

COMPUESTOS MODULADORES DE RECEPTORES DE DOPAMINA D3/D2

REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

5 La solicitud inmediata reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de los EE. UU. núm. 63/479.530, presentada el 11 de enero de 2023, cuyo contenido se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

CAMPO

10 La presente descripción se refiere a compuestos que modulan la actividad de los receptores de dopamina D2 y D3, métodos para elaborar tales compuestos, composiciones que contienen los compuestos y métodos de
15 tratamiento que usan los compuestos.

ANTECEDENTES

20 La disfunción del sistema de neurotransmisores dopaminérgicos puede observarse en la patología de trastornos neuropsiquiátricos que incluyen la esquizofrenia y disfunciones emocionales o cognitivas (Sokoloff, P. et al.: Nature, 1990, 347. 146; Schwartz, J.-C. et al.: Clin. Neuropharmacology., 1993, 16, 295). El efecto de la
25 dopamina es mediado por al menos cinco receptores de

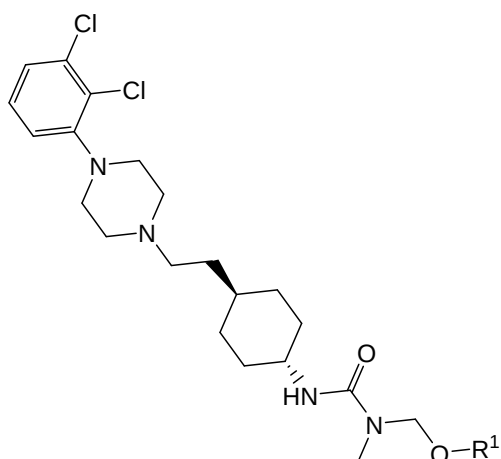
dopamina distintos que pertenecen a las familias de receptores de dopamina D1 (es decir, D1 y D5), o D2 (es decir, D2, D3, y D4). Los receptores D3 tienen una distribución característica en los sistemas dopaminérgicos centrales. Los receptores de dopamina D2 se distribuyen ampliamente en el cerebro y están implicados en numerosas funciones fisiológicas y estados patológicos. Se usan antagonistas de dopamina D2, por ejemplo, como agentes antipsicóticos. Sin embargo, el antagonismo masivo de los receptores D2 conduce a efectos secundarios no deseados, tales como síntomas motores extrapiramidales, sedación psicomotora, o desglose cognitivo. Los agentes antipsicóticos que se dirigen preferentemente a los receptores D3 proporcionan una intervención terapéutica exitosa en el tratamiento de la esquizofrenia.

Sigue existiendo una necesidad en la técnica de compuestos mejorados con selectividad de receptores D3/D2.

SUMARIO

20

En algunas modalidades, la descripción proporciona compuestos de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de estos,



(I)

en donde

5 R¹ es alquilo C₁-C₃.

En algunas modalidades, la descripción proporciona compuestos de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, en donde R¹ es CH₃.

En algunas modalidades, la descripción
10 proporciona compuestos de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, en donde R¹ es CH₂CH₃.

En algunas modalidades, la descripción proporciona compuestos de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, en donde R¹ es CH₂CH₂CH₃.

15 En algunas modalidades, la descripción proporciona compuestos de la Fórmula (I), en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

N' - [(1*r*,4*r*) - 4 - {2 - [4 - (2,3-diclorofenil)piperazin-1-il]etil}ciclohexil] - *N* - (etoximetil) - *N* - metilurea;

$N' - [(1r, 4r) - 4 - \{2 - [4 - (2, 3 -$
diclorofenil)piperazin-1-il]etil}ciclohexil]- $N -$
(etoximetil)- N -metilurea; y
 $N' - [(1r, 4r) - 4 - \{2 - [4 - (2, 3 -$
5 diclorofenil)piperazin-1-il]etil}ciclohexil]- $N -$
metil- N -(propoximetil)urea; o una sal
farmacéuticamente aceptable de estos.

En algunas modalidades, la descripción proporciona
un compuesto de la Fórmula (I), en donde el compuesto es $N' -$
10 $[(1r, 4r) - 4 - \{2 - [4 - (2, 3 - \text{diclorofenil})\text{piperazin-1-}$
il]etil}ciclohexil]- $N -$ (etoximetil)- N -metilurea; o una sal
farmacéuticamente aceptable de este.

En algunas modalidades, la descripción proporciona
un compuesto de la Fórmula (I), en donde el compuesto es $N' -$
15 $[(1r, 4r) - 4 - \{2 - [4 - (2, 3 - \text{diclorofenil})\text{piperazin-1-}$
il]etil}ciclohexil]- $N -$ (etoximetil)- N -metilurea.

En algunas modalidades, la descripción
proporciona un compuesto de la Fórmula (I), en donde el
compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable $N' -$
20 $[(1r, 4r) - 4 - \{2 - [4 - (2, 3 - \text{diclorofenil})\text{piperazin-1-}$
il]etil}ciclohexil]- $N -$ (etoximetil)- N -metilurea.

En algunas modalidades, la descripción
proporciona una composición farmacéutica que comprende una
cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la
25 Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este,
en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un método para tratar la esquizofrenia, el método comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la
5 Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En algunas modalidades, la descripción proporciona compuestos de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para usar como medicamento.

En algunas modalidades, la descripción
10 proporciona un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para usar en el tratamiento de la esquizofrenia.

En algunas modalidades la descripción proporciona el uso de un compuesto de la Fórmula (I), o una sal
15 farmacéuticamente aceptable de este, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la esquizofrenia.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente descripción describe compuestos que modulan la actividad de los receptores de dopamina D3 y
5 dopamina D2.

Los compuestos descritos en la presente pueden contener una o más variable(s) que ocurren más de una vez en cualquier sustituyente o en las fórmulas en la presente. La definición de una variable en cada una de las
10 apariciones es independiente de sus definiciones en otra aparición. Además, las combinaciones de sustituyentes son permisibles solo si tales combinaciones resultan en compuestos estables. Los compuestos estables son compuestos que pueden aislarse de una mezcla de reacción.

15

Definiciones

Ciertos términos como se usan en la especificación se pretende que se refieran a las siguientes definiciones, como se detalla a continuación.

20

Se observa que, como se usa en esta especificación y las reivindicaciones previstas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente de cualquier otra manera. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “un compuesto”
25 incluye un único compuesto, así como uno o más de los mismos compuestos o compuestos diferentes. La referencia a “un

portador farmacéuticamente aceptable” significa un único portador farmacéuticamente aceptable, así como uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, y lo similar.

Como se usa en la especificación y las
5 reivindicaciones adjuntas, a menos que se especifique lo contrario, los siguientes términos significan lo que se indica:

El término “alquilo C_1-C_3 ”, como se usa en la presente, se refiere a un radical de cadena de hidrocarburo
10 saturado, lineal o ramificado que tiene uno, dos, o tres carbonos, a menos que se especifique de cualquier otra manera. Ejemplos representativos de alquilo C_1-C_3 incluye metilo, etilo y *n* -propilo.

En algunos casos, el número de átomos de carbono
15 en una entidad se indica mediante el prefijo “ C_x-C_y ”, en donde *x* es el mínimo y *y* es el número máximo de átomos de carbono en el sustituyente. Por lo tanto, por ejemplo, “alquilo C_1-C_6 ” significa un sustituyente alquilo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono y “alquilo C_1-C_3 ” significa un sustituyente
20 alquilo que contiene de 1 a 3 átomos de carbono.

La frase “composición farmacéutica” se refiere a una composición adecuada para la administración en uso médico.

La frase “sal farmacéuticamente aceptable” se
25 refiere a aquellas sales que, dentro del alcance del buen

juicio médico, son adecuadas para usar en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin toxicidad, irritación y respuesta alérgica indebidas, y lo similar, y son proporcionales a una relación razonable
5 entre beneficio/riesgo.

El término “estable” se refiere a compuestos que poseen una estabilidad suficiente para permitir su fabricación y que mantienen la integridad del compuesto durante un período de tiempo suficiente para que sea útil
10 para los propósitos detallados en la presente.

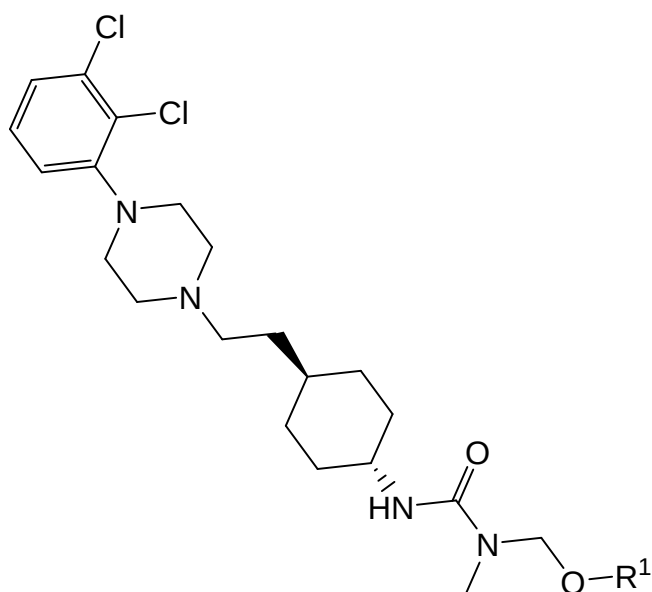
La frase “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a una cantidad de un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, suficiente para prevenir el desarrollo o para aliviar en cierta medida uno
15 o más de los síntomas de la afección o trastorno que se trata cuando se administra para el tratamiento en un sujeto particular o una población de sujetos.

Los términos “tratar”, “que trata” y “tratamiento”, como se usan en la presente, se refieren a un método para
20 aliviar o anular una enfermedad y/o sus síntomas asociados.

Compuestos

Los compuestos de la presente descripción tienen la Fórmula general (I) como se describe en la presente.

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona compuestos de la Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de estos,



(I)

en donde

R¹ es alquilo C₁-C₃.

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona compuestos de la Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, en donde R¹ es alquilo C₁.

