



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11) Número de publicación: **2 274 025**

51) Int. Cl.:

A61K 31/66 (2006.01)

C07C 233/65 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 5/48 (2006.01)

A61P 9/06 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 9/12 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

A61P 15/10 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86) Número de solicitud europea: **02722066 .4**

86) Fecha de presentación : **12.02.2002**

87) Número de publicación de la solicitud: **1361882**

87) Fecha de publicación de la solicitud: **19.11.2003**

54

Título: **4-fluoro-N-indan-2-il-benzamida y su uso como agente farmacéutico.**

30

Prioridad: **13.02.2001 EP 01102852**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2007

73

Titular/es: **Sanofi-Aventis Deutschland GmbH**
Brüningstrasse 50
65929 Frankfurt am Main, DE

72

Inventor/es: **Wohlfart, Paulus;**
Suzuki, Teri;
Dharanipragada, Ramalinga, M.;
Safarova, Alena;
Walser, Armin y
Strobel, Hartmut

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

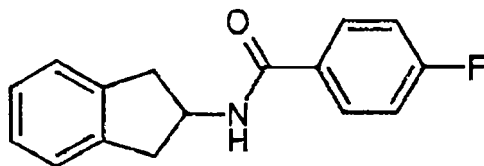
ES 2 274 025 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

4-fluoro-N-indan-2-il-benzamida y su uso como agente farmacéutico.

La presente invención se refiere a la 4-fluoro-N-indan-2-il-benzamida de la fórmula (I) y a su uso como agente farmacéutico.



(I)

La NO-sintasa endotelial (eNOS, NOS-III) pertenece a un grupo de tres isoenzimas que producen óxido nítrico (NO) por oxidación de la arginina. El NO liberado endotelialmente es de central importancia en una serie de mecanismos cardiovasculares claves. Tiene un efecto vasodilatador e inhibe la agregación plaquetaria, la adhesión de los leucocitos al endotelio y la proliferación de las células del músculo liso de la íntima.

La NO-sintasa endotelial está sometida a una regulación fisiológica y patofisiológica tanto a nivel transcripcional como a nivel post-transcripcional. La enzima ya presente en el endotelio puede sufrir una activación calcio-dependiente y calcio-independiente a través de la fosforilación de aminoácidos específicos, pero también por interacciones directas con proteínas específicas. Los estimuladores de esta liberación de NO, usualmente transitoria, son la arginina extracelular, los 17β -estrógenos y el estímulo mecánico ejercido sobre la superficie luminal del endotelio por el flujo sanguíneo (tensión cortante). Adicionalmente, el último lleva a la regulación de la eNOS a nivel transcripcional. De este modo, por ejemplo, Sessa *et al.*, (Circ. Research 74 (1994) 349-353) fueron capaces de obtener un marcado incremento de la eNOS por medio del entrenamiento con ejercicio y por el incremento de la tensión cortante asociado con el mismo.

No se ha probado sin ambigüedad si la regulación en el nivel post-transcripcional es relevante *in vivo*. Por tanto, por ejemplo, la administración de una dosis alta de arginina sólo va seguida de una mejora transitoria de la vasorrelajación endotelio-dependiente en los pacientes con cardiopatía isquémica.

Por otro lado, la importancia de la regulación por incremento de la proteína eNOS está aceptada científicamente. Así, existen hallazgos que demuestran que las propiedades protectoras del inhibidor de la HMG-CoA-reductasa, simvastatina, pueden ser atribuidas, además de a la reducción de lípidos, también en parte a un aumento en la expresión de la eNOS *in vivo* (Endres *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 8880-8885). Adicionalmente, es conocido que las mutaciones en un único punto de la región que flanquea el borde 5' del gen de eNOS ("promotor de eNOS"), y la reducción de la velocidad de transcripción del gen de eNOS asociada con las mismas, se asocian en la población japonesa con un aumento del riesgo de espasmos coronarios (Nakayama *et al.*, Circulation 99 (1999) 2864-2870).

Por tanto actualmente se da por hecho que los mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales de la regulación de la eNOS son seriamente alterados en un gran número de trastornos, especialmente en los trastornos cardiovasculares. Incluso en las etapas muy iniciales de una amplia variedad de trastornos cardiovasculares es posible que una disfunción de este tipo en el endotelio que cubre los vasos sanguíneos lleve a una deficiencia del NO bioactivo, lo que se manifiesta, cuando progresa el trastorno, en forma de cambios patofisiológicos y morfológicos cuantificables. De este modo, las etapas críticas de la aterogénesis inicial se aceleran por una reducción de la liberación del NO endotelial, tal como, por ejemplo, por la oxidación de lipoproteínas de baja densidad, el agrupamiento y depósito de los monocitos en la íntima de los vasos, y la proliferación de las células de la íntima. Una consecuencia de la aterogénesis es la formación de placas en el interior de los vasos sanguíneos, lo que a su vez puede llevar, a través de una disminución de la tensión cortante, a una reducción adicional de la liberación del NO endotelial y a un posterior deterioro de la patología. Puesto que el NO endotelial es también un vasodilatador, una reducción del mismo frecuentemente lleva también a hipertensión, que puede, como un factor de riesgo independiente, causar daños orgánicos adicionales.

