicated that the modification occurred on the benzyl group. LC/MS with D_2O substituted for H_2O in the mobile phase confirmed that there was only one exchangeable proton for M14, which was from the NH group in the diazepane ring. Therefore, M18 was proposed to be a keto DCDQ.

METABOLITE M19: FROM IN VIVO DOG STUDIES

The $[M+H]^+$ for M19 was observed at m/z 245. The product ions of m/z 245 mass spectrum of M19 and the proposed fragmentation scheme indicated an increase of 16 Da, suggesting monohydroxylation. The product ions at m/z 216, 202 and 187 were

16 Da more than the corresponding ions at m/z 200, 186 and 171, respectively, for DCDQ, indicating that diazepane group was not the site of modification. Loss of propene from the molecular ion generated the fragment at m/z 203 and further loss of methyleneamine and ethylideneamine generated the fragment ions at m/z 174 and 160. These were 16 Da more than the corresponding ions for DCDQ, indicating that hydroxylation occurred at either the benzene or pyridine group. Therefore, M19 was proposed to be hydroxy DCDQ.

PRODUCT P3: FROM IN VIVO STUDIES

The $[M+H]^+$ for P3 was observed at m/z 227. The product ions of m/z 227 mass spectrum of P3 and the proposed fragmentation scheme indicated the molecular weight for P3 was 2 Da less than DCDQ suggesting the formation of a double bond. The fragment ion at m/z 130 was 2 Da less than the corresponding ion for DCDQ, suggesting the formation of an imine. Therefore, P3 was proposed to be DCDQ imine.

IDENTIFICATION OF METABOLITES M7, M9 AND M13 IN RAT URINE FOLLOWING A SINGLE ORAL 50 MG/KG ADMINISTRATION OF DCDQ

SYNOPSIS

This study was designed to obtain rat urine for metabolite isolation and to obtain more specific structural identification for selected metabolites of DCDQ. Three male and three female rats were given a single 50 mg/kg dose of DCDQ. Urine was collected at 0-12 and 12-24 hour intervals. DCDQ metabolites M7 (keto DCDQ), M9 (hydroxy DCDQ glucuronide) and M13 (hydroxy DCDQ sulfate) were isolated from the urine by a two stage semi-preparative HPLC method in low microgram quantities sufficient for NMR spectroscopic analysis. Based upon MS and NMR spectroscopic analysis the site of metabolism for M7 and M13 was at 17 position 17. The site of metabolism for M9 was at position 13.

INTRODUCTION

When incubated with rat liver microsomes in the presence of NADPH and UDPGA, [^{14}C]DCDQ was converted to several oxidative metabolites. A previous

metabolism study in rats showed that DCDQ was extensively metabolized and oxidative metabolism was the major metabolic pathway in rats. Phase II metabolites including a sulfate and a glucuronide of hydroxy DCDQ were also detected in rats. The present study was designed to obtain rat urine for metabolite isolation and to obtain more specific structural identification for selected metabolites of DCDQ.

MATERIALS AND METHODS

Materials

DCDQ hydrochloride was synthesized by Wyeth Research as described above. Polysorbate 80 was obtained from Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, NJ) and methylcellulose was from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI). Solvents used for extraction and for chromatographic analysis were HPLC or ACS reagent grade from EMD Chemicals (Gibbstown, NJ). Deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO-d6) was purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA). NMR tubes (3mm) were purchased from Wilmad Glass Co. (Buena, NJ).

METHODS

DRUG ADMINISTRATION AND SPECIMEN COLLECTION

Dose preparation, animal dosing and specimen collection were performed at Wyeth Research, Collegeville, PA. The dose vehicle contained 2% (v/v) Tween 80 and 0.5% (v/v) methylcellulose in water. On the day of dosing, non-labeled DCDQ (205.7 mg) was dissolved in the vehicle to a final concentration of approximately 10 mg/mL.

Three male rats weighing from 413 to 474 grams and three female rats weighing from 272 to 290 grams at the time of dosing were purchased from Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Non-fasted rats were given a single 50 mg/kg target dose of DCDQ at a volume of 5.0 mL/kg via intragastric gavage. Animals were provided standard rat chow and water ad libitum, and were kept in metabolism cages individually.

Urine was collected into containers on dry ice at 0-12 and 12-24 hour intervals, and stored at approximately -70°C until fraction collection.

ANALYSIS OF RAT URINE BY LIQUID CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY

Rat urine samples were analyzed by LC/MS to characterize the DCDQ metabolites present in the rat urine samples used for metabolite isolation. The HPLC system used for LC/MS analysis was an Agilent Model 1100 HPLC system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) equipped with a binary pump, autosampler and diode array UV detector. The autosampler temperature was set to 10°C. The UV detector was set to monitor 190 to 400 nm. Separations were accomplished with a Supelco Discovery C18 column (250 x 2.1 mm x 5 µm). The column temperature was 20°C. The mobile phase gradient program used was as described below.

Mobile phase A: 10 mM Ammonium acetate in water, pH 4.5

Mobile phase B: Methanol

Table 27: HPLC Gradient

Time (min)	Mobile Phase A (%)	Mobile Phase B (%)
0	90	10
6	80	20
35	70	30
65	15	85
80	15	85
81	90	10
100	90	10

The mass spectrometer used for metabolite characterization was a Finnigan LCQ ion trap mass spectrometer (ThermoElectron Corp., San Jose, CA). It was equipped with an electrospray ionization (ESI) interface and operated in the positive ionization mode. Settings for the mass spectrometer are listed below.

Table 28 Finnigan LCQ Ion Trap Mass Spectrometer Settings

Nebulizer gas	90 arb. units
Auxiliary gas	10 arb. units
Spray voltage	3.5 KV
Heated capillary temp.	200 °C
Full scan AGC setting	4×10^7
Relative collision energy	30%

METABOLITE ISOLATION BY LIQUID CHROMATOGRAPHY

The HPLC system used for metabolite isolation consisted of a Waters Prep LC 4000 pump, a Waters 2767 Sample Manager for sample injection, Waters 996 diode array UV detector and a Gilson FC204 fraction collector (Gilson, Inc., Middleton, WI). The UV detector was set to monitor 210-450 nm. The fraction collector was set to collect fractions at 1 min intervals. The HPLC mobile phase gradient was as described above for LC/MS analysis except that the flow rate was 4.7 mL/min. Mobile phases were as described below for each HPLC Condition. No mass spectral analysis was conducted during fraction collection.

Two HPLC Conditions were used to isolate metabolites. HPLC Condition 1 was used to fractionate metabolites from rat urine. HPLC Condition 2 was used to further purify the DCDQ metabolite fractions collected using HPLC Condition 1. The columns and mobile phases used for HPLC Conditions 1 and 2 are listed below.

HPLC Condition 1

Column: Supelco Discovery C18 semi-preparative column (250 x 10 mm, 5 μm) (Supelco, Bellefonte, PA).

Mobile phase A: 10 mM Ammonium acetate in water, pH 4.5

Mobile phase B: Methanol.

HPLC Condition 2

Column: Zorbax SB-CN semi-preparative column (250 x 9.4 mm, 5 μm) (Agilent Technologies)

Mobile phase A: 0.02% Trifluoroacetic acid in water

Mobile phase B: 0.02% Trifluoroacetic acid in methanol

Fractions containing metabolites M7, M9 and M13 from HPLC Condition 2 were combined and evaporated to dryness under nitrogen using a Zymark TurboVap (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA). Dried metabolites were submitted for NMR spectroscopic analysis.

NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (NMR) SPECTROSCOPY ANALYSIS OF ISOLATED M7, M9 AND M13

For NMR spectroscopy, samples of isolated DCDQ metabolites M7, M9 and M13 were each dissolved in 150 µL of 100% DMSO-d6 and transferred to individual 3 mm NMR tubes under a nitrogen gas atmosphere. One-dimensional (1D) proton NMR and two-dimensional (2D) NMR (COSY, ROESY) data were collected on a Varian Inova 500 MHz NMR spectrometer (Palo Alto, CA) equipped with a Nalorac 5mm z-gradient indirect detection probe (Varian).

Data Analysis

ThermoFinnigan Xcalibur software (version 1.3) was used to control the LC/MS system and analyze LC/MS data. Micromass MassLynx software (version 4.0) was used for control of the HPLC equipment used for fraction collection. NMR spectroscopic data were collected, processed and displayed using the VNMR program (version 6.1C, Varian).

RESULTS

DCDQ METABOLITE CHARACTERIZATION BY LC/MS AND NMR SPECTROSCOPY

In this study, DCDQ metabolites M7, M9 and M13 were isolated in sufficient amounts to conduct NMR spectroscopic analysis for more detailed structural characterizations. The structural identifications for M7 (keto DCDQ), M9 (hydroxy DCDQ glucuronide) and M13 (hydroxy DCDQ sulfate) presented in this report shall replace those presented in previous reports. Structures of DCDQ, M7, M9 and M13, along with their NMR numbering schemes, are summarized in Figure 5. Identification of M7, M9 and M13 by mass and NMR spectroscopy is discussed below.

DCDQ

The mass spectral and NMR characteristics of DCDQ standard were examined for comparison with the metabolites. In the LC/MS spectrum of DCDQ, a protonated molecular ion, $[M+H]^+$, was observed at m/z 229. The product ions of m/z 229 mass spectrum of DCDQ obtained from collision-induced dissociation (CID), and the proposed fragmentation scheme indicated a loss of methyleneamine and ethylideneamine from the molecular ion generated the product ions at m/z 200 and 186, respectively. Loss of propene from the molecular ion generated m/z 187 and further loss of ethylideneamine generated m/z 144. Loss of the cyclopentyl-methyleneamine group generated the m/z 132 product ion.

Table 29 summarizes the ^{1}HNMR chemical shift data for DCDQ. These data were used for comparison with the isolated metabolites.

Table 29. ^{1}H Chemical Shifts for DCDQ in DMSO-d_6

Atom Number	δ^1H (ppm)[a, b]
2	3.40, 3.10
3	3.19, 3.13
4	9.68, 8.77 (salt)
5	4.20, 4.07
9	2.94
10	2.23
11	3.06, 2.66
12	7.18
13	6.91
14	7.24
15	2.19, 1.34
16	1.65, 1.55
17	2.00, 1.26

[a]Chemical shifts are referenced to residual internal TMS (0.0 ppm) for ^{1}H.
[b]Several proton assignments could not be made because of overlap in the 3.35 to 3.15 ppm region.

Metabolite M7

The $[M+H]^+$ for M7 was observed at m/z 243. The product ions of m/z 243 mass spectrum of M7 and the proposed fragmentation scheme indicated a loss of methyleneamine, ethylideneamine from the molecular ion generated the product ions at m/z 214 and 200, respectively, which were 14 Da larger than the corresponding ions at m/z 200 and 186, respectively, for DCDQ. This suggested the addition of one oxygen atom and loss of two hydrogen atoms from DCDQ. The product ions at m/z 132, 144 and 158 were the same as for DCDQ, which indicated the site of biotransformation as the cyclopentane ring.

Table 30 lists the chemical shifts and assignments for M7. The metabolite was assigned using information from the 1D NMR spectrum and the 2D COSY spectrum. The 1D ^{1}H NMRspectrum showed that the aromatic ring was intact with three aromatic resonances coupled in series. With the available data, it was not possible to distinguish H12 from H14. The protons in the dizaepine ring were assigned from the salt resonances (H4) at 9.10 and 8.62 ppm. The 2D COSY data showed that these protons were coupled to the protons at 3.20 ppm (H3) and 4.18 and 4.15 ppm (H5). The H3 protons were also coupled to protons at 3.34 and 3.06 (H2). These results confirmed that the dizaepine ring was intact.

Table 30. ^{1}H Chemical Shifts for Metabolite M7 in DMSO-d_6

Atom Number	δ^1H (ppm)[a]
2	3.34, 3.06
3	3.20
4	9.10, 8.62
5	4.18, 4.15
9	3.47
10	2.59
11	3.16, 3.01
12	7.23[b]
13	7.01
14	7.35[b]
15	2.53, 1.76
16	2.32, 2.14

[a]Chemical shifts are referenced to residual internal DMSO-d_6 at 2.49 ppm for ^{1}H.
[b]The assignments for H12 and H14 might be interchanged.

The 1D ^{1}H NMRspectrum also showed a change occurred in the cyclopentyl region versus DCDQ because there were three resonances upfield of 2.5 ppm while for DCDQ, there were seven resonances. The assignment of the remaining protons began with the H11 protons. The resonances at 3.16 ppm and 3.01 ppm were assigned to H11 based on comparison to the coupling constants observed for DCDQ. The resonance at 3.01 ppm was a triplet and the resonance at 3.16 ppm was a doublet of doublets. These were also observed for DCDQ. The H11 protons were both coupled to a resonance at 2.59 ppm (H10). The H10 resonance was coupled to one other resonance at 3.47 ppm (H9). The H9 resonance was coupled to a methylene pair at 2.53 ppm and 1.76 ppm (H15). The H15 resonances were coupled to another methylene pair at 2.32 ppm and 2.14 ppm (H16). There were no resonances assignable to H17, which indicated the site of metabolism as the C17 position. The downfield shift of the H16 protons would be consistent with a carbonyl oxygen at C17. Therefore, M7 was identified as 17-keto DCDQ.

Metabolite M9

M9 generated a $[M+H]^+$ at m/z 421. The product ions of m/z 421 mass spectrum of M9 and the proposed fragmentation scheme indicated a loss of 176 Da from the molecular ion generated m/z 245, 16 Da larger than the DCDQ molecular ion, which indicated glucuronidation of hydroxy DCDQ. Loss of ethylideneamine from $[M+H]^+$ yielded m/z 378. This indicated an unchanged ethyleneamine moiety. Loss of glucuronic acid (176 Da) from m/z 378 yielded m/z 202, which was 16 Da higher than the corresponding ion at m/z 186 for DCDQ. This eliminated the three methylene groups of the cyclopropane ring as sites of metabolism. The product ion at m/z 203 was 16 Da larger than the corresponding ion at 187 for DCDQ. These data were consistent with either the benzyl or tetrahydropyridine group as the site of metabolism.

Table 31 lists the NMR chemical shifts and assignments for M9 using the numbering scheme in Figure 5. Much of the metabolite could be assigned using information from the 1D NMR spectrum and results from 2D COSY analysis, showing the through-bond correlations in M9, and ROESY analysis, showing through-space NOE close contacts in M9, experiments. The resonances from the methylene protons on C2 were not assigned because of overlap. Their resonances were located between 3.35 ppm and 3.15 ppm. The upfield regions of the NMR spectra for M9 DCDQ were identical. Further analysis of this region using a COSY experiment confirmed that the pentyl ring system was intact. Also visible in the 1D ^{1}H NMR spectrum for M9 were the resonances from the glucuronic acid. Several of these resonances could not be unambiguously assigned because of spectral overlap. There was an adequate amount of metabolite for the unassigned protons to resonate in the 3.35 to 3.15 ppm region.

Table 31. ^{1}H Chemical Shifts for Metabolite M9 in DMSO-d_6

Atom Number	δ^1H (ppm)[a, b]
3	2.19, 3.01
4	9.11, 8.55
5	4.18, 4.11
9	2.93
10	2.24
11	3.02, 2.62
12	6.94
14	6.91
15	2.19, 1.32
16	1.63, 1.52
17	2.00, 1.23
18	4.95
19	3.84
20	3.37

[a]Chemical shifts are referenced to residual internal DMSO at 2.49 ppm for ^{1}H.
[b]Several proton assignments could not be made because of overlap in the 3.35 to 3.15 ppm region.

Inspection of the 500 MHz 1D ^{1}H NMR spectrum showed that the resonances for the aromatic region were changed from the NMR spectrum of DCDQ. Two of these

aromatic resonances remained from the three for DCDQ. Coupling at 2.5 Hz between these aromatic resonances is characteristic of a *meta* orientation between the protons. This placed the glucuronic acid at the C13 position. The location of the glucuronic acid was further supported by the results of a ROESY experiment that showed H12 had NOEs to the H5 proton and H14 had an NOE to H9. These results positioned H12 and H14 at opposite ends of the aromatic ring. Both aromatic protons also had NOEs to the anomeric proton of the glucuronic acid ring. All these results were consistent with the glucuronic acid conjugation being at C13.

Metabolite M13

The $[M+H]^+$ for M13 was observed at m/z 325. The product ions of m/z 325 mass spectrum of M13 and the proposed fragmentation scheme indicated a loss of 80 Da from $[M+H]^+$ yielded m/z 245, which was 16 Da larger than $[M+H]^+$ for DCDQ. This indicated that M13 was a sulfate conjugate of hydroxy DCDQ. Loss of ethylideneamine from the molecular ion yielded m/z 282. The presence of product ions at m/z 144 and 132, also observed for DCDQ, indicated that one of the three methylene positions of the cyclopentane ring was the site of metabolism.

Table 32 lists the chemical shifts and assignments for M13. The metabolite was assigned using information from the 1D ^{1}H NMR spectrum, 2D COSY spectrum and 2D ROESY spectrum. The 1D ^{1}H NMR spectrum for M13 showed that the aromatic ring was intact with three coupled protons at 7.15 ppm (H12), 6.91 ppm (H13) and 7.23 ppm (H14). The assignments were confirmed by observing an ROE from H12 to the resonances at 4.17 ppm and 4.14 ppm which were identified as H5. The protons in the dizaepine ring were assigned from the salt resonances (H4) at 9.04 and 8.57 ppm. The 2D COSY data showed that these protons were coupled to the protons at 3.22 ppm and 3.20 ppm (H3) and 4.17 and 4.14 ppm (H5). The H3 protons were also coupled to protons at 3.34 and 3.14 (H2). These results confirmed that the dizaepine ring was intact.

Table 32. ^{1}H Chemical Shifts for Metabolite M13 in DMSO-d_6

Atom Number	δ^1H (ppm)[a]
2	3.34, 3.14
3	3.22, 3.20
4	9.10, 8.62
5	4.17, 4.14
9	3.15
10	2.40
11	3.23, 2.68
12	7.15
13	6.91
14	7.23
15	2.26, 1.33
16	1.97, 1.67
17	4.29

a. Chemical shifts are referenced to residual internal DMSO at 2.49 ppm for ^{1}H.

The 1D ^{1}H NMR spectral data (Table 32) showed that a change occurred in the cyclopentyl region because there were five resonances upfield of 2.5 ppm for M13 while in the DCDQ NMR spectrum, there were seven resonances. The protons at position 11 were assigned based on their similarity to those for DCDQ. The triplet resonance at 2.68 ppm was unique to DCDQ. This resonance was coupled to a resonance at 3.23 ppm (H11) and another at 2.40 ppm (H10). H10 was coupled to a resonance at 3.15 ppm (H9) and weakly coupled to 4.29 ppm (H17). H9 was coupled to a methylene pair at 2.26 ppm and 1.33 ppm (both H15). This methylene pair was coupled to a second methylene pair at 1.97 ppm and 1.67 ppm (both H16). The H16 methylene was coupled to H17. One proton was missing from the cyclopentane ring and the large downfield shift of the remaining proton was indicative of a nearby heteroatom. All these data were consistent with the sulfate group present at the C17 position. Therefore, M13 was identified as 17-hydroxy DCDQ sulfate.

DISCUSSION

The present study was designed to obtain rat urine for metabolite isolation and to obtain more specific structural identification for selected metabolites of DCDQ. Three

male and three female rats were given a single 50 mg/kg dose of DCDQ. Urine was collected at 0-12 and 12-24 hour intervals. DCDQ metabolites M7 (keto DCDQ), M9 (hydroxyl DCDQ glucuronide) and M13 (hydroxyl DCDQ sulfate) were isolated from the urine by a two stage semi-preparative HPLC method in low microgram quantities sufficient for NMR spectroscopic analysis. Based upon MS and NMR spectroscopic analysis the site of metabolism for M7 and M13 was at 17 position 17. The site of metabolism for M9 was at position 13. The structural identifications for M7, M9 and M13 identified through this study further refine those of the in vivo rat study discussed above.

IN VIVO METABOLISM OF [^{14}C] DCDQ IN HEALTHY HUMAN SUBJECTS FOLLOWING ORAL ADMINISTRATION

The metabolite profiles of DCDQ in plasma and urine of healthy human subjects receiving a single or multiple oral doses of DCDQ at various dosages were determined. In addition, relative concentrations of the major DCDQ metabolite (M6, carbamoyl glucuronide) were determined in selected samples.

DCDQ and several DCDQ metabolites were identified in plasma and urine. DCDQ carbamoyl glucuronide (M6) was the predominant drug-related component in both plasma and urine. DCDQ imine N-oxide (M5), unchanged DCDQ, DCDQ imine (P3) and other relatively minor drug-related components were also observed in plasma. Unchanged DCDQ, DCDQ N-oxide glucuronide (M40), hydroxyl DCDQ glucuronide (M38), hydroxyl DCDQ carbamoyl glucuronide (M37) and a number of other relatively minor drug-related components were excreted in urine.

The concentrations of M6 in plasma increased with increased dosage, and large individual variations were observed. Plasma M6 concentrations decreased over time from 6 to 24 hour post-dose. The ratios of M6-to-DCDQ plasma concentrations were higher at 6 hour than at 12 and 24 hour post-dose. At 6 hour post-dose, the average ratios ranged from 35.4 to 76.6. There were no statistically significant differences in M6 concentrations and the M6-to-DCDQ ratios between fasted and fed subjects receiving 300 mg of DCDQ. The average M6-to-DCDQ ratios ranged from 84 to 1018 in urine.

The results show that DCDQ underwent phase I and phase II metabolism in healthy human subjects receiving DCDQ orally, and carbamoyl glucuronidation was the

major metabolic pathway. In contrast to animal studies, formation of the carbamoyl glucuronide (M6) was the major metabolic pathway in humans, and M6 was the predominant drug-related metabolite in human plasma and urine.

MATERIALS AND METHODS

METHODS

DCDQ hydrochloride with a chemical purity of 98.6% was synthesized by Wyeth Research (Pearl River, NY). DCDQ carbamoyl glucuronide was synthesized by Chemical Development at Wyeth Research (Montreal, Canada), and had a purity of 95.5%. The internal standard (d_8-DCDQ, lot L27347-140-A) was synthesized by the Radiosynthesis group at Wyeth Research (Pearl River, NY). The reported deuterium distribution was d_0-d_5 0%, d_6 0.1%, d_7 2.7%, and d_8 97.1%. Solvents used for extraction and for chromatographic analysis were HPLC or ACS reagent grade from EMD Chemicals (Gibbstown, NJ).

METHODS

DRUG ADMINISTRATION AND SPECIMEN COLLECTION

Drug administration and specimen collection were performed in a randomized, double-blinded, placebo-controlled, ascending single dose study of the safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of DCDQ administered orally to healthy subjects and subjects with schizophrenia and schizoaffective disorder. The specimens were stored at approximately –70 °C until analysis for metabolite profiles and for ratios of carbamoyl glucuronide (M6) to DCDQ.

SAMPLE PREPARATION

Two subjects with medium and high exposure to DCDQ in the 25 mg multiple ascending dose study were also analyzed by LC/MS for metabolite profiles. The 8 hr plasma samples collected on day 1 and day 14 from subjects 9 and 41 were processed and analyzed as described below. No internal standard was added to the samples analyzed for metabolite profiles.

Plasma samples from fasted subjects 25, 28 and 30 in the 50 mg single dose group, fasted subjects 50, 51, 54 in the 200 mg single dose group, fasted subjects 74, 76, 79 in the 300 mg single dose group, fed subjects 83, 84, 86 in the 300 mg single dose group and fasted subjects 92, 94, 96 in the 500 mg single dose group were analyzed for DCDQ carbamoyl glucuronide (M6) concentrations. The internal standard d8-DCDQ (25 μL of 200 ng/mL methanol solution) was added to 100 μL of the plasma samples, followed by the addition of 300 μL of acetonitrile. The samples were mixed and centrifuged at 14000 rpm in an Eppendorf 5415C centrifuge (Brinkman Instruments Inc., Westbury, NY) for 10 minutes. The supernatant of each sample was transferred to a clean tube and evaporated to dryness under a stream of nitrogen in a TurboVap LV evaporator (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA). The residue was reconstituted with 50 μL of methanol followed by the addition of 150 μL of water. The sample was mixed and centrifuged as described above. The supernatant was analyzed by LC/MS/MS analysis. Samples for standard curves were prepared with control plasma spiked with synthetic M6. The concentrations of M6 used for the standard curve ranged from 0 to 2500 ng/mL plasma.

The 0-4, 4-12 and 12-24 hr urine samples from the same subjects in the single dose groups were analyzed for ratios of M6 to DCDQ. The internal standard was not used in the analysis of urine samples. The samples were diluted for 20-fold with a control urine sample and directly analyzed by LC/MS. To estimate M6-to-DCDQ ratios in human urine, control urine samples were spiked with 200 ng/mL of DCDQ and 1000, 5000, or 10000 ng/mL of DCDQ carbamoyl glucuronide, and were analyzed by LC/MS.

LIQUID CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY

Three LC/MS systems were used in this work. LC/MS System 1 was used for analysis of plasma and urine samples for metabolite characterization. LC/MS System 2 was used to provide additional MS/MS data for characterization of DCDQ metabolites in urine. LC/MS System 3 was used for semi-quantitative analysis of metabolite M6 (DCDQ carbamoyl glucuronide) in plasma and urine samples.

LC/MS SYSTEM 1

LC/MS System 1 was used for analysis of plasma and urine samples for metabolite characterization. The HPLC equipment used with this LC/MS System consisted of an Agilent Model 1100 HPLC system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) including an autosampler, binary pump and diode array UV detector. The UV detector was set to monitor 210 to 350 nm. The HPLC mobile phase consisted of 10 mM ammonium acetate, pH 4.5 (A) and methanol (B), and was delivered at 0.2 mL/min. The linear mobile phase gradient (HPLC Gradient 1) is shown below. During LC/MS sample analysis, up to 6 min of the initial flow was diverted away from the mass spectrometer prior to evaluation of metabolites.

HPLC Gradient 1

Time (min)	A (%)	B (%)
0	95	5
3	95	5
3.1	90	10
13	90	10
25	80	20
50	70	30
70	5	95
80	5	95

The mass spectrometer used for metabolite characterization with LC/MS System 1 was a Finnigan LCQ-Deca ion trap mass spectrometer (Thermo Electron, San Jose, CA). This mass spectrometer was equipped with an electrospray ionization (ESI) interface and operated in the positive ionization mode. Settings for the LCQ mass spectrometer are listed below.

Finnigan LCQ Mass Spectrometer Settings	
Spray voltage	4.5 kV
Heated capillary temp.	200 °C

Nebulizer gas pressure	50 psi
Auxiliary gas setting	60
Full scan AGC setting	5×10^7
Relative collision energy	30%

LC/MS System 2

LC/MS System 2 was used to provide additional MS/MS data for characterization of DCDQ metabolites in urine. The HPLC equipment used with LC/MS System 2 consisted of a Waters model 2695 HPLC system (Waters Corp., Milford, MA). It was equipped with a built-in autosampler and a model 996 diode array UV detector. The UV detector was set to monitor 210-400 nm. The HPLC column, mobile phases, flow rate, diversion of flow away from the mass spectrometer and gradient were as described above for LC/MS System 1. The column temperature was 25°C.

The mass spectrometer used for metabolite characterization with LC/MS System 2 was a Micromass Quattro Micro triple quadrupole mass spectrometer (Waters Corp.). This mass spectrometer was equipped with an electrospray interface and operated in the positive ionization mode. Settings for this mass spectrometer are listed below.

Micromass Mass Spectrometer Settings	
ESI spray	2.5 kV
Cone	45 V
Mass resolution (MS1 and MS2)	0.7 Da ± 0.2 Da width at half height
Desolvation gas flow	900-1100 L/hr
Cone gas flow	50-70 L/hr
Source block temp.	80°C
Desolvation gas temp.	200°C
Collision gas pressure	$1.0\text{-}1.2 \times 10^{-3}$ mbar
Collision offset	22 eV

LC/MS System 3

LC/MS System 3 was used for semi-quantitative analysis of metabolite M6 (DCDQ carbamoyl glucuronide) in plasma and urine samples. The HPLC equipment for this

LC/MS System consisted of a Thermo Surveyor HPLC (Thermo Electron Corp., San Jose, CA), including a Surveyor MS pump and autosampler. Separations were accomplished on a 5 micron Phenomenex Luna C18(2) column, 150 x 2 mm (Phenomenex, Torrance, CA). The autosampler and column temperatures were set at 5°C and 40°C, respectively. The HPLC mobile phase consisted of 10 mM ammonium acetate (A) and methanol (B), and was delivered at 0.2 mL/min. The linear mobile phase gradient (HPLC Gradient 2) is shown below. During LC/MS sample analysis, up to 3 min of the initial flow was diverted away from the mass spectrometer prior to evaluation of metabolites.

HPLC Gradient 2

Time (min)	A (%)	B (%)
0	90	10
3	90	10
11	10	90
18	10	90
20	90	10
24	90	10

The mass spectrometer used for semi-quantitative analysis with LC/MS System 3 was a Finnigan TSQ Quantum triple quadrupole mass spectrometer (Thermo Electron Corp.). This mass spectrometer was equipped with an electrospray interface and operated in the positive ionization mode. Settings for this mass spectrometer are listed below.

Finnigan TSQ Quantum Mass Spectrometer Settings

Spray voltage	4.5 kV
Capillary temperature	250°C
Q1 mass resolution setting	0.8 Da width at half height
Q3 mass resolution setting	0.6 Da width at half height
Nebulizer gas pressure	30 arb. units
Auxiliary gas setting	50 arb. units
Collision gas pressure	1.5 mtorr

LC/MS/MS analysis in the selected reaction monitoring (SRM) mode (LC/SRM) was conducted for DCDQ and M6 using the following settings.

LC/SRM Analysis Settings				
Compound	Nominal Mass Q1	Q3	Collision offset (eV)	Dwell time (ms)
DCDQ	229	186	22	300
d_8-DCDQ (plasma only)	237	194	22	300
DCDQ carbamoyl glucuronide (M6)	449	273	25	300

Data Analysis and Statistical Evaluation

The computer program Microsoft Excel® 97 was used to calculate means and standard deviations and to perform the student *t*-test. Xcalibur (version 1.3) and MassLynx software (version 4.0) were used for collection and analysis of LC/MS data. Peak area ratios of M6 to the internal standard were used for quantitation of M6 in plasma samples.

RESULTS

Metabolite Profiles and M6 Concentrations in Plasma

DCDQ and eight DCDQ metabolites were identified in human plasma (Table 33). DCDQ carbamoyl glucuronide (M6) was the predominant drug-related component in plasma in all dose groups in both single and multiple dose studies. DCDQ imine N-oxide (M5), unchanged DCDQ, DCDQ imine (P3) and trace amounts of hydroxyl DCDQ, hydroxyl DCDQ imine, hydroxyl DCDQ glucuronide (M9) and keto DCDQ glucuronide (M22) were also observed in plasma. Metabolite profiles were qualitatively similar in all samples analyzed.

Plasma M6 concentrations increased with increased dosage, and large individual variations were observed (Table 34). Of the three time points analyzed, M6 concentrations were the highest at 6 hour post-dose and decreased over time at 12 and 24 hour post-dose. The ratios of M6 to DCDQ plasma concentrations were also the highest at 6 hour post-dose, and in general decreased over time. At 6 hour post-dose, the average ratios ranged from 35.4 to 76.6. There were no statistically significant differences in M6 concentrations and the M6 to DCDQ ratios between fasted and fed subjects receiving 300 mg of DCDQ.

Metabolite Profiles and M6 to DCDQ Ratios in Urine

DCDQ and several DCDQ metabolites were identified in urine. DCDQ carbamoyl glucuronide (M6) was the predominant drug-related component in urine, as in plasma. Unchanged DCDQ, DCDQ N-oxide glucuronide (M40), hydroxyl DCDQ glucuronide (M38), hydroxyl DCDQ carbamoyl glucuronide (M37) and trace amounts of DCDQ imine (P3), hydroxyl DCDQ (M1 and M32), hydroxyl DCDQ imine (M29), keto DCDQ glucuronide (M22), hydroxyl DCDQ glucuronide (M9), hydroxyl DCDQ carbamoyl glucuronides (M33, M36 and M39), DCDQ imine glucuronide (M34) and dihydroxyl DCDQ imine glucuronide (M35) were also observed in urine.

The carbamoyl glucuronide (M6) was present in urine at much higher concentrations than the parent drug (Table 35). The average M6 to DCDQ ratios ranged from 84 to 1018; large variations were observed. The ratios appeared to be lower in the 500 mg dosage group than in the other dose groups.

Metabolite Characterization by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry

Mass spectra were obtained by LC/MS and LC/MS/MS analysis for DCDQ and its metabolites in human plasma and urine. Table 33 summarizes the DCDQ metabolites characterized in this study. As M6 (DCDQ carbamoyl glucuronide) was the predominant DCDQ related component in both plasma and urine, and the relative concentration of unchanged DCDQ was relatively minor. Therefore, mass spectral characterization only of DCDQ related components present in approximately equal or greater concentrations than unchanged DCDQ in plasma or urine are discussed in more detail below.

DCDQ

The mass spectral characteristics of DCDQ authentic standard were examined for comparison with metabolites. In the LC/MS spectrum of DCDQ, a protonated molecular ion, $[M+H]^+$, was observed at m/z 229. Loss of NH_3 from $[M+H]^+$ yielded m/z 212. Loss of methyleneamine, ethylideneamine and propylideneamine from the molecular ion generated the product ions at m/z 200, 186 and 171, respectively. Loss of the propene group from the molecular ion generated m/z 187 and further loss of methyleneamine and ethylideneamine yielded m/z 158 and 144. Loss of cyclopentene from $[M+H]^+$ yielded

m/z 161. Loss of the cyclopentyl-methyleneamine group generated the product ion at m/z 132.

Metabolite M5

Metabolite M5 produced a $[M+H]^+$ at m/z 243, which was 14 Da larger than DCDQ and 16 Da larger than P3. These data suggested that M5 was a keto DCDQ metabolite, hydroxyl DCDQ imine or DCDQ imine N-oxide. Loss of NH_3 and H_2O from $[M+H]^+$ yielded m/z 226 and 225, respectively, which was consistent with addition of an oxygen atom. Loss of methyleneamine, from the molecular ion was proposed to generate m/z 213, consistent with addition of oxygen and the presence of a double bond from loss of two hydrogens. The product ion at m/z 130 was also observed for P3 and was 2 Da less than the corresponding ion at m/z 132 for DCDQ. These data indicated that M5 also contained an imine group, which eliminated keto DCDQ from consideration. The HPLC retention time of M5 was longer than both DCDQ and P3 (DCDQ imine), which was also observed in the in vitro metabolism study[1] and consistent with N-oxidation. Therefore, M5 was identified as DCDQ imine N-oxide.

Metabolite M6

The $[M+H]^+$ for M6 was observed at m/z 449, which was 220 Da larger than DCDQ. Loss of 176 Da from the molecular ion generated m/z 273, indicating that M6 was a glucuronide. Further loss of 44 Da from m/z 273 yielded m/z 229, which was also the molecular ion for DCDQ. Product ions at m/z 212 and 186 were also observed for DCDQ, consistent with M6 being a conjugate of DCDQ. Therefore, M6 was identified as the carbamoyl glucuronide of DCDQ.

Metabolite M38

The $[M+H]^+$ for M38 was observed at m/z 421, which was 192 Da larger than DCDQ. Loss of NH_3 from $[M+H]^+$ yielded m/z 404, which suggested an unchanged amino group on the diazepane ring. Loss of 176 Da from the molecular ion generated m/z 245, which was also the molecular ion for hydroxyl DCDQ metabolites. Losses of NH_3 and H_2O from m/z 245 generated m/z 228 and 227, respectively. These data indicated that M38 was a glucuronide of a hydroxyl DCDQ. The product ion at m/z 362 was 176 Da larger than the corresponding ion at m/z 186 for DCDQ, which indicated glucuronidation of the

quinoline-cyclopentane moiety. Product ions at m/z 382 and 269 were proposed to include the glucuronic acid moiety and have been the result of fragmentation of diazepine, quinoline and cyclopentane rings as indicated in the fragmentation scheme. These data were consistent with glucuronidation of the quinoline nitrogen and hydroxylation of the diazepine ring. Therefore M38 was identified as a hydroxyl DCDQ glucuronide.

Metabolite M40

The $[M+H]^+$ for M40 was observed at m/z 421, which was 192 Da larger than DCDQ. Loss of H_2O from $[M+H]^+$ yielded m/z 403. No apparent loss of NH_3 was observed from $[M+H]^+$, which suggested a modified amino group on the diazepane ring. Loss of 176 Da from the molecular ion generated m/z 245, which was also the molecular ion for hydroxyl DCDQ metabolites. However, the relative intensity m/z 245 for M40 was weaker than was obeserved for metabolite M38. Loss of an oxygen atom from m/z 245 yielded m/z 229, also the molecular ion for DCDQ. These data in combination with the presence of m/z 229 as the base peak in the ion trap mass spectrum, rather than m/z 245 as was observed for metabolite M38, indicated the presence of an N-oxide. Product ions at m/z 228, 227, 212 and 210 respectively were generated by losses of H_2O and NH_3 from m/z 245 and 229 as indicated in the fragmentation scheme. The HPLC retention time of M40 was longer than for M38, which was also consistent with M40 being an N-oxide. Product ions at m/z 200 and 186 were also observed for DCDQ and were proposed to be the result of loss of an oxygen atom from the corresponding N-oxide product ions for M40. Product ions at m/z 380 and 271 were proposed to include the glucuronic acid moiety and have been the result of fragmentation of diazepine, quinoline and cyclopentane rings as indicated in the fragmentation scheme. These data were consistent with glucuronidation of the amino group of the diazepine ring and N-oxidation of the quinoline nitrogen. Therefore, M40 was proposed to be a DCDQ N-oxide glucuronide.

Discussion

DCDQ underwent metabolism in humans. DCDQ carbamoyl glucuronide (M6) was the predominant drug-related component in both plasma and urine. DCDQ imine N-oxide

(M5), unchanged DCDQ, DCDQ imine (P3) were the other major drug-related components observed in plasma. Unchanged DCDQ, DCDQ N-oxide glucuronide (M40), hydroxyl DCDQ glucuronide (M38), hydroxyl DCDQ carbamoyl glucuronide (M37) were excreted in urine.

Plasma M6 concentrations increased with increased dosage, and large individual variations were observed. M6 concentrations decreased over time from 6 to 24 hour post-dose. The ratios of M6 to DCDQ plasma concentrations were higher at 6 hour than at 12 and 24 hour post-dose. At 6 hour post-dose, the average ratios ranged from 35.4 to 76.6. In contrast, much lower amounts of M6 were detected in the previous in vitro and in vivo studies. There were no statistically significant differences in M6 concentrations and the M6 to DCDQ ratios between fasted and fed subjects receiving 300 mg of DCDQ. The average M6-to-DCDQ ratios ranged from 84 to 1018 in urine.

In summary, DCDQ underwent both phase I and phase II metabolism in healthy human subjects and carbamoyl glucuronidation was the major metabolic pathway. In contrast to animal studies, formation of the carbamoyl glucuronide (M6) was the major metabolic pathway in humans, and M6 was the predominant drug-related metabolite in human plasma and urine.

Table 33. DCDQ metabolites characterized by LC/MS in human plasma and urine

t_R[a]	Metabolite peak	$[M+H]^+$	Site of metabolism	Name	Matrix[b]
31.7	M32	245	Cyclopropane or Piperidine ring	Hydroxyl DCDQ	P, U
32.2	M29	243	Cyclopentane and diazepane rings	Hydroxyl DCDQ imine	P, U
36.3	M1	245	Piperidine ring	Hydroxyl DCDQ	P, U
38.3	M22	419	Diazapine and Cyclopentane rings	Keto DCDQ glucuronide	P, U
49.6	M9	421	Benzene ring	Hydroxyl DCDQ Glucuronide	P, U
58.0	M33	465	Diazepine ring	Hydroxyl DCDQ carbamoyl glucuronide	U
63.3	M34	403	Diazepine ring	DCDQ imine glucuronide	U
63.6	M35	435	Diazepine and cyclopentane rings	Dihydroxyl DCDQ imine glucuronide	U
64.2	M36	465	Diazepine ring and quinoline or cyclopenatne ring	Hydroxyl DCDQ carbamoyl glucuronide	U
65.9	P3	227	Diazepine ring	DCDQ imine	P, U
67.1	M37	465	Diazepine ring and quinoline or cyclopenatne ring	Hydroxyl DCDQ carbamoyl glucuronide	U
68.6	DCDQ	229	None	DCDQ	P, U
70.9	M38	421	Quinoline nitrogen and diazepine ring	Hydroxyl DCDQ glucuronide	U
71.4	M5	243	Diazepine ring	DCDQ imine N-oxide	P
71.4	M39	465	Diazepine ring and quinoline or cyclopenatne ring	Hydroxyl DCDQ carbamoyl glucuronide	U
73.6	M40	421	Diazepine nitrogens	DCDQ N-oxide glucuronide	U
75.2	M6	449	Diazepine secondary amine group	Carbamoyl Glucuronide of DCDQ	P, U

a: Retention times taken from LC/MS data
b: P = plasma, U= urine

Table 34. Concentrations (ng/mL) of DCDQ and DCDQ Carbamoyl Glucuronide (M6) in Plasma from Healthy Subjects Receiving DCDQ

Dose (mg)	Time (hr)	Subject	DCDQ [a]	M6	M6 to DCDQ Ratios
50 (fasted)	6	25	1.6	83.1	55.4
		28	0.9	127	141
		30	5.0	132	26.4
		Mean ± S.D.	2.47 ± 2.21	114 ± 26.9	74.3 ± 59.6
	12	25	0.7	15.1	21.6
		28	0.4	6.60	16.5
		30	2.5	15.4	6.16
		Mean ± S.D.	1.20 ± 1.14	12.4 ± 5.00	14.8 ± 7.67
	24[b]	25	0.2	3.1	15.5
		28	NA [c]	NA	NA
		30	0.6	3.6	6.00
		Mean	0.40	3.35	10.8
200 (fasted)	6	50	2.7	225	83.3
		51	18.0	615	34.2
		54	12.0	216	18.0
		Mean ± S.D.	10.9 ± 7.71	352 ± 228	45.2 ± 34.0
	12	50	1.2	37.5	31.3
		51	9.2	62.9	6.84
		54	6.4	30.3	4.73
		Mean ± S.D.	5.60 ± 4.06	43.6 ± 17.1	14.3 ± 14.8
	24	50	0.3	4.8	16.0
		51	2.8	8.8	3.38
		54	1.6	9.4	5.88
		Mean ± S.D.	1.50 ± 1.15	7.67 ± 2.50	8.42 ± 6.68
300 (fasted)	6	74	2.09	123	58.9
		76	4.27	249	58.3
		79	16.0	339	21.2
		Mean ± S.D.	7.45 ± 7.48	237 ± 108	46.1 ± 21.6
	12	74	1.50	43.0	28.7
		76	3.34	78.0	23.4
		79	7.84	145	18.5
		Mean ± S.D.	4.23 ± 3.26	88.7 ± 51.8	23.5 ± 5.10
	24	74	0.972	48.5	49.9
		76	1.72	12.0	6.98
		79	1.70	26.3	15.5
		Mean ± S.D.	1.46 ±0.43	28.9 ± 18.4	24.1 ± 22.7

Table 34 (Continued). Concentrations (ng/mL) of DCDQ and DCDQ Carbamoyl Glucuronide (M6) in Plasma from Healthy Subjects Receiving DCDQ

Dose (mg)	Time (hr)	Subject	DCDQ [a]	M6	M6 to DCDQ Ratios
300 (fed)	6	83	19.0	860	45.3
		84	15.6	696	44.6
		86	1.30	182	140
		Mean ± S.D.	12.0 ± 9.39	579 ± 354	76.6 ± 54.9
	12	83	10.9	279	25.6
		84	8.06	38.1	4.73
		86	5.97	540	90.5
		Mean ± S.D.	8.31 ± 2.47	286 ± 251	40.3 ± 44.7
	24	83	2.60	24.6	9.46
		84	1.15	6.40	5.57
		86	2.69	148	54.3
		Mean ± S.D.	2.15 ± 0.86	59.0 ± 75.9	23.1 ± 27.1
500 (fasted)	6	92	44.5	1324	29.8
		94	31.7	508	16.0
		96	20.2	1221	60.4
		Mean ± S.D.	32.1 ± 12.2	1018 ± 444	36.4 ± 22.7
	12	92	24.5	148	5.96
		94	21.7	181	8.34
		96	12.0	206	17.2
		Mean ± S.D.	19.4 ± 6.66	178 ± 30.1	10.5 ± 5.92
	24	92	5.53	58.3	10.6
		94	6.88	13.5	1.96
		96	3.95	77.0	19.5
		Mean ± S.D.	5.45 ± 1.47	49.6 ± 32.6	10.7 ± 8.77

a: DCDQ concentrations were determined by Bioanalytical with a validated assay for human plasma.[4] Concentrations of M6 were quantified by anon-validated LC/MS method in Biotransformation using a standard curve generated with synthesized M6.
b: Standard deviation was not calculated;
c: NA, not analyzed because the plasma DCDQ level was below the level of quantitation.

Table 35. Concentrations (ng/mL) of DCDQ and DCDQ Carbamoyl Glucuronide (M6) to DCDQ Ratios in Urine from Healthy Subjects Receiving DCDQ

Dose (mg)	Time (hr)	Subject	DCDQ [a]	M6 to DCDQ Ratios
50 (fasted)	0-4	25	13.7	571
		28	13.7	1739
		30	115	214
		Mean ± S.D.	47.5 ± 58.5	841 ± 798
	4-12	25	31	389
		28	16.2	606
		30	126	261
		Mean ± S.D.	58.4 ± 56.9	419 ± 174
	12-24	25	17.7	143
		28	5.21	259
		30	75.3	83.9
		Mean	32.7 ± 37.4	155 ± 98.1
200 (fasted)	0-4	50	251	169
		51	288	171
		54	57	113
		Mean ± S.D.	199 ± 124	151 ± 32.9
	4-12	50	79.5	397
		51	177	240
		54	97.3	215
		Mean ± S.D.	118 ± 51.9	284 ± 98.7
	12-24	50	23.1	216
		51	181	85.9
		54	137	42.3
		Mean ± S.D.	114 ± 81.5	115 ± 90.4
300 (fasted)	0-4	74	9.43	1167
		76	62.8	852
		79	172	440
		Mean ± S.D.	81.4 ± 82.9	820 ± 365
	4-12	74	21.7	329
		76	93.4	1543
		79	72.3	324
		Mean ± S.D.	62.5 ± 36.8	732 ± 702
	12-24	74	22.9	485
		76	298	127
		79	64.1	110
		Mean ± S.D.	128 ± 148	241 ± 212

Table 35 (Continued). Concentrations (ng/mL) of DCDQ and DCDQ Carbamoyl Glucuronide (M6) to DCDQ Ratios in Urine from Healthy Subjects Receiving DCDQ

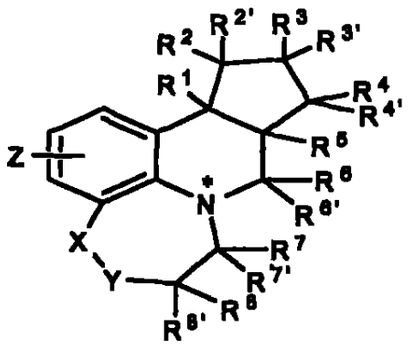
Dose (mg)	Time (hr)	Subject	DCDQ [a]	M6 to DCDQ Ratios
300 (fed)	0-4	83	55.9	1182
		84	1.56	441
		86	1.82	1451
		Mean ± S.D.	19.8 ± 31.3	1018 ± 520
	4-12	83	259	376
		84	174	571
		86	30.6	1337
		Mean ± S.D.	155 ± 115	761 ± 508
	12-24	83	351	148
		84	116	92.6
		86	308	184
		Mean ± S.D.	258 ± 125	142 ± 46.0
500 (fasted)	0-4	92	1569	71.5
		94	835	60.2
		96	339	161
		Mean ± S.D.	914 ± 619	97.8 ± 55.2
	4-12	92	1883	149
		94	612	34.6
		96	1611	69.4
		Mean ± S.D.	1369 ± 658	84.3 ± 58.6
	12-24	92	160	288
		94	405	36.0
		96	273	203
		Mean ± S.D.	279 ± 123	176 ± 128

a: DCDQ concentrations were determined by Bioanalytical with a validated assay for human urine.[6] Concentrations of M6 were quantified by an non-validated LC/MS method in Biotransformation using a standard curve generated with synthesized M6.

All references, including but not limited to articles, texts, patents, patent applications, publications, and books, cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety. This application claims priority benefit of U.S. Provisional Application Ser. No. 60/625,335 filed November 5, 2004, the entire content of which is incorporated by reference herein in its entirety.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A compound of formula I



I

wherein:.

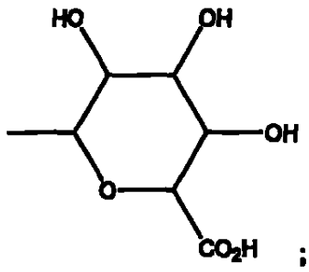
for each R^n and $R^{n'}$, where n is 1 through 8:

each R^n and $R^{n'}$ is independently hydrogen, hydroxy, $CH_3C(O)$-O, $-OSO_3H$, or -O-G; or

R^n and the corresponding $R^{n'}$, where n is 2, 3, 4, 6, 7, or 8, taken together with the carbon to which they are attached, form C=O; or

R^n along with the corresponding R^{n+1}, where n is 1, 2, 3, 4, 5, or 7, taken together form a double bond between the carbons to which they are attached, and each corresponding $R^{n'}$ and $R^{(n+1)'}$ is independently hydrogen, hydroxy, $CH_3C(O)$-O, $-OSO_3H$, or -O-G;

G has the formula:



;

wherein the nitrogen denoted with the symbol * can optionally form an N-oxide;

X-Y is CH=N, CH=N(O), $CH_2N(O)$, C(O)NH or CR^9HNR^{10};

R^9 is hydrogen, hydroxyl, or $-OSO_3H$;

R^{10} is hydrogen, acetyl, $-SO_3H$, -G, or -C(O)-OG;

Z is hydrogen, hydroxy, $-OSO_3H$, or -O-G;

with the proviso that when Z is hydroxy, then either (a) one of R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, and R^{10} is not hydrogen; or (b) X-Y is not CR^9HNR^{10}; and

with the further proviso that when X-Y is CHR^9NR^{10}, then at least one of Z, R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, and R^{10} is not H;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

2. A compound or salt according to claim 1, wherein at least one of Z and R^1 through R^6 is –OH.

3. A compound or salt according to claim 2, wherein X-Y is CR^9HNR^{10}.

4. A compound or salt according to claim 2, wherein $R^9 = R^{10} = H$.

5. A compound or salt according to claim 4, wherein at least one of R^7 and R^8 is –OH.

6. A compound or salt according to claim 4, wherein R^8 is –OH.

7. A compound or salt according to claim 4, wherein at least one of R^3 and R^4 is –OH.

8. A compound or salt according to claim 4, wherein at least one of R^1, R^5, R^6, R^7, and Z is –OH.

9. A compound or salt according to claim 2, where R^9 is H and R^{10} is acetyl.

10. A compound or salt according to claim 9, wherein at least one of R^7 and R^8 is –OH.

11. A compound or salt according to claim 2, wherein X-Y is CH=N.

12. A compound or salt according to claim 11, wherein at least one of R^1 through R^6 is -OH.

13. A compound or salt according to claim 11, wherein at least one of R^2 through R^4 is -OH.

14. A compound or salt according to claim 1, wherein

at least one of R^1 through R^6, R^9, R^{10}, and Z is –C(O)-O-G, –O-G, or -G.

15. A compound or salt according to claim 14, wherein X-Y is CR^9HNR^{10}.

16. A compound or salt according to claim 15, where R^9 and R^{10} are H.

17. A compound or salt according to claim 15, wherein at least one of Z, R^3, and R^4 is -O-G.

18. A compound or salt according to claim 14, wherein at least one of R^1 through R^6, R^9, and Z is –O-G.

19. A compound or salt according to claim 14, wherein R^2 along with R^3 taken together form a double bond between the carbons to which they are attached, and at least one of $R^{3'}$ and R^4 is –O-G.

20. A compound or salt according to claim 15, wherein R^4 and $R^{4'}$ together with the carbon to which they are attached form C=O.

21. A compound or salt according to claim 20 wherein R^{10} is -G.

22. A compound or salt according to claim 15, where R^{10} is -C(O)O-G.

23. A compound or salt according to claim 15, where R^{10} is acetyl.

24. A compound or salt according to claim 23, wherein at least one of R^1 through R^6, R^9, and Z is –O-G.

25. A compound or salt according to claim 23, wherein at least one of R^7 and R^8 is –O-G.

26. A compound or salt according to claim 1, wherein at least one of R^1 through R^9, and Z is $-OSO_3H$.

27. A compound or salt according to claim 26, wherein X-Y is $–CHR^9NR^{10}$.

28. A compound or salt according to claim 26 or claim 27, where $R^9 = R^{10} = H$.

29. A compound or salt according to claim 28, wherein at least one of R^1 through R^9 is $–OSO_3H$.

30. A compound or salt according to claim 28, wherein at least one of R^2 and R^3 is $-OSO_3H$.

31. A compound or salt according to claim 26, wherein R^3 is $–OSO_3H$.

32. A compound or salt according to claim 26 or claim 27, wherein at least one of R^9 and Z is $-OSO_3H$.

33. A compound or salt according to claim 1, wherein X-Y is CR^9HNR^{10}, where R^9 is H and R^{10} is $-SO_3H$.

34. A compound or salt according to claim 33, wherein at least two of R^n and the corresponding R^{n+1}, where n = 1-5, form a double bond between the carbons to which they are attached.

35. A compound or salt according to claim 1, wherein R^n and corresponding $R^{n'}$ taken together with the carbon to which they are attached form C=O.

36. A compound or salt according to claim 35, wherein R^4 and $R^{4'}$ taken together with the carbon to which they are attached form C=O.

