



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 291 308**

51 Int. Cl.:

G01N 33/15 (2006.01)

C07D 211/58 (2006.01)

C07D 417/04 (2006.01)

A61K 31/4468 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01921835 .3**

86 Fecha de presentación : **13.04.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1228367**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **07.08.2002**

54 Título: **Derivados de aminofenoxiacetamida y composición farmacéutica que contiene los mismos.**

30 Prioridad: **13.04.2000 JP 2000-112100**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2008

73 Titular/es: **Asubio Pharma Co., Ltd.**
9-11 Akasaka 2-chome
Minato-ku, Tokyo, JP

72 Inventor/es: **Takemoto, Naohiro;**
Annoura, Hirokazu y
Murayama, Norihito

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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 aminofenoxiacetamida y composición farmacéutica que contiene los mismos.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a agentes para mejora y tratamiento de trastornos cerebrales funcionales u orgánicos que contienen derivados de aminofenoxiacetamida y sus sales farmacéuticamente aceptables como ingrediente activo, teniendo efecto neuroprotector por inducir la producción de CalbindinD-28k, una de las proteínas de fijación de Ca^{2+} , y a los métodos para seleccionar estos derivados de aminofenoxiacetamida neuroprotectores. De modo más específico, la presente invención se refiere a los agentes terapéuticos y mejoradores para las diversas disfunciones cerebrales debidas a diversos trastornos isquémicos tales como infarto cerebral, hemorragia intracerebral y aterosclerosis cerebral. Adicionalmente, la presente invención se refiere a agentes terapéuticos y mejoradores para diversos trastornos cerebrales orgánicos debidos a demencia senil, secuelas de lesión cerebral, u operación quirúrgica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica, así como enfermedad de Huntington, etc.

Técnica anterior

Se considera que la muerte progresiva y retardada de las células nerviosas, observada en lesión cerebral y enfermedades cerebrovasculares tales como hemorragia intracerebral, isquemia cerebral transitoria, e infarto cerebral, e infarto cerebral, está causado principalmente por el aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} , cuyos diversos factores están relacionados con la transducción de señales que causan, por ejemplo, la activación anormal de receptores por una liberación excesiva de glutamato que produce excitabilidad interna, la activación de canales iónicos, y la inducción de especies y radicales libres de oxígeno reactivos.

25

[F. B. Meyer, *Brain Res. Rev.*, 14, 227 (1989); E. Boddeke *et al.*, *Trends Pharmacol. Sci.*, 10, 397 (1989); J. M. McCall *et al.*, *Ann. Rep. Med. Chem.*, 27, 31 (1992)].

30

Basándose en estos puntos de vista, antagonistas para receptores de glutamato, bloqueadores de los canales de calcio, antioxidantes, etcétera, han sido aplicados para medicamentos orientados a la prevención o supresión de la neurodegeneración. Sin embargo, estos medicamentos utilizados clínicamente suprimen sólo un pequeño número de caminos relacionados con el aumento de la concentración celular de Ca^{2+} , y por consiguiente no son todavía suficientes para prevenir o suprimir la neurodegeneración.

35

Por el contrario, la producción interna de CalbindinD-28k es inducida por activación de receptores para muchas sustancias fisiológicamente activas tales como FGF, NT-3, NT-4/4, BDNF, IGF-I/II, PDGF, estrógeno, etcétera, así como por activación del receptor de FGF, que es uno de los receptores de factores de crecimiento de los nervios [C.V.-Abejon *et al.*, *Neuron*, 15, 105 (1995); A. Silva *et al.*, *Brain Res. Bull.*, 1, 35 (2000)]. Y CalbindinD-28k, una de las proteínas de fijación de Ca^{2+} y distribuida principalmente en sitios vulnerables contra los trastornos isquémicos en el sistema nervioso central, que se sabe exhibe acción amortiguadora contra el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular.

45

[A. M. Lacopino *et al.*, *Neurodegeneration*, 3, 1, (1994); M. P. Mattson *et al.*, *Neuron*, 6, 41 (1991)]

De acuerdo con ello, se espera alcanzar efectos neuroprotectores suficientes contra el aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} causado por cualesquiera clases de caminos si CalbindinD-28k, una de las proteínas fijadoras de Ca^{2+} *per se*, puede suministrarse a una célula. Es decir, se espera que los medicamentos que contengan CalbindinD-28k sean agentes terapéuticos y mejoradores extremadamente eficaces contra trastornos cerebrales funcionales y debidos a diversos trastornos isquémicos tales como infarto cerebral, hemorragia intracerebral y arterioesclerosis cerebral. Se espera también que sean eficaces contra la disfunción cerebral debida a trastornos cerebrales isquémicos debidos a secuelas de demencia senil, lesión cerebral y operación quirúrgica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, etcétera.

55

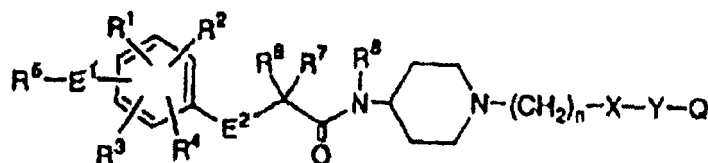
Sin embargo, es muy difícil y por consiguiente no es verosímil administrar la proteína CalbindinD-28k directamente al sitio deseable en el sistema nervioso central de un cuerpo teniendo en cuenta las limitaciones existentes en la metodología farmacológica y farmacéutica dado que CalbindinD-28k es en sí misma una proteína inestable de alto peso molecular que tiene 28 Kd (Kilo-Dalton) de peso molecular.

60

Por el contrario, los compuestos de peso molecular inferior capaces de incluir la producción de la proteína CalbindinD-28k pueden prepararse fácilmente en las diversas clases de composiciones farmacéuticas por la técnica convencional. Por ello, estos compuestos de peso molecular inferior podrían inducir la producción de la proteína neuroprotectora CalbindinD-28k una vez administrados fácilmente a un cuerpo, exhibiendo la acción amortiguadora contra el aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} . Es decir, estos compuestos de peso molecular inferior pueden ser compuestos farmacéuticamente eficaces para mejorar y tratar trastornos cerebrales funcionales y orgánicos.

65

La solicitud de patente internacional WO 00/23076, que pertenece a la técnica anterior conforme al artículo 54(3) EPC, describe derivados del ácido aminofenoxiacético de la fórmula siguiente como neuroprotectores:



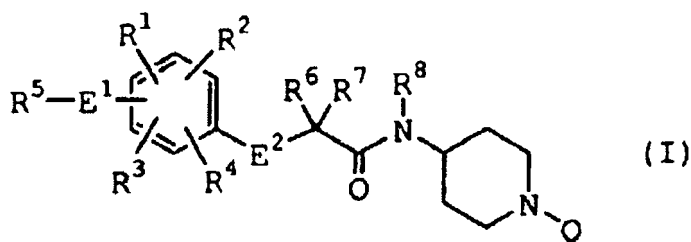
en donde: R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son, independientemente unos de otros, grupo alcoxi, grupo alquilo o grupo arilo, etc; E^1 y E^2 son átomo de oxígeno, átomo de azufre, etc; n es 0 a 5; X e Y son grupo alquileo, grupo cicloalquileo, o grupo alquilenilo; Q es grupo fenilo que puede estar sustituido o grupo benzoilo, etc; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Estos compuestos se describen como poseedores de efectos neuroprotectores por inducir CalbindinD-28kd, una de las proteínas de fijación de Ca^{2+} .

En estas circunstancias, un objetivo de la presente invención es seleccionar y proporcionar los compuestos neuroprotectores de peso molecular inferior capaces de inducir la porción de CalbindinD-28k, una clase de proteínas fijadoras de Ca^{2+} , por fosforilación de receptores de diversas sustancias fisiológicamente activas, así como proporcionar las composiciones farmacéuticas de toxicidad baja en preparaciones adecuadas tales como solución inyectable intravenosa.

El otro objetivo de la presente invención es proporcionar los agentes terapéuticos y mejoradores para trastornos cerebrales funcionales debidos a diversos trastornos isquémicos tales como infarto cerebral, hemorragia intracerebral y arteriosclerosis cerebral, así como trastornos cerebrales orgánicos tales como secuelas de demencia senil, lesión cerebral, u operación quirúrgica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica.

Exposición de la invención

La presente invención proporciona un derivado de aminofenoxiacetamida representado por la fórmula (I) siguiente:



en donde

R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son metilo;

R^5 , R^6 , R^7 y R^8 son, independientemente unos de otros, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C_1-C_6 ;

cuando E^1 es un átomo de oxígeno, E^2 es el grupo $-NR^9$; o

cuando E^1 es el grupo $-NR^{10}$, E^2 es un átomo de oxígeno; en donde R^9 y R^{10} son un átomo de hidrógeno; un grupo alquilo C_1-C_5 de cadena lineal o ramificado que puede estar sustituido con halógeno; un grupo arilo C_4-C_{14} que puede estar sustituido con sustituyentes seleccionados del grupo constituido por átomos de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C_1-C_5 de cadena lineal o ramificado y un grupo alquilo C_1-C_5 de cadena lineal o ramificado que puede estar sustituido con átomos de halógeno; o un grupo aralquilo C_5-C_{12} que puede estar sustituido con sustituyentes seleccionados del grupo constituido por átomos de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C_1-C_5 de cadena lineal o ramificado y un grupo alquilo C_1-C_5 de cadena lineal o ramificado que puede estar sustituido con átomos de halógeno;

Q es un grupo de $-X-Y-Q'$, en donde X es un enlace de conexión, un grupo alquileo C_1-C_6 o un grupo alquilenilo C_2-C_4 ; Y es un grupo de conexión, $C(=O)NH$ o $NHC(=O)$; y Q' es un grupo fenilo, un grupo piridilo, un grupo quinolilo, un grupo isoquinolilo, un grupo benzotiazol o un grupo bencimidazol, cada uno de los cuales puede estar sustituido con sustituyentes seleccionados del grupo constituido por átomos de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C_1-C_5 de cadena lineal o ramificado y un grupo alquilo C_1-C_5 de cadena lineal o ramificado que puede estar sustituido con átomos de halógeno;

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En la descripción de un grupo alquilo inferior puede tratarse específicamente de un grupo alquilo lineal o ramificado del número de átomos de carbono C₁ a C₆, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, etcétera, y más preferiblemente metilo o etilo. En la descripción de grupo alqueno inferior puede tratarse específicamente de un grupo alqueno C₂ a C₆, y grupo alquino inferior puede ser específicamente un grupo alquino C₂ a C₆.

Más específicamente, los grupos de compuestos siguientes (1) o (2) son las realizaciones específicas de los derivados de aminofenoxiacetamida de la fórmula (I) de la presente invención que tienen un efecto excelente.

(1) Los derivados de aminofenoxiacetamida de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:

R⁵ es átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₆;

E¹ es -NH-;

E² es átomo de oxígeno;

o sus sales farmacéuticamente aceptables.