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona compuestos de la Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, en donde R¹ es alquilo C₂.

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona compuestos de la Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, en donde R^1 es alquilo C_3 .

5 En algunas modalidades, la presente descripción proporciona compuestos de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, en donde R^1 se selecciona del grupo que consiste en CH_3 , CH_2CH_3 y $CH_2CH_2CH_3$.

En algunas modalidades, la presente descripción
10 proporciona compuestos de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, en donde R^1 es CH_3 .

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona compuestos de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, en donde R^1 es CH_2CH_3 .

15 En algunas modalidades, la presente descripción proporciona compuestos de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, en donde R^1 es $CH_2CH_2CH_3$.

En algunas modalidades, la presente descripción
20 proporciona un compuesto de la Fórmula (I), en donde el compuesto es $N'-[(1r,4r)-4-\{2-[4-(2,3-$
 $\text{diclorofenil})\text{piperazin-1-il}]\text{etil}\}\text{ciclohexil}]-N-$
 $(\text{etoximetil})-N\text{-metilurea}$; o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

25 En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un compuesto de la Fórmula (I), en donde el

compuesto es $N'-[(1r,4r)-4-\{2-[4-(2,3-$
diclorofenil)piperazin-1-il]etil}ciclohexil]-N-
(etoximetil)-N-metilurea.

En algunas modalidades, la presente descripción
5 proporciona un compuesto de la Fórmula (I), en donde el
compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable de $N'-$
 $[(1r,4r)-4-\{2-[4-(2,3-$ diclorofenil)piperazin-1-
il]etil}ciclohexil]-N-(etoximetil)-N -metilurea.

En algunas modalidades, la presente descripción
10 proporciona un compuesto de la Fórmula (I), en donde el
compuesto es $N'-[(1r,4r)-4-\{2-[4-(2,3-$
diclorofenil)piperazin-1-il]etil}ciclohexil]-N-
(metoximetil)-N-metilurea; o una sal farmacéuticamente
aceptable de este.

15 En algunas modalidades, la presente descripción
proporciona un compuesto de la Fórmula (I), en donde el
compuesto es $N'-[(1r,4r)-4-\{2-[4-(2,3-$
diclorofenil)piperazin-1-il]etil}ciclohexil]-N-
(metoximetil)-N-(metoximetil)-N-metilurea.

20 En algunas modalidades, la presente descripción
proporciona un compuesto de la Fórmula (I), en donde el
compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable de $N'-$
 $[(1r,4r)-4-\{2-[4-(2,3-$ diclorofenil)piperazin-1-
il]etil}ciclohexil]-N-(metoximetil)-N-(metoximetil)-N-
25 metilurea.

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un compuesto de la Fórmula (I), en donde el compuesto es $N'-[(1r,4r)-4-\{2-[4-(2,3-$
diclorofenil)piperazin-1-il]etil}ciclohexil]-*N*-metil-*N*-
5 (propoximetil)urea; o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

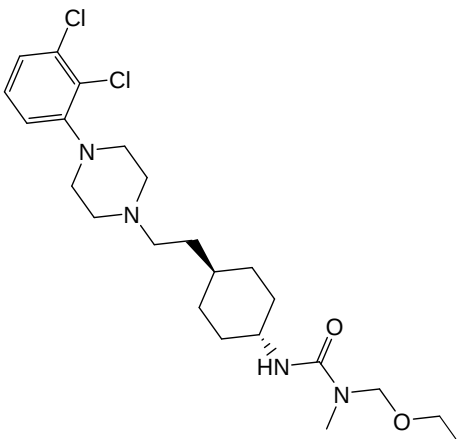
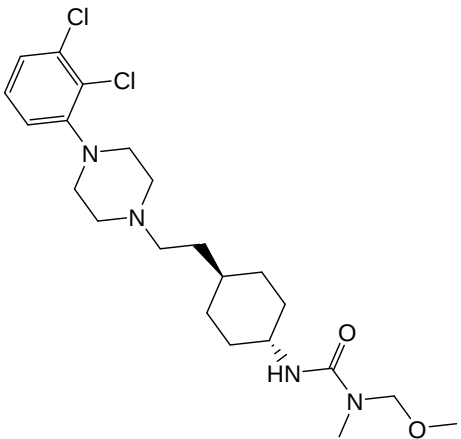
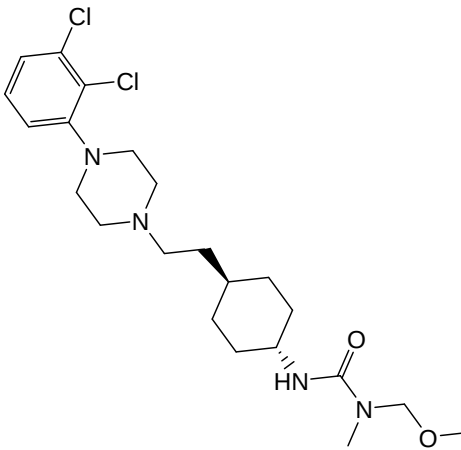
En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un compuesto de la Fórmula (I), en donde el compuesto es $N'-[(1r,4r)-4-\{2-[4-(2,3-$
10 diclorofenil)piperazin-1-il]etil}ciclohexil]-*N*-metil-*N*-(propoximetil)urea.

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un compuesto de la Fórmula (I), en donde el compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable de $N'-$
15 $[(1r,4r)-4-\{2-[4-(2,3-$ diclorofenil) piperazin-1-il]etil}ciclohexil]-*N*-metil-*N*-(propoximetil)urea.

Los compuestos de la presente descripción y los intermediarios se denominaron mediante el uso del programa de software ACD/Name 2021.1.3 (versión de archivo N15E41,
20 compilación 123232, 07 de julio de 2021) y/o mediante el uso del algoritmo de denominación Struct=Name como parte de CHEMDRAW® Professional v. 20.1.1.125.

Los ejemplos de compuestos de la Fórmula (I) incluyen, pero no se limitan a, los compuestos que se
25 muestran en la Tabla 1 más adelante, y sales farmacéuticamente aceptables de estos.

Tabla 1

Ejemplo 1	
Ejemplo 2	
Ejemplo 3	

5 Los compuestos de la Fórmula (I) pueden usarse en la forma de sales farmacéuticamente aceptables. Los

compuestos de la Fórmula (I) pueden contener una funcionalidad básica o ácida, o ambas, y pueden convertirse en una sal farmacéuticamente aceptable, cuando se desee, mediante el uso de un ácido o base adecuado.

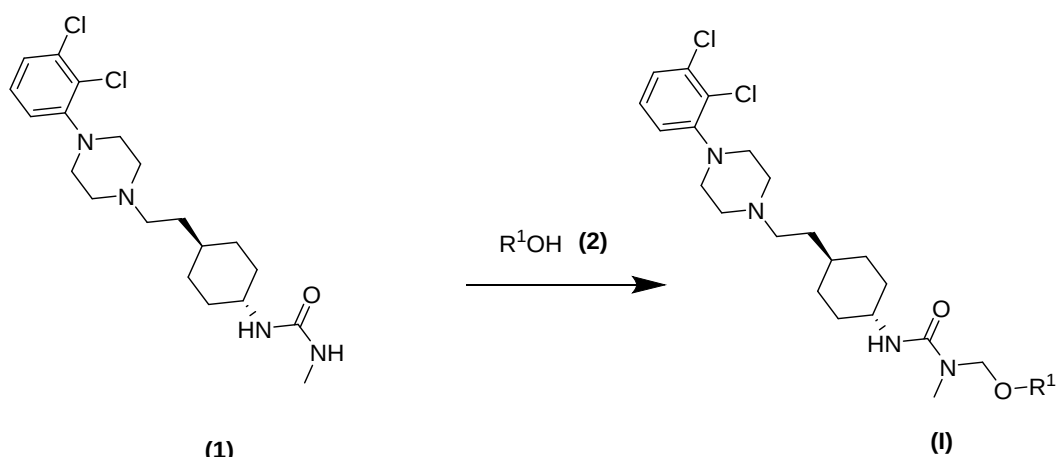
5

Métodos para elaborar compuestos ilustrativos

Los compuestos de la presente descripción pueden entenderse mejor en relación con los siguientes esquemas y métodos sintéticos que ilustran un medio por el cual
10 pueden prepararse los compuestos. Los compuestos de la presente descripción pueden prepararse mediante una variedad de procedimientos sintéticos. Los procedimientos sintéticos representativos se muestran en, pero no se limitan a, los **Esquemas 1-2**. La variable R^1 se define como
15 se detalla en la presente, p. ej., en el Sumario.