37. A compound or salt according to claim 36, wherein X-Y is CR^9HNR^{10}.

38. A compound or salt according to claim 36 or claim 37, wherein R^{10} is –G.

39. A compound or salt according to claim 36 or claim 37, where R^9 and R^{10} are H.

40. A compound or salt according to claim 1, wherein X-Y is C(O)NH.

41. A compound or salt according to claim 1, wherein X-Y is CH=N.

42. A compound or salt according to claim 41, wherein at least one of R^1 through R^6 is -OH.

43. A compound or salt according to claim 42, wherein at least one of R^2 through R^4 is -OH.

44. A compound or salt according to claim 42 wherein the nitrogen between R^6 and R^7 forms an N-oxide.

45. A compound or salt according to claim 1, wherein at least one of R^n and its corresponding R^{n+1}, where n = 1-5, together form a double bond between the carbons to which they are attached and each $R^{n'}$ and $R^{(n+1)'}$ is independently hydrogen, hydroxy, $CH_3C(O)$-O, -OSO_3H, or -O-G.

46. A compound or salt according to claim 45, wherein n=2.

47. A compound or salt according to claim 45, wherein $R^{2'}$ = H, and $R^{3'}$ or R^4 is -O-G.

48. A compound or salt according to claim 45, wherein X-Y is CHR^9NR^{10}.

49. A compound or salt according to claim 48, wherein $R^9 = R^{10}$ = H.

50. A compound or salt according to claim 45, wherein for at least two R^n, each said R^n and its corresponding R^{n+1}, where n = 1-5, together form a double bond between the carbons to which they are attached.

51. A compound or salt according to claim 50, wherein X-Y = CHR^9NR^{10}.

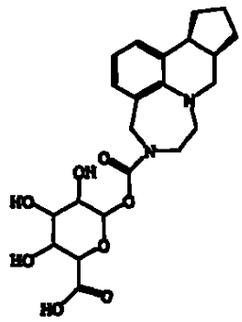
52. A compound or salt according to claim 51, wherein R^{10} is H; and Z or R^9 is –OSO_3H.

53. A compound or salt according to claim 50, wherein $R^9 = R^{10}$ = H.

54. A compound or salt of claim 45, wherein R^9 is H and R^{10} is -SO_3H.

55. A compound or salt of claim 45, wherein R^9 is H and R^{10} is acetyl.

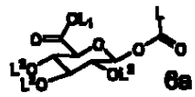
56. A method of preparing a compound of formula M6:



M6

comprising:

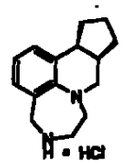
reacting Compound 6a:



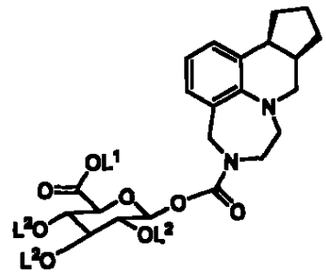
6a

where each L, L^1, and L^2 is a leaving group;

with DCDQ:



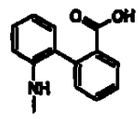
In the presence of a coupling reagent under conditions sufficient to yield compound 7:



7 ; and

removing said leaving groups L^1 and L^2.

57. The method of claim 56 wherein L has the formula:



58. The method fo claim 56 wherin L^1 and L^2 are independently selected from lower alkyl and acetyl.

59. The method of claim 56 wherein L^1 is methyl and each L^2 is acetyl.

60. The method of claim 56 further comprising:

deprotecting compound 7 by removing the L^1 and L^2 protecting groups of the glucuronyl moiety of compound 7, thereby forming the M6 metabolite.

61. The method of claim 56 wherein said coupling reagent is selected from BOP, DCC, and EDC.

62. The method of claim 56 wherein said coupling reagent is BOP.

63. The method of claim 56 wherein said reaction of compound 6 with said coupling reagent and DCDQ is carried out in the presence of an amine.

64. The method of claim 63 wherein said amine is Hünig's base.

65. The method of claim 63 wherein said reaction of compound 6 with said coupling reagent and DCDQ is performed in a solvent.

66. The method of claim 65 wherein the solvent is CH_2Cl_2.

67. The method of claim 60, wherein said compound 7 is subjected to column chromatography purification prior to deprotection.

68. The method of claim 60, wherein said deprotecting is performed in alcohol in the presence of a base.

69. The method of claim 68, wherein said base is selected from NaOH, LiOH, and KOH.

70. The method of claim 68 wherein said alcohol is a lower alkyl alcohol.

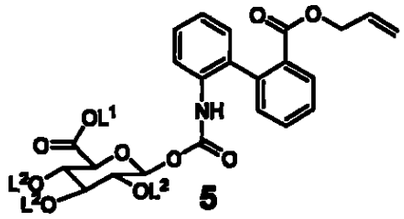
71. The method of claim 68, wherein said deprotecting is performed with $LiOH \cdot H_2O$ in $MeOH/H_2O/THF$.

72. The method of claim 71, wherein said $MeOH/H_2O/THF$ ratio is approximately 2.5:1.0:0.5.

73. The method of claim 71 wherein said deprotection is carried out at 0 °C for 1 hour.

74. The method of claim 60 further comprising purifying said M6 metabolite.

75. The method of claim 57 wherein compound 6a is prepared by removing the allyl protecting group of compound 5:



5

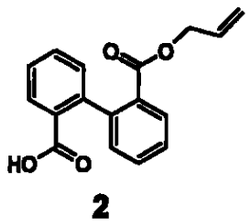
using a catalyst and a nucleophile.

76. The method of claim 75, wherein said catalyst is $Pd(PPh_3)_4$.

77. The method of claim 75, wherein said nucleophile is morpholine.

78. The method of claim 75, wherein compound 5 is prepared by:

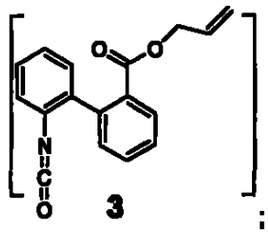
reacting carboxylic acid 2:



2

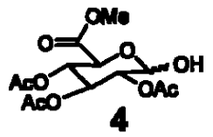
with DPPA under conditions sufficient to yield an acyl azide intermediate;

heating resultant acyl azide intermediate under conditions sufficient to yield isocyanate 3:



3 ; and

treating result of said heating step with 2,3,4,-triacetyl-1-hydroxyglucoronic ester 4:



4

under conditions sufficient to yield compound 5.

79. The method of claim 78, wherein said reacting step is carried out in the presence of a base.

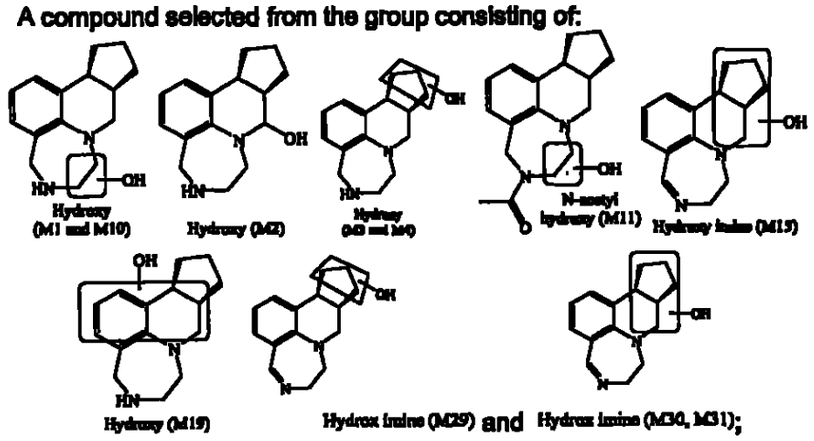
80. The method of claim 79, wherein said base is Et_3N.

81. The method of claim 78, wherein compound 2 is prepared by reacting diphenic anhydride with excess allyl alcohol in the presence of a catalyst.

82. The method of claim 81, wherein said allyl alcohol is prop-2-en-1-ol.

83. The method of claim 81 wherein said catalyst is DMAP.

84. A compound selected from the group consisting of:

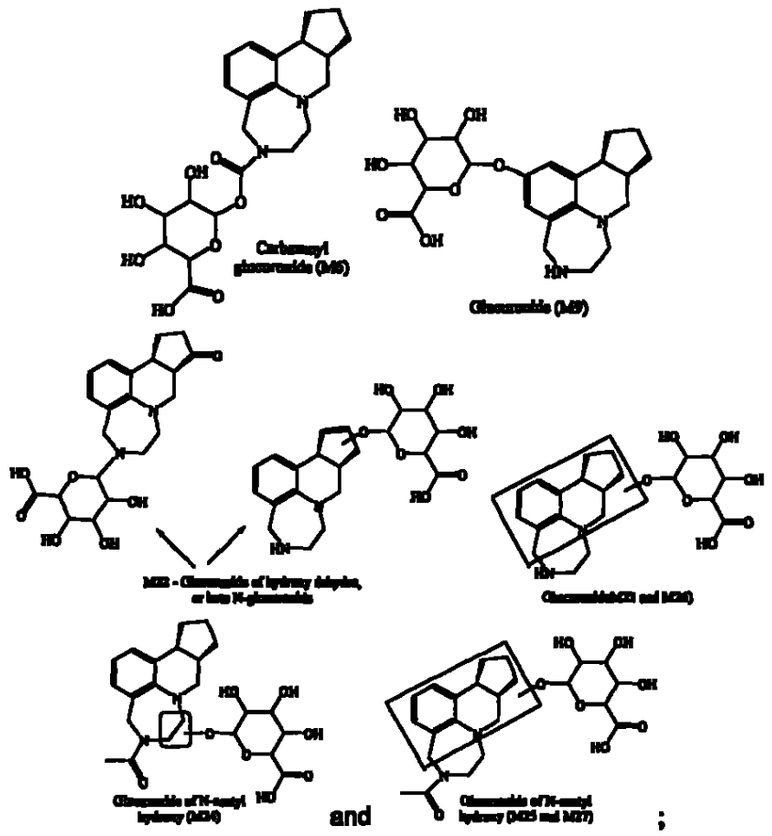


and

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

85. A pharmaceutical composition comprising a compound or salt of claim 84.

86. A compound selected from the group consisting of:

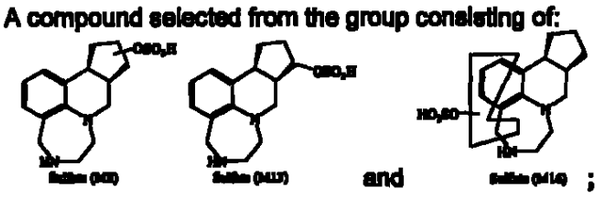


and ;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

87. A pharmaceutical composition comprising a compound or salt of claim 86.

88. A compound selected from the group consisting of:

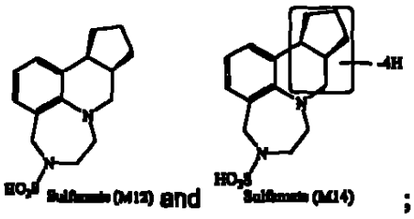


and ;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

89. A pharmaceutical composition comprising a compound or salt of claim 88.

90. A compound selected from the group consisting of:

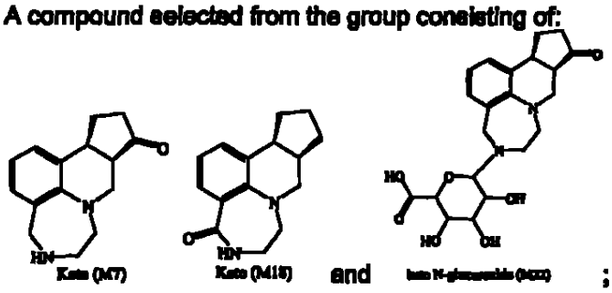


Sulfamate (M12) and Sulfamate (M14) ;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

91. A pharmaceutical composition comprising a compound or salt of claim 90.

92. A compound selected from the group consisting of:

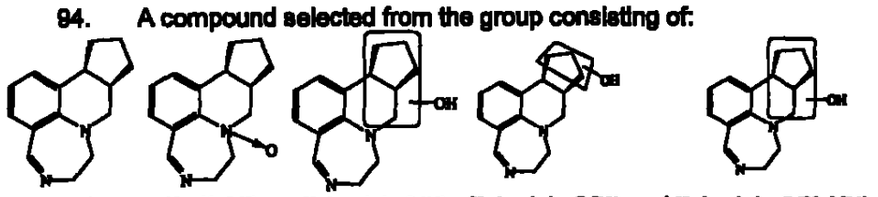


Keto (M7) Keto (M18) and ;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

93. A pharmaceutical composition comprising a compound or salt of claim 92.

94. A compound selected from the group consisting of:



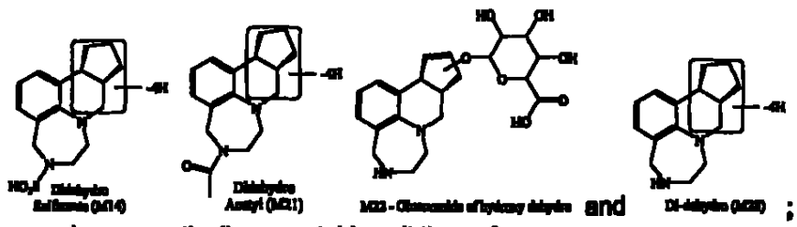
Imine (P3) N-oxide (M5) Hydroxy Imine (M15) Hydrox Imine (M29) and Hydrox Imine (M30, M31);

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

95. A pharmaceutical composition comprising a compound or salt of claim 94.

96. A compound selected from the group consisting of:

00159



and ;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

97. A pharmaceutical composition comprising a compound or salt of claim 96.

98. A composition comprising a compound or salt according to any one of claims 1 to 55, and one or more pharmaceutically acceptable carriers.

99. A method for treating a patient suffering from schizophrenia, schizophreniform disorder, schizoeffective disorder, delusional disorder, substance-induced psychotic disorder, L-DOPA-induced psychosis, psychosis associated with Alzheimer's dementia, psychosis associated with Parkinson's disease, psychosis associated with Lewy body disease, dementia, memory deficit, or intellectual deficit disorder associated with Alzheimer's disease comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of a compound or salt according to claim 1 or a composition comprising such a compound or salt.

100. The method of claim 99, wherein the patient is suffering from schizophrenia.

101. A method for treating a patient suffering from bipolar disorders, depressive disorders, mood episodes, anxiety disorders, adjustment disorders, or eating disorders comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of a compound or salt according to claim 1 or a composition comprising such a compound or salt..

102. The method of claim 101, wherein the bipolar disorder is bipolar I disorder, bipolar II disorder, or cyclothymic disorder; the depressive disorder is major depressive disorder, dysthymic disorder, or substance-induced mood disorder; the mood episode is major depressive episode, manic episode, mixed episode, or

hypomanic episode; the anxiety disorder is panic attack, agoraphobia, panic disorder, specific phobia, social phobia, obsessive compulsive disorder, posttraumatic stress disorder, acute stress disorder, generalized anxiety disorder, separation anxiety disorder, or substance-induced anxiety disorder.

103. The method of claim 102, wherein the condition is depressive disorder, bipolar disorder or mood episode.

104. A method for treating a patient suffering from epilepsy, sleep disorders, migraines, sexual dysfunction, drug addiction, alcohol addiction, gastrointestinal disorders, or obesity comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of a compound or salt according to claim 1 or a composition comprising such a compound or salt.

105. A method for treating a patient suffering from a central nervous system deficiency associated with trauma, stroke, or spinal cord injury comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of a compound or salt according to claim 1 or a composition comprising such a compound or salt.

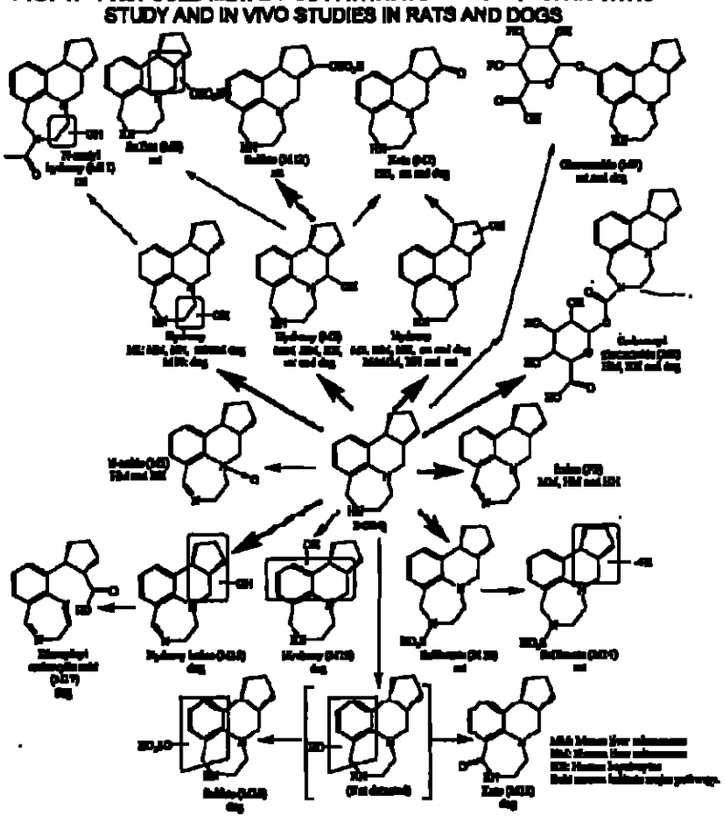
106. A compound or salt according to claim 1, wherein Z, each R^n, and each $R^{n'}$ is H; and X-Y is CR^9HNR^{10}.

107. A compound or salt according to claim 106, wherein R^9 is H.

108. A compound or salt according to claim 106, wherein R^9 is H and R^{10} is –C(O)-OG.

109. A composition comprising a compound according to any one of claims 106 to 108, and one or more pharmaceutically acceptable carriers.

FIG. 1: PROPOSED METABOLIC PATHWAYS OF DCDQ FOR IN VITRO STUDY AND IN VIVO STUDIES IN RATS AND DOGS



formula I

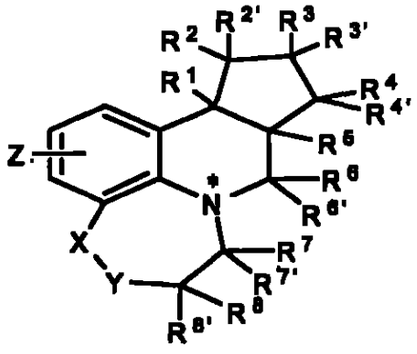


FIG. 2: PROPOSED METABOLIC PATHWAYS OF DCDQ IN RAT BILIARY EXCRETION STUDY

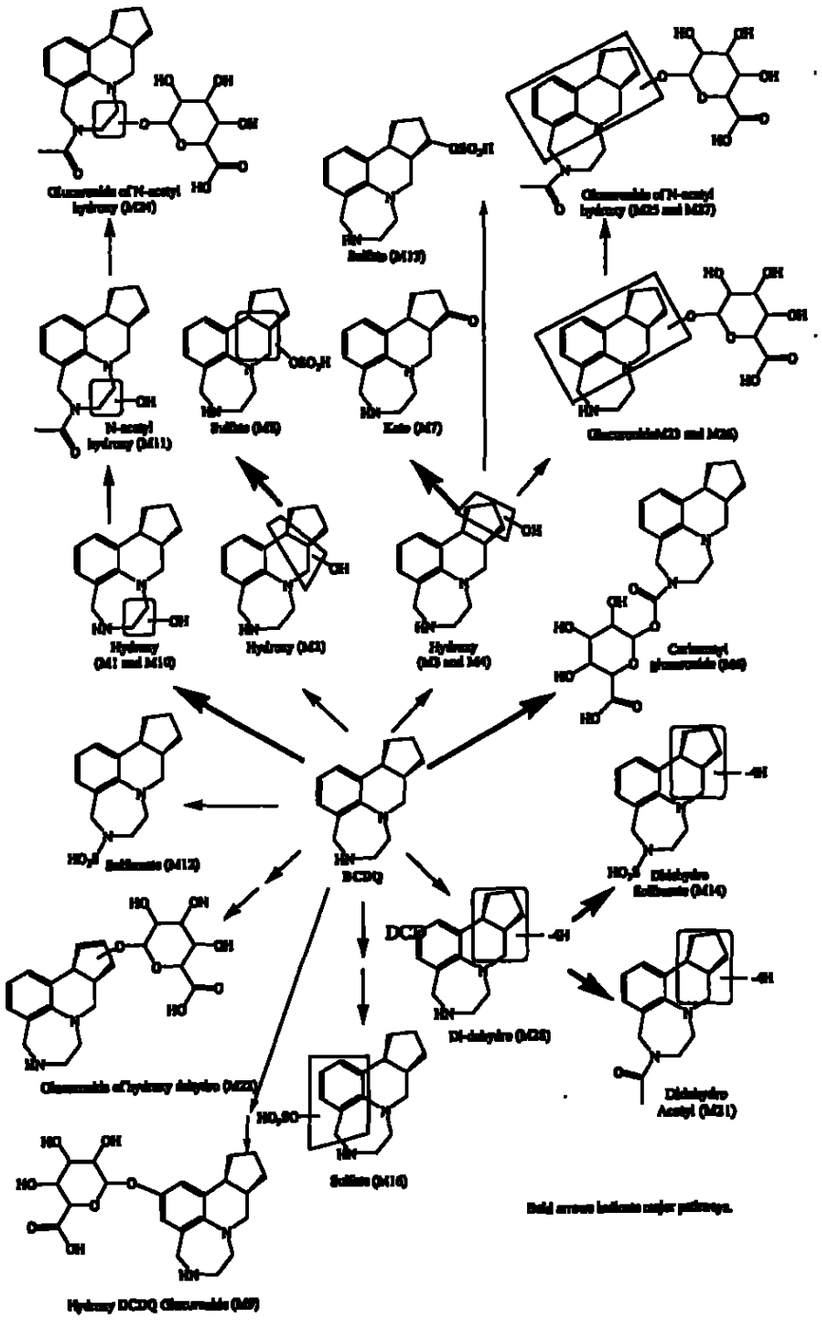
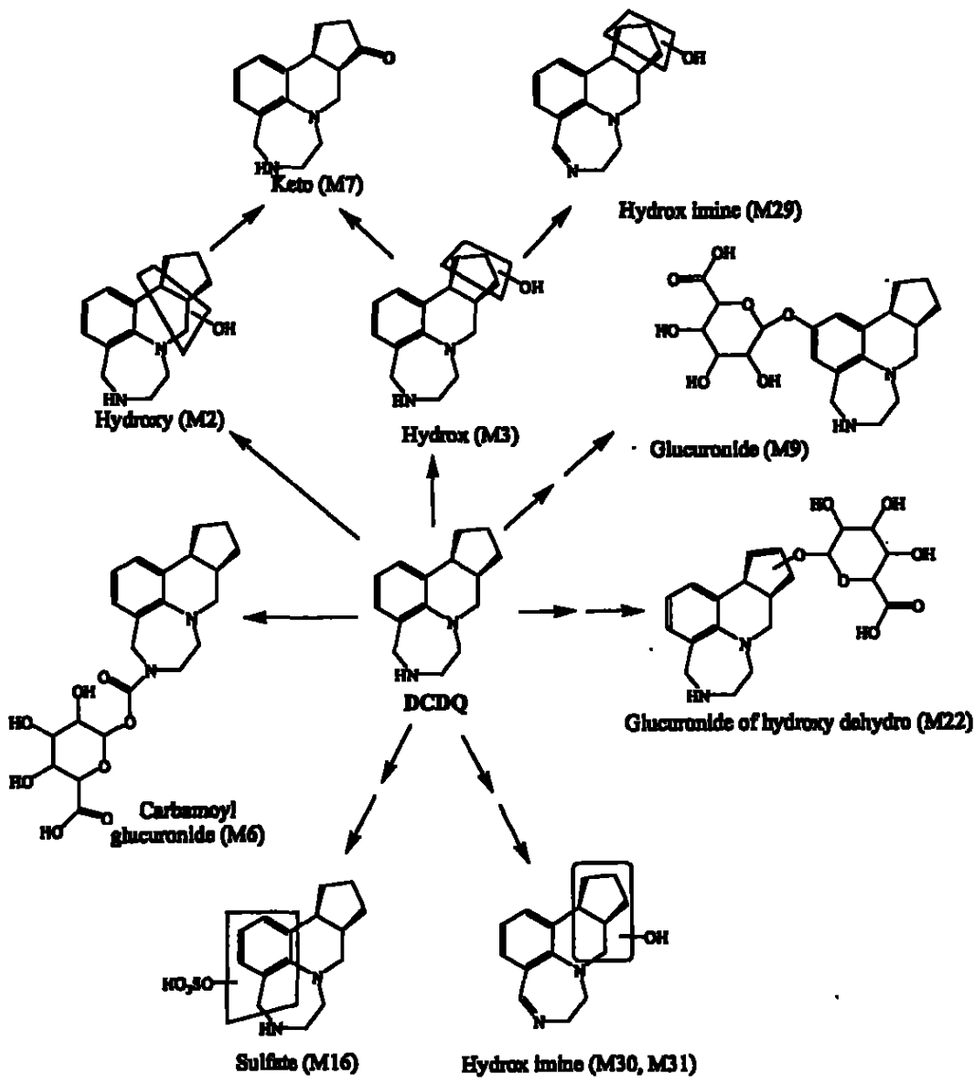


FIG. 3: PROPOSED METABOLIC PATHWAYS OF DCDQ IN MICE



5

FIG 4: METABOLITES DETECTED IN HUMAN PLASMA

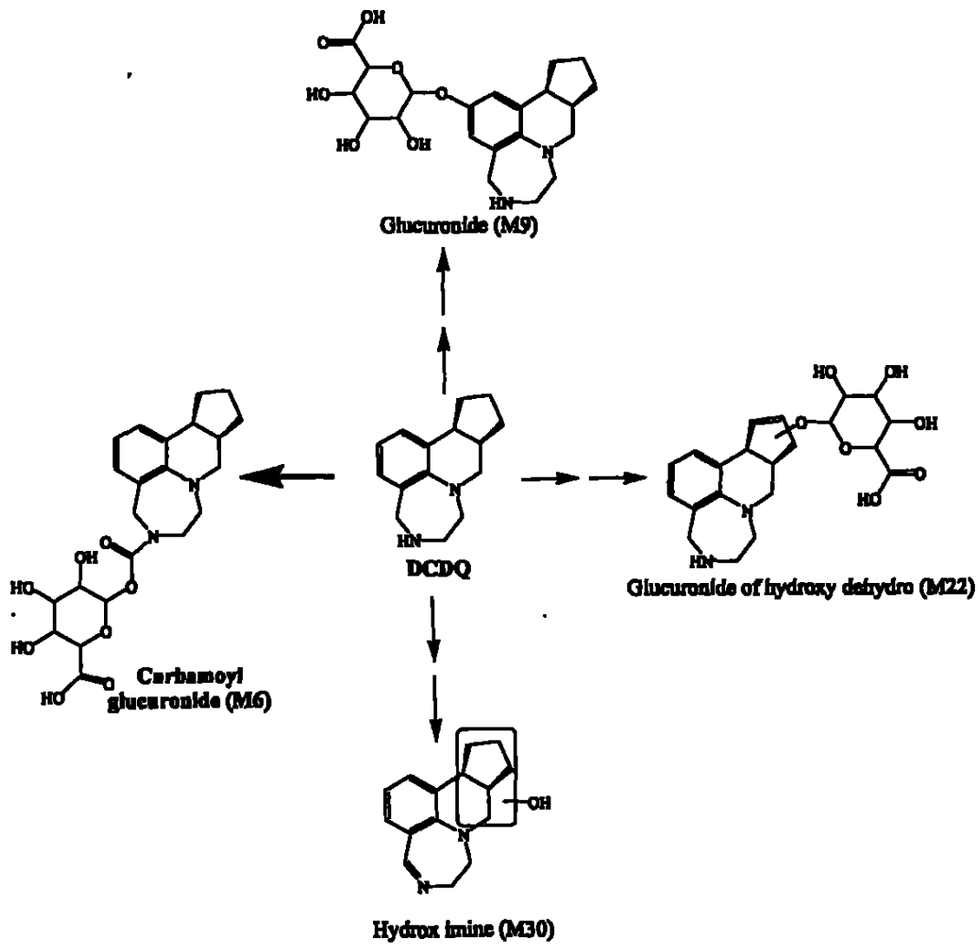
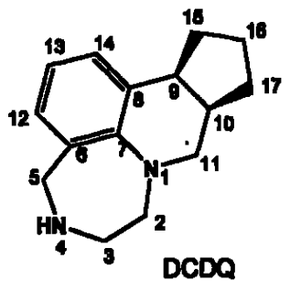
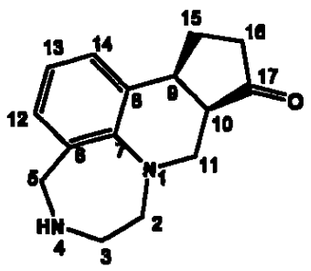


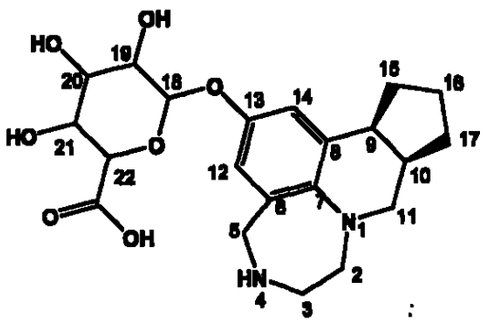
FIG. 5: Structures and NMR numbering schemes for DCDQ, M7, M9 and M13



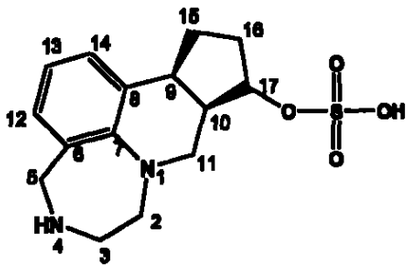
DCDQ



M7 (Keto DCDQ)



M9
(Hydroxy DCDQ glucuronide)



M13
(Hydroxy DCDQ sulfate)

METABOLITOS DE CIERTOS DERIVADOS DE [1,4]DIAZEPINO[6,7,1-IJ]QUINOLINA Y METODOS DE PREPARACION Y USO DE LOS MISMOS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con metabolitos de ciertos derivados de [1,4]diazepino[6,7,1-ij]quinolina, que son útiles como agentes antisicóticos y antiobesidad, con los procedimientos para su preparación, con composiciones farmacéuticas que los contienen y con los métodos de uso de los mismos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La esquizofrenia afecta a aproximadamente 5 millones de personas. En la actualidad, los tratamientos más ampliamente extendidos para la esquizofrenia son los antisicóticos "atípicos", que combinan el antagonismo del receptor de dopamina (D2) con el antagonismo del receptor de la serotonina (5-HT_{2A}). A pesar de los avances reportados en la eficacia y los riesgos de los efectos laterales de los antisicóticos atípicos con respecto a los antisicóticos típicos, estos compuestos no tratan de manera adecuada todos los síntomas de la esquizofrenia y están acompañados por efectos laterales problemáticos, que incluyen la ganancia de peso (Allison, D. B., et. al., Am. J. Psychiatry, 156: 1686-1696, 1999; Masand, P. S., Exp. Opin.

Pharmacother. I: 377-389, 2000; Whitaker, R., Spectrum Life Sciences. Decision Resources. 2:1-9, 2000). Los antisicóticos novedosos que son efectivos para tratar los trastornos del ánimo o las disminuciones cognoscitivas en la esquizofrenia sin producir ganancia de peso, representarían un avance significativo en el tratamiento de la esquizofrenia.

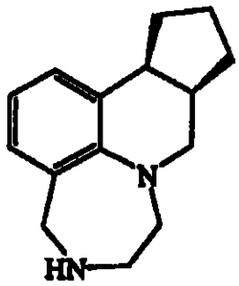
Los agonistas y agonistas parciales de 5-HT_{2C} representan un procedimiento terapéutico novedoso hacia el tratamiento de la esquizofrenia. Varias líneas de evidencia apoyan un papel del antagonismo del receptor de 5-HT_{2C} como un tratamiento para la esquizofrenia. Los estudios con antagonistas de 5-HT_{2C}, sugieren que estos compuestos incrementan los niveles sinápticos de dopamina y pueden ser efectivos en modelos animales de la enfermedad de Parkinson (Di Matteo, V., et. al., Neuropharmacology 37: 265-272, 1998; Fox, S. H., et. al., Experimental Neurology 151: 35-49, 1998). Puesto que los síntomas positivos de la esquizofrenia están asociados con niveles incrementados de dopamina, los compuestos con acciones opuestas a aquéllas de los antagonistas de 5-HT_{2C}, tales como los agonistas y los agonistas parciales de 5-HT_{2C} deberían reducir los niveles de dopamina sináptica. Los estudios recientes han demostrado que los agonistas de 5-HT_{2C} disminuyen los niveles de dopamina en la corteza prefrontal y en el núcleo accumbens (Millan, M. J., et. al., Neuropharmacology 37: 953-955, 1998; Di Matteo, V., et. al., Neuropharmacology 38: 1195-1205, 1999; Di Giovanni, G., et. al., Synapse 35: 53- 61, 2000), las regiones del cerebro que se piensa median los efectos antisicóticos críticos de los fármacos como la

clozapina. En contraste, los agonistas de 5-HT_{2C} no disminuyen los niveles de dopamina en el estriato, la región del cerebro más estrechamente asociada con los efectos laterales extrapiramidales. Además, un estudio reciente demuestra que los agonistas de 5-HT_{2C} disminuyen la activación en el área tegmental ventral (VTA), pero no en la sustancia negra. Los efectos diferenciales de los agonistas de 5-HT_{2C} en la trayectoria mesolímbica con relación a la trayectoria negroestriatal, sugiere que los agonistas de 5-HT_{2C} tendrán una selectividad límbica y será menos probable que produzcan efectos laterales extrapiramidales asociados con los antisicóticos típicos.

Los antisicóticos atípicos se unen con alta afinidad a los receptores de 5-HT_{2C} y funcionan como antagonistas o agonistas inversos del receptor de 5-HT_{2C}. La ganancia de peso es un efecto lateral problemático asociado con los antisicóticos atípicos, tales como la clozapina y la olanzapina, y se ha sugerido que el antagonista de 5-HT_{2C} es responsable de la ganancia de peso incrementada. De manera inversa, se sabe que la estimulación del receptor de 5-HT_{2C} resulta en una ingesta de comida y peso corporal disminuidos (Walsh et. al., Psychopharmacology 124: 57-73, 1996; Cowen, P. J., et. al., Human Psychopharmacology 10: 385-391, 1995; Rosenzweig-Lipson, S., et. al., ASPET abstract, 2000). Como resultado, será menos probable que los agonistas y agonistas parciales de 5-HT_{2C} produzcan los incrementos de peso corporal asociados con los antisicóticos atípicos actuales. En realidad, los agonistas y agonistas parciales de 5-HT_{2C} son de gran interés para el tratamiento de la obesidad, un trastorno médico

caracterizado por un exceso de grasa corporal o tejido adiposo y asociado con comorbilidades tales como diabetes del Tipo II, enfermedad cardiovascular, hipertensión, hiperlipidemia, apoplejía, osteoartritis, apnea del sueño, enfermedad de la vesícula biliar, gota, algunos cánceres, alguna infertilidad y mortalidad temprana.

El compuesto (9aR,12aS)-4,5,6,7,9,9a,10,11,12,12a-decahidro-ciclopenta[c][1,4]diacepin[6,7,1-ij]quinolina (de aquí en adelante DCDQ):



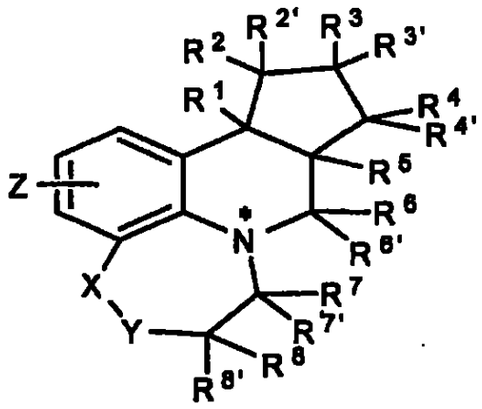
DCDQ

es un potente agonista de 5-HT_{2C}. Véanse las solicitudes publicadas relacionadas WO03/091250 y US2004/0009970, cada una de las cuales se incorpora como referencia en la presente en su totalidad. La DCDQ también puede ser efectiva para tratar los trastornos del ánimo o las disminuciones cognoscitivas asociadas con la esquizofrenia. La DCDQ se convierte, en varios modelos in vitro e in vivo, en varios metabolitos. Puede observarse que estos metabolitos son de interés para tratar aquellas enfermedades, trastornos o condiciones tratables mediante la DCDQ misma, como tal o como un profármaco que se convierte a DCDQ. Estos metabolitos también pueden ser

útiles para estudiar además los efectos de la DCDQ. Esta invención está dirigida a estos fines, así como a otros fines importantes.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

Algunas modalidades de la invención incluyen compuestos de fórmula I



I

en donde:

para cada R^n y $R^{n'}$, en donde n es 1 hasta 8:

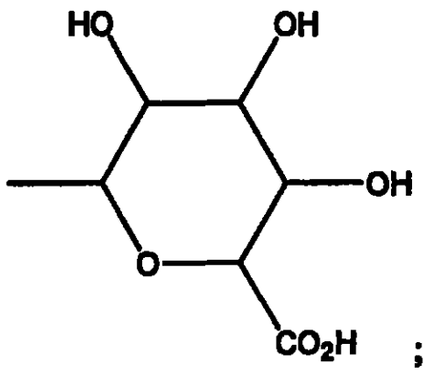
cada R^n y $R^{n'}$ es de manera independiente hidrógeno, hidroxi, $CH_3C(O)$-O-, $-OSO_3H$ u -O-G; o

R^n y $R^{n'}$ correspondiente, en donde n es 2, 3, 4, 6, 7 u 8, tomadas junto con el carbono al cual están unidas, forman C=O; o

R^n junto con R^{n+1} correspondiente, en donde n es 1, 2, 3, 4, 5 ó 7, tomadas juntas forman un enlace doble entre los carbonos a los cuales

están unidos, y cada $R^{n'}$ y $R^{(n+1)'}$ correspondiente, es de manera independiente hidrógeno, hidroxi, $CH_3C(O)$-O, $-OSO_3H$ u -O-G;

G tiene la fórmula:



;

en donde el nitrógeno denotado con el símbolo *, puede formar opcionalmente un N óxido;

X-Y es CH=N, CH=N(O), $CH_2N(O)$, C(O)NH o CR^9HNR^{10};

R^9 es hidrógeno, hidroxilo o $-OSO_3H$;

R^{10} es hidrógeno, acetilo, $-SO_3H$, -G o -C(O)-OG;

Z es hidrógeno, hidroxi, $-OSO_3H$ u -O-G;

con la condición de que cuando Z es hidroxi, entonces (a) uno de R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9 y R^{10} no es hidrógeno; o (b) X-Y no es CR^9HNR^{10}; y

con la condición adicional de que cuando X-Y es CHR^9NR^{10}, entonces al menos uno de Z, R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9 y R^{10} no es H.

En algunas modalidades, la invención proporciona compuestos de acuerdo con la Fórmula I, en donde al menos uno de Z y R^1 hasta R^8 es -OH.

En algunas modalidades, la invención proporciona compuestos de acuerdo con la Fórmula I en donde al menos uno de R^1 hasta R^6, R^9, R^{10} y Z es -C(O)-O-G, -O-G o -G.

En algunas modalidades, la invención proporciona compuestos de acuerdo con la Fórmula I, en donde al menos uno de R^1 hasta R^9, y Z es $-OSO_3H$.

En algunas modalidades, la invención proporciona compuestos de acuerdo con la Fórmula I, en donde X-Y es CR^9HNR^{10}, en donde R^9 es H y R^{10} es $-SO_3H$.

En algunas modalidades, la invención proporciona compuestos de acuerdo con la Fórmula I, en donde R^n y $R^{n'}$ correspondiente, tomadas junto con el carbono al cual están unidas, forman C=O.

En algunas modalidades, la invención proporciona compuestos de acuerdo con la Fórmula I, en donde X-Y es C(O)NH.

En algunas modalidades, la invención proporciona compuestos de acuerdo con la Fórmula I, en donde X-Y es CH=N.

En algunas modalidades, la invención proporciona compuestos de acuerdo con la Fórmula I, en donde al menos uno de R^n y R^{n+1} correspondiente, en donde n = 1-5, forman juntas un enlace doble entre los

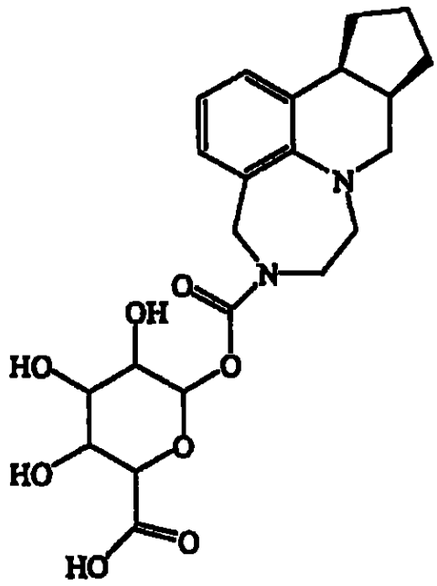
carbonos a los cuales están unidas, y cada $R^{n'}$ y $R^{(n+1)'}$ es de manera independiente hidrógeno, hidroxi, $CH_3C(O)$-O, -OSO_3H u -O-G.

En algunas modalidades, la invención proporciona formas aisladas o sustancialmente puras de los compuestos de Fórmula I, que tienen al menos 75% de pureza. En otras modalidades, la invención proporciona compuesto de Fórmula I, que tienen al menos 80% de pureza. En otras modalidades, la invención proporciona compuestos de Fórmula I, que tienen al menos 85% de pureza. En otras modalidades, la invención proporciona compuestos de Fórmula I, que tienen al menos 90% de pureza. En otras modalidades, la invención proporciona compuestos de Fórmula I, que tienen al menos 95% de pureza.

En algunas modalidades, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen los compuestos de fórmula I.

En algunas modalidades, la invención proporciona métodos para tratar condiciones, enfermedades o trastornos asociados con $5HT_{2C}$, administrando los compuestos de Fórmula I o composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de Fórmula I a un paciente en necesidad del mismo.

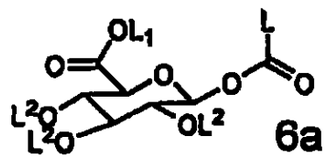
En algunas modalidades, la invención proporciona un método para preparar un compuesto de fórmula M6:



M6

que comprende:

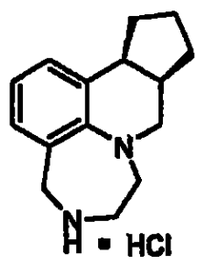
hacer reaccionar el Compuesto 6a:



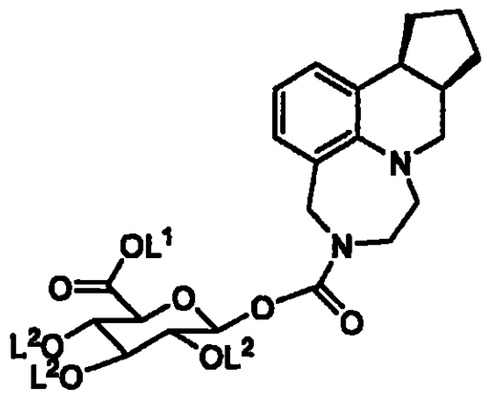
6a

en donde cada L, L^1 y L^2 es un grupo saliente;

con DCDQ:

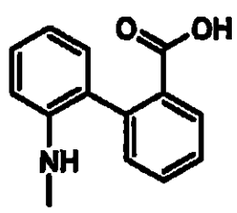


en la presencia de un reactivo de acoplamiento, bajo condiciones suficientes para proporcionar el compuesto 7:



y eliminar los grupos salientes L^1 y L^2 para formar el compuesto M6.

En algunas modalidades, la invención proporciona métodos en donde L tiene la fórmula:



En algunas modalidades, la invención proporciona métodos en donde L^1 y L^2 se selecciona de manera independiente de alquilo inferior y acetilo, tal como cuando L^1 es metilo y cada L^2 es acetilo.

Los reactivos de acoplamiento preferidos son hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfonio (BOP),

N,N'-Diciclohexilcarbodiimida (DCC) y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC).

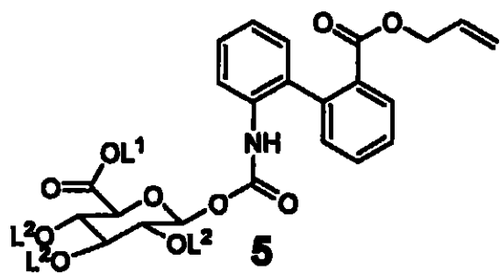
En algunas modalidades, la invención proporciona un método que comprende además desproteger el compuesto 7 eliminando los grupos protectores L^1 y L^2 de la porción glucuronilo del compuesto 7, formando por lo tanto el metabolito M6. En algunas modalidades, el paso de desprotección se realiza en alcohol, de manera preferida, un alcohol alquílico inferior, en la presencia de una base, de manera preferida NaOH, LiOH o KOH. En algunas modalidades preferidas, se utiliza $LiOH \bullet H_2O$ en $MeOH/H_2O/THF$ en una relación preferida de aproximadamente 2.5:1.0:0.5. En algunas modalidades, la reacción de desprotección se lleva a cabo a 0°C durante 1 hora.

En algunas modalidades, la reacción del compuesto 6 con el reactivo de acoplamiento y DCDQ se lleva a cabo en la presencia de una amina, de manera preferida una base de Hünig. Esta reacción se realiza de manera preferida en un solvente, tal como CH_2Cl_2.

En algunas modalidades, el compuesto 7 se somete a purificación en cromatografía en columna antes de la desprotección.

En algunas modalidades, la invención proporciona además la purificación del metabolito M6.

En algunas modalidades, la invención proporciona métodos en donde el compuesto 6a se prepara eliminando el grupo protector alilo del compuesto 5:

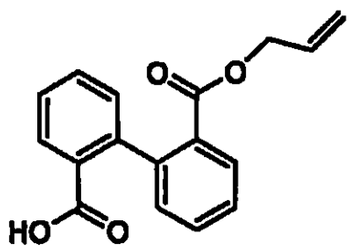


5

utilizando un catalizador y un nucleófilo, de manera preferida morfolina. En algunas modalidades, el catalizador es $Pd(PPh_3)_4$.

En algunas modalidades, la invención proporciona métodos en donde el compuesto 5 se prepara haciendo reaccionar el ácido carboxílico 2:

10

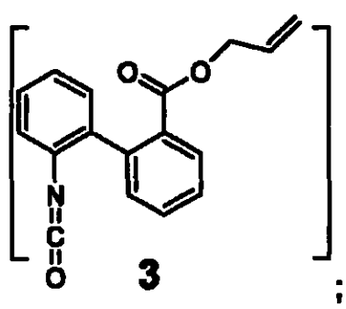


2

15 con DPPA bajo condiciones suficientes para proporcionar un intermediario de acil azida;

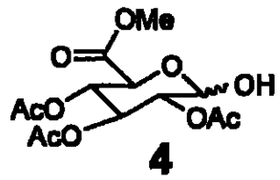
calentar el intermediario de acil azida resultante bajo condiciones suficientes para proporcionar el isocianato 3:

20



;

tratar el resultado del paso de calentamiento con el éster 2,3,4,-triacetil-1-hidroxiglucurónico 4:



4

bajo condiciones suficientes para proporcionar el compuesto 5. En algunas modalidades, el paso de la reacción se lleva a cabo en la presencia de una base, de manera preferida Et_3N.

En algunas modalidades, la invención proporciona métodos en donde compuesto 2 se prepara haciendo reaccionar el anhídrido difénico con alcohol alílico en exceso, de manera preferida prop-2-en-1-ol, en la presencia de un catalizador, de manera preferida DMAP.

Estas y otras modalidades de la invención serán evidentes para aquellos con experiencia en la técnica tras la lectura de esta descripción.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un diagrama de flujo de las trayectorias metabólicas propuestas de la DCDQ identificadas en los estudios in vitro e in vivo.

La Figura 2 es un diagrama de flujo adicional de las trayectorias metabólicas propuestas de la DCDQ identificadas en los estudios de excreción biliar en ratas.

La Figura 3 es un diagrama de flujo adicional de las trayectorias metabólicas propuestas de la DCDQ identificadas en ratones.

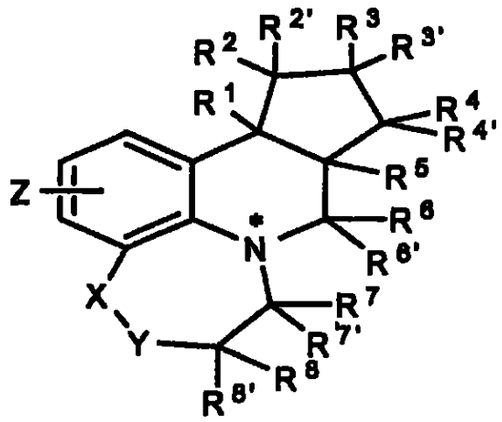
La Figura 4 es un diagrama de flujo adicional de las trayectorias metabólicas propuestas de la DCDQ identificadas en plasma humano.

La Figura 5 describe las estructuras y los esquemas de numeración de la RMN para DCDQ, M7, M9 y M13, como se identificaron en los estudios de excreción biliar en ratas.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

En algunos aspectos, esta invención se relaciona con los metabolitos de DCDQ, métodos para prepararlos y métodos para utilizarlos para tratar varios trastornos.

En algunos aspectos, la presente invención proporciona compuestos de fórmula (I)



I

en donde:

para cada R^n y $R^{n'}$, en donde n es 1 hasta 8:

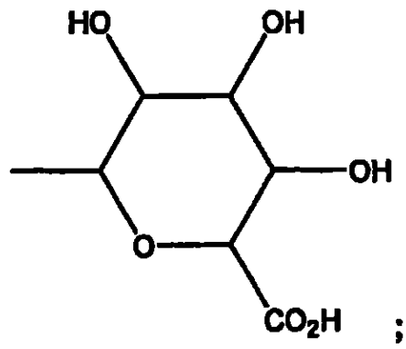
cada R^n y $R^{n'}$ es de manera independiente hidrógeno, hidroxi, $CH_3C(O)$-O-, $-OSO_3H$ u -O-G; o

R^n y $R^{n'}$ correspondiente, en donde n es 2, 3, 4, 6, 7 u 8, tomadas junto con el carbono al cual están unidas, forman C=O; o

R^n junto con R^{n+1} correspondiente, en donde n es 1, 2, 3, 4, 5 ó 7, tomadas juntas forman un enlace doble entre los carbonos a los cuales están unidos, y cada $R^{n'}$ y $R^{(n+1)'}$ correspondiente, es de manera independiente hidrógeno, hidroxi, $CH_3C(O)$-O, $-OSO_3H$ u -O-G;

en donde el nitrógeno denotado con el símbolo * puede formar opcionalmente un N óxido;

G tiene la fórmula:



;

X-Y es CH=N, CH=N(O), $CH_2N(O)$, C(O)NH o CR^9HNR^{10};

R^9 es hidrógeno, hidroxilo o $-OSO_3H$; y

R^{10} es hidrógeno, acetilo, $-SO_3H$, -G o -C(O)-OG;

Z es hidrógeno, hidroxi, $-OSO_3H$ u -O-G; con la condición de que cuando Z es hidroxi, entonces (a) uno de R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9 y R^{10} no es hidrógeno; o (b) X-Y no es CR^9HNR^{10};

con la condición adicional de que cuando X-Y es CHR^9NR^{10}, entonces al menos uno de Z, R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9 y R^{10} no es H.

Los métodos para la preparación de la DCDQ (es decir, el compuesto de Fórmula I, en donde X-Y es CHR^9NR^{10} y cada uno de Z, y R^1 hasta R^{10} es H), se describe en la Publicación de la Solicitud de Patente de E.U.A. No. US2004/0009970, incorporada en la presente como referencia en su totalidad. La DCDQ misma no pretende estar dentro de los compuestos de Fórmula I descritos en la presente.

En algunas modalidades, la invención proporciona compuestos de hidroxi de fórmula I. De manera preferida, al menos uno de Z y R^1 hasta R^8 es hidroxi.

En algunas modalidades, la invención proporciona además compuestos de hidroxi de fórmula I, en donde X-Y es CR^9HNR^{10}. Algunos ejemplos de tales compuestos de hidroxi incluyen aquéllos en donde:

R^9 y R^{10} son cada uno H;

al menos uno de R^7 y R^8 es -OH;

R^8 es -OH;

al menos uno de R^3 y R^4 es -OH; o

al menos uno de R^1, R^5, R^6, R^7 y Z es -OH.

En otras modalidades, la invención proporciona compuestos de hidroxi de fórmula I, en donde X-Y es CR^9HNR^{10} y R^{10} es acetilo. Algunos ejemplos preferidos de tales compuestos de hidroxilo incluyen aquéllos en donde:

al menos uno de R^7 y R^8 es -OH.

En otras modalidades, la invención proporciona compuestos de hidroxi de fórmula I, en donde X-Y es C=N. En algunas modalidades preferidas, al menos uno de R^1 hasta R^6 es -OH. En otras modalidades preferidas, al menos uno de R^2 hasta R^4 es -OH.

En otras modalidades, la invención proporciona compuestos de glucuronilo de acuerdo con la fórmula I, en donde al menos uno de R^1 hasta R^6, R^9, R^{10}, y Z es -C(O)-O-G, -O-G o -G.

En algunas modalidades preferidas, la invención proporciona compuestos de glucuronilo, en donde X-Y es CR^9HNR^{10}. En algunas modalidades preferidas, R^9 y R^{10} son H. En otras modalidades preferidas, al menos uno de Z, R^3 y R^4 es -O-G. En otras modalidades preferidas, al menos uno de R^1 hasta R^6, R^9, y Z es -O-G.

En modalidades aún adicionales, la invención proporciona compuestos de glucuronilo de fórmula I, en donde R^2 junto con R^3 tomadas juntas, forman un enlace doble entre los carbonos a los cuales están unidas, y al menos uno de $R^{3'}$ y R^4 es -O-G.