El objetivo de un método terapéutico para el tratamiento de estos trastornos debe ser, por tanto, interrumpir esta cadena de acontecimientos al aumentar la expresión del NO endotelial. Los experimentos de transferencia génica que llevan *in vitro* a la sobreexpresión de la NO-sintasa en vasos previamente dañados, son capaces de hecho de contrarrestar los procedimientos descritos y existen por tanto pruebas de la exactitud de este método (Varenne *et al.*, Hum. Gene Ther. 11 (2000) 1329).

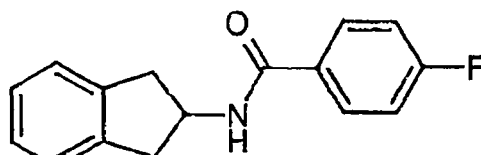
En la literatura médica están descritos algunos compuestos de bajo peso molecular que, en los cultivos celulares, pueden llevar a un efecto directo sobre la transcripción y expresión de la eNOS. Las estatinas que ya han sido mencionadas son, sin embargo, las únicas sustancias de las que ha sido posible, hasta la fecha, demostrar tal aumento de la eNOS *in vivo* como un efecto secundario. En vista del intervalo conocido de efectos secundarios de esta clase

de sustancias, sin embargo, no está claro hasta dónde está presente este efecto en una dosis toxicológicamente no problemática.

Liso *et al.*, reivindican en los documentos WO 99/47153 y WO 00/03746 el uso de los inhibidores de la rhoGTP-asa y de los agentes que influyen en la organización del citoesqueleto de la actina para aumentar la eNOS en las células endoteliales y para la terapia de diferentes trastornos tales como, por ejemplo, los ictus o la hipertensión pulmonar, sin que indiquen, sin embargo, un modo específico para conseguir esto.

Por tanto, existe una gran necesidad de un medicamento que regule por aumento la expresión de la eNOS en las células endoteliales. El objetivo de la presente invención es proporcionar un compuesto que presente esta capacidad.

Este objetivo se consigue por el uso de la 4-fluoro-N-indan-2-il-benzamida según la fórmula (I)



(I)

que estimula la expresión de la NO-sintasa endotelial, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de angina de pecho estable o inestable, cardiopatía isquémica, angina de Prinzmetal, síndrome coronario agudo, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, trombosis, enfermedad oclusiva de las arterias periféricas, aterosclerosis, restenosis, daños endoteliales después de PTCA, hipertensión, hipertensión esencial, hipertensión pulmonar, hipertensión secundaria, hipertensión renovascular, glomerulonefritis crónica, disfunción eréctil, arritmia ventricular, diabetes, nefropatía, retinopatía, angiogénesis, asma bronquial, insuficiencia renal crónica, cirrosis hepática u osteoporosis, o para la reducción del riesgo cardiovascular de las mujeres posmenopáusicas o después de la toma de anticonceptivos, así como por un procedimiento para la fabricación de un medicamento de este tipo, que comprende llevar una 4-fluoro-N-indan-2-il-benzamida de acuerdo con la fórmula (I), junto con una o más sustancias de soporte y/o aditivos farmacéuticos, sólidos o líquidos y, si se desea, en combinación con otros compuestos farmacéuticamente activos, a una forma de administración o forma de dosificación adecuada. La presente invención incluye, además, el uso de todos los solvatos del compuesto de acuerdo con la fórmula (I), por ejemplo hidratos y aductos con alcoholes.