Esquemas

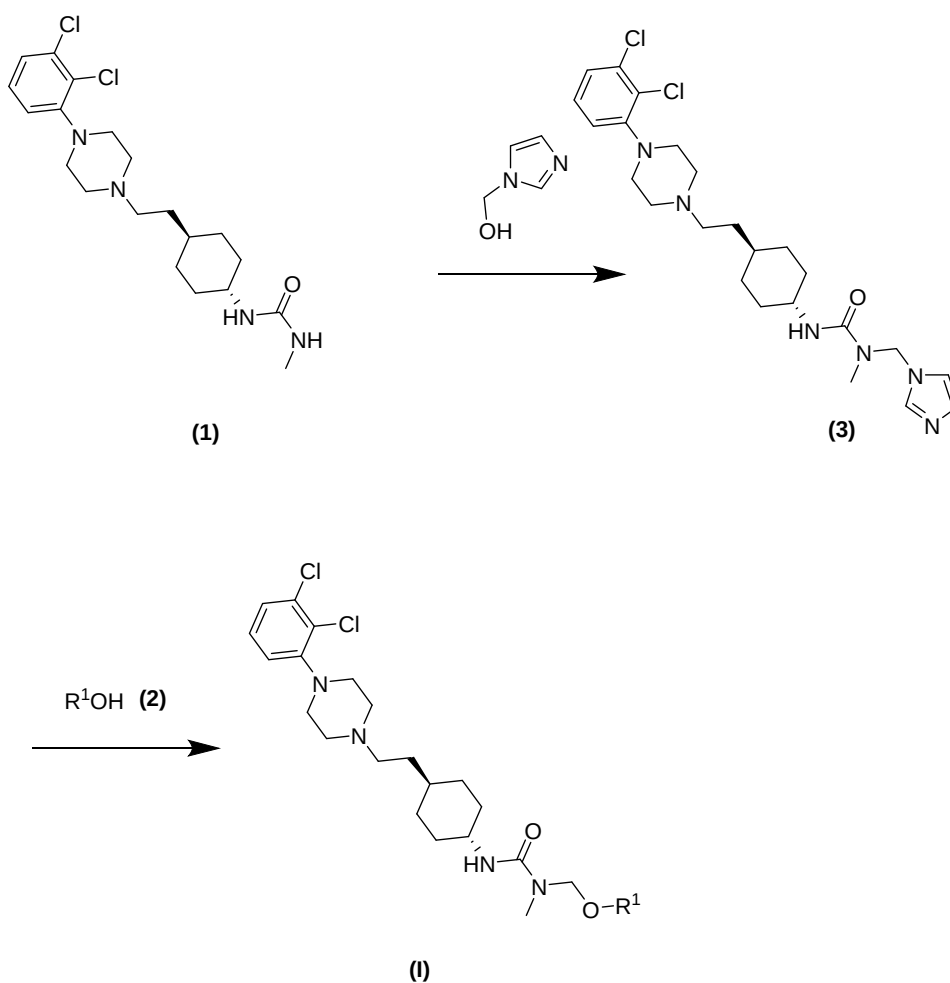
Esquema 1



20

Como se muestra en el **Esquema 1**, los compuestos de la Fórmula (I), en donde R^1 es como se define en la presente, pueden prepararse a partir del compuesto de la Fórmula (1) que puede prepararse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, tales como, p. ej., WO 2010/070370 A1. En consecuencia, el compuesto de la Fórmula (1) puede tratarse con paraformaldehído o formaldehído disponible comercialmente (solución acuosa saturada con estabilizador de metanol) y con el alcohol apropiado de la Fórmula (2), en donde R^1 es como se describe en la presente y que son disponibles comercialmente o pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, a temperatura ambiente a reflujo. La reacción se realiza típicamente durante 1 a 168 horas en un solvente adecuado tal como, pero sin limitarse a, el alcohol (2) o tetrahidrofurano para proporcionar compuestos de la Fórmula (I).

Esquema 2



Como se muestra en el **Esquema 2**, los compuestos
5 de la Fórmula (I) pueden prepararse a partir del compuesto
de la Fórmula (1). En consecuencia, el compuesto de la
Fórmula (1) puede tratarse con 1-hidroximetil imidazol
disponible comercialmente a temperatura ambiente a reflujo
durante 1 a 24 horas en un solvente adecuado, tal como una
10 mezcla de ácido acético y tetrahidrofurano para proporcionar
el compuesto de la Fórmula (3). El compuesto de la Fórmula
(3) puede tratarse con el alcohol apropiado de la Fórmula
(2), en donde R¹ es como se describe en la presente, en

presencia de una base adecuada tal como hidróxido de potasio o un ácido adecuado tal como ácido sulfúrico o ácido metansulfónico para proporcionar compuestos de la Fórmula (I). La reacción se realiza típicamente a temperatura ambiente a reflujo durante 1 a 24 horas en un solvente adecuado tal como tetrahidrofurano o tolueno.

Se proporcionan procedimientos específicos en la sección de Ejemplos sintéticos. A menos que se describa de cualquier otra manera, los materiales y reactivos de inicio son disponibles comercialmente o un experto en la técnica los puede preparar a partir de materiales disponibles comercialmente usando métodos descritos en la literatura química.

15 Composiciones farmacéuticas

Cuando se emplea como producto farmacéutico, un compuesto de la presente descripción puede administrarse en forma de composición farmacéutica. Tal composición puede comprender una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

En algunas modalidades, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la Fórmula

(I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

Método de uso

5 Los compuestos de la Fórmula (I) o sales farmacéuticamente aceptables de estos, y las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este, pueden administrarse a un sujeto que padece esquizofrenia. El
10 término “administrar” se refiere al método de poner a un sujeto en contacto con un compuesto.

 En algunas modalidades, la presente descripción proporciona los compuestos de la Fórmula (I), o sales farmacéuticamente aceptables de estos, y composiciones
15 farmacéuticas que comprenden un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para usar como medicamento.

 En algunas modalidades, la presente descripción proporciona los compuestos de la Fórmula (I), o sales
20 farmacéuticamente aceptables de estos, y composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para usar en el tratamiento de la esquizofrenia.

 En algunas modalidades, la presente descripción
25 proporciona el uso de los compuestos de la Fórmula (I), o sales farmacéuticamente aceptables de estos, y

composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la esquizofrenia.

5

Ejemplos

Los siguientes ejemplos pueden usarse para propósitos ilustrativos y no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención.

10

Todos los reactivos eran de calidad comercial y se usaron tal como se recibieron sin purificación adicional, a menos que se indique de cualquier otra manera. Se usaron solventes anhidros disponibles comercialmente para las reacciones realizadas en atmósfera inerte. Se usaron solventes de grado reactivo en todos los demás casos, a menos que se especifique de cualquier otra manera. Los desplazamientos químicos (δ) para los espectros de ^1H NMR se informaron en partes por millón (ppm) con respecto a tetrametilsilano (δ 0,00) o el pico de solvente residual adecuado, es decir, CHCl_3 (δ 7,27), como referencia interna.

15

20

Las siguientes abreviaturas tienen el significado indicado a menos que se especifique de cualquier otra manera:

NMR	Resonancia magnética nuclear
s	Singulete
br s	Singulete amplio
d	Duplete o doblete

m	Multiplete
t	Triplete
q	Cuarteto
sxt	Sexteto
LC/MS o LCMS	Cromatografía líquida-Espectrometría de masas
min	Minuto
ml	Mililitro
μl	Microlitro
L	Litro
g	Gramo
mg	Miligramo
mmol	Milimoles
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
ppm	Partes por millón
ESI	Ionización por electorrociado
M	Molaridad (moles/litro)

Ejemplos sintéticos

Ejemplo 1

5

N' -[(1*r*,4*r*)-4-{2-[4-(2,3-diclorofenil)piperazin-1-il]etil}ciclohexil]-*N*-(etoximetil)-*N*-metilurea

Una mezcla de 5,0 g (12,5 mmol) de *N* -[(1*r*,4*r*)-4-{2-[4-(2,3-diclorofenil)piperazin-1-il]etil}ciclohexil]-
10 *N'*-metilurea, 250 ml de etanol, 2,5 ml de ácido acético y 3,75 g (125 mmol) de paraformaldehído se agitaron durante 40 horas a 70 °C. La mezcla de reacción se concentró *in vacuo*. El residuo se sometió a cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con acetona. El material crudo se mezcló
15 con dietiléter y se filtró para proporcionar el compuesto del título. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 0,88-1,02 (m,

2H), 1,08 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H), 1,14-1,28 (m, 3H), 1,31-1,40 (m, 2H), 1,69-1,81 (m, 4H), 2,31-2,39 (m, 2H), 2,42-2,61 (br m, 4H), 2,79 (s, 3H), 2,90-3,04 (br m, 4H), 3,35 (q, $J = 7,0$ Hz, 2H), 3,31-3,44 (m, 1H), 4,63 (s, 2H), 6,03
5 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,10-7,18 (m, 1H), 7,25-7,34 (m, 2H);
LC-MS (ESI) m/z 471,3 (M+H)⁺.

Ejemplo 2

10 *N'* -[(1*r*,4*r*)-4-{2-[4-(2,3-diclorofenil)piperazin-1-il]etil}ciclohexil]-*N*-(metoximetil)-*N*-metilurea

Una mezcla de 1 g (2,4 mmol) de *N* -[(1*r*,4*r*)-4-{2-[4-(2,3-diclorofenil)piperazin-1-il]etil}ciclohexil]-*N'*-metilurea, 20 ml de metanol, 0,5 ml de ácido acético y 2 ml
15 (26,8 mmol) de solución de formaldehído al 37 % (acuosa con metanol al ~10 %) se agitaron durante 20 horas a 85 °C. La mezcla de reacción se concentró *in vacuo*. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa en Phenomenex Kinetex®
5 µm C18 100 Å AXIA LC Empaque de columna LC (150 mm x
20 21,2 mm); isocrático de 20 mmol/l NH₄HCO₃ en agua + 0,1 % de dietilamina (A) durante 3 minutos; 40-50 % de gradiente de 20 mmol/l NH₄HCO₃ en agua + 0,1 % de dietilamina (A) y metanol (B) durante 16 minutos, a una velocidad de flujo de 21,2 ml/minuto, a 40 °C para proporcionar el compuesto del
25 título. ¹H NMR (400 MHz, dimetilsulfóxido-*d*₆) δ ppm 0,88-1,06 (m, 2H), 1,15-1,28 (m, 3H), 1,31-1,40 (m, 2H), 1,68-

1,82 (m, 4H), 2,31-2,39 (m, 2H), 2,46-2,59 (br m, 4H), 2,79 (s, 3H), 2,90 -3,05 (br m, 4H), 3,12 (s, 3H), 3,25-3,45 (m, 1H), 4,59 (s, 2H), 6,05 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,11-7,17 (m, 1H), 7,27-7,34 (m, 2H); LC-MS (ESI) m/z 457,3 (M+H)⁺.