(2) Los derivados de aminofenoxiacetamida de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:

R⁵ es átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₆;

E¹ es -NH-;

E² es átomo de oxígeno;

cuando X es un enlace de conexión, Y es -CONH-; o cuando X es -CONH-, Y es un enlace de conexión;

Q' es grupo fenilo que puede estar sustituido;

o sus sales farmacéuticamente aceptables.

De acuerdo con las investigaciones de los autores de la presente invención, se ha confirmado que los derivados de aminofenoxiacetamida representados por la fórmula (I) inducían eficazmente la producción de CalbindinD-28k en baja concentración y poseían un efecto neuroprotector excelente. Adicionalmente, se ha confirmado también que estos compuestos poseen un alto margen de seguridad, y son adecuados para preparación de diversas clases de composiciones farmacéuticas.

Por esta razón, como una realización adicional, la presente invención proporciona un agente mejorador y terapéutico para los trastornos cerebrales funcionales y orgánicos, que contiene derivados de aminofenoxiacetamida representados por la fórmula (I) o sus sales farmacéuticamente aceptables, como ingrediente activo.

En el contexto de la presente invención, se hace referencia a un método eficaz y simple de selección (escrutinio) de compuestos de peso molecular relativamente bajo capaces de inducir la producción de la CalbindinD-28k, una de las proteínas de fijación de Ca²⁺.

El método de selección de compuestos de peso molecular bajo consiste en varios ensayos de evaluación mencionados a continuación:

(1) Ensayo de evaluación para comparar el efecto neuroprotector de los compuestos de ensayo contra la neurodegeneración inducida por glutamato, entre la administración de los mismos antes de la adición de glutamato y la administración simultánea de los mismos.

(2) Ensayo para confirmar si el efecto neuroprotector mencionado anteriormente es o no neuroprotector por fosforilación de receptores para diversas sustancias fisiológicamente activas. Estos ensayos se conducen por el efecto antagonista de los inhibidores para cada uno de los receptores tales como FGF NT-3, NT-4/5, BDNF, IGF-I/II, PDGF, o estrógeno, y MTA (5-desoxi-5-metiltoadenosina), que inhibe específicamente la autofosforilación del receptor FGF.

(3) Ensayo de evaluación de la capacidad de inducción para cada uno de los compuestos de ensayo en cuanto a la producción de CalbindinD-28k.

(4) Ensayo de confirmación para el efecto neuroprotector de CalbindinD-28k por la inhibición utilizando su oligonucleótido antisentido.

Por los ensayos de evaluación arriba indicados, pueden seleccionarse compuestos eficaces que tienen las características siguientes.

Ensayo de evaluación (1)

Este ensayo tiene por objeto evaluar si los compuestos de ensayo tienen efecto neuroprotector contra la neurodegeneración inducida por el glutamato, por administración de tales compuestos de ensayo antes o simultáneamente con el glutamato para inducir la lesión celular neuronal.

Si el compuesto de ensayo exhibe un efecto neuroprotector mayor contra la neurodegeneración inducida por la administración de glutamato en el caso de pretratamiento que en el caso del tratamiento simultáneo, entonces el compuesto puede poseer efecto de inducción de una sustancia proteínica similar, que exhibe efecto neuroprotector. Por esta razón, el compuesto que posee efecto neuroprotector basado en la sustancia proteínica similar inducida, con inclusión de CalbindinD-28k, una de las proteínas de fijación de Ca^{2+} , se selecciona por este ensayo de evaluación.

Ensayo de evaluación (2)

En el caso en que el efecto neuroprotector desaparece por la administración de inhibidores para receptores tales como FGF, NT-3, NT-4/5, BDNF, IGF-I/II, PDGF y estrógeno, entonces se confirma que dicho efecto neuroprotector está causado por la activación de estos receptores. Adicionalmente, en la célula viva, MTA (5-desoxi-5-metiltoadeno-sina) inhibe específicamente la autofosforilación de los receptores FGF. La inhibición de la actividad neuroprotectora por el tratamiento con MTA (inhibidor específico para la autofosforilación de los receptores FGF) confirma que dicho efecto neuroprotector implica fosforilación de los receptores FGF. Por tanto, este ensayo de evaluación seleccionaría los compuestos cuyo efecto neuroprotector se expresa por la activación de receptores de diversas sustancias fisiológicamente activas y por fosforilación del receptor FGF.

Ensayo de evaluación (3)

Por este ensayo de evaluación se seleccionaría el compuesto que tiene efecto inductor de la producción de CalbindinD-28k.

Ensayo de evaluación (4)

Es necesario que la proteína protectora que debe producirse por la transducción de señales de las células por la fosforilación de receptores de diversas sustancias fisiológicamente activas proporcione el efecto neuroprotector de los compuestos, y la CalbindinD-28k es una de dichas proteínas protectoras. Por tanto, con este ensayo de evaluación, el compuesto que tiene actividad neuroprotectora debida a la producción de CalbindinD-28k, es inhibido por la utilización de CalbindinD-28k antisentido. En este ensayo, el compuesto que tiene efecto neuroprotector se confirma basándose en la CalbindinD-28k producida.

El método arriba mencionado de selección eficaz y simple de compuestos neuroprotectores de peso molecular relativamente bajo basado en la producción de CalbindinD-28k inducida, puede utilizar todos los ensayos de evaluación, o una combinación de los ensayos de evaluación (1) y (2), los ensayos de evaluación (1), (2) y (3), los ensayos de evaluación (1) y (3) o los ensayos de evaluación (1), (3) y (4).

La Figura 1 muestra el diagrama de flujo de los métodos de selección que muestra el resumen del método de selección de compuestos de peso molecular relativamente bajo que poseen efecto neuroprotector basado en la producción de CalbindinD-28k inducida, por combinación de los ensayos de evaluación mencionados anteriormente.

De acuerdo con los métodos de selección arriba mencionados, los compuestos descritos específicamente en la descripción de la presente invención se seleccionan como compuestos de peso molecular relativamente bajo que poseen el efecto de inducción de la producción de CalbindinD-28k, una de las proteínas de fijación de Ca^{2+} . Sin embargo, estos métodos de selección pueden aplicarse para seleccionar diversos compuestos que poseen efecto neuroprotector basado en la activación de receptores de sustancias fisiológicamente activas y el efecto inductor de la producción de CalbindinD-28k que induce que implica autofosforilación del receptor FGF, y no están limitados a la selección de los compuestos descritos en esta memoria descriptiva.

Breve descripción del dibujo

La Figura 1 muestra el diagrama de flujo de los métodos mencionados anteriormente de selección de compuestos de peso molecular relativamente bajo que poseen efecto neuroprotector basado en la producción de CalbindinD-28k inducida.

Modo óptimo de realización de la invención

Los derivados de aminofenoxiacetamida de la presente invención incluyen aminofenoxiacetamidas, aminoanilinoacetamidas, y oxianilinoacetamidas. Por esta razón, la expresión "derivados de aminofenoxiacetamida" incluye en esta memoria descriptiva todos los derivados arriba indicados mientras no se especifique otra cosa.

ES 2 291 308 T3

En los derivados de aminofenoxiacetamida de la fórmula (I) proporcionados por la presente invención con referencia a diversos grupos de sustitución de R¹ a R¹⁰, “átomo de halógeno” incluye átomo de flúor, átomo de cloro y átomo de bromo.

5 El término “grupo alcoxi” se refiere a un grupo alcoxi C₁-C₅ de cadena lineal o de cadena ramificada, y puede incluir, por ejemplo, metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, sec-butoxi, terc-butoxi y análogos.

La expresión “grupo alquilo que puede estar sustituido” significa un grupo alquilo C₁-C₅ de cadena lineal o de cadena ramificada que puede estar sustituido con halógeno, y puede incluir, por ejemplo, grupo metilo, etilo, propilo, 10 trifluorometilo, y análogos.

El “arilo”, una parte de la expresión “grupo arilo que puede estar sustituido”, significa grupo arilo C₄-C₁₄ que contiene al menos un heteroátomo tal como uno o más átomos de nitrógeno y oxígeno. Ejemplos del grupo arilo preferido incluyen fenilo, piridinilo y naftilo. Los sustituyentes adecuados de dicho grupo arilo incluyen átomos de 15 halógeno tales como átomo de flúor, átomo de cloro y átomo de bromo; grupo hidroxilo; un grupo alcoxi C₁-C₅ de cadena lineal o de cadena ramificada que tiene 1 a 5 átomos de carbono tal como grupo metoxi y grupo etoxi, y un grupo alquilo C₁-C₅ de cadena lineal o de cadena ramificada que puede estar sustituido con átomo de halógeno tal como metilo, etilo y trifluorometilo.

20 El “aralquilo”, una parte de la expresión “grupo aralquilo que puede estar sustituido”, significa grupo aralquilo C₅-C₁₂ que contiene al menos un heteroátomo en el anillo tal como uno o más átomos de nitrógeno y oxígeno. Los ejemplos incluyen bencilo, fenetilo, piridilmetilo, y piridiletilo.

Los sustituyentes adecuados de dicho grupo aralquilo incluyen átomos de halógeno tales como átomo de flúor, 25 átomo de cloro y átomo de bromo; grupo hidroxilo; un grupo alcoxi C₁-C₅ de cadena lineal o de cadena ramificada tal como grupo metoxi y grupo etoxi; y un grupo alquilo C₁-C₅ de cadena lineal o de cadena ramificada que puede estar sustituido con átomo de halógeno tal como metilo, etilo y trifluorometilo.

El “arilo”, una parte de la expresión “grupo arilo que puede estar sustituido” representado como “Q”, significa un 30 grupo arilo C₄-C₁₄ que puede contener al menos un heteroátomo tal como uno o más átomos de nitrógeno y oxígeno. Los ejemplos incluyen fenilo, piridilo, y naftilo. Los sustituyentes adecuados de dicho grupo arilo incluyen átomo de halógeno tal como átomo de flúor, átomo de cloro y átomo de bromo; grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C₁-C₅ de cadena lineal o de cadena ramificada que tiene 1 a 5 átomos de carbono tal como grupo metoxi y grupo etoxi; y un grupo 35 alquilo C₁-C₅ de cadena lineal o de cadena ramificada que puede estar sustituido con átomo de halógeno tal como metilo, etilo y trifluorometilo. Adicionalmente, estos sustituyentes pueden incluir también un grupo alquilo C₁-C₅ de cadena lineal o de cadena ramificada que puede estar sustituido con átomo de halógeno tal como átomo de flúor, átomo de cloro y átomo de bromo.

El “alquilenilo”, una parte de la expresión “grupo alquilenilo que puede estar sustituido con grupo hidroxilo”, hace 40 referencia a los sustituyentes “X” e “Y”, y representa preferiblemente un grupo alquilenilo C₁-C₆ de cadena lineal o de cadena ramificada tal como metileno, metilmetileno, etileno, trimetileno, tetrametileno, ciclopropilmetileno y análogos.