El documento WO 00/51970 describe la fabricación y el uso de 4-fluoro-N-indan-2-il-benzamida como un medicamento. El compuesto tiene una fuerte capacidad de potenciación de la actividad colinérgica, y es útil para el tratamiento y/o prevención de trastornos del sistema nervioso central en los mamíferos, y más particularmente de la amnesia, demencia, por ejemplo demencia senil, demencia de Alzheimer, demencia asociada con diferentes enfermedades tales como la demencia cerebrovascular, demencia cerebral post-traumática, demencia debida a un tumor cerebral, demencia debida a hematoma subdural crónico, demencia debida a hidrocefalia normotensa, demencia post-meningitis, demencia del tipo enfermedad de Parkinson, y similares. Es de esperar que el compuesto sea útil como agente terapéutico y/o preventivo para la esquizofrenia, depresión, ictus, lesiones cerebrales, abandono de la nicotina, lesión de la médula espinal, ansiedad, polialquiuria, incontinencia de orina, distrofia miotónica, trastorno de hiperactividad con déficit de atención, excesiva somnolencia durante el día (narcolepsia), enfermedad de Parkinson o autismo. El documento WO 00/51970 no describe ni sugiere el uso de la 4-fluoro-N-indan-2-il-benzamida para la regulación por aumento de la expresión de la NO-sintasa endotelial, en particular para el tratamiento de angina de pecho estable o inestable, cardiopatía isquémica, angina de Prinzmetal, síndrome coronario agudo, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, trombosis, enfermedad oclusiva de las arterias periféricas, aterosclerosis, restenosis, daños endoteliales después de PTCA, hipertensión, hipertensión esencial, hipertensión pulmonar, hipertensión secundaria, hipertensión renovascular, glomerulonefritis crónica, disfunción eréctil, arritmia ventricular, diabetes, nefropatía, retinopatía, angiogénesis, asma bronquial, insuficiencia renal crónica, cirrosis hepática u osteoporosis, o para la reducción del riesgo cardiovascular de las mujeres posmenopáusicas o después de la toma de anticonceptivos.

El compuesto según la fórmula (I) puede ser preparado partiendo de 2-indanilamina que es conocida en la bibliografía. Se puede hacer reaccionar la 2-indanilamina, en forma de base libre o una de sus sales, con cloruro de 4-fluorobenzoilo en presencia de una base como, por ejemplo, trietilamina. La reacción se lleva a cabo generalmente en un disolvente como diclorometano, tetrahidrofurano, tolueno o dioxano, y preferiblemente a temperatura ambiente. Alternativamente, el compuesto según la fórmula (I) se obtiene por una reacción de acoplamiento de dicha 2-indanilamina con ácido 4-fluorobenzoico, en presencia de una base como, por ejemplo, diisopropililamina, y el uso de un reactivo de acoplamiento apropiado como, por ejemplo, carbodiimidias, HATU o TOTU.

Reacciones adicionales para la síntesis del compuesto según la fórmula (I) son evidentes o bien conocidas por los expertos y se pueden llevar a cabo en condiciones estándar de forma análoga o según procedimientos descritos en la bibliografía, por ejemplo, en Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie (Methods of Organic Chemistry), Thieme-Verlag, Stuttgart, o Organic Reactions, John Wiley & Sons, New York. Si se desea, el compuesto de la fórmula

ES 2 274 025 T3

(I) se puede purificar por procedimientos habituales de purificación, por ejemplo, por recristalización o cromatografía. Los compuestos de partida para la preparación del compuesto de la fórmula (I) están comercialmente disponibles o se pueden preparar de forma análoga o según procedimientos descritos en la bibliografía.

5 El compuesto según la fórmula (I) se puede usar para regular por aumento la expresión de la NO-sintasa endotelial y es un compuesto farmacéutico útil para el tratamiento de diferentes enfermedades. En el contexto de la presente invención, el tratamiento incluye la terapia así como la profilaxis de las respectivas enfermedades.

10 Enfermedades que se pueden tratar con el compuesto (I) según la presente invención incluyen enfermedades cardiovasculares seleccionadas del grupo que consiste en angina de pecho estable e inestable, cardiopatía isquémica, angina de Prinzmetal (espasmo), síndrome coronario agudo, insuficiencia cardiaca, infarto de miocardio, trombosis, enfermedad oclusiva de las arterias periféricas (PAOD), aterosclerosis, restenosis, daños endoteliales después de PT-CA, hipertensión que incluye la hipertensión esencial, hipertensión pulmonar e hipertensión secundaria (hipertensión renovascular, glomerulonefritis crónica), disfunción eréctil y arritmia ventricular, y la reducción del riesgo cardiovascular de las mujeres posmenopáusicas o después de la toma de anticonceptivos.

20 El compuesto (I) se puede usar adicionalmente en la terapia y profilaxis de la diabetes, nefropatía (complicaciones de la diabetes), retinopatía (complicaciones de la diabetes), angiogénesis, asma bronquial, insuficiencia renal crónica, cirrosis hepática u osteoporosis.

Las indicaciones preferidas son angina de pecho estable, cardiopatía isquémica, hipertensión y aterosclerosis.

25 El compuesto según la fórmula (I) se puede usar también en combinación con otros compuestos farmacéuticamente activos, preferiblemente compuestos que son capaces de mejorar el efecto del compuesto según la fórmula (I). Ejemplos de tales compuestos incluyen: estatinas; inhibidores de la ACE; antagonistas de AT1; inhibidores de la argininas; inhibidores de PDE V; antagonistas del calcio; alfa-bloqueantes; beta-bloqueantes; metimazol y compuestos análogos; arginina; tetrahidrobiopterina; vitaminas, en particular la vitamina C y vitamina B6; niacina.