En otras modalidades, la invención proporciona compuestos de glucuronilo de fórmula I, en donde R^{10} es -C(O)O-G o -G. En algunas

modalidades, tales compuestos se proporcionan además, en donde R^4 y $R^{4'}$ junto con el carbono al cual están unidas, forman C=O.

En algunas modalidades, la invención proporciona compuestos de glucuronilo, en donde X-Y es $-CHR^9NR^{10}$, en donde R^{10} es -C(O)-O-G.

En algunas modalidades preferidas, la invención proporciona compuestos de fórmula I, en donde Z, cada R^n y $R^{n'}$ es H, X-Y es $-CHR^9NR^{10}$. En algunas de tales modalidades, R^9 es H. En las modalidades preferidas, R^9 es H y R^{10} es -C(O)-O-G.

En otras modalidades, la invención proporciona compuestos de glucuronilo de fórmula I, en donde R^{10} es acetilo. En una modalidad preferida, tales derivados se proporcionan además, en donde al menos uno de R^1 hasta R^6, R^9, y Z es -O-G. En aún otras modalidades, al menos uno de R^7 y R^8 es -O-G.

En algunas modalidades, la invención proporciona compuestos de sulfato de acuerdo con la fórmula I, en donde al menos uno de R^1 hasta R^9, y Z es $-OSO_3H$.

En algunas modalidades preferidas, la invención proporciona tales compuestos de sulfato, en donde X-Y es $-CHR^9NR^{10}$. En algunas de tales modalidades, R^9 y R^{10} son cada uno H. En algunas de tales modalidades, al menos uno de R^1 hasta R^6 es $-OSO_3H$. En modalidades adicionales, al menos uno de R^2 y R^3 es $-OSO_3H$. En algunas modalidades, R^3 es $-OSO_3H$.

En algunas modalidades, la invención proporciona compuestos de sulfato de fórmula I, en donde al menos uno de R^9 y Z es $-OSO_3H$.

En algunas modalidades, la invención proporciona compuestos de sulfamato de acuerdo con la fórmula I. En algunas modalidades, la invención proporciona tales compuestos de sulfamato, en donde X-Y es CR^9HNR^{10}, y R^{10} es $-SO_3H$. En otras modalidades, la invención proporciona tales compuestos de sulfamato, en donde al menos dos de R^n y su R^{n+1} correspondiente, en donde n = 1-5, forman un enlace doble entre los carbonos a los cuales están unidas.

En algunas modalidades, la invención proporciona compuestos ceto de acuerdo con la fórmula I, en donde R^n y su $R^{n'}$ correspondiente, tomadas junto con el carbono al cual están unidas, forman C=O. En algunas modalidades preferidas, n = 4. En las modalidades preferidas adicionales, X-Y es CR^9HNR^{10} y de manera preferida R^{10} es -G. En otras modalidades, R^9 y R^{10} son H.

Otras modalidades de los compuestos ceto de acuerdo con la fórmula I, proporciona compuestos en donde X-Y es C(O)NH.

En algunas modalidades, la invención proporciona compuestos de imina de acuerdo con la fórmula I. En algunas modalidades, X-Y es CH=N. En algunas de tales modalidades, al menos uno de R^1 hasta R^6 es -OH. En otras de tales modalidades, al menos uno de R^2 hasta R^4 es -OH. En aún otras de tales modalidades, el compuesto puede ser un N óxido, en donde el

nitrógeno entre los carbonos a los cuales R^6 y R^7 están unidos, forman un N óxido.

En modalidades aún adicionales, la invención proporciona compuestos deshidro de fórmula I, que contienen uno o más dobles enlaces. En estas modalidades, tales compuestos se proporcionan en donde al menos uno de R^n y su R^{n+1} correspondiente, en donde n = 1-5, juntas forman un enlace doble entre los carbonos a los cuales están unidas y cada $R^{n'}$ y $R^{(n+1)'}$ es de manera independiente hidrógeno, hidroxi, $CH_3C(O)$-O, -OSO_3H u -O-G. En algunas modalidades preferidas, n = 2. En las modalidades preferidas adicionales, n = 2, $R^{2'}$ = H, y $R^{3'}$ o R^4 es -O-G. En modalidades aún adicionales, X-Y es CHR^9NR^{10}, en donde R^9 y R^{10} son de manera preferida H.

En otras modalidades, se proporcionan los compuestos dideshidro de fórmula I, en donde para al menos dos R^n, cada R^n y su R^{n+1} correspondiente, en donde n = 1-5, forman juntas un enlace doble entre los carbonos a los cuales están unidas. En algunas modalidades preferidas, la invención proporciona además que X-Y = CHR^9NR^{10}. En modalidades adicionales, R^{10} es H; y Z o R^9 es -OSO_3H. En aún otras modalidades, X-Y = CHR^9NR^{10} y $R^9 = R^{10} = H$.

En algunas modalidades, la invención proporciona tales compuestos dideshidro de fórmula I, en donde R^{10} es -SO_3H, o acetilo.

En algunos aspectos de la invención, los compuestos de fórmula I se proporcionan en forma aislada.

En otros aspectos de la invención, los compuestos de fórmula I se proporcionan en forma sustancialmente pura de al menos 75% de pureza. En otros aspectos, los compuestos son al menos 80% puros. En otros aspectos, los compuestos son al menos 85% puros. En otros aspectos, los compuestos son al menos 90% puros. En otros aspectos, los compuestos son al menos 95% puros.

Acetilo, como se utiliza en la presente, se refiere a CH_3-C(=O)-.

Alquilo, como se utiliza en la presente, se refiere a una cadena de hidrocarbono alifática, por ejemplo, de 1 a 6 átomos de carbono, e incluye, de manera no exclusiva, cadenas lineales y ramificadas tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, t-butilo, n-pentilo, isopentilo, neo-pentilo, n-hexilo e isohexilo. Alquilo inferior se refiere a un alquilo que tiene de 1 a 3 átomos de carbono.

BOP se refiere a hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfonio.

Carbamoilo, como se utiliza en la presente, se refiere al grupo -C(=O)N<.

DCC se refiere a N,N'-Diciclohexilcarbodiimida.

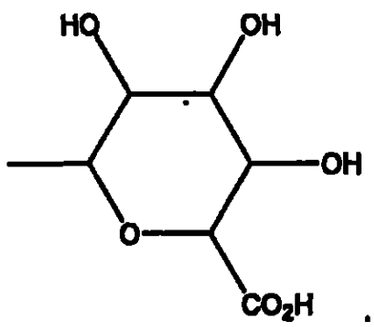
DIBAH y DIBAL se refieren, de manera indistinta, a hidruro de diisobutilaluminio.

DMAP se refiere a 4-dimetilaminopiridina.

DPPA se refiere a difenilfosforil azida.

EDC se refiere al clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida.

Glucuronilo, como se utiliza en la presente, se refiere al grupo:



Halógeno (o halo) como se utiliza en la presente, se refiere a cloro, bromo, flúor y yodo. La base de Hünig es N,N-diisopropiletilamina, también indicada en la presente como i-Pr_2NEt.

PyBOP se refiere al hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio.

Los compuestos de esta invención contienen átomos de carbono asimétricos y por lo tanto dan lugar a isómeros y diastereoisómeros ópticos. La presente invención incluye tales isómeros y diastereoisómeros ópticos; así como los estereoisómeros R y S racémicos y resueltos, enantioméricamente puros; así como otras mezclas de los estereoisómeros R y S y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En donde se prefiere un enantiómero, puede, en algunas modalidades, proporcionarse sustancialmente libre del enantiómero correspondiente. Así, un enantiómero sustancialmente libre del enantiómero

correspondiente se refiere a un compuesto que está aislado o separado vía técnicas de separación o preparado libre del enantiómero correspondiente. "Sustancialmente libre", como se utiliza en la presente, significa que el compuesto está constituido de una proporción significativamente mayor de enantiómero. En las modalidades preferidas, el compuesto está constituido de al menos aproximadamente 90% en peso de un enantiómero preferido. En otras modalidades de la invención, el compuesto está constituido de al menos aproximadamente 99% en peso de un enantiómero preferido. Los enantiómeros preferidos pueden aislarse de mezclas racémicas mediante cualquier método conocido por aquellos con experiencia en la técnica, incluyendo cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), y la formación y cristalización de sales quirales, o prepararse mediante los métodos descritos en la presente. Véanse, por ejemplo, Jacques, et al., Enantiomers, Racemates y Resolutions (Wiley Interscience, New York, 1981); Wilen, S.H., et al., Tetrahedron 33:2725 (1977); Eliel, E.L. Stereochemistry of Carbon Compounds (McGraw-Hill, NY, 1962); Wilen, S. H. Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions p. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN 1972).

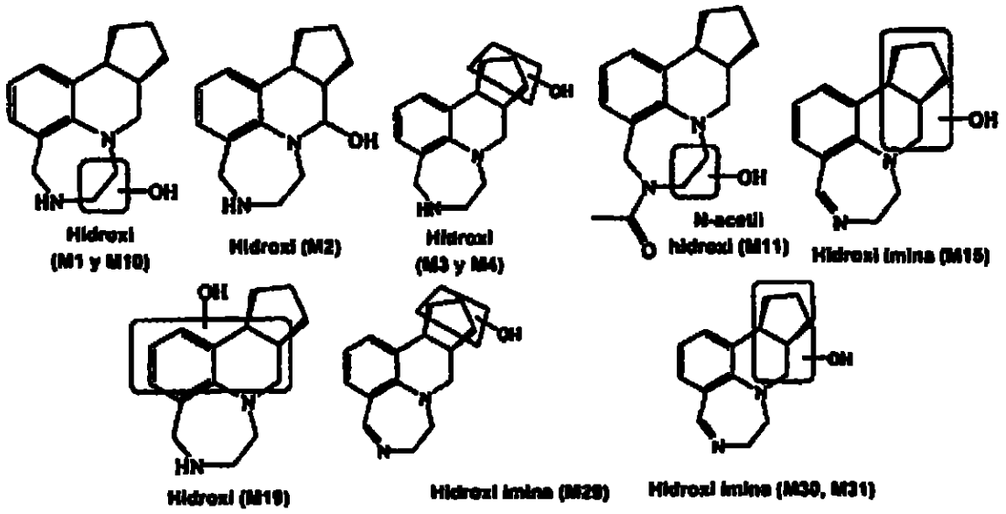
Alguien con experiencia en la técnica también reconocerá que es posible que existan tautómeros de fórmula (I). La presente invención incluye todos de tales tautómeros aunque no se muestren en la fórmula (I).

Los compuestos útiles en la presente invención también incluyen sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula (I). Por

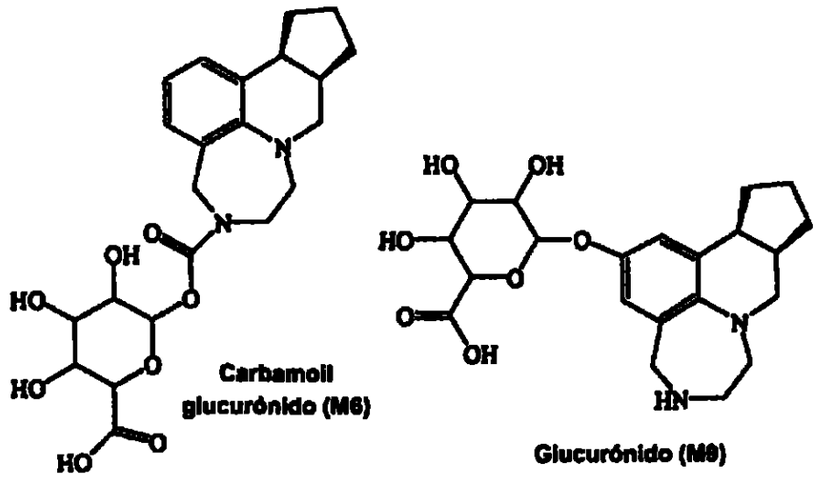
"sal farmacéuticamente aceptable", se pretende cualquier compuesto formado por la adición de una base farmacéuticamente aceptable y un compuesto de fórmula (I) para formar la sal correspondiente. Por el término "farmacéuticamente aceptable", se quiere decir una sustancia que es aceptable para utilizarse en aplicaciones farmacéuticas desde una perspectiva toxicológica y no interactúan de manera adversa con el ingrediente activo. Las sales farmacéuticamente aceptables, incluyendo las mono y bisales incluyen, de manera no exclusiva, aquéllas derivadas de ácidos orgánicos e inorgánicos tales como, de manera no exclusiva, ácidos acético, láctico, cítrico, cinámico, tartárico, succínico, fumárico, maleico, malónico, mandélico, málico, oxálico, propiónico, clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, nítrico, sulfúrico, glicólico, pirúvico, metansulfónico, etansulfónico, toluensulfónico, salicílico, benzoico y ácidos similarmente conocidos aceptables.

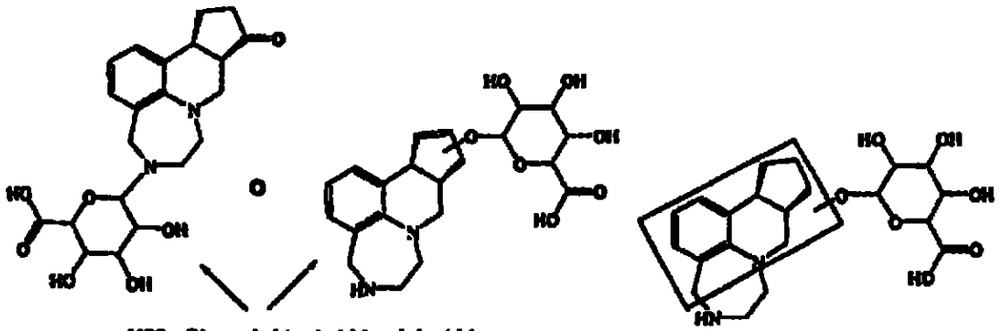
Los ejemplos no limitantes de los compuestos de Fórmula I incluyen aquéllos identificados a través de los estudios in vitro e in vivo detallados en la presente, y mostrados en las trayectorias metabólicas descritas en las Figuras 1-4. Tales ejemplos incluyen aquéllos mostrados a continuación. En donde la unión de sustituyentes datos se describe mediante un recuadro, se pretende que el sustituyente indicado pueda unirse a cualquiera de uno o más átomos de carbono disponibles dentro del recuadro.

Metabolitos de hidroxi



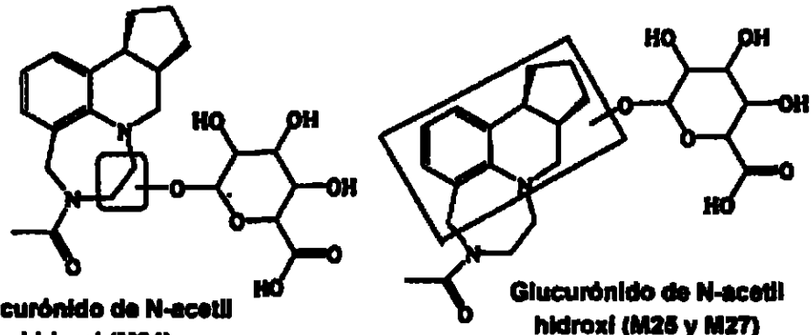
Metabolitos de glucuronilo





M22 - Glucurónido de hidroxi deshidro, o ceto N-glucurónido

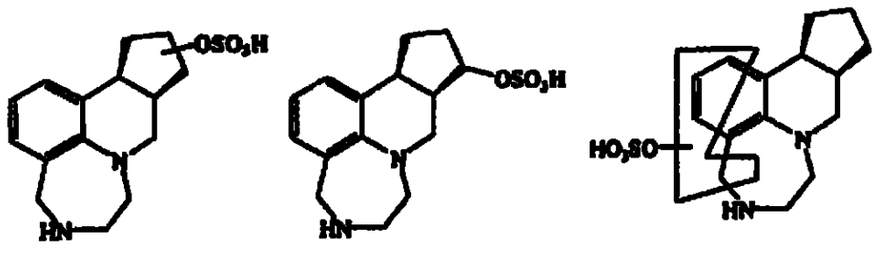
Glucurónido (M23 y M26)



Glucurónido de N-acetil hidroxi (M24)

Glucurónido de N-acetil hidroxi (M25 y M27)

Compuestos de sulfato

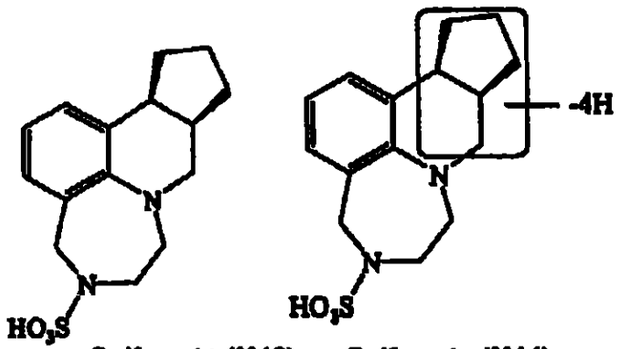


Sulfato (M8)

Sulfato (M13)

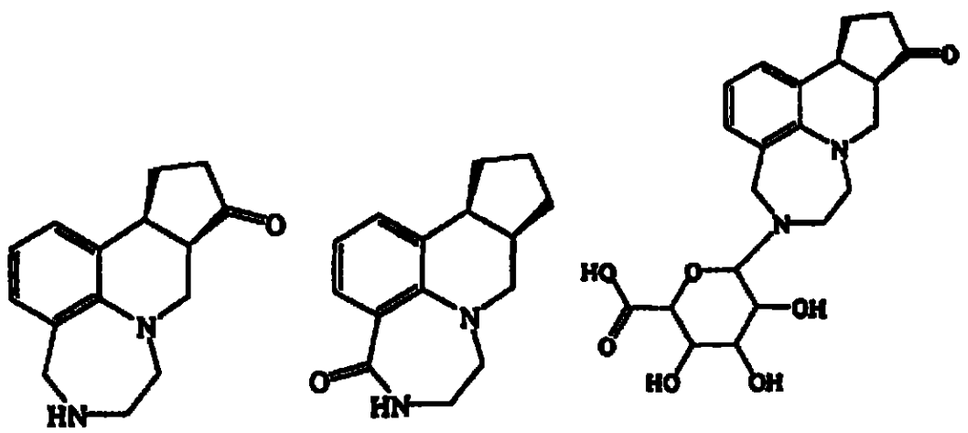
Sulfato (M16)

Compuestos de sulfamato



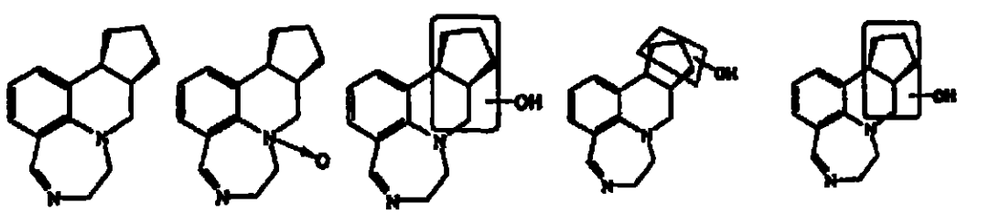
Sulfamato (M12) Sulfamato (M14)

Compuestos ceto



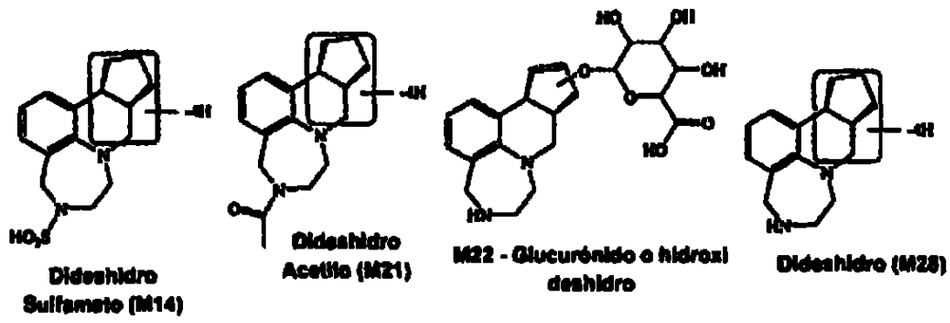
Ceto (M7) Ceto (M18) ceto N-glucurónido (M22)

Compuestos de imina



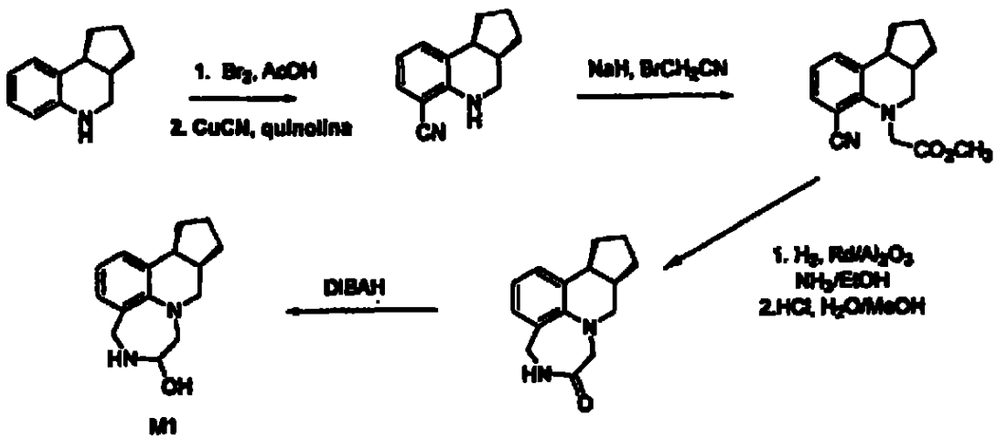
Imina (P3) N óxido (M5) Hidroxi imina (M15) Hidroxi imina (M29) Hidroxi imina (M30, M31)

Compuestos deshidro

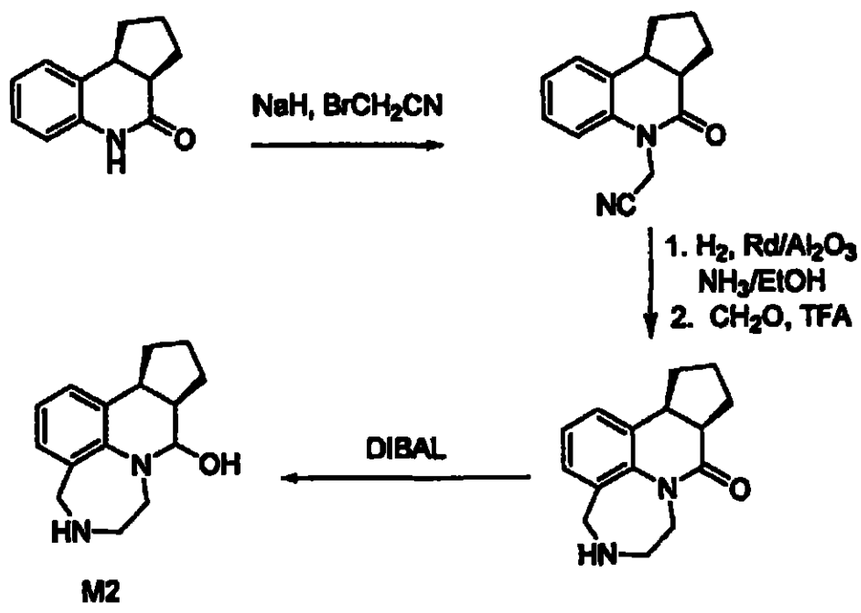


Síntesis ejemplares

Síntesis propuestas para el metabolito de hidroxi M1

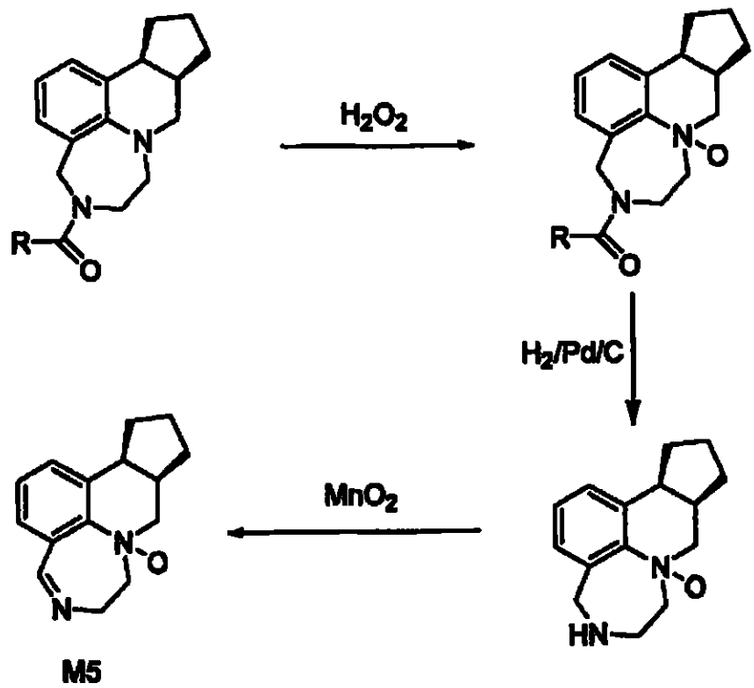


Síntesis propuesta del metabolito de hidroxi M2



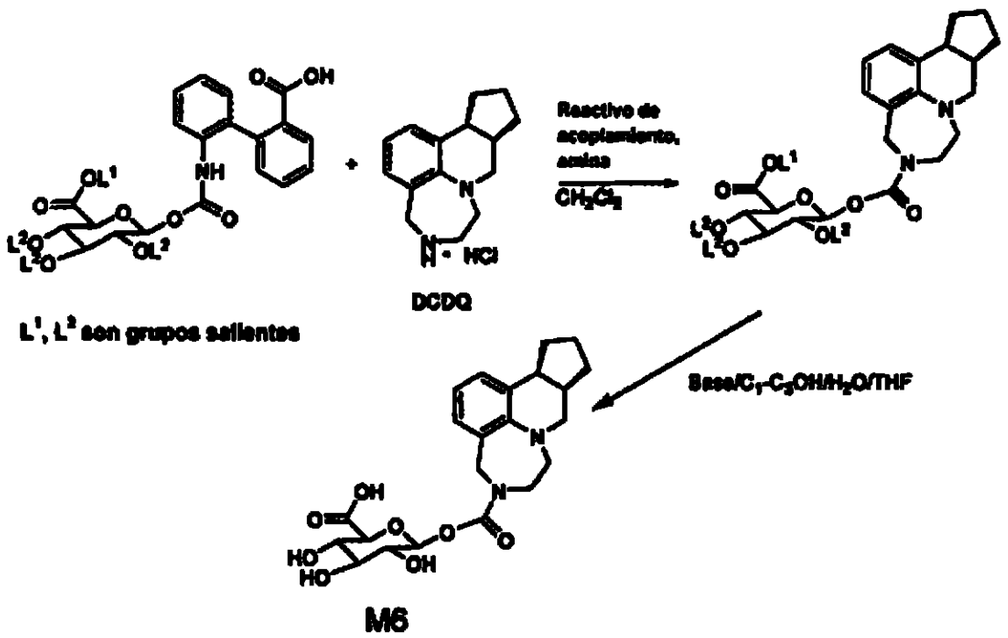
M2

Síntesis propuesta del metabolito N óxido M5

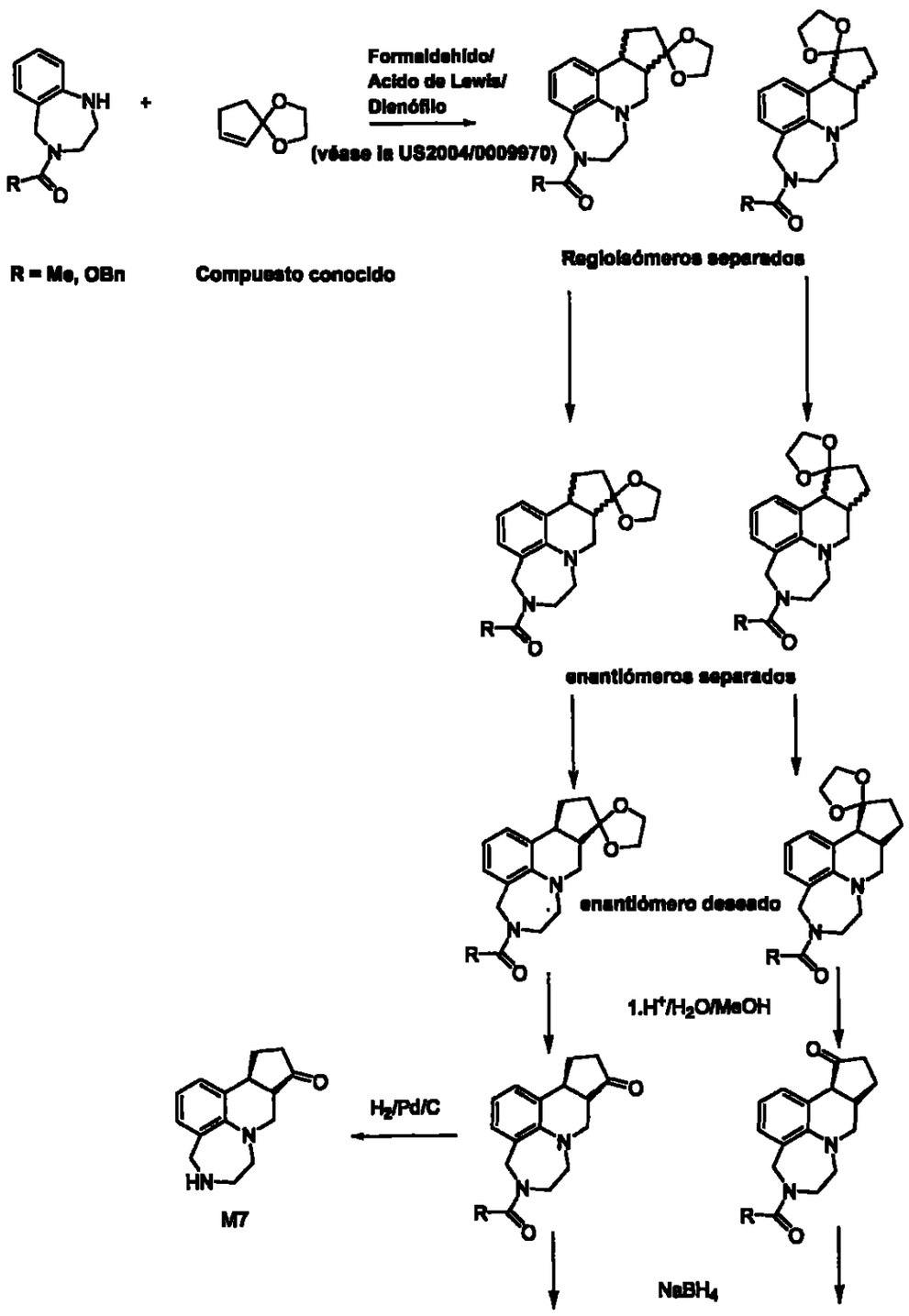


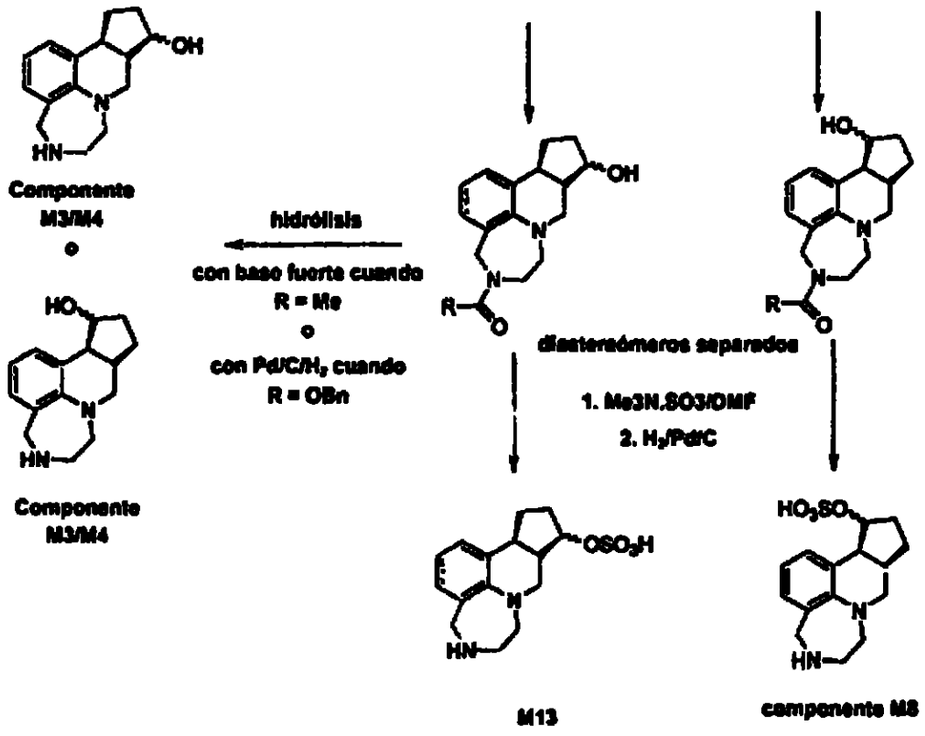
M5

Síntesis para el metabolito de carbamoil glucurónido M6

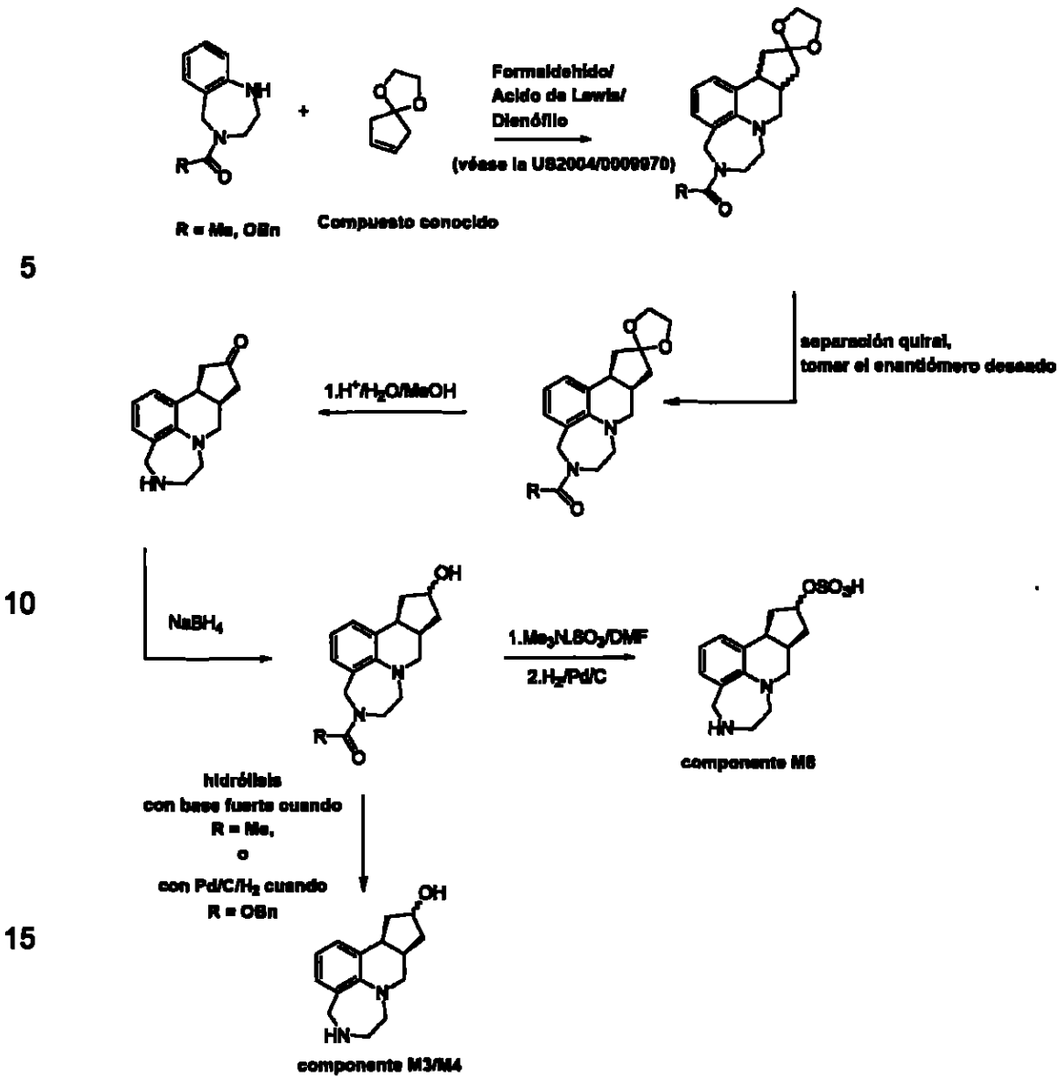


Síntesis propuesta para los metabolitos de hidroxi M3 y M4, el metabolito ceto M7, y los metabolitos de sulfato M8 y M13

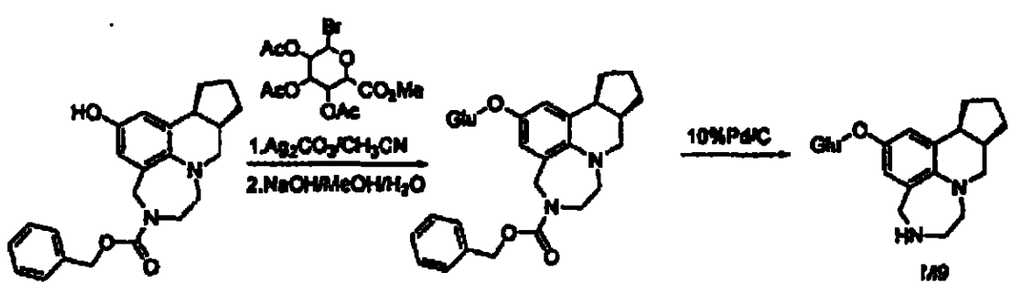

Formaldehído/
Ácido de Lewis/
Dienófilo
(véase la US2004/0009970)
R = Me, OBn
Compuesto conocido
Regioisómeros separados
enantiómeros separados
enantiómero deseado
1.H+/H2O/MeOH
H2/Pd/C
M7
NaBH4



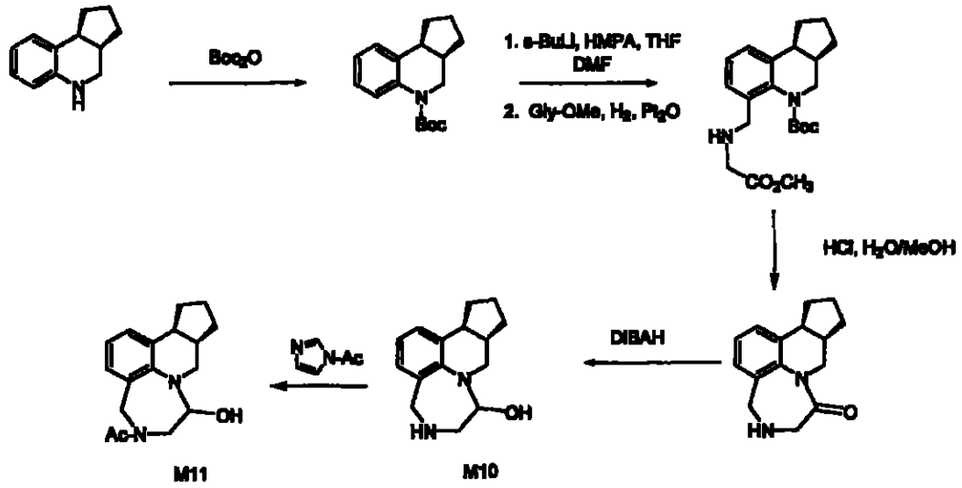
Síntesis propuesta del componente adicional del metabolito de sulfato M8



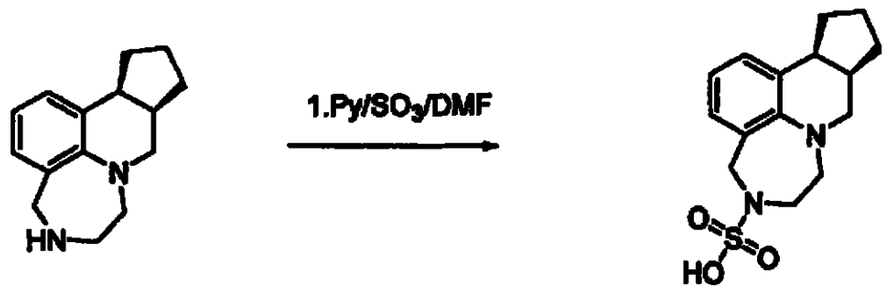
Síntesis propuesta del metabolito de glucuronilo M9



Síntesis propuesta del metabolito de hidroxi M10 y el metabolito de N-acetil hidroxi M11

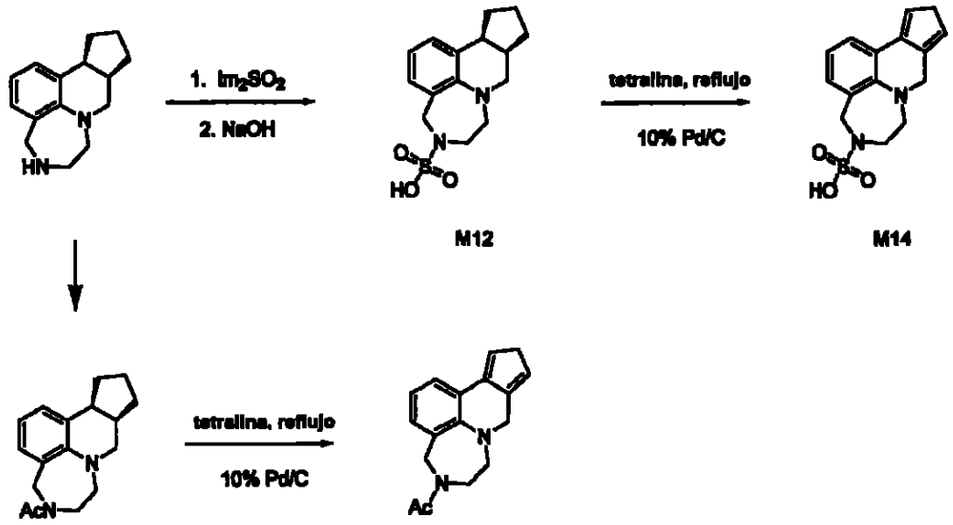


Síntesis propuesta del metabolito de sulfamato M12

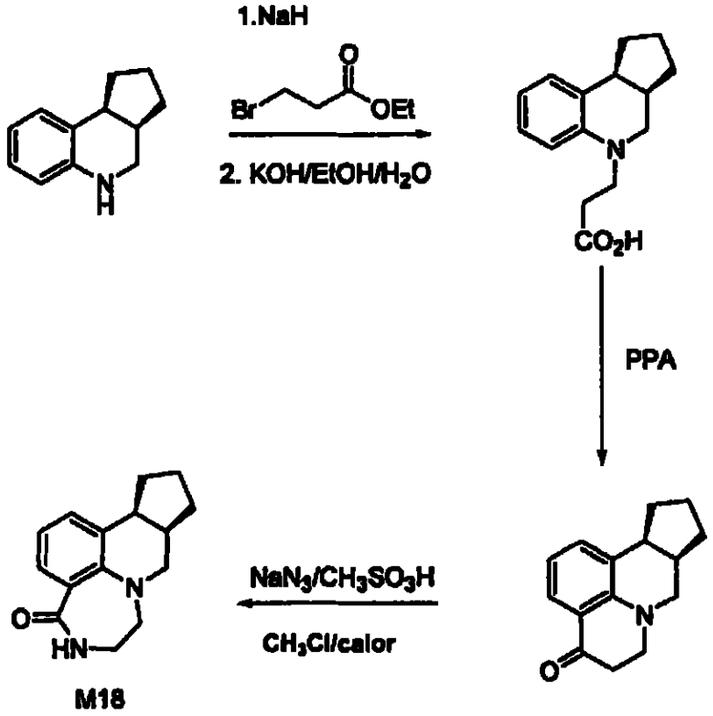


M12

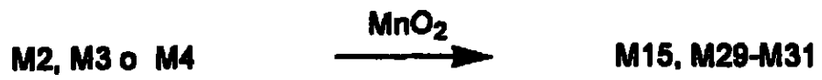
Síntesis propuestas para el metabolito de sulfamato M12, dideshidro sulfamato M14 y el metabolito de N-acetil dideshidro M21



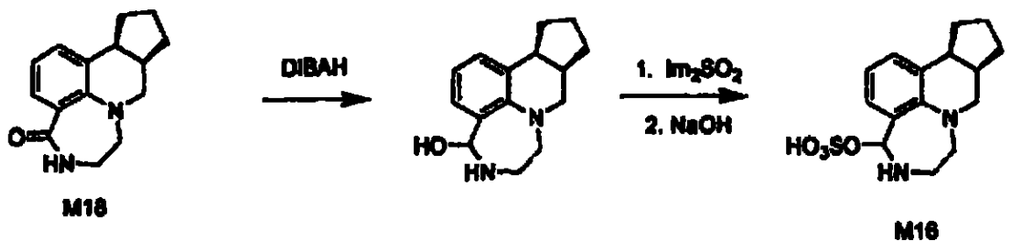
Síntesis propuesta del metabolito ceto M18



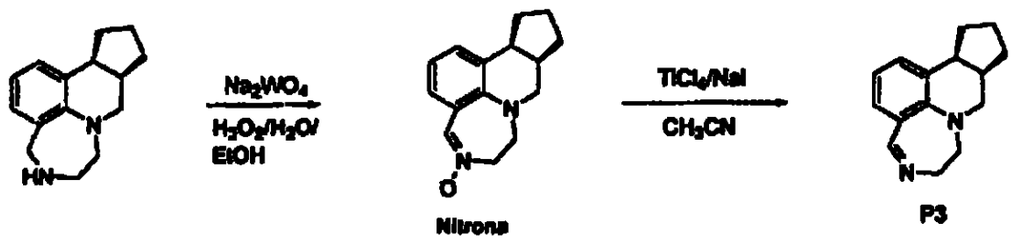
Síntesis propuestas para los metabolitos de hidroxi imina M15 y M29-M31



Síntesis propuesta para el metabolito de sulfamato M16



Síntesis propuesta para el metabolito de imina P3



Estas síntesis propuestas son ejemplares únicamente. Aquellos con experiencia en la técnica reconocerán que otras síntesis pueden utilizarse para hacer los varios compuestos de la invención. Además, aquellos con experiencia en la técnica reconocerán que un intermediario en cualquiera de los esquemas de reacción descritos anteriormente, puede ser un compuesto de acuerdo con la Fórmula I y puede recolectarse y purificarse, si es necesario, sin ir al siguiente paso. Por ejemplo, la nitrona anterior puede aislarse y purificarse. Además, aquellos con experiencia en la técnica

reconocerán que está síntesis puede modificarse para proporcionar los compuestos relacionados que se describen por la Fórmula I, presente. Estas y otras variaciones o modificaciones de estos métodos, compuestos e intermediarios se consideran dentro del alcance y espíritu de la invención descrita en la presente.

Métodos de tratamiento

La afinidad de unión de la DCDQ, y los compuestos relacionados, está bien documentada en las solicitudes publicadas relacionadas WO03/091250 y US2004/0009970, cada una de las cuales se incorpora como referencia. En consecuencia, los metabolitos, que se forman después de la administración de la DCDQ, también pueden utilizarse de manera similar a la DCDQ para tratar los trastornos sicóticos y otros trastornos.

Los compuestos de esta invención son agonistas y agonistas parciales del subtipo 2C de los receptores de serotonina del cerebro y por lo tanto, son de interés para el tratamiento de trastornos mentales, incluyendo trastornos sicóticos tales como esquizofrenia, incluyendo el tipo paranoide, el tipo desorganizado, el tipo catatónico y el tipo no diferenciado, trastorno esquizofreniforme, trastorno esquizoafectivo, trastorno delusional, trastorno sicótico inducido por sustancias y trastorno sicótico no especificado de otra manera; psicosis inducida por L-DOPA; psicosis asociada con la demencia de Alzheimer; psicosis asociada con la enfermedad de Parkinson; psicosis

asociada con la enfermedad del cuerpo de Lewy; trastornos bipolares tales como el trastorno bipolar I, trastorno bipolar II y el trastorno ciclotímico; trastornos depresivos tales como trastorno depresivo mayor, trastorno distímico, trastorno del ánimo inducido por sustancias y trastorno depresivo no especificado de otra manera; episodios del ánimo tales como episodio depresivo mayor, episodio maniaco, episodio mezclado y episodio hipomaniaco; trastornos de la ansiedad tales como ataque de pánico, agorafobia, trastorno del pánico, fobia específica, fobia social, trastorno obsesivo compulsivo, trastorno por tensión postraumática, trastorno por tensión aguda, trastorno de ansiedad generalizado, trastorno de ansiedad inducida por sustancias y trastorno de ansiedad no especificado de otra manera; trastornos del ajuste tales como trastornos del ajuste con ansiedad y/o ánimo deprimido; trastornos del déficit intelectual tales como demencia, enfermedad de Alzheimer y déficit de la memoria; trastornos de la alimentación (por ejemplo, hiperfagia, bulimia o anorexia nerviosa) y combinaciones de estos trastornos mentales que pueden estar presentes en un mamífero. Por ejemplo, los trastornos del ánimo tales como los trastornos depresivos o los trastornos bipolares con frecuencia acompañan los trastornos sicóticos tales como la esquizofrenia. Una descripción más completa de los trastornos mentales mencionados anteriormente puede encontrarse en Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4a edición, Washington, DC, Asociación Psiquiátrica Americana (1994).

Los compuestos de la presente invención también son de interés para el tratamiento de la epilepsia; migrañas; disfunción sexual; trastornos del sueño; trastornos gastrointestinales, tales como el mal funcionamiento de la motilidad gastrointestinal; y obesidad, con sus comorbilidades consecuentes, incluyendo diabetes del Tipo II, enfermedad cardiovascular, hipertensión, hiperlipidemia, apoplejía, osteoartritis, apnea del sueño, enfermedad de la vesícula biliar, gota, algunos cánceres, alguna infertilidad y mortalidad temprana. Los compuestos de la presente invención también pueden utilizarse para tratar las deficiencias del sistema nervioso central asociadas por ejemplo, con trauma, apoplejía y lesiones de la médula espinal. Los compuestos de la presente invención pueden utilizarse por lo tanto, para mejorar o inhibir la degradación adicional de la actividad del sistema nervioso central durante o después de una enfermedad o trauma en cuestión. Incluidas en estas mejoras, están el mantenimiento o mejora en las habilidades motoras y de la motilidad, control, coordinación y fuerza.

Así, la presente invención proporciona métodos para tratar cada una de las enfermedades listadas anteriormente en un mamífero, de manera preferida en un humano, los métodos comprenden proporcionar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de esta invención a un mamífero en necesidad del mismo. Por "tratamiento", como se utiliza en la presente, se quiere decir aliviar, inhibir, prevenir, aminorar y/o mitigar de manera parcial o completa el trastorno. Por ejemplo, "tratamiento" como se utiliza en la presente, incluye aliviar, inhibir o mitigar parcial o completamente la condición

en cuestión. "Mamíferos", como se utiliza en la presente, se refiere a animales vertebrados de sangre caliente, tales como humanos. "Proporcionar", como se utiliza en la presente, significa administrar directamente un compuesto o composición de la presente invención, o administrar un derivado o análogo que formará una cantidad equivalente del compuesto o sustancia activa dentro del cuerpo.

Composiciones farmacéuticas

También abarcadas por la presente invención están las composiciones farmacéuticas para tratar o controlar los estados de enfermedad o condiciones del sistema nervioso central, que comprenden al menos un compuesto de Fórmula I, mezclas del mismo, y/o sales farmacéuticas del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable del mismo. Tales composiciones se preparan de acuerdo con los procedimientos farmacéuticos aceptables, tales como los descritos en Remingtons Pharmaceutical Sciences, 17a edición, ed. Alfonso R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA (1985). Los portadores farmacéuticamente aceptables son aquéllos que son compatibles con los otros ingredientes en la formulación y biológicamente aceptables.

Los compuestos de esta invención pueden administrarse oral o parenteralmente, puros o en combinación con portadores farmacéuticos convencionales, la proporción de los cuales se determina mediante la solubilidad y la naturaleza química del compuesto, la ruta de administración y

la práctica farmacológica estándar. El portador farmacéutico puede ser sólido o líquido.

Los portadores sólidos aplicables pueden incluir una o más sustancias que también pueden actuar como agentes saborizantes, lubricantes, solubilizantes, agentes de suspensión, rellenos, deslizantes, adyuvantes de la compresión, aglutinantes o agentes desintegrantes de la tableta o un material encapsulante. En los polvos, el portador es un sólido dividido finamente que está en mezcla con el ingrediente activo dividido finamente. En las tabletas, el ingrediente activo se mezcla con un portador que tiene las propiedades de compresión necesarias en proporciones adecuadas, y se compacta en la forma y tamaño deseados. Los polvos y tabletas contienen de manera preferida hasta 99% del ingrediente activo. Los portadores sólidos adecuados incluyen, por ejemplo, fosfato de calcio, estearato de magnesio, talco, azúcares, lactosa, dextrina, almidón, gelatina, celulosa, metil celulosa, carboximetil celulosa sódica, polivinilpirrolidina, ceras de bajo punto de fusión y resinas de intercambio de iones.