El término “cicloalquilenilo” significa preferiblemente cicloalquilenilo C₃-C₆ y puede incluir 1,1-ciclopropileno, 1,2- 45 ciclopropileno, 1,1-ciclobutileno, 1,1-ciclopentileno, 1,1-ciclohexileno y análogos. Entre ellos, son más preferibles 1,1-ciclopropileno y 1,2-ciclopropileno.

El “alquenileno”, una parte de la expresión “grupo alquenileno que puede estar sustituido con grupo alquilo infe- 50 rior”, puede incluir alquilenilo C₂-C₄ tal como vinileno, y butadieno, utilizándose preferiblemente vinileno. El grupo alquilo inferior, que es sustituyente del grupo alquenileno, puede ser metilo, etilo, propilo, isopropilo y análogos.

El término “enlace conectado” con referencia a “X” e “Y” significa enlace directo. Por esta razón, si “X” y/o “Y” 55 son enlace conectado, dos sustituyentes adyacentes de “X” y/o “Y” están conectados directamente, y estos sustituyentes no existen como “X” y/o “Y”.

Los sustituyentes adecuados representados como “Q” para “grupo fenilo que puede estar sustituido”, “grupo fenoxi 60 xi que puede estar sustituido”, “grupo benzoilo que puede estar sustituido”, “grupo piridilo que puede estar sustituido”, “grupo quinolilo que puede estar sustituido”, “grupo isoquinolilo que puede estar sustituido”, “grupo benzotiazol que puede estar sustituido” y “grupo bencimidazolilo que puede estar sustituido”, pueden incluir átomo de halógeno tal como átomo de flúor, átomo de cloro y átomo de bromo; grupo hidroxilo; un grupo alcoxi C₁-C₅ de cadena lineal o de 65 cadena ramificada tal como grupo metoxi, grupo etoxi, etcétera. Adicionalmente, estos sustituyentes pueden incluir también un grupo alquilo C₁-C₅ de cadena lineal o de cadena ramificada que puede estar sustituido con átomo de halógeno tal como metilo, etilo, trifluorometilo y análogos.

65 Debe entenderse que cuando los derivados de aminofenoxiacetamida de la fórmula (I) de la presente invención existen en las formas isómeras, cada uno de los isómeros *per se*, así como la mezcla de isómeros, estará incluido en los compuestos de la presente invención. Es decir, que pueden existir isómeros estructurales debido a los sustituyentes en el anillo de benceno. Adicionalmente, pueden existir isómeros ópticos debido al átomo de carbono asimétrico del

grupo "X" o "Y" sustituido con hidroxilo del grupo alqueno. Estos isómeros se incluyen dentro del alcance de los compuestos de la presente invención.

Los derivados de aminofenoxiacetamida de la fórmula (I) incluyen los compuestos (Ia), (Ib), (Ic) y (Id) obtenidos por el proceso de síntesis mencionado más adelante. Por ejemplo, estos compuestos se pueden preparar por el método siguiente. En la extensión en que los procesos que siguen se refieren a la preparación de compuestos no abarcados por la reivindicación 1, la información se da únicamente para referencia y/o comparación.

El compuesto (IV), obtenido por la reacción del compuesto (II) con derivado éster (III), se hidroliza para convertirse en el derivado de ácido carboxílico (V). Adicionalmente, el compuesto (VIII) se obtiene por la reacción del derivado amina (VI) con el compuesto (VII), y el grupo protector del compuesto (VIII) se elimina para obtener el derivado amina (IX). A continuación, el compuesto (V) obtenido se convierte en el compuesto amida (X) por la reacción de condensación con el compuesto (IX). Adicionalmente, el grupo protector en el compuesto (X) así obtenido se elimina para obtener el compuesto (Ia), el compuesto de fórmula (I) de la reivindicación 1 de la presente invención (Proceso 1).

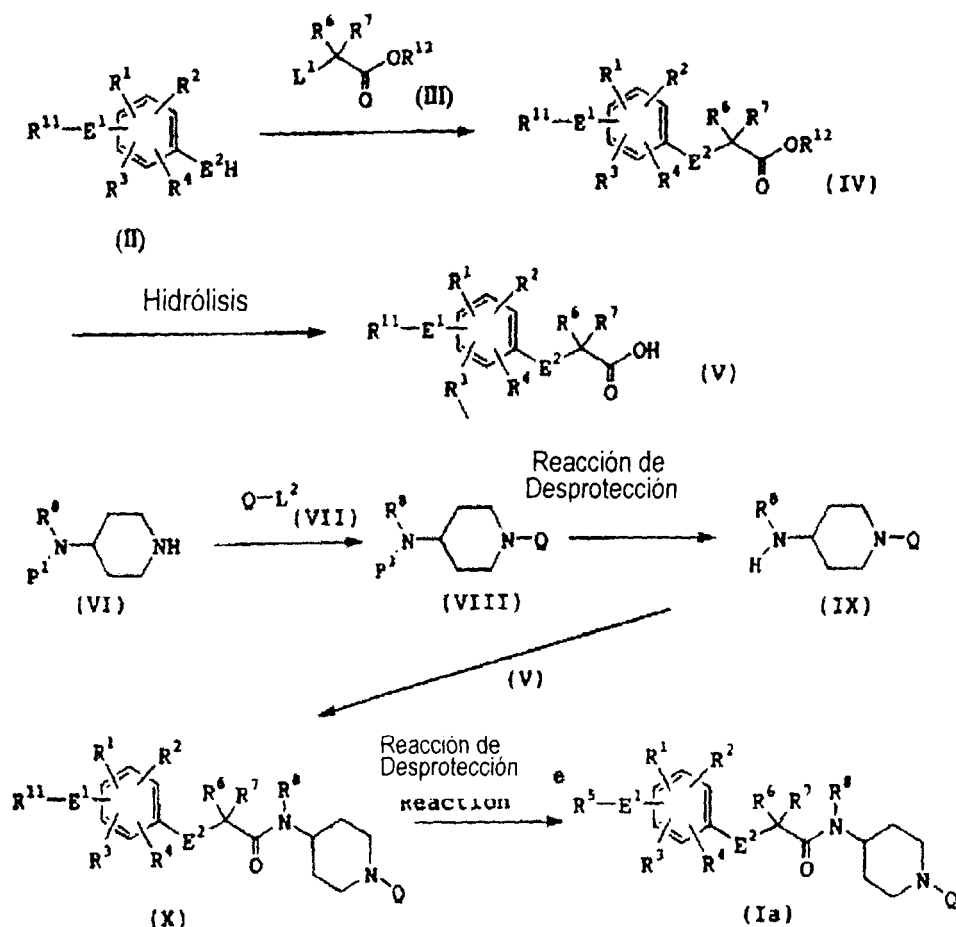
El compuesto (Ib), el derivado de aminofenoxiacetamida de fórmula (I) en la reivindicación 2 de la presente invención, puede obtenerse del modo siguiente. El compuesto amida (XII) se obtiene por una reacción de condensación del derivado de ácido carboxílico (V'), que se obtiene en el Proceso 1, con el compuesto (XI), y el grupo protector del compuesto resultante se elimina (Proceso 2).

El compuesto (Ib), obtenido en el Proceso 2, puede convertirse en el compuesto (XII) por la reacción con el compuesto (XIII) (Proceso 3).

Adicionalmente, el compuesto (Id) puede obtenerse por reacción del compuesto (Ib) con el compuesto (XIV) (Proceso 4).

Cada proceso se ilustrará ulteriormente por el esquema de reacción siguiente.

Proceso 1



ES 2 291 308 T3

en donde R¹ a R⁸, E¹ y E² tienen las mismas definiciones que anteriormente; Q tiene el mismo significado que se define en la reivindicación 1; y R¹¹ es un grupo alquilo que puede estar sustituido; grupo arilo que puede estar sustituido; grupo aralquilo que puede estar sustituido; grupo terc-butoxicarbonilo; grupo etoxycarbonilo; grupo acetilo; grupo benciloxycarbonilo; grupo p-metoxibencil-oxycarbonilo; R¹² es un grupo alquilo C₁-C₅ de cadena lineal o de cadena ramificada; L¹ es un grupo lábil que puede reemplazarse fácilmente con los grupos amino, hidroxilo, y mercapto; L² es un grupo lábil que puede reemplazarse fácilmente con amino, y ácido bórico; P¹ es un grupo terc-butoxicarbonilo, grupo etoxycarbonilo, grupo acetilo, grupo benciloxycarbonilo, grupo p-metoxibenciloxycarbonilo, grupo bencilo o grupo trifluoroacetilo.

De acuerdo con este proceso 1, el compuesto (Ia) puede obtenerse a partir del compuesto de partida conocido (II).

Es decir, para el primer paso, el compuesto (II) se hace reaccionar con 1,0 a 1,5 equivalentes molares del compuesto éster (III) en el disolvente inerte, y en caso necesario en presencia de la base, bajo agitación a -20°C hasta 150°C, preferiblemente a 0°C hasta 100°C.

El disolvente inerte a utilizar en la reacción puede ser benceno, tolueno, tetrahidrofurano, dioxano, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, acetonitrilo, acetona, metanol, etanol, alcohol isopropílico, alcohol terc-butílico, etilenglicol, dietil-éter y análogos.

La base a utilizar en la reacción anterior puede ser una base orgánica tal como trietilamina, diisopropil-etil-amina, piridina y análogas, o una base inorgánica tal como sodio, hidruro de sodio, potasio, hidruro de potasio, metóxido de sodio, terc-butoxido de potasio, carbonato de sodio, carbonato de potasio, carbonato de cesio, fluoruro de cesio, bicarbonato de sodio, bicarbonato de potasio y análogas. Estas bases orgánicas y bases inorgánicas pueden utilizarse en combinación, y pueden añadirse yoduro de sodio, yoduro de potasio o yoduro de tetrabutylamonio en la mezcla de reacción.

El sustituyente "L¹" en el derivado éster (III) puede ser el grupo lábil que puede reemplazarse fácilmente con grupo amino, hidroxilo o mercapto, y ejemplos de los mismos incluyen átomo de halógeno tal como átomo de cloro, átomo de bromo, átomo de yodo; grupo alquilsulfonilo tal como grupo metanosulfonilo; grupo arilsulfonilo tal como grupo p-toluenosulfonilo, grupo 3-nitrobenzenosulfonilo y análogos.

El compuesto (II) y el compuesto (III) a utilizar en esta reacción pueden ser compuestos disponibles comercialmente y conocidos, o pueden prepararse fácilmente a partir de compuestos conocidos por utilización de métodos comunes.