30 El compuesto (I), opcionalmente en combinación con otros compuestos farmacéuticamente activos, se puede administrar a animales, preferiblemente a los mamíferos, y en particular a los humanos, como un producto farmacéutico propiamente dicho o en forma de preparaciones farmacéuticas (o composiciones farmacéuticas) que comprenden una dosis efectiva del compuesto de la fórmula (I) y excipientes farmacéuticamente aceptables, esto es una o más sustancias excipientes y/o aditivos farmacéuticamente aceptables. Dicha preparación farmacéutica se usa para estimular la expresión de la NO-sintasa endotelial y en particular como un medicamento para la terapia y profilaxis de los síndromes mencionados antes.

40 El producto farmacéutico utilizado según la invención se puede administrar oralmente, por ejemplo, en forma de píldoras, comprimidos, comprimidos con película, comprimidos recubiertos con azúcar, gránulos, cápsulas de gelatina dura y blanda, soluciones acuosas, alcohólicas u oleosas, jarabes, emulsiones o suspensiones, o rectalmente, por ejemplo en forma de supositorios. La administración también se puede realizar parenteralmente, por ejemplo subcutáneamente, intramuscularmente o intravenosamente en forma de soluciones para inyección o infusión. Otras formas de administración adecuadas son, por ejemplo, la administración percutánea o tópica, por ejemplo en forma de pomadas, tinturas, pulverizaciones o sistemas terapéuticos transdérmicos, o la administración inhalativa en forma de pulverizaciones nasales o mezclas en aerosol, o por ejemplo, microcápsulas, implantes o bastoncillos. La forma de administración preferida depende, por ejemplo, de la enfermedad a ser tratada y de su gravedad.

45 La cantidad del compuesto de la fórmula (I) en las preparaciones farmacéuticas normalmente varía de 0,2 a 800 mg, preferiblemente de 0,5 a 500 mg, en particular de 1 a 200 mg por dosis, pero dependiendo del tipo de preparación farmacéutica también puede ser más alta. Las preparaciones farmacéuticas usualmente comprenden de 0,5 a 90 por ciento en peso del compuesto de la fórmula (I). La elaboración de las preparaciones farmacéuticas se puede realizar de una manera conocida *per se*. A este fin, el compuesto de la fórmula (I) junto con una o más sustancias excipientes farmacéuticos sólidos o líquidos y/o aditivos (o sustancias auxiliares) y, si se desea, en combinación con otros compuestos farmacéuticamente activos que tienen acción terapéutica o profiláctica, se preparan en una forma de administración o forma farmacéutica adecuada que después se puede usar como un producto farmacéutico en medicina humana o veterinaria.

60 Para la producción de píldoras, comprimidos, comprimidos recubiertos con azúcar y cápsulas de gelatina dura, es posible usar, por ejemplo, lactosa, almidón, por ejemplo almidón de maíz, o derivados de almidón, talco, ácido esteárico o sus sales, etc. Los excipientes para las cápsulas de gelatina blanda y los supositorios son, por ejemplo, grasas, ceras, polioles semisólidos y líquidos, aceites naturales o endurecidos, etc. Los excipientes adecuados para la preparación de soluciones, por ejemplo, de soluciones inyectables, o de emulsiones o jarabes, son por ejemplo, agua, solución fisiológica de cloruro de sodio, alcoholes tales como etanol, glicerol, polioles, sacarosa, azúcar invertido, glucosa, manitol, aceites vegetales, etc. Es posible también liofilizar el compuesto de la fórmula (I) y utilizar los liofilizados resultantes, por ejemplo, para elaborar preparaciones para inyección o infusión. Los excipientes adecuados para microcápsulas, implantes o bastoncillos, son por ejemplo, copolímeros de ácido glicólico y ácido láctico.

65 Además del compuesto (I) y excipientes, las preparaciones farmacéuticas pueden contener también aditivos, por ejemplo agentes de carga, desintegrantes, aglutinantes, lubricantes, agentes humectantes, estabilizantes, emulsifi-

cantes, dispersantes, conservantes, edulcorantes, colorantes, aromatizantes, espesantes, diluyentes, sustancias tampón, disolventes, solubilizantes, agentes para conseguir un efecto prolongado, sales para alterar la presión osmótica, agentes de recubrimiento o antioxidantes.