Los portadores líquidos pueden utilizarse en la preparación de soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes y elixires. El ingrediente activo de esta invención puede disolverse o suspenderse en un portador líquido farmacéuticamente aceptable tal como agua, un solvente orgánico, una mezcla de ambos o aceites o grasas farmacéuticamente aceptables. El portador líquido puede contener otros aditivos farmacéuticos adecuados, tales como solubilizantes, emulsificantes, amortiguadores, conservadores,

edulcorantes, agentes saborizantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, colores, reguladores de la viscosidad, estabilizantes u osmorreguladores. Los ejemplos adecuados de portadores líquidos para la administración oral y parenteral incluyen agua (particularmente que contiene aditivos como en lo anterior, por ejemplo, derivados de celulosa, de manera preferida una solución de carboximetil celulosa sódica), alcoholes (incluyendo alcoholes monohídricos y alcoholes polihídricos, por ejemplo, glicoles) y sus derivados, y aceites (por ejemplo, aceite de coco y aceite de cacahuate fraccionados). Para la administración parenteral, el portador también puede ser un éster oleoso, tal como oleato de etilo y miristato de isopropilo. Los portadores líquidos estériles se utilizan en composiciones en forma líquida estéril para la administración parenteral. El portador líquido para las composiciones presurizadas puede ser un hidrocarbono halogenado u otro propelente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas líquidas que son soluciones o suspensiones estériles, pueden administrarse mediante, por ejemplo, inyección intramuscular, intraperitoneal o subcutánea. Las soluciones estériles también pueden administrarse intravenosamente. La administración puede ser en forma de una composición líquida o sólida.

Los compuestos de esta invención pueden administrarse rectalmente o vaginalmente en la forma de un supositorio convencional. Para la administración mediante inhalación o insuflación intranasal o intrabronquial, los compuestos de esta invención pueden formularse en una solución acuosa

o parcialmente acuosa, que puede utilizarse a continuación en la forma de un aerosol. Los compuestos de esta invención también pueden administrarse transdérmicamente a través del uso de un parche transdérmico que contiene el compuesto activo y el portador que es inerte al compuesto activo, no es tóxico a la piel y permite el suministro del agente para la absorción sistémica en la corriente sanguínea vía la piel. El portador puede tomar cualquier número de formas tales como cremas y ungüentos, pastas, geles y dispositivos oclusores. Las cremas y ungüentos pueden ser emulsiones líquidas o semisólidas viscosas del tipo aceite en agua o agua en aceite. Las pastas comprendidas de polvos absorbentes dispersas en petróleo o petróleo hidrofílico que contiene el ingrediente activo, también pueden ser adecuadas. Una variedad de dispositivos oclusores pueden utilizarse para liberar el ingrediente activo en la corriente sanguínea, tales como una membrana semipermeable que cubre un depósito que contiene el ingrediente activo con o sin un portador, o una matriz que contiene el ingrediente activo. Otros dispositivos oclusores se conocen en la literatura.

De manera preferida, la composición farmacéutica está en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como tabletas, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones, emulsiones, gránulos o supositorios. En tal forma, la composición se subdivide en una dosis unitaria que contiene las cantidades apropiadas del ingrediente activo; las formas de dosificación unitarias pueden ser composiciones empacadas, por ejemplo, polvos empaquetados, viales, ampollas, jeringas prellenadas o bolsitas que contienen líquidos. La forma de

dosificación unitaria puede ser, por ejemplo, una cápsula o tableta misma, o puede ser el número apropiado de cualquiera de tales composiciones en forma de paquete.

Los requisitos de la dosificación varían con las composiciones particulares empleadas, la ruta de administración, la severidad de los síntomas presentados, y el sujeto particular siendo tratado. Basándose en los resultados obtenidos en los procedimientos de las pruebas farmacológicas estándar, las dosificaciones diarias estimadas proyectadas del compuesto activo serían de aproximadamente 0.02 µg/kg-aproximadamente 4000 µg/kg, o hasta aproximadamente 500 mg/día. Se entenderá que estos intervalos de dosificación son meramente estimados, y aquellos con experiencia en la técnica serán capaces de determinar las dosis apropiadas dependiendo de muchos factores, incluyendo el peso del paciente, la severidad de los síntomas y otros factores. El tratamiento se iniciará generalmente con dosificaciones pequeñas menores que la dosis óptima del compuesto. Posteriormente, la dosificación se incrementa hasta que el efecto óptimo bajo las circunstancias se alcanza; las dosificaciones precisas para la administración oral, parenteral, nasal o intrabronquial se determinarán por el médico que las administra basándose en la experiencia con el sujeto individual tratado.

EJEMPLOS

Compuestos del metabolito

El metabolismo de la DCDQ se investigó en varios modelos in vitro e in vivo utilizando una versión radiomarcada de la DCDQ, [^{14}C]DCDQ. Los estudios revelaron varias trayectorias metabólicas y varios metabolitos significativos. Estos estudios se explican con detalle adicional en la sección Experimental, a continuación.

El metabolismo de la [^{14}C]DCDQ se investigó mediante la incubación con microsomas de hígado de ratones CD-1 machos y hembra, ratas Sprague Dawley, perros sabuesos y microsomas de hígado humano recolectados a través de los sexos, y hepatocitos humanos masculinos crioconservados. La DCDQ se convirtió a los metabolitos oxidativos, incluyendo M1, M2, M3, M4, M5 y un carbamoil glucurónido (M6) en las incubaciones microsomales y los hepatocitos humanos.

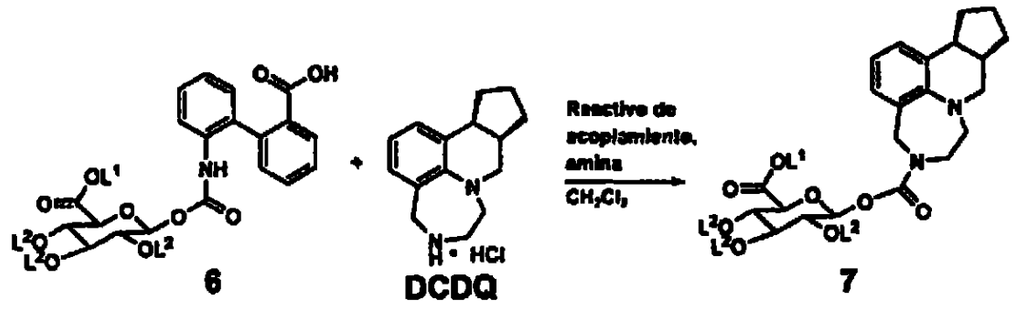
El metabolismo in vivo de la [^{14}C]DCDQ se investigó además en cuatro perros sabueso machos, después de una sola administración de 14.1 a 16.7 mg/kg de clorhidrato de [^{14}C]DCDQ en una cápsula con recubrimiento entérico. Los principales metabolitos observados en el plasma incluyeron hidroxi DCDQ (M1, M2 y M3), una N óxido DCDQ (M5), una ceto DCDQ (M7), una hidroxi DCDQ imina (M15), un hidroxi DCDQ glucurónido (M9) y el carbamoil glucurónido de DCDQ (M6). Un conjugado de sulfato de hidroxi DCDQ (M16) y un ácido diacepinil DCDQ carboxílico (M17), que no se

detectaron en plasma, se observaron en las muestras de orina. Los metabolitos de hidroxi DCDQ (M2, M3 y M19), una ceto DCDQ (M18) y la hidroxi DCDQ imina (M15) se detectaron en los extractos fecales. La DCDQ se metabolizó extensamente en los perros, con el metabolismo oxidativo como la trayectoria metabólica principal, aunque la formación de un DCDQ carbamoil glucurónido (M6) también se observó.

El metabolismo in vivo de la [^{14}C]DCDQ se estudió además en ratas Sprague-Dawley machos y hembras después de una sola administración oral (5 mg/kg). Los metabolitos detectados en el plasma incluyeron los metabolitos de hidroxi DCDQ (M1, M2, M3, M4 y M10), ceto DCDQ (M7), y los metabolitos de la fase II, sulfamato de DCDQ (M12), dideshidro sulfamato de DCDQ (M14), sulfatos de hidroxi DCDQ (M8 y M13), hidroxi DCDQ glucurónido (M9) e hidroxi DCDQ acetilada (M11). La DCDQ se metabolizó extensamente en ratas a los metabolitos predominantemente oxidativos.

Así, los metabolitos de la DCDQ se crean a través de varias trayectorias metabólicas, algunas de las cuales son comunes a través de varias especies. Tales metabolitos pueden ser útiles para tratar trastornos y enfermedades afectadas por el receptor de $5HT_{2C}$ y/o aquéllos que pueden tratarse mediante la administración de la DCDQ.

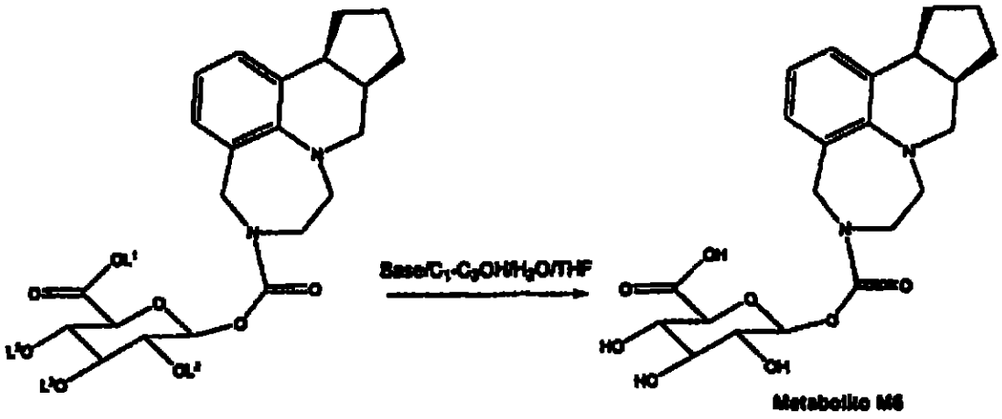
Síntesis del metabolito (M6) de carbamoil glucuronilo



El metabolito M6 puede obtenerse acoplando la DCDQ con un portador de glucuronilo 6 en la presencia de un reactivo de acoplamiento y una amina en CH_2Cl para proporcionar el compuesto 7. El producto, el compuesto 7 puede purificarse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, y de manera preferida, mediante purificación con cromatografía en columna, de manera preferida con EtOAc/heptano como un eluyente. El reactivo de acoplamiento puede seleccionarse de cualquier reactivo de acoplamiento adecuado, incluyendo, de manera no exclusiva, BOP, DCC y EDC. BOP es el agente de acoplamiento preferido. Las aminas adecuadas incluyen, de manera no exclusiva Et_3N, piridina y una base de Hünig. La base de Hünig es la preferida. El portador de glucuronilo 6 puede prepararse mediante métodos conocidos por aquellos con experiencia en la técnica. L^1 es un grupo saliente alifático, tal como de manera no exclusiva, alquilo de C_1 a C_6, metilo, etilo y propilo, de manera preferida metilo. Cada L^2 es un grupo saliente que se selecciona de manera independiente de un grupo acetilo y un grupo bencílico. Los grupos acetilo se prefieren. El portador de glucuronilo 6

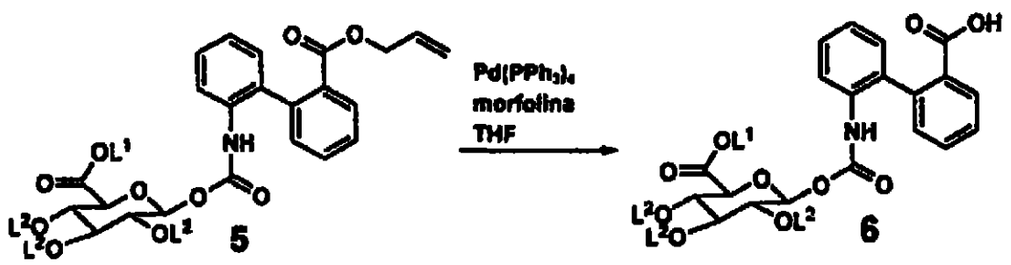
es de manera preferida, un carbamato de glucuronilo de amina secundaria 6, tales como aquéllos que pueden diseñarse basándose en el protocolo de Scheeren discutido en Ruben G. G. Leeders, Hans W. Scheeren, Tetrahedron Letters 2000, 41, 9173-9175.

Metabolito M6 de glucuronil carbamoilo



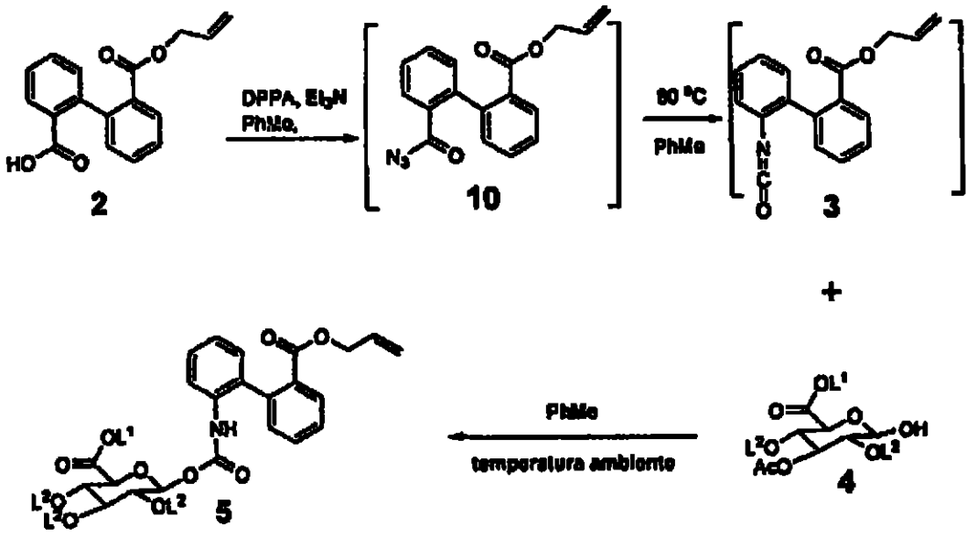
El compuesto 7 se somete a continuación a una hidrólisis básica que resulta en la desprotección de todos los grupos salientes, L^2, en la posición 2, 3, 4 de la porción de azúcar, así como L^1, para proporcionar el producto final, el metabolito M6. La hidrólisis básica se lleva a cabo utilizando una base, tal como NaOH, LiOH y KOH en un alcohol alifático de C_1-C_3. LiOH es la base preferida y MeOH es el alcohol preferido. La eliminación de los solventes orgánicos y la liofilización pueden utilizarse para proporcionar el producto crudo M6 en un rendimiento cuantitativo. La purificación de M6 crudo puede llevarse a cabo entonces mediante los métodos conocidos por aquellos con experiencia en la técnica.

Portador de glucuronilo, compuesto 6



El compuesto 6 puede prepararse mediante la desprotección del grupo alilo en el compuesto 5, catalizado de manera preferida utilizando $Pd(PPh_3)_4$, y morfolina como un nucleófilo. El catalizador fresco se prefiere. Además, puede burbujearse N_2 opcionalmente a través de la solución de reacción antes de agregar el catalizador. De esta manera, el portador de glucuronilo crudo 6 se obtiene en un rendimiento cuantitativo sin purificación adicional.

Compuesto 5



El compuesto 5 puede prepararse en un alto rendimiento en una reacción de un solo recipiente. El tratamiento del compuesto 2 con uno de DPPA, NaN_3 o $TMSN_3$ en la presencia de Et_3N en tolueno in situ, produce una acil azida 10, que se calienta, de manera preferida a 80°C durante 1.5 horas, para proporcionar el isocianato 3. El compuesto 3 no necesita aislarse y se trata posteriormente con un éster 1-hidroxiglucurónico 4, de manera preferida a temperatura ambiente durante la noche, para obtener el compuesto del título 5 (Esquema de Reacción 3). El compuesto 4 puede prepararse siguiendo el procedimiento descrito en la US 6,380,166B1, que se incorpora en la presente como referencia. La ^1H RMN a 30°C muestra que todas las señales son dobles debido a la rotación restringida alrededor del enlace Ar-Ar.

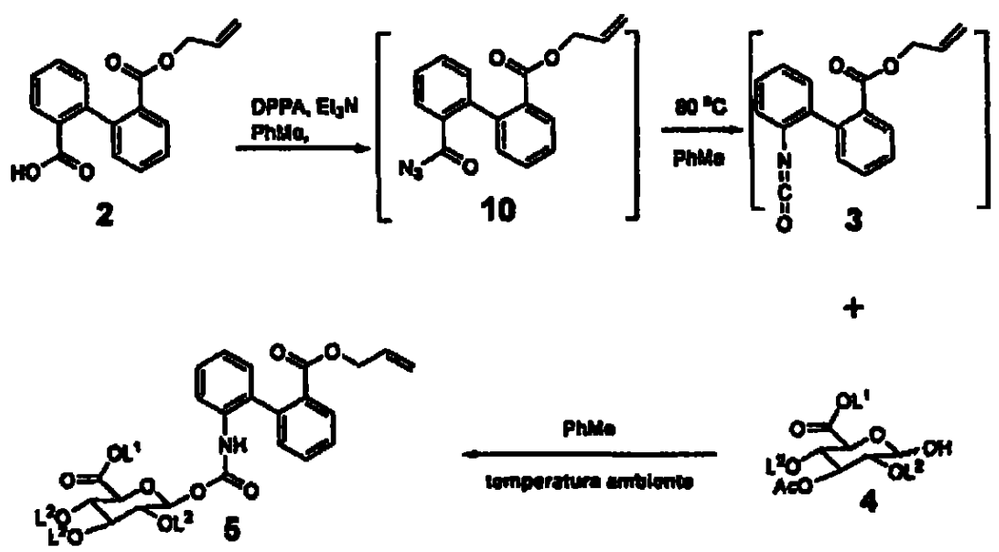
En el compuesto 4, L^1 es un grupo saliente alifático, tal como, de manera no exclusiva, alquilo de C_1 a C_8, metilo, etilo y propilo, de manera preferida metilo. Cada L^2 es un grupo saliente que se selecciona de manera independiente de un grupo acetilo y un grupo bencílico. Los grupos acetilo son los preferidos.

Compuesto 2

Con el fin de preparar el éster monoalílico 2, se eligió el anhídrido difénico como una materia prima y se trató con un exceso de alcohol alílico en la presencia de un catalizador. Los catalizadores adecuados incluyen Et_3N, base de Hüning, piridina, aminas, NaOH, LiOH, KPH, y otras

bases inorgánicas. Pueden lograrse rendimientos cuantitativos para el compuesto 2.

Compuesto 5



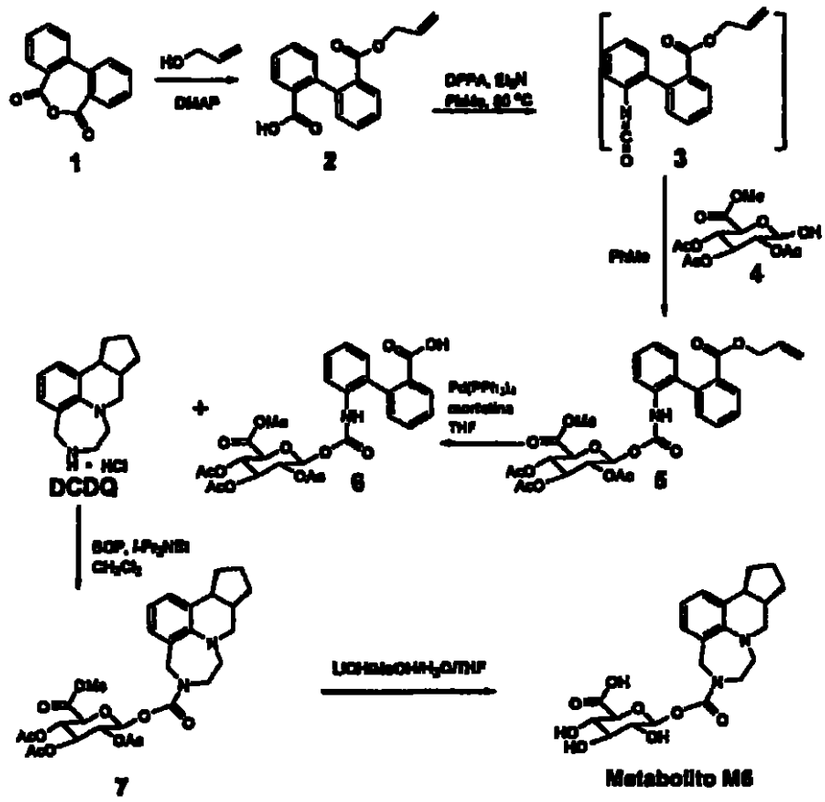
El compuesto 5 puede prepararse en un alto rendimiento en una reacción en un solo recipiente. El tratamiento del compuesto 2 con uno de DPPA, NaN_3 o $TMSN_3$ en la presencia de Et_3N en tolueno in situ, produce una acil azida 10, que se calienta, de manera preferida a 80°C durante 1.5 horas, para proporcionar el isocianato 3. El compuesto 3 no necesita aislarse y se trata posteriormente con un éster 1-hidroxiglucurónico 4, de manera preferida a temperatura ambiente durante la noche, para obtener el compuesto del título 5 (Esquema de Reacción 3). El compuesto 4 puede prepararse siguiendo el procedimiento descrito en la US 6,380,166B1, que se incorpora en la presente

como referencia. La ^{1}H RMN a 30°C muestra que todas las señales son dobles debido a la rotación restringida alrededor del enlace Ar-Ar.

En el compuesto 4, L^1 es un grupo saliente alifático, tal como, de manera no exclusiva, alquilo de C_1 a C_6, metilo, etilo y propilo, de manera preferida metilo. Cada L^2 es un grupo saliente que se selecciona de manera independiente de un grupo acetilo y un grupo bencílico. Los grupos acetilo son los preferidos.

Síntesis ejemplar del metabolito (M6) de carbamoil glucuronilo

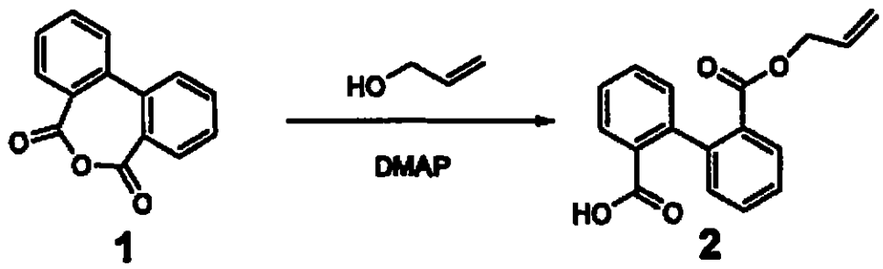
Una síntesis ejemplar del metabolito (M6) de DCDQ carbamoil glucurónido se muestra en el Esquema de Reacción 1:



General

Los espectros de la RMN se registraron en un Varian Inova 300 a 300 MHz (^1H y ^{13}C) y los desplazamientos químicos se identificaron en ppm con relación al estándar interno de TMS. Se realizaron TLC analíticas y preparativas sobre placas recubiertas con Gel de Sílice 60 F-254 obtenidas de EM Science. Los compuestos se visualizaron utilizando UV a 254 nm o un indicador de $KMnO_4$ acuoso al 10%. El análisis de la HPLC se determinó en un instrumento para HPLC Waters Alliance 2695 equipado con un detector UV PDA (Modelo 2996). Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro de masas Finnigan.

Ester 2'-alílico del ácido bifenil-2,2'-dicarboxílico 2



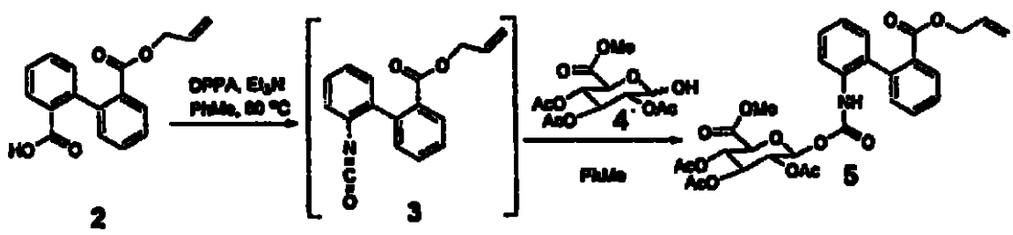
1 2

En un matraz de 1 L se cargó anhídrido difénico (40 g, 178 mmoles), alcohol alílico (300 mL) y DMAP (2.18 g, 17.8 mmoles, 10 % en mol). La mezcla de reacción se agitó durante 12 horas. El exceso de alcohol alílico se evaporó bajo presión reducida a 40°C. El residuo se redisolvió en EtOAc (400 mL) y se lavó con $NaHSO_4$ acuoso (0.5 N, 200 mL), salmuera (200 mL x 3) y agua (200 mL x 3). La capa orgánica se secó

con Na_2SO_4 anhidro, se pasó a través de una almohadilla de gel de sílice (500 g), se lavó la almohadilla con EtOAc (1 L), se concentró bajo presión reducida hasta sequedad. Las trazas del alcohol alílico se eliminaron mediante destilación con heptano para proporcionar el éster monoalílico 2 (50 g, 100%) como un aceite incoloro.

^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): 8.03-7.99 (m, 2H), 7.56-7.39 (m, 4H), 7.19-7.16 (m, 2H), 5.74-5.61 (m, 1H), 5.17-5.06 (m, 2H), 4.52-4.49 (m, 2H).

Ester metílico del ácido 3,4,5-triacetoxi-6-(2'-aliloxicarbonilbifenil-2-ilcarbamoiloxi)tetrahidro-piran-2-carboxílico 5



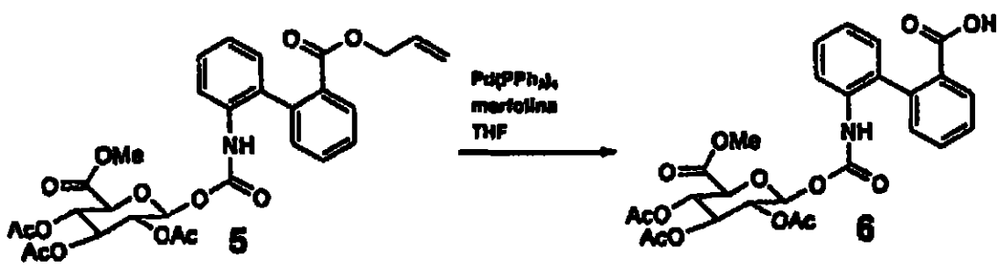
2 3 4 5

En un matraz de 500 mL se cargó el éster 2'-alílico del ácido bifenil-2,2'-dicarboxílico 2 (5.2 g, 18.4 mmoles), tolueno (100 mL), DPPA (4.8 mL, 22.1 mmoles, 1.2 equivalentes) y Et_3N (3.1 mL, 22.1 mmoles, 1.2 equivalentes) bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente, a continuación se calentó a 85°C durante 1.5 horas para generar in situ el intermediario de isocianato 3. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente. A esta mezcla se le agregó el éster 2,3,4-triacetil-1-hidroxiglucurónico de metilo 4 (3.7 g, 11 mmoles, 0.6 equivalentes) y se agitó durante la noche. La mezcla se diluyó con EtOAc

(500 mL), se lavó posteriormente con $NaHSO_4$ acuoso (0.5 N, 200 mL), $NaHCO_3$ saturado (200 mL), salmuera (200 mL x 2) y agua (200 mL). La capa orgánica se secó sobre $NaSO_4$ anhidro y se concentró bajo presión reducida. El residuo (11 g), mezclado con gel de sílice (22 g), se cargó en una columna (4.5 x 50 cm) que se empacó con gel de sílice (500 g). La columna se lavó con EtOAc/heptano (2:8, 6 L; 3:7, 4 L; 4:6, 4 L). Las fracciones (60 mL/fracción se recolectaron y el solvente se evaporó para proporcionar el compuesto 5 (5.5 g, 82%). HPLC, RT=7.73 minutos, pureza: 81.44%.

^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$), todas las señales son dobles debido a la rotación restringida alrededor del enlace Ar-Ar, 8.03-7.93 (m, 2H), 7.64-7.48 (m, 2H), 7.40-7.23 (m, 2H)1 7.18-7.05 (m, 2H), 6.49, 6.42 (2s, ^{1}H, NH), 5.74, 5.73 (2d, J = 8.1 Hz, ^{1}H, β-anómero), 5.70-5.57 (m, 1H), 5.33-5.01 (m, 5H), 4.54-4.48 (m, 2H), 4.16 (d, J = 9.9 Hz, ^{1}H), 3.73, 3.72 (2s, 3H), 2.04- 1.95 (3s, 9H). MS: m/z:[636 M+Na]$^+$.

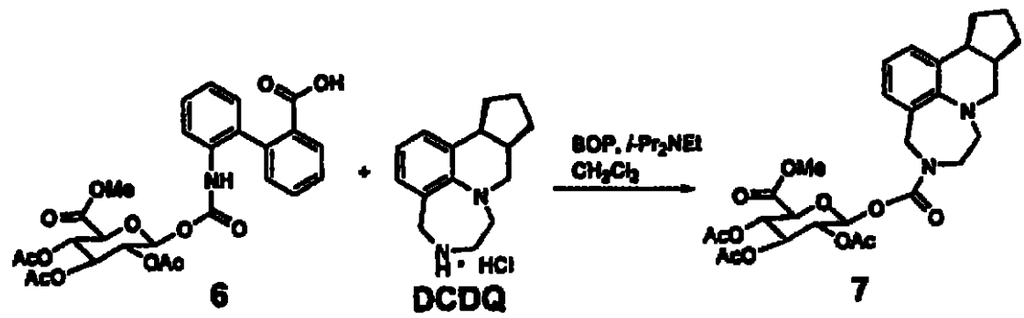
<u>Ester metílico del ácido 3,4,5-triacetoxi-6-(2'-carboxilbifenil-2-ilcarbamoiloxi)tetrahidropiran-carboxílico 6</u>



En un matraz de 500 mL se cargó el éster metílico del ácido 3,4,5-triacetoxi-6-(2'-aliloxicarbonilbifenil-2-ilcarbamoiloxi)tetrahidro-piran-2-carboxílico 5 (5.3 g, 8.65 mmoles), THF (400 mL) y morfolina (3.8 mL, 43.3 mmoles, 5 equivalentes). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente mientras se burbujea nitrógeno a través de la solución. Después de eso, se agregó $Pd(PPh_3)_4$ (300 mg, 0.26 mmoles, 3 % en mol). La mezcla de reacción se agitó además durante 15 minutos, se diluyó con Et_2O (1L) y se lavó con $NaHSO_4$ (0.5 N, 300 mL), salmuera (300 mL x 2), agua (400 mL x 2). La capa orgánica se secó sobre $MgSO_4$ y se evaporó para obtener el compuesto 6 (5.3 g, 100%, HPLC: 84% de pureza). Este compuesto se utilizó sin purificación adicional en el siguiente paso.

^1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): todas las señales son dobles debido a la rotación restringida alrededor del enlace Ar-Ar, 8.05-7.15 (m, 8H), 5.72, 5.70 (2d, J = 8.1 Hz, 1H), 5.36-5.02 (m, 2H), 4.18, 4.13 (2d, J = 9.9 Hz, 1H), 3.77-3.73 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 2.03-1.98 (3s, 9H). MS: m/z: 572 $[M-H]^-$.

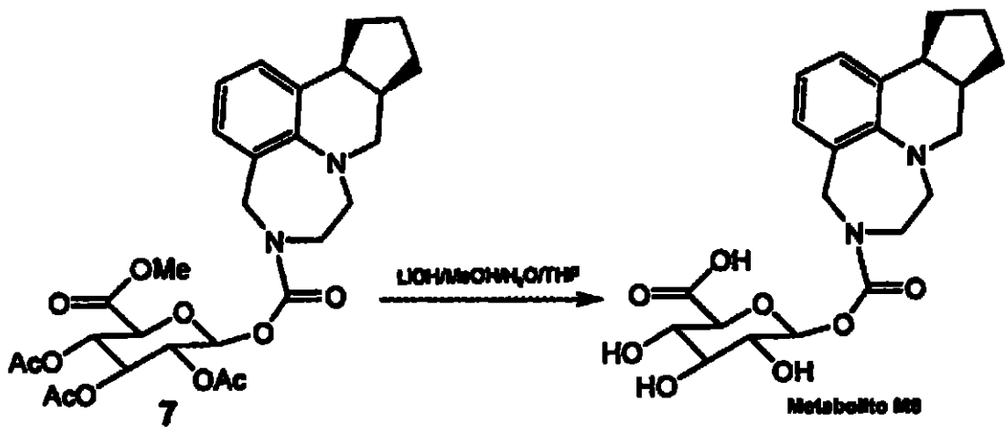
Compuesto 7



En un matraz de 500 mL se cargó el éster metílico del ácido 3,4,5-triacetoxi-6-(2'-carboxilbifenil-2-ilcarbamoiloxi)tetrahidropiran-2-carboxílico 6 (5.0 g, 8.7 mmoles), CH_2Cl_2 (200 mL) y BOP (4.2 g, 9.6 mmoles, 1.1 equivalente). La mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno para volverse una solución. A esta solución se le agregó gota a gota una solución de DCDQ (2.5 g, 9.6 mmoles, 1.1 equivalente) y N,N-diisopropil-N-etil amina (7.6 mL, 43.5 mmoles, 5 equivalentes) en CH_2Cl_2 (200 mL) en 10 minutos. La mezcla de reacción se agitó durante la noche y se filtró a través de celite. La capa orgánica se lavó con agua (200 mL), se secó sobre $MgSO_4$ y se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (columna: 4.5 x 50 cm, gel de sílice: 500 g, solvente: EtOAc/heptano (2/8, 4 L), (3/7, 8 L), 50 mL/fracción) para obtener el compuesto 7 (4.0 g, HPLC: 74%), se suspendió en CH_2Cl_2 para proporcionar el compuesto 7 (3.52 g, 68.8%, HPLC: 96%).

^1H RMN (300 MHz, DMSO-d6): 7.12-7.08 (m, 1H), 6.98-6.96 (m, 1H), 6.86-6.77 (m, 1H), 5.81, 5.79 (2d, J = 8.1 Hz, 1H, β-anómero), 5.10-4.90 (m, 2H), 4.63-4.36 (m, 2H), 4.17-4.12 (m, 1H), 3.88-3.68 (m, 1H), 3.64, 3.59 (2s, 3H), 3.40-3.21 (m, 1H), 3.04-2.59 (m, 4H), 2.30-2.14 (m, 1H), 2.05-1.95 (3s, 9H), 1.70-1.20 (m, 5H). MS: m/z 589 $[M + H]^+$.

Metabolito M6 de DCDQ



Una solución del compuesto 7 (5.0 g, 8.5 mmoles) en THF (64 mL) se agregó a MeOH (319 mL) y H_2O (70 mL). La solución se enfrió a 0-5°C (baño de hielo-agua). Y se agregó gota a gota una solución de $LiOH \bullet H_2O$ (2.1 g, 51 mmoles, 6 equivalentes) en H_2O (58 mL) [LiOH/MeOH/THF/H_2O 0.1 N] en 20 minutos. La mezcla de reacción se agitó a 0-5°C durante 2 horas bajo atmósfera de N_2. El progreso de la desprotección se verificó en la TLC de fase inversa (SiO_2-C_{18} MeCN/H_2O, 3/7). La mezcla de reacción se diluyó con H_2O (500 mL) y se neutralizó agregando HOAc (3.1 g, 51 mmoles) a 20°C. El solvente se concentró bajo presión reducida a 22°C y la suspensión acuosa resultante se liofilizó para proporcionar el metabolito M6 crudo (6.2 g, 100%). La purificación adicional del compuesto crudo (1.2 g) utilizando cromatografía en columna sobre gel de sílice Biotage (Horizon), 2 $CHCl_3$/MeOH/H_2O como un eluyente proporcionó M6 (400 mg) con 95% de pureza (HPLC).

^{1}H RMN (300 MHz, DMSO-d6, intercambio de D_2O): 7.13-6.99 (m, 2H), 6.87-6.80 (m, 1H), 5.09 (d, J = 7.8 Hz, 1H, β-anómero), 4.77-4.58 (m, 1H), 4.19-4.12 (m, 1H), 3.93 (m, 1H), 3.40-2.87 (9m, 9H), 2.68-2.60 (m, 1H), 2.24-1.99 (m, 3H), 1.63-1.20 (m, 4H); ^{13}C (75 MHz, DMSO-d6): 173.3, 173.1, 154.6, 154.0, 147.3, 132.5, 132.4, 130.9, 130.6, 130.1, 127.9, 127.7, 121.4, 121.1, 96.9, 96.3, 77.1, 76.9, 75.3, 73.2, 72.9, 72.6, 56.9, 56.1, 55.6, 50.9, 50.4, 48.7, 41.7, 35.0, 34.9, 32.5, 32.3, 29.8, 24.1; LC/MS (ESI), m/z 449 $[M+H]^+$.

Referencias

1. Equipo para HPLC: Waters 2690

Preparación de la muestra: agregar 2-3 gotas de la mezcla de reacción a 2 mL de acetonitrilo, agitar bien hasta una solución y someter a análisis con HPLC.

Condiciones de la HPLC:

Columna: Alltima C_{18} 3µm 7 x 53 mm

Temperatura de la columna: 25°C

Fases móviles: Solvente A = 1900 mL H_2O, 100 mL CH_3CN, 1 mL H_3PO_4;

Solvente B = 1900 mL CH_3CN, 100 mL H_2O, 1 mL H_3PO_4

CUADRO 1

Cuadro del gradiente W2690

Tiempo (minutos)	Velocidad de Flujo (mL/minuto)	% de A	% de B	curva
	2.50	100	0	6
2	2.50	100	0	6
9	2.50	0	100	6
11	2.50	0	100	6
12	2.50	100	0	6
16	2.50	100	0	6

UV: 215 nm

Volumen de inyección: 10 µL

2. Biotage Flash-12 (Horizon) Método para la Purificación Final de M6

Fases Móviles:

A: $CHCl_3$: MeOH: H_2O (8: 2: 0.2)

B: $CHCl_3$: MeOH: H_2O (7: 3: 0.5)

Gradiente por el Volumen de la Columna (CV, 120 mL/CV):

2 (CV): A 100%

5 (CV): A 100% → B 100%

3 (CV): B 100%

Carga de la muestra: Disolver 1.2 g de M6 crudo en 8 ml de la fase móvil A y verter en el tomador de muestras.

Velocidad de flujo: 40 mL/minuto

UV: 254 nm

Fracción: 12 mL/fracción, total 96 fracciones

Estudios in vitro/in vivo del metabolito

La DCDQ es un potente agonista de 5-HT_{2C} y es efectiva en varios modelos animales que predicen la actividad antisicótica, con un perfil antisicótico atípico. El perfil del comportamiento de la DCDQ en estos modelos es consistente con la actividad similar a la antisicótica atípica con riesgos de los efectos laterales extrapiramidales disminuidos. El agonista de 5-HT_{2C} DCDQ también puede ser efectivo para tratar los trastornos del ánimo o las disminuciones cognoscitivas asociadas con la esquizofrenia.

Varios metabolitos de la DCDQ se identificaron a través de los modelos in vivo e in vitro. Sin estar apegado a la teoría detrás de las trayectorias, las Figuras 1-4 muestran las trayectorias metabólicas propuestas que conducen a estos compuestos.

Metabolismo in vitro de la [^{14}C]DCDQ en los microsomas de hígado de ratones, ratas, perros y humanos, y en hepatocitos humanos crioconservados

El metabolismo de la [^{14}C]DCDQ se investigó mediante la incubación con microsomas de hígado de ratones CD-1 machos y hembras, ratas Sprague Dawley, perros sabuesos y microsomas de hígado humano recolectados a través de los sexos, y hepatocitos humanos masculinos

crioconservados. Utilizando los microsomas de hígado humano, los valores de K_m para la formación del metabolito M1 oxidativo principal y el carbamoil glucurónido M6 fueron de 10.8 y 56.1 μM, respectivamente.

Se observaron diferencias de las especies en el metabolismo de la DCDQ. El metabolismo oxidativo fue la trayectoria metabólica principal para la DCDQ en las incubaciones microsomales hepáticas. Varios metabolitos hidroxi (M1, M2, M3 y M4) de DCDQ se detectaron con los microsomas de hígado humano en la presencia de NADPH. El metabolito M1 no se detectó en otras especies. Los metabolitos M2 y M3 también se observaron con el perro y la rata. El metabolito M4 también se detectó en la rata, pero no en el ratón o el perro. El ratón pareció tener un metabolito menos extenso que otras especies y M2 fue el único metabolito detectado con los microsomas de hígado de ratón. Un N óxido de la DCDQ imina (M5) se detectó con el perro y el humano, pero no con microsomas de hígado de ratón o de rata. La formación de la DCDQ imina (P3) y los productos P1 y P2 actualmente no identificados, del hígado de todas las especies, no fue dependiente de NADPH y requiere investigación adicional. No se observaron diferencias por el sexo en las incubaciones microsomales para ratones, ratas y perros.

En la presencia de UDPGA, el carbamoil glucurónido de DCDQ (M6) se detectó con el perro y el humano, pero no con microsomas de hígado de ratón o de rata. Aunque la formación de los metabolitos hidroxi fue la trayectoria metabólica principal con los microsomas de hígado humano en la

presencia de NADPH y UDPGA, el carbamoil glucurónido fue el metabolito principal en los hepatocitos humanos a una concentración de DCDQ 50 µM.

En resumen, la DCDQ se convirtió a los metabolitos oxidativos y al carbamoil glucurónido en las incubaciones microsomales y los hepatocitos humanos.

Introducción

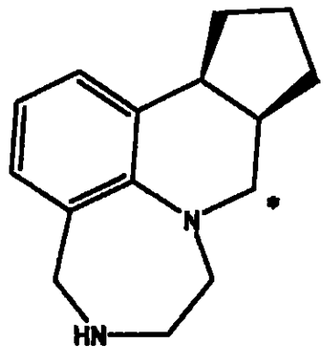
Este estudio investigó la biotransformación in vitro de la DCDQ en microsomas de hígado y hepatocitos humanos. Las trayectorias dependientes del citocromo P450 y de UDP-glucuronosiltransferasa se examinaron y los metabolitos de DCDQ se caracterizaron mediante LC/MS.

Materiales y métodos

Materiales

El clorhidrato de [^{14}C]DCDQ (Lote L25073-42) se sintetizó mediante el grupo de radiosíntesis de Wyeth Research (Pearl River, NY). La pureza radioquímica de la [^{14}C]DCDQ fue del 98.9% y la pureza química fue de 99.9% mediante detección UV. La actividad específica de la [^{14}C]DCDQ fue de 222.9 µCi/mg como una sal de clorhidrato. La estructura química de la [^{14}C]DCDQ se muestra con la posición de la marca de ^{14}C. El clorhidrato de DCDQ no marcado (Lote PB3312) con una pureza química de 98.6% se sintetizó por Wyeth Research (Pearl River, NY). A menos que se indique de

otra manera, cuando se hace referencia a la DCDQ o la [^{14}C]DCDQ, se supone la sal de clorhidrato.



DCDQ

$C_{15}H_{20}N_2$

PM monoisotípico de la base libre sin marcar = 228.2

* sitio de la marca de ^{14}C

Los hepatocitos humanos crioconservados, el medio de suspensión de los hepatocitos y el medio de cultivo de los hepatocitos se obtuvieron de In Vitro Technologies (Baltimore, MD). Los hepatocitos fueron de dos individuos masculinos (Lote 070, 57 años y Lote DRL, 44 años) con la actividad de la testosterona 6β-hidroxilasa de 55 y 43 pmol/106 células/minuto, respectivamente, como se determinó por In Vitro Technologies. Los cromosomas del hígado listados en el siguiente Cuadro 2 de ratones CD-1, ratas Sprague Dawley y perros sabueso también se obtuvieron de In Vitro Technologies.

CUADRO 2

Características de los Microsomas de Hígado de Ratón, Rata y Perro

Especies	Sexo	Lote No.	Número de Animales por recolección	Contenido de P450 (nmol/mg de proteína)
Ratón	Macho	100005	20	0.40
	Hembra	100005	23	0.79
Rata	Macho	111	50	0.55
	Hembra	108	5	0.57
Perro	Macho	M100006	4	0.43
	Hembra	108		

Los microsomas de hígado humano de los sujetos 3, 6, 15, 17, 18 y 19 se prepararon de los hígados recibidos de IIAM (Exton, PA). Estos microsomas se prepararon y caracterizaron por el Dr. Andrew Parkinson y se describen en Parkinson A. Preparation and characterization of human liver microsomes. Wyeth-Ayerst Research GTR-25617, 1994, que se incorpora en la presente como referencia. Las preparaciones microsomales se almacenaron a aproximadamente -70°C en alícuotas de 250-500 µL hasta el uso. El siguiente Cuadro lista las características de los microsomas de hígado humano utilizados en este estudio.

CUADRO 3

Características de los Microsomas Individuales de Hígado Humano

Número de Individuos	Datos preparados	Sexo	Contenido de P450 (nmol/mg de proteína
3	3/12/93	F	0.52
6	3/15/93	M	0.56
15	3/19/93	F	0.53
17	3/29/93	F	0.38
18	3/29/93	M	0.36
19	3/29/93	F	0.71
Valor medio de los microsomas recolectados (N = 6)			0.51

Los cócteles de centelleo Ultima Gold, Ultima Flo, Permafluor E+, y el absorbente de dióxido de carbono Carbo-Sorb E se compraron de Perkin Elmer (Wellesley, MA). El agua y el acetonitrilo grado cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) se obtuvieron de EMD Chemicals (Gibbstown, NJ). La sal de triamonio del ácido uridin 5'-difosfoglucurónico (UDPGA) y el EDTA se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El acetato de amonio y el cloruro de magnesio se obtuvieron de Mallinckrodt Baker Inc. (Phillipsburg, NJ). Todos los otros reactivos fueron grado analítico o mejor.

Métodos

Incubación de la [^{14}C]DCDQ con microsomas de hígado de ratones, ratas, perros y humanos

La [^{14}C]DCDQ se mezcló con DCDQ no radiomarcada (1:3 ó 1:5) en las incubaciones. Las incubaciones microsomales consisten de [^{14}C]DCDQ, cloruro de magnesio (10 mM) y microsomas de hígado incubados en 0.5 mL de amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.4. La [^{14}C]DCDQ (20 µL) en agua se agregó a los tubos de incubación que contienen el amortiguador, solución de cloruro de magnesio y los microsomas. Después de mezclar, los tubos se preincubaron durante 2 minutos en un baño de agua con agitación a 37°C. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de UDPGA o el sistema de regeneración de NADPH. La UDPGA se agregó como una alícuota de 50 µL de una solución 20 mM en agua, para proporcionar una concentración final de 2 mM. Se agregó un sistema de regeneración de NADPH (30 µL) a las incubaciones para evaluar el metabolismo mediado por CYP450. El sistema de regeneración de NADPH consistió de glucosa-6-fosfato (2 mg/mL), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (0.8 unidades/mL) y $NADP^+$ (2 mg/mL). Las incubaciones de control se realizaron bajo las mismas condiciones, pero sin el sistema de regeneración de NADPH, UDPGA o microsomas. Todas las incubaciones se realizaron por duplicado. Las incubaciones se detuvieron mediante la adición de 0.5 mL de metanol enfriado con hielo. Las muestras se mezclaron con vórtice. Las proteínas desnaturalizadas se separaron mediante centrifugación a 4300 rpm

y 4°C durante 10 minutos (supercentrífuga Modelo T21, Sorvall). Las pelotillas de la proteína se extrajeron con 0.5 mL de metanol. El sobrenadante se combinó para cada muestra, se mezcló y evaporó a un volumen de aproximadamente 0.3 mL bajo corriente de nitrógeno en un evaporador Zymark TurboVap LV (Caliper Life Science, Hopkinton, MA). La muestra concentrada se centrifugó y las alícuotas se radioprobaron y analizaron mediante HPLC. Este método recuperó un promedio de 92.1% de la radiactividad de la mezcla de reacción.

Las condiciones de la velocidad inicial se determinaron para el metabolismo de la DCDQ en incubaciones con microsomas de hígado humano en la presencia de NADPH o UDPGA. Las incubaciones para el estudio del curso del tiempo contenían 20 μM de [^{14}C]DCDQ y 0.5 mg/mL de las proteínas microsomales, y se incubaron a 37°C con agitación leve durante 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos. El estudio de dependencia de la proteína se realizó con 20 μM de [^{14}C]DCDQ incubada durante 20 minutos con 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 mg/mL de proteínas microsomales.

Los valores de K_m se determinaron con 0.5 mg/mL de microsomas de hígado humano incubados con [^{14}C]DCDQ durante 20 minutos con el sistema de regeneración de NADPH o durante 10 minutos con UDPGA. Las concentraciones de [^{14}C]DCDQ utilizadas fueron 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 75 y 100 μM.

Para evaluar las diferencias de las especies en el metabolismo mediado por el citocromo P450 y por UGT, la [^{14}C]DCDQ se incubó durante 20

minutos con 0.5 mg/mL de proteínas microsomales de hígado de ratones, ratas, perros y humanos, en la presencia del sistema de regeneración de NADPH o UDPGA. Las condiciones del ensayo fueron las mismas como se describió anteriormente y las concentraciones de DCDQ fueron 12 µM y 56 µM para el metabolismo mediado por el citocromo P450 y por UGT, respectivamente.

Las muestras se analizaron para los metabolitos mediante detección del flujo de la radiactividad y mediante LC/MS.

Preparación de los hepatocitos humanos

Los viales que contienen los hepatocitos humanos crioconservados se descongelaron en un baño de agua a 37°C con agitación suave hasta que el hielo casi se fundió. Los viales se retiraron del baño de agua y la agitación suave continuó a temperatura ambiente durante 30-60 segundos hasta que se descongelaron completamente. Las suspensiones de hepatocitos de cada vial se transfirieron inmediatamente a vasos de precipitados de 50 mL preenfriados en hielo. A cada vaso de precipitados, se les agregó gota a gota 12 mL del medio de suspensión de los hepatocitos enfriado con hielo durante un minuto, con agitación suave ocasional con la mano, para evitar que las células se sedimenten. Las suspensiones celulares se transfirieron a un tubo de 15 mL y se centrifugaron a 100 g fuerza durante 3 minutos a 4°C (supercentrífuga Modelo T21, Sorvall). El sobrenadante se desechó y las pelotillas se resuspendieron en 4 mL de medio de cultivo de los

hepatocitos enfriado con hielo. Las suspensiones celulares contienen aproximadamente 3.1 x 106 hepatocitos viables/mL. La viabilidad promedio fue de 76.0%, como se determinó utilizando la exclusión con Azul de Tripan y un hemacitómetro.

Incubación de [^{14}C]DCDQ con hepatocitos humanos

Las suspensiones celulares se distribuyeron en placas de 12 pozos a 1.0 ml por pozo. Las incubaciones se realizaron utilizando los hepatocitos recolectados de dos donadores. La [^{14}C]DCDQ en agua se agregó a la suspensión de hepatocitos a una concentración final de 10 ó 50 µM. Las incubaciones se llevaron a cabo a 37°C durante 4 horas en un incubador suministrado con 5% de CO_2. Al final de la incubación, la reacción se detuvo mediante la adición de 200 µL de metanol frío a cada pozo. El contenido de cada pozo se transfirió a un tubo para centrífuga de 15 mL y se sometió a sonicación durante 30 segundos. Después de mezclar con vórtice con 6 mL de metanol y a continuación la centrifugación, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se evaporó a aproximadamente 0.5 mL en un evaporador TurboVap. El residuo se analizó mediante HPLC y LC/MS.

Análisis con HPLC

Un sistema para HPLC modelo 2690 Waters (Waters Corp., Milford, MA) con un tomador de muestras automático integrado se utilizó para el análisis. Las separaciones se lograron en una columna Phenomenex Luna

C_{18}(2) (2x150 mm, 5 µm) (Phenomenex, Torrance, CA) acoplada con un cartucho de filtro (4x2 mm). Un detector UV de longitud de onda variable se ajustó para verificar a 250 nm y un detector del flujo de la radiactividad Flo-One β Modelo A525 (Perkin Elmer) con una celda de flujo LQTR de 250 µL se utilizó para la adquisición de datos. La velocidad de flujo del fluido de centelleo Ultima Flow M fue de 1 mL/minuto, proporcionando una relación de mezclado del cóctel de centelleo a la fase móvil de 5:1. La cámara de la muestra en el tomador de muestras automáticos se mantuvo a 4°C, mientras que la columna estaba a una temperatura ambiente de aproximadamente 20°C. La fase móvil consistió de acetato de amonio 10 mM, pH 4.5 (A) y metanol (B) y se suministró a 0.2 mL/minuto. Las condiciones del gradiente lineal fueron como sigue:

CUADRO 4

Tiempo (minutos)	A (%)	B (%)
0	90	10
3	90	10
25	60	40
45	15	85
50	15	85

Cromatografía líquida/espectrometría de masas

Un sistema para HPLC Modelo 1100 Agilent (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) que incluye un tomador de muestras automático y un detector UV de arreglo de diodo se utilizó para el análisis de LC/MS. El

detector UV se ajustó para verificar de 200 a 400 nm. Para el análisis de LC/MS seleccionado, los radiocromatogramas se adquirieron utilizando un detector de flujo de la radiactividad β-Ram modelo 3 (IN/US Systems Inc., Tampa, FL) equipado con una celda de flujo de centelleo sólido. Las separaciones se lograron en una columna Phenomenex Luna $C_{18}(2)$ (2x150 mm, 5 µm) bajo las mismas condiciones como se describió anteriormente.

El espectrómetro de masas utilizado para la caracterización del metabolito fue un espectrómetro de masas híbrido de tiempo de vuelo con cuadrupolo Q-TOF-2 Micromass (Nature Corp.). El espectrómetro de masas se equipó con una interconexión de ionización con electrorrocío (ESI) y se operó en el modo de ionización positiva. Se utilizaron ajustes de la energía de colisión de 5 y 30 eV para las exploraciones completas de MS y MS/MS, respectivamente. Los ajustes para el espectrómetro de masas se listan a continuación.

CUADRO 5

Ajustes del Espectrómetro de Masas Q-TOF-2 Micromass	
Voltaje capilar	3.0 kV
Cono	30 V
Temperatura del bloque de la fuente	100°C
Temperatura del gas de desolvación	250°C
Flujo del gas de desolvación	550 L/hora
Flujo del gas del cono	50 L/hora
Presión de entrada del gas CID	1.947-2.017 kg_f/cm^2 (13-14 psig)
Resolución TOF-MS (m/Δm)	8000

Análisis de los datos

Se utilizó el programa analítico Flo-One (Perkin Elmer, versión 3.6) para integrar los picos radiactivos. Se utilizó el programa de computadora Excel® 97 de Microsoft para calcular las medias y las desviaciones estándar y para realizar la prueba t de Student. Se utilizó el programa Micromass MassLynx software (Waters, versión 4.0) para la recolección y análisis de los datos de LC/MS.

