



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 341 958**

51 Int. Cl.:
C07C 225/00 (2006.01)
C07C 67/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04744907 .9**
96 Fecha de presentación : **24.06.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1644316**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.04.2006**

54 Título: **Derivados de 2-aminobenzoílo.**

30 Prioridad: **26.06.2003 IL 156669**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.06.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.06.2010

73 Titular/es:
NEURIM PHARMACEUTICALS (1991) LIMITED
8 Hanechosht Street
Tel Aviv 69710, IL

72 Inventor/es: **Zisapel, Nava;**
Laudon, Moshe y
Daily, Dvorah

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 341 958 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

Derivados de 2-aminobenzofilo.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a derivados novedosos de 2-aminobenzofilo, formulaciones farmacéuticas que los contienen, y al uso de los compuestos en la fabricación de medicamentos para tratar o prevenir diversas enfermedades.

10 **Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere de forma general a compuestos novedosos, su uso en terapia, y a formulaciones farmacéuticas que los contienen.

15 El aminoácido triptófano se convierte biológicamente a través de la "ruta de la kinurenina" (Beadle, G. W., Mitchell, H. K., y Nyc, J. F., Proc. Nat. Acad. Sci., 33,155 (1948); véase Charles Heidelberger, Mary E. Guilberg, Agnes Fay Morgan, y Samuel Lepkovsky TRYPTOPHAN METABOLISM. I. CONCERNING THE MECHANISM OF THE MAMMALIAN CONVERSION OF TRYPTOPHAN INTO KYNURENINE, KYNURENIC ACID, AND NICOTINIC ACID. J. Biol. Chem. (1949) 179: 143-150). Más del 95% de todo el triptófano alimentario se metaboliza a kinureninas (Wolf, H. - Studies on tryptophan metabolism in man. Scand J Clin Lab Invest 136 (supl.): 1-186,1974). En los tejidos periféricos, en particular en el hígado, el anillo indol del triptófano es modificado o bien por la triptófano dioxigenasa o por la indolamina 2,3-dioxigenasa, formando formilkinurenina. Posteriormente, la kinurenina formilasa convierte rápidamente la formilkinurenina en L-kinurenina, que es el compuesto clave en la ruta de la kinurenina (W, Eugene Knox y Alan H. Mehler THE CONVERSION OF TRYPTOPHAN TO KYNURENINE IN LIVER. I. THE COUPLED TRYPTOPHAN PEROXIDASE-OXIDASE SYSTEM FORMING FORMYLKYNURENINE J. Biol. Chem. (1950) 187: 419-430). La L-kinurenina está presente a bajas concentraciones en la sangre, el cerebro y en los órganos periféricos y puede atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica mediante el transportador aminoacídico neutro grande. La L-kinurenina es metabolizada por tres enzimas diferentes en los tejidos mamíferos: kinurenina 3-hidroxilasa que forma 3-hidroxikinurenina (3-HK); la kinureninasa que forma ácido antranílico y la kinurenina aminotransferasa (KAT) que cataliza la formación de ácido kinurénico. La 3-HK es metabolizada por la misma KAT proporcionando ácido xanturénico, un subproducto metabólicamente inerte de la ruta, o por la kinureninasa para dar ácido 3-hidroxiantranílico, que finalmente se convierte en ácido quinolínico. Finalmente, el ácido quinolínico es metabolizado por la ácido quinolínico fosforribosiltransferasa, formando un mononucleótido de ácido nicotínico y los posteriores productos de degradación que incluyen el producto final NAD⁺. 35 El ácido kinurénico, la 3-hidroxikinurenina y el ácido quinolínico son todos intermedios neuroactivos de esta cascada catabólica. La 3-hidroxikinurenina es un generador de radicales libres, que se ha demostrado que provoca inducción de apoptosis, potenciación de excitotoxicidad, formación de cataratas, enfermedades neurodegenerativas, ictus, lesión traumática, enfermedades neurovíricas y neuroinflamación. El ácido quinolínico es un agonista del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) y generador de radicales libres y, como tal, puede provocar excitotoxicidad, enfermedades neurodegenerativas, ictus, lesión cerebral por traumatismo, epilepsia, malaria cerebral, hipoxia perinatal, enfermedades neurovíricas y neuroinflamación. El ácido quinolínico endógeno puede provocar activación del receptor de NMDA promoviendo excitotoxicidad y neurotoxicidad que desencadenan procesos fisiológicos y patológicos mediados por los receptores de NMDA. De entre las kinureninas neuroactivas, es el ácido kinurénico (KYNA) el que ha recibido más atención recientemente. Inicialmente catalogado como compuesto neuroinhibidor hace dos décadas, el KYNA, 45 a concentraciones elevadas no fisiológicas es un antagonista de amplio espectro de los receptores de glutamato ionotrópicos. Las concentraciones elevadas de KYNA son anticonvulsiantes y proporcionan una excelente protección contra lesiones excitotóxicas. A concentraciones mucho menores, el KYNA actúa como bloqueante competitivo del sitio coagonista de la glicina del receptor de NMDA y como inhibidor no competitivo del receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$. El hecho de que la afinidad de KYNA por estos dos receptores permeables a Ca^{2+} esté comprendida en el intervalo de los niveles de KYNA en el cerebro humano y razonablemente próximos al (menor) contenido en KYNA del cerebro de roedor apunta a una función fisiológica en la neurotransmisión glutamatérgica y colinérgica. Se han encontrado indicios que respaldan directamente dicho papel, por ejemplo, en los estudios in vivo del núcleo estriado de rata en el que una reducción en los niveles de KYNA potencia la vulnerabilidad a la agresión excitotóxica y, a la inversa, un pequeño aumento de KYNA inhibe la liberación de glutamato (Schwarcz R, Pellicciari R. Manipulation of 55 brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. J Pharmacol Exp Ther. 2002: 303; 1-10).