5 La dosis del compuesto de la fórmula (I) a ser administrada depende de cada caso individual y, como es habitual, tiene que ser adaptada a las circunstancias individuales para conseguir un efecto óptimo. Por tanto, depende de la naturaleza y gravedad del trastorno a ser tratado, y también del sexo, edad, peso y respuesta individual del ser humano o animal a ser tratado, de la duración de acción del compuesto (I), de si la terapia es aguda o crónica o profiláctica, o de si se administran otros compuestos activos además del compuesto de la fórmula (I). En general, una dosis diaria
10 de aproximadamente 0,01 a 100 mg/kg, preferiblemente de 0,1 a 10 mg/kg, en particular de 0,3 a 5 mg/kg (en cada caso mg por kg de peso corporal) es apropiada para la administración a un adulto de aproximadamente 75 kg de peso para obtener los resultados deseados. La dosis diaria se puede administrar en una dosis única o, en particular cuando se administran cantidades más grandes se puede dividir en varias, por ejemplo dos, tres o cuatro dosis individuales. En algunos casos, dependiendo de la respuesta individual, puede ser necesario desviarse hacia arriba o hacia abajo de la
15 dosis diaria dada.

Los compuestos según la fórmula (I) se pueden usar también para otros propósitos distintos de los indicados anteriormente. Ejemplos no limitantes incluyen fines de diagnóstico, el uso como dispositivos bioquímicos, y como intermedios para la preparación de compuestos adicionales, por ejemplo, compuestos farmacéuticamente activos.

20 La presente invención se ilustrará ahora con el siguiente ejemplo:

Ejemplo

25 *Preparación de 4-fluoro-N-indan-2-il-benzamida*

Se mezclaron 43,70 g (258 mol) de hidrocloreuro de 2-aminoindano y 53,43 g (528 mmol) de trietilamina con 250 ml de tetrahidrofurano, se añadieron 42,89 g (270 mmol) de cloruro de 4-fluorobenzoilo, y se agitó la mezcla durante 2 h a temperatura ambiente.

30 La mezcla resultante se vertió entonces sobre una mezcla de hielo/HCl, se filtró el precipitado obtenido, se lavó con una solución de NaHCO₃ y agua y se secó en vacío. El producto crudo se cristalizó en metanol. Se obtuvieron 47,8 g (73%) de un producto blanco cristalino.

35 Punto de fusión: 167°C.

MS: M+H⁺: 256,1

40 ¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 2,96 (dd, 2H, H1/H3), 3,25 (dd, 2H, H3/H1), 4,70 (sexteto, 1H, H2), 7,12-7,19 (m, 2H, H4,7/5,6), 7,20-7,28 (m, 2H, H5,6/4,7), 7,30 (t, 2H, H3',5'), 7,95 (dd, 2H, H2',6'), 8,68 (d, 1H, NH).

Medida de la activación de la transcripción de la eNOS

45 La activación de la transcripción de la eNOS se midió como se describe en detalle en Li *et al.*, "Activation of protein kinase C alpha and/or epsilon enhances transcription of the human endothelial nitric oxide synthase gene", Mol. Pharmacol. 1998; 53: 630-637.

50 Brevemente, un fragmento 5' de una longitud de 3,5 kB del codón inicial del gen de eNOS fue clonado, secuenciado y clonado en plásmidos de expresión de la luciferasa de luciérnaga para verificar la activación del promotor de la eNOS por la actividad del gen indicador. Para el ensayo del compuesto se usó una línea de células endoteliales humanas estable, transfectada, y que expresa esta estructura artificial de promotor-indicador. Las células se incubaron durante 18 h con el compuesto (I).

55 Previamente se disolvió el compuesto en DMSO estéril. Se dejó una concentración final de 0,5% de DMSO en medio completo. Se midió la inducción de la expresión del gen indicador en estas células usando un sistema estándar de ensayo de la luciferasa (Promega, Cat. No E150) según las instrucciones del fabricante. La inducción de la luciferasa en las células incubadas con el compuesto (I) se comparó con la de las células incubadas con disolvente solo. La relación de ambas actividades (relación transcripción-inducción, TIR) se representó como una función de la concentración del compuesto. Típicamente, los valores TIR empezaron a concentraciones bajas en una relación de 1, lo que indica que no
60 hay ningún efecto del compuesto, y se extendieron hasta un valor máximo de TIR, TIR(max) que indica el incremento de la transcripción de la eNOS. Los valores EC₅₀ de las relaciones transcripción-inducción como una función de la concentración del compuesto, se determinaron gráficamente.