Ejemplos del compuesto (II) incluyen 4-(terc-butoxi-carbonilamino)fenol, 4-(terc-butoxicarbonilamino)-2,3,5,6-tetrametilfenol, 2-(terc-butoxicarbonilamino)-3,4,5,6-tetra-metilfenol, 3-(terc-butoxicarbonilamino)-2,4,5,6-tetrametilfenol, 4-(terc-butoxicarbonilamino)-2,3,5-trimetilfenol, 4-(terc-butoxicarbonilamino)-2-cloro-3,5,6-trimetilfenol, 4-(terc-butoxicarbonilamino)-2,3,6-trimetilfenol, 4-(terc-butoxicarbonilamino)-2,3-dimetilfenol, 4-(terc-butoxicarbonilamino)-2,5-dimetilfenol, 2-(terc-butoxicarbonilamino)-4,6-dimetilfenol, 5-(terc-butoxicarbonilamino)-2-metoxifenol, 5-(terc-butoxicarbonilamino)-4-cloro-2-metoxifenol, 4-(terc-butoxicarbonilamino)-2,6-diclorofenol, 4-(terc-butoxicarbonilamino)-2,3,4,6-tetrametilnilina, 4-metoxi-2-metilnilina, 4-(terc-butoxicarbonilamino)-2,5-dimetilnilina, 2-(terc-butoxicarbonilamino)-4,5-dimetilnilina, 3-(terc-butoxicarbonilamino)-2,4,6-trimetilnilina, 2-(terc-butoxicarbonilamino)-4,5-dimetilnilina, 4-(terc-butoxicarbonilamino)-2,5-dicloroanilina, 4-(terc-butoxicarbonilamino)-2,6-dicloroanilina, 2-(terc-butoxicarbonilamino)-4,5-dicloroanilina, 4-(terc-butoxicarbonilamino)-2-metoxi-5-metilnilina, 4-(terc-butoxicarbonilamino)-2,5-dimetoxianilina, 4-(benciloxycarbonilamino)fenol, 4-(benciloxycarbonilamino)-2,3,5,6-tetrametilfenol, 2-(benciloxycarbonilamino)-3,4,5,6-tetrametilfenol, 3-(benciloxycarbonilamino)-2,4,5,6-tetrametilfenol, 4-(benciloxycarbonilamino)-2,3,5-trimetilfenol, 4-(benciloxycarbonilamino)-2-cloro-3,5,6-trimetilfenol, 4-(benciloxycarbonilamino)-2,3,6-trimetilfenol, 4-(benciloxycarbonilamino)-2,3-dimetilfenol, 4-(benciloxycarbonilamino)-2,5-dimetilfenol, 2-(benciloxycarbonilamino)-4,6-dimetilfenol, 5-(benciloxycarbonilamino)-2-metoxifenol, 5-(benciloxycarbonilamino)-4-cloro-2-metoxifenol, 4-(benciloxycarbonilamino)-2,6-diclorofenol, 4-(benciloxycarbonilamino)-2,3,4,6-tetrametilnilina, 4-metoxi-2-metilnilina, 4-(benciloxycarbonilamino)-2,5-dimetilnilina, 2-(benciloxycarbonilamino)-4,5-dimetilnilina, 3-(benciloxycarbonilamino)-2,4,6-trimetilnilina, 2-(benciloxycarbonilamino)-4,5-dimetilnilina, 4-(benciloxycarbonilamino)-2,5-dicloroanilina, 4-(benciloxycarbonilamino)-2,6-dicloroanilina, 2-(benciloxycarbonilamino)-4,5-dicloroanilina, 4-(benciloxycarbonilamino)-2-metoxi-5-metilnilina, 4-(benciloxycarbonilamino)-2,5-dimetoxianilina y análogos.

El compuesto éster de la fórmula (III) incluye, por ejemplo, bromoacetato de etilo, 2-bromopropionato de etilo, 2-bromo-2-metilpropionato de etilo, etcétera.

A continuación, el compuesto (IV) obtenido se hidrogena para convertirlo en el derivado de ácido carboxílico (V) por los métodos comunes.

El compuesto (IX) a utilizar para la reacción de condensación con el derivado de ácido carboxílico (V) arriba obtenido puede obtenerse de la manera siguiente.

A saber, en el primer paso, el derivado amina (VI) se trata por la reacción de condensación con el compuesto (VII) en el disolvente inerte, y en caso necesario en presencia de la base, con agitación a la temperatura ambiente hasta 180°C, para obtener el compuesto (VIII).

El disolvente inerte a utilizar en la reacción puede ser benceno, tolueno, xileno, dietilnilina, tetrahidrofurano, dietiléter, dimetilformamida, dimetil-sulfóxido, diclorometano, cloroformo, metanol, etanol, propan-2-ol, alcohol butílico y análogos.

- 5 La base a utilizar en la reacción anterior puede ser una base orgánica tal como trietilamina, diisopropilamina, y análogas, o una base inorgánica tal como hidruro de sodio, hidruro de potasio, terc-butóxido de sodio, terc-butóxido de potasio, etóxido de sodio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, carbonato de cesio y análogos.

- 10 La reacción del compuesto amina (VI) con el compuesto (VII) puede conducirse también en un disolvente inerte tal como benceno, tolueno, xileno y tetrahidrofurano, y en presencia de un catalizador de paladio tal como tris(dibencilideno-acetona)dipaladio, diacetoxipaladio, cloruro de paladio y análogos, un compuesto de coordinación con fosfina tal como tri-*n*-butilfosfina, tri-terc-butilfosfina, tri-*o*-tolilfosfina, BINAP y análogos, y una base tal como terc-butóxido de sodio y carbonato de cesio con agitación a 50°C hasta 150°C.

- 15 Adicionalmente, la reacción del compuesto (VII), en el cual el sustituto "L²" es un resto de ácido borónico, con el compuesto amina (VI) puede conducirse en un disolvente inerte, y en presencia de la base y 1,0 a 2,0 equivalentes molares de acetato de cobre (CuOAc₂), con agitación a la temperatura ambiente hasta 100°C [D.M.T. Chan *et al.*, *Tetrahedron Letters*, 39, 2933 (1998)].

- 20 El disolvente inerte a utilizar en esta reacción puede ser diclorometano, cloroformo y análogos, y la base puede ser trietilamina, piridina y análogos.

- El compuesto (VI) a utilizar para la reacción con el compuesto (VII) es un compuesto conocido [compárese R.H. Mach *et al.*, *J. Med. Chem.*, 36, 3707 (1993)], o puede prepararse fácilmente por los métodos descritos en el documento
25 EP 0184257 A1 [R.A. Stokbroekx, *et al.*].

A continuación, el grupo protector en el átomo de nitrógeno del compuesto (VIII) así obtenido se elimina para obtener el derivado de amina (IX).

- 30 Esta reacción puede variar dependiendo del grupo protector en el átomo de nitrógeno del compuesto (VIII). Por ejemplo, el compuesto (VIII) se trata con ácidos tales como ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido metanosulfónico, ácido trifluorometanosulfónico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, o ácido nítrico en un disolvente inerte tal como benceno, tolueno, acetonitrilo, tetrahidrofurano, dioxano, diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono, agua, metanol, etanol, y análogos.

- 35 Adicionalmente, la eliminación del grupo protector puede llevarse a cabo también por hidrogenólisis del compuesto (VIII) bajo 1 a 5 atmósferas de hidrógeno, en presencia de un catalizador tal como paladio-carbono, hidróxido de paladio, platino, u óxido de platino, en un disolvente inerte tal como metanol, etanol, alcohol isopropílico, acetato de etilo o ácido acético.

- 40 A continuación, el derivado de ácido carboxílico de la fórmula (V) se convierte en el derivado amina (X) por reacción con el compuesto (IX).

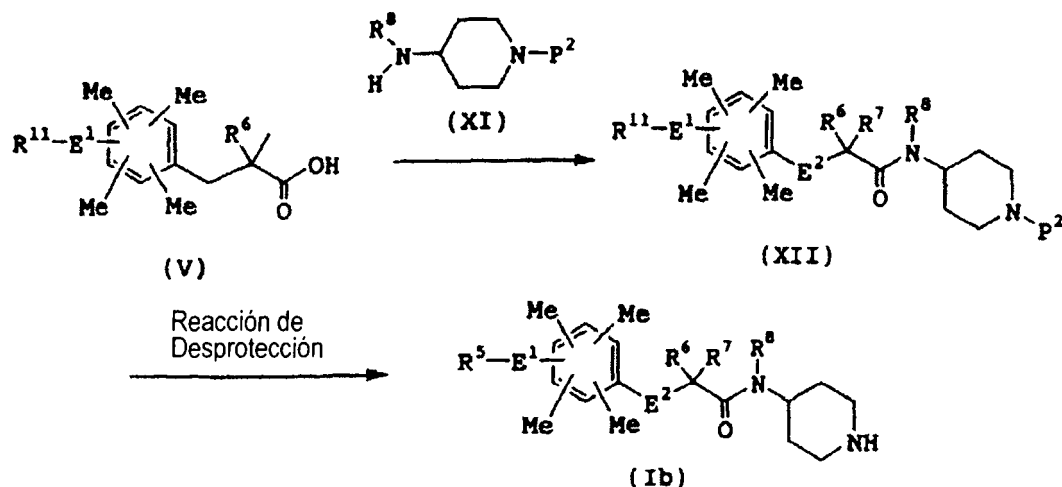
- 45 Las condiciones de reacción de esta reacción de amidación pueden variar de acuerdo con los métodos descritos en "Compendium for Organic Synthesis" (Wiley-Interscience: A Division of John Wiley & Sons Ltd.).

- Por ejemplo, el compuesto (V) se trata, opcionalmente en presencia de una base orgánica o inorgánica, con cianofosfonato de dietilo (DEPC), difenilfosforil-azida (DPPA), díciclohexilcarbodiimida (DCC), hidrocloreto de 1-etil-3-(dimetilaminopropil)carbodiimida o yoduro de 2-yodo-1-metil-piridinio, seguido por reacción con el compuesto
50 (IX) para obtener el compuesto amida (X). Ulteriormente, el compuesto (V) se convierte en el compuesto éster activado tal como haluro de ácido, anhídrido de ácido simétrico, o mezcla de anhídridos de ácido, y a continuación se hace reaccionar con el compuesto (IX) para obtener el compuesto amida (X).

- 55 El compuesto (X) así obtenido se convierte en los derivados de aminofenoxiacetamida de la fórmula (Ia), el compuesto de la presente invención, por la reacción de eliminación del grupo protector en el átomo de nitrógeno del compuesto amida (X).

- Aunque cada compuesto obtenido en el proceso 1 anterior puede utilizarse para la reacción siguiente sin purificación adicional, el mismo puede utilizarse también después de purificación adicional en caso necesario de manera
60 convencional tal como recristalización o cromatografía en columna, etcétera.