Dado que se ha insinuado que las kinureninas no solo participan en la patofisiología de los trastornos neurodegenerativos y en los ataques epilépticos, sino que también desempeñan su papel en un gran número de enfermedades del SNC de diversa etiología, es importante modular su formación. Los presentes inventores proponen que los derivados 60 de 2-aminobenzofilo (compuestos de tipo kinurenina) que se describen en el presente documento serán útiles para dicha intervención terapéutica. El mecanismo de acción sugerido podría ser, pero sin limitación, inhibir enzimas de la ruta de la kinurenina, y/o inhibir los compuestos intermedios, y/o inhibir la formación de radicales libres.

65 **Técnica anterior citada**

Los siguientes compuestos se describieron en los documentos indicados citados por la EPO en la tramitación de la presente solicitud de patente:

clorhidrato de 4'-5'-dimetoxi-2',3'-diaminopropiofenona (D1: documento US-A-4. 018823) del que se dice posee actividad hipotensora; DL-5-bromokinuremina y 4-clorokinuremina (D3: Schwarcz R. et al.: Manipulation of brain kynurenine: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities". Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics". Vol. 303, n.º 1, 2002, páginas 1-10., XP002398242) de los que se indica son inhibidores de KAT II;

5 5-hidroxi-kinurenina (D17: Base de datos Beilstein Beilstein GmbH; XP002398270) del que se indica que tiene una afinidad intrínseca por el receptor D y que es un agonista de 5-HT; 1-β-(1-fenil-1-hidroxipropil-(2)-amino),2-β,β-dimetil-acrililamino)propiofenona (D26: documento DE2061864) del que se dice tiene actividad antiflogística, analgésica, antipirética, bronquiolítica, y cardiocirculatoria.

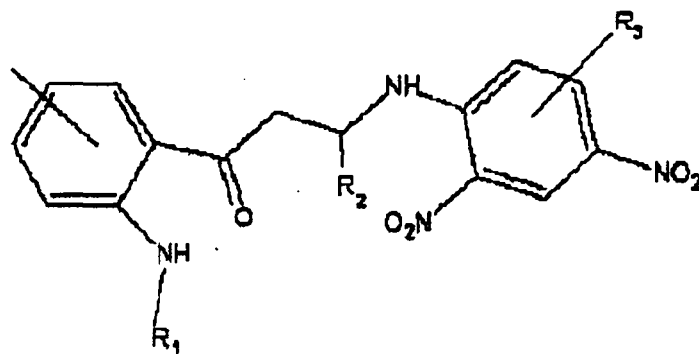
10 Los siguientes compuestos se encontraron en la Base de Datos Beilstein Beilstein GmbH, sin mencionar la actividad biológica: ácido 2-benzilamino-4-(2-formilaminofenil)-4-oxobutanóico (D4: XP002398257); éster metílico de N(3')-trifluoroacetamidokinuremina (D6: XP002398258); 2-(3-acetamino-3-carboxi-propionil)anilina (D6: XP002398259); ácido 2-acetilamino-4-(2-formilaminofenil)-4-oxobutírico (D7: XP002398260); N-(3-(2-amino-3-hidroxi-fenil)-3-oxopropil)acetamida (erebusinona) (D8: XP002398261); 3-hidroxikinuremina (D-10: XP002398263); ácido 2-benzil-