5

Ejemplo 3

N' -[(1*r*,4*r*)-4-{2-[4-(2,3-diclorofenil)piperazin-1-il]etil}ciclohexil]- N -metil- N -(propoximetil)urea

10

Ejemplo 3A

N' -[(1*r*,4*r*)-4-{2-[4-(2,3-diclorofenil)piperazin-1-il]etil}ciclohexil]- N -[(1*H*-imidazol-1-il)metil]- N -metilurea

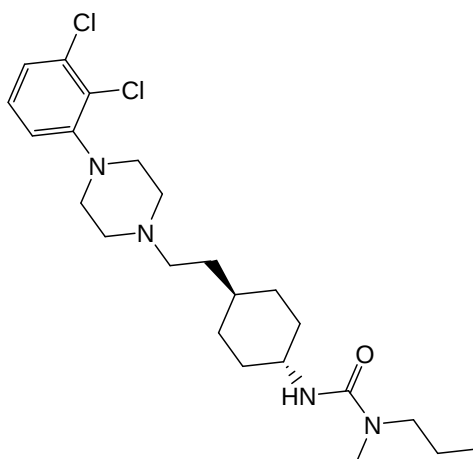
15

Una mezcla de 3,0 g (7,25 mmol) de N -[(1*r*,4*r*)-4-{2-[4-(2,3-diclorofenil)piperazin-1-il]etil}ciclohexil]- N' -metilurea, 1070 g (10,9 mmol) de (1*H*-imidazol-1-il)metanol, 9 ml (200 mmol) de ácido acético y 70 ml de tetrahidrofurano se agitaron a 80 °C durante 18 horas. Se
20 añadió diclorometano (100 ml) y 50 ml de NaHCO₃ acuoso saturado a la mezcla. La capa orgánica se separó, se secó sobre sulfato de sodio y se filtró. El filtrado se concentró in vacuo. El residuo se mezcló con mezcla de éter dietílico (200 ml) y metanol (5 ml) y se filtró para proporcionar el
25 compuesto del título. LC-MS (ESI) m/z 493,3 (M+H)⁺.

Ejemplo 3B

N' -[(1*r*,4*r*)-4-{2-[4-(2,3-diclorofenil)piperazin-1-il]etil}ciclohexil]-*N*-metil-*N*-(propoximetil)urea

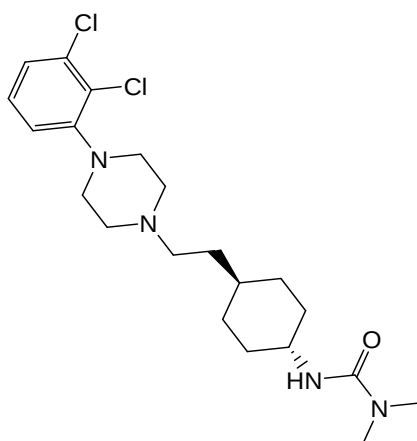
5 A una solución de 87 mg de ácido metanosulfónico (0,9 mmol) en 273 mg de 1-propanol (4,55 mmol), 20 ml de tolueno y 443 mg (1 mmol) de *N'* -[(1*r*,4*r*)-4-{2-[4-(2,3-diclorofenil)piperazin-1-il]etil}ciclohexil]-*N* -[(1*H*-imidazol-1-il)metil]-*N*-metilurea se añadió a temperatura
10 ambiente y la mezcla de reacción se agitó a 90 °C durante 2 horas. Acetato de etilo (30 ml) y 30 ml de NaHCO₃ acuoso saturado se añadieron a la mezcla. La capa orgánica se separó, se secó sobre sulfato de sodio y se filtró. El filtrado se concentró in vacuo. El residuo se sometió a
15 cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con diclorometano/metanol (97:3). El material crudo se mezcló con *n*-pentano y se filtró para obtener el compuesto del título. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 0,84 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H), 0,88-1,03 (m, 2H), 1,13-1,29 (m, 3H), 1,30-1,40 (m, 2H), 1,48 (sxt, *J* = 7,0 Hz, 2H), 1,69-1,81 (br m, 4H),
20 2,31-2,40 (m, 2H), 2,43-2,60 (br m, 4H), 2,79 (s, 3H), 2,90-3,05 (br m, 4H), 3,26 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 3,31-3,46 (m, 1H), 4,64 (s, 2H), 6,02 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,11-7,17 (m, 1H), 7,27-7,33 (m, 2H); LC-MS (ESI) *m/z* 485,3 (M+H)⁺.



Ejemplo de referencia 1

- 5 *N'* - [(1*r*, 4*r*) - 4 - { 2 - [4 - (2, 3 - diclorofenil) piperazin - 1 - il] etil } ciclohexil] - *N* - metil - *N* - propilurea

El compuesto del título se preparó como se describe en W02005012266.



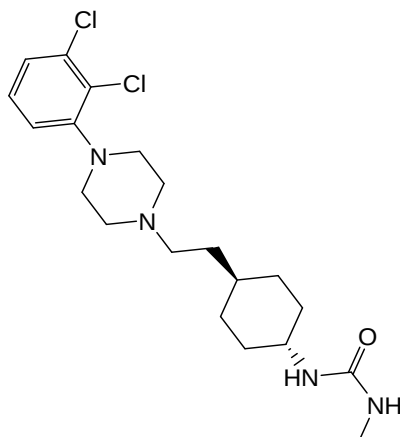
10

Ejemplo de referencia 2

N' -[(1*r*, 4*r*) -4 -{2 -[4 - (2, 3 -diclorofenil) piperazin -1 -
il]etil} ciclohexil] -*N,N* -dimetilurea (CAR)

El compuesto del título se preparó como se describe en W02005012266.

5



Ejemplo de referencia 3

10 *N* -[(1*r*, 4*r*) -4 -{2 -[4 - (2, 3 -diclorofenil) piperazin -1 -
il]etil} ciclohexil] -*N'* -metilurea (DCAR)

El compuesto del título se preparó como se describe en W02005012266.

15 Estudio de solubilidad cinética

Clase de solubilidad en DMSO	Concentración máxima en el estudio de solubilidad cinética (μM)*
Soluble ≥ 10 mM	100
Moderado ≥ 5 mM	50
Bajo ≥ 1 mM	10
Insoluble < 1 mM	No medida

*En la presencia de cosolvente DMSO al 1 %, TA, 2 horas

Para la determinación de la solubilidad cinética, se pipetearon 3 ml de una solución madre de DMSO de 10 mM (5 mM, 1 mM) de cada compuesto en un pocillo de una placa de 96 pocillos (placa de filtro Millipore Multiscreen®_{HTS}-PCF, MilliporeSigma, St. Louis, MO, EE. UU.) que contenía 295 ml de PBS pH 7,4. Después de agitar la suspensión en un agitador orbital a 300 rpm durante 2 horas, la suspensión se aclaró por filtración al vacío (Multiscreen® distribuidor de vacío; MilliporeSigma). Inmediatamente después de la etapa de filtración, se transfirieron 160 ml del filtrado a 40 ml de acetonitrilo para evitar la precipitación del compuesto de la solución saturada. La concentración del compuesto de investigación se determinó mediante detección HPLC-UV-(MS), usando un estándar externo elaborado a partir del mismo lote de compuesto de investigación. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Estudio de solubilidad termodinámica (37 °C, 4 horas)

Para medir la solubilidad termodinámica: típicamente, se añadieron 200-400 µl de la solución a 1-2 mg de los materiales de prueba sólidos (n=5). Las mezclas/soluciones saturadas resultantes se agitan a 37 °C durante 4 horas (al equilibrio de la solución) y se filtran en una placa de filtro Millipore MultiSreen (0,45 µm). Las concentraciones de los filtrados se determinan por

LC/UV/MS basado en una calibración de 5 puntos. (Cuando el material sólido se disolvió totalmente en el medio de prueba acuoso, el resultado debe considerarse como un valor mínimo). Los resultados se muestran en la Tabla 2.

5

Estudio de solubilidad termodinámica (TA, 24 horas)

Para medir la solubilidad termodinámica: típicamente, se añadieron 200-400 μ l de la solución a 1-2 mg de los materiales de prueba sólidos (n=5). Las mezclas resultantes se agitaron a temperatura ambiente (TA) durante 24 horas (al equilibrio de la solución) y se filtraron en una placa de filtro Millipore MultiSreen (0,45 μ m). Las concentraciones de los filtrados se determinaron por LC/UV/MS basado en una calibración de 5 puntos. (Cuando el material sólido se disolvió totalmente en el medio de prueba acuoso, el resultado debe considerarse como un valor mínimo). Los resultados se muestran en la Tabla 2.

20

Tabla 2

	Solución cinética [μ M] PBS pH = 7,4 2 horas, TA	Sol. termodinámica [μ M] SIF pH = 6,8 4 horas, 37 °C	Sol. termodinámica [μ M] PBS pH = 7,4 4 horas, 37 °C	Sol. termodinámica [μ M] PBS pH = 7,4 24 horas, TA
Ejemplo 1	72,7 $\pm$ 3,4	53,5 $\pm$ 0,9	10,9 $\pm$ 0,3	45,3 $\pm$ 0,6
Ejemplo 2	47,7 $\pm$ 4,5	147,04 $\pm$ 8,72	58,93 $\pm$ 5,32	50,93 $\pm$ 2,3
Ejemplo 3	32,4 $\pm$ 3,2	32,68 $\pm$ 1,65	30,50 $\pm$ 3,06	39,68 $\pm$ 2,15

Ej. de ref. 1	10,9 ± 1,7	27,7 ± 1,1	4,9 ± 0,3	6,2 ± 0,3
Ej. de ref. 2	7,8 ± 0,1	13,3 ± 1,5 **	3,2 ± 0,3 **	3,8 ± 0,3
Ej. de ref. 3	0,9 ± 0,1	1,9 ± 0,2 **	0,3 ± 0,1 **	0,6 ± 0,1

SIF: pH 6,8 de fluido intestinal simulado sin pancreatina (0,68 % (p/v) KH₂PO₄, 0,09 % (p/v) de NaOH)

PBS: pH 7,4 (0,01 M de solución salina regulada con fosfato, 0,138 M de NaCl, 0,0027 M de KCl, sin Ca²⁺, Mg²⁺)

5 ** 24 horas

TA = temperatura ambiente

Los datos de solubilidad cinética y termodinámica de los ejemplos de la presente descripción
10 indican que su solubilidad en comparación con la de los compuestos de referencia mejora inesperadamente.