65 El efecto del compuesto (I) sobre la transcripción de la eNOS se confirmó en un segundo ensayo basado en la detección de la proteína eNOS. Se aislaron y se cultivaron siguiendo procedimientos estándar las células primarias endoteliales de la vena del cordón umbilical humano (HUVEC). Se incubaron las células con el compuesto (I) durante 18 h y se determinó el efecto sobre la expresión de la proteína eNOS por medio de un procedimiento cuantitativo de transferencia Western. Después de la incubación del compuesto (I), se lisaron las HUVEC en una

ES 2 274 025 T3

solución tampón de lisis enfriada en hielo que contiene Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, 1% de SDS e inhibidores de la proteasa. Se sometió el lisado a una electroforesis estándar en gel de poliacrilamida desnaturante y se transfirió a membranas de nitrocelulosa. Usando un anticuerpo monoclonal específico primario (Transduction Laboratories, UK) y un anticuerpo secundario marcado con fosfatasa alcalina (Jackson Labs), se observó una pista específica de la proteína eNOS y se cuantificó basándose en un método de detección por quimiofluorescencia.

Para el compuesto (I), el valor de EC_{50} fue $0,8 \mu\text{M}$ y el valor de TIR(max) fue 4,10.

Modelos animales

10

Todos los experimentos en animales se realizaron de acuerdo con la ley alemana de protección a los animales y con las directrices para la utilización de animales de experimentación dadas por la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the US National Institutes of Health.

15 Animales y tratamiento (experimentos A-C)

Se utilizaron ratones deficientes en apolipoproteína E (ApoE) y en eNOS (antecedentes C57BL/6J, Jackson Laboratory, Bar Harbor, Me). Todos los animales tenían 10-12 semanas de edad y pesaban de 22 a 28 g. Tres días antes de la cirugía se dividieron los ratones en 4 grupos (apoE testigo, $n = 10-12$; apoE con el compuesto (I), $n = 10-12$; eNOS testigo, $n = 10-12$; eNOS con el compuesto (I), $n = 10-12$) y recibieron o un alimento estándar para roedores (que contiene 4% de grasa y 0,001% de colesterol; en el siguiente grupo denominado grupo placebo) o un alimento estándar para roedores + compuesto (I) (10 o 30 mg/kg/día/p.o.).

25 A. Efecto antihipertensivo en ratones con falta de ApoE

Se determinó la presión sanguínea en ratones conscientes usando un sistema, regido por ordenador, de manguito en la cola.

Para el compuesto (I), después de 4 meses de tratamiento de los ratones deficientes en ApoE, la presión sanguínea se redujo significativamente ($p < 0,05$) en el grupo de 30 mg/kg/día en comparación con el tratamiento placebo (92 ± 5 mm de Hg frente a 115 ± 2 mm de Hg). No se pudo observar ninguna reducción de la presión sanguínea a dosis similares en los ratones deficientes en eNOS después de 4 semanas de tratamiento.

35 B. Inhibición de la formación de la neointima y aterogénesis (manguito en la arteria femoral)

Después de 3 días de tratamiento de los ratones deficientes en ApoE con el compuesto (I) (10 mg/kg/día prensado en el pienso), se anestesiaron los animales con una inyección intraperitoneal de pentobarbital (60 mg/kg) seguida por una inyección intramuscular de xilazina (2 mg/kg) y se colocó un manguito alrededor de la arteria femoral como se describe en Moroi *et al.*, (J. Clin. Invest. 101: 1225-32, 1998). Brevemente, se disecó la arteria femoral izquierda. Se colocó alrededor de la arteria un manguito no oclusivo de polietileno de 2,0 mm hecho con tubo de PE-50 (diámetro interior 0,56 mm, diámetro exterior 0,965 mm, Becton Dickinson, Mountain View, Ca) y se sujetó en el sitio con dos suturas 7-0. Se aisló la arteria femoral derecha de los tejidos circundantes pero no se colocó ningún manguito. Se continuó el tratamiento con el compuesto (I) durante 14 días después de la cirugía. A continuación se sacrificaron los animales. Se tomaron las aortas para la determinación de la expresión de la eNOS vascular por medio de análisis cuantitativo de transferencia Western. Se recogieron ambas arterias femorales, se fijaron en formalina y se incluyeron en parafina. Se cortaron 20 secciones transversales ($10 \mu\text{m}$) de la porción con manguito de la arteria femoral izquierda y del correspondiente segmento de la arteria derecha. Se sometieron las secciones a una tinción estándar con hematoxilina y eosina. Se realizaron análisis morfométricos usando un programa de ordenador para análisis por la imagen (LeicaQWin, Leica Imaging Systems, Cambridge, GB). En cada sección transversal se determinaron las áreas del lumen, de la neointima y de la media. A este fin, se definió la neointima como el área entre el lumen y la lámina elástica interna y se definió la media como el área entre la lámina elástica interna y la externa. La relación entre el área de la neointima y el área de la media se expresó como la relación neointima/media.