15 amino-4-(2-formilamino-fenil)-oxobutírico (D-11: XP002398264); TFA-kinuramina (D-12: XP002398265); 3-acetilamino-2'-formilaminopropiofenona (D-13: XP002398266); N-(2-(3-aminopropionil)-4-hidroxifenil)acetamida (D-14: XP002398267); 3-amino-(2-aminofenil)propanona (D-15: XP002398268); 2-acetamino-β-aminopropiofenona (D-16: XP002398269); dihidrobromuro de 3-amino-1-(2-amino-3-hidroxifenil)-propan-1-ona (D-18: XP002398272); 2-(3-bencilamino-propionil)anilina (D-19: XP002398273).

20 Además, en Back, W.: "Synthesis of o-acylamino-beta-aminopropiophenones. 4. Synthesis of primary Mannich bases. Archiv der Pharmazie und Berichte der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, 305(6), 448-55 CODEN: APBDAJ; ISSN: 0004-9425, 1978, XP008068823 (D-20) se describieron los siguientes compuestos, sin mencionar su actividad biológica. 2-acetamino-5-benziloxi-β-dimetilaminopropiofenona (XXVI); 2-acetamino-β-dibencilami-

30 Sumario de la invención

La invención se refiere en un aspecto a compuestos que tienen la fórmula (II)



(II)

y a sus estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables, en la que R es hidrógeno, metilo o metoxi, R₁ es hidrógeno o formilo, R₂ es hidrógeno o carboxilo, y R₃ es hidrógeno, halo, haloalquilo, arilo, un grupo heterocíclico, un grupo heteroarilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, arilalquenilo, arilalquinilo, hidroxialquilo, nitro, amino, ciano, cianamido, guanidina, amidino, acilamido, hidroxilo, tiol, aciloxi, azido, alcoxi, carboxi, carbonilamido, S-alquilo o alquiltiol.

60 "Arilo" en la presente memoria descriptiva y reivindicaciones quiere decir un radical monovalente derivado de un compuesto aromático por eliminación de un átomo de hidrógeno del núcleo aromático.

Los compuestos que tienen la fórmula (II) incluyen: N1-(2,4-dinitrofenil)-kinuramina, N1-(2,4-dinitrofenil)kinure-

65 La presente invención incluye en su alcance también las composiciones farmacéuticas que contienen como sustancia activa una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la fórmula (II) o una sal farmacéuticamente

aceptable del mismo así como cualquier isómero o mezcla de isómeros posible, englobados en la fórmula (II) junto con uno o más diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes, excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables de los que se usan convencionalmente en las formulaciones farmacéuticas y veterinarias. Las presentes formulaciones farmacéuticas pueden adaptarse para la administración a seres humanos y/o animales.

Los compuestos de la fórmula (II) son útiles para tratar y/o prevenir, y/o minimizar la pérdida neuronal asociada a ictus, isquemia, traumatismo del SNC, hipoglucemia e intervención quirúrgica, trastornos del SNC que incluyen enfermedades neurodegenerativas como por ejemplo enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson y síndrome de Down, para tratar o prevenir las consecuencias de la hiperestimulación de los aminoácidos excitatorios, trastornos psiquiátricos, por ejemplo, trastornos del sueño, epilepsia y otros trastornos que cursan con convulsiones, ansiedad, enfermedades psiquiátricas, psicosis, demencia senil, demencia multifarcto, dolor crónico (analgesia), glaucoma, retinitis por CMV, incontinencia urinaria y para inducir anestesia, así como potenciar la cognición, y prevenir la tolerancia a los opiáceos y los síntomas del síndrome de abstinencia.