Proceso 2



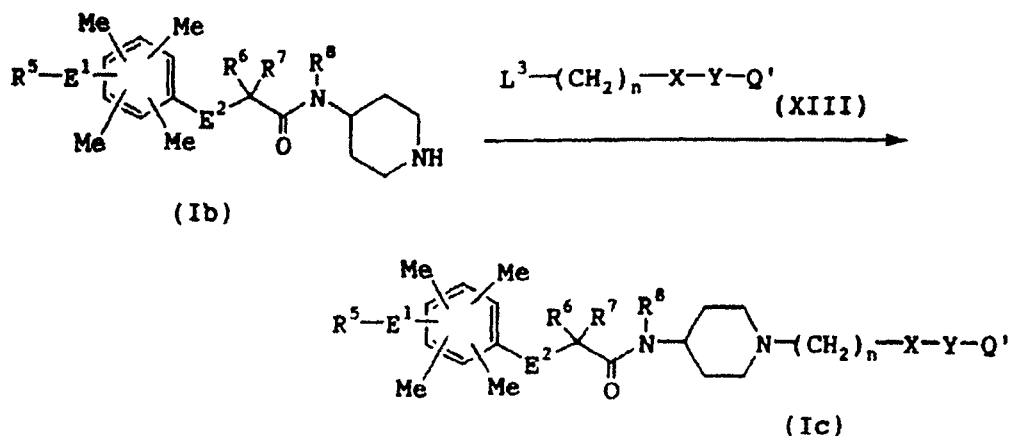
en donde, R^5 a R^8 , y R^{11} tienen las mismas definiciones que anteriormente, E^1 y E^2 tienen los mismos significados que se definen en la reivindicación 2, y P^2 es grupo terc-butoxicarbonilo, grupo etoxicarbonilo, grupo acetilo, grupo benciloxicarbonilo, grupo p-metoxibenciloxi-carbonilo, grupo bencilo o grupo trifluoroacetilo.

De acuerdo con este proceso 2, el derivado de aminofenoxiacetamida de la fórmula (Ib) puede sintetizarse a partir del compuesto (V') [en donde R^1 a R^4 son grupos metilo, E^1 es átomo de oxígeno y E^2 es $-NR^9$; o E^1 es $-NR^{10}$ y E^2 es átomo de oxígeno] obtenido en el proceso 1 arriba mencionado.

A saber, el compuesto (V') [en donde R^1 a R^4 son grupos metilo, E^1 es átomo de oxígeno y E^2 es $-NR^9$; o E^1 es $-NR^{10}$ y E^2 es átomo de oxígeno] se hace reaccionar con el compuesto (XI) para obtener el compuesto amida (XII), y a continuación, el grupo protector del compuesto resultante (XII) se elimina para dar el derivado de aminofenoxiacetamida (Ib).

Esta reacción puede llevarse a cabo de la misma manera que se ha descrito en el proceso 1.

Proceso 3



en donde R^5 a R^8 tienen las mismas definiciones que anteriormente, n , X , Y , Q' , E^1 y E^2 tienen los mismos significados que se definen en la reivindicación 2.

De acuerdo con este proceso 3, el derivado de aminofenoxiacetamida de la fórmula (Ic) puede obtenerse a partir del compuesto (Ib) por reacción con el compuesto (XIII).

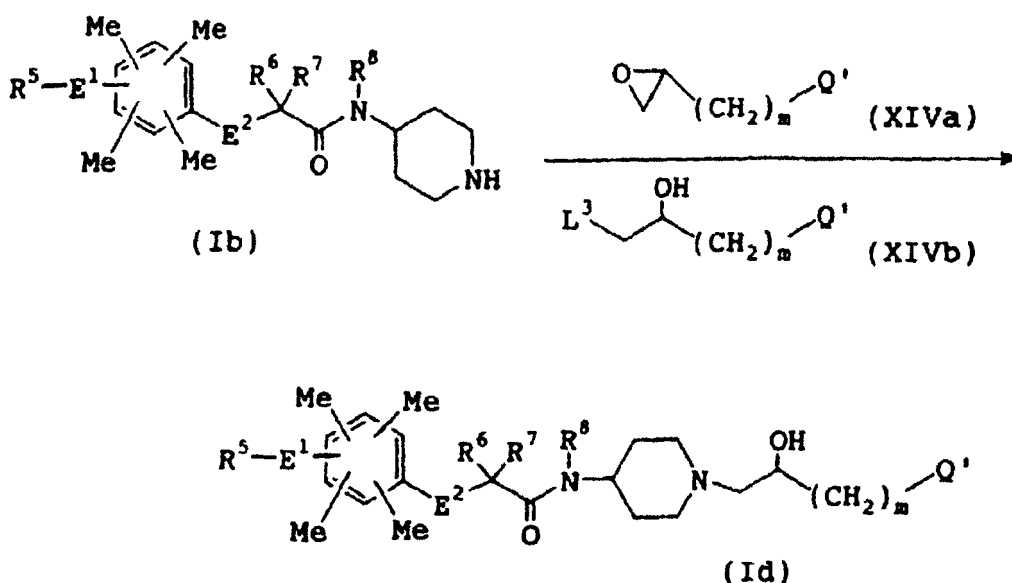
A saber, el compuesto (Ib) se hace reaccionar con 1,0 a 1,5 equivalentes molares del compuesto (XIII) en un disolvente inerte tal como benceno, tolueno, tetrahidrofurano, dioxano, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, acetonitrilo, acetona, éter, diclorometano, cloroformo y tetracloruro de carbono en presencia de una base, a -50°C hasta 120°C , con preferencia a -20°C hasta 80°C .

La base a utilizar en la reacción puede ser una base orgánica tal como trietilamina, diisopropiletilamina, piridina y análogos, o una base inorgánica tal como sodio, hidruro de sodio, potasio, hidruro de potasio, etóxido de sodio, terc-butóxido de sodio, carbonato de sodio, carbonato de potasio, carbonato de cesio, fluoruro de cesio, bicarbonato de sodio, bicarbonato de potasio y análogos. Yoduro de sodio, yoduro de potasio o yoduro de tetrabu-tilamonio pueden

El sustituyente "L³" en el compuesto (XIII) es el grupo lábil, que puede reemplazarse fácilmente por grupo amino, incluyendo ejemplos del mismo átomo de halógeno tal como átomo de cloro, átomo de bromo, átomo de yodo; grupo alquilsulfonilo tal como grupo metanosulfonilo; grupo arilsulfonilo tal como grupo p-toluenosulfonilo y análogos.

En este proceso 3, puede producirse también el derivado de aminofenoxiacetamida de la fórmula (Ic).

Proceso 4



en donde R⁵ a R⁸ y L³ tienen las mismas definiciones que se han mencionado anteriormente, Q', E¹ y E² tienen los mismos significados que se definen en la reivindicación 2, y n es un número entero de 0 a 3.

De acuerdo con este proceso 4, el derivado de aminofenoxiacetamida de la fórmula (Id) de la presente invención puede obtenerse por la reacción del compuesto (Ib), obtenido en el proceso 2 arriba mencionado, con el compuesto (XIVa) o el compuesto (XIVb).

Por ejemplo, el compuesto (Ib) se hace reaccionar con 0,9 a 1,5 equivalentes molares del compuesto (XIVa) o (XIVb) en un disolvente inerte a una temperatura que va desde la temperatura ambiente hasta aproximadamente 200°C, con preferencia a aproximadamente 50°C hasta aproximadamente 150°C, para producir la aminofenoxiacetamida de la fórmula (Id).

El disolvente inerte a utilizar en la reacción puede ser benceno, tolueno, tetrahidrofurano, dietil-éter, etilenglicol-dimetil-éter, dioxano, dimetilformamida, dimetil-sulfóxido, acetonitrilo, metanol, etanol, alcohol isopropílico, alcohol terc-butílico, etilenglicol y análogos.

Ejemplos del compuesto (XIVa) incluyen epibromhidrina, epiclorhidrina, (R)-epiclorhidrina, (S)-epiclorhidrina y análogos, y ejemplos del compuesto (XIVb) incluyen tosilato de glicidilo, (R)-tosilato de glicidilo, (S)-tosilato de glicidilo, (R)-3-nitro-bencenosulfonato de glicidilo, (S)-3-nitrobencenosulfonato de glicidilo, (R)-4-nitro-benzoato de glicidilo, (S)-4-nitrobenzoato de glicidilo, cloruro de glicidiltrimetilamonio y análogos.

En este proceso 4, puede producirse también el derivado de aminofenoxiacetamida de la fórmula (Id).

Los derivados de aminofenoxiacetamida de la fórmula (I) así obtenidos pueden aislarse y purificarse de manera convencional, tal como recrystalización, cromatografía en columna y métodos análogos.

Adicionalmente, cada isómero contenido en los compuestos de la fórmula (I) de la presente invención puede obtenerse por resolución de la mezcla de isómeros de estos compuestos por los métodos convencionales, tales como recrystalización, cromatografía en columna, HPLC y análogos, o por utilización de reactivos ópticamente activos.

ES 2 291 308 T3

Los derivados de aminofenoxiacetamida de la presente invención representados por la fórmula (I) pueden utilizarse en la forma de bases libres o sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables adecuadas de los mismos. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden obtenerse por el tratamiento del compuesto (I) con un ácido inorgánico o un ácido orgánico en un disolvente orgánico adecuado tal como éter, tetrahidrofurano, diclorometano, cloroformo, benceno, tolueno, metanol, isopropanol, etanol y análogos.

Ejemplos del ácido inorgánico incluyen ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido peryódico y análogos. Adicionalmente, ejemplo del ácido orgánico incluyen ácido fórmico, ácido acético, ácido butírico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido propiónico, ácido valérico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico, ácido benzoico, ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico y análogos.

Los derivados de aminofenoxiacetamida de la presente invención representados por la fórmula (I) o sus sales farmacéuticamente aceptables exhiben una toxicidad baja y pueden administrarse *per se*. Sin embargo, los mismos pueden convertirse en la forma de composiciones farmacéuticamente aceptables con los vehículos farmacéuticamente aceptables convencionales para mejora o tratamiento de diversas clases de enfermedades debidas a trastorno cerebral funcional u orgánico.

Las formas de dosificación pueden incluir formulaciones orales tales como cápsulas, tabletas o formulaciones parenterales tales como soluciones inyectables que contienen el compuesto de la fórmula (I) *per se*, o utilizando los excipientes convencionales. Por ejemplo, las cápsulas pueden prepararse por mezcla del compuesto de la fórmula (I) en forma de polvo con un excipiente adecuado tal como lactosa, almidón o derivados de los mismos o derivados de celulosa, e introducirse luego en cápsulas de gelatina.

Asimismo, las tabletas se pueden preparar por mezcla de los ingredientes activos con los excipientes arriba mencionados, aglomerantes tales como sodio-carboximetilcelulosa, ácido algínico o goma arábica y agua, seguido en caso necesario por transformación en gránulos de la mixtura resultante. A continuación, la mixtura puede mezclarse ulteriormente con lubricantes tales como talco o ácido esteárico, y comprimirse en tabletas por medio de una máquina común de fabricación de tabletas.