El compuesto (I) dividió por un factor de 2 la formación con adaptación insuficiente de la neointima, disminuyendo la relación de la neointima a la media desde $0,39 \pm 0,07$ en el grupo placebo hasta $0,170 \pm 0,04$ en el grupo del compuesto. En paralelo, se multiplicó por un factor de 2,1 la expresión de la eNOS vascular. No se pudo demostrar ningún efecto del compuesto (I) en circunstancias similares usando ratones deficientes en eNOS en lugar de ratones con falta de ApoE.

60 C. Prevención de la formación de la placa aterosclerótica en el tratamiento crónico

Los ratones deficientes en ApoE se trataron durante 16 semanas con el compuesto (I) prensado en el pienso y finalmente se sacrificaron. Se separaron las aortas de cada ratón, se fijaron en formalina y se incluyeron en parafina. Se midió la formación de la placa a través de la formación de lesiones lipídicas en las aortas (desde el arco aórtico hasta el diafragma) y se analizó por tinción con rojo O en aceite. Para cuantificar el efecto del compuesto respectivo sobre la expresión de la eNOS vascular se usaron las arterias femorales en este experimento.

ES 2 274 025 T3

El compuesto (I) según la presente invención redujo significativamente la formación de placa ($5,2 \pm 1\%$ frente a $13,3 \pm 2,6$ del grupo placebo, valores dados en el tamaño global de la placa como % de la superficie total). Se encontró que la expresión de la eNOS vascular había aumentado 1,75 veces en el grupo de tratamiento.

5 D. Mejora de la función coronaria en ratones enfermos deficientes en ApoE

Se utilizaron en los experimentos ratones viejos machos naturales C57BL/6J, (Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld), y ratones deficientes en ApoE (antecedentes C57BL/6J, Jackson Laboratory, Bar Harbor, Me) de 6 meses de edad y con un peso de 28 a 36 g. Se dividieron los ratones en 3 grupos (C57BL/6, n = 8; apoE testigo, n = 8; apoE
10 con el compuesto (I), n = 8) y recibieron durante 8 semanas o un alimento estándar para roedores (que contiene 4% de grasa y 0,001% de colesterol) o un alimento estándar para roedores + compuesto (I) (30 mg/kg/día/p.o.).

Se anestesiaron los ratones con pentobarbitona de sodio (100 mg/kg, i.p.), y se extirparon rápidamente los corazones y se pusieron en una solución tampón para perfusión enfriada en hielo. Se canuló la aorta y se conectó a un aparato
15 de perfusión (HUGO SACHS ELECTRONICS, Freiburg, Alemania) que se puso inmediatamente en funcionamiento a una presión constante de perfusión de 60 mm de Hg. Se perfundieron los corazones de una forma retrógrada con solución tampón de bicarbonato de Krebs modificada, equilibrada con 95% de O₂ y 5% de CO₂ y mantenida a 37,5°C.

Se pasó un pequeño tubo (PE 50) biselado a lo largo de una vena pulmonar hasta el ventrículo izquierdo y se
20 arrastró el mismo a lo largo de la pared ventricular, se ancló en el vértice por un extremo acanalado, y se conectó a una punta de un micromanómetro (Millar 1,4 French). La aurícula izquierda se canuló a través de la misma vena pulmonar y se cambió el corazón al modo de trabajo con una presión constante de precarga de 10 mm de Hg y una presión después de carga de 60 mm de Hg. El caudal aórtico de salida y el caudal auricular de entrada se midieron continuamente usando sondas ultrasónicas de caudal (HSE/Transonic Systems Inc.). El caudal coronario se calculó
25 como la diferencia entre el caudal auricular y el caudal aórtico. Todos los datos hemodinámicos se digitalizaron a una velocidad de muestreo de 1000 Hz y se registraron con un PC utilizando un programa informático especializado (HEM, Notocord).

Se dejaron estabilizar los corazones durante 30 min. Todos los datos hemodinámicos funcionales se midieron
30 durante el estado de equilibrio, y durante la carga de volumen y presión.

Las curvas de la función ventricular izquierda se construyeron variando la presión de pre-carga. Para la adquisición de las curvas de pre-carga, se fijó la post-carga a 60 mm de Hg y la pre-carga se ajustó a pasos de 5 mm de Hg a lo largo de un intervalo de 5 a 25 mm de Hg. Se dejaron estabilizar los corazones en las condiciones de la línea base entre
35 la carga de presión y volumen.