Para mayor detalle o explicación, las afecciones que actualmente se piensa que podrían tratarse mediante la administración de los presentes compuestos, incluyen impotencia; trastornos cardiovasculares que incluyen hipertensión, prevención de la coagulación sanguínea, antiinflamación, neuropatía, trastornos cronobiológicos, por ejemplo, jet lag, trastornos del sueño circadianos como por ejemplo síndrome de la fase de sueño retrasada, problemas por el trabajo a turnos, y trastornos estacionales, por ejemplo trastorno afectivo estacional (SAD); indicaciones endocrinas, por ejemplo, anticoncepción e infertilidad, pubertad precoz, síndrome premenstrual, hiperprolactemia y déficit de hormona de crecimiento; enfermedades neoplásicas por ejemplo cáncer y otras enfermedades proliferativas (hiperplasia de próstata benigna y tumoral), trastornos del sistema inmunitario que incluyen SIDA, afecciones asociadas a la senescencia, enfermedades oftalmológicas, cefaleas en racimo, migraña, protección cutánea, estabilización de la diabetes y trastornos de subida de peso (leptina, obesidad), y como ayuda a la cría de animales, por ejemplo, regulación de la fertilidad, pubertad y color del pelaje.

Descripción detallada de la invención

La presente invención también incluye en su ámbito también las formulaciones farmacéuticas que contienen como sustancia activa una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo así como cualquier isómero o mezcla de isómeros posible, englobados en la fórmula (II) junto con uno o más diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes, excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables de los que se usan convencionalmente en las formulaciones farmacéuticas y veterinarias. Las presentes formulaciones farmacéuticas pueden adaptarse para la administración a seres humanos y/o animales.

La formulación farmacéutica de acuerdo con la invención preferentemente se caracteriza por al menos uno de los siguientes atributos:

(i) está adaptada a la administración oral, rectal, parenteral, transbucal, intrapulmonar (por ejemplo por inhalación) o transdérmica;

(ii) está en forma monodosis, comprendiendo cada monodosis una cantidad de dicho al menos un miembro incluida en el intervalo de 0,0025-1000 mg;

(iii) es una formulación de liberación controlada, en la que dicho al menos un miembro se libera a una velocidad controlada predeterminada.

Para la administración oral, las formulaciones farmacéuticas pueden utilizarse por ejemplo en forma de comprimidos, cápsulas, emulsiones, soluciones, jarabes o suspensiones. Para la administración parenteral, las formulaciones pueden utilizarse en forma de ampollas, o si no en forma de suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos acuosos u oleosos. La necesidad de agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión por supuesto tendrá en cuenta la solubilidad o no de los compuestos activos, en los vehículos que se usan en realizaciones particulares. Las formulaciones además pueden contener, por ejemplo conservantes y antioxidantes fisiológicamente compatibles. En las formulaciones para aplicación tópica, por ejemplo cremas, lociones o pastas, el ingrediente activo puede mezclarse con excipientes oleaginosos o emulsionantes convencionales.

La formulación farmacéutica puede utilizarse también en forma de supositorios con bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos. De forma alternativa, las formulaciones pueden prepararse en forma depot que liberará la formulación activa lentamente en el organismo, durante un periodo de tiempo previamente seleccionado. Además, los compuestos de la invención pueden administrarse usando sistemas de administración transbucales, intrapulmonares o transdérmicos.

También entran dentro del alcance de la presente invención las combinaciones de los compuestos de la fórmula I, así como sus sales con otros principios activos, especialmente otros neurolépticos, timolépticos, ansiolíticos, analgésicos, fármacos antiparkinson (fármacos dopaminérgicos y no dopaminérgicos) o similares.

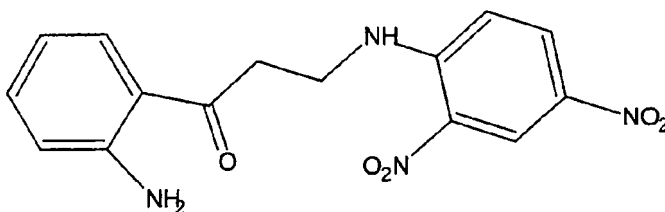
Los compuestos de la presente invención son útiles para tratar y/o prevenir, y/o minimizar la pérdida neuronal asociada a ictus, isquemia, traumatismo del SNC, hipoglucemia e intervención quirúrgica, trastornos del SNC que incluyen enfermedades neurodegenerativas como por ejemplo enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson y síndrome de Down, para tratar o prevenir las consecuencias de la hiperestimulación de los aminoácidos excitatorios, trastornos psiquiátricos, por ejemplo, trastornos del sueño, epilepsia y otros trastornos que cursan con convulsiones, ansiedad, enfermedades psiquiátricas, psicosis, demencia senil, demencia multifactorial, dolor crónico (analgesia), glaucoma, retinitis por CMV, incontinencia urinaria y para inducir anestesia, así como potenciar la cognición, y prevenir la tolerancia a los opiáceos y los síntomas del síndrome de abstinencia.