Las formulaciones inyectables para ruta parenteral pueden prepararse también por disolución del compuesto de la fórmula (I) o sus sales en solución destilada estéril o solución salina fisiológica estéril con adyuvante de disolución, y llenado de aquél en amplio [sic]. Puede utilizarse un estabilizador o tampón en la solución inyectable, y la solución inyectable puede administrarse por vía intravenosa o por goteo.

En la administración del compuesto de la fórmula (I), que posee efecto neuroprotector por inducción de CalbindinD-28k, una de las proteínas de fijación de Ca^{2+} , la dosis terapéuticamente eficaz para la mejora de los trastornos cerebrales funcionales y orgánicos no está limitada particularmente y puede variar dependiendo de las diversas clases de factores. Estos factores pueden ser el estado del paciente, la gravedad de la enfermedad, la edad, la existencia de una complicación, la ruta de administración, la formulación, así como el número de veces para administración.

Una dosis diaria usual recomendada para administración oral está comprendida en el intervalo de 0,1-1000 mg/día/persona, preferiblemente 1-500 mg/día/persona, mientras que una dosis diaria recomendada usual para administración parenteral está comprendida dentro del intervalo de 1/100 a 1/2 basada en la dosis de la administración oral. Estas dosis pueden variar también dependiendo de la edad, así como del estado del paciente.

Ejemplos

La presente invención se ilustra con mayor detalle por la vía de los ejemplos que siguen, no obstante lo cual debe indicarse que la presente invención no está limitada en modo alguno por estos ejemplos. Los ejemplos marcados con un asterisco (*) se dan únicamente para referencia y/o comparación.

Los números de los compuestos en los ejemplos que siguen son idénticos a los de la Tabla mencionada más adelante.

Ejemplo 1*

2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilfenoxi)-N-metil-N-(4-piperidinil)acetamida (1)

Una solución de 457 mg de ácido 2-[4-(terc-butoxicarbonil-amino)-2,3,5,6-tetrametilfenoxi]acético, 363 mg de 1-(terc-butoxi-carbonilamino)-4-metilamino-piperidina, 2,16 g de anhídrido del ácido propano-fosfónico al 25% [Japanese Patent Kokai Showa 55-100346] en solución de acetato de etilo y 985 μl de trietilamina en 5 ml de diclorometano se agitó durante una noche a la temperatura ambiente. Después de la reacción, se añadió una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio a la mezcla de reacción, y la mezcla se extrajo con diclorometano. El extracto se lavó con solución salina, se secó y se concentró a presión reducida para dar un residuo. El residuo obtenido se disolvió en 8 ml de diclorometano, y se añadieron a esta solución 2 ml de ácido trifluoroacético bajo enfriamiento con hielo,

ES 2 291 308 T3

después de lo cual la mezcla se agitó durante una hora a la temperatura ambiente. Después de eliminación del disolvente, el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (diclorometano:metanol = 30:1) sobre gel de sílice recubierto con amina (Fuji Silysia Chemical Ltd.) para dar 192 mg (42%) del compuesto (1) arriba mencionado.

Ejemplo 2*

2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilfenoxi)-N-metil-(4-piperidinil)propanamida (2)

El compuesto del título (2) se obtuvo a partir de ácido 2-[4-(terc-butoxicarbonilamino)-2,3,5,6-tetrametil-fenoxi] propiónico y 1-(terc-butoxi-carbonilamino)-4-metilaminopiperidina del mismo modo que en el Ejemplo 1.

Ejemplo 3*

2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilfenoxi)-2-metil-N-metil-N-(4-piperidinil)-propanamida (3)

El compuesto del título (3) se obtuvo a partir de ácido 2-[4-(terc-butoxicarbonilamino)-2,3,5,6-tetrametil-fenoxi]-2-metil-propiónico y 1-(terc-butoxi-carbonil-amino)-4-metilaminopiperidina de la misma manera que en el Ejemplo 1.

Ejemplo 4*

2-(2-Amino-3,4,5,6-tetrametilfenoxi)-N-metil-N-(4-piperidinil)acetamida (4)

El compuesto del título (4) se obtuvo a partir de ácido 2-[2-(terc-butoxicarbonilamino)-3,4,5,6-tetrametil-fenoxi] acético y 1-(terc-butoxi-carbonilamino)-4-metilaminopiperidina de la misma manera que en el Ejemplo 1.

Ejemplo 5*

2-(3-Amino-2,4,5,6-tetrametilfenoxi)-N-metil-N-(4-piperidinil)acetamida (5)

El compuesto del título (5) se obtuvo a partir de ácido 2-[3-(terc-butoxicarbonilamino)-2,4,5,6-tetrametil-fenoxi] acético y 1-(terc-butoxi-carbonilamino)-4-metilaminopiperidina de la misma manera que en el Ejemplo 1.

Ejemplo 6

2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilfenoxi)-N-metil-N-(1-fenil-4-piperidinil)acetamida (6)

A una solución mixta de 99 mg del compuesto (1) obtenido en el Ejemplo 1 y 42,3 μ l de bromuro de fenetilo en 2 ml de acetonitrilo se añadieron 65 μ l de trietilamina, y la mezcla se agitó durante 5 horas a 60°C. Después de la reacción, se añadió a la mezcla de reacción solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. El extracto se lavó con solución salina, se secó y se concentró a presión reducida para dar el residuo. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna (diclorometano:éter = 1:1) sobre gel de sílice recubierto con amina (Fuji Silysia Chemical Ltd.) para dar 86 mg (65%) del compuesto (6) arriba mencionado.

Ejemplo 7

2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilfenoxi)-N-[1-(2-anilino-2-oxoetil)-4-piperidinil]-N-metilacetamida (7)

El compuesto del título (7) se obtuvo a partir del compuesto (1) obtenido en el Ejemplo 1 y N-fenil-2-bromoacetamida de la misma manera que en el Ejemplo 6.

Ejemplo 8*

2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilfenoxi)-N-(1-benzoil-4-piperidinil)-N-metilacetamida (8)

El compuesto del título (8) se obtuvo a partir del compuesto (1) obtenido en el Ejemplo 1 y cloruro de benzoilo de la misma manera que en el Ejemplo 6.

ES 2 291 308 T3

Ejemplo 9*

2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilfenoxi)-N-(1-butil-4-piperidinil)-N-metilacetamida (9)

5 El compuesto del título (9) se obtuvo a partir del compuesto (1) obtenido en el Ejemplo 1 y bromuro de butilo de la misma manera que en el Ejemplo 6.

Ejemplo 10*

10 *2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilfenoxi)-N-[1-(2-fenil-2-oxoetil)-4-piperidinil]-N-metilacetamida (10)*

15 El compuesto del título (10) se obtuvo a partir del compuesto (1) obtenido en el Ejemplo 1 y bromuro de fenacilo de la misma manera que en el Ejemplo 6.

Ejemplo 11*

20 *2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilfenoxi)-N-[1-(2-hidroxi-2-feniletíl)-4-piperidinil]-N-metilacetamida (11)*

A una solución mixta del compuesto (10) obtenido en el Ejemplo 10 en metanol se añadieron 1,0 equivalentes de borohidruro de sodio a 0°C, y la mezcla se agitó durante 1,5 horas a la temperatura ambiente. Después de la reacción se eliminó el disolvente a presión reducida, y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (diclorometano:metanol = 20:1) sobre gel de sílice recubierto con amina (Fuji Silysia Chemical Ltd.) para dar del
25 compuesto arriba mencionado (11) con un rendimiento de 58%.

Ejemplo 12*

30 *2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilfenoxi)-N-(1-ciclopropilmetil-4-piperidinil)-N-metilacetamida (12)*

El compuesto del título (12) se obtuvo a partir del compuesto (1) obtenido en el Ejemplo 1 y bromuro de ciclopropilmetilo de la misma manera que en el Ejemplo 6.

Ejemplo 13

40 *2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilfenoxi)-N-metil-N-[1-(trans-2-fenil-1-ciclopropilmetil)-4-piperidinil]-metilacetamida (13)*

El compuesto del título (13) se obtuvo a partir del compuesto (1) obtenido en el Ejemplo 1 y bromuro de *trans*-2-fenil-1-ciclopropilmetilo de la misma manera que en el Ejemplo 6.

Ejemplo 14*

2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilfenoxi)-N-metil-N-[1-(2-fenoxietil)-4-piperidinil]acetamida (14)

50 El compuesto del título (14) se obtuvo a partir del compuesto (1) obtenido en el Ejemplo 1 y bromuro de 2-fenoxietilo de la misma manera que en el Ejemplo 6.

Ejemplo 15*

55 *2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilfenoxi)-N-metil-N-[1-[2-(N-metilanilino)-2-oxoetil]-4-piperidinil]-acetamida (15)*

El compuesto del título (15) se obtuvo a partir del compuesto (1) obtenido en el Ejemplo 1 y N-metil-N-fenil-2-bromoacetamida de la misma manera que en el Ejemplo 6.

Ejemplo 16*

2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilfenoxi)-N-metil-N-[1-[2-(4-morfolinil)etil]-4-piperidinil]acetamida (16)

65 El compuesto del título (16) se obtuvo a partir del compuesto (1) obtenido en el Ejemplo 1 e hidrocloreto de N-(2-bromoetil)morfolina de la misma manera que en el Ejemplo 6.

ES 2 291 308 T3

Ejemplo 17*

2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilfenoxi)-N-[1-[2-(2-hidroxi-2-feniletoksi)etil]-4-piperidinil]-N-metil-acetamida (17)

- 5 El compuesto del título (17) se obtuvo a partir del compuesto (1) obtenido en el Ejemplo 1 y 2-(cloroetoxi)-1-feniletanol de la misma manera que en el Ejemplo 6.

Ejemplo 18*

10 *2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilfenoxi)-N-[1-(4-ciano-bencil)-4-piperidinil]-N-metilacetamida (18)*

- 15 El compuesto del título (18) se obtuvo a partir del compuesto (1) obtenido en el Ejemplo 1 bromuro de 4-ciano-bencilo de la misma manera que en el Ejemplo 6.

Ejemplo 19*

20 *4-({4-[[1-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilfenoxi)-acetil]-(metil)amino]-1-piperidinil}metil)benzamida (19)*

- 25 A una solución mixta de 82 mg del compuesto (18) obtenido en el Ejemplo 18 en metanol se añadieron 58 µl de solución acuosa de peróxido de hidrógeno al 30% y 150 µl de solución acuosa 3 N de hidróxido de sodio bajo enfriamiento con hielo, y la mezcla de reacción se agitó durante 6 horas a la temperatura ambiente. Después de la reacción, se añadió solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio a la mezcla de reacción, y se extrajo con diclorometano. La capa orgánica se lavó con solución salina saturada, se secó y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (diclorometano:metanol = 10:1) sobre gel de sílice recubierto con amina (Fuji Silysia Chemical Ltd.) para dar 66 mg (77%) del compuesto arriba mencionado (19).