Ensayos biológicos

En los estudios de biología *in vitro* se usaron
15 comúnmente las siguientes abreviaturas: BSA para albúmina sérica bovina, cAMP para monofosfato de adenosina cíclico, DMEM para medio Eagle modificado de Dulbecco, DMSO para sulfóxido de dimetilo, EDTA para sal tetrasódica de ácido etilendiaminatetraacético, EGTA para etilenglicol-*bis*(2-
20 aminoetiléter)-*N,N,N',N'*-ácido tetraacético, FBS para suero fetal bovino, G418 para geneticina, IBMX para 3-isobutil-1-metilxantina y Tris para tris(hidroximetil)aminometano.

Estudios con receptores D_{2L} humano

25

Determinación de la afinidad de los receptores D_{2L} humano en ensayo de unión competitiva usando [³H]racloprida

Las células CHO-K1 cultivadas que expresan receptores D_{2L} humano recombinante (DRD2L cAMP Hunter™, línea celular G_i, Eurofins DiscoverX, Fremont, CA, EE. UU.) se homogeneizaron en solución regulador 4x (v/v) (50 mM de Tris, 5 mM de MgCl₂, 1 mM de EGTA, pH 7,4 a 25 °C) con un molinillo de tejido Dounce y se centrifugó a 40.000 x g a 4 °C durante 10 minutos. El sobrenadante se eliminó y el gránulo se resuspendió en regulador 4 x (v/v) y se centrifugó. El gránulo resultante se resuspendió en la solución regulador anterior a un volumen de 12,5 ml/g de peso original. Después, la preparación de la membrana se dividió en alícuotas y se almacenó a -70 °C.

Los compuestos de prueba se diluyeron en serie en DMSO y posteriormente se diluyeron en DMSO al 5 % (v/p) en regulador de unión (50 mM de Tris, 5 mM de MgCl₂, 5 mM de KCl, 1 mM de CaCl₂, 120 mM de NaCl, 1 mM de EDTA). Un compuesto concentrado 5 x en regulador de unión (50 µl) se transfirió a placas de 96 pocillos profundos (BRAND, Wertheim, Alemania). Las preparaciones de membrana en alícuotas se descongelaron y se lavaron una vez en regulador de unión. En el mismo regulador, se incubó 10 µg de proteína/pocillo con 2 nM [³H]racloprida (PerkinElmer, Waltham, MA, EE. UU.) en presencia o ausencia del compuesto de prueba (para determinar la inhibición de la unión del

compuesto de prueba o la unión total, respectivamente) durante 120 minutos a 25 °C en un volumen de 250 µl. La unión no específica (NSB, por sus siglas en inglés) se determinó en presencia de 10 µM de haloperidol, un antagonista del receptor D₂. Después de la incubación, las muestras se filtraron sobre placas UniFilter® GF/B (PerkinElmer) usando un recolector Filtermate™ (PerkinElmer) y se lavaron cuatro veces con 1 ml de regulador de unión helado. Las placas se secaron a 40 °C durante una hora y se añadió 40 µl de cóctel de centelleo Microscint™-20 (PerkinElmer) a cada pocillo. La radioactividad se determinó usando un contador de microplacas MicroBeta²® (PerkinElmer).

La unión no específica se sustrajo para producir una unión específica que se normalizó a las muestras tratadas con vehículo y se convirtió en valores del % de desplazamiento. Se usó GraFit 6.0 (Erithracus Software, Horley, Reino Unido) para la determinación de valores IC₅₀ y ajustes de curvas. Los valores IC₅₀ (es decir, la concentración de compuesto que da 50 % de inhibición de unión específica) se determinaron a partir de curvas de concentración-desplazamiento por ajuste sigmoideal. Las constantes de inhibición (K_i) se calcularon usando la ecuación de Cheng-Prusoff: $K_i = IC_{50} / [1 + ([L] / K_D)]$, donde [L] es la concentración de radioligando y K_D la afinidad del ligando etiquetado para el receptor. K_D se determinó a

partir de un experimento de saturación separado. El valor de pK_i se derivó al calcular el logaritmo negativo del valor K_i expresado en mol/litro. Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se muestran en la Tabla 3. Los resultados indican que los ejemplos de la presente descripción son ligandos de alta afinidad de receptores D_{2L} humano recombinantes.

Tabla 3

10

Ejemplo	D_{2L} pK_i [3H]racloprida
1	8,71
2	8,90
3	8,94
Ej. de ref. 2	8,71

Determinación de la afinidad de los receptores D_{2L} humano en ensayo de unión competitiva usando [3H] espiperona

Las células CHO-K1 que expresan receptores D_{2L} humano recombinante se lavaron con solución salina regulada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés). Las células se rasparon de las placas y se centrifugaron a 1000 x g . Las células se interrumpieron usando un homogeneizador de pistilo de Teflon® en regulador que contenía 25 mM de Tris-HCl, pH=7,4, 6 mM de $MgCl_2$, 1 mM de EDTA, 10 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, por sus siglas en inglés). La suspensión resultante se centrifugó a 1000 x g . El sobrenadante se recolectó y se centrifugó a 41.000 x g . El

sobrenadante se descartó y el gránulo se resuspendió en el regulador anterior. Después, la preparación de la membrana se dividió en alícuotas y se almacenó a -70 °C.

Las preparaciones de membrana en alícuota se
5 incubaron con 0,16 nM [³H]espiperona (PerkinElmer) en presencia o ausencia del compuesto de prueba en placas de 96 pocillos durante 120 minutos a 25 °C en un regulador de incubación que contiene 50 mM de Tris-HCl, 1,4 mM de ácido ascórbico, BSA al 0,001 %, 150 mM de NaCl, pH 7,4, con DMSO
10 al 1 % en un volumen de reacción final de 222 µl. La unión no específica (NSB) se determinó en presencia de 10 µM de haloperidol (Sigma-Aldrich). Después de la incubación, las muestras se filtraron sobre placas UniFilter® GF/C (PerkinElmer), se lavaron y se añadió el coctel de centelleo
15 Microscint™-20. La radiactividad se determinó con un contador de microplacas MicroBeta²® (PerkinElmer).

A partir de recuentos de centelleo, se sustrajo la NSB para producir una unión específica que se normalizó a las muestras tratadas con vehículo y se convirtió en
20 valores de % de desplazamiento. Los valores IC₅₀ se determinaron mediante un análisis de regresión de mínimos cuadrados no lineal con MathIQ™ (ID Business Solutions Ltd., Surrey, Reino Unido). Los valores K_i se calcularon usando la ecuación de Cheng-Prusoff usando el IC₅₀
25 observado del compuesto evaluado, la concentración de radioligando empleada en el ensayo y los valores históricos

para la K_D del ligando. El valor pK_i se derivó al calcular el logaritmo negativo del valor K_i expresado en mol/litro y se muestra en la Tabla 4. Los resultados indican que los ejemplos de la presente descripción son ligandos de alta
 5 afinidad de receptores D_{2L} humano recombinantes cuando se usa [3H]espiperona como radioligando.

Tabla 4

Ejemplo	D_{2L} pK_i [3H]espiperona
1	9,06
2	8,93
3	8,93
Ej. de ref. 2	9,20

10

Caracterización del agonismo de los receptores D_{2L} humano usando detección de monofosfato de adenosina cíclica

La actividad agonista en receptores D_{2L} humano se analizó midiendo los niveles de cAMP en células CHO-K1 que
 15 expresan receptores D_{2L} humano (Eurofins DiscoverX, Fremont, CA, EE. UU.) mediante fluorescencia homogénea de resolución temporal (HTRF®) usando cAMP G_i kit (Cisbio/PerkinElmer). Las células CHO-K1 que expresan receptores D_{2L} humano se cultivaron en medio F12 de Ham
 20 suplementado con 10 % de FBS, solución antimicótica de penicilina-estreptomicina al 1 % y 800 $\mu g/ml$ de G418 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada que

contenía 5,0 % de CO₂. Para las mediciones de cAMP, las células criopreservadas se descongelaron y se sembraron en placas de 96 pocillos de media área de pared blanca a 10.000 células/pocillo en reactivo de siembra de placas 2 (CP2) PathHunter® de AssayComplete™ (Eurofins DiscoverX) y se incubó durante la noche a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5,0 % de CO₂. Antes de la medición de cAMP, el reactivo CP2 se eliminó de las células y se reemplazó con 20 µl de compuesto o vehículo que contenía regulador de ensayo (140 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 2 mM de CaCl₂, 10 mM de ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etan-1-sulfónico (HEPES), 10 mM de glucosa, pH 7,4) complementado con 100 µM de IBMX y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de una etapa adicional de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente con 0,5 µM de forskolina (Eurofins DiscoverX), la estimulación celular se detuvo al añadir los reactivos de detección (20 µl de cAMP-d2 y 20 µl de criptato anti-cAMP, Cisbio/PerkinElmer) diluido en regulador de lisis. La señal de fluorescencia de resolución temporal se cuantificó con un lector multimodo PHERAstar FS (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania) usando configuraciones de HTRF® estándar con excitación láser a 337 nm después de 60 minutos de incubación a temperatura ambiente. Los resultados se calcularon a partir de la relación de la señal de fluorescencia aceptora (A665 nm)

y la señal de fluorescencia del donante ($A_{620\text{ nm}} \times 10^4$) y expresado como valores de $\Delta F \%$ usando la siguiente fórmula:

$$100 \times (\text{relación de muestra-relación de control negativo}) / \text{relación de control negativo}.$$

En experimentos, todos los tratamientos se midieron en múltiples pocillos en paralelo, y se usaron los valores medios de $\Delta F \%$ para su posterior análisis. Los valores de actividad agonista se calcularon como porcentaje de inhibición de la acumulación de cAMP estimulada por forskolina normalizada a la respuesta provocada por una concentración máxima efectiva de la dopamina probada en el mismo experimento. Todos los cálculos se realizaron usando Microsoft Excel® (Microsoft, Redmond, WA, EE. UU.). Los valores pEC_{50} mostrados en la Tabla 5 (el logaritmo negativo de la concentración, expresado en mol/litro, del agonista que produce 50 % de inhibición de la acumulación de cAMP estimulada por forskolina) se obtuvieron mediante el ajuste de curvas sigmoideal de 4 parámetros a los datos de efecto de concentración con la asíntota inferior limitada a cero usando GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.). Los resultados indican que los ejemplos de la presente descripción son agonistas potentes de la vía de señalización acoplada a la proteína G de los receptores D_{2L} humano recombinantes.