Para mayor detalle o explicación, las afecciones que actualmente se piensa que podrían tratarse mediante la administración de los presentes compuestos, incluyen impotencia; trastornos cardiovasculares que incluyen hipertensión, prevención de la coagulación sanguínea, antiinflamación, neuropatía, trastornos cronobiológicos, por ejemplo, jet lag, trastornos del sueño circadianos como por ejemplo síndrome de la fase de sueño retrasada, problemas por el trabajo a turnos, y trastornos estacionales, por ejemplo trastorno afectivo estacional (SAD); indicaciones endocrinas, por ejemplo, anticoncepción e infertilidad, pubertad precoz, síndrome premenstrual, hiperprolactemia y déficit de hormona de crecimiento; enfermedades neoplásicas por ejemplo cáncer y otras enfermedades proliferativas (hiperplasia benigna de próstata y tumoral), trastornos del sistema inmunitario que incluyen SIDA, afecciones asociadas a la senescencia, enfermedades oftalmológicas, cefaleas en racimo, migraña, protección cutánea, estabilización de la diabetes y trastornos de subida de peso (leptina, obesidad), y como ayuda a la cría de animales, por ejemplo, regulación de la fertilidad, pubertad y color del pelaje.

La invención se ilustrará mediante los siguientes Ejemplos. Se entiende que los siguientes ejemplos son ilustrativos.

Ejemplo 1

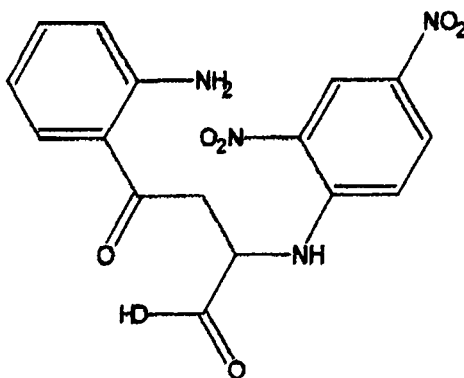
2-(2-aminobenzoyl)-N-(2,4-dinitrofenil)etilamina



Se disuelve kinuramina · 2HBr (125 mg) en 5 cm³ de etanol absoluto en un matraz de 50 cm³. Después se añade una solución de 2,4-dinitrofluorobenceno, 71 mg en 5 cm³ de EtOH (se forma una solución amarillo claro). Después de cinco minutos, se introducen 2 cm³ de una solución de NaHCO₃ al 10% gota a gota en el matraz. La reacción se deja a temperatura ambiente toda la noche. A la mañana siguiente, el precipitado amarillo claro formado se filtra, se lava con agua y etanol y se seca en UHV obteniendo 80 mg de producto (rendimiento aprox. 63%).

Ejemplo ácido 2

3-(2-aminobenzoyl)-2-(2,4-dinitroanilino)propanoico



ES 2 341 958 T3

Se disuelve L-kinurena (125 mg) en 5 cm³ de etanol absoluto en un matraz de 50 cm³. Después se añade una solución de 2,4-dinitrofluorobenceno, 71 mg en 5 cm³ de EtOH (se forma una solución amarillo claro). Después de cinco minutos, se introducen 2 cm³ de una solución de NaHCO₃ al 10% gota a gota en el matraz. La reacción se deja a temperatura ambiente toda la noche. A la mañana siguiente, el precipitado amarillo claro formado se filtra, se lava con agua y etanol y se seca en UHV obteniendo 80 mg de producto (rendimiento aprox. 71%).

La invención también incluye las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la fórmula (I), así como los posibles isómeros englobados en la fórmula (I) tanto por separado como en mezclas.