Los corazones aislados de los animales deficientes en ApoE presentaron un caudal coronario más bajo en estas circunstancias en comparación con los ratones naturales C57B16 (3,6 ml/min frente a 4,95 ml/min). El tratamiento de los animales deficientes en ApoE con el compuesto (I) según la presente invención aumentó el caudal coronario hasta 5 ml/min comparable a los niveles de los ratones naturales no enfermos. El compuesto (I) mejoró también el caudal coronario dependiente de la precarga y redujo la incidencia de las arritmias ventriculares como un indicador de la eficacia anti-isquémica.

45

50

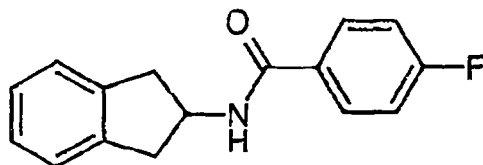
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. El uso de 4-fluoro-N-indan-2-il-benzamida según la fórmula (I)



(I)

para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de angina de pecho estable o inestable, cardiopatía isquémica, angina de Prinzmetal, síndrome coronario agudo, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, trombosis, enfermedad oclusiva de las arterias periféricas, aterosclerosis, restenosis, daños endoteliales después de PTCA, hipertensión, hipertensión esencial, hipertensión pulmonar, hipertensión secundaria, hipertensión renovascular, glomerulonefritis crónica, disfunción eréctil, arritmia ventricular, diabetes, nefropatía, retinopatía, angiogénesis, asma bronquial, insuficiencia renal crónica, cirrosis hepática, osteoporosis u osteoporosis, o para la reducción del riesgo cardiovascular de las mujeres posmenopáusicas o después de la toma de anticonceptivos.

2. El uso según la reivindicación 1, en el que el medicamento es para el tratamiento de angina de pecho inestable, síndrome coronario agudo, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, trombosis, enfermedad oclusiva de las arterias periféricas, restenosis o daños endoteliales después de PTCA.

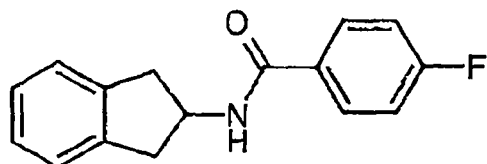
3. El uso según la reivindicación 1, en el que el medicamento es para el tratamiento de la hipertensión, angina de pecho estable o aterosclerosis.

4. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3, en el que el medicamento es para el tratamiento de la cardiopatía isquémica.

5. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que el medicamento es para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca.

6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el medicamento está en la forma de una píldora, comprimido, comprimido con película, comprimido recubierto con azúcar, gránulo, cápsula de gelatina dura y blanda, solución acuosa, alcohólica u oleosa, jarabe, emulsión o suspensión, supositorio, solución para inyección o infusión, pomada, tintura, pulverización, sistema terapéutico transdérmico, pulverización nasal, mezcla en aerosol, microcápsulas, implantes o bastoncillos.

7. Un procedimiento para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de angina de pecho estable o inestable, cardiopatía isquémica, angina de Prinzmetal, síndrome coronario agudo, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, trombosis, enfermedad oclusiva de las arterias periféricas, aterosclerosis, restenosis, daños endoteliales después de PTCA, hipertensión, hipertensión esencial, hipertensión pulmonar, hipertensión secundaria, hipertensión renovascular, glomerulonefritis crónica, disfunción eréctil, arritmia ventricular, diabetes, nefropatía, retinopatía, angiogénesis, asma bronquial, insuficiencia renal crónica, cirrosis hepática u osteoporosis, o para la reducción del riesgo cardiovascular de las mujeres posmenopáusicas o después de la toma de anticonceptivos, que comprende llevar 4-fluoro-N-indan-2-il-benzamida de acuerdo con la fórmula (I),



(I)

junto con una o más sustancias de soporte y/o aditivos farmacéuticos, sólidos o líquidos y, si se desea, en combinación con otros compuestos farmacéuticamente activos, a una forma de administración o forma de dosificación adecuada.

8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que el medicamento es para el tratamiento de angina de pecho inestable, síndrome coronario agudo, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, trombosis, enfermedad oclusiva de las arterias periféricas, restenosis o daños endoteliales después de PTCA.

9. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que el medicamento es para el tratamiento de la hipertensión, angina de pecho estable o aterosclerosis.

ES 2 274 025 T3

10. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 y 9, en el que el medicamento es para el tratamiento de la cardiopatía isquémica.

5 11. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8, en el que el medicamento es para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca.

10 12. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en el que el medicamento está en la forma de una píldora, comprimido, comprimido con película, comprimido recubierto con azúcar, gránulo, cápsula de gelatina dura y blanda, solución acuosa, alcohólica u oleosa, jarabe, emulsión o suspensión, supositorio, solución para inyección o infusión, pomada, tintura, pulverización, sistema terapéutico transdérmico, pulverización nasal, mezcla en aerosol, microcápsulas, implantes o bastoncillos.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65