Tabla 5

Ejemplo	D _{2L} CAMP pEC ₅₀
1	8,43
2	8,88
Ej. de ref. 2	8,43

5 Medición del reclutamiento de β -arrestina en los receptores de dopamina D_{2L} humanos

Las células CHO-K1 PathHunter® que expresan receptores D_{2L} humano etiquetados y la β -arrestina-2 etiquetada (Eurofins DiscoverX, Fremont, CA, EE. UU.) se
10 sembraron en placas de cultivo de tejidos de fondo transparente de pared blanca de 96 pocillos en 90 μ l/célula de reactivo de placa de células (CP2) de AssayComplete™ (Eurofins DiscoverX) a una densidad de 20.000 células/pocillo. Las placas se incubaron durante la noche en
15 una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂ a 37 °C. Veinticuatro horas después, se añadieron 20 μ l de compuesto de prueba o vehículo en reactivo CP2 y que contenía DMSO al 2,2 % a las células, y se incubaron durante 90 minutos a 37 °C. Después, 55 μ l de reactivo de detección PathHunter®
20 (Eurofins DiscoverX) se añadió por pocillo y las placas se incubaron durante 60 minutos a 25 °C, seguido de detección de luminiscencia usando un lector de placas multimodo PHERAstar® FS (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). Los datos

sin procesar se convirtieron al porcentaje de estimulación por encima de los valores basales. Los valores se convirtieron adicionalmente al porcentaje de estimulación máxima del reclutamiento de β -arrestina mediante 30 μ M de dopamina. Los valores EC_{50} se calcularon a partir de curvas de concentración-respuesta de al menos seis concentraciones realizadas por duplicados por ajuste sigmoideal usando el software Origin® 7.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EE. UU.) y se definieron como la concentración del agonista con la estimulación máxima media. Los valores pEC_{50} se calcularon como el logaritmo negativo del valor EC_{50} expresado en mol/litro y se muestra en la Tabla 6. Los resultados indican que los ejemplos de la presente descripción son agonistas potentes de la vía de señalización independiente de la proteína G de los receptores D2L humano recombinantes.

Tabla 6

Ejemplo	D _{2L} arrestina pEC_{50}
1	8,96
2	9,14
Ej. de ref. 2	8,71

20 Estudios con receptores D₃ humanos

Determinación de la afinidad de los receptores D₃ humanos
en ensayo de unión competitiva usando [³H]racloprida

Los cultivos celulares (CHO-K1) que expresan receptores D₃ humano recombinante (DRD3, GenBank núm. de ident. U32499, comprados de Euroscreen Fast, Bruselas, BE) se homogeneizaron en 4 x solución regulador (v/v) (15 mM de Tris, 2 mM de MgCl₂, 0,3 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, pH 7,4 a 25 °C) con un molinillo de tejido Dounce y se centrifugó a 40.000 x g a 4 °C durante 25 minutos. El sobrenadante se eliminó y el gránulo se resuspendió en regulador 4x (v/v) y se centrifugó. El proceso se repitió dos veces, y el sedimento se resuspendió en regulador de almacenamiento (75 mM de Tris, 12,5 mM de MgCl₂, 0,3 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 250 mM de sacarosa, pH 7,4 a 25 °C) a un volumen de 12,5 ml/g de peso original de la célula. Después, la preparación de la membrana se dividió en alícuotas y se almacenó a -70 °C.

Los compuestos se diluyeron en DMSO y regulador de unión (que contenía 50 mM de Tris, 5 mM de MgCl₂, 5 mM de KCl, 1 mM de CaCl₂, 120 mM de NaCl, 1 mM de EDTA) y 50 µl de cada solución se transfirieron a una placa de pocillos profundos (BRAND) en una concentración final de 5 veces en solución reguladora de DMSO al 5 %. La preparación de membrana en alícuotas se descongeló y se lavó una vez en regulador de unión. En el mismo regulador, se incubó 3,3 µg de proteína/ensayo con ca. 2,7 nM [³H]racloprida (PerkinElmer) en presencia o ausencia del compuesto de

prueba durante 120 minutos a 25 °C en un volumen de 250 µl en una placa de pocillos profundos (BRAND) de 96 pocillos. La unión no específica (NSB) se determinó en presencia de 10 µM de haloperidol. La concentración final de DMSO fue del 1 % (v/v) en todas las reacciones. Después de la incubación, las muestras se filtraron sobre placas UniFilter® GF/B (PerkinElmer) usando un recolector Filtermate™ (PerkinElmer) y se lavaron con 4 x 1 ml de regulador de unión a helado. La placa se secó a 40 °C durante una hora y se añadió 40 µl de cóctel de centelleo Microscint™-20 (PerkinElmer) a cada pocillo. La radiactividad se determinó con un contador de microplacas Microbeta²® (PerkinElmer).

Usando recuentos de centelleo sin procesar, se sustrajo la NSB para producir una unión específica que se normalizó a las muestras tratadas con vehículo y se convirtió en valores de porcentaje de desplazamiento. Se usó GraFit 6.0 (Erithracus Software, Horley, Reino Unido) para los ajustes de curvas y los cálculos. Los valores IC₅₀ (es decir, la concentración de compuesto que da 50 % de inhibición de unión específica) se determinaron a partir de curvas de concentración-desplazamiento por ajuste sigmoideal. Las constantes de inhibición (K_i) se calcularon usando la ecuación de Cheng-Prusoff: $K_i = IC_{50} / [1 + ([L] / K_D)]$, donde [L] es la concentración de radioligando y K_D la afinidad del ligando etiquetado para el receptor. K_D se determinó a partir de un experimento de saturación

separado. El valor pK_i mostrado en la Tabla 7 se derivó al calcular el logaritmo negativo de valor K_i expresado en mol/litro. En todos los experimentos, las muestras se realizaron por triplicado. Los resultados indican que los
5 ejemplos de la presente descripción son ligandos de alta afinidad de receptores D_3 humano recombinantes.

Tabla 7

Ejemplo	D_3 pK_i [3H]racloprida
1	8,99
2	9,15
Ej. de ref. 2	9,51

10

Determinación de la afinidad de los receptores D_3 humanos en ensayo de unión competitiva usando [3H]espiperona

Las células CHO-K1 que expresan receptores D_3 humano recombinantes se lavaron con PBS. Las células se
15 rasparon de las placas y se centrifugaron a 1000 x g . Las células se interrumpieron usando un homogeneizador de pistilo de Teflon® en regulador que contenía 25 mM de Tris-HCl, pH=7,4, 6 mM de $MgCl_2$, 1 mM de EDTA, 10 mM de PMSF. La suspensión se centrifugó a 1000 x g . El sobrenadante se
20 recolectó y se centrifugó a 41.000 x g . El sobrenadante se descartó y el gránulo se resuspendió en el regulador anterior. La preparación de la membrana se dividió en alícuotas y se almacenó a -70 °C.

Las preparaciones de membrana en alícuotas se incubaron con 0,7 nM [³H]espiperona (PerkinElmer) en presencia o ausencia del compuesto de prueba en placas de 96 pocillos durante 120 minutos a 37 °C en un regulador de incubación que contiene 50 mM de Tris-HCl, 1,4 mM de ácido ascórbico, albúmina sérica bovina al 0,001 % y 150 mM de NaCl, a pH 7,4, con DMSO al 1 % en un volumen de reacción final de 222 µl. La unión no específica (NSB) se determinó en presencia de 25 µM de (S)-(-)-sulpirida (Sigma Aldrich).

Después de la incubación, las muestras se filtraron en placas de filtro GF/C (PerkinElmer), se lavaron y se añadió el coctel de centelleo Microscint™-20. La radiactividad se determinó en un contador de microplacas MicroBeta²® (PerkinElmer).

A partir de recuentos de centelleo sin procesar, se sustrajo la NSB para producir una unión específica que se normalizó a las muestras tratadas con vehículo y se convirtió en valores de % de desplazamiento. Los valores IC₅₀ se determinaron mediante un análisis de regresión de mínimos cuadrados no lineal usando MathIQ™ (ID Business Solutions Ltd., Surrey, Reino Unido). Los valores K_i se calcularon usando la ecuación de Cheng-Prusoff usando el IC₅₀ observado del compuesto evaluado, la concentración de radioligando empleada en el ensayo y los valores históricos para la K_D del ligando. El valor pK_i mostrado en la Tabla 8 se derivó al calcular el logaritmo negativo de valor K_i expresado en mol/litro. Los resultados indican que los

ejemplos de la presente descripción son ligandos de alta afinidad de receptores D₃ humano recombinantes cuando se usa [³H]espiperona como radioligando.

5 Tabla 8

Ejemplo	D ₃ pK _i [³ H]espiperona
1	10,00
2	9,77
3	9,74
Ej. de ref. 2	9,80

Caracterización del agonismo en receptores D₃ humano usando detección de monofosfato de adenosina cíclica

10 La actividad agonista en los receptores D₃ humano se analizó mediante los niveles de cAMP en las células HEK293 que expresan receptores D₃ humano recombinantes (BioXtal, Saint-Félix, Francia) que coexpresan de manera estable adenilil ciclasa V (ACV, por sus siglas en inglés) (línea
15 celular desarrollada por Gedeon Richter) mediante fluorescencia homogénea de resolución temporal (HTRF, por sus siglas en inglés) usando el cAMP G_i kit (Cisbio/PerkinElmer). Las células HEK293 que expresan receptores D₃ humano recombinantes y ACV se cultivaron en DMEM suplementado con
20 10 % de FBS, solución antimicótica de penicilina-estreptomicina al 1 %, piruvato al 1 %, 100 µg/ml de G418 (Thermo Fisher Scientific) y 60 µg/ml de higromicina B y se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada que

contenía 5 % de CO₂. Antes de medir el cAMP, las células se separaron con Versene (Thermo-Fisher Scientific) y se resuspendieron en regulador de ensayo (140 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 2 mM de CaCl₂, 10 mM de ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etan-1-sulfónico (HEPES, por sus siglas en inglés), 10 mM de glucosa, pH 7,4) en microplacas de 96 pocillos de área media de pared blanca, a una densidad de 15.000 células/pocillo y 20 µl de volumen. El regulador de ensayo se complementó con 100 µM de IBMX (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.). Después de añadir los compuestos de prueba (4 x concentrados) o vehículo (DMSO) a 10 µl/cavidad, las células se incubaron con regulador de ensayo o varias concentraciones de los compuestos de prueba durante 20 minutos. Después de 30 minutos adicionales de incubación a temperatura ambiente con 1,5 µM de forskolina (concentración final de DMSO fue de 0,3 %) se detuvo la estimulación celular mediante la adición de reactivos de detección (20 µl de cAMP-d2 y 20 µl de anti-cAMP criptato) diluido en regulador de lisis (PerkinElmer). La señal de fluorescencia de resolución temporal (TRF, por sus siglas en inglés) se cuantificó con un lector multimodo PHERAstar FS (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania) usando configuraciones estándar de HTRF con excitación láser a 337 nm después de 60 minutos de incubación a temperatura ambiente.