Resultados

Determinación de los valores de K_m con microsomas de hígado humano

Las condiciones de la velocidad inicial y los valores de K_m para la formación del metabolito de [^{14}C]DCDQ se determinaron para los microsomas de hígado humano. En los estudios de dependencia con el tiempo, la formación dependiente de NADPH de los metabolitos oxidativos principales (M1, M2, M3 y M4) fue lineal durante 20 minutos y la formación del carbamoil glucurónido (M6) fue lineal durante 10 minutos (datos no mostrados). En los estudios de dependencia de la proteína, la formación del metabolismo oxidativo y el carbamoil glucurónido fue lineal hasta 0.5 mg/mL de la proteína microsomal. Los valores de K_m para la formación del metabolito oxidativo principal M1 y el carbamoil glucurónido M6 en los microsomas de hígado humano fueron de 10.8 y 56.1 µM, respectivamente. Los valores de K_m para la formación de los metabolitos M2, M3 y M4 en microsomas de hígado

humano variaron de 8.9 a 13.8 µM. El valor de K_m para la formación del metabolito M5 en los microsomas de hígado humano fue de 36.2 µM.

Metabolismo de la [^{14}C]DCDQ por los microsomas del hígado de ratones, ratas, perros y humanos

Para la comparación de las especies en incubaciones microsomales, las concentraciones de DCDQ para el metabolismo mediado por P450 y por UGT fueron de 12 y 56 µM, respectivamente, que fueron aproximadamente los valores de K_m. En la presencia del sistema de regeneración de NADPH, cuatro metabolitos hidroxi (M1, M2, M3 y M4) se detectaron con microsomas humanos. El metabolito M1 no se detectó en otras especies. Los metabolitos M2 y M3 se observaron con el perro y la rata. El metabolito M4 también se detectó en la rata, pero no en el ratón o el perro. El ratón pareció tener un metabolismo menos extenso que otras especies, y M2 fue el único metabolito detectado con los microsomas de hígado de ratón. Un N óxido de DCDQ imina (M5) se detectó con el perro y el humano, pero no en el ratón o rata. Tres otros picos (P1, P2 y una DCDQ imina P3) también se observaron en las incubaciones microsomales. La formación de P1, P2 y P3 no fue dependiente de NADPH. Puesto que estos productos no se formaron en las incubaciones de control sin los microsomas (datos no mostrados), su formación puede catalizarse mediante enzimas que no son de P450.

En la presencia de UDPGA, la formación de un carbamoil glucurónido de DCDQ (M6) se detectó con los microsomas de hígado de perro

y humano, pero no de ratón o rata. Cuando la DCDQ (20 µM) se incubó con microsomas de hígado humano en la presencia de NADPH y UDPGA, la formación de los metabolitos hidroxi fue la trayectoria metabólica principal, y sólo cantidades menores del carbamoil glucurónido se detectaron. No se observaron diferencias del género en las incubaciones microsomales para el ratón, rata o perro.

Metabolismo de la [^{14}C]DCDQ por los hepatocitos humanos

Cuando la DCDQ se incubó con hepatocitos humanos, el carbamoil glucurónido (M6) fue el metabolito más prominente a una concentración de DCDQ 50 µM. Los metabolitos oxidativos también se observaron a una concentración de DCDQ 50 µM, aunque menos abundantes con relación al carbamoil glucurónido. Las incubaciones que contienen DCDQ 10 µM con hepatocitos humanos produjeron los metabolitos oxidativos a niveles que se aproximan a aquéllos del carbamoil glucurónido. Además de los metabolitos formados en las incubaciones microsomales humanas, se detectó otro metabolito (M7). La DCDQ imina (P3), que se formó en los microsomas, también se observó en las incubaciones de hepatocitos.

Caracterización del metabolito mediante análisis de LC/MS

Los espectros de masa se obtuvieron mediante análisis de LC/MS y LC/MS/MS para la DCDQ y sus metabolitos. La caracterización estructural de estos compuestos se resume en el Cuadro 6.

CUADRO 6

Metabolitos de la DCDQ generados mediante microsomas y hepatocitos de hígado

Productos	$[M+H]^+$	Sitio del metabolismo	Fuente
M1, hidroxi DCDQ	245	Anillo de diazepan	HM, HH
M2, hidroxi DCDQ	245	Anillo de piridina	MM, RM, DM, HM, HH
M3, hidroxi DCDQ	245	Anillo de ciclopentano	MM, RM, DM, HM, HH
M4, hidroxi DCDQ	245	Anillo de ciclopentano	MM, RM, DM, HM, HH
M5, óxido de DCDQ imina	243	Anillo de diazepan	DM, HM, HH
M6, carbamoil glucurónido de DCDQ	449	Anillo de diazepan	DM, HM, HH
M7, ceto DCDQ	243	Anillo de piridina o ciclopentano	HH
P3, DCDQ imina	227	Anillo de diazepan	MM, RM, DM, HM, HH
DCDQ	229		MM, RM, DM, HM, HH

MM: Microsomas de hígado de ratón
RM: Microsomas de hígado de rata
DM: Microsomas de hígado de perro
HM: Microsomas de hígado de humano
HH: Hepatocitos humanos

La caracterización de la masa espectral de la DCDQ y sus metabolitos identificados en cada uno de los estudios se discute además a continuación.

Discusión

Las diferencias de las especies se observaron en el metabolismo de la DCDQ. El metabolismo oxidativo fue la trayectoria metabólica principal para la DCDQ en las incubaciones microsomales hepáticas. Varios metabolitos hidroxi (M1, M2, M3 y M4) de la DCDQ se detectaron con los microsomas de hígado humano en la presencia de NADPH (Figura 1). Los metabolitos M2 y M3 también se observaron con los microsomas de hígado de perro y de rata. El ratón tuvo un metabolismo menos extenso que otras especies, y M2 fue el único metabolito detectado con los microsomas de hígado de ratón. Un N óxido de DCDQ imina (M5) se detectó en las incubaciones microsomales para perro y humano, pero no para los microsomas de hígado de ratón o de rata. En la presencia de UDPGA, el carbamoil glucurónido de DCDQ (M6) se detectó con el perro y el humano, pero no en el ratón o la rata. Aunque la formación de los metabolitos hidroxi fue la trayectoria metabólica principal con los microsomas de hígado humano en la presencia de NADPH y UDPGA, el carbamoil glucurónido M6 fue el metabolito principal en hepatocitos humanos a una concentración de DCDQ 50 µM. Los sistemas de enzimas diferentes a P450 también pueden contribuir al metabolismo de la DCDQ mediante la formación de una DCDQ imina (P3) y otros productos (P1 y P2). La formación de los productos P1, P2 y P3 no fue dependiente de NADPH, y requiere una investigación adicional puesto que estuvieron generalmente presentes en todas las incubaciones con

microsomas de hígado y hepatocitos. No se observaron diferencias por el sexo para los ratones, ratas o perros en las incubaciones microsomales.

En resumen, la DCDQ se convirtió a los metabolitos oxidativos y a un carbamoil glucurónido en incubaciones microsomales y hepatocitos humanos.

Metabolismo in vivo de la [^{14}C]DCDQ en ratas Sprague-Dawley machos y hembras después de una sola administración con sonda oral (5 mg/kg)

Sinopsis

El presente estudio investigó el metabolismo in vivo de la [^{14}C]DCDQ en ratas Sprague-Dawley machos y hembras después de una sola administración oral (5 mg/kg). La sangre, el plasma y el cerebro se recolectaron a 2, 4, 8 y 24 horas postdosis de las ratas macho y a las 2 y 8 horas postdosis de las ratas hembra. La orina y las heces se recolectaron de las ratas macho a intervalos de 0-8 y 8-24 horas postdosis.

En las ratas macho, las concentraciones de la radiactividad en plasma fueron de 632 ± 144, 659 ± 16.5, 465 ± 43.1 y 46.9 ± 8.30 ng equivalentes/mL a 2, 4, 8 y 24 horas postdosis, respectivamente. Para las ratas hembra, la concentración de la radiactividad en plasma media de 658 ± 189 ng equivalentes/mL a las 2 horas postdosis fue similar a las ratas macho, pero la concentración de la radiactividad promedio de 338 ± 60.7 ng equivalentes/mL a las 8 horas postdosis fue menor que en las ratas macho.

La relación de sangre a plasma promedio fue de aproximadamente 1.1 entre 2 y 8 horas postdosis, indicando la división limitada de la DCDQ y sus metabolitos en las células sanguíneas.

La DCDQ representó un promedio de 13% a 20% de la radiactividad en plasma entre 2 y 8 horas postdosis. Las muestras del plasma de 24 horas no se analizaron para los perfiles debido a las bajas concentraciones de la radiactividad. Los cambios en los perfiles del metabolito no fueron evidentes con el tiempo. Los metabolitos detectados en el plasma incluyeron los metabolitos de hidroxi DCDQ (M1, M2, M3, M4 y M10), ceto DCDQ (M7), y los metabolitos de la fase II del sulfamato de DCDQ (M12), el sulfamato de dideshidro DCDQ (M14), los sulfatos de hidroxi DCDQ (M8 y M13), hidroxi DCDQ glucurónido (M9) e hidroxi DCDQ acetilada (M11). Los perfiles del metabolito en plasma exhibieron diferencias relacionadas con el sexo. Aunque los metabolitos de hidroxi DCDQ (M1, M2 y M3), la ceto DCDQ (M7) y el hidroxi DCDQ glucurónido (M9), fueron los metabolitos principales en el plasma de rata macho, el metabolito de hidroxi DCDQ (M3), el sulfato de hidroxi DCDQ (M8), el hidroxi DCDQ glucurónido (M9) y el sulfamato de DCDQ (M12), fueron los metabolitos principales en las ratas hembra. La diferencia por el sexo primaria fue en la formación de los sulfatos o sulfamatos.

La excreción urinaria fue una ruta principal de eliminación de la DCDQ administrada oralmente, y constituyó 66.7% de la dosis. Los metabolitos principales observados en las muestras de plasma también se

detectaron en la orina, en donde la DCDQ constituyó menos que 1% de la dosis. Los metabolitos hidroxi (M1 y M3), la ceto DCDQ (M7) y el glucurónido (M9), fueron los metabolitos principales en la orina. Un promedio de 21.1% de la radiactividad dosificada se recuperó en las heces. Los metabolitos M3, M8, M9, M10, M11 y sólo se detectaron cantidades en trazas de DCDQ en las heces de ratas macho.

La radiactividad en el tejido del cerebro fue significativamente más alta que en el plasma a las 2, 4 y 8 horas postdosis. Las concentraciones de la radiactividad del cerebro fueron 5.12 ± 1.28, 4.94 ± 0.44, 3.25 ± 0.99 y 0.037 ± 0.002 µg equivalentes/g de tejido a 2, 4, 8 y 24 horas postdosis para las ratas macho, respectivamente, mientras que las concentraciones fueron 6.38 ± 2.22 y 2.85 ± 0.68 µg equivalentes/g de tejido a las 2 y 8 horas postdosis para las ratas hembra, respectivamente. Las relaciones de la radiactividad cerebro a plasma promedio entre las 2 y 8 horas postdosis variaron de 6.9 a 9.6, indicando una captación significativa por el tejido del cerebro. Para las 24 horas postdosis, la relación de la radiactividad de cerebro a plasma promedio disminuyó a 0.8. La DCDQ constituyó un promedio de más del 90% de la radiactividad cerebral para las ratas macho y hembra entre 2 y 8 horas postdosis. Basándose en las concentraciones de la radiactividad y la distribución cromatográfica de la radiactividad en el cerebro, se estimó que las relaciones de DCDQ de cerebro a plasma promedio variaron de 49.9 a 56.1. No hubo diferencias por el género significativas o cambios con el tiempo entre las 2 y 8 horas postdosis. Unicamente

cantidades menores de los metabolitos M1, M3, M7, M10 y M11 se detectaron en el cerebro de las ratas macho o hembras. Estos datos indican que la DCDQ cruzó fácilmente la barrera sangre-cerebro, mientras que la captación de los metabolitos en el tejido del cerebro fue limitada. Las relaciones de la radiactividad de cerebro a plasma también sugieren que la eliminación del cerebro ocurrió rápidamente después de 8 horas postdosis, puesto que las relaciones disminuyeron de 6.9 a 0.8 a las 24 horas postdosis.

En resumen, la DCDQ se metabolizó de manera extensa en las ratas a los metabolitos predominantemente oxidativos. Los perfiles en plasma para las ratas macho y hembra difirieron en los conjugados de sulfato y sulfamato de la DCDQ y sus metabolitos oxidativos. La DCDQ fue el componente relacionado con el fármaco predominante en el cerebro, mientras que sólo se observaron cantidades menores de los metabolitos, y la diferencia por el género no fue evidente. La DCDQ cruzó fácilmente la barrera sangre-cerebro, mientras que la captación de los metabolitos fue limitada a cantidades menores de los metabolitos oxidativos.

Introducción

Un estudio del balance de masa previo mostró que la orina fue la ruta principal A de excreción en ratas, con un promedio de 64.3% de la radiactividad dosificada recuperada en la orina. Un estudio in vitro con microsomas de hígado mostró que el metabolismo oxidativo fue la trayectoria metabólica principal para la DCDQ en ratas. (Iwasaki K, Shiraga T, Tada K,

Noda K, Noguchi H. Age- and sex-related changes in amine sulphoconjugation in Sprague-Dawley strain rats. Comparison with phenol and alcohol sulphoconjugations. Xenobiotica. 1986; 16:717-723). El presente estudio investigo el metabolismo de la [^{14}C]DCDQ en ratas después de una sola dosis oral de 5 mg/kg.

Materiales y métodos

Materiales

El clorhidrato de [^{14}C]DCDQ se sintetizó mediante el grupo de radiosíntesis de Wyeth Research (Pearl River, NY), como se describe en el estudio in vitro discutido anteriormente. Los cócteles de centelleo Ultima Gold, Ultima Flo, Permafluor E+-, y el absorbente de dióxido de carbono Carbo-Sorb E, se compraron de Perkin Elmer (Wellesley, MA). El Polisorbato 80 se obtuvo de Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, NJ), y la metilcelulosa de Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI). Los solventes utilizados para la extracción y para el análisis cromatográfico fueron grado reactivo para HPLC o ACS de EMD Chemicals (Gibbstown, NJ).

Métodos

Administración del fármaco y recolección del espécimen

La preparación de la dosis, la dosificación del animal y la recolección del espécimen se realizaron en Wyeth Research, Collegeville, PA. El vehículo de la dosis contuvo 2% (peso/peso) de Tween 80 y metilcelulosa

al 0.5% en agua. En el día de la dosificación, la [^{14}C]DCDQ (12.2 mg) y la DCDQ no marcada (36.5 mg), se disolvieron en el vehículo a una concentración final de aproximadamente 2 mg/mL.

Las ratas macho que pesan de 318 a 345 gramos y las ratas hembra que pesan de 227 a 255 gramos al momento de la dosificación, se compraron de Charles River Laboratories, Wilmington, MA. A las ratas sin ayunar se les dio una sola dosis de 5 mg/kg (~300 µCi/kg) de DCDQ a un volumen de 2.5 mL/kg vía sonda intragástrica. A los animales se les proporcionó alimento para rata purina y agua ad libitum, y se mantuvieron individualmente en jaulas para el metabolismo. Las ratas macho se sacrificaron a las 2, 4, 8 y 24 horas después de la administración de la dosis. Las ratas hembra se sacrificaron a las 2 y 8 horas después de la administración de la dosis.

Con el sacrificio, las muestras de sangre se recolectaron mediante punción cardiaca en tubos que contienen EDTA como el anticoagulante y se colocaron en hielo. Se retiraron alícuotas de 50 µL para la combustión y determinación del contenido de radiactividad. El plasma se obtuvo inmediatamente de la sangre restante mediante centrifugación a 4°C. Los cerebros se escindieron después de la perfusión con 50 mL de suero fisiológico estéril y enfriado. Las muestras de orina se recolectaron en hielo seco a intervalos de 0-8 y 8-24 horas postdosificación. Las heces se recolectaron a intervalos de 0-8 y 8-24 horas postdosificación a temperatura ambiente, y se homogeneizaron como se describió previamente. Los

especimenes biológicos y las alícuotas de la solución de dosificación a la pre y postdosis se almacenaron a aproximadamente -70°C hasta que se analizaron.

Determinaciones de la radiactividad

Las alícuotas de plasma (20 µL) y orina (50 µL) se analizaron para las concentraciones de la radiactividad. Las determinaciones de la radiactividad de la dosis, el plasma y la orina se hicieron con contador de centelleo líquido TR/LL Modelo 3100 Tri-Carb (LSC) (Perkin Elmer), utilizando 10 mL de Ultima Gold como el fluido de centelleo.

Las muestras de cerebro y fecales se pesaron y homogeneizaron en agua a relaciones de volumen a peso de aproximadamente 1:1 y 5:1, respectivamente. Las alícuotas de sangre (50 µL), homogenados de cerebro (0.1 gramos) y homogenados fecales (0.2 gramos), se colocaron en conos Combusto con almohadillas Combusto y se quemaron. Un Oxidante de la Muestra Tri-Carb modelo 307, equipado con un Tomador de Muestras Automático Oximate-80 Robotic (Perkin Elmer), se utilizó para la combustión. El $^{14}CO_2$ liberado se atrapó con un absorbente de dióxido de carbono Carbo-Sorb E, se mezcló con el cóctel de centelleo líquido PermaFluor® E+ y se contó en un contador de centelleo líquido TR/LL Modelo 3100 de Tri-Carb (Perkin Elmer). La eficiencia de la oxidación del oxidante fue de 98.2%.

Un detector de radiactividad Flo-One β Modelo A525 (Perkin Elmer) con una celda de flujo LQTR de 250 µL se utilizó para la detección de la radiactividad en línea para la HPLC. La velocidad de flujo del fluido de

centelleo Ultima Flow M fue de 1 mL/minuto, proporcionando una relación de mezclado del cóctel de centelleo a la fase móvil de 5:1. Los límites de detección fueron de aproximadamente 1 ng equivalente/g para el cerebro, 2 ng equivalentes/mL para el plasma, 5 ng equivalentes/g para las heces y 10 ng equivalentes/mL para la orina.

Análisis de la dosis

Las alícuotas de las soluciones de la pre y postdosis se diluyeron con metanol al 25% en agua y se analizaron para las concentraciones de la radiactividad como se describió anteriormente. Aproximadamente 100,000 DPM en 10 µL de la solución de dilución se analizaron mediante HPLC para la pureza radioquímica y la pureza química. Para determinar la radiactividad específica de la suspensión de la dosis, la DCDQ no radiomarcada se disolvió en metanol, se diluyó con metanol al 25% en agua, y se analizó de manera concurrente mediante HPLC para generar una curva estándar. Las alícuotas (10 µL) de la solución de la dosis diluida se inyectaron en una columna de HPLC y las fracciones se recolectaron a intervalos de 1 minuto después de la detección UV. La radiactividad en cada fracción se determinó. Las fracciones también se recolectaron de una inyección blanco para obtener el nivel de fondo de la radiactividad.

Perfiles del metabolito en plasma

Las muestras de plasma se analizaron para los perfiles del metabolito mediante HPLC. Las alícuotas de 1.5 mL de plasma se mezclaron con 3.0 mL de metanol, se colocaron en hielo durante aproximadamente 10 minutos, y a continuación se centrifugaron. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. Las pelotillas de la proteína se extrajeron una vez con 3.0 mL de metanol. Los sobrenadantes de la precipitación y la extracción de cada muestra se recolectaron, mezclaron y evaporaron a 22°C bajo nitrógeno en un Zymark TurboVap LV (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA) a aproximadamente 0.3 mL. El extracto concentrado se centrifugó, el volumen del sobrenadante se midió y la eficiencia de la extracción se determinó analizando por duplicado alícuotas de 10 µL para la radiactividad. Una alícuota del sobrenadante (50-200 µL), se analizó mediante HPLC con detección del flujo de la radiactividad. Los extractos de plasma se analizaron también mediante LC/MS.

Análisis de las heces y la orina

Los homogenados fecales se analizaron para los perfiles del metabolito. Las alícuotas de 1 gramo de homogenados fecales se mezclaron con 2 mL de metanol, se colocaron en hielo durante aproximadamente 10 minutos y se centrifugaron. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. El residuo se extrajo tres veces con 2 mL de una mezcla de agua:metanol (3:7). Los sobrenadantes de cada muestra se combinaron, se evaporaron a

aproximadamente 1 mL, y se centrifugaron. La eficiencia de la extracción se determinó analizando las alícuotas de 10 µL del sobrenadante para la radiactividad. Una alícuota (50-200 µL) del sobrenadante se analizó mediante HPLC con detección del flujo de la radiactividad para el perfilado. Las muestras se analizaron también mediante LC/MS para caracterizar los picos radiactivos.

La orina se analizó para la concentración de la radiactividad y se analizó para los perfiles del metabolito mediante inyección directa en la columna de HPLC. Los análisis de LC/MS para la identificación del metabolito también se llevaron a cabo con muestras de orina.

Perfiles del metabolito en el cerebro

Los homogenados del cerebro se analizaron para los perfiles del metabolito. Las alícuotas de 1 gramo de homogenados de cerebro se mezclaron con un volumen igual de metanol, se colocaron en hielo durante aproximadamente 10 minutos y se centrifugaron. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. El residuo se extrajo tres veces con 1 mL de metanol. Los sobrenadantes de cada muestra se combinaron, se evaporaron a aproximadamente 0.5 mL, y se centrifugaron. La eficiencia de la extracción se determinó analizando las alícuotas de 10 µL del sobrenadante para la radiactividad. Una alícuota (100-200 µL) del sobrenadante se analizó mediante HPLC con detección del flujo de la radiactividad para el perfilado.

Las muestras también se analizaron mediante LC/MS para caracterizar los picos radiactivos.

Cromatografía líquida de alto rendimiento

Un sistema para HPLC modelo 2690 Waters (Waters Corp., Milford, MA), con un tomador de muestras integrado se utilizó para el análisis. Las separaciones se lograron en una columna Phenomenex Luna $C_{18}(2)$ (150 x 2.0 mm, 5 µm) (Phenomenex, Torrance, CA). La cámara de la muestra del tomador de muestras automático se mantuvo a 4°C, mientras que la columna estuvo a una temperatura ambiente de aproximadamente 20°C. Un detector de UV de longitud de onda variable se ajustó para verificar a 250 nm, y un detector de radiactividad Modelo A525 Flo-One β descrito anteriormente, se utilizaron para la adquisición de datos. La fase móvil del HPLC consistió de acetato de amonio 10 mM, pH 4.5 (A) y metanol (B), y se suministró a 0.2 mL/minuto. La condición cromatográfica A se utilizó para el análisis de la dosis, mientras que la condición B se utilizó para el análisis de los extractos de orina y plasma, cerebro y fecales.

CUADRO 7

CONDICION A		
Tiempo (minutos)	**A (%)**	**B (%)**
0	90	10
3	90	10
25	60	40
CONDICION B		
Tiempo (minutos)	**Tiempo (minutos)**	**Tiempo (minutos)**
0	90	10
6	90	10
35	60	40
65	15	85
70	15	85

Análisis de LC/MS

Un sistema para HPLC Modelo 1100 Agilent (Agilent Technologies, Wilmington, DE), que incluye un tomador de muestras automático y un detector de UV con arreglo de diodo, se utilizó para los análisis de LC/MS de las muestras de plasma y orina. El detector UV se ajustó para verificar de 200 a 400 nm. Para los análisis de LC/MS seleccionados, los radiocromatogramas se adquirieron utilizando un detector de flujo de la radiactividad modelo 3 β-Ram (IN/US Systems Inc., Tampa, FL), equipado con una celda de flujo de centelleo sólido. Las muestras fecales también se analizaron utilizando un sistema para HPLC Waters Alliance modelo 2690. Se equipó con un tomador de muestras integrado y un detector de UV de arreglo de diodo modelo 996 ajustado a 210-350 nm. El flujo del HPLC se dividió entre el analizador de centelleo de flujo Radiomatic modelo

150TR (Perkin Elmer) y el espectrómetro de masas. Otras condiciones para la HPLC fueron las mismas que la condición B descrita anteriormente.

El espectrómetro de masas utilizado para la caracterización del metabolito para el plasma y la orina fue un espectrómetro de masas híbrido de tiempo de vuelo con cuadrupolo Q-TOF-2 Micromass (Waters). El espectrómetro de masas se equipó con una interconexión de ionización de electrorrocío (ESI), y se operó en el modo de ionización positiva. Los ajustes de la energía de la colisión de 5 y 30 eV se utilizaron para las exploraciones completas de MS y MS/MS, respectivamente. Los ajustes para el espectrómetro de masas se listan a continuación.

CUADRO 8

Ajustes del espectrómetro de masas Q-TOF-2 Micromass	
Voltaje capilar	3.0 Kv
Cono	30 V
Temperatura del bloque de la fuente	100°C
Temperatura del gas de desolvación	250°C
Flujo del gas de desolvación	550 L/hr
Flujo del gas del cono	50 L/hr
Presión de entrada del gas CID	1.947-2.017 kg_f/cm^2 (13-14 psig)
Resolución TOF-MS (m/Δm)	8000

Un espectrómetro de masas Micromass Quattro Micro (Waters), también se utilizó para analizar las muestras fecales. Se equipó con una interconexión de ionización con electrorrocío (ESI), y se operó en el modo de ionización positiva. Los ajustes para el espectrómetro de masas se listan a continuación.

CUADRO 9

Ajustes del espectrómetro de masas Cuádruple Triple Micromass	
Rocío ESI	2.75 KV
Cono	30 V
Resolución de la masa MS1	1-1.5 Da de ancho a la mitad de la altura
Resolución de la masa MS2	0.7 Da ± 0.2 Da de ancho a la mitad de la altura
Flujo del gas de desolvación	875-950 L/hr
Flujo del gas del cono	20-35 L/hr
Temperatura del bloque de la fuente	80°C
Temperatura del gas de desolvación	250°C
Presión del gas de colisión	1.3-1.5 x 10^{-3} mBar
Energía de colisión	25 eV

La LC/MS/MS en el modo de verificación de la reacción (SRM) seleccionado (LC/SRM), se realizó con el espectrómetro de masas cuádruple triple para verificar la DCDQ y sus metabolitos en las muestras fecales. Las transiciones verificadas se listan a continuación.

CUADRO 10

Ion precursor (m/z)	Ion del producto (m/z)	Compuesto
229	186	DCDQ
243	200	M7
245	144	M3, M4 y M 10
245	184	M3, M4 y M 10
287	186	M11
325	245	M8, M13
421	245	M9

Análisis de los datos y evaluación estadística

Se utilizó el programa analítico Flo-One (Packard, versión 3.6), para integrar los picos radiactivos. Se utilizó el programa de computadora Excel® 97 de Microsoft para calcular las medias y las desviaciones estándar y realizar la prueba t de student. Se utilizó el programa Micromass MassLynx (Waters, versión 4.0) para la recolección y análisis de los datos de la LC/MS.

Resultados

Análisis de la dosis

La pureza radioquímica y la pureza química estimada (mediante detección ultravioleta) de la [^{14}C]DCDQ en la solución de la dosis fueron 99.0 ± 0.3% y 99.6 ± 0.1%, respectivamente. Las alícuotas pre y postdosis tuvieron la misma pureza. La actividad específica de [^{14}C]DCDQ en la solución de dosificación fue de 48.2 µCi/mg como la sal de clorhidrato. La concentración promedio del fármaco fue de 2.48 mg/mL como la sal de clorhidrato o 2.14 mg/mL como la base libre. La dosis real de la DCDQ administrada, varió de 5.2 a 5.4 mg/kg como la base libre, o 6.1 a 6.3 mg/kg como la sal de clorhidrato.

Concentraciones de la radiactividad en plasma y perfiles del metabolito

Las concentraciones de la radiactividad en la sangre y el plasma después de una sola dosis oral de [^{14}C]DCDQ, se resumen en el Cuadro 11.

CUADRO 11

Concentraciones en sangre y plasma de rata (ng equivalentes/mL) de la radiactividad después de la administración de una sola dosis oral de 5 mg/kg de [^{14}C]DCDQ

Tiempo (horas)	Sangre de los individuos			Media ± SD	Plasma de los Individuos			Media ± SD
Macho								
2	606	624	888	706 ± 158	567	531	797	632 ± 144
4	698	725	689	704 ± 18.7	678	652	647	659 ± 16.5
8	538	475	562	525 ± 45.3	487	415	492	465 ± 43.1
24	66.5	58.9	78.7	68.0 ± 10.0	50.5	37.4	52.8	46.9 ± 8.30
Hembra								
2	661	932	499	697 ± 219	635	857	481	658 ± 189
8	413	292	406	307 ± 68.4*	362	269	383	338 ± 60.7*

*: Significativamente menor que los machos a 8 horas, $p<0.05$

En las ratas macho, las concentraciones de la radiactividad en plasma promedio fueron 632, 659, 465 y 46.9 ng equivalentes/mL a 2, 4, 8 y 24 horas postdosis, respectivamente. En las ratas hembra, la concentración de la radiactividad en plasma promedio de 658 ng equivalentes/mL a las 2 horas fue similar a la de las ratas macho, pero la concentración en plasma promedio de 338 ng equivalentes/mL a las 8 horas postdosis fue

significativamente menor que en las ratas macho. Las muestras de sangre tuvieron concentraciones de la radiactividad ligeramente más altas que el plasma en todos los puntos de medición. Las relaciones de la radiactividad sangre a plasma promedio variaron de aproximadamente 1.1 para las ratas macho y hembra a 2, 4 y 8 horas postdosis a aproximadamente 1.5 para las ratas macho a las 24 horas postdosis, indicando una división limitada de la DCDQ o sus metabolitos en las células sanguíneas (Cuadro 12).

CUADRO 12

Relaciones de la radiactividad sangre a plasma en ratas después de la administración de una sola dosis oral de 5 mg/kg de [^{14}C]DCDQ

Tiempo (horas)	Relaciones sangre/plasma de los individuos			Media ± SD
Machos				
2	1.07	1.18	1.11	1.12 ± 0.06
4	1.03	1.11	1.07	1.07 ± 0.04
8	1.10	1.14	1.14	1.13 ± 0.02
24	1.32	1.58	1.49	1.46 ± 0.13
Hembras				
2	1.04	1.09	1.04	1.06 ± 0.03
8	1.14	1.08	1.06	1.09 ± 0.04

Los extractos del plasma contuvieron un promedio de 82 a 96% de la radiactividad del plasma total para las muestras de 2, 4 y 8 horas. Los perfiles del metabolito no se obtuvieron de las muestras de plasma de 24 horas debido a las bajas concentraciones de la radiactividad. La DCDQ se metabolizó de manera extensa en las ratas. El fármaco original representó un promedio de 13 a 20% de la radiactividad total en los extractos de plasma sin

diferencias evidentes entre los machos y las hembras con el tiempo (Cuadros 13 y 14). Varios metabolitos de hidroxi DCDQ (M1, M2, M3, M4 y M10) y ceto DCDQ (M7), se detectaron en el plasma (Figura 1). Los metabolitos de Fase II observados en el plasma incluyeron el sulfamato de DCDQ (M12, principal en el plasma de la hembra únicamente), sulfamato de dideshidro DCDQ (M14, principal en el plasma de la hembra únicamente), sulfatos de hidroxi DCDQ (M8 y M13), hidroxi DCDQ glucurónido (M9) e hidroxi DCDQ acetilada (M11) (Figura 1). El por ciento de distribución de la radiactividad en plasma no cambió de manera significativa con el tiempo, excepto para el metabolito M8, que fue marcadamente inferior a las 8 horas postdosis. Los metabolitos M1, M2, M3, M7 y M9 fueron los metabolitos principales en las ratas macho, mientras que M3, M8, M9 y M12 fueron los metabolitos principales en las ratas hembra, indicando diferencias por el sexo en los perfiles del metabolito (Cuadros 13 y 14). Un número de metabolitos relativamente menores detectados en los extractos del plasma no se caracterizaron, aunque cuando se combinan representan 19-38% de la radiactividad en plasma. Las concentraciones en el plasma de los metabolitos individuales basándose en su por ciento de distribución se presentan en el Cuadro 4. Las concentraciones de la DCDQ generalmente igualaron o excedieron las concentraciones de cada metabolito individual en el plasma de rata macho y hembra. En las ratas macho, los metabolitos M1, M3+M9 y M7 exhibieron las concentraciones más altas, mientras en que en las ratas hembra, los metabolitos M3+M9 y M8 fueron los metabolitos más prominentes.

CUADRO 13

Distribución cromatográfica (%) de la radiactividad en el plasma de rata después de la administración oral de [^{14}C]DCDQ (5 mg/kg)

Tiempo (horas)	M1	M2	M3+M9	M4	M7	M8	M10	M11	M12	M13	M14	DCDQ	Otros[3]
Machos													
2	14 (2.7)[b]	5.2 (2.3)	12 (4.8)	4.4 (0.85)	10 (1.3)	2.4 (1.5)	3.6 (0.83)	6.0 (2.2)	BQL[c]	1.9 (0.65)	BQL	14 (4.9)	26 (4.8)
4	9.1 (0.6)	3.4 (0.81)	16 (3.1)	4.3 (0.47)	9.4 (2.3)	4.6 (0.83)	1.5 (2.6)	5.2 (0.98)	BQL	2.2 (0.36)	BQL	14 (3.4)	31 (1.3)
8	8.9 (2.3)	4.3 (0.40)	14 (2.0)	2.5 (2.4)	12 (4.5)	BQL	3.0 (2.7)	3.6 (1.2)	BQL	1.4 (1.2)	BQL	13 (2.4)	38 (2.6)
Hembras													
2	2.0[d] (0.77)	BQL	14 (2.7)	2.4[e] (0.48)	5.4[d] (0.50)	14[d] (2.2)	5.2 (0.90)	6.1 (1.1)	5.2[e] (1.8)	2.6 (2.4)	4.0[d] (0.77)	20 (6.5)	20 (5.7)
8	1.9[d] (0.55)	1.5[e] (1.5)	18[e] (0.83)	2.7 (0.84)	5.6 (4.9)	10[d] (0.10)	5.6 (0.70)	4.9 (0.10)	3.3 (1.9)	1.6 (1.7)	4.9[d] (1.6)	15 (2.4)	25 (6.2)

a: Incluye más de diez metabolitos menores no identificados

b: Desviación estándar (n = 3)

c: BQL, Debajo del límite de cuantificación (2 ng equivalentes/mL para el plasma)

d: Significativamente diferente de los machos, $p<0.01$

e: Significativamente diferente de los machos, $p<0.05$

CUADR 14

Concentraciones estimadas en plasma (ng equivalentes/ml) de DCDQ y metabolitos en ratas después de la administración oral de [^{14}C]DCDQ (5 mg/kg)[a]

Tiempo (horas)	M1	M2	M3+M9	M4	M7	M8	M10	M11	M12	M13	M14	DCDQ
Machos												
2	88.4	32.3	76.4	28.3	63.6	15.1	23.7	37.2		11.6		86.9
	(1.77)[b]	(12.1)	(31.6)	(9.26)	(6.12)	(9.12)	(10.5)	(10.5)	BQL[c]	(3.66)	BQL	(35.2)
4	59.7	22.6	105	28.3	62.1	30.3	9.81	34.5		14.2		90.8
	(4.88)	(5.01)	(18.6)	(3.39)	(16.7)	(4.81)	(16.7)	(6.82)	BQL	(2.02)	BQL)	(22.8)
8	41.9	20.0	64.0	12.4	53.0		13.2	16.3		6.33		58.7
	(13.7)	(2.96)	(3.77)	(11.4)	(20.6)	BQL	(11.7)	(3.75)	BQL	(5.50)	BQL	(15.5)
Hembras												
2	12.6[d]		92.5	15.9	35.6[e]	91.1[e]	35.2	41.0	33.8[e]	16.6	25.1[d]	132
	(2.14)	BQL	(28.6)	(7.65)	(12.2)	(37.5)	(16.2)	(17.0)	(12.6)	(15.4)	(2.29)	(61.2)
8	6.52[d]	4.40[d]	61.8	8.96	17.5	34.4[d]	18.9	16.6	11.8	5.62	16.5[e]	49.4
	(2.16)	(4.15)	(8.84)	(1.52)	(15.3)	(6.44)	(3.69)	(2.95)	(7.79)	(6.75)	(6.51)	(12.6)

a: Las concentraciones se estimaron basándose en las concentraciones de la radiactividad en plasma totales (Cuadro 14) y el por ciento de distribución de la radiactividad en plasma (Cuadro 13).

b: Desviación estándar (n = 3)

c: BQL, Debajo del límite de cuantificación (2 ng equivalentes/mL para el plasma)

d: Significativamente diferente de los machos, $p<0.01$

e: Significativamente diferente de los machos, $p<0.05$

5

Excreción urinaria y perfiles del metabolito

La orina fue una ruta de excreción principal, con 66.7 ± 5.0% de la dosis radiactiva recuperada en las muestras de orina en las primeras 24 horas postdosis, con 32.5% en el periodo de 0-8 horas y 34.2% en el periodo de 8-24 horas. La mayoría de los principales metabolitos en plasma se detectaron también en la orina (Cuadro 15). Los metabolitos principales en la orina de las ratas macho incluyeron los metabolitos de hidroxi DCDQ (M1, M2, M3 y M4), ceto DCDQ (M7) e hidroxi DCDQ glucurónido (M9) (Cuadro 15). Los metabolitos individuales en la orina de 0-24 horas representaron aproximadamente 2 a 16% de la dosis administrada (Cuadro 16), mientras que la DCDQ representó menos que el 1% de la dosis. La distribución de los metabolitos fue similar para las recolecciones de 0-8 horas y 8-24 horas.

CUADRO 15

Distribución cromatográfica (%) de la radiactividad en la orina de las ratas macho después de la administración oral de [^{14}C]DCDQ (5 mg/kg)

Tiempo (horas)	M1	M2	M3+M9	M4	M7	M8	M10	DCDQ	Otros[a]
0-8	26.9 (3.43)[b]	9.51 (3.66)	18.8 (0.95)	3.73 (1.15)	9.68 (1.06)	3.56 (0.32)	3.32 (0.18)	1.29 (0.12)	23.2 (1.28)
8-24	22.5 (2.96)	5.83 (3.09)	18.8 (2.13)	3.08 (1.05)	10.1 (0.22)	4.36 (0.60)	2.70 (0.52)	1.46 (0.63)	31.2 (0.85)

a: Al menos diez metabolitos menores adicionales

b: Desviación estándar (n = 3)

CUADRO 16

Porcentaje de la dosis para los metabolitos urinarios en ratas después de la administración oral de [^{14}C]DCDQ (5 mg/kg)

Tiempo (horas)	M1	M2	M3+M9	M4	M7	M8	M10	DCDQ
0-8	8.67 (0.64)[a]	3.16 (1.53)	6.13 (0.91)	1.21 (0.37)	3.16 (0.57)	1.15 (0.00)	1.08 (0.14)	0.42 (0.02)
8-24	7.74 (1.87)	1.94 (0.85)	6.45 (1.45)	1.03 (0.29)	3.44 (0.45)	1.47 (0.13)	0.91 (0.07)	0.51 (0.28)
0-24	16.4 (2.45)	5.09 (2.35)	12.6 (1.83)	2.24 (0.27)	6.60 (0.31)	2.62 (0.13)	1.99 (0.15)	0.93 (0.29)

a: Desviación estándar (n = 3)

excreción fecal y perfiles metabólicos

La eliminación fecal constituyó del 21.1 ± 2.1% de la radiactividad dosificada recuperada en las primeras 24 horas postdosificación para las ratas macho. La eficiencia de la extracción para las muestras fecales de 8-24 horas fue de 64.3%, mientras que un promedio de 89.5% de la radiactividad se extrajo de las incubaciones de [^{14}C]DCDQ en los homogenados fecales de control. Los metabolitos de hidroxi DCDQ (M3 y M4), el sulfato de hidroxi DCDQ (M8), el hidroxi DCDQ glucurónido (M9) y el hidroxi DCDQ acetilado (M11), fueron los metabolitos principales en los extractos fecales de 8-24 horas, con únicamente cantidades en trazas del fármaco original detectado. Los perfiles del metabolito no se obtuvieron de las muestras fecales de 0-8 horas debido a la baja radiactividad (menos que 0.1% de la radiactividad dosificada). La incubación de [^{14}C]DCDQ en el

homogenado fecal a 37°C durante 24 horas, no mostró degradación detectable.

Contenido de radiactividad y perfiles del metabolito en el cerebro

Se extrajo un promedio de 84.5% de la radiactividad en el tejido del cerebro. Las concentraciones de radiactividad del cerebro fueron más altas que en el plasma a través de 8 horas postdosis, y la DCDQ fue el componente relacionado con el fármaco predominante en el cerebro de la rata. La DCDQ constituyó un promedio de más del 90% de la radiactividad en los extractos del cerebro para las ratas macho a 2, 4 y 8 horas postdosis, y más del 94% a las 2 y 8 horas postdosis para las ratas hembra (Cuadro 17). Las concentraciones de las radiactividad promedio en el cerebro de ratas macho y hembra fueron similares, y únicamente disminuyeron ligeramente de 2 horas (5.1 y 6.4 µg equivalentes/g para los machos y hembras, respectivamente) a 8 horas (3.2 y 2.8 µg equivalentes/g para las ratas macho y hembra, respectivamente). Para las 24 horas, la concentración del cerebro, a un promedio de 0.04 µg equivalentes/g para las ratas macho, fue menor que en el plasma. Las relaciones de la radiactividad de cerebro a plasma promedio entre 2 y 8 horas postdosificación fueron 6.9 a 8.2 para las ratas macho y 8.7 a 9.6 para las ratas hembra, y disminuyeron a 0.8 a 24 horas para las ratas macho. No hubo diferencias significativas en el contenido de radiactividad en el cerebro o las relaciones de la radiactividad de cerebro a plasma entre las ratas macho y hembra. Las relaciones de DCDQ de cerebro

a plasma fueron mucho más altas que las relaciones de radiactividad (Cuadro 17). La relación de DCDQ de cerebro a plasma promedio fue entre 49.9 y 56.1 de manera independiente al tiempo o el sexo. Unicamente se detectaron cantidades menores de los metabolitos M7, M10 y M11 en el cerebro de las ratas macho y hembra, y cada metabolito representó un promedio de menos del 4.5% de la radiactividad del cerebro. Dos metabolitos menores adicionales (M1 y M3), se observaron en el cerebro de las ratas macho. Para 8 horas postdosis, la mayoría de los metabolitos no se detectaron y únicamente se observó la DCDQ.

CUADRO 17

Concentraciones en el cerebro de la radiactividad y DCDQ con relación a las concentraciones en plasma después de la administración oral de [^{14}C]DCDQ (5 mg/kg) a ratas[a]

Tiempo (horas)	Concentración de la radiactividad (µg equivalentes/g)		% de DCDQ de la radiactividad del cerebro	Relación cerebro/plasma	
	Total	DCDQ[b]		Total	DCDQ
Machos					
2	5.12 ± 1.28	4.63 ± 1.18	90.4 ± 0.9	8.20 ± 1.95	56.4 ± 11.5
4	4.94 ± 0.44	4.47 ± 0.42	90.4 ± 0.5	7.49 ± 0.62	50.5 ± 8.88
8	3.25 ± 0.99	2.93 ± 0.93	90.0 ± 1.2	6.92 ± 1.62	50.5 ± 11.4
24	0.04 ± 0.00	NAc	NA	0.80 ± 0.12	NA
Hembras					
2	6.38 ± 2.22	6.08 ± 2.17	95.2 ± 1.0	9.57 ± 0.68	49.9 + 14.3
8	2.85 ± 0.68	2.68 ± 0.66	94.1 ± 0.7	8.69 ± 2.86	56.1 ± 17.8

a: Los datos se representan como la media ± S. D., N = 3

b: Las concentraciones de la DCDQ se estimaron en las concentraciones de la radiactividad total en el cerebro y el por ciento de distribución de la radiactividad del cerebro,

c: No disponible, concentración debajo del nivel del perfilado

Caracterización del metabolito mediante análisis de LC/MS

Los espectros de masas se obtuvieron mediante análisis de LC/MS y LC/MS/MS para DCDQ y sus metabolitos. La caracterización estructural de estos compuestos se resume en el Cuadro 18. La caracterización espectral de masas de la DCDQ y sus metabolitos se discute a continuación con la caracterización de los otros estudios descritos en la presente.

CUADRO 18

Metabolitos de la DCDQ identificados en ratas mediante análisis de LC/MS

Metabolito	Tiempo de retención (minutos)[a]	$[M+H]^+$	Sitios del metabolismo	Nombre del metabolito	Matriz[b]
M1	24.9	245	Anillo de diazepan	Hidroxi DCDQ	P, U, B
M2	28.8	245	Anillo de piridina	Hidroxi DCDQ	P, U
M3	35.3	245	Anillo de ciclopentano	Hidroxi DCDQ	P, U, B, F
M4	37.1	245	Anillo de ciclopentano	Hidroxi DCDQ	U, F
M7	32.2	243	Anillo de ciclopentano o piridina	Ceto DCDQ	P, U, B
M8	22.0	325	Anillo de piridina	Sulfato de hidroxi DCDQ	P, U, F
M9	35.4	421	Anillo de ciclopentano	Hidroxi DCDQ glucurónido	P, U, F
M10	41.7	245	Anillo de diazepan	Hidroxi DCDQ	U, B, F
M11	48.7	287	Anillo de diazepan	Hidroxi DCDQ acetilada	P, B, F
M12	60.4	309	Anillo de diazepan	Sulfamato de DCDQ	P, U
M13	35.6	325	Anillo de piridina	Sulfato de hidroxi DCDQ	
M14	15.8	305	Anillo de piridina y diazepan	Sulfamato de dideshidro DCDQ	P, U
DCDQ	53.8	229			P, U, F

a: Los tiempos de retención de LC/MS se normalizaron al archivo de datos de LC/MS GU_071803_0003, y GU_081303_0002.

b: P = plasma; U = orina; B = cerebro; F = heces. Los metabolitos fecales se detectaron mediante la verificación de la reacción selectiva.

mrsp

Discusión

La DCDQ se metabolizó de manera extensa en las ratas después de una sola administración oral de 5 mg/kg y el metabolismo oxidativo fue la trayectoria metabólica principal. La DCDQ representó un promedio de 13% a 20% de la radiactividad en plasma entre 2 y 8 horas postdosis y menos que el 2% de la radiactividad urinaria total a 0-8 y 8-24 horas postdosis. Los metabolitos observados en plasma incluyeron los metabolitos de hidroxi DCDQ (M1, M2, M3, M4 y M10), ceto DCDQ (M7), y los metabolitos de la fase II tales como sulfamato de DCDQ (M12), sulfamato de dideshidro DCDQ (M14), sulfatos de hidroxi DCDQ (M8 y M13), hidroxi DCDQ glucurónido (M9) e hidroxi DCDQ acetilada (M11) (Figura 1). El por ciento de distribución de la radiactividad en plasma no cambió de manera significativa con el tiempo, excepto para el metabolito M8, que fue significativamente menor a las 8 horas que a las 2 y 4 horas postdosis. Los perfiles del metabolito en plasma, exhibieron diferencias en las ratas macho y hembra. Aunque los metabolitos de hidroxi DCDQ (M1, M2 y M3), la ceto DCDQ (M7) y el hidroxi DCDQ glucurónido (M9), fueron los metabolitos principales en el plasma de ratas macho, el metabolito de hidroxi DCDQ (M3), el sulfato de hidroxi DCDQ (M8), el hidroxi DCDQ glucurónido (M9) y el sulfamato de DCDQ (M12), fueron los metabolitos principales en las ratas hembra. La diferencia primaria de los sexos fue en la formación de los sulfatos o los sulfamatos. Estas diferencias por los sexos fueron predecibles puesto que la actividad de la sulfotransferasa hacia el alcohol y las aminas alicíclicas se ha

reportado que es marcadamente más alta en las ratas hembras que en las ratas macho. (Naritomi Y, Niwa T, Shiraga T, Iwasaki K, Noda K. Isolation and characterization of an alicyclic amine N-sulfotransferase from female rat liver. Biological & Pharmaceutical Bulletin. 1994; 7:1008-1011).

La mayoría de los metabolitos principales en plasma también se detectaron en la orina. Se obtuvieron perfiles similares para las muestras de orina de 0-8 horas y de 8-24 horas. Los metabolitos principales en la orina de las ratas macho, incluyeron los metabolitos de hidroxi DCDQ (M1, M2, M3 y M4), ceto DCDQ (M7) e hidroxi DCDQ glucurónido (M9). Cada metabolito individual en la orina de 0-24 horas, representó aproximadamente 2 a 16% de la dosis administrada, mientras que la DCDQ representó menos que el 1% de la dosis. En las muestras fecales de 8-24 horas, los metabolitos de hidroxi DCDQ (M3 y M4), el sulfato de hidroxi DCDQ (M8), el hidroxi DCDQ glucurónido (M9) y la hidroxi DCDQ acetilada (M11), fueron los metabolitos principales observados, con únicamente cantidades en trazas del fármaco original detectado.

La radiactividad en el tejido del cerebro fue significativamente más alta que en el plasma a las 2, 4 y 8 horas postdosis. La DCDQ constituyó un promedio de más del 90% de la radiactividad del cerebro para las ratas macho y hembra. Las relaciones de la radiactividad de cerebro a plasma promedio entre 2 y 8 horas postdosis variaron de 6.9 a 9.6, indicando captación por el tejido del cerebro. Para las 24 horas postdosis, la relación de la radiactividad de cerebro a plasma promedio disminuyó a 0.8. No hubo

diferencias significativas en el contenido de radiactividad del cerebro o las relaciones de radiactividad cerebro a plasma entre las ratas macho y hembra. Las relaciones de DCDQ cerebro a plasma promedio variaron de 49.9 a 56.1, sin diferencias por el sexo o cambios con el tiempo entre 2 y 8 horas postdosis. Se detectaron cantidades menores de los metabolitos M7, M10 y M11 en el cerebro de las ratas macho y hembra. Estos datos indicaron que la DCDQ cruzó fácilmente la barrera sangre-cerebro, mientras que la captación de los metabolitos en el tejido del cerebro fue limitada. Las relaciones de la radiactividad de cerebro a plasma también sugieren que la eliminación del cerebro ocurrió rápidamente después de las 8 horas postdosis, puesto que las relaciones disminuyeron de 6.9 a 0.8 a las 24 horas postdosis. Aunque la división de la radiactividad en el cerebro fue evidente, la división en las células sanguíneas se limitó con las relaciones sangre a plasma de únicamente aproximadamente 1.1 entre 2 y 8 horas postdosis.

El metabolismo de la DCDQ pareció más extenso en el estudio presente en comparación con el estudio del metabolismo in vitro previo con microsomas de hígado de rata. Unicamente tres metabolitos oxidativos (M2, M3 y M4) se observaron con los microsomas de hígado de rata y no se observaron diferencias por el sexo. Sin embargo, las diferencias por el sexo en la formación de sulfatos y sulfamatos, que se observaron en la rata, no se investigaron en ningún sistema in vitro. Además de los metabolitos M2, M3 y M4 detectados con los microsomas de hígado de rata, otros metabolitos

oxidativos (M1, M7 y M10) y varios metabolitos de la fase II (M8, M11, M12, M13 y M14), también se observaron en las ratas (Figura 1).

En resumen, la DCDQ se metabolizó de manera extensa en las ratas a los metabolitos predominantemente oxidativos. Los perfiles en plasma para las ratas macho y hembra difieren en los conjugados de sulfato y sulfamato de DCDQ y algunos metabolitos oxidativos. La DCDQ fue el componente relacionado con el fármaco predominante en el cerebro, mientras que se observaron únicamente cantidades menores de metabolitos, y las diferencias por el sexo no fueron evidentes. La DCDQ cruzó fácilmente la barrera sangre-cerebro mientras que la captación de los metabolitos se limitó a cantidades menores de metabolitos oxidativos.

Metabolismo in vivo de la [^{14}C]DCDQ en perros macho después de una sola administración de una cápsula oral de 15 mg/kg

Sinopsis

El presente estudio investigó el metabolismo de la [^{14}C]DCDQ en cuatro perros sabueso machos después de una sola administración de 14.1 a 16.7 mg/kg de clorhidrato de [^{14}C]DCDQ en una cápsula con recubrimiento entérico. Las muestras en plasma se recolectaron a 2, 4, 8, 24 y 48 horas postdosis. Las heces y la orina se recolectaron a intervalos de 0-8, 8-24 y 24-48 horas postdosis. Las muestras se analizaron para el contenido de radiactividad y los perfiles del metabolito.

Las concentraciones en plasma de la radiactividad fueron 422 ± 573, 564 ± 748, 528 ± 566, 1340 ± 508 y 507 ± 135 ng equivalentes/mL a 2, 4, 8, 24 y 48 horas postdosis, respectivamente. Se observaron grandes variaciones individuales en las concentraciones de la radiactividad en plasma, que varían de 4 a 1640 ng equivalentes/mL a 2, 4 y 8 horas postdosis. Las concentraciones de la radiactividad en plasma más altas ocurrieron a 24 horas, excepto en el perro 2, en donde las concentraciones fueron las más altas a las 4 horas postdosis. Los datos son consistentes con las variaciones en la excreción de la radiactividad observada en las primeras 24 horas postdosis. La variabilidad puede asociarse con la absorción lenta y prolongada de la DCDQ en algunos perros, y las cápsulas con recubrimiento entérico. La relación de la radiactividad de sangre a plasma promedio para el perro fue de aproximadamente 0.72.