Ejemplo 20*

2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilfenoxi)-N-metil-N-[1-[2-feniltio]etil]-4-piperidinil]acetamida (20)

- 35 El compuesto del título (20) se obtuvo a partir del compuesto (1) obtenido en el Ejemplo 1 y sulfuro de 2-(cloroetil) fenilo de la misma manera que en el Ejemplo 6.

Ejemplo 21*

40 *2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilfenoxi)-N-metil-N-[1-(2-propinil)-4-piperidinil]acetamida (21)*

- 45 El compuesto del título (21) se obtuvo a partir del compuesto (1) obtenido en el Ejemplo 1 y bromuro de propargilo de la misma manera que en el Ejemplo 6.

Ejemplo 22

2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilfenoxi)-N-metil-N-[1-(1-metil-2-feniletil)-4-piperidinil]acetamida (22)

- 50 El compuesto del título (22) se obtuvo a partir del compuesto (1) obtenido en el Ejemplo 1 y 2-bromo-1-fenilpropano de la misma manera que en el Ejemplo 6.

Ejemplo 23*

55 *2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilfenoxi)-N-(1-ciclopropilmetil-4-piperidinil)-N-metilpropanamida (23)*

- 60 El compuesto del título (23) se obtuvo a partir del compuesto (2) obtenido en el Ejemplo 2 y bromuro de ciclopropilmetilo de la misma manera que en el Ejemplo 6.

Ejemplo 24*

65 *2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilfenoxi)-N-(1-butil-4-piperidinil)-N-metilpropanamida (24)*

- El compuesto del título (24) se obtuvo a partir del compuesto (2) obtenido en el Ejemplo 2 y 1-bromobutano de la misma manera que en el Ejemplo 6.

ES 2 291 308 T3

Ejemplo 25*

2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilfenoxi)-N-metil-N-[1-[2-(4-morfolinil)etil]-4-piperidinil]propan-amida (25)

5 El compuesto del título (25) se obtuvo a partir del compuesto (2) obtenido en el Ejemplo 2 e hidrocloreuro de N-(2-bromoetil)morfolina de la misma manera que en el Ejemplo 6.

Ejemplo 26

10 2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilfenoxi)-N-metil-N-[1-(trans-2-fenil-1-ciclopropilmetil)-4-piperidinil]-propanamida (26)

El compuesto del título (26) se obtuvo a partir del compuesto (2) obtenido en el Ejemplo 2 y bromuro de *trans*-2-fenil-1-ciclopropilmetilo de la misma manera que en el Ejemplo 6.

Ejemplo 27*

2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilfenoxi)-N-metil-N-[1-[2-(N-metilanilino)-2-oxoetil]-4-piperidinil]-propanamida (27)

20 El compuesto del título (27) se obtuvo a partir del compuesto (2) obtenido en el Ejemplo 2 y N-metil-N-fenil-2-bromoacetamida de la misma manera que en el Ejemplo 6.

Ejemplo 28

25 2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilfenoxi)-N-2-dimetil-N-[1-(2-feniletil)-4-piperidinil]propanamida (28)

El compuesto del título (28) se obtuvo a partir del compuesto (3) obtenido en el Ejemplo 3 y bromuro de fenetilo de la misma manera que en el Ejemplo 6.

Ejemplo 29

2-(2-Amino-3,4,5,6-tetrametilfenoxi)-N-metil-N-[1-(2-fenetil)-4-piperidinil]acetamida (29)

35 El compuesto del título (29) se obtuvo a partir del compuesto (4) obtenido en el Ejemplo 4 y bromuro de fenetilo de la misma manera que en el Ejemplo 6.

Ejemplo 30*

40 2-(2-Amino-3,4,5,6-tetrametilfenoxi)-N-[1-(2-fenil-2-oxoetil)-4-piperidinil]-N-metilacetamida (30)

El compuesto del título (30) se obtuvo a partir del compuesto (4) obtenido en el Ejemplo 4 y bromuro de fenacilo de la misma manera que en el Ejemplo 6.

Ejemplo 31*

50 2-(2-Amino-3,4,5,6-tetrametilanilino)-N-metil-N-[1-(4-fenoxifenil)-4-piperidinil]acetamida (31)

El compuesto del título (31) se obtuvo a partir de ácido 2-[2-(terc-butoxicarbonilamino)-3,4,5,6-tetrametil-anilino] acético y 1-(4-fenoxifenil)-4-metilamino-piperidina de la misma manera que en el Ejemplo 1.

Ejemplo 32*

55 2-(2-Amino-3,4,5,6-tetrametilanilino)-N-[1-[4-(4-fluorobencil)fenil]-4-piperidinil]N-metilacetamida (32)

60 El compuesto del título (32) se obtuvo a partir de ácido 2-[2-(terc-butoxicarbonilamino)-3,4,5,6-tetrametil-anilino] acético y 1-[4-(4-fluorobencil)fenil]-4-metil-aminopiperidina de la misma manera que en el Ejemplo 1.

Ejemplo 33*

65 2-(3-Amino-2,4,5,6-tetrametilfenoxi)-N-(1-benzoil-4-piperidinil)N-metilacetamida (33)

El compuesto del título (33) se obtuvo a partir del compuesto (5) obtenido en el Ejemplo 5 y cloruro de benzoílo de la misma manera que en el Ejemplo 6.

ES 2 291 308 T3

Ejemplo 34*

2-(3-Amino-2,4,5,6-tetrametilfenoxi)-N-(1-(4-ciano-bencil)-4-piperidinil)-N-metilacetamida (34)

5 El compuesto del título (34) se obtuvo a partir del compuesto (5) obtenido en el Ejemplo 5 y bromuro de 4-cianobencilo de la misma manera que en el Ejemplo 6.

Ejemplo 35

10

2-(3-Amino-2,4,5,6-tetrametilfenoxi)-N-metil-N-[1-(2-feniletil)-4-piperidinil]-acetamida (35)

El compuesto del título (35) se obtuvo a partir del compuesto (5) obtenido en el Ejemplo 5 y bromuro de fenetilo de la misma manera que en el Ejemplo 6.

15

Ejemplo 36*

2-(4-Amino-2,3,5-trimetilfenoxi)-N-[1-(4-fluorofenil)-4-piperidinil]-N-metilacetamida (36)

20

El compuesto del título (36) se obtuvo a partir de ácido 2-[4-(terc-butoxicarbonilamino)-2,3,5-trimetil-fenoxi] acético y 1-(4-fluorofenil)-4-metilaminopiperidina de la misma manera que en el Ejemplo 1.

Ejemplo 37*

2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilanilino)-N-[1-(1,3-benzotiazol-2-il)-4-piperidinil]-N-metilacetamida (37)

25

El compuesto del título (37) se obtuvo a partir de ácido 2-[4-(terc-butoxicarbonilamino)-2,3,5,6-tetrametil-anilino] acético y 1-(1,3-benzotiazol-2-il)-4-metilamino-piperidina de la misma manera que en el Ejemplo 1.

30

Ejemplo 38*

2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilanilino)-N-[1-(4-fluorofenil)-4-piperidinil]-N-metilacetamida (38)

35

El compuesto del título (38) se obtuvo a partir de ácido 2-[4-(terc-butoxicarbonilamino)-2,3,5,6-tetrametil-anilino] acético y 1-(4-fluorofenil)-4-metilamino-piperidina de la misma manera que en el Ejemplo 1.

40

Ejemplo 39*

2-(3-Amino-2,4,6-trimetilanilino)-N-[1-(4-fluorofenil)-4-piperidinil]-N-metilacetamida (39)

45

El compuesto del título (39) se obtuvo a partir de ácido 2-[3-(terc-butoxicarbonilamino)-2,4,6-trimetil-anilino] acético y 1-(4-fluorofenil)-4-metilamino-piperidina de la misma manera que en el Ejemplo 1.

Ejemplo 40*

50

2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilanilino)-N-metil-N-[1-(4-fenoxifenil)-4-piperidinil]propanamida (40)

El compuesto del título (40) se obtuvo a partir de ácido 2-[4-(terc-butoxicarbonilamino)-2,3,5,6-tetrametil-anilino] propiónico y 1-(4-fenoxifenil)-4-metilamino-piperidina de la misma manera que en el Ejemplo 1.

55

Ejemplo 41*

2-(4-Amino-2,3,5,6-tetrametilanilino)-N-(1-[1,1'-bifenil]-4-il-4-piperidinil)-N-metilpropanamida (41)

60

El compuesto del título (41) se obtuvo a partir de ácido 2-[4-(terc-butoxicarbonilamino)-2,3,5,6-tetrametil-anilino] propiónico y 1-[1,1'-bifenil]-4-il-N-metil-4-piperidin-amina de la misma manera que en el Ejemplo 1.

Los datos fisicoquímicos de los compuestos obtenidos por los ejemplos arriba mencionados se resumen en las tablas 1 a 7 siguientes.

65

Tabla 1

No.	Estructura Química	Propiedades	IR (KBr) cm ⁻¹	¹ H-NMR (CDCl ₃)
1 *		polvo blanco	(CHCl ₃) 2950, 2399, 1734, 1652, 1558, 1472, 1418, 1319, 1083	1.53-1.85(4H, m), 2.08(3H, s), 2.09(3H, s), 2.23(3H, s), 2.24(3H, s), 2.53(1H, m), 2.76(1H, m), 2.88&2.92(3H, todos s), 3.15(2H, m), 3.48(2H, brs), 3.73&4.63(1H, todos m), 4.31&4.38(2H, todos s),
2 *		polvo blanco	3378, 2938, 1638 1472, 1418, 1370 1286, 1257, 1077	1.42 & 1.43 (3H, d, J = 6.5 Hz), 1.54-1.72 (4H, m), 2.08 (6H, s), 2.19 (6H, s), 2.35 & 2.53 (1H, todos m), 2.74 (1H, m), 2.80 & 2.84 (3H, todos s), 3.08 (2H, m), 3.44 (2H, brs), 3.80 (0.5H, m), 4.58 (1.5H, m)
3 *		polvo amarillito pálido	(CHCl ₃) 2401, 1624, 1474 1412, 1384, 1256 1145, 1076	1.41 (6H, s), 1.61-1.80 (4H, m), 2.04 & 2.07 & 2.08 & 2.11 & 2.13 (12H, todos s), 2.65 (1H, m), 2.75 (1H, m), 2.89 & 3.34 (3H, todos s), 3.14 (2H, m), 3.45 (2H, brs), 4.60 & 4.90 (1H, m)
4 *		polvo blanco	(CHCl ₃) 2401, 1654, 1474 1238, 1077, 1044 928	1.49-1.73 (4H, m), 2.10 (3H, s), 2.13 (3H, s), 2.17 (3H, s), 2.22 (3H, s), 2.53-2.81(2H, m), 2.76&2.91 (3H, todos s), 3.14 (2H, m), 3.40&4.61 (1H, m), 3.96-4.33 (2H, brs), 4.47&4.51 (2H, todos s)
5 *		Acete amarillo	(CHCl ₃) 2932, 2402, 1654 1451, 1320, 1122 1084, 1050	1.61-1.81 (4H, m), 2.08 & 2.13 & 2.18 & 2.22 (12H todos s), 2.63 (2H, m), 2.77 (2H, m), 2.88 & 2.92 (3H, todos s), 3.16 & 3.18 (2H, todos m), 3.52 (2H, brs), 3.72 & 4.63 (1H, todos m), 4.34 & 4.38 (2H, todos s)