Los resultados se calcularon a partir de la relación de la señal de fluorescencia aceptora (A665 nm) y

la señal de fluorescencia del donante (A620 nm) $\times 10^4$ y expresado como valores de ΔF % usando la siguiente fórmula:

$$100 \times (\text{relación de muestra-relación de control negativo}) / \text{relación de control negativo}.$$

En todos los experimentos, se midieron múltiples pocillos en paralelo, y se usaron los valores promedio de ΔF % para el análisis adicional. Los valores de actividad agonista se calcularon como porcentaje de inhibición de la acumulación de cAMP estimulada por forskolina normalizada a la respuesta provocada por una concentración máxima efectiva de la dopamina probada en el mismo experimento. Todos los cálculos se realizaron usando Excel (Microsoft, Redmond, WA, EE. UU.). Los valores pEC_{50} (el logaritmo negativo de la concentración, expresado en mol/litro, del agonista que produce 50 % de inhibición de la acumulación de cAMP estimulada por forskolina) se obtuvieron mediante el ajuste de curvas sigmoideal de 4 parámetros a los datos de efecto de concentración con la asíntota inferior limitada a cero usando GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.) y se muestran en la Tabla 9. Los resultados indican que los ejemplos de la presente descripción son agonistas altamente potentes de la vía de señalización dependiente de la proteína G de los receptores D_3 humano recombinantes.

Tabla 9

Ejemplo	D ₃ CAMP pEC ₅₀
1	8,45
2	8,71
Ej. de ref. 2	8,71

5 Medición del reclutamiento de β -arrestina en los
receptores de dopamina D₃ humanos

Las células CHO-K1 PathHunter® que expresan receptores D₃ humano etiquetados y la β -arrestina-2 etiquetada (Eurofins DiscoverX, Fremont, CA, EE. UU.) se
10 sembraron en placas de cultivo de tejidos de fondo transparente de pared blanca de 96 pocillos en 90 μ l de reactivo de placa de células (CP2) de AssayComplete™ (Eurofins DiscoverX) a una densidad de 25.000 células/pocillo y se incubaron durante la noche en atmósfera humidificada
15 con 5 % de CO₂ a 37 °C. Veinticuatro horas después, se añadieron 20 μ l de compuestos de prueba o vehículo en reactivo CP2 que contenía DMSO al 2,2 % a las células y las células se incubaron durante 90 minutos a 37 °C. Después de la incubación, 55 μ l de reactivo de detección PathHunter®
20 (Eurofins DiscoverX) se añadió por pocillo y las placas se incubaron durante 60 minutos a 25 °C seguido de detección de luminiscencia usando un lector de placas multimodo PHERAstar® FS (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania).

Los datos sin procesar se convirtieron primero en el % de estimulación por encima de los valores basales. El % de estimulación por encima de los valores basales se convirtió adicionalmente en el % de estimulación máxima del reclutamiento de β -arrestina mediante 1 μ M de dopamina. Los valores EC_{50} se calcularon a partir de curvas de concentración-respuesta de al menos seis concentraciones en duplicados mediante ajuste sigmoideal usando el software Origin® 7.5 (OriginLab® Corporation, Northampton, MA, EE. UU.) y se definieron como la concentración del agonista con la estimulación máxima media. Los valores pEC_{50} mostrados en la Tabla 10 se calcularon como el logaritmo negativo del valor EC_{50} expresado en mol/litro. Los resultados indican que los ejemplos de la presente descripción son agonistas altamente potentes de la vía de señalización independiente de la proteína G de los receptores D_3 humano recombinantes.

Tabla 10

Ejemplo	D_3 arrestina EC_{50}
1	8,51
2	8,41
Ej. de ref. 2	8,55

Ensayos del receptor 5-HT2_A

Determinación de la afinidad para receptores 5-HT_{2A}
humano en el ensayo de unión competitiva

Las membranas receptoras se prepararon a partir de la línea celular AequoScreen®recombinante CHO-K1 que expresa
5 establemente el receptor 5-HT_{2A} humano (PerkinElmer, Waltham, MA, EE. UU.). Las células se suspendieron en 4 x el volumen en el regulador A (15 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 2 mM MgCl₂, 0,3 mM de EDTA, 1 mM de EGTA) (1 g de célula - 4 ml de regulador) y se homogeneizaron en un homogeneizador Dounce.
10 La fracción de membrana cruda se recolectó después de dos etapas de centrifugación consecutivas a 40.000 x g durante 25 minutos separados por una etapa de lavado en regulador A. El gránulo final se resuspendió en el regulador B (75 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 12,5 mM de MgCl₂, 0,3 mM de EDTA, 1 mM de
15 EGTA, 250 mM de sacarosa) en una concentración de 80 mg de peso de la célula húmeda en 0,5 ml de regulador, en alícuotas y congelada instantáneamente en hielo seco. El contenido de proteína se determinó usando el ensayo de ácido bicinconínico en presencia de reactivos de sulfhidrilo con albúmina de
20 suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) como estándar.

En experimentos de unión, se prepara 15 µg de preparación de membrana de proteína/pocillo y 1 nM de clorhidrato de cetanserina, [etileno-³H] (PerkinElmer) como radioligando se incubaron con compuestos o vehículo (DMSO,
25 concentración final de 1 % (v/v)) en un regulador de incubación (50 mM de Tris, 0,3 % de BSA, pH 7,4). La unión

no específica (NSB) se determinó en presencia de 1 μ M de clorhidrato de mianserina (Tocris, Bristol, Reino Unido). Las muestras se incubaron en un volumen final de 250 μ l durante 15 minutos a 25 °C. Las reacciones de unión se terminaron
5 mediante filtración rápida a través de un recolector Filtermate™ (PerkinElmer) usando placas UniFilter® GF/C remojadas previamente durante al menos 1 hora en 0,5 % (v/v) de polietilenimina (PEI, por sus siglas en inglés, disuelta en agua destilada). Las placas de filtro se lavaron tres
10 veces con 0,5 ml de regulador de lavado helado (50 mM de Tris, pH 7,4). Las placas de filtro lavadas se secaron a 40 °C durante 60 minutos y se añadió 40 μ l de un cóctel de centelleo Microscint™-20 (PerkinElmer) a cada pocillo. La radiactividad se determinó con un contador de microplacas
15 MicroBeta²® (PerkinElmer).

La unión no específica se sustrajo de los recuentos de centelleo sin procesar para producir una unión específica que se normalizó a las muestras tratadas con vehículo y se convirtió en valores de % de desplazamiento. Los valores IC₅₀
20 (es decir, la concentración de compuesto que desplaza el 50 % de radioligando unido específico) se determinaron a partir de curvas de concentración-desplazamiento por ajuste sigmoidal usando el software Origin® 7.5. (OriginLab® Corporation, Northampton, MA, EE. UU.). Los valores K_i
25 mostrados en la Tabla 11 (es decir, las constantes de inhibición) se calcularon usando la ecuación de Cheng-

Prusoff: $K_i = IC_{50}/[1+([L]/K_D)]$, donde [L] es la concentración de radioligando usado y se determina por recuento de centelleo y K_D es la afinidad del ligando etiquetado para el receptor, determinado en un experimento separado. Los ensayos de unión competitiva se realizaron en un mínimo de seis concentraciones con tres réplicas de cada concentración, en dos experimentos independientes. Los valores pK_i mostrados en la Tabla 11 se derivaron al calcular el logaritmo negativo de los valores K_i expresados en mol/litro. Los resultados indican que los ejemplos de la presente descripción son ligandos de receptores 5-HT_{2A} humano recombinantes.

Tabla 11

Ejemplo	5-HT _{2A} pK_i
1	7,64
2	7,81
Ej. de ref. 2	7,53

Caracterización de antagonismo en receptores 5-HT_{2A} humano usando detección de Ca²⁺ fluorométrico

Las células CHO-K1 que expresan receptores 5-HT_{2A} humano recombinantes y G α_{16} (comprado de Euroscreen Fast, Bruselas, BE) en cultivo se criopreservaron de acuerdo con los protocolos establecidos, usando FBS al 90 %/DMSO al 10 % como medio. Antes del experimento, las células se descongelaron, se resuspendieron en medio PowerCHO™ 2 (Lonza,

Basel, Suiza) complementado con suero bovino fetal (FBS, por sus siglas en inglés) al 10 %, solución antimicótica de penicilina-estreptomicina al 1 % y piruvato al 1 %. Las células se sembraron en microplacas de 96 pocillos a una densidad de 40.000 células/pocillo y se incubaron durante la noche a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía 5,0 % de CO₂. El día del experimento, las placas se lavaron con regulador de ensayo (140 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 2 mM de CaCl₂, 10 mM de ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etan-1-sulfónico (HEPES), 10 mM de glucosa, 2 mM de probenecid, pH 7,4) usando una lavadora de placas (Elx405UCWS, Biotek, Winooski, VT, EE. UU.), después se añadió 50 µl/pocillo de 4 µM de Fluo-4 AM (Thermo Fisher Scientific) en regulador de ensayo. Después de cargar el tinte (60 minutos, 37 °C, en oscuridad), las placas se lavaron con regulador de ensayo usando el lavador de placas dejando 50 µl/pocillo de volumen residual, después se añadió 50 µl/pocillo de regulador de ensayo que contenía vehículo (DMSO al 3 % en regulador de ensayo) o compuestos de prueba (3 veces la concentración final) y las células se incubaron durante 10 minutos adicionales a 37 °C.