La DCDQ se metabolizó de manera extensa en perros. El metabolismo oxidativo fue la principal trayectoria metabólica, mientras que la formación de un DCDQ carbamoil glucurónido también se observó. La DCDQ representó 1.9% a 21% de la radiactividad en plasma a 2 y 4 horas, menos de 3% a 8 y 24 horas, y no se detectó a 48 horas postdosis. La DCDQ constituyó un promedio de menos del 11% de la radiactividad urinaria en todos los periodos de tiempo. En los extractos fecales, 54% a 97% de la radiactividad se atribuyó al fármaco original. Los metabolitos principales observados en el plasma a las 2 y 4 horas incluyeron hidroxi DCDQ (M1, M2 y M3), un N óxido DCDQ (M5), un cero DCDQ (M7), una hidroxi DCDQ imina (M15), un hidroxi

DCDQ glucurónido (M9) y el carbamoil glucurónido de la DCDQ (M6) (Figura 1). Los metabolitos M3 y M9 constituyeron la mayoría de la radiactividad en plasma a las 8, 24 y 48 horas postdosis. Los metabolitos M2, M3, M5 y M6 también se observaron en la incubación in vitro de DCDQ con microsomas de hígado de perro en la presencia de NADPH. Los metabolitos observados en el plasma del perro también se detectaron en la orina del perro, excepto para el metabolito M7. Un conjugado de sulfato de hidroxi DCDQ (M16) y un ácido diazepinil DCDQ carboxílico (M17), que no se detectaron en el plasma, se observaron en las muestras de orina. Los metabolitos de hidroxi DCDQ (M2, M3 y M19), un ceto DCDQ (M18) y la hidroxi DCDQ imina (M15), se detectaron en los extractos fecales. El metabolismo extenso y la absorción oral prolongada de la DCDQ constituyó probablemente la biodisponibilidad oral relativamente baja de aproximadamente 25.4% en perros.

El metabolismo de la DCDQ en perros exhibió algunas diferencias de las ratas. Algunos metabolitos oxidativos diferentes se observaron en las ratas y en los perros. Los metabolitos oxidativos M15, M16, M17, M18 y M19 no se observaron en ratas, mientras que un metabolito de hidroxi M4, que se observa en ratas, no se detectó en los perros. Más metabolitos de la fase II se observaron en las ratas que en los perros. Los sulfatos M8 y M13, y los sulfamatos M12 y M14 se observaron en las ratas, pero no en los perros. El sulfato M16 se observó en los perros, pero no en las ratas. El carbamoil glucurónido de DCDQ, que se detectó en el plasma y la orina del perro, no se observó en el plasma o la orina de la rata.

En resumen, la DCDQ se metabolizó de manera extensa en los perros, con el metabolismo oxidativo como la principal trayectoria metabólica, aunque la formación de un DCDQ carbamoil glucurónido también se observó.

Introducción

Los estudios de balance de la masa mostraron que un promedio de 64.3% de la dosis oral se excretó en la orina de la rata, mientras que 32.7% de la dosis se recuperó en la orina del perro, después de la administración de una cápsula con recubrimiento entérico. Cuando se incuba con microsomas de hígado de perro en la presencia de NADPH y UDPGA, la [^{14}C]DCDQ se convirtió a varios metabolitos oxidativos y a un carbamoil glucurónido. Un estudio de metabolismo previo en ratas, mostró que la DCDQ se metabolizó de manera extensa y el metabolismo oxidativo fue la trayectoria principal en las ratas. El presente estudio investigó el metabolismo de la [^{14}C]DCDQ después de una sola administración de una cápsula oral a los perros.

Materiales y métodos

Materiales

El clorhidrato de [^{14}C]DCDQ se sintetizó mediante el grupo de radiosíntesis de Wyeth Research (Pearl River, NY), como se describió anteriormente en los estudios in vivo. Los cócteles de centelleo Ultima Gold, Ultima Flo, Permafluor E+-, y el absorbente de dióxido de carbono Carbo-Sorb

E se compraron de Perkin Elmer (Wellesley, MA). El EDTA se obtuvo de Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI). Los solventes utilizados para la extracción y para los análisis cromatográficos fueron grado reactivo para HPLC o ACS de EMD Chemicals (Gibbstown, NJ).

5

Métodos

Preparación de la cápsula y análisis

Aproximadamente 11 mg de clorhidrato de la [^{14}C]DCDQ y 940 mg de clorhidrato de la DCDQ no marcado, se disolvieron en metanol y a 10 continuación se evaporaron bajo una corriente de nitrógeno hasta sequedad. Las cápsulas (#2), se llenaron con cantidades exactas (126.7-138.1 mg) de la sustancia activa mezclada de acuerdo con los pesos de los animales. Las cápsulas de gelatina llenas se recubrieron a continuación entéricamente de manera manual.

15 La sustancia activa en una cápsula extra se analizó para la pureza radioquímica y la actividad específica. Una alícuota de la sustancia activa se disolvió en DMSO, se diluyó en agua, y se analizó mediante HPLC con detección del flujo de la radiactividad y detección UV a 250 nm. Para determinar la actividad específica, las soluciones de DCDQ no marcadas a 20 cinco diferentes concentraciones se prepararon diluyendo una solución patrón en metanol, y se analizaron mediante HPLC para generar una curva estándar. El pico de UV de la [^{14}C]DCDQ se integró para calcular la cantidad de DCDQ contra la curva estándar. Las fracciones alrededor del pico de la [^{14}C]DCDQ

se recolectaron a intervalos de 1 minuto después de la detección UV. La radiactividad en cada fracción se determinó mediante conteo del centelleo líquido (LSC). Las fracciones también se recolectaron de una inyección blanco para obtener el nivel de fondo de la radiactividad.

Administración del fármaco y recolección del espécimen

Cuatro perros sabueso machos, que pesan de 7.6 a 9.8 kg al tiempo de la dosificación, fueron de una colonia interna. A cada perro se le dio una cápsula con recubrimiento entérico que contiene [^{14}C]DCDQ como la sal de clorhidrato. Los animales se alimentaron dos horas antes de la dosificación y se les proporcionó alimento para perro Purina y agua ad libitum, y se alojaron individualmente en jaulas metabólicas.

Las muestras de sangre se recolectaron de la vena yugular a 2, 4, 8, 24 y 48 horas después de la administración de la dosis en tubos que contienen EDTA potásico como en anticoagulante y a continuación se colocaron en hielo. Se retiraron alícuotas de 50 µL para la combustión y la determinación del contenido de la radiactividad. El plasma se obtuvo inmediatamente de la sangre restante mediante centrifugación a 4°C. Las muestras de orina se recolectaron en tubos en hielo seco a intervalos de 0-8, 8-24 y 24-48 horas postdosis. Las muestras fecales se recolectaron a intervalos de 0-8, 8-24 y 24-48 horas postdosis a temperatura ambiente, y se homogeneizaron. Los especimenes biológicos se almacenaron a aproximadamente -70°C hasta el análisis.

Determinaciones de la radiactividad

Las alícuotas de 50 µL de plasma y 100-200 µL de orina se analizaron para las concentraciones de la radiactividad. Las determinaciones de la radiactividad de la dosis, el plasma y la orina se hicieron con un LSC TR/LL Modelo 3100 Tri-Carb, utilizando 5-10 mL de Ultima Gold como el fluido de centelleo.

Las heces se pesaron y homogeneizaron en agua a una relación de volumen a peso de aproximadamente 5:1. Las alícuotas de sangre (200 µL) y los homogenados fecales (0.25-0.53 gramos), se colocaron en conos Combusto con almohadillas Combusto y se quemaron. Un oxidante de las Muestras Tri-Carb modelo 307, equipado con un tomador de muestras automático robótico Oximate-80 (Perkin Elmer), se utilizó para la combustión de las muestras de sangre y fecales. El $^{14}CO_2$ liberado se atrapó con el absorbente de dióxido de carbono Carbo-Sorb E, se mezcló con el cóctel de centelleo líquido PermaFluor® E+, y se contó en un contador de centelleo líquido TR/LL Modelo 3100 de Tri-Carb (Perkin Elmer). La eficiencia de la combustión fue de 98.9%.

Para los perfiles en plasma, se utilizó un lector de microplacas radiométrico TopCount NXT (Perkin Elmer), para analizar la radiactividad en las fracciones de HPLC recolectadas. El límite de detección del TopCount fue de aproximadamente 1 ng equivalente/mL. Un detector de radiactividad Modelo A525 Flo-One β (Perkin Elmer) con una celda de flujo LQTR de 250 µL, se utilizó para adquirir los datos para las muestras de orina y fecales. La

velocidad de flujo del fluido de centelleo Ultima Flow M fue de 1 mL/minuto, proporcionando una relación de mezclado del cóctel de centelleo a la fase móvil de 5:1. Los límites de detección por el detector Flo-One fueron de aproximadamente 200 ng equivalentes/mL para la orina y 12 ng equivalentes/g para las heces.

Perfiles del metabolismo en plasma

Las muestras de plasma se analizaron para los perfiles del metabolito mediante HPLC. Las alícuotas de plasma se mezclaron con dos volúmenes de metanol frío que contienen ácido trifluoroacético al 0.1% (TFA), colocado en hielo durante aproximadamente 2 minutos y a continuación se centrifugó. El fluido sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se evaporó a 22°C bajo nitrógeno en un LV Zymark TurboVap (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA) a un volumen de aproximadamente 0.3 mL. El residuo se centrifugó, el volumen del sobrenadante se midió y la eficiencia de la extracción se determinó mediante análisis por duplicado de alícuotas de 20 µL para la radiactividad. Una alícuota de 200 µL del sobrenadante se inyectó en la columna de HPLC, y el efluente se recolectó a intervalos de 20 segundos en Lumaplacas de 96 pozos (Perkin Elmer). Las placas se secaron durante la noche en un horno a 40°C y se analizaron mediante un TopCount. Los extractos del plasma se analizaron también mediante LC/MS.

Análisis de las heces y la orina

Los homogenados fecales se analizaron para los perfiles del metabolito. Las alícuotas de 1 gramo del homogenado fecal se mezclaron con 2 mL de metanol, se colocaron en hielo durante aproximadamente 10 minutos y se centrifugaron. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. El residuo se extrajo tres veces con 2 mL de una mezcla de agua:metanol (3:7). Los sobrenadantes de cada muestra se combinaron, se evaporaron a aproximadamente 1 mL, y se centrifugaron. La eficiencia de la extracción se determinó analizando alícuotas de 10 µL del sobrenadante para la radiactividad. Una alícuota (50-200 µL) del sobrenadante se analizó mediante HPLC con detección del flujo de la radiactividad para los perfiles del metabolito. Las muestras se analizaron también mediante LC/MS para caracterizar los picos radiactivos.

La orina se analizó para la concentración de la radiactividad y se analizó mediante HPLC con la detección del flujo de la radiactividad para los perfiles del metabolito mediante la inyección directa a la columna de HPLC. Los análisis de LC/MS para la identificación del metabolito también se llevaron a cabo con las muestras de orina.

Cromatografía líquida de alto rendimiento

Un sistema para HPLC modelo 2690 Waters (Waters Corp., Milford, MA), con un tomador de muestras automático integrado, se utilizó para los análisis. Las separaciones se lograron en una columna Phenomenex

Luna C_{18}(2) (150 x 2.0 mm, 5 µm) (Phenomenex, Torrance, CA). La cámara de la muestra del tomador de muestras automático se mantuvo a 4°C, mientras que la columna estaba a una temperatura ambiente de aproximadamente 20°C. Un detector UV de longitud de onda variable ajustado para verificar a 250 nm y una detector de radiactividad Modelo A525 Flo-One β, se utilizaron para la adquisición de los datos. La fase móvil de la HPLC consistió de acetato de amonio 10 mM, pH 4.5 (A) y acetonitrilo (B), y se suministró a 0.2 mL/minuto. La condición cromatográfica A se utilizó para el análisis de la dosis, mientras que la condición B se utilizó para el análisis de los extractos de orina y plasma, cerebro y fecales.

CUADRO 19

CONDICION A

Tiempo (minutos)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0	90	10
3	90	10
25	60	40
45	15	85
50	15	85

CONDICION B

Tiempo (minutos)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0	90	10
6	90	10
35	60	40
65	15	85
70	15	85

Análisis de LC/MS

Un sistema para HPLC Modelo 1100 Agilent (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), que incluye un tomador de muestras automático y un detector de UV de arreglo de diodo se utilizó para el análisis de LC/MS. El detector de UV se ajustó para verificar de 200 a 400 nm. Para los análisis LC/MS seleccionados, los radiocromatogramas se adquirieron utilizando un detector de flujo de la radiactividad modelo 3 β-Ram (IN/US Systems Inc., Tampa, FL), equipado con una celda de flujo de centelleo sólido. Las condiciones de la LC fueron las mismas que la condición B descrita anteriormente.

El espectrómetro de masas utilizado para la caracterización del metabolito fue un espectrómetro de masas híbrido de tiempo de vuelo con cuadrupolo Q-TOF-2 Micromass (Waters). El espectrómetro de masas se equipó con una interconexión de ionización con electrorrocío (ESI), y se operó en el modo de ionización positiva. Los ajustes de la energía de la colisión de 5 y 30 eV se utilizaron para las exploraciones completas de MS y MS/MS, respectivamente. Los ajustes para el espectrómetro de masas se listan a continuación.

CUADRO 20

Ajustes del Espectrómetro de masas Q-TOF-2 Micromass	
Voltaje capilar	3.0 kV
Cono	30 V
Temperatura del bloque de la fuente	100°C
Temperatura del gas de desolvación	250°C
Flujo del gas de desolvación	550 L/hr
Flujo del gas del cono	50 L/hr
Presión de entrada del gas CID	1.947-2.017 kg/cm^2 (13-14 psig)
Resolución TOF-MS (m/Δm)	8000

Análisis de los datos y evaluación estadística

Se utilizó el programa analítico Flo-One (Perkin Elmer, versión 3.6) para integrar los picos radiactivos. Se utilizó la Utilidad del Programa DataFlo (Perkin Elmer, beta versión 0.55) para convertir los archivos ASCII del contador de microplacas TopCount NXT en un formato CR para el procesamiento en el programa de Análisis Flo-One. Se utilizó el programa de computadora Excel® 97 de Microsoft para calcular las medias y las desviaciones estándar y para realizar la prueba t de estudent. Se utilizó el programa Micromass MassLynx (Waters, versión 4.0) para la recolección y el análisis de los datos de LC/MS.

Resultados

Análisis del contenido de la cápsula

La [^{14}C]DCDQ cargada en las cápsulas tenía una pureza radioquímica de aproximadamente 98.9% y una pureza química (mediante detección ultravioleta) de más del 99%. La actividad específica de la

[^{14}C]DCDQ en las cápsulas fue de 2.18 µCi/mg como la sal de clorhidrato. La dosis real de DCDQ administrada varió de 12.2 a 14.4 mg/kg como la base libre.

Concentraciones de la radiactividad en el plasma y perfiles del metabolito

Las concentraciones de la radiactividad en la sangre y el plasma después de una sola dosis de una cápsula de [^{14}C]DCDQ se resumen en el Cuadro 21.

CUADRO 21

Concentraciones en sangre y plasma (Ng equivalentes/Ml) de la radiactividad en perros después de una dosis oral única de 15 mg/kg de [^{14}C]DCDQ en una cápsula con recubrimiento entérico

Tiempo (horas)	Sangre 1[a]	2	3	4	Media ± SD	Plasma 1	2	3	4	Media ± SD
2	161	840	48.6	0.00	262 ± 391	360	1250	74.4	4.13	422 ± 573
4	319	1100	66.7	0.90	372 ± 505	500	1640	112	4.13	564 ± 748
8	331	878	176	5.41	347 ± 378	541	1310	256	4.13	528 ± 566
24	980	782	1360	556	920 ± 341	1530	1110	1940	769	1340 ± 508
48	333	434	364	241	343 ± 79.9	504	669	517	339	507 ± 135

a: Número de perros

Las concentraciones de la radiactividad en plasma promedio variaron de 423 ng equivalentes/mL a las 2 horas a 1340 ng equivalentes/mL a las 24 horas postdosis. La concentración de la radiactividad más alta ocurrió generalmente a las 24 horas postdosis, excepto para el perro 2, en donde las concentraciones fueron las más altas a las 4 horas postdosis. Se observaron grandes variaciones individuales en las concentraciones de la radiactividad en plasma, que varían de 4 a 1640 ng equivalentes/mL a las 2, 4 y 8 horas postdosis. Los datos están de acuerdo con las grandes variaciones en la excreción de la radiactividad, observadas en las primeras 24 horas postdosis. Estas variaciones pueden atribuirse a una absorción lenta y prolongada de la DCDQ en algunos perros. Las concentraciones de la radiactividad en sangre fueron menores que los niveles de radiactividad en plasma, y las relaciones de la radiactividad sangre a plasma promedio variaron entre 0.68 y 0.79 (Cuadro 22).

La división de la DCDQ y sus metabolitos en las células sanguíneas fue limitada, basándose en estas relaciones.

CUADRO 22

Relaciones de radiactividad de sangre a plasma en perros después de una dosis oral única de 15 mg/kg de [^{14}C]DCDQ en una cápsula con recubrimiento entérico

Tiempo (horas)	Relaciones sangre a plasma 1[a]	2	3	4	Media ± SD
2	0.51	0.77	0.75	NA[b]	0.68 ± 0.14
4	0.73	0.77	0.69	NA[b]	0.73 ± 0.04
8	0.70	0.77	0.79	NA[b]	0.75 ± 0.05
24	0.73	0.81	0.80	0.83	0.79 ± 0.04
48	0.76	0.74	0.81	0.82	0.78 ± 0.04

a: Número de perro

b: Datos no disponibles debido a las bajas concentraciones de la radiactividad.

La recuperación de la extracción fue mayor que el 71 % de la radiactividad en plasma. La DCDQ se metabolizó de manera extensa en los perros (Cuadros 23 y 24). A las 2 y 4 horas postdosis, la DCDQ representó 1.9% a 21% de la radiactividad en plasma. La DCDQ representó menos que el 3% de radiactividad en plasma a las 8 y 24 horas y no fue detectable a las 48 horas postdosis (Cuadros 23 y 24). Los metabolitos principales observados a las 2 y 4 horas en plasma incluyeron los metabolitos de hidroxi DCDQ (M2 y M3), un N óxido de DCDQ (M5), una ceto DCDQ (M7), una imina de hidroxi DCDQ (M15), un glucurónido de hidroxi DCDQ (M9) y un carbamoil glucurónido de DCDQ (M6). Se obtuvieron perfiles similares para las muestras de plasma de 8, 24 y 48 horas, aunque la mayoría de la

radiactividad en estos últimos puntos de medición se atribuyó al metabolito de hidroxi M3 y al glucurónido M9, que no estaban separados cromatográficamente. Varios metabolitos menores constituyeron 6.2% a 42% de la radiactividad en plasma en las muestras y 2 y 4 horas. Estos metabolitos no se caracterizaron debido a las bajas concentraciones.

CUADRO 23

Distribución cromatográfica (porcentaje) de la radiactividad en el plasma de perros después de una dosis oral única de 15 mg/kg de [^{14}C]DCDQ en una cápsula con recubrimiento entérico[a]

Tiempo (horas)	No. de Perro	M1	M2	M3+M9	M5	M6	M7	M15	DCDQ	Otros[b]
2	1	8.4	ND[c]	11	12	ND	ND	17	11	41
	2	2.6	8.0	21	2.9	19	ND	2.8	1.9	42
4	1	8.0	6.6	28	6.6	ND	6.9	8.5	11	25
	2	4.9	12	20	5.3	13	7.8	9.6	21	6.2
8	1	8.0	ND	43	4.0	7.0	ND	8.3	2.7	27
	2	4.7	ND	79	ND	ND	ND	7.3	ND	8.8
	3	9.7	ND	85	ND	ND	ND	ND	ND	5.1
24	1	6.8	ND	61	ND	17	13	ND	2.6	0.0
	2	2.1	5.0	73	ND	5.6	6.7	ND	ND	7.7
	3	6.4	7.0	62	ND	ND	ND	ND	2.3	22
48	1	12	ND	66	ND	ND	ND	ND	ND	22
	2	6.7	ND	85	2.8	ND	ND	ND	ND	5.6
	3	ND	ND	95	ND	ND	ND	ND	ND	4.7

a: Los perfiles para las muestras de 2 y 4 horas para el perro 3 y 4, y las muestras de las 8, 24 y 48 horas para el perro 4 no se obtuvieron.
b: Incluye los metabolitos no caracterizados
c: No detectado

CUADRO 24

Concentraciones estimadas en plasma (ng equivalentes/mL) de la DCDQ y los metabolitos en perros, después de una sola dosis oral de 15 mg/kg de [^{14}C]DCDQ en una cápsula con recubrimiento entérico[a]

Tiempo (horas)	No. de Perro	M1	M2	M3+M9	M5	M6	M7	M15	DCDQ
2	1	30.1	BQL[b]	37.8	43.1	BQL	BQL	62.2	39.6
	2	32.9	99.5	264	36.4	239	BQL	35.6	23.2
4	1	40.0	33.1	142	33.1	BQL	34.5	42.7	52.5
	2	80.9	192	335	86.6	215	127	157	345
8	1	43.3	BQL	234	21.7	37.9	BQL	45.1	14.5
	2	61.9	BQL	1030	BQL	BQL	BQL	95.3	BQL
	3	24.8	BQL	218	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
24	1	104	BQL	929	BQL	258	202	BQL	39.6
	2	23.0	55.3	808	BQL	62.1	73.6	BQL	BQL
	3	125	135	1210	BQL	BQL	BQL	BQL	43.8
48	1	58.0	BQL	333	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
	2	44.7	BQL	568	18.9	BQL	BQL	BQL	BQL
	3	BQL	BQL	492	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL

a: Los datos para las muestras de 2 y 4 h ras para el perro 3 y 4, y las muestras de las 8, 24 y 48 h ras para el perro 4 no se obtuvieron debido a las bajas concentraciones de radiactividad circulante; las concentraciones se estimaron basándose en las concentraciones de la radiactividad total en plasma (Cuadro 21) y la distribución cromatográfica de la radiactividad (Cuadro 23).

b: Debajo del límite de cuantificación (1 ng equivalente/mL para el plasma).

Perfiles del metabolito urinario

La orina fue una ruta de eliminación principal de la DCDQ en el perro, aunque la excreción fecal fue mayor que la excreción urinaria. Numerosos metabolitos se detectaron en la orina. La DCDQ representó un promedio de menos que el 11 % de la radiactividad urinaria para todos los puntos de medición (Cuadro 25). Los metabolitos principales incluyeron los metabolitos de hidroxi DCDQ (M2 y M3), un N óxido de DCDQ (M5), una imina de hidroxi DCDQ (M15), un sulfato de hidroxi DCDQ (M16), un ácido diacepinil DCDQ carboxílico (M17), un hidroxi DCDQ glucurónido (M9) y un carbamoil glucurónido de DCDQ (M6) (Figura 1).

CUADRO 25

Distribución cromatográfica (porcentaje) de la radiactividad en la orina de perro después de la administración de una cápsula con recubrimiento entérico que contiene [^{14}C]DCDQ[a]

Tiempo (horas)	No. de Perro	M1	M2	M3+M9	M5	M6	M7	M15	M16	M17	DCDQ	Otros[c]
0-8		ND[b]	10	10	5.9	13	ND	11	16	11	ND	24
	1	8.3	21	11	ND	6.1	ND	9.2	9.3	4.1	9.5	22
	2	4.7	26	14	ND	7.6	ND	4.1	3.3	2.8	ND	38
8-24	3	6.7	26	16	ND	3.6	ND	2.3	3.7	3.8	11	28
	Media	6.6	24	13	NA[d]	5.8	NA	5.2	5.5	3.5	NA	29
	SD	1.8	2.8	2.3	NA	2.0	NA	3.6	3.3	0.7	NA	8.4
	1	4.4	25	11	8.5	5.8	5.0	ND	8.4	ND	3.8	28
	2	7.6	18	14	4.0	3.5	6.2	ND	5.0	3.4	ND	39
	3	7.6	22	14	ND	4.3	9.2	ND	3.2	ND	3.0	37
24-48	4	3.2	21	13	ND	5.9	3.4	3.5	5.5	5.7	6.9	32
	Media	5.7	22	13	NA	4.7	5.9	NA	5.5	NA	3.4	34
	SD	2.3	2.8	1.2	NA	1.2	2.5	NA	2.2	NA	2.8	4.8

a: Las muestras de las 0-8 horas para los perros 2, 3 y 4, y de las 0-24 horas para el perro 4 no tuvieron suficiente radiactividad para el perfilado.
b: ND, no detectado
c: Incluye varios metabolitos no caracterizados
d: No disponible

MPEP 603

Perfiles del metabolito fecal

Se extrajo un promedio de 70.2% de la radiactividad fecal, mientras que se extrajo un promedio de 88.2% de la radiactividad de las incubaciones de [^{14}C]DCDQ en el homogenado fecal blanco. En los extractos fecales, la DCDQ fue un componente radiactivo principal, representando 54.4% a 96.7% de la radiactividad total. Los metabolitos detectados en las heces incluyen hidroxi DCDQ (M2, M3 y M19), una ceto DCDQ (M18) y un pico no caracterizado (M20). El metabolito más abundante M18 representó hasta 16.4% de la radiactividad total en los extractos fecales. El glucurónido de hidroxi DCDQ (M9) y el carbamoil glucurónido de DCDQ (M6) no se detectaron en las heces. La incubación de [^{14}C]DCDQ en el homogenado fecal a 37°C durante 24 horas no mostró degradación obvia (datos no mostrados).

Caracterización de los metabolitos mediante los análisis de LC/MS

Los espectros de masas se obtuvieron mediante análisis de LC/MS y LC/MS/MS para la DCDQ y sus metabolitos. La caracterización estructural de estos compuestos se resume en el Cuadro 26. La caracterización espectral másica de la DCDQ y sus metabolitos, de cada uno de los estudios descritos en la presente se discuten además a continuación.

CUADRO 26

Metabolitos de la DCDQ identificados en perros mediante análisis de LC/MS

Metabolito	Tiempo de retención (minutos)[a]	$[M+H]^+$	Sitios del metabolismo	Nombre del metabolito	Matriz[b]
M1	26.26	245	Anillo de diazepan	Hidroxi DCDQ	P, U
M2	29.46	245	Anillo de piridina	Hidroxi DCDQ	P, U, F
M3	35.95	245	Anillo de ciclopentano	Hidroxi DCDQ	P, U, F
M6	59.80	449	Anillo de diazepan	Carbamato glucurónido DCDQ	P, U
M7	33.74	243	Anillo de ciclopentano o piridina	Ceto DCDQ	P, U
M9	36.12	421	Anillo de ciclopentano	Hidroxi DCDQ glucurónido	P, U
M15	42.42	243	Anillo de ciclopentano o piridina	Hidroxi DCDQ imina	P, U, F
M16	44.26	325	Anillo de piridina y diazepan	Sulfato de hidroxi DCDQ	U
M17	48.00	257	Anillo de piridina y diazepan	Acido diiazepinil DCDQ carboxílico	U
M18	41.72	243	Anillo de diazepan	Ceto DCDQ	F
M19	45.24	245	Anillo de piridina o benceno	Hidroxi DCDQ	F
DCDQ	53.84	229			P, U, F

a: Los tiempos de retención de LC/MS se normalizaron con el archivo de datos de LC/MS GU_072303_0004, GU_072403_0004 y GU_081403_0005

b: Matriz en donde los metabolitos se detectaron y caracterizaron mediante LC/MS, P = plasma; U = orina; B = cerebro; F = heces

09909

Discusión

Se observaron grandes variaciones individuales en las concentraciones de la radiactividad en plasma, que varían de 4 a 1640 ng equivalentes/mL a las 2, 4 y 8 horas postdosis. Los datos son consistentes con las variaciones en la excreción de la radiactividad observada en las primeras 24 horas postdosis. La excreción urinaria varió de 0 a 25%, mientras que la excreción fecal varió de 0 a 23% de la radiactividad dosificada en las primeras 24 horas postdosis. Las concentraciones de la radiactividad más altas en plasma ocurrieron a las 24 horas, excepto en el perro 2, en donde la concentración fue la más alta a las 4 horas postdosis. La variabilidad puede estar asociada con la lenta y prolongada absorción de la DCDQ en algunos perros, y posiblemente a las cápsulas con recubrimiento entérico. La relación de la radiactividad en sangre a plasma para el perro fue de aproximadamente 0.72 en comparación con aproximadamente 1.1 para la rata entre 2 y 8 horas postdosis, indicando menos captación de la DCDQ y sus metabolitos en las células sanguíneas del perro más que en las ratas.

La DCDQ se metabolizó de manera extensa en los perros como se observa en las ratas, después de la administración de una cápsula con recubrimiento entérico que contiene [^{14}C]DCDQ (Figura 1). El metabolismo oxidativo fue la ruta metabólica principal, mientras que la formación de un DCDQ carbamoil glucurónido, que no se observó en las ratas, también se observó. La DCDQ representó 1.9% a 21% de la radiactividad en plasma a las 2 y 4 horas, menos que 3% a las 8 y 24 horas, y no se detectó a las 48

horas postdosis. La DCDQ constituyó un promedio de menos que 11% de la radiactividad urinaria en todos los puntos de medición. En los extractos fecales, 54.4% a 98.7% de la radiactividad se atribuyó al fármaco original. Los metabolitos en plasma a las 2 y 4 horas postdosis incluyeron hidroxi DCDQ (M1, M2 y M3), un N óxido de DCDQ (M5), una ceto DCDQ (M7), una hidroxi DCDQ imina (M15), un hidroxi DCDQ glucurónido (M9) y el carbomoil glucurónido de DCDQ (M6). La mayoría de la radiactividad a las 8, 24 y 48 horas postdosis se atribuyó a metabolito de hidroxi M3 y al glucurónido M9, que no estaban separados cromatográficamente. Los metabolitos M2, M3, M5 y M6 también se observaron en la incubación in vitro de la DCDQ con microsomas de hígado de perro en la presencia de NADPH. Los metabolitos observados en el plasma de perro también se detectaron en la orina del perro, excepto el metabolito M7. Un conjugado de sulfato de hidroxi DCDQ (M16) y un ácido diacepinil DCDQ carboxílico (M17), que no se detectaron en el plasma, se observaron en las muestras de orina. Los metabolitos de hidroxi DCDQ (M2, M3 y M19), una ceto DCDQ (M18) y una hidroxi DCDQ imina se detectaron en los extractos fecales. La formación del metabolito M6 puede subestimarse debido a la posible hidrólisis en el tracto GI. El metabolismo extenso y la absorción oral prolongada de la DCDQ probablemente constituyen la biodisponibilidad oral relativamente baja de aproximadamente 25.4% en los perros.

El metabolismo de la DCDQ en perros exhibió algunas diferencias de las ratas (Figura 1). Algunos metabolitos oxidativos diferentes

se observaron en las ratas y los perros. Los metabolitos oxidativos M15, M16, M17, M18 y M19 no se observaron en las ratas, mientras que un metabolito de hidroxi M4, que se observó en las ratas, no se detectó en los perros. Más metabolitos de la fase II se observaron en las ratas que en los perros. Los sulfatos M8 y M13 y los sulfamatos M12 y M14 se observaron en ratas, pero no en los perros. El sulfato M16 se observó en los perros, pero no en las ratas. El carbamoil glucurónido de DCDQ, que se detectó en el plasma y la orina de perros, no se observó en el plasma u orina de ratas.

En resumen, la DCDQ se metabolizó de manera extensa en los perros, con el metabolismo oxidativo como la trayectoria metabólica principal, aunque se observó también la formación de un DCDQ carbamoil glucurónido.

Caracterización del metabolito mediante los análisis de LC/MS

Los espectros de masas se obtuvieron mediante análisis de LC/MS y LC/MS/MS para la DCDQ y sus metabolitos identificados en los estudios anteriores. La caracterización espectral másica de la DCDQ y sus metabolitos, de cada uno de los estudios, se discute a continuación.

DCDQ

Las características espectrales másicas del estándar de DCDQ se examinaron para la comparación con los metabolitos. En el espectro de LC/MS de la DCDQ, un ion molecular protonado, $[M+H]^+$, se observó a m/z 229. Los iones del producto del espectro de masas m/z 229 de la DCDQ

obtenidos de la disociación inducida por la colisión (CID), y el esquema de fragmentación propuesto indicaron la pérdida de metilenamina, etilidenamina, y etiliden-metil-amina del ion molecular, que generó los iones del producto a m/z 200, 186 y 171, respectivamente. La pérdida del grupo propeno del ion molecular, generó el fragmento a m/z 187 y la pérdida adicional de la metilenamina y la etilidenamina generó los iones fragmentados a m/z 158 y 144. La pérdida del grupo ciclopentil-metilenamina generó el ion del fragmento a m/z 132.

Metabolito M1: de estudios in vitro e in vivo en ratas y perros

La $[M+H]^+$ para M1 se observó a m/z 245. Los iones del producto del espectro de masas a m/z 245 de M1 y el esquema de fragmentación propuesto, indicaron un incremento de 16 Da, sugiriendo la monohidroxilación. La pérdida de propeno del ion molecular, generó el fragmento a m/z 203, que fue 16 Da mayor que el ion correspondiente a m/z 187 para la DCDQ. Los iones del fragmento a m/z 171 y 186 fueron los mismos que en el espectro del ion del producto de la DCDQ, indicando que la hidroxilación ocurrió en la porción de diazepan de la molécula, como se muestra. Por lo tanto, se propuso que M1 es hidroxi DCDQ.

Metabolito M2: de estudios in vitro e in vivo en ratas y perros

La $[M+H]^+$ para M2 se observó a m/z 245. Los iones del producto del espectro de masas a m/z 245 de M2 y el esquema de

fragmentación propuesto, indicaron un incremento de 16 Da, sugiriendo la monohidroxilación. La pérdida de propeno del ion molecular, generó el fragmento a m/z 203, que fue 16 Da mayor que el ion correspondiente a m/z 187 para la DCDQ. Esto indicó que el anillo de ciclopentano no era el sitio de la biotransformación. El ion del fragmento a m/z 132 era el mismo para la DCDQ indicando que la porción de diazepan no es el sitio de la biotransformación. Los iones del fragmento a m/z 169 y 184 fueron 2 Da menores que los iones correspondientes para la DCDQ a m/z 171 y 186, respectivamente, indicando la pérdida de H_2O del anillo de piridina como resultado de la hidroxilación. Por lo tanto, se propuso que M2 es hidroxi DCDQ.

Metabolito M3: de estudios in vitro e in vivo en ratas y perros

La $[M+H]^+$ para M3 se observó a m/z 245. Los iones del producto del espectro de masas a m/z 245 de M3 y el esquema de fragmentación propuesto, indicaron un incremento de 16 Da, sugiriendo la monohidroxilación. La pérdida de la etilidenamina generó el fragmento a m/z 202, que fue 16 Da mayor que el ion correspondiente a m/z 186 para SAX-187. Los iones del fragmento a m/z 158 y 144 fueron los mismos que en el espectro del ion del producto de la DCDQ. Esto indicó que la hidroxilación ocurrió en la porción de ciclopentano de la molécula, como se muestra. Por lo tanto, se propuso que M3 es hidroxi DCDQ.

Metabolito M4: de estudios in vitro e in vivo en ratas

La $[M+H]^+$ para M4 se observó a m/z 245. Los iones del producto del espectro de masas a m/z 245 de M4 y el esquema de fragmentación propuesto, indicaron un incremento de 16 Da, sugiriendo la monohidroxilación. La pérdida de H_2O del ion molecular generó el fragmento a m/z 227. El ion del producto a m/z 144 también se observó para la DCDQ, indicando que la hidroxilación ocurrió en la porción de ciclopentano de la molécula, como se muestra. Esto también fue consistente con la presencia del ion del producto a m/z 184, generado por la pérdida de la etilidenamina y H_2O del ion correspondiente a m/z 186 para la DCDQ. La masa exacta medida para este ion fue 184.1120 Da, que estuvo dentro de 3.6 ppm de la masa teórica para $C_{13}H_{14}N$. Por lo tanto, se propuso que M4 es hidroxi DCDQ.

Metabolito M5: de los estudios in vitro

La $[M+H]^+$ para M5 se observó a m/z 243. La masa exacta medida para M5 fue 243.1478 Da, que estuvo dentro de 7.9 ppm de la masa teórica para $C_{15}H_{19}N_2O$. Esto corresponde a la adición de un oxígeno y la pérdida de dos átomos de hidrógeno, en comparación con la fórmula molecular para la DCDQ. Un ion del fragmento a m/z 130 fue 2 Da menor que el ion correspondiente para la DCDQ, sugiriendo la formación de la imina. La LC/MS con D_2O sustituido por H_2O en la fase móvil confirmó que no existían

protones intercambiables para M5, indicando que M5 fue un N óxido. Por lo tanto, se propuso que M5 es el N óxido de la DCDQ imina.

Metabolito M6: de los estudios in vitro e in vivo en perros

La $[M+H]^+$ para M6 se observó a m/z 449. Los iones del producto del espectro de masas a m/z 449 de M6 y el esquema de fragmentación propuesto, indicaron una pérdida de 176 Da del ion molecular, que generó un fragmento a m/z 273, indicando que M5 fue un conjugado de glucurónido. La pérdida adicional de 44 Da de m/z 273 generó m/z 229, que también es el ion molecular para la DCDQ. Por lo tanto, se propuso que M6 es el carbamoil glucurónido de DCDQ.

Metabolito M7: de los estudios in vitro e in vivo en ratas y perros

La $[M+H]^+$ para M7 se observó a m/z 243. Los iones del producto del espectro de masas a m/z 243 de M7 y el esquema de fragmentación propuesto indicó la pérdida de metilenamina, etilidenamina del ion molecular, que generó los iones del producto a m/z 214 y 200, que fueron 14 Da más que los iones correspondientes a m/z 200 y 186, respectivamente, para la DCDQ. Esto sugirió la adición de un átomo de oxígeno y la pérdida de dos átomos de hidrógeno de la DCDQ. Los iones del producto a m/z 132, 144 y 158 fueron los mismos que para la DCDQ, lo cual indicó que la biotransformación ocurrió en los anillos de piridina y ciclopentano. La LC/MS con D_2O sustituido por H_2O en la fase móvil confirmó que hay sólo un protón

intercambiable para M7, que fue del grupo NH en el anillo de diazepan. Por lo tanto, se propuso que M7 es una ceto DCDQ.

Metabolito M8: de los estudios in vivo en ratas

La $[M+H]^+$ para M8 se observó a m/z 325. Los iones del producto del espectro de masas a m/z 325 de M8 y el esquema de fragmentación propuesto, indicaron una pérdida de propeno del ion molecular, que generó el ion del producto a m/z 283, indicando que la biotransformación no ocurrió en el anillo de ciclopentano. La pérdida de la metilenamina, etilidenamina del ion del producto a m/z 283 y la pérdida posterior del grupo sulfato, generó los iones del producto a m/z 158 y 144, respectivamente. La pérdida de etilidenamina del ion molecular generó el ion del producto a m/z 282 y la pérdida posterior del grupo sulfonato y H_2O generó los iones del producto a m/z 202 y 184, respectivamente. El ion del fragmento a m/z 132 fue el mismo que para la DCDQ indicando que la porción de diazepan no es el sitio de la biotransformación. Por lo tanto, se propuso que M8 es el conjugado de sulfato de hidroxi DCDQ.

Metabolito M9: de los estudios in vivo en ratas y perros

La $[M+H]^+$ para M9 se observó a m/z 421. Los iones del producto del espectro de masas a m/z 421 de M9 y el esquema de fragmentación propuesto, indicaron una pérdida de 176 Da del ion molecular, que generó el ion del fragmento a m/z 245, que indicó la glucuronidación de la

hidroxi DCDQ. La pérdida de la etilidenamina y el ácido glucurónico generó el fragmento a m/z 202, que fue 16 Da mayor que el ion correspondiente a m/z 186 para la DCDQ. El ion del fragmento a m/z 187 sugiere que la biotransformación ocurrió en el anillo de ciclopentano. Por lo tanto, se propuso que M9 es un glucurónido de hidroxi DCDQ.

Metabolito M10

La $[M+H]^+$ para M10 se observó a m/z 245. Los iones del producto del espectro de masas a m/z 245 de M10 y el esquema de fragmentación propuesto, indicaron un incremento de 16 Da, sugiriendo la monohidroxilación. Los iones del fragmento a m/z 171 y 186 fueron los mismos que en el espectro del ion del producto de la DCDQ, indicando que la hidroxilación ocurrió en la porción de diazepan de la molécula, como se muestra. Por lo tanto, se propuso que M10 es hidroxi DCDQ.

Metabolito M11: de los estudios in vivo en ratas

La $[M+H]^+$ para M11 se observó a m/z 287. Los iones del producto del espectro de masas a m/z 287 de M11 y el esquema de fragmentación propuesto, indicaron una pérdida de H_2O del ion molecular, que generó el ion del fragmento a m/z 269. La pérdida adicional de 42 Da generó m/z 227, lo que indicó la acetilación. Los iones del fragmento a m/z 171 y 186 fueron los mismos que en el espectro del ion del producto de la DCDQ, indicando que la biotransformación ocurrió en la porción de diazepan de la

molécula, como se muestra. Por lo tanto, se propuso que M11 es la hidroxi DCDQ acetilada.

Metabolito M12: de los estudios in vivo en ratas

La $[M+H]^+$ para M12 se observó a m/z 309. Los iones del producto del espectro de masas a m/z 309 de M12 indicó una pérdida de 80 Da, que generó el ion del producto a m/z 229, que es el ion molecular de la DCDQ. Esto indicó la sulfatación. La pérdida adicional de la metilenamina, etilidenamina, generó los iones del producto a m/z 200 y 186, que fueron los mismos que para la DCDQ. Por lo tanto, se propuso que M12 es el N-sulfato de DCDQ.

Metabolito M13: de los estudios in vivo en ratas

La $[M+H]^+$ para M13 se observó a m/z 325. Los iones del producto del espectro de masas a m/z 325 de M13 y el esquema de fragmentación propuesto, indicaron una pérdida de 80 Da de $[M+H]^+$, que proporcionó m/z 245, que fue 16 Da mayor que la $[M+H]^+$ para la DCDQ. Esto indicó que M13 fue un conjugado de sulfato de hidroxi DCDQ. Por lo tanto, se propuso que M13 es un conjugado del sulfato de la hidroxi DCDQ.

Metabolito M14: de los estudios in vivo en ratas

La $[M+H]^+$ para M14 se observó a m/z 305. Los iones del producto del espectro de masas a m/z 305 de M14, los iones del producto del

espectro de masas a m/z 225 y el esquema de fragmentación propuesto para M14, indicaron una pérdida de 80 Da del ion molecular, que generó el ion a m/z 225, lo cual indicó que M14 era un sulfato. La pérdida adicional de etilidenamina, y etiliden-metil-amina, generó los iones del producto a 182 y 167, respectivamente, que son 4 Da menores que los iones correspondientes para la DCDQ a m/z 186 y 171, respectivamente, lo que indicó el metabolismo del grupo ciclopentano. Por lo tanto, se propuso que M14 es el conjugado del sulfato de di-deshidro DCDQ.

Metabolito M15: de los estudios in vivo en perros

La $[M+H]^+$ para M15 se observó a m/z 245. Los iones del producto del espectro de masas a m/z 245 de M15 y el esquema de fragmentación propuesto indicaron un ion del fragmento a m/z 187 que fue 16 Da mayor que el ion correspondiente a m/z 171 para la DCDQ, indicando la hidroxilación del ciclopentano o el anillo de piridina. El ion del fragmento a m/z 130 fue 2 Da menor que el ion correspondiente para la DCDQ, indicando la formación de la imina. La LC/MS con D_2O sustituido por H_2O en la fase móvil, confirmó que sólo hay un protón intercambiable para M15. Por lo tanto, se propuso que M15 es la hidroxi DCDQ imina.

Metabolito M16: de los estudios in vivo en perros

La $[M+H]^+$ para M16 se observó a m/z 325. Los iones del producto del espectro de masas a m/z 325 de M13 y el esquema de

fragmentación propuesto, indicaron una pérdida de 80 Da del ion molecular, que generó el ion del producto a m/z 245, indicando la sulfatación. La pérdida del propeno del ion molecular generó el ion del producto a m/z 283, indicando que la biotransformación no ocurrió en el anillo de ciclopentano. La pérdida de etilidenamina generó el ion del producto a m/z 282 y la pérdida posterior del grupo sulfato y H_2O generó los iones del producto a m/z 202 y 184 respectivamente. El ion del producto a m/z 148, fue 16 Da mayor que el ion correspondiente a 132 para la DCDQ, y el ion del producto a m/z 282 indicó que la hidroxilación ocurrió en el grupo bencilo de la molécula, como se muestra. Por lo tanto, se propuso que M16 es un conjugado de sulfato de la hidroxi DCDQ.

Metabolito M17: de los estudios in vivo en perros

La $[M+H]^+$ para M17 se observó a m/z 257. La masa exacta medida de $[M+H]^+$ fue de 257.1292 Da, que estuvo dentro de 0.8 ppm de la masa teórica para $C_{15}H_{17}N_2O_2$. Esto corresponde a la adición de dos átomos de oxígeno y a la pérdida de 4 átomos de hidrógeno de la fórmula molecular de la DCDQ. La pérdida de 44 Da del ion molecular generó el fragmento a m/z 213. La masa exacta medida de este fragmento fue 213.1376 Da, que estuvo dentro de 7.6 ppm de la masa teórica para $C_{14}H_{17}N_2$. Esto confirmó que la pérdida de 44 fue de la pérdida neutra de CO_2, indicando que M17 es un ácido carboxílico. La pérdida adicional de ciclopenteno, pentano, propeno y HCN de m/z 213 generó los fragmentos a m/z 145, 171 y 186

respectivamente. El ion del producto a m/z 130 fue 2 Da menor que el ion correspondiente a m/z 132 para la DCDQ, indicando la formación de una imina. La LC/MS con D_2O sustituida por H_2O en la fase móvil, confirmó que sólo hay un protón intercambiable para M17, que es del grupo del ácido carboxílico. Por lo tanto, se propuso que M17 es un ácido benzo-diazepinil-ciclopentancarboxílico (ácido diazepinil DCDQ carboxílico).

Metabolito M18: de los estudios in vivo en perros

La $[M+H]^+$ para M18 se observó a m/z 243. Los iones del producto del espectro de masas a m/z 243 de M18 y el esquema de fragmentación propuesto, indicaron una pérdida de los grupos propeno y etilidenamina del ion molecular, que generó el ion del producto a m/z 158. La pérdida de metilenamina, etilidenamina del ion molecular, generó los iones del producto a m/z 214 y 200, que son 14 Da mayores que los iones correspondientes a m/z 200 y 186, respectivamente, para la DCDQ. Esto sugirió la adición de un átomo de oxígeno y la pérdida de dos átomos de hidrógeno de la DCDQ. El ion del producto a m/z 146, fue 14 Da mayor que el ion correspondiente a m/z 132 para la DCDQ, y el ion de producto a m/z 200 indicó que la modificación ocurrió en el grupo bencilo. La LC/MS con D_2O sustituido por H_2O en la fase móvil, confirmó que sólo hay un protón intercambiable para M14, que es del grupo NH en el anillo de diazepan. Por lo tanto, se propuso que M18 es una ceto DCDQ.

Metabolito M19: de los estudios in vivo en perros

La $[M+H]^+$ para M19 se observó a m/z 245. Los iones del producto del espectro de masas a m/z 245 de M19 y el esquema de fragmentación propuesto, indicaron un incremento de 16 Da, sugiriendo la monohidroxilación. Los iones del producto a m/z 216, 202 y 187 fueron 16 Da mayores que los iones correspondientes a m/z 200, 186 y 171, respectivamente, para la DCDQ, indicando que el grupo diazepan no era el sitio de la modificación. La pérdida de propeno del ion molecular, generó el fragmento a m/z 203 y la pérdida adicional de la metilenamina y la etilidenamina generó los iones del fragmento a m/z 174 y 160. Estos fueron 16 Da mayores que los iones correspondientes para la DCDQ, indicando que la hidroxilación ocurrió en el grupo benceno o piridina. Por lo tanto, se propuso que M19 es hidroxi DCDQ.

Producto P3: de los estudios in vivo

La $[M+H]^+$ para P3 se observó a m/z 227. Los iones del producto del espectro de masas a m/z 227 de P3 y el esquema de fragmentación propuesto indicaron que el peso molecular de P3 fue de 2 Da menos que la DCDQ, sugiriendo la formación de un enlace doble. El ion del fragmento a m/z 130 fue 2 Da menor que el ion correspondiente para la DCDQ, sugiriendo la formación de una imina. Por lo tanto, se propuso que P3 es la DCDQ imina.

Identificación de los metabolitos M7, M9 y M13 en la orina de las ratas después de una sola administración oral de 50 mg/kg de DCDQ

Sinopsis

Este estudio se diseño para obtener la orina de la rata para el aislamiento del metabolito y obtener una identificación estructural más específica de los metabolitos seleccionados de DCDQ. A tres ratas macho y tres ratas hembra se les proporcionó una sola dosis de 50 mg/kg de DCDQ. La orina se recolectó a intervalos de 0-12 y 12-24 horas. Los metabolitos de DCDQ M7 (ceto DCDQ), M9 (hidroxi DCDQ glucurónido) y M13 (sulfato de hidroxi DCDQ), se aislaron de la orina mediante un método de HPLC semipreparativa de dos etapas, en cantidades de pocos microgramos, suficientes para el análisis espectroscópico con RMN. Basándose en los análisis espectroscópicos de MS y RMN, el sitio del metabolismo para M7 y M13 fue la posición 17. El sitio del metabolismo para M9 fue la posición 13.

Introducción

Cuando se incuban con microsomas de hígado de rata en la presencia de NADPH y UDPGA, la [^{14}C]DCDQ se convirtió a varios metabolitos oxidativos. Un estudio previo del metabolismo en ratas, mostró que la DCDQ se metaboliza de manera extensa, y el metabolismo oxidativo fue la trayectoria metabólica principal en las ratas. Los metabolitos de fase II que incluyen un sulfato y un glucurónido de hidroxi DCDQ, se detectaron también en ratas. El presente estudio se diseñó para obtener la orina de la

rata para el aislamiento de los metabolitos y para obtener una identificación estructural más específica para los metabolitos seleccionados de DCDQ.

Materiales y métodos

Materiales

El clorhidrato de la DCDQ se sintetizó por Wyeth Research como se describió anteriormente. El polisorbato 80 se obtuvo de Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, NJ) y la metilcelulosa fue de Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI). Los solventes utilizados para la extracción y para los análisis cromatográficos fueron grado reactivo para HPLC o ACS de EMD Chemicals (Gibbstown, NJ). El sulfóxido de dimetilo deuterado (DMSO-d6) se compró de Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA). Los tubos para la RMN (3 mm), se compraron de Wilmad Glass Co. (Buena, NJ).

Métodos

Administración del fármaco y recolección del espécimen

La preparación de la dosis, la dosificación del animal y la recolección del espécimen se realizaron en Wyeth Research, Collegeville, PA. El vehículo de la dosis contenía Tween 80 al 2% (volumen/volumen) y metilcelulosa al 0.5% (volumen/volumen) en agua. En el día de la dosificación, la DCDQ no marcada (205.7 mg), se disolvió en el vehículo a una concentración final de aproximadamente 10 mg/mL.

Tres ratas macho que pesan de 413 a 474 gramos y tres ratas hembra que pesan de 272 a 290 gramos al momento de la dosificación, se compraron de Charles River Laboratories (Wilmington, MA). A las ratas sin ayunar se les proporcionó una sola dosis objetivo de 50 mg/kg de DCDQ a un volumen de 5.0 mL/kg vía sonda intragástrica. A los animales se les proporcionó alimento para rata estándar y agua ad libitum, y se mantuvieron en jaulas metabólicas de manera individual.

La orina se recolectó en recipientes en hielo seco a intervalos de 0-12 y 12-24 horas, y se almacenó a aproximadamente -70°C hasta la recolección de la fracción.

Análisis de la orina de la rata mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas

Las muestras de orina de rata se analizaron mediante LC/MS para caracterizar los metabolitos de la DCDQ presentes en las muestras de la orina de la rata, utilizadas para el aislamiento del metabolito. El sistema para HPLC utilizado para el análisis de LC/MS fue un sistema para HPLC Modelo 1100 Agilent (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), equipado con una bomba binaria, un tomador de muestras automático y un detector UV de arreglo de diodo. La temperatura del tomador de muestras automático se ajustó a 10°C. El detector UV se ajustó para verificar de 190 a 400 nm. Las separaciones se lograron con una columna Supelco Discovery C18 (250 x 2.1 mm x 5 µm). La

temperatura de la columna fue de 20°C. El programa del gradiente de la fase móvil utilizado fue como se describe a continuación.

Fase móvil A: Acetato de amonio 10 mM en agua, pH 4.5

Fase móvil B: Metanol

CUADRO 27

Gradiente de la HPLC

Tiempo (minutos)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0	90	10
6	80	20
35	70	30
65	15	85
80	15	85
81	90	10
100	90	10

El espectrómetro de masas utilizado para la caracterización del metabolito fue un espectrómetro de masas con trampa de iones Finnigan LCQ (ThermoElectron Corp., San Jose, CA). Se equipó con una interconexión de ionización con electrorrocío (ESI), y se operó en el modo de ionización positiva. Los ajustes para el espectrómetro de masas se listan a continuación.

CUADRO 28

Ajustes del espectrómetro de masas con trampa de iones Finnigan LCQ	
Gas del nebulizador	90 unidades arbitrarias
Gas auxiliar	10 unidades arbitrarias
Voltaje del rocío	3.5 KV
Temperatura del capilar calentado	200°C
Ajuste AGC de la exploración completa	4×10^7
Energía relativa de la colisión	30%

Aislamiento del metabolito mediante cromatografía líquida

El sistema para HPLC utilizado para el aislamiento del metabolito consistió de una bomba Waters Prep LC 4000, un Manejador de Muestras Waters 2767 para la inyección de la muestra, un detector UV con arreglo de diodo Waters 996 y un recolector de las fracciones Gilson FC204 (Gilson, Inc., Middleton, WI). El detector UV se ajustó para verificar a 210-450 nm. El recolector de las fracciones se ajustó para recolectar las fracciones a intervalos de 1 minuto. El gradiente de la fase móvil de la HPLC fue como se describió anteriormente para los análisis de LC/MS, excepto que la velocidad de flujo fue de 4.7 mL/minuto. Las fases móviles fueron como se describe a continuación para cada Condición de HPLC. No se realizó un análisis espectral másico durante la recolección de las fracciones.