10 **Análisis biológicos de los compuestos de la invención**

Experimento 1

15 *Evaluación de la actividad antiparkinson usando ratones tratados con MPTP con/sin una dosis inferior a la umbral de L-Dopa*

Animales: se usaron ratones C57 BL/6 de seis meses de edad, que pesaban 22-25 g. Después de llegar al laboratorio, se dejó que los ratones se aclimataran durante dos semanas en una sala con temperatura controlada (21± 1°C), y una pauta de luz y oscuridad constante (12 h encendidas/12 h apagada, luces encendidas entre 06:00 y 18:00 h). Se mantuvo el acceso libre a alimento y agua durante todo el tiempo. Se alojaron en grupos de 12 animales y se analizaron sólo durante las horas de luz (08:00-15:00 h). Todas las pruebas se realizaron en una sala con iluminación normal. Cada cámara de pruebas (es decir, jaula de pruebas de actividad) se introdujo en una caja de madera con aislamiento acústico con paredes de grueso y paneles frontales de 12 cm y con iluminación tenue.

25 Mediciones conductuales y aparatos: Se usó un dispositivo automático formado por jaulas para pruebas con roedores macrolon (40 x 25 x 15 cm) cada una situada entre dos series de rayos infrarrojos (a dos alturas diferentes, uno bajo y otro alto, a 2 y 8 cm, respectivamente, sobre la superficie de serrín de 1 cm de grueso), para medir la actividad motora espontánea y/o inducida por fármacos de los ratones tratados con MPTP y de control. Se midieron los siguientes parámetros: la LOCOMOCIÓN se midió mediante la rejilla inferior de rayos infrarrojos. Los recuentos se registraron sólo cuando el ratón en el plano horizontal, deambulaba por la caja para pruebas. La ELEVACIÓN se registró durante todo el tiempo cuando se interrumpía al menos un rayo de nivel alto, es decir, el número de recuentos registrado era proporcional a la cantidad de tiempo que se mantenía en elevación. La ACTIVIDAD TOTAL se medía mediante 8 sensores (8 receptores similares a la aguja de un gramófono, montados sobre 8 palancas con un contrapeso) con los que la jaula de pruebas estaba siempre en contacto. El sensor registraba todo tipo de vibraciones provenientes de la jaula de pruebas, como por ejemplo las producidas por la locomoción y la elevación así como por agitación, temblores, rascado y acicalado.

Mediciones conductuales (locomoción, elevación y actividad total): Doce días después de las inyecciones de MPTP (2 x 40 mg/kg, s.c., intervalo de 24 h), se inyectó a los ratones por vía i.p. 2-(2-aminobenzoi)-N-(2,4-dinitrofenil) etilamina (0,3, 1, 3,10 mg/kg) o vehículo (10% de DMSO, 1% de CMC) e inmediatamente después se introdujeron en las cámaras para pruebas de actividad y se controló su actividad motora durante 60 min. Después de 60 min, se inyectó a los ratones 5 mg/kg de L-Dopa (s.c) y después se volvieron a introducir en la cámara de pruebas y las mediciones de la actividad se mantuvieron durante otros 240 min. Las dosis se espaciaron dos días, empezando por la dosis más baja.

45 La Tabla 1 presenta la media los recuentos de locomoción, la elevación y la actividad total (1± desviación típica) de los ratones tratados con MPTP y los ratones de control a los que se había administrado 2-(2-aminobenzoi)-N-(2,4-dinitrofenil)etilamina o vehículo con una dosis inferior al umbral de L-Dopa, el nivel de significación al 1% se representa mediante un asterisco (prueba de HSD de Tukey).

50

| TRATAMIENTO | LOCOMOCIÓN | ELEVACIÓN | ACTIVIDAD TOTAL |
|---|------------|------------|-----------------|
| Vehículo | 1000 ± 145 | 920 ± 181 | 10937 ± 2812 |
| MPTP+vehículo | 200 ± 90 | 225 ± 72 | 4530 ± 937 |
| MPTP + 0,3 mg/kg de 2-(2-aminobenzoi)-N-(2,4-dinitrofenil)etilamina | 273 ± 64 | 290 ± 73 | 5160 ± 1093 |
| MPTP + 1 mg/kg de 2-(2-aminobenzoi)-N-(2,4- | 473 ±108* | 582 ± 145* | 6250 ± 625* |

65

| | | | |
|---|------------|------------|-------------|
| dinitrofenil)etilamina | | | |
| MPTP + 3 mg/kg de 2-(2-aminobenzoil)-N-(2,4-dinitrofenil)etilamina | 510 ± 107* | 731 ± 110* | 8563 ± 781* |
| MPTP + 10 mg/kg de 2-(2-aminobenzoil)-N-(2,4-dinitrofenil)etilamina | 470 ± 110* | 619 ± 102* | 6250 ± 625* |