La concentración final de DMSO fue del 1 % (v/v) para todos los tratamientos. Para lograr esto, se preparó una serie de soluciones madre de DMSO a partir de todos los compuestos de prueba. Las soluciones madre se almacenaron a -20 °C y se diluyeron adicionalmente en regulador de ensayo

para obtener la concentración final deseada inmediatamente antes de la medición. Se preparó solución madre de 5-HT (10 mM) disolviendo 5-HT en agua desionizada y ultrafiltrada.

Los valores de referencia y los cambios evocados por agonista $[Ca^{2+}]_i$ (Ca^{2+} intracelular) se monitorearon con un lector de placas de 96 pocillos FlexStation® II (Molecular Devices, San José, CA, EE. UU.). La configuración del FlexStation® II fue como sigue para imágenes de fluorescencia: excitación a 485 nm; emisión a 525 nm con un filtro de corte a 515 nm. Las mediciones de fluorescencia se llevaron a cabo a 37 °C con un tiempo de ejecución de 40 segundos y un intervalo de muestreo de 1,36 segundos. La excitación y detección fueron a través del fondo de la placa. El valor inicial se registró durante 20 segundos seguido de estimulación con agonista, cuando 50 µl de 3 x solución agonista concentrada (5-HT en su EC_{80}) o regulador/vehículo de ensayo se añadió a todos los pocillos a 75 µl/segundo usando la pipeta incorporada, a una altura correspondiente a 155 µl. La fluorescencia se monitoreó durante 20 segundos adicionales.

Los compuestos se evaluaron contra una concentración de 5-HT EC_{80} , según se determina en cada placa con el módulo de ajuste de curva incorporado del software de medición (SoftMax® Pro 5.2, Molecular Devices, San José, CA, EE. UU.).

Los resultados se expresaron como valores $\Delta F/F$, donde F fue la fluorescencia inicial definida como la fluorescencia promedio que precede y/o inmediatamente después de la administración del agonista y ΔF fue el aumento en la fluorescencia después de la administración del agonista; calculado como $\Delta F = F_{\text{Máx}} - F$, donde $F_{\text{Máx}}$ es la fluorescencia máxima entre las lecturas 17-29 y F es el promedio de las lecturas de fluorescencia 2-13. En todos los experimentos, todos los tratamientos se midieron en múltiples pocillos en paralelo, y los valores promedio de $\Delta F/F$ se usaron para un análisis adicional. Los valores medios $\Delta F/F$ se convirtieron en valores del % de inhibición (I %) usando la siguiente fórmula: $I\% = 100 \times [1 - ((\Delta F/F_{\text{compuesto}} - \Delta F/F_{\text{vehículo}}) / (\Delta F/F_{\text{control}} - \Delta F/F_{\text{vehículo}}))]$. Los valores IC_{50} para los compuestos de prueba se determinaron usando el software SoftMax® Pro (Molecular Devices) de curvas de concentración-efecto sigmoideal de 4 parámetros ajustadas a los datos del % de inhibición. Los cálculos adicionales de los valores pIC_{50} mostrados en la Tabla 12 se derivaron al calcular el logaritmo negativo de IC_{50} , expresados como mol/litro, mediante el software anterior. Los resultados indican que los ejemplos de la presente descripción son antagonistas de receptores 5-HT_{2A} humano recombinantes.

Tabla 12

Ejemplo	5-HT _{2A} Ca ²⁺ pIC ₅₀
1	6,80
2	6,88
Ej. de ref. 2	6,75

5 Hipermotilidad inducida por fenciclidina en ratas

La actividad locomotora espontánea se midió usando un monitor de actividad de seis canales fabricado por Experimetria Ltd. (Budapest, HU). El aparato consistió en jaulas acrílicas (48,5 cm x 48,5 cm x 40 cm) equipadas con
10 2 veces 30 pares de fotoceldas en las paredes, cerca de la parte inferior de la jaula para detectar comportamiento ambulatorio horizontal. Las matrices adicionales de fotocélulas (30 pares) se colocaron a lo largo de lados opuestos de la jaula a diferentes alturas (6,5 cm, 12 cm,
15 18 cm y 23 cm) para detectar respuestas de erguimiento. Las señales, causadas por la rotura de los haces de fotocélulas, se procesaron mediante el software de análisis de movimiento (Experimetria) que determinó la posición espacial del animal con una frecuencia de muestreo de 1 Hz, y se calculó el
20 tiempo que las ratas pasaron en ambulación.

Se administraron los compuestos de prueba para estudiar animales por vía oral o subcutánea, con diez animales por grupo de tratamiento. En estos estudios, se

usaron ratas Harlan-Wistar macho (Toxi-Coop, Budapest, HU) con peso de 190-210 gramos. Después de la administración oral del compuesto o vehículo de prueba, los animales se habituaron individualmente a los monitores de actividad durante 30 minutos. En los casos de administración subcutánea de compuestos de prueba, las ratas se habituaron primero durante 15 minutos a los monitores de actividad, después se trataron con el compuesto de prueba o vehículo seguido de volverlas a colocar en los monitores de actividad durante un período adicional de 15 minutos de acostumbramiento. Después de la habituación, las ratas se trataron por vía subcutánea con clorhidrato de fenciclidina (PCP, por sus siglas en inglés) y se volvieron a colocar en el aparato experimental inmediatamente para el período de medición (una hora).

Los datos se analizaron usando el software GraphPad® Prism® 9 (GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.). La evaluación estadística se realizó después de una hora de actividad (tiempo pasado con ambulación). El efecto del fármaco se evaluó usando análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés, o ANOVA de Welch cuando sea apropiado) seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Cuando fue apropiado, el valor ED_{50} se determinó a partir de los datos de porcentaje de inhibición del análisis de regresión lineal. Los valores de ED_{50} se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13

Ejemplo	PCP (MED, mg/kg)	PCP (ED ₅₀ mg/kg)
1	0,4	0,07
Ej. de ref. 2	0,1	0,09

MED = dosis mínima efectiva
(la dosis más baja que muestra un efecto estadísticamente significativo)

5

Los datos anteriores (Tabla 13) muestran que los compuestos de los ejemplos de la presente descripción mostraron un efecto/actividad farmacodinámica buena y potente en la hipermotilidad inducida por fenciclidina en
10 ratas, lo que indica que pueden tener una eficacia antipsicótica sustancial.

Escalada y olfateo inducidos por apomorfina en ratones

Los ratones CD1® macho (Envigo, Horst, NL) que
15 pesan 24-29 g se usaron en los experimentos (n=12 por grupo de tratamiento). El comportamiento de escalada y olfateo se midieron mediante observación visual en jaulas cilíndricas. Las jaulas eran de 15 cm de alto, 12 cm de diámetro, con paredes de barras de metal verticales, 2 mm
20 de diámetro y 1 cm de separación, montadas sobre una superficie de plástico lisa.

Inmediatamente después de la administración subcutánea del vehículo o el compuesto de prueba, los animales se colocaron en las jaulas durante 10 minutos para
25 habituación. Al final del período de habituación de 10

minutos, se administró por vía subcutánea 1,5 mg/kg de clorhidrato de apomorfina. Después del tratamiento, los animales se volvieron a colocar en las jaulas cilíndricas. La medición del comportamiento de escalada y olfateo comenzó 10 minutos después del tratamiento con apomorfina (durante el minuto 11) y se duró durante 16 minutos. Cada minuto se puntuó el comportamiento de escalada de la siguiente manera: cuatro patas en el piso (0 puntos); pies delanteros que tocan las barras (1 punto); y cuatro patas que sujetan las barras (2 puntos). Los animales también se clasificaron por olfateo repetitivo como una medida de estereotipia de acuerdo con la siguiente escala: sin olfatear (0 puntos), olfateo moderada, poco contacto de hocico con paredes de jaula o piso (1 punto); y olfateo constante, contacto de hocico persistente (2 puntos).

Los datos se analizaron usando el software GraphPad Prism 9 (GraphPad). Se calcularon las puntuaciones para ambos comportamientos para cada individuo (posible puntaje máximo 32) y medio de grupo. El efecto del fármaco se calculó como el porcentaje de inhibición del comportamiento inducido por apomorfina. A partir de los datos de inhibición porcentuales, se trazaron las curvas de respuesta a la dosis y se calcularon los valores ED_{50} por regresión lineal simple.

Tabla 14

Ejemplo	APO (ED ₅₀ cl mg/kg)	APO (ED ₅₀ sn mg/kg)
1	0,1	0,4
Ej. de ref. 2	0,27	0,38

APO cl = escalada inducida por apomorfina en ratones,
 APO sn = olfateo inducido por apomorfina en ratones

5

Los datos anteriores (Tabla 14) muestran que los compuestos de los ejemplos de la presente descripción muestran un efecto/actividad farmacodinámica buena y potente en la escalada y olfateo inducidos por apomorfina en ratones, lo que indica que pueden tener una eficacia antipsicótica sustancial.

Se entiende que la descripción detallada anterior y los ejemplos que la acompañan son meramente ilustrativos y no deben interpretarse como limitaciones sobre el alcance de la descripción, la cual es definida únicamente por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes. Varios cambios y modificaciones de las modalidades descritas resultarán evidentes para los expertos en la técnica. Tales cambios y modificaciones, que incluyen sin limitarse a los relacionados con las estructuras químicas, sustituyentes, derivados, intermediarios, síntesis, formulaciones y/o métodos de uso de la descripción, pueden realizarse sin apartarse del espíritu y alcance de esta. Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas

en la presente se incorporan en la presente como referencia en su totalidad para todos los fines.