Se utilizaron dos Condiciones para la HPLC para aislar los metabolitos. La Condición 1 para la HPLC se utilizó para fraccionar los metabolitos de la orina de la rata. La Condición 2 para la HPLC se utilizó para purificar adicionalmente las fracciones del metabolito de DCDQ recolectadas

utilizando la Condición 1 para la HPLC. Las columnas y las fases móviles utilizadas para las Condiciones 1 y 2 para la HPLC se listan a continuación.

Condición 1 para la HPLC

Columna: columna semipreparativa Supelco Discovery C18 (250 x 10 mm, 5 µm) (Supelco, Bellefonte, PA).

Fase móvil A: acetato de amonio 10 mM en agua, pH 4.5

Fase móvil B: Metanol.

Condición 2 para la HPLC

Columna: Zorbax columna semipreparativa SB-CN (250 x 9.4 mm, 5 µm) (Agilent Technologies)

Fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0.02% en agua

Fase móvil B: ácido trifluoroacético al 0.02% en metanol

Las fracciones que contienen los metabolitos M7, M9 y M13 de la Condición 2 para la HPLC se combinaron y evaporaron hasta sequedad bajo nitrógeno, utilizando un TurboVap Zymark (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA). Los metabolitos secos se presentaron para los análisis espectroscópicos con RMN.

Análisis de espectroscopia con resonancia magnética nuclear (RMN) de M7, M9 y M13 aislados

Para la espectroscopia con RMN, las muestras de los metabolitos M7, M9 y M13 aislados de DCDQ se disolvieron cada una en 150 µL de DMSO-d6 al 100% y se transfirieron a tubos para RMN de 3 mm, individuales, bajo una atmósfera de gas nitrógeno. Los datos de la RMN de protón unidimensional (1D) y bidimensional (2D) (COSY, ROESY), se recolectaron en un espectrómetro para RMN de 500 MHz Varian Inova (Palo Alto, CA), equipado con una sonda de detección indirecta de gradiente z de 5 mm Nalorac (Varian).

Análisis de los datos

Se utilizó el programa ThermoFinnigan Xcalibur (versión 1.3) para controlar el sistema de LC/MS y analizar los datos de LC/MS. Se utilizó el programa Micromass MassLynx (versión 4.0) para controlar el equipo para la HPLC utilizado para la recolección de la fracción. Los datos espectroscópicos de la RMN se recolectaron, procesaron y mostraron utilizando el programa VRMN (versión 6.1C, Varian).

Resultados

Caracterización del metabolito de DCDQ mediante LC/MS y espectroscopia con RMN

En este estudio, los metabolitos M7, M9 y M13 de la DCDQ se aislaron en suficientes cantidades para realizar los análisis espectroscópicos con RMN para las caracterizaciones estructurales más detalladas. Las identificaciones estructurales para M7 (ceto DCDQ), M9 (hidroxi DCDQ glucurónido) y M13 (sulfato de hidroxi DCDQ) presentadas en este reporte, deben reemplazar aquéllas presentadas en reportes previos. Las estructuras de la DCDQ, M7, M9 y M13, junto con sus esquemas de numeración de RMN, se resumen en la Figura 5. La identificación de M7, M9 y M13 mediante espectroscopia de masas y con RMN se discute a continuación.

DCDQ

Las características espectrales másicas y de RMN del estándar de la DCDQ se examinaron para la comparación con los metabolitos. En el espectro de LC/MS de la DCDQ, un ion molecular protonado $[M+H]^+$, se observó a m/z 229. Los iones del producto del espectro de masas de m/z 229 de la DCDQ obtenidos de la disociación inducida por la colisión (CID), y el esquema de fragmentación propuesto, indicaron una pérdida de metilenamina y etilidenamina del ion molecular, que generó los iones del producto a m/z 200 y 186, respectivamente. La pérdida de propeno del ion molecular generó m/z

187 y la pérdida adicional de etilidenamina generó m/z 144. La pérdida del grupo de ciclopentil-metilenamina generó el ion del producto a m/z 132.

El Cuadro 29 resume los datos del desplazamiento químico de ^{1}H RMN para la DCDQ. Estos datos se utilizaron para la comparación con los metabolitos aislados.

CUADRO 29

Desplazamientos químicos de ^{1}H para la DCDQ en DMSO-d_6

Número de átomos	δ^1H (ppm)[a,b]
2	3.40, 3.10
3	3.19, 3.13
4	9.68, 8.77 (sal)
5	4.20, 4.07
9	2.94
10	2.23
11	3.06, 2.66
12	7.18
13	6.91
14	7.24
15	2.19, 1.34
16	1.65, 1.55
17	2.00, 1.26

[a]Los desplazamientos químicos se refieren al TMS interno residual (0.0 ppm) para ^{1}H.
[b]Varias asignaciones de protones no pudieron hacerse debido a la superposición en la región de 3.35 a 3.15 ppm.

Metabolito M7

La $[M+H]^+$ para M7 se observó a m/z 243. Los iones del producto del espectro de masas a m/z 243 de M7 y el esquema de fragmentación propuesto indicaron una pérdida de metilenamina,

etilidenamina del ion molecular, que generó los iones del producto a m/z 214 y 200, respectivamente, que son 14 Da mayores que los iones correspondientes a m/z 200 y 186, respectivamente, para la DCDQ. Esto sugiere la adición de un átomo de oxígeno y la pérdida de dos átomos de hidrógeno de la DCDQ. Los iones del producto a m/z 132, 144 y 158 fueron los mismos que para la DCDQ, lo cual indicó el sitio de la biotransformación como el anillo de ciclopentano.

El Cuadro 30 lista los desplazamientos químicos y las asignaciones para M7. El metabolito se asignó utilizando la información del espectro de 1D RMN y el espectro 2D COSY. El espectro 1D ^{1}H RMN mostró que el anillo aromático estaba intacto con tres resonancias aromáticas acopladas en serie. Con los datos disponibles, no fue posible distinguir H12 de H14. Los protones en el anillo de diacepina se asignaron de las resonancias de la sal (H4) a 9.10 y 8.62 ppm. Los datos de 2D COSY mostraron que estos protones se acoplaron a los protones a 3.20 ppm (H3) y 4.18 y 4.15 ppm (H5). Los protones H3 también se acoplaron a los protones a 3.34 y 3.06 (H2). Estos resultados confirmaron que el anillo de diacepina estaba intacto.

CUADRO 30

Desplazamientos químicos de ^1H para el metabolito M7 en DMSO-d_6

Número de átomos	δ^1H (ppm)[a]
2	3.34, 3.06
3	3.20
4	9.10, 8.62
5	4.18, 4.15
9	3.47
10	2.59
11	3.16, 3.01
12	7.23[b]
13	7.01
14	7.35[b]
15	2.53, 1.76
16	2.32, 2.14

[a]Los desplazamientos químicos se refieren al DMSO-d_6 interno residual a 2.49 ppm para ^1H.
[b]Las asignaciones para H12 y H14 pueden intercambiarse.

El espectro de 1D ^1H RMN también mostró que ocurrió un cambio en la región de ciclopentilo versus DCDQ, debido a que hubo tres resonancias campo arriba de 2.5 ppm, mientras que para la DCDQ, hubo siete resonancias. La asignación de los protones restantes empieza con los protones H11. Las resonancias a 3.16 ppm y 3.01 ppm se asignaron a H11, basándose en la comparación de las constantes de acoplamiento observadas par ala DCDQ. La resonancia a 3.01 ppm fue un triplete, y la resonancia a 3.16 ppm fue un doble de dobletes. Esto también se observó para la DCDQ. Los protones H11 se acoplaron ambos a una resonancia a 2.59 ppm (H10). La resonancia H10 se acopló a otra resonancia a 3.47 ppm (H9). La resonancia H9 se acopló a un par de metilenos a 2.53 ppm y 1.76 ppm (H15).

Las resonancias H15 se acoplaron a otro par de metileno a 2.32 ppm y 2.14 ppm (H16). No hubo resonancias asignables a H17, lo cual indicó el sitio del metabolismo como la posición C17. El desplazamiento campo abajo de los protones H16 sería consistente con un oxígeno de carbonilo en C17. Por lo tanto, M7 se identificó como 17-ceto DCDQ.

Metabolito M9

M9 generó una $[M+H]^+$ a m/z 421. Los iones del producto del espectro de masas a m/z 421 de M9y el esquema de fragmentación propuesto indicaron una pérdida de 176 Da del ion molecular, que generó m/z 245, 16 Da mayor que el ion molecular de la DCDQ, que indicó la glucuronidación de la hidroxi DCDQ. La pérdida de la etilidenamina de $[M+H]^+$ proporcionó m/z 378. Esto indicó una porción etilenamina sin cambio. La pérdida del ácido glucurónico (176 Da) de m/z 378, proporcionó m/z 202, que fue 16 Da mayor que el ion correspondiente a m/z 186 para la DCDQ. Esto eliminó los tres grupos de metileno del anillo de ciclopropano como los sitios del metabolismo. El ion del producto a m/z 203 fue 16 Da mayor que el ion correspondiente a 187 para la DCDQ. Estos datos fueron consistentes con el grupo bencilo o tetrahidropiridina como el sitio del metabolismo.

El Cuadro 31 lista los desplazamientos químicos de la RMN y las asignaciones para M9 utilizando el esquema de numeración en la Figura 5. Mucho del metabolito puede asignarse utilizando la información del espectro 1D RMN y los resultados del análisis 2D COSY, que muestran las

correlaciones a través del enlace en M9, y el análisis ROESY, que muestra los contactos estrechos NOE a través del espacio en los experimentos con M9. Las resonancias de los protones de metileno en C2 no se asignaron debido a la superposición. Sus resonancias se localizaron entre 3.35 ppm y 3.15 ppm. Las regiones campo arriba del espectro de RMN para la DCDQ M9 fueron idénticas. En análisis adicional de esta región utilizando un experimento COSY confirmó que el sistema del anillo pentilo estaba intacto. También visible en el espectro de 1D ^{1}H RMN para M9, estuvieron las resonancias del ácido glucurónico. Varias de estas resonancias pueden no ser asignadas de manera no ambigua debido a la superposición del espectro. Hubo una cantidad adecuada de metabolito para los protones no asignados para que resonaran en la región de 3.35 a 3.15 ppm.

CUADRO 31

Desplazamientos químicos de ^{1}H para el metabolito M9 en DMSO-d_6

Número de átomos	$\delta^{1}H$ (ppm)[a,b]
3	2.19, 3.01
4	9.11, 8.55
5	4.18, 4.11
9	2.93
10	2.24
11	3.02, 2.62
12	6.94
14	6.91
15	2.19, 1.32
16	1.63, 1.52
17	2.00, 1.23
18	4.95

CUADRO 31

Desplazamientos químicos de ^1H para el metabolito M9 en DMSO-d_6

Número de átomos	δ^1H (ppm)[a,b]
19	3.84
20	3.37

[a]Los desplazamientos químicos se refieren al DMSO interno residual a 2.49 ppm para ^1H.
[b]Varias asignaciones de protones no pudieron hacerse debido a la superposición en la región de 3.35 a 3.15 ppm.

La inspección del espectro 1D ^1H RMN a 500 MHz mostró que las resonancias para la región aromática se cambiaron del espectro RMN de la DCDQ. Dos de estas resonancias aromáticas permanecieron de las tres para la DCDQ. El acoplamiento a 2.5 Hz entre estas resonancias aromáticas es característica de una orientación meta entre los protones. Esto colocó al ácido glucurónico en la posición C13. La ubicación del ácido glucurónico se apoyó además por los resultados de un experimento ROESY que mostró que H12 tuvo NOE para el protón H5 y H14 tuvo un NOE para H9. Esto resultados colocaron a H12 y H14 en extremos opuestos del anillo aromático. Ambos protones aromáticos también tuvieron NOE para el protón anomérico del anillo del ácido glucurónico. Todos estos resultados fueron consistentes con la conjugación del ácido glucurónico que está en C13.

Metabolito M13

La $[M+H]^+$ para M13 se observó a m/z 325. Los iones del producto del espectro de masas a m/z 325 de M13 y el esquema de fragmentación propuesto indicaron una pérdida 80 Da de $[M+H]^+$, que proporciona m/z 245, que fue 16 Da mayor que $[M+H]^+$ para la DCDQ. Esto indicó que M13 fue un conjugado de sulfato de hidroxi DCDQ. La pérdida de etilidenamina del ion molecular proporcionó m/z 282. La presencia de los iones del producto a m/z 144 y 132, también observada para la DCDQ, indicó que una de las tres posiciones de metileno del anillo de ciclopentano es un sitio del metabolismo.

El Cuadro 32 lista los desplazamientos químicos y las asignaciones para M13. El metabolito se asignó utilizando la información del espectro de 1D RMN, el espectro 2D COSY y el espectro 2D ROESY. El espectro 1D ^1H RMN para M13 mostró que el anillo aromático estaba intacto, con tres protones acoplados a 7.15 ppm (H12), 6.91 ppm (H13) y 7.23 ppm (H14). Las asignaciones se confirmaron observando un ROE de H12 a las resonancias a 4.17 ppm y 4.14 ppm, que se identificaron como H5. Los protones en el anillo de diacepina se asignaron de las resonancias de la sal (H4) a 9.04 y 8.57 ppm. Los datos 2D COSY mostraron que estos protones se acoplaron a los protones en 3.22 ppm y 3.20 ppm (H3) y 4.17 y 4.14 ppm (H5). Los protones H3 también se acoplaron a los protones a 3.34 y 3.14 (H2). Estos resultados confirmaron que el anillo de diacepina estaba intacto.

CUADRO 32

Desplazamientos químicos de ^1H para el metabolito M13 en DMSO-d_6

Número de átomos	δ^1H (ppm)[a]
2	3.34, 3.14
3	3.22, 3.20
4	9.10, 8.62
5	4.17, 4.14
9	3.15
10	2.40
11	3.23, 2.68
12	7.15
13	6.91
14	7.23
15	2.26, 1.33
16	1.97, 1.67
17	4.29

[a]Los desplazamientos químicos se refieren al DMSO-d_6 interno residual a 2.49 ppm para ^1H.

Los datos espectrales de 1D ^1H RMN (Cuadro 32), mostraron que ocurrió un cambio en la región de ciclopentilo, debido a que hubo cinco resonancias campo arriba de 2.5 ppm para M13, mientras que en el espectro RMN para la DCDQ, hubo siete resonancias. Los protones en la posición 11 se asignaron basándose en su similitud con aquéllos para la DCDQ. La resonancia del triplete a 2.68 fue única para la DCDQ. Esta resonancia se acopló a una resonancia a 3.23 ppm (H11) y otra a 2.40 ppm (H 10). H10 se acopló a una resonancia a 3.15 ppm (H9), y se acopló débilmente a 4.29 ppm (H17). H9 se acopló a un par de metileno a 2.26 ppm y 1.33 ppm (ambos H15). Este par de metileno se acopló a un segundo par de metileno a 1.97 ppm y 1.67 ppm (ambos H16). El metileno H16 se acopló a H17. Un protón

faltaba del anillo de ciclopentano y el gran desplazamiento campo abajo del protón restante indicó un heteroátomo cercano. Todos estados datos fueron consistentes con el grupo sulfato presente en la posición C17. Por lo tanto, M13 se identificó como un sulfato de 17 hidroxi DCDQ.

Discusión

El presente estudio se diseñó para obtener la orina de la rata para el aislamiento del metabolito y para obtener una identificación estructural más específica para los metabolitos seleccionados de la DCDQ. A tres ratas macho y tres ratas hembra se les dio una sola dosis de 50 mg/kg de DCDQ. La orina se recolectó a intervalos de 0-12 y 12-24 horas. Los metabolitos de la DCDQ M7 (ceto DCDQ), M9 (hidroxil DCDQ glucurónido) y M13 (sulfato de hidroxil DCDQ), se aislaron de la orina mediante un método de HPLC semipreparativo de dos etapas, en cantidades de pocos microgramos, suficientes para el análisis espectroscópico con RMN. Basándose en los análisis espectroscópicos de MS y RMN, el sitio del metabolismo para M7 y M13 fue en la posición 17. El sitio del metabolismo para M9 fue en la posición 13. Las identificaciones estructurales para M7, M9 y M13 identificadas a través de este estudio, refinan además aquellas del estudio in vivo en ratas discutido anteriormente.

Metabolismo in vivo de la [^{14}C]DCDQ en sujetos humanos sanos después de la administración oral

Los perfiles del metabolito de la DCDQ en plasma y orina de sujetos humanos sanos que reciben una sola dosis o múltiples dosis orales de DCDQ a varias dosificaciones se determinaron. Además, las concentraciones relativas del metabolito principal de la DCDQ (M6, carbamoil glucurónido), se determinaron en las muestras seleccionadas.

La DCDQ y varios metabolitos de la DCDQ se identificaron en plasma y orina. El DCDQ carbamoil glucurónido (M6), fue el componente relacionado con el fármaco predominante en el plasma y la orina. El N óxido de la DCDQ imina (M5), la DCDQ sin cambio, la DCDQ imina (P3) y otros compuestos relacionados con el fármaco relativamente menores, también se observaron en el plasma. La DCDQ sin cambio, el N óxido de la DCDQ glucurónico (M40), el hidroxil DCDQ glucurónido (M38), el hidroxil DCDQ carbamoil glucurónido (M37) y varios de otros componentes relacionados con el fármaco relativamente menores, se excretaron en la orina.

Las concentraciones de M6 en plasma se incrementaron con la dosificación que se incrementa, y se observaron grandes variaciones individuales. Las concentraciones de M6 en plasma disminuyeron con el tiempo de 6 a 24 horas postdosis. Las relaciones de las concentraciones en plasma de M6 a DCDQ fueron más altas a las 6 horas que a las 12 y 24 horas postdosis. A las 6 horas postdosis, las relaciones promedio variaron de 35.4 a 76.6. No hubo diferencias estadísticamente significativas en las

concentraciones de M6 y las relaciones de M6 a DCDQ entre los sujetos en ayuno y alimentados que recibieron 300 mg de DCDQ. Las relaciones promedio de M6 a DCDQ variaron de 84 a 1018 en la orina.

Los resultados muestran que la DCDQ se sometió a un metabolismo de fase I y fase II en sujetos humanos sanos, que recibieron DCDQ oralmente, y la carbamoil glucuronidación fue la trayectoria metabólica principal. En contraste con los estudios en animales, la formación del carbamoil glucurónido (M6), fue la trayectoria metabólica principal en humanos, y M6 fue el metabolito relacionado con el fármaco predominante en el plasma y orina humanos.

Materiales y métodos

Métodos

El clorhidrato de DCDQ con una pureza química de 98.6% se sintetizó por Wyeth Research (Pearl River, NY). El DCDQ carbamoil glucurónido se sintetizó por Chemical Development en Wyeth Research (Montreal, Canadá), y tuvo una pureza de 95.5%. El estándar interno (d_8-DCDQ, lote L27347-140-A), se sintetizó por el grupo de Radiosíntesis en Wyeth Research (Pearl River, NY). La distribución de deuterio reportada fue d_0-d_5 0%, d_6 0.1%, d_7 2.7%, y d_8 97.1%. Los solventes utilizados para la extracción y los análisis cromatográficos fueron grado reactivo para HPLC o ACS de EMD Chemicals (Gibbstown, NJ).

Métodos

Administración del fármaco y recolección del espécimen

La administración del fármaco y la recolección del espécimen se realizaron en un estudio aleatorizado, con doble anonimato, controlado con placebo, de una sola dosis ascendente de la seguridad, tolerabilidad, farmacocinética y farmacodinámica de la DCDQ administrada oralmente a sujetos sanos y sujetos con esquizofrenia y un trastorno esquizoafectivo. Los especimenes se almacenaron a aproximadamente -70°C hasta el análisis para los perfiles del metabolito y para las relaciones del carbamoil glucurónido (M6) a DCDQ.

Preparación de la muestra

Dos sujetos con una exposición media y alta a la DCDQ en el estudio de la dosis ascendente múltiple de 25 mg se analizaron también mediante LC/MS para los perfiles del metabolito. Las muestras de plasma a las 8 horas se recolectaron en el día 1 y en el día 14 de los sujetos 9 y 41, se procesaron y analizaron como se describe a continuación. No se agregó un estándar interno a las muestras analizadas para los perfiles del metabolito.

Las muestras de plasma de los sujetos en ayuno 25, 28 y 30 en el grupo de una sola dosis de 50 mg, los sujetos en ayuno 50, 51, 54 en el grupo de la dosis única de 200 mg, los sujetos en ayuno 74, 76, 79 en el grupo de la dosis única de 300 mg, los sujetos alimentados 83, 84, 86 en el grupo de la dosis única de 300 mg y los sujetos en ayuno 92, 94, 96 en el

grupo de la dosis única de 500 mg, se analizaron para las concentraciones de DCDQ carbamoil glucurónido (M6). El estándar interno d_8-DCDQ (25 µL de una solución de metanol de 200 ng/mL), se agregó a 100 µL de las muestras de plasma, seguido por la adición de 300 µL de acetonitrilo. Las muestras se mezclaron y centrifugaron a 14000 rpm en una centrífuga Eppendorf 5415C (Brinkman Instruments Inc., Westbury, NY) durante 10 minutos. El sobrenadante de cada muestra se transfirió a un tubo limpio y se evaporó hasta sequedad bajo una corriente de nitrógeno en un evaporador TurboVap LV (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA). El residuo se reconstituyó con 50 µL de metanol, seguido por la adición de 150 µL de agua. La muestra se centrifugó y se mezcló como se describió anteriormente. El sobrenadante se analizó mediante análisis de LC/MS/MS. Las muestras para las curvas estándar se prepararon con el plasma de control alterado con M6 sintético. Las concentraciones de M6 utilizadas para la curva estándar variaron de 0 a 2500 ng/mL de plasma.

Las muestras de orina de 0-4, 4-12 y 12-24 horas de los mismos en sujetos en los grupos de una sola dosis se analizaron para las relaciones de M6 a DCDQ. El estándar interno no se utilizó en el análisis de las muestras de orina. Las muestras se diluyeron 20 veces con una muestra de orina de control y se analizaron directamente mediante LC/MS. Para estimar las relaciones de M6 a DCDQ en la orina humana, las muestras de orina de control se alteraron con 200 ng/mL de DCDQ y 1000, 5000 ó 10000 ng/mL de DCDQ carbamoil glucurónido, y se analizaron mediante LC/MS.

Cromatografía líquida/espectrometría de masas

Se utilizaron tres sistemas LC/MS en este trabajo. El Sistema 1 de LC/MS se utilizó para el análisis de las muestras de plasma y orina para la caracterización del metabolito. El Sistema 2 de LC/MS se utilizó para proporcionar datos de MS/MS adicionales para la caracterización de los metabolitos de DCDQ en la orina. El Sistema 3 de LC/MS se utilizó para el análisis semicuantitativo del metabolito M6 (DCDQ carbamoil glucurónido) en las muestras de plasma y orina.

Sistema 1 de LC/MS

El Sistema 1 de LC/MS se utilizó para el análisis de las muestras de plasma y orina para la caracterización del metabolito. El equipo para la HPLC utilizado con este Sistema de LC/MS consistió de un sistema para HPLC Modelo 1100 Agilent (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), que incluye un tomador de muestras automático, una bomba binaria y un detector UV de arreglo de diodo. El detector UV se ajustó para verificar de 210 a 350 nm. La fase móvil del HPLC consistió de acetato de amonio 10 mM, pH 4.5 (A) y metanol (B), y se suministró a 0.2 mL/minuto. El gradiente de la fase móvil lineal (Gradiente 1 de la HPLC) se muestra a continuación. Durante el análisis de la muestra con LC/MS, hasta 6 minutos de flujo inicial se separó del espectrómetro de masas antes de la evaluación de los metabolitos.

Gradiente 1 de la HPLC

Tiempo (minutos)	A (%)	B (%)
0	95	5
3	95	5
3.1	90	10
13	90	10
25	80	20
50	70	30
70	5	95
80	5	95

El espectrómetro de masas utilizado para la caracterización del metabolito con el Sistema 1 de LC/MS fue un espectrómetro de masas con trampa de iones Finnigan LCQ-Deca (Thermo Electron, San Jose, CA). Este espectrómetro de masas se equipó con una interconexión de ionización con electrorrocío (ESI), y se operó en el modo de ionización positiva. Los ajustes para el espectrómetro de masas LCQ se listan a continuación.

Ajustes para el espectrómetro de masas Finnigan LCQ	
Voltaje del rocío	4.5 kV
Temperatura del capilar calentado	200°C
Presión del gas nebulizador	3.515 kg/cm^2 (50 psi)
Ajuste del gas auxiliar	60
Ajuste AGC de la exploración completa	5×10^7
Energía relativa de la colisión	30%

Sistema 2 de LC/MS

El Sistema 2 de LC/MS se utilizó para proporcionar datos de MS/MS adicionales para la caracterización de los metabolitos de la DCDQ en la orina. El equipo para la HPLC utilizado con el Sistema 2 de LC/MS consistió de un sistema para HPLC modelo Waters (Waters Corp., Milford,

MA). Se equipó con un tomador de muestras automático integrado y un detector UV de arreglo de diodo modelo 996. El detector de UV se ajustó para verificar a 210-400 nm. La columna para la HPLC, las fases móviles, la velocidad de flujo, la separación del flujo lejos del espectrómetro de masas y el gradiente son como se describió anteriormente para el Sistema 1 de LC/MS. La temperatura de la columna fue de 25°C.

El espectrómetro de masas utilizado para la caracterización del metabolito con el Sistema 2 de LC/MS fue un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Micromass Quattro (Waters Corp.). Este espectrómetro de masas se equipó con una interconexión de electrorrocío y se operó en el modo de ionización positiva. Los ajustes para este espectrómetro de masas se listan a continuación.

Ajustes del espectrómetro de masas Micromass	
Rocío ESI	2.5 kV
Cono	45 V
Resolución de la masas (MS1 y MS2)	0.7 Da ± 0.2 Da de ancho a la mitad de la altura
Flujo del gas de desolvación	900-1100 L/hr
Flujo del gas del cono	50-70 L/hr
Temperatura del bloque de la fuente	80°C
Temperatura del gas de desolvación	200°C
Presión del gas de colisión	1.0-1.2 x 10^{-3} mbar
Desviación de la colisión	22 eV

Sistema 3 de LC/MS

El Sistema 3 de LC/MS se utilizó para el análisis semicuantitativo del metabolito M6 (DCDQ carbamoil glucurónido) en las muestras de plasma y orina. El equipo para la HPLC de este Sistema de LC/MS consistió de un

HPLC Thermo Surveyor HPLC (Thermo Electron Corp., San Jose, CA), que incluye una bomba Surveyor MS y un tomador de muestras automático. Las separaciones se lograron en una columna de 5 micras Phenomenex Luna C18(2), 150 x 2 mm (Phenomenex, Torrance, CA). Las temperaturas del tomador de muestras automático y la columna se ajustaron a 5°C y 40°C, respectivamente. La fase móvil de la HPLC consistió de acetato de amonio 10 mM (A) y metanol (B), y se suministraron a 0.2 mL/minuto. El gradiente de la fase móvil lineal (Gradiente 2 de la HPLC), se muestra a continuación. Durante el análisis de la muestra con LC/MS, hasta 3 minutos del flujo inicial se separó del espectrómetro de masas antes de la evaluación de los metabolitos.

Gradiente 2 de la HPLC

Tiempo (minutos)	A (%)	B (%)
0	90	10
3	90	10
11	10	90
18	10	90
20	90	10
24	90	10

El espectrómetro de masas utilizado para el análisis semicuantitativo con el Sistema 3 de LC/MS fue un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Finnigan TSQ Quantum (Thermo Electron Corp.). Este espectrómetro de masas se equipó con una interconexión de electrorrocío, y

se operó en el modo de ionización positiva. Los ajustes para este espectrómetro de masas se listan a continuación.

Ajustes para el espectrómetro de masas Finnigan TSQ Quantum	
Voltaje del rocío	4.5 kV
Temperatura del capilar	250°C
Ajuste de la resolución de la masa Q1	0.8 Da de ancho a la mitad de la altura
Ajuste de la resolución de la masa Q3	0.6 Da de ancho a la mitad de la altura
Presión del gas del nebulizador	30 unidades arbitrarias
Ajuste del gas auxiliar	50 unidades arbitrarias
Presión del gas de colisión	1.5 mtorr

El análisis de LC/MS/MS en el modo de verificación de la reacción (SRM) seleccionado (LC/SRM), se condujo para la DCDQ y M6 utilizando los siguientes ajustes.

Ajustes de los Análisis de LC/SRM				
Compuesto	Masa Nominal		Desviación de la colisión	Tiempo de residencia
	Q1	Q3	(eV)	(ms)
DCDQ	229	186	22	300
d8-DCDQ (únicamente plasma)	237	194	22	300
DCDQ carbamoil glucurónido (M6)	449	273	25	300

Análisis de los datos y evaluación estadística

Se utilizó el programa de computadora Excel® 97 de Microsoft para calcular las medias y las desviaciones estándar y para realizar la prueba t de estudent. Se utilizaron los programas Xcalibur (versión 1.3) y MassLynx

(versión 4.0) para la recolección y el análisis de los datos de LC/MS. Las relaciones del área de los picos de M6 al estándar interno se utilizaron para la cuantificación de M6 en las muestras de plasma.

Resultados

Perfiles del metabolito y concentraciones de M6 en plasma

La DCDQ y ocho metabolitos de la DCDQ se identificaron en el plasma humano (Cuadro 33). El DCDQ carbamoil glucurónido (M6) fue el componente relacionado con el fármaco predominante en el plasma en todos los grupos de las dosis en los estudios de una sola dosis y de múltiples dosis. El N óxido de DCDQ imina (M5), la DCDQ sin cambiar, la DCDQ imina (P3) y cantidades en trazas de hidroxil DCDQ, hidroxil DCDQ imina, hidroxil DCDQ glucurónido (M9) y ceto DCDQ glucurónido (M22) se observaron también en el plasma. Los perfiles del metabolito fueron cualitativamente similares en todas las muestras analizadas.

Las concentraciones en plasma de M6 se incrementaron con la dosificación incrementada, y se observaron grandes variaciones individuales (Cuadro 34). De los tres puntos de medición analizados, las concentraciones de M6 fueron las más altas a las 6 horas postdosis y disminuyeron con el tiempo a las 12 y 24 horas postdosis. Las relaciones de las concentraciones en plasma de M6 a DCDQ fueron también las más altas a las 6 horas postdosis, y en general disminuyeron con el tiempo. A las 6 horas postdosis, las relaciones promedio variaron de 35.4 a 76.6. No hubo diferencias

estadísticamente significativas en concentraciones de M6 y las relaciones de M6 a DCDQ entre los sujetos en ayuno y alimentados que reciben 300 mg de DCDQ.

Perfiles del metabolito y relaciones de M6 a DCDQ en la orina

La DCDQ y varios metabolitos de la DCDQ se identificaron en la orina. El DCDQ carbamoil glucurónido (M6) fue el componente relacionado con el fármaco predominante en la orina, como en el plasma. La DCDQ sin cambio, el N óxido de DCDQ glucurónido (M40), el hidroxil DCDQ glucurónido (M38), hidroxil DCDQ carbamoil glucurónido (M37) y cantidades en trazas de la DCDQ imina (P3), hidroxil DCDQ (M1 y M32), hidroxil DCDQ imina (M29), ceto DCDQ glucurónido (M22), hidroxil DCDQ glucurónido (M9), hidroxil DCDQ carbamoil glucurónidos (M33, M36 y M39), DCDQ imina glucurónido (M34) e dihidroxil DCDQ imina glucurónido (M35) también se observaron en la orina.

El carbamoil glucurónido (M6) estaba presente en la orina a concentraciones mucho mayores que el fármaco original (Cuadro 35). Las relaciones promedio de M6 a DCDQ variaron de 84 a 1018; se observaron grandes variaciones. Las relaciones parecieron ser menores en el grupo de la dosis de 500 mg que en los otros grupos de las dosis.

Caracterización del metabolito mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas

Los espectros de masas se obtuvieron mediante análisis de LC/MS y LC/MS/MS para la DCDQ y sus metabolitos en el plasma y orina humanos. El Cuadro 33 resume los metabolitos de DCDQ caracterizados en este estudio. Puesto que M6 (DCDQ carbamoil glucurónido) fue el componente relacionado con la DCDQ predominante en el plasma y la orina, y la concentración relativa de DCDQ sin cambiar fue relativamente menor. Por lo tanto, la caracterización espectral másica sólo de los componentes relacionados con la DCDQ presentes en concentraciones aproximadamente iguales o mayores que la DCDQ sin cambiar en el plasma o la orina se discuten con más detalle a continuación.

DCDQ

Las características de la masa espectral del estándar auténtico de la DCDQ se examinaron para la comparación con los metabolitos. En el espectro LC/MS de la DCDQ, un ion molecular protonado, $[M+H]^+$, se observó a m/z 229. La pérdida de NH_3 de $[M+H]^+$ proporcionó m/z 212. La pérdida de metilenamina, etilidenamina y propilidenamina del ion molecular generó los iones del producto a m/z 200, 186 y 171, respectivamente. La pérdida del grupo propeno del ion molecular generó m/z 187 y la pérdida adicional de metilenamina y etilidenamina proporcionó m/z 158 y 144. La pérdida del grupo

ciclopenteno de $[M+H]^+$ proporcionó m/z 161. La pérdida del grupo ciclopentil-metilenamina generó el ion del a m/z 132.

Metabolito M5

El metabolito M5 produjo una $[M+H]^+$ a m/z 243, que fue 14 Da mayor que la DCDQ y 16 Da mayor que P3. Estos datos sugieren que M5 fue un metabolito ceto DCDQ, hidroxil DCDQ imina o N óxido de DCDQ imina. La pérdida de NH_3 y H_2O de $[M+H]^+$ proporcionó m/z 226 y 225, respectivamente, que fue consistentes con la adición de un átomo de oxígeno. La pérdida de metilenamina, del ion molecular se propuso que generó m/z 213, consistente con la adición de oxígeno y la presencia de un enlace doble de la pérdida de dos hidrógenos. El ion del producto a m/z 130 se observó también para P3 y fue 2 Da menor que el ion correspondiente a m/z 132 para la DCDQ. Estos datos indicaron que M5 también contenía un grupo imina, que eliminó a la ceto DCDQ de consideración. El tiempo de retención de la HPLC de M5 fue más largo que para DCDQ y P3 (DCDQ imina), lo que se observó también en el estudio[1] del metabolismo in vitro y es consistente con la N oxidación. Por lo tanto, se identificó a M5 como el N óxido de DCDQ imina.

Metabolito M6

La $[M+H]^+$ para M6 se observó a m/z 449, que fue 220 Da mayor que para DCDQ. La pérdida de 176 Da del ion molecular generó m/z 273, indicando que M6 fue un glucurónido. La pérdida adicional de 44 Da de m/z

273 proporcionó m/z 229, que también fue el ion molecular para la DCDQ. Los iones del producto a m/z 212 y 186 también se observaron para DCDQ, consistente con que M6 es un conjugado de la DCDQ. Por lo tanto, M6 se identificó como el carbamoil glucurónido de DCDQ.

Metabolito M38

La $[M+H]^+$ para M38 se observó a m/z 421, que fue 192 Da mayor que la DCDQ. La pérdida de NH_3 de $[M+H]^+$ proporcionó m/z 404, lo que sugirió un grupo amino sin cambiar en el anillo de diazepan. La pérdida de 176 Da del ion molecular generó m/z 245, que también fue el ion molecular para los metabolitos de hidroxil DCDQ. Las pérdidas de NH_3 y H_2O de m/z 245 generaron m/z 228 y 227, respectivamente. Estos datos indicaron que M38 fue un glucurónido de una hidroxil DCDQ. El ion del producto a m/z 362 fue 176 Da mayor que el ion correspondiente a m/z 186 para la DCDQ, lo cual indicó la glucuronidación de la porción de quinolina-ciclopentano. Los iones del producto a m/z 362 y 269 se propusieron para incluir la porción del ácido glucurónico y han sido el resultado de la fragmentación de los anillos de diacepina, quinolina y ciclopentano, como se indica en el esquema de fragmentación. Estos datos fueron consistentes con la glucuronidación del nitrógeno de la quinolina y la hidroxilación del anillo de diacepina. Por lo tanto, M38 se identificó como un hidroxil DCDQ glucurónido.

Metabolito M40

La $[M+H]^+$ para M40 se observó a m/z 421, que fue 192 Da mayor que la DCDQ. La pérdida de H_2O de $[M+H]^+$ proporcionó m/z 403. No se observó una pérdida evidente de NH_3 de $[M+H]^+$, lo cual sugiere un grupo amino modificado en el anillo de diazepan. La pérdida de 176 Da del ion molecular generó m/z 245, que es también el ion molecular para los metabolitos de hidroxil DCDQ. Sin embargo, la intensidad relativa de m/z 245 para M40 fue más débil que la observada para el metabolito M38. La pérdida de un átomo de oxígeno de m/z 245 proporcionó m/z 229, también el ion molecular para DCDQ. Estos datos en combinación con la presencia de m/z 229 como el pico base en el espectro de masas con trampa de iones, más que m/z 245 como se observó para el metabolito M38, indicaron la presencia de un N óxido. Los iones del producto a m/z 228, 227, 212 y 210 respectivamente, se generaron por las pérdidas de H_2O y NH_3 de m/z 245 y 229 como se indicó en el esquema de fragmentación. El tiempo de retención de la HPLC de M40 fue mayor que para M38, lo cual también es consistente con que M40 es un N óxido. Los iones del producto a m/z 200 y 186 también se observaron para la DCDQ y se propusieron como el resultado de la pérdida de un átomo de oxígeno de los iones del producto del N óxido correspondiente para M40. Los iones del producto a m/z 360 y 271 se propusieron para incluir la porción del ácido glucurónico y han sido el resultado de la fragmentación de los anillos de diacepina, quinolina y ciclopentano, como se indica en el esquema de fragmentación. Estos datos fueron consistentes con la

glucuronidación del grupo amino del anillo de diacepina y la N oxidación del nitrógeno de la quinolina. Por lo tanto, se propuso que M40 es un N óxido de DCDQ glucurónido.

Discusión

La DCDQ se somete al metabolismo en los humanos. El DCDQ carbamoil glucurónido (M6) fue el componente relacionado con el fármaco predominante en el plasma y la orina. El N óxido de DCDQ imina (M5), la DCDQ sin cambiar, la DCDQ imina (P3), fueron los otros componentes relacionados con el fármaco principales observados en el plasma. La DCDQ sin cambiar, el N óxido de DCDQ glucurónido (M40), el hidroxil DCDQ glucurónido (M38), el hidroxil DCDQ carbamoil glucurónido (M37) se excretaron en la orina.

Las concentraciones en plasma de M6 se incrementaron con la dosificación que se incrementa, y se observaron variaciones individuales grandes. Las concentraciones de M6 disminuyeron con el tiempo de 6 a 24 horas postdosis. Las relaciones de las concentraciones en plasma de M6 a DCDQ fueron más altas a las 6 horas que a las 12 y 24 horas postdosis. A las 6 horas postdosis, las relaciones promedio variaron de 35.4 a 76.6. En contraste, se detectaron cantidades mucho menores de M6 en los estudios in vitro e in vivo previos. No hubo diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de M6 y las relaciones de M6 a DCDQ entre los sujetos en ayuno y alimentados que reciben 300 mg de DCDQ. Las relaciones

promedio de M6 a DCDQ variaron de 84 a 1018 en la orina. En resumen, la DCDQ se sometió al metabolismo de la fase I y fase II en sujetos humanos sanos y la carbamoil glucuronidación fue la trayectoria metabólica principal. En contraste con los estudios en animales, la formación del carbamoil glucurónido (M6) fue la trayectoria metabólica principal en humanos y M6 fue el metabolito relacionado con el fármaco predominante en el plasma y la orina humanos.

CUADRO 33

Metabolitos de la DCDQ caracterizados mediante LC/MS en el plasma y la orina humanos

t_R[a]	Pico del metabolito	$[M+H]^+$[b]	Sitio del metabolismo	Nombre	Matriz[c]
31.7	M32	245	Anillo de ciclopropano o piperidina	Hidroxilo DCDQ	P, U
32.2	M29	243	Anillos de ciclopentano y diazepan	Hidroxil DCDQ imina	P, U
36.3	M1	245	Anillo de piperidina	Hidroxilo DCDQ	P, U
38.3	M22	419	Anillos de diacepina y ciclopentano	Ceto DCDQ glucurónido	P, U
49.6	M9	421	Anillo de benceno	Hidroxil DCDQ glucurónido	P, U
58.0	M33	465	Anillo de diacepina	Hidroxil DCDQ carbamoil glucurónido	U
63.3	M34	403	Anillo de diacepina	DCDQ imina glucurónido	U
63.6	M35	435	Anillos de diacepina y ciclopentano	Dihidroxil DCDQ imina glucurónido	U

CUADRO 33 (Continuación)

Metabolitos de la DCDQ caracterizados mediante LC/MS en el plasma y la orina humanos

t_R[a]	Pico del metabolito	$[M+H]^+$	Sitio del metabolismo	Nombre	Matriz[b]
64.2	M36	465	Anillo de diacepina y anillo de quinolina o ciclopentano	Hidroxil DCDQ carbamoil glucurónido	U
65.9	P3	227	Anillo de diacepina	DCDQ imina	P, U
67.1	M37	465	Anillo de diacepina y anillo de quinolina o ciclopentano	Hidroxil DCDQ carbamoil glucurónido	U
68.6	DCDQ	229	Ninguna	DCDQ	P, U
70.9	M38	421	Nitrógeno de quinolina y anillo de diacepina	Hidroxil DCDQ glucurónido	U
71.4	M5	243	Anillo de diacepina	N-óxido de DCDQ imina	P
71.4	M39	465	Anillo de diacepina y anillo de quinolina o ciclopentano	Hidroxil DCDQ carbamoil glucurónido	U
73.6	M40	421	Nitrógenos de diacepina	N-óxido de glucurónido de DCDQ	U
75.2	M6	449	Grupo amina secundaria de diacepina	Carbamoil glucurónido de DCDQ	P, U

a: Tiempos de retención tomados de los datos de LC/MS

b: P = plasma, U= orina

CUADRO 34

Concentraciones (ng/mL) de DCDQ y DCDQ carbamoil glucurónido (M6) en plasma de sujetos sanos que reciben la DCDQ

Dosis (mg)	Tiempo (horas)	Sujeto	DCDQ[a]	M6	Relaciones de M6 a DCDQ
50 (en ayuno)	6	25	1.5	83.1	55.4
		28	0.9	127	141
		30	5.0	132	26.4
		Media ± S.D.	2.47 ± 2.21	114 ± 26.9	74.3 ± 59.6
	12	25	0.7	15.1	21.6
		28	0.4	6.60	16.5
		30	2.5	15.4	6.16
		Media ± S.D.	1.20 ± 1.14	12.4 ± 5.00	14.8 ± 7.87
	24[b]	25	0.2	3.1	15.5
		28	NA[c]	NA	NA
		30	0.6	3.6	6.00
		Media ± S.D.	0.40	3.35	10.8
200 (en ayuno)	6	50	2.7	225	83.3
		51	18.0	615	34.2
		54	12.0	216	18.0
		Media ± S.D.	10.9 ± 7.71	352 ± 17.1	45.2 ± 34.0
	12	50	1.2	37.5	31.3
		51	9.2	62.9	6.84
		54	6.4	30.3	4.73
		Media ± S.D.	5.60 ± 4.06	43.6 ± 17.1	14.3 ± 14.8
	24	50	0.3	4.8	16.0
		51	2.6	8.8	3.38
		54	1.6	9.4	5.88
		Media ± S.D.	1.50 ± 1.15	7.67 ± 2.50	8.42 ± 6.68

CUADRO 34 (Continuación)

Concentraciones (ng/mL) de DCDQ y DCDQ carbamoil glucurónido (M6) en plasma de sujetos sanos que reciben la DCDQ

Dosis (mg)	Tiempo (horas)	Sujeto	DCDQ[a]	M6	Relaciones de M6 a DCDQ
300 (en ayuno)	6	74	2.09	123	58.9
		76	4.27	249	58.3
		79	16.0	339	21.2
		Media ± S.D.	7.45 ± 7.48	237 ± 108	46.1 ± 21.6
	12	74	1.50	43.0	28.7
		76	3.34	78.0	23.4
		79	7.84	145	18.5
		Media ± S.D.	4.23 ± 3.26	88.7 ± 51.8	23.5 ± 5.10
	24	74	0.972	48.5	49.9
		76	1.72	12.0	6.98
		79	1.70	26.3	15.5
		Media ± S.D.	1.46 ± 0.43	28.9 ± 18.4	24.1 ± 22.7
300 (en ayuno)	6	83	19.0	860	45.3
		84	15.6	696	44.6
		86	1.30	182	140
		Media ± S.D.	12.0 ± 9.39	579 ± 354	76.6 ± 54.9
	12	83	10.9	279	25.6
		84	8.06	38.1	4.73
		86	5.97	540	90.5
		Media ± S.D.	8.31 ± 2.47	286 ± 251	40.3 ± 44.7
	24	83	2.60	24.6	9.46
		84	1.15	6.40	5.57
		86	2.69	146	54.3
		Media ± S.D.	2.15 ± 0.86	59.0 ± 75.9	23.1 ± 27.1

CUADRO 34 (Continuación)

Concentraciones (ng/mL) de DCDQ y DCDQ carbamoil glucurónido (M6) en plasma de sujetos sanos que reciben la DCDQ

Dosis (mg)	Tiempo (horas)	Sujeto	DCDQ[a]	M6	Relaciones de M6 a DCDQ
500 (en ayuno)	6	92	44.5	1324	29.8
		94	31.7	508	16.0
		96	20.2	1221	60.4
		Media ± S.D.	32.1 ± 12.2	1018 ± 444	35.4 ± 22.7
	12	92	24.5	146	5.96
		94	21.7	181	8.34
		96	12.0	206	17.2
		Media ± S.D.	19.4 ± 6.56	178 ± 30.1	10.5 ± 5.92
	24	92	5.53	58.3	10.5
		94	6.88	13.5	1.96
		96	3.95	77.0	19.5
		Media ± S.D.	5.45 ± 1.47	49.6 ± 32.6	10.7 ± 8.77

a: Las concentraciones de DCDQ se determinaron mediante Bioanalytical con un ensayo validado para el plasma humano. [4]Las concentraciones de M6 se cuantificaron mediante un método de LC/MS no validado en la Biotransformación utilizando una curva estándar generada con M6 sintetizado.

b: La desviación estándar no se calculó;

c: NA, no analizado debido a que el nivel en plasma de la DCDQ estuvo por debajo del nivel de cuantificación.

CUADRO 35

Concentraciones (ng/mL) de DCDQ y DCDQ carbamoil glucurónido (M6) a las relaciones de DCDQ en orina de sujetos sanos que reciben la DCDQ

Dosis (mg)	Tiempo (horas)	Sujeto	DCDQ[a]	Relaciones de M6 a DCDQ
50 (en ayuno)	0-4	25	13.7	571
		28	13.7	1739
		30	115	214
		Media ± S.D.	47.5 ± 58.5	841 ± 798
	4-12	25	31	389
		28	18.2	606
		30	126	261
		Media ± S.D.	58.4 ± 58.9	419 ± 174
	12-24	25	17.7	143
		28	5.21	259
		30	75.3	63.9
		Media	32.7 ± 37.4	155 ± 98.1
200 (en ayuno)	0-4	50	251	169
		51	288	171
		54	57	113
		Media ± S.D.	199 ± 124	151 ± 32.9
	4-12	50	79.5	397
		51	177	240
		54	97.3	215
		Media ± S.D.	118 ± 51.9	284 ± 98.7
	12-24	50	23.1	216
		51	181	85.9
		54	137	42.3
		Media	114 ± 81.5	115 ± 90.4
300 (en ayuno)	0-4	74	9.43	1167
		76	62.8	852
		79	172	440
		Media ± S.D.	81.4 ± 82.9	820 ± 365

CUADRO 35 (Continuación)

Concentraciones (ng/mL) de DCDQ y DCDQ carbamoil glucurónido (M6) a las relaciones de DCDQ en orina de sujetos sanos que reciben la DCDQ

Dosis (mg)	Tiempo (horas)	Sujeto	DCDQ[a]	Relaciones de M6 a DCDQ
	4-12	74	21.7	329
		76	93.4	1543
		79	72.3	324
		Media ± S.D.	62.5 ± 36.8	732 ± 702
	12-24	74	22.9	485
		76	2981	127
		79	64.1	110
		Media ± S.D.	128 ± 148	241 ± 212
300 (en ayuno)	0-4	83	55.9	1162
		84	1.56	441
		86	1.82	1451
		Media ± S.D.	19.8 ± 31.3	1018 ± 520
	4-12	83	259	375
		84	174	571
		86	30.6	1337
		Media ± S.D.	155 ± 115	761 ± 508
	12-24	83	351	148
		84	116	92.6
		96	308	184
		Media ± S.D.	258 ± 125	142 ± 46.0
500 (en ayuno)	0-4	92	1569	71.5
		94	835	60.2
		96	339	161
		Media ± S.D.	914 ± 619	97.6 ± 55.2
	4-12	92	1683	149
		94	612	34.6
		96	1811	69.4
		Media ± S.D.	1369 ± 658	84.3 ± 58.6
	12-24	92	160	288
		94	405	36.0
		96	273	203
		Media ± S.D.	279 ± 123	176 ± 128

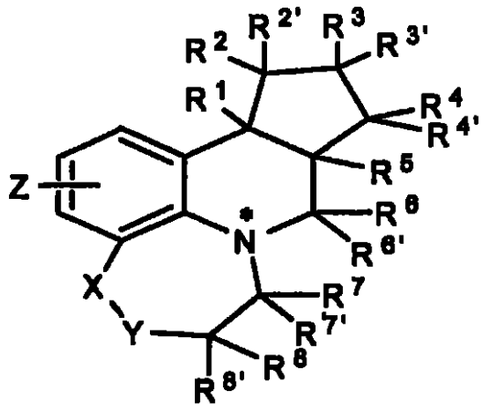
a: Las concentraciones de DCDQ se determinaron mediante Bioanalytical con un ensayo validado para la orina humana. [5]Las concentraciones de M6 se cuantificaron mediante un método de LC/MS no validado en la Biotransformación utilizando una curva estándar generada con M6 sintetizado.

Todas las referencias, incluyendo de manera no exclusiva los artículos, textos, patentes, solicitudes de patente, publicaciones y libros, citadas en la presente se incorporan como referencia en su totalidad. Esta solicitud reclama el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de E.U.A. No. de Serie 60/625,335, presentada en Noviembre 5 del 2004, el contenido total de la cual se incorpora como referencia en su totalidad.

NOVEDAD DE LA INVENCION

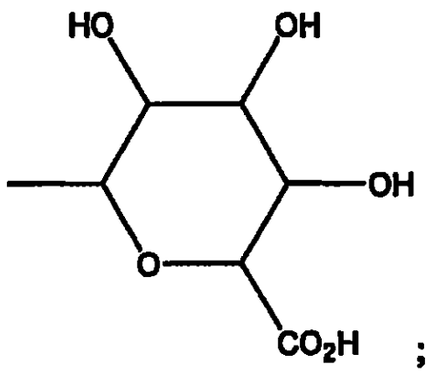
REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto of fórmula I



I

en donde: para cada R^n y $R^{n'}$, en donde n es 1 hasta 8: cada R^n y $R^{n'}$ es de manera independiente hidrógeno, hidroxi, $CH_3C(O)$-O-, -OSO_3H u -O-G; o R^n y $R^{n'}$ correspondiente, en donde n es 2, 3, 4, 6, 7 u 8, tomadas junto con el carbono al cual están unidas, forman C=O; o R^n junto con R^{n+1} correspondiente, en donde n es 1, 2, 3, 4, 5 ó 7, tomadas juntas forman un enlace doble entre los carbonos a los cuales están unidos, y cada $R^{n'}$ y $R^{(n+1)'}$ correspondiente, es de manera independiente hidrógeno, hidroxi, $CH_3C(O)$-O, -OSO_3H u -O-G; G tiene la fórmula:



;

en donde el nitrógeno denotado con el símbolo *, puede formar opcionalmente un N óxido; X-Y es CH=N, CH=N(O), $CH_2N(O)$, C(O)NH o CR^9HNR^{10}; R^9 es hidrógeno, hidroxilo o $-OSO_3H$; R^{10} es hidrógeno, acetilo, $-SO_3H$, -G o -C(O)-OG; Z es hidrógeno, hidroxi, $-OSO_3H$ u -O-G; con la condición de que cuando Z es hidroxi, entonces (a) uno de R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9 y R^{10} no es hidrógeno; o (b) X-Y no es CR^9HNR^{10}; y con la condición adicional de que cuando X-Y es CHR^9NR^{10}, entonces al menos uno de Z, R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9 y R^{10} no es H; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque al menos uno de Z y R^1 hasta R^8 es -OH.

3.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque X-Y es CR^9HNR^{10}.

4.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque $R^9 = R^{10} = H$.

5.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado además porque al menos uno de R^7 y R^8 es -OH.

6.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado además porque R^6 es -OH.

7.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado además porque al menos uno de R^3 y R^4 es -OH.

8.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado además porque al menos uno de R^1, R^5, R^6, R^7, y Z es -OH.

9.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque R^9 es H y R^{10} es acetilo.

10.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado además porque al menos uno de R^7 y R^8 es -OH.

11.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque X-Y es CH=N.

12.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado además porque al menos uno de R^1 hasta R^6 es -OH.

13.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado además porque al menos uno de R^2 hasta R^4 es -OH.

14.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque al menos uno de R^1 hasta R^6, R^9, R^{10}, y Z es -C(O)-O-G, -O-G o -G.

15.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado además porque X-Y es CR^9HNR^{10}.

16.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado además porque R^9 y R^{10} son H.

17.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado además porque al menos uno de Z, R^3, y R^4 es -O-G.

18.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado además porque al menos uno de R^1 hasta R^6, R^9, y Z es -O-G.

19.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado además porque R^2 junto con R^3 tomadas juntas forman un enlace doble entre los carbonos a los cuales están unidos, y al menos uno de $R^{3'}$ y R^4 es -O-G.

20.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado además porque R^4 y $R^{4'}$ junto con el carbono al cual están unidos forman C=O.

21.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado además porque R^{10} es -G.