La 2-(2-aminobenzoil)-N-(2,4-dinitrofenil)etilamina no tuvo ningún efecto durante el periodo de 60 minutos anterior a la L-Dopa, frente a los ratones tratados con MPTP y vehículo. Sin embargo, 2-(2-aminobenzoil)-N-(2,4-dinitrofenil)etilamina mejoró significativamente los tres parámetros conductuales cuando se administraba junto con una dosis inferior a la umbral de L-Dopa. La 2-(2-aminobenzoil)-N-(2,4-dinitrofenil)etilamina (1, 3 ó 10 mg/kg) mejoró significativamente la locomoción, elevación y actividad total de los ratones tratados con MPTP, frente al grupo tratado con MPTP y vehículo.

La 2-(2-aminobenzoil)-N-(2,4-dinitrofenil)etilamina administrada a los animales de control tratados con vehículo no tuvo ningún efecto sobre ninguna variable.

Experimento 2

Caracterización electrofisiológica de las corrientes activadas por NMDA en neuronas hipocámpicas recién aisladas de rata

Aislamiento de neuronas hipocámpicas: ratas Wister (de 12-14 días) se decapitaron sin anestesia y se extrajo el hipocampo. Se cortó manualmente en secciones (0,2-0,4 mm), en una solución que contenía (mM): NaCl 150; KCl 5; NaH₂PO₄ 1,25; CaCl₂ 2; MgCl₂ 2; NaHCO₃ 26; glucosa 20. Las secciones se preincubaron en esta solución durante 30 min a temperatura ambiente. El tratamiento enzimático se realizó en la misma solución con una concentración menor de Ca²⁺ (0,5 mM) que contenía 0,4 mg/ml de proteasa de *Aspergillus oryzae*. La incubación en la solución de enzimas se llevó a cabo a 32°C en 10 min. Las secciones se mantuvieron posteriormente en solución sin enzimas que contenía una concentración normal de Ca²⁺ y se usaron en 6-8 h para obtener neuronas aisladas. Durante todo el procedimiento, las soluciones se saturaron continuamente con una mezcla de gases de 95% de O₂ y 5% de CO₂ para mantener el pH de 7,4. Para la disociación celular, la sección se transfirió a la solución extracelular que contenía (mM): NaCl 150; KCl 5; CaCl₂ 2; ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etanosulfónico (Hepes) 10; el pH se ajustó con NaOH a 7,4. Se aislaron células solas a partir de las zonas hipocámpicas CA1 y CA3 por el método de vibrodisociación. Presentaban un diámetro de 10-15 µm y conservaban una pequeña parte del árbol de dendritas. Después de aislar, habitualmente podían realizarse registros durante 1-2 h.

Soluciones salinas y productos químicos: El contenido de la solución extracelular era el siguiente (en mM): NaCl 130, KCl 5, CaCl₂ 2, ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etanosulfónico (Hepes) 20; TTX 0,1 µM, glicina 10 µM, L-aspartato 300 µM; el pH se ajustó con NaOH a 7,4.

El contenido de la solución intracelular era el siguiente (en mM): CSF 10, Tris-HCl 20 (pH = 7,2). Las soluciones de L-aspartato y glicina se prepararon el día del experimento.

La sustancia analizada 2-(2-aminobenzoil)-N-(2,4-dinitrofenil)etilamina se disolvió en DMSO.

Registros de corriente y análisis de datos: Las soluciones que contenían los fármacos se aplicaron mediante el procedimiento de "pinzamiento de concentración" rápida usando los ajustes del programa "jumping table" (Pharma Robot, Kiev). Las corrientes se registraron con la técnica de pinzamiento zonal en la configuración de células enteras. El registro de las corrientes se realizó usando el amplificador de pinzamiento zonal EPC-7UM.

Corrientes activadas por NMDA: Las corrientes se filtraron a 3 kHz (filtro Bessel activo de tres polos) con toma de muestras digital a una velocidad de 6000 µs por punto para las corrientes activadas por NMDA. Las corrientes transmembrana inducidas por NMDA se midieron en presencia de glicina 10 µM y L-aspartato 300 µM en las soluciones de control y de prueba. Las corrientes se registraron a un potencial de cebado de 70 mV.