Tabla 2

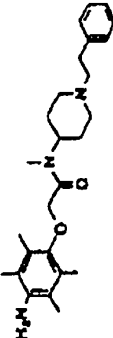
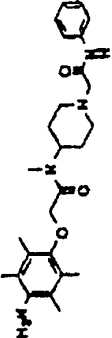
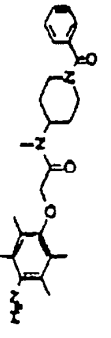
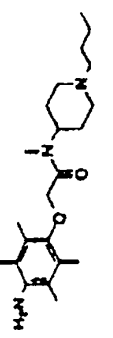
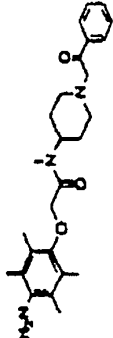
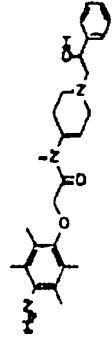
No.	Estructura Química	Propiedades	IR (KBr) cm ⁻¹	¹ H-NMR (CDCl ₃)
6		polvo blanco (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 281-283°C	3432, 2928, 2345, 1646, 1534, 1478, 1455, 1304, 1248, 1098 (sal 2-HCl)	1.56-2.29(6H, m), 2.09(8H, s), 2.23(3H, s), 2.24(3H, s), 2.61(2H, m), 2.75-2.85(2H, m), 2.88&2.92(3H, todos s), 3.09(2H, m), 3.47(2H, brs), 3.69&4.58(1H, todos m), 4.32&4.35(2H, todos s), 1.20(3H, m), 7.24-7.33(2H, m)
7		polvo blanco (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 196-200°C	3425, 2950, 1892, 1836, 1558, 1498, 1447, 1314, 1248, 1097 (sal 2-HCl)	1.68-2.04(4H, m), 2.09(6H, s), 2.23(6H, s), 2.29-2.55(2H, m), 2.94&2.96(3H, todos s), 3.00(2H, m), 3.14&3.16(2H, todos s), 3.49(2H, brs), 3.81&4.57(1H, todos m), 4.33&4.36(2H, todos s), 7.12(1H, m), 7.35(2H, m), 7.57(2H, d), 8.96&9.06(1H, todos brs)
8 *		polvo blanco (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 202-203°C	3457, 2922, 2586, 1633, 1530, 1448, 1318, 1250, 1108, 1043, 713 (sal 2-HCl)	1.78 (4H, m), 2.08 (6H, s), 2.22 (6H, s), 2.89 (3H, s), 2.89-3.08 (2H, brs), 3.47 (2H, brs), 3.87 (1H, brs), 4.06 & 4.78 (1H, todos m), 4.32 & 4.37 (2H, todos s), 4.82 (1H, brs), 7.41 (5H, m)
9 *		polvo blanco (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 229-230°C	3428, 2956, 1648, 1522, 1463, 1419, 1309, 1248, 1108, 1091, 1048 (sal 2-HCl)	0.92 (3H, m), 1.33 & 1.45 (4H, todos m), 1.74-2.32 (8H, m), 2.08 (6H, s), 2.22 (6H, s), 2.88 & 2.90 (3H, todos s), 2.99 & 3.01 (2H, todos m), 3.46 (2H, brs), 3.68 & 4.11 & 4.54 (1H, todos m), 4.31 & 4.34 (2H, todos s)
10 *		polvo blanco (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 201-203°C	3417, 2938, 1694, 1646, 1598, 1450, 1417, 1247, 1101, (sal 2-HCl)	1.69 (2H, m), 1.89 (1H, m), 2.08 (6H, s), 2.22 (6H, s), 2.30 (1H, m), 2.89 (3H, s), 2.91 & 3.09 (4H, todos m), 3.74 & 4.59 & 4.81 (1H, todos m), 3.82 & 3.85 (2H, todos s), 4.32 & 4.35 (2H, todos s), 7.46 & 7.57 (3H, todos m), 7.97 (2H, m)
11 *		polvo blanco (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 229-230°C	3375, 2945, 1646, 1480, 1248, 1100, 700 (sal 2-HCl)	1.73-2.56 (8H, m), 2.09 (6H, s), 2.23 (6H, s), 2.90 & 3.25 (2H, todos m), 2.90 & 2.92 (3H, todos s), 3.47 (2H, brs), 3.76 & 4.58 (1H, todos m), 4.33 & 4.35 (2H, todos s), 4.71 & 4.73 (1H, todos m), 7.36 (5H, m)

Tabla 3

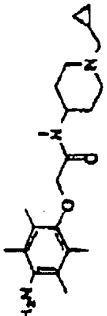
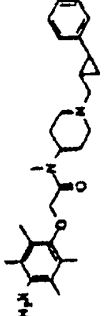
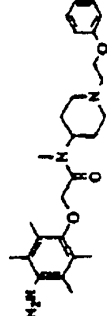
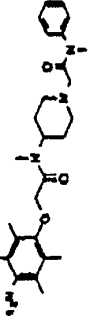
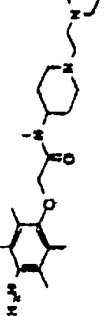
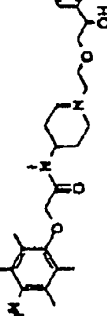
No.	Estructura Química	Propiedades	IR (KBr) cm ⁻¹	¹ H-NMR (CDCl ₃)
12 *		polvo blanco (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 223-225°C	(sal 2-HCl) 3425, 2932, 1648, 1480, 1414, 1306, 1248, 1095, 1032.	0.11 (2H, m), 0.41 (2H, m), 0.75 & 0.95 (12H, todos m), 1.65-2.18 (6H, m), 1.98 (6H, s), 2.10 & 2.13 (6H, todos s), 2.78 & 2.81 (3H, todos s), 3.05 (2H, m), 3.37 (2H, bra), 3.58 & 4.44 (1H, todos m), 4.21 & 4.24 & 4.27 (2H, todos s)
13		polvo blanco (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 216-217°C	(sal 2-HCl) 3431, 2941, 1637, 1498, 1460, 1417, 1248, 1088, 1032.	0.82 (1H, m), 0.97 (1H, m), 1.23 (1H, m), 1.66-2.22 (7H, m), 2.08 (6H, s), 2.22 (6H, s), 2.37 (1H, m), 2.53 (1H, m), 2.87 & 2.90 (3H, todos s), 3.12 (2H, m), 3.46 (2H, bra), 3.67 & 4.54 (1H, todos m), 4.31 & 4.33 (2H, todos s), 7.04 (2H, m), 7.14 (1H, m), 7.25 (2H, m)
14 *		polvo blanco (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 218-219°C	(sal 2-HCl) 3417, 2950, 1638, 1598, 1494, 1413, 1305, 1248, 1099, 1044, 758	1.61-2.38 (6H, m), 2.09 (6H, s), 2.22 (6H, s), 2.82 (2H, m), 2.88 & 2.91 (3H, todos s), 3.08 (2H, m), 3.46 (2H, bra), 3.70 & 4.56 (1H, todos m), 4.09 (2H, m), 4.31 & 4.34 (2H, todos s), 6.90 (3H, m), 7.28 (2H, m)
15 *		polvo blanco (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 210-212°C	(sal 2-HCl) 3414, 2938, 1663, 1495, 1452, 1388, 1248, 1088, 703	1.79-2.20 (6H, m), 2.07 (6H, s), 2.17 & 2.21 (6H, todos s), 2.84 & 2.88 (3H, todos s), 2.92 (4H, m), 3.27 (3H, s), 3.47 (2H, m), 3.57 & 4.47 (1H, m), 4.29 & 4.30 (2H, todos s), 7.18 (2H, d = 7.3 Hz, J = 17.2 Hz), 7.36-7.45 (3H, m)
16 *		polvo blanco (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 290-293°C	(sal 2-HCl) 3442, 2945, 2402, 1688, 1452, 1306, 1294, 1248, 1121, 1102, 1060, 878	1.75-2.23 (6H, m), 2.09 (6H, s), 2.22 (6H, s), 2.50 (8H, m), 2.87 & 2.90 (3H, todos s), 3.01 (2H, m), 3.47 (2H, m), 3.47 & 4.54 (1H, todos m), 3.71 (4H, m), 4.30 & 4.34 (2H, todos s)
17 *		polvo blanco (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 228-231°C	(sal 2-HCl) 3427, 2950, 1651, 1452, 1415, 1306, 1248, 1124, 1101, 1045, 700	1.67-2.24 (6H, m), 2.09 (6H, s), 2.22 & 2.23 (6H, todos s), 2.61 (2H, m), 2.79 (2H, m), 2.89 & 2.92 (3H, todos m), 3.08 (2H, m), 3.43 (2H, m), 3.47 (2H, bra), 3.70 & 4.57 (1H, todos m), 3.75 (2H, m), 4.32 & 4.35 (2H, todos s), 4.87 (1H, m), 7.23 (5H, m)

Tabla 4

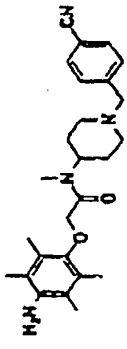
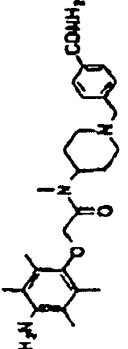
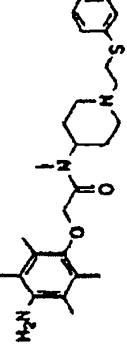
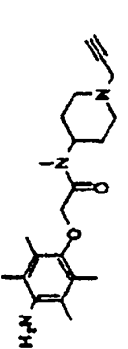
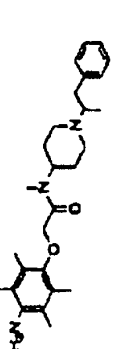
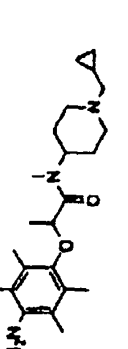
No.	Estructura Química