22.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado además porque R^{10} es -C(O)O-G.

23.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado además porque R^{10} es acetilo.

24.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado además porque al menos uno de R^1 hasta R^6, R^9, y Z es -O-G.

25.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado además porque al menos uno de R^7 y R^8 es -O-G.

26.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque al menos uno de R^1 hasta R^9, y Z es $-OSO_3H$.

27.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado además porque X-Y es $-CHR^9NR^{10}$.

28.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 26 o la reivindicación 27, caracterizado además porque $R^9 = R^{10} = H$.

29.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado además porque al menos uno de R^1 hasta R^6 es $-OSO_3H$.

30.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado además porque al menos uno de R^2 y R^3 es $-OSO_3H$.

31.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado además porque R^3 es $-OSO_3H$.

32.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 26 o la reivindicación 27, caracterizado además porque al menos uno de R^9 y Z es $-OSO_3H$.

33.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque X-Y es CR^9HNR^{10}, en donde R^9 es H y R^{10} es $-SO_3H$.

34.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado además porque al menos dos de R^n y el R^{n+1}

correspondiente, en donde n = 1-5, forman un enlace doble entre los carbonos a los cuales están unidos.

35.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque R^n y $R^{n'}$ correspondientes tomadas junto con el carbono al cual están unidas forman C=O.

36.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 35, caracterizado además porque R^4 y $R^{4'}$ tomadas junto con el carbono al cual están unidas forman C=O.

37.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 36, caracterizado además porque X-Y es CR^9HNR^{10}.

38.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 36 o la reivindicación 37, caracterizado además porque R^{10} es -G.

39.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 36 o la reivindicación 37, caracterizado además porque R^9 y R^{10} son H.

40.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque X-Y es C(O)NH.

41.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque X-Y es CH=N.

42.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 41, caracterizado además porque al menos uno de R^1 hasta R^6 es -OH.

43.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 42, caracterizado además porque al menos uno de R^2 hasta R^4 es -OH.

44.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 42, caracterizado además porque el nitrógeno entre R^6 y R^7 forman un N óxido.

45.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque al menos uno de R^n y su R^{n+1} correspondiente, en donde n = 1-5, forman juntas un enlace doble entre los carbonos a los cuales están unidas y cada $R^{n'}$ y $R^{(n+1)'}$ es de manera independiente hidrógeno, hidroxi, $CH_3C(O)$-O, -OSO_3H u -O-G.

46.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 45, caracterizado además porque n = 2.

47.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 45, caracterizado además porque $R^{2'}$ = H, y $R^{3'}$ o R^4 es -O-G.

48.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 45, caracterizado además porque X-Y es CHR^9NR^{10}.

49.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 48, caracterizado además porque $R^9 = R^{10}$ = H.

50.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 45, caracterizado además porque para al menos dos R^n, cada R^n y su R^{n+1} correspondiente, en donde n = 1-5, forman juntas un enlace doble entre los carbonos a los cuales están unidas.

51.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 50, caracterizado además porque X-Y = CHR^9NR^{10}.

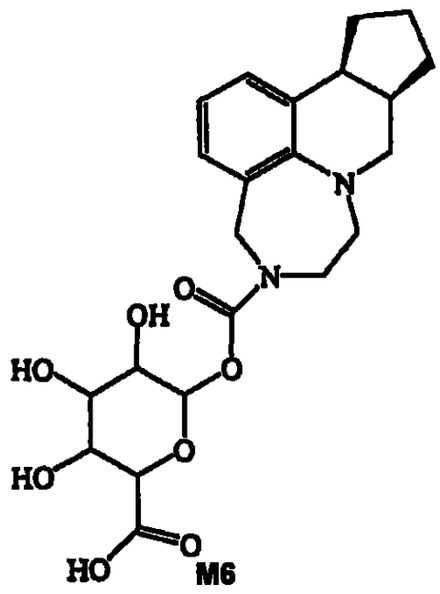
52.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado además porque R^{10} es H; y Z o R^9 es $-OSO_3H$.

53.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 50, caracterizado además porque $R^9 = R^{10} = H$.

54.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 45, caracterizado además porque R^9 es H y R^{10} es $-SO_3H$.

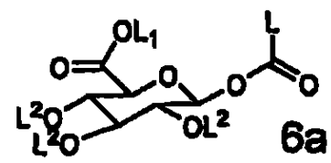
55.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 45, caracterizado además porque R^9 es H y R^{10} es acetilo.

56.- Un método para preparar un compuesto de fórmula M6:



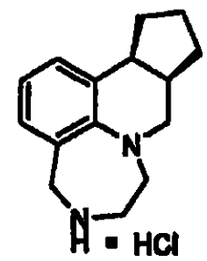
M6

que comprende: hacer reaccionar el Compuesto 6a:

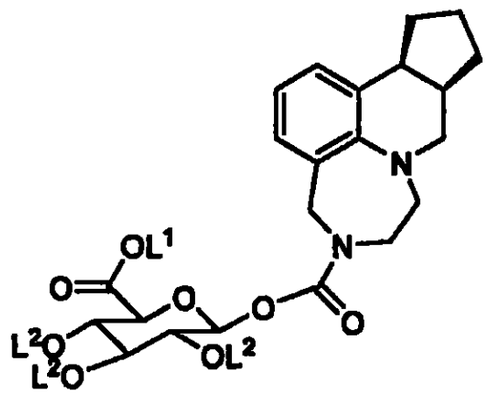


6a

en donde cada L, L^1 y L^2 es un grupo saliente; con DCDQ:



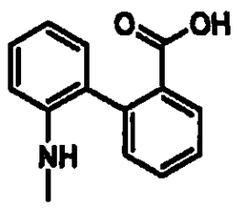
en la presencia de un reactivo de acoplamiento, bajo condiciones suficientes para proporcionar el compuesto 7:



7

y eliminar los grupos salientes L^1 y L^2.

57.- El método de conformidad con la reivindicación 56, caracterizado además porque L tiene la fórmula:



58.- El método de conformidad con la reivindicación 56, caracterizado además porque L^1 y L^2 se seleccionan de manera independiente de alquilo inferior y acetilo.

59.- El método de conformidad con la reivindicación 56, caracterizado además porque L^1 es metilo y cada L^2 es acetilo.

60.- El método de conformidad con la reivindicación 56, caracterizado además porque comprende: desproteger el compuesto 7 eliminando los grupos protectores L^1 y L^2 de la porción glucuronilo del compuesto 7, formando por lo tanto el metabolito M6.

61.- El método de conformidad con la reivindicación 56, caracterizado además porque el reactivo de acoplamiento se selecciona de BOP, DCC y EDC.

62.- El método de conformidad con la reivindicación 56, caracterizado además porque el reactivo de acoplamiento es BOP.

63.- El método de conformidad con la reivindicación 56, caracterizado además porque la reacción del compuesto 6 con el reactivo de acoplamiento y la DCDQ se lleva a cabo en la presencia de una amina.

64.- El método de conformidad con la reivindicación 63, caracterizado además porque la amina es una base de Hünig.

65.- El método de conformidad con la reivindicación 63, caracterizado además porque la reacción del compuesto 6 con el reactivo de acoplamiento y la DCDQ se lleva a cabo en un solvente.

66.- El método de conformidad con la reivindicación 65, caracterizado además porque el solvente es CH_2Cl_2.

67.- El método de conformidad con la reivindicación 60, caracterizado además porque el compuesto 7 se somete a purificación en cromatografía en columna antes de la desprotección.

68.- El método de conformidad con la reivindicación 60, caracterizado además porque la desprotección se lleva a cabo en alcohol en la presencia de una base.

69.- El método de conformidad con la reivindicación 68, caracterizado además porque la base se selecciona de NaOH, LiOH y KOH.

70.- El método de conformidad con la reivindicación 68, caracterizado además porque el alcohol es un alcohol alquílico inferior.

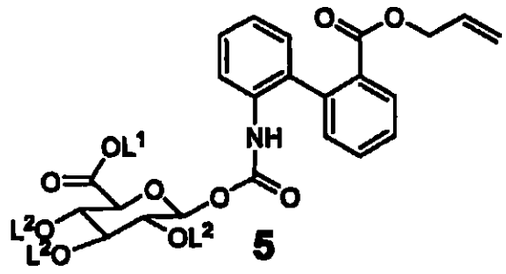
71.- El método de conformidad con la reivindicación 68, caracterizado además porque la desprotección se lleva a cabo con $LiOH \bullet H_2O$ en $MeOH/H_2O/THF$.

72.- El método de conformidad con la reivindicación 71, caracterizado además porque la relación de $MeOH/H_2O/THF$ es de aproximadamente 2.5:1.0:0.5.

73.- El método de conformidad con la reivindicación 71, caracterizado además porque la desprotección se lleva a cabo a 0°C durante 1 hora.

74.- El método de conformidad con la reivindicación 60, caracterizado además porque comprende purificar el metabolito M6.

75.- El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado además porque el compuesto 6a se prepara eliminando el grupo protector de alilo del compuesto 5:



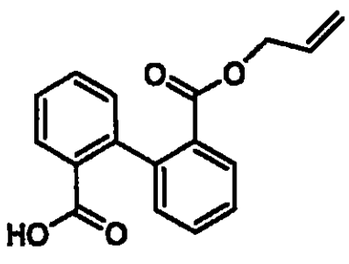
5

utilizando un catalizador y un nucleófilo.

76.- El método de conformidad con la reivindicación 75, caracterizado además porque el catalizador es $Pd(PPh_3)_4$.

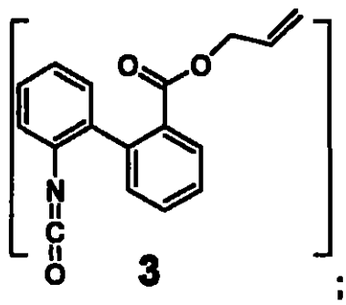
77.- El método de conformidad con la reivindicación 75, caracterizado además porque el nucleófilo es morfolina.

78.- El método de conformidad con la reivindicación 75, caracterizado además porque el compuesto 5 se prepara mediante: la reacción del ácido carboxílico 2:



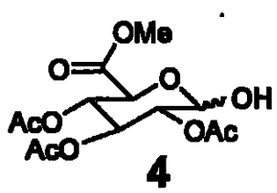
2

con DPPA bajo condiciones suficientes para proporcionar un intermediario de acil azida; calentar el intermediario de acil azida resultante bajo condiciones suficientes para proporcionar el isocianato 3:



3 ;

y tratar el resultado del paso de calentamiento con el éster 2,3,4,-triacetil-1-hidroxiglucurónico 4:



4

bajo condiciones suficientes para proporcionar el compuesto 5.

79.- El método de conformidad con la reivindicación 78, caracterizado además porque el paso de la reacción se lleva a cabo en la presencia de una base.

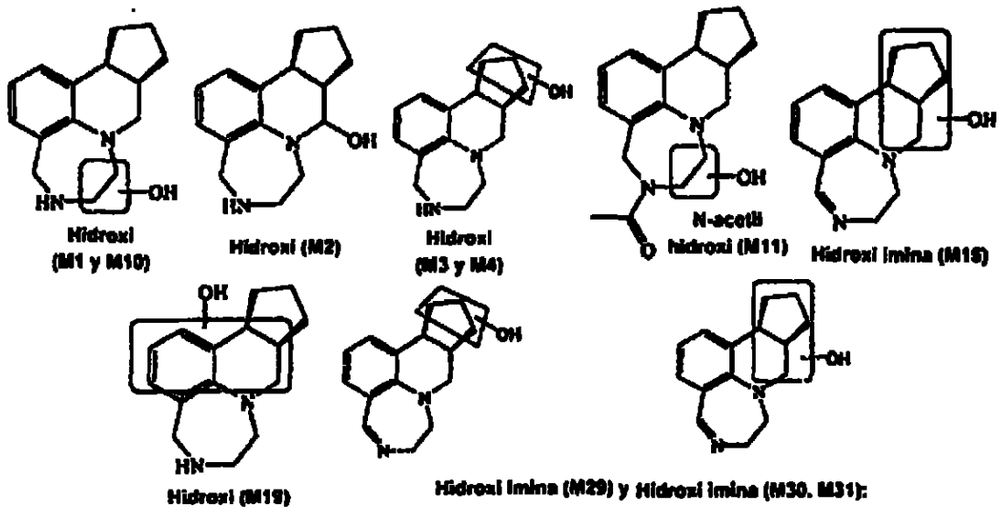
80.- El método de conformidad con la reivindicación 79, caracterizado además porque la base es Et_3N.

81.- El método de conformidad con la reivindicación 78, caracterizado además porque el compuesto 2 se prepara mediante la reacción de anhídrido difénico con un exceso de alcohol alílico en la presencia de un catalizador.

82.- El método de conformidad con la reivindicación 81, caracterizado además porque el alcohol alílico es prop-2-en-1-ol.

83.- El método de conformidad con la reivindicación 81, caracterizado además porque el catalizador es DMAP.

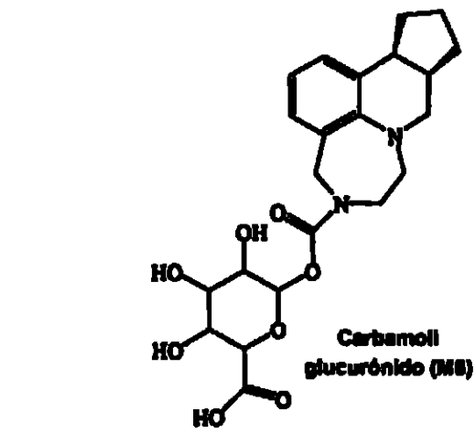
84.- Un compuesto seleccionado del grupo que consiste de:



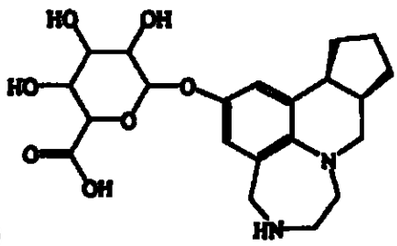
o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

85.- Una composición farmacéutica que comprende un compuesto o una sal de conformidad con la reivindicación 84.

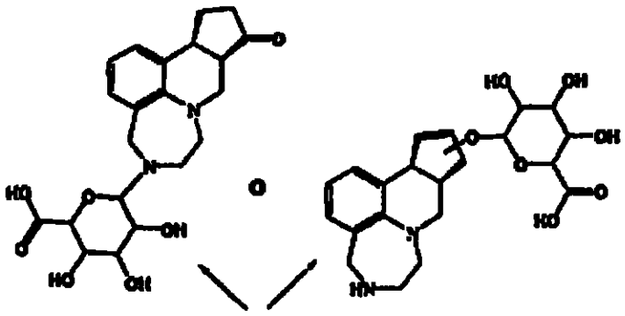
86.- Un compuesto seleccionado del grupo que consiste de:



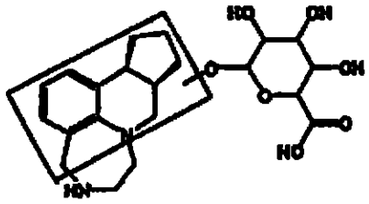
Carbamoil glucurónido (M8)



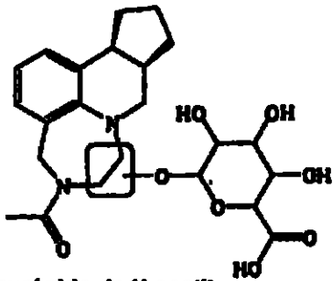
Glucurónido (M9)



M22 - Glucurónido de hidroxi deshidro, o ceto N-glucurónido

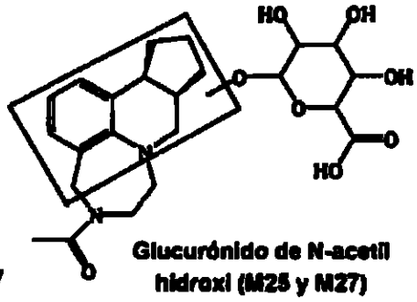


Glucurónido (M23 y M26)



Glucurónido de N-acetil hidroxi (M24)

y



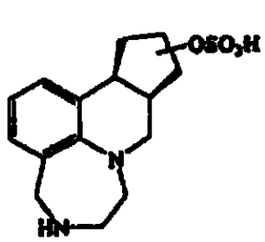
Glucurónido de N-acetil hidroxi (M25 y M27)

;

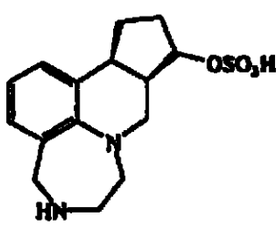
o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

87.- Una composición farmacéutica, que comprende un compuesto o una sal de conformidad con la reivindicación 86.

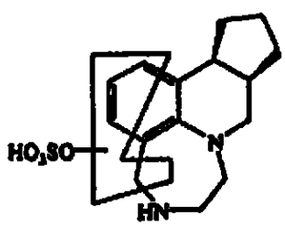
88.- Un compuesto seleccionado del grupo que consiste de:



Sulfato (M8)



Sulfato (M13) y

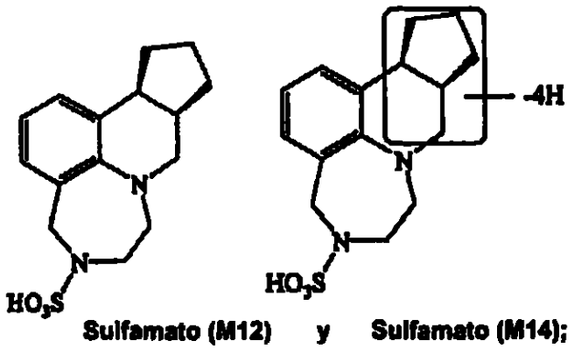


Sulfato (M16) ;

o una sal farmacéuticamente de los mismos.

89.- Una composición farmacéutica que comprende un compuesto o una sal de conformidad con la reivindicación 88.

90.- Un compuesto seleccionado del grupo que consiste de:

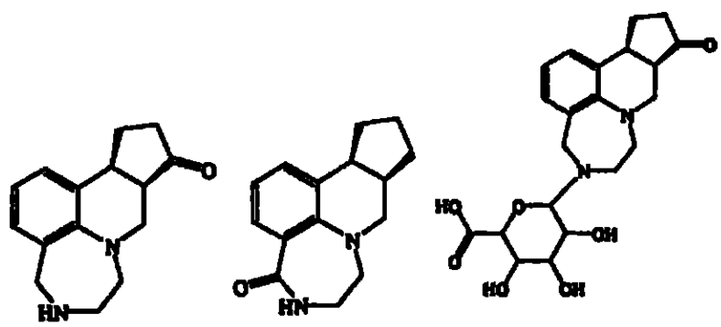


Sulfamato (M12) y Sulfamato (M14);

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

91.- Una composición farmacéutica que comprende un compuesto o una sal de conformidad con la reivindicación 90.

92.- Un compuesto seleccionado del grupo que consiste de:

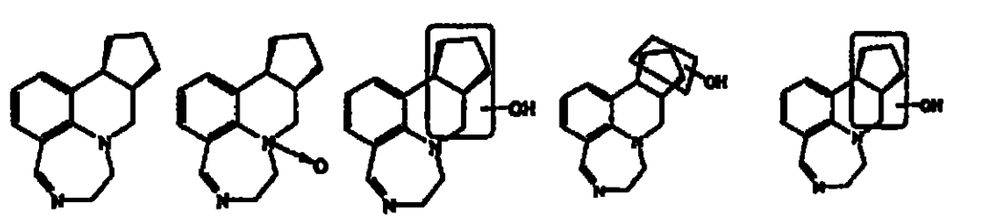


Ceto (M7) Ceto (M18) y ceto N-glucurónido (M22);

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

93.- Una composición farmacéutica que comprende un compuesto o una sal de conformidad con la reivindicación 92.

94.- Un compuesto seleccionado del grupo que consiste de:

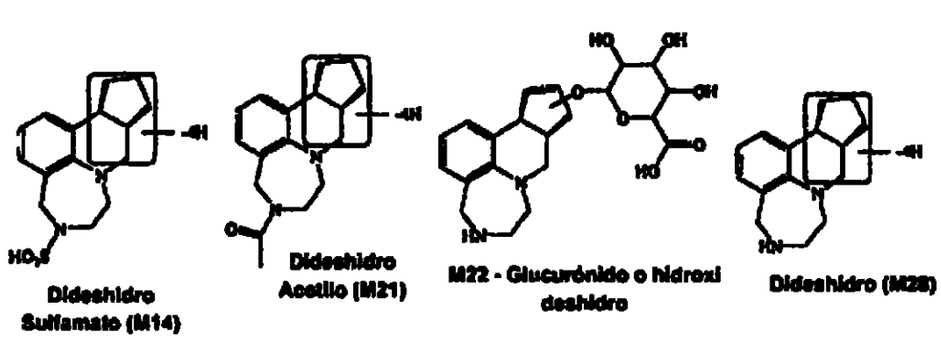


Imina (P3) N óxido (M8) Hidroxi Imina (M19) Hidroxi Imina (M29) y Hidroxi Imina (M30, M31);

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

95.- Una composición farmacéutica que comprende un compuesto o una sal de conformidad con la reivindicación 94.

96.- Un compuesto seleccionado del grupo que consiste de:



Dideshidro Sulfamato (M14) Dideshidro Acetilo (M21) M22 - Glucurónido o hidroxi deshidro Dideshidro (M28)

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

97.- Una composición farmacéutica que comprende un compuesto o una sal de conformidad con la reivindicación 96.

98.- Una composición que comprende un compuesto o una sal de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 55, y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

99.- Un método para tratar un paciente que sufre de esquizofrenia, trastorno esquizofreniforme, trastorno esquizoafectivo, trastorno delusional, trastorno sicótico inducido por sustancias, psicosis inducida por L-DOPA, psicosis asociada con la demencia de Alzheimer, psicosis asociada con la enfermedad de Parkinson, psicosis asociada con la enfermedad del cuerpo de Lewy, demencia, déficit de la memoria o trastorno de déficit intelectual asociado con la enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o un sal de conformidad con la reivindicación 1 o una composición que comprende tal compuesto o sal.

100.- El método de conformidad con la reivindicación 99, caracterizado además porque el paciente sufre de esquizofrenia.

101.- Un método para tratar un paciente que sufre de trastornos bipolares, trastornos depresivos, episodios del ánimo, trastornos de la ansiedad, trastornos del ajuste o trastornos de la alimentación, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de

un compuesto o un sal de conformidad con la reivindicación 1 o una composición que comprende tal compuesto o sal.

102.- El método de conformidad con la reivindicación 101, caracterizado además porque el trastorno bipolar es el trastorno bipolar I, trastorno bipolar II o el trastorno ciclotímico; el trastorno depresivo es el trastorno depresivo mayor, trastorno distímico o un trastorno del ánimo inducido por sustancias; el episodio del ánimo es el episodio depresivo mayor, episodio maniaco, episodio mezclado, o episodio hipomaniaco; el trastorno de la ansiedad es el ataque de pánico, agorafobia, trastorno del pánico, fobia específica, fobia social, trastorno obsesivo compulsivo, trastorno por tensión postraumática, trastorno por tensión aguda, trastorno de ansiedad generalizado, trastorno de ansiedad por separación o trastorno de ansiedad inducida por sustancias.

103.- El método de conformidad con la reivindicación 102, caracterizado además porque la condición es un trastorno depresivo, trastorno bipolar o episodio del ánimo.

104.- Un método para tratar un paciente que sufre de epilepsia, trastornos del sueño, migrañas, disfunción sexual, adicción a los fármacos, adicción al alcohol, trastornos gastrointestinales u obesidad, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o una sal de conformidad con la reivindicación 1 o una composición que comprende tal compuesto o sal.

105.- Un método para tratar un paciente que sufre de deficiencias del sistema nervioso central asociadas con trauma, apoplejía o lesiones de la médula espinal, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o una sal de conformidad con la reivindicación 1 o una composición que comprende tal compuesto o sal.

106.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque Z, cada R^n, y cada $R^{n'}$ es H; y X-Y es CR^9HNR^{10}.

107.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 106, caracterizado además porque R^9 es H.

108.- El compuesto o la sal de conformidad con la reivindicación 106, caracterizado además porque R^9 es H y R^{10} es -C(O)-OG.

109.- La composición que comprende un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 106 a 108, y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

RESUMEN DE LA INVENCION

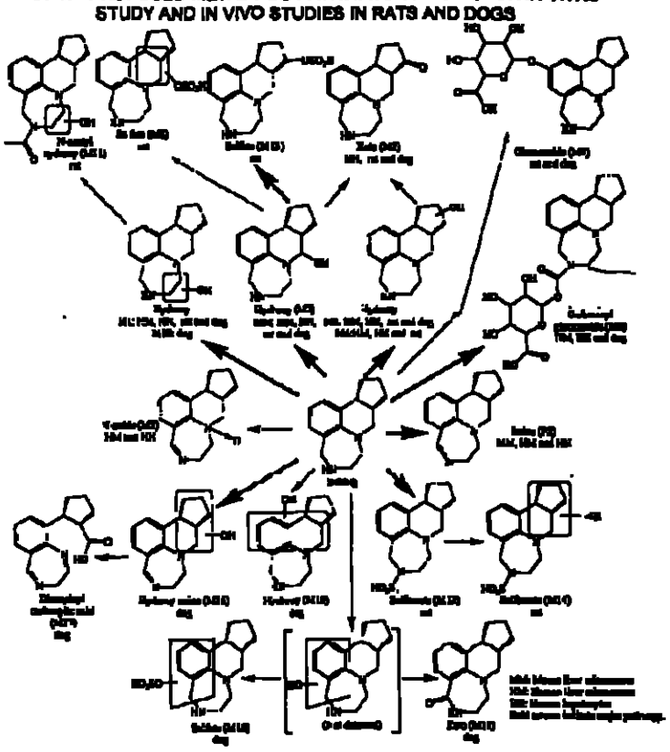
La invención se relaciona con los metabolitos de ciertos derivados de [1,4]diazepino[6,7,1-ij]quinolina y métodos de preparación y uso de los mismos; específicamente, la invención se relaciona con los compuestos de fórmula I, en donde los varios sustituyentes son como se define en la presente; la invención también proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen los compuestos de fórmula I, métodos para hacer tales compuestos y métodos de uso de tales compuestos.

DH

P07-677F

~~N9275~~

FIG. 1: PROPOSED METABOLIC PATHWAYS OF DCDQ FOR IN VITRO STUDY AND IN VIVO STUDIES IN RATS AND DOGS



formula I

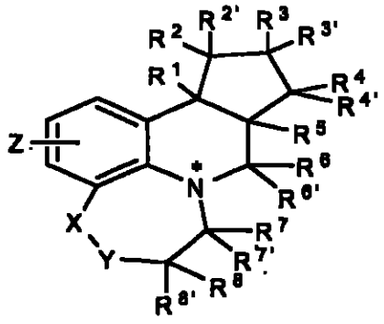


FIG. 2: PROPOSED METABOLIC PATHWAYS OF DCDQ IN RAT BILIARY EXCRETION STUDY

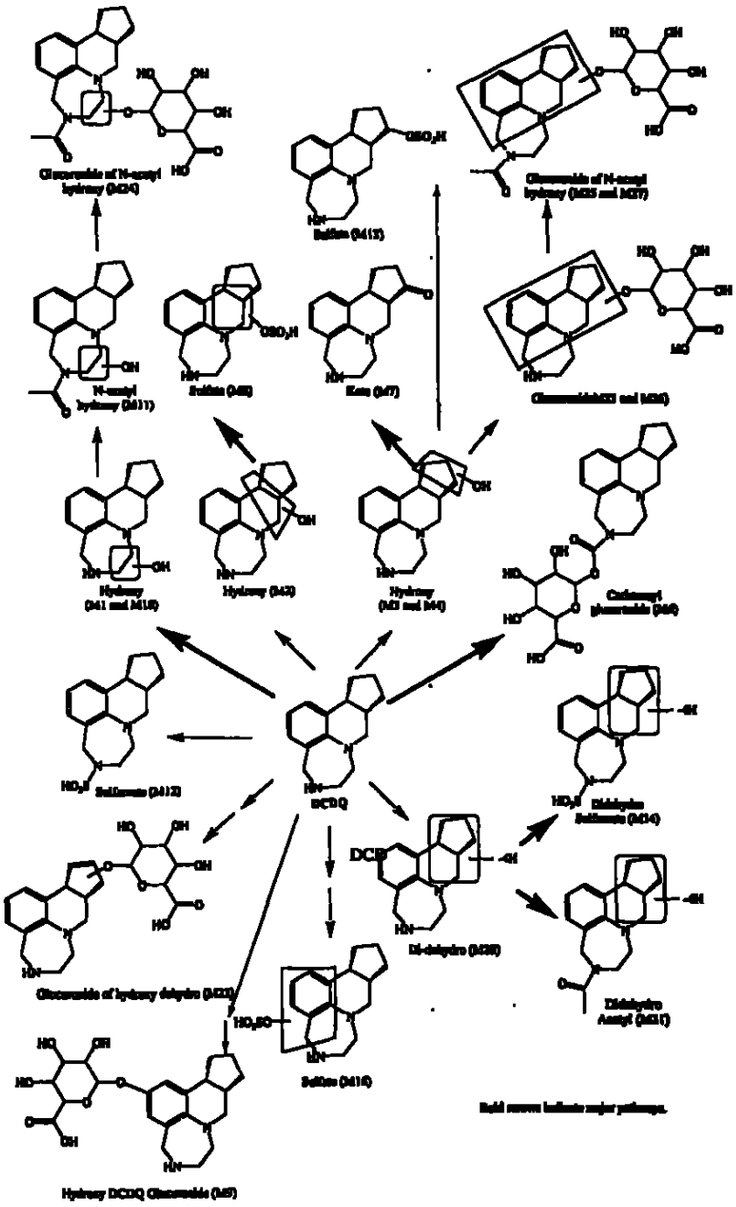
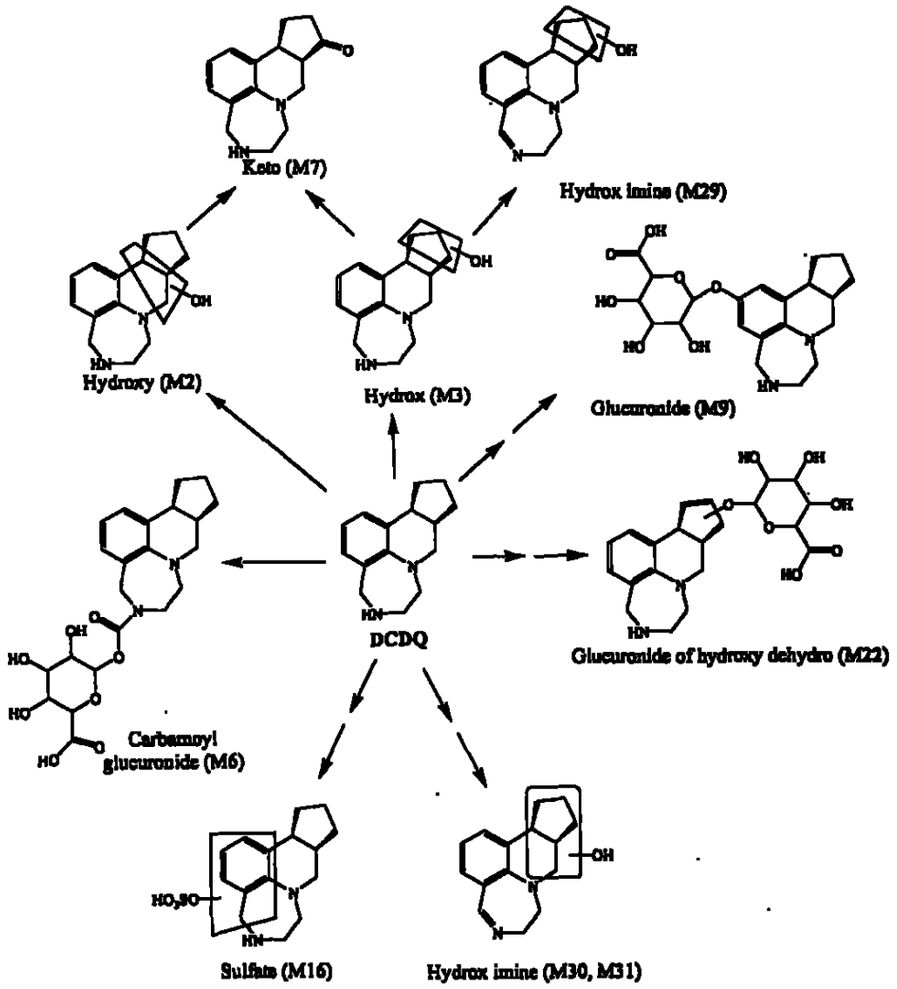


FIG. 3: PROPOSED METABOLIC PATHWAYS OF DCDQ IN MICE



5

FIG 4: METABOLITES DETECTED IN HUMAN PLASMA

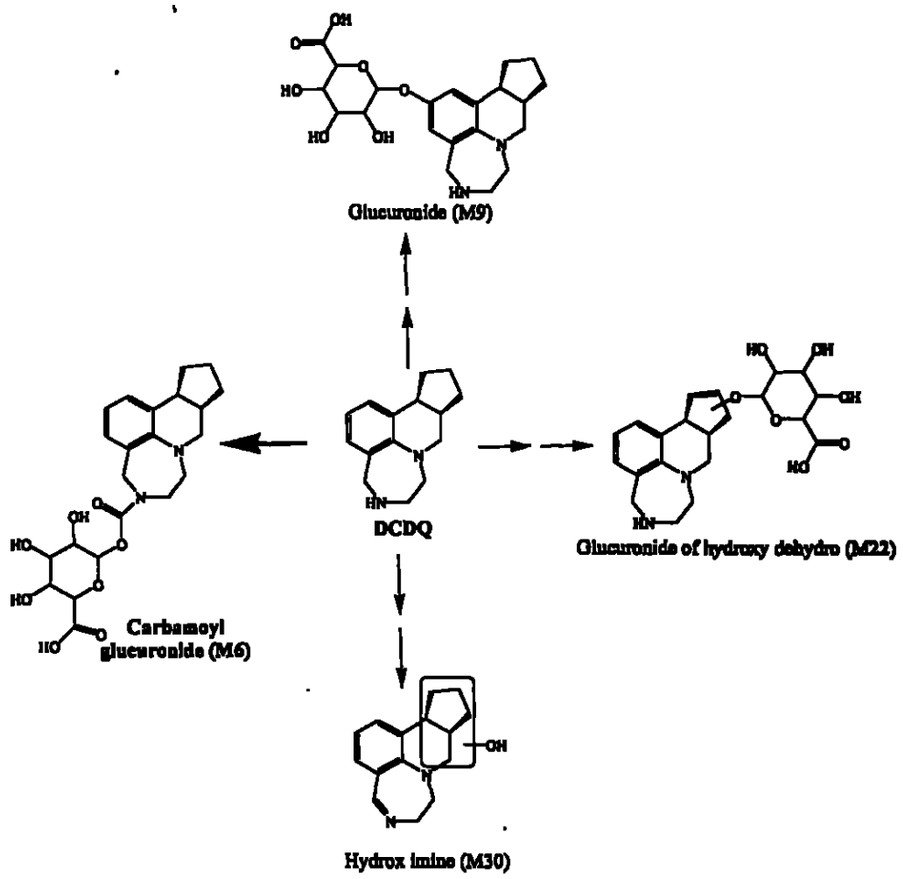
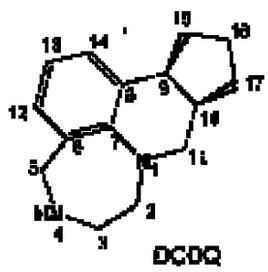
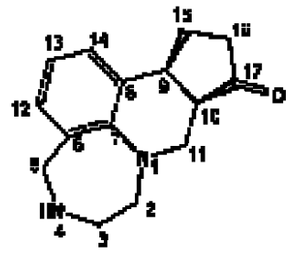


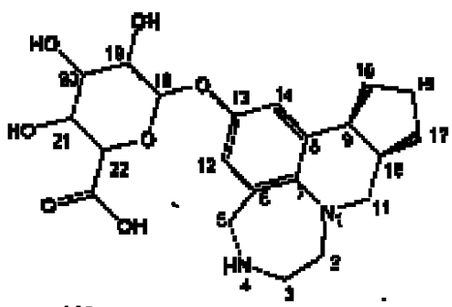
FIG. 5: Structures and NMR numbering schemes for DCDQ, M7, M9 and M13



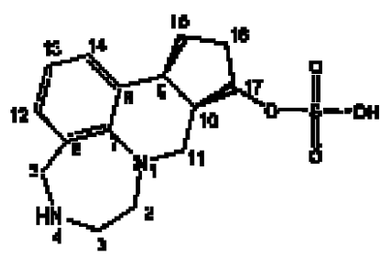
DCDQ



M7 (Keto DCDQ)



M9
(Hydroxy DCDQ glucuronide)



M13
(Hydroxy DCDQ sulfate)

FIGURA 1

PROPOSED METABOLIC PATHWAYS FOR DCDQ FOR IN VITRO STUDY AND IN VIVO ESTUDIES IN RATS AND DOGS – TRAYECTORIAS METABOLICAS PROPUESTAS PARA LA DCDQ PARA EL ESTUDIO IN VITRO Y LOS ESTUDIOS IN VIVO EN RATAS Y PERROS

N-ACETYL HIDROXI (M11) RAT- N-ACETIL HIDROXI (M11) RATA

SULFATE (M8) RAT – SULFATO (M8) RATA

SULFATE (M13) RAT – SULFATO (M13) RATA

KETO (M7) HH, RAT AND DOG – CETO (M7) HH, RATA Y PERRO

GLUCURONIDE (M7) RAT AND DOG – gLUCURÓNIDO (M7) RATA Y PERRO

HYDROXY M1: HM, HH, RAT AND DOG, M10, DOG – HIDROXI M1: HM, HH, RATA Y PERRO, M10, PERRO

HYDROXY (M2) MM, HM, MM, RAT AND DOG – HIDROXI (M2) MM, HM, MM, RATA Y PERRO

HYDROXY M3: HM, HH, RAT AND DOG, M4: HM, HH AND RAT – HIDROXI M3: HM, HH, RATA Y PERRO, M4: HM, HH Y RATA

CARBAMOYL GLUCURONIDE (M6) HM, HH AND DOG – CARBAMOIL GLUCURÓNIDO (M6) HM, HH Y PERRO

N-OXIDE (M5) HM AND HH – N-OXIDO (M5) HM Y HH

IMINE (P3) MM, HM AND HH – IMINA (P3) MM, HM Y HH

DIAZEPINYL CARBOXYLIC ACID (M17) DOG – ACIDO DIACEPINIL CARBOXILICO (M17) PERRO

HYDROXY IMINE (M15) DOG – HIDROXI IMINA (M15) PERRO

HYDROXY (M19) DOG – HIDROXI (M19) PERRO

SULFAMATE (M12) RAT – SULFAMATO (M12) RATA

SULFAMATE (M14) RAT – SULFAMATO (M14) RATA

SULFAMATE (M16) DOG – SULFAMATO (M16) PERRO

(NOT DETECTED) – NO DETECTADO

MM: MOUSE LIVER MICROSOMES – MM: MICROSOMAS DE HIGADO DE RATON

HM: HUMAN LIVER MICROSOMES – HM: MICROSOMAS DE HIGADO DE HUMANO

HH: HUMAN HEPATOCYTES – HEPATOCITOS HUMANOS

BOLD ARROWS INDICATE MAJOR PATHWAYS – LAS FLECHAS EN NEGRILLAS INDICAN LAS PRINCIPALES TRAYECTORIAS

FIGURA 2

PROPOSED METABOLIC PATHWAYS OF DCDQ IN RAT BILIARY EXCRETION STUDY – TRAYECTORIAS METABOLICAS PROPUESTAS DE LA DCDQ EN EL ESTUDIO DE EXCRECIÓN BILIAR EN RATAS

GLUCURONIDE OF N-ACETYL HIDROXI (M24) – GLUCURÓNIDO DE N-ACETYL HIDROXI (M24)

SULFATE (M13) – SULFATO (M13)

GLUCURONIDE OF N-ACETYL HIDROXI (M25 AND M27) – GLUCURÓNIDO DE N-ACETYL HIDROXI (M25 Y M27)

N-ACETYL hIDROXI (M11) – N-ACETIL HIDROXI (M11)

SULFATE (M8) – SULFATO (M8)

KETO (M7) – CETO (M7)

GLUCURONIDE (M23 AND M26) – GLUCURÓNIDO (M23 Y M26)

HYDROXY (M1 AND M10) – HIDROXI (M1 Y M10)

HYDROXY (M2) – HIDROXI (M2)

HYDROXY (M3 AND M4) – HIDROXI (M3 Y M4)

CARBAMOYL GLUCURONIDE (M6) – CARBAMOIL GLUCURÓNIDO (M6)

SULFAMATE (M12) – SULFAMATO (M12)

DIDEHYDRO SULFAMATE (M14) –SULFAMATO DIDESHIDRO (M14)

GLUCURONIDE OF HYDROXY DEHYDRO (M22) – GLUCURÓNIDO DE DESHIDRO HIDROXI (M22)

DY-DEHYDRO (M28) – DIDESHYDRO (M28)

DIDEHYDRO ACETYL (M21) – DIDESHIDRO ACETILO (M21)

HYDROXY DCDQ GLUCURONIDE (M9) – HIDROXI DCDQ GLUCURÓNIDO (M9)

SULFATE (M16) – SULFATO (M16)

BOLD ARROWS INDICATE MAJOR PATHWAYS – LAS FLECHAS EN NEGRILLAS INDICAN LAS TRAYECTORIAS PRINCIPALES

FIGURA 3

PROPOSED METABOLIC PATHWAYS OF DCDQ IN MICE – TRAYECTORIAS METABOLICAS PROPUESTAS DE LA DCDQ EN RATONES

KETO (M7) – CETO (M7)

HYDROXY IMINE (M29) – HIDROXI IMINA (M29)

HYDROXY (M2) – HIDROXI (M2)

HYDROXY (M3) – HIDROXI (M3)

GLUCURONIDE (M9) – GLUCURÓNIDO (M9)

CARBAMOYL GLUCURONIDE (M6) – CARBAMOIL GLUCURÓNIDO (M6)

GLUCURONIDE OF HYDROXY DEHYDRO (M22) – GLUCURÓNIDO DE HIDROXI DESHIDRO (M22)

SULFATE (M16) – SULFATO (M16)

HYDROXY IMINE (M30, M31) – HIDROXI IMINA (M30, M31)

FIGURA 4

METABOLITES DETECTED IN HUMAN PLASMA – METABOLITOS DETECTADOS EN EL PLASMA HUMANO

GLUCURONIDE (M9) – GLUCURÓNIDO (M9)

CARBAMOYL GLUCURONIDE (M6) – CARBAMOIL gLUCURÓNIDO (M6)

HYDROXY IMINE (M30) – HIDROXI IMINA (M30)

GLUCURONIDE OF HYDROXY DEHYDRO (M22) – GLUCURÓNIDO DE HIDROXI DESHIDRO (M22)

FIGURA 5

STRUCTURES AND NMR NUMBERING SCHEMES FOR DCDQ, M7, M9 AND M13 – ESTRUCTURAS Y ESQUEMAS DE NUMERACIÓN DE LA RMN PARA LA DCDQ, M7, M9 Y M13

M7 (KETO DCDQ) – M7 (CETO DCDQ)

M9 (HYDROXY DCDQ GLUCURONIDE) – M9 (HIDROXI DCDQ GLUCURÓNIDO)

M13 – (HYDROXY DCDQ SULFATE) – M13 (SULFATO DE HIDROXI DCDQ)

207

nn782

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference (if desired) (12 characters maximum) AM101867

Box No. I TITLE OF INVENTION

METABOLITES OF CERTAIN [1,4]DIAZEPINO[6,7,1-IJ]QUINOLINE DERIVATIVES AND METHODS OF PREPARATION AND USE THEREOF

Box No. II APPLICANT ☐ This person is also inventor

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country of residence) (no State of residence is indicated below.)

Wyeth
a Corporation of the State of Delaware
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940
United States of America

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality: US

State (that is, country) of residence: US

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence (no State of residence is indicated below.)

TONG, Zeen
3829 Vincent Drive
Collegeville, Pennsylvania 19426
United States of America

This person is:
☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality: US

State (that is, country) of residence: US

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: ☐ agent ☐ common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

Straher, Michael P.; Patané, Michael A.
Cozen O'Connor
1900 Market Street
Philadelphia, Pennsylvania 19103-3508
United States of America

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office
38,325; 42,982

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box No. III — FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

WANG, Jim
133 Margaret Lane
Malvern, Pennsylvania 19355
United States of America

This person is:
- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office:

State *(that is, country)* of nationality: CN

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of:
- ☐ all designated States
- ☐ all designated States except the United States of America
- ☒ the United States of America only
- ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

DEMAIO, William
4 Wynnwood Drive
Collegeville, Pennsylvania 19426
United States of America

This person is:
- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office:

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of:
- ☐ all designated States
- ☐ all designated States except the United States of America
- ☒ the United States of America only
- ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

BACH II, Alvin C.
213 Cinnaminson Street
Riverton, New Jersey 08077
United States of America

This person is:
- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office:

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of:
- ☐ all designated States
- ☐ all designated States except the United States of America
- ☒ the United States of America only
- ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

JORDAN, Ronald A.
51 Carol Lane
Richboro, Pennsylvania 18954
United States of America

This person is:
- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office:

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of:
- ☐ all designated States
- ☐ all designated States except the United States of America
- ☒ the United States of America only
- ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Continuation of Box No. III — OTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

WANG, Youchu
51 Elmo Desiauriers
Sainte-Anne-de-Bellevue, Quebec
H9X 4C5 Canada

This person is:
- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office:

State *(that is, country)* of nationality: CA

State *(that is, country)* of residence: CA

This person is applicant for the purposes of:
- ☐ all designated States
- ☐ all designated States except the United States of America
- ☒ the United States of America only
- ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

RAMAMOORTHY, P. Sivaramakrishnan
1605 Aspen Drive
Plainsboro, New Jersey 08536
United States of America

This person is:
- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office:

State *(that is, country)* of nationality: IN

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of:
- ☐ all designated States
- ☐ all designated States except the United States of America
- ☒ the United States of America only
- ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

STACK, Gary Paul
526 Brookfield Lane
Ambler, Pennsylvania 19002
United States of America

This person is:
- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office:

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of:
- ☐ all designated States
- ☐ all designated States except the United States of America
- ☒ the United States of America only
- ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

This person is:
- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office:

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant for the purposes of:
- ☐ all designated States
- ☐ all designated States except the United States of America
- ☐ the United States of America only
- ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Box No. V DESIGNATION

The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.

However,

☐ DE Germany is not designated for any kind of national protection

☐ KR Republic of Korea is not designated for any kind of national protection

☐ RU Russian Federation is not designated for any kind of national protection

(The check-boxes above may be used to exclude (irrevocably) the designations concerned in order to avoid the coming of the effect under the national law, of an earlier national application from which priority is claimed. See the Notes to Box No. V as to the consequences of such reduced fee procedure in these and certain other States.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country or Member of WTO	regional application*: regional Office	international application: receiving Office
Item (1) 05 November 2004 (05.11.2004)	60/625,335	US		
Item (2)				
Item (3)				

☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) *(only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office)* identified above as:

☐ all items ☒ Item (1) ☐ Item (2) ☐ Item (3) ☐ other, see Supplemental Box

** Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)):*

.....

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) *(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used)*:

ISA / EP.....

Request to use results of earlier search; reference to that search *(if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority)*:

Date (day/month/year) Number Country (or regional Office)

Box No. VIII DECLARATIONS

The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration)*:

Number of declarations

☐	Box No. VIII (i)	Declaration as to the identity of the inventor	:
☐	Box No. VIII (ii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	:
☐	Box No. VIII (iii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	:
☐	Box No. VIII (iv)	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	:
☐	Box No. VIII (v)	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	:

Sheet No. 5

Box No. IX CHECK LIST; BASIS OF FILING

This international application contains:

(a) on paper, the following number of sheets:

request (including declaration sheets)	:	6
description (excluding sequence listing and/or tables related thereto)	:	121
claims	:	12
abstract	:	1
drawings	:	5
Sub-total number of sheets	:	144
sequence listing	:	
tables related thereto	:	
(for both, actual number of sheets if filed on paper, whether or not also filed in electronic form; see (c) below)		
Total number of sheets	:	144

(b) ☐ only in electronic form (Section 801(a)(i))
- (i) ☐ sequence listing
- (ii) ☐ tables related thereto

(c) ☐ also in electronic form (Section 801(a)(ii))
- (i) ☐ sequence listing
- (ii) ☐ tables related thereto

Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the:

☐ sequence listing .....

☐ tables related thereto: .....

(additional copies to be indicated under items 9(c) and/or 10(c), in right column)

This international application is accompanied by the following item(s) *(insert the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item)*:

		Number of items
1. ☒ fee calculation sheet	:	1
2. ☐ original separate power of attorney	:	
3. ☐ original general power of attorney	:	
4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:	:	
5. ☐ statement explaining lack of signature	:	
6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):	:	
7. ☐ translation of international application into (language):	:	
8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material	:	
9. ☐ sequence listing in electronic form *(indicate type and number of carrier(s))*		
(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13*ter* only (and not as part of the international application)	:	
(ii) ☐ *(only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13*ter*	:	
(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column	:	
10. ☐ tables in electronic form related to sequence listing *(indicate type and number of carrier(s))*		
(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application)	:	
(ii) ☐ *(only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater)	:	
(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column	:	
11. ☒ other *(specify)*: Transmittal Letter and return card	:	2

Figure of the drawings which should accompany the abstract: 1

Language of filing of the international application: English

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

Michael A. Peluso 42,982

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

212

110367

This sheet is part of and does not count as a sheet of the international application.

PCT

FEE CALCULATION SHEET

Annex to the Request

For receiving Office use only	
International Application No.	
Date stamp of the receiving Office	

Applicant's or agent's file reference: AM101867

Applicant: Wyath, et al.

CALCULATION OF PRESCRIBED FEES

1. TRANSMITTAL FEE		300.00 T	
2. SEARCH FEE		1677.00 S	
International search to be carried out by: EP			
(If two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the name of the Authority which is chosen to carry out the international search.)			
3. INTERNATIONAL FILING FEE			
Where items (b) and/or (c) of Box No. IX apply, enter Sub-total number of sheets	144		
Where items (b) and (c) of Box No. IX do not apply, enter Total number of sheets			
i) First 30 sheets		1102.00 i	
ii) 110 (number of sheets in excess of 30) × 12 (fee per sheet)	=	1320.00 ii	
iii) additional component (only if a sequence listing and/or tables related thereto are filed in electronic form under Section 801(a)(i), or both in short form and on paper, under Section 801(a)(ii)): 400 × (fee per sheet)	=	iii	
Add amounts entered at i, ii and iii and enter total at 3		2422.00 3	
(Applicants from certain States are entitled to a reduction of 75% of the international filing fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the total to be entered at 3 is 25% of the international filing fee.)			
4. FEE FOR PRIORITY DOCUMENT *(if applicable)*		20.00 P	
5. TOTAL FEES PAYABLE		4819.00	
Add amounts entered at T, S, 3 and P, and enter total in the TOTAL box		TOTAL	

MODE OF PAYMENT *(for all modes of payment may be available at all receiving Offices)*

- ☒ authorization to charge deposit account (see below)
- ☐ postal money order
- ☐ cash
- ☐ coupons
- ☐ cheque
- ☐ bank draft
- ☐ revenue stamps
- ☐ other *(specify)*:

AUTHORIZATION TO CHARGE (OR CREDIT) DEPOSIT ACCOUNT
(This mode of payment may not be available at all receiving Offices)

Receiving Office: RO/ US

Deposit Account No.: 50-1275

Date: 04 November 2005

Name: Michael A. Patané

Signature: Michael A. Patané 47482

☒ Authorization to charge the total fees indicated above.

☒ *(This check-box may be marked only if the conditions for deposit accounts of the receiving Office so permit)* Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above.

☐ Authorization to charge the fee for priority document.

213

PCT/US2005/040269

PATENT COOPERATION TREATY

MPS/MAP

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

STRAHER, Michael, P.
Cozen O'Connor
1900 Market Street
Philadelphia, PA 19103-3508
United States of America

RECEIVED
COZEN IP DEPT
APR 07 2006
DUE DATE n/a
MAX DATE
DOCKETED BY

Date of mailing (day/month/year)	
28 March 2006 (28.03.2006) (175322)	
Applicant's or agent's file reference: AM101867 WythQ113-500	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No.: PCT/US2005/040269	International filing date (day/month/year): 04 November 2005 (04.11.2005)
International publication date (day/month/year): Not yet published	Priority date (day/month/year): 05 November 2004 (05.11.2004)
Applicant: WYETH et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

3. (If applicable) An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as priority document, Rule 17.1(d) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
05 Nove 2004 (05.11.2004)	60/625,385	US	30 Janu 2006 (30.01.2006)

CORRECTED VERSION

To: Copy sent to Client

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Claudio BORTON (Fax 338-8995)
Facsimile No. (41-22) 338.89.95	Telephone No. (41-22) 338 8481

Form PCT/IB/304 (January 2004) 008926867

Rectivo 389 a 391
" Tajetas y Extracto

215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 07-044403- -00000-0000
Fecha 2007-05-04 16:03:04 Dep 2020 NUECREACIONI
Tra 11 PATENTE(YII Eve 378 FASENACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios 391

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION [X] MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [X]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [X]
- Descripción de la invención [X]
- Dibujos de ser estos pertinentes [X]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [X]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Firma Responsable

Fecha 04 MAYO 2007

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

216

REPUBLICA DE COLOMBIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 393

2020
Bogotá D.C.,

Doctor(a)
CORREA ORDOÑEZ ALVARO
Apoderado(a) y/o Representante de
WYETH

REFERENCIA	Radicación No	07 44403
	Solicitud internacional	PCT/US2005/040289
	Fecha inicio fase nacional	05/06/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	3336
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial

Cúmplase
Dado en Bogotá DC, 16 JUL 2007

CLARA C. DE JAIMES
Jefe de la división de Nuevas Creaciones (E)

adpa11