Cálculos: La inhibición de la corriente a diferentes concentraciones de la sustancia se promedió al menos para 4 células. El efecto de la sustancia se midió en términos de proporción media de I/I_0 donde I era la corriente con acción de la sustancia y I_0 era la corriente en condiciones de control. DT representa la desviación típica.

ES 2 341 958 T3

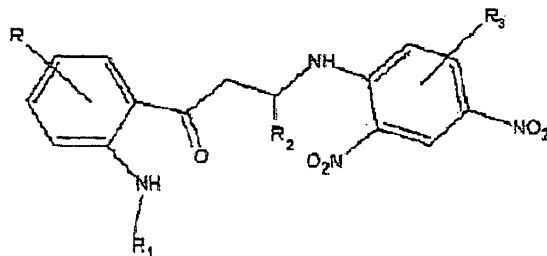
Acción de 2-(2-aminobenzoil)-n-2,4-dinitrofeniletamina 10 μ M sobre las corrientes activadas por NMDA:

| | | | | | | |
|---|--|---------|-------|-------|-------|----------|
| 5 | 2-(2-aminobenzoil)-N-(2,4-dinitrofenil)etilamina 10 μ M | CÉLULAS | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | MEDIA | \pm DT |
| | | 92,77 | 77,15 | 80,17 | 83,36 | 8,28 |

10 Este experimento reveló que 2-(2-aminobenzoil)-N-(2,4-dinitrofenil)etilamina presenta una actividad de bloqueo de los receptores de NMDA.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula (II):



(II)

en la que R es hidrógeno, metilo o metoxi, R₁ es hidrógeno o formilo, R₂ es hidrógeno o carboxilo, y R₃ es hidrógeno, halo, haloalquilo, arilo, un grupo heterocíclico, un grupo heteroarilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, arilalquenilo, arilalquinilo, hidroxialquilo, nitro, amino, ciano, cianamido, guanidina, amidino, acilamido, hidroxilo, tiol, aciloxi, azido, alcoxi, carboxi, carbonilamido, S-alquilo o alquiltiol y sus estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es ácido 3-(2-aminobenzoil)-2-(2,4-dinitroanilino)propanoico, y sus estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables.

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es 2-(2-aminobenzoil)-N-(2,4-dinitrofenil)etilamina, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

4. Una formulación farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, junto con al menos un ingrediente farmacéuticamente aceptable que se selecciona de entre diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes, excipientes y vehículos.

5. Una formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, que además se **caracteriza** por al menos uno de los siguientes atributos:

(i) está adaptada a la administración oral, rectal, parenteral, transbucal, intrapulmonar o transdérmica;

(ii) está en forma monodosis, comprendiendo cada monodosis una cantidad de dicho al menos un compuesto incluida en el intervalo de 0,0425-1000 mg;

(iii) es una formulación de liberación controlada, en la que dicho al menos un compuesto se libera a una velocidad controlada predeterminada.

(iv) comprende además al menos un ingrediente terapéuticamente activo conocido que se selecciona de entre neurolépticos, timolépticos, ansiolíticos, tranquilizantes, analgésicos, y fármacos contra el parkinson.

6. Uso de al menos un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o una formulación farmacéutica como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una afección fisiológica que se selecciona entre ictus, isquemia, traumatismo del SNC, hipoglucemia e intervención quirúrgica, trastornos del SNC que incluyen enfermedades neurodegenerativas, hiperestimulación de los aminoácidos excitatorios, trastornos psiquiátricos, epilepsia y otros trastornos que cursan con convulsiones, ansiedad, psicosis, demencia senil, demencia multifarcto, dolor crónico (analgesia), glaucoma, retinitis por CMV, incontinencia urinaria, y para inducir anestesia, potenciar la cognición, y prevenir la tolerancia a los opiáceos y los síntomas de la abstinencia, impotencia, trastornos cardiovasculares que incluyen hipertensión, prevención de la coagulación sanguínea, neuropatía, antiinflamación, trastornos cronobiológicos, trastornos estacionales, indicaciones endocrinas, anticoncepción e infertilidad, pubertad precoz, síndrome premenstrual, hiperprolactinemia y déficit de hormona del crecimiento, enfermedad neoplásica, otras enfermedades proliferativas (hiperplasia benigna de próstata y tumoral), trastornos del sistema inmunitario, afecciones asociadas a la senescencia, enfermedades oftalmológicas, cefalea en racimos, migraña, protección cutánea, estabilización de la diabetes y trastornos de subida de peso y para usar en la cría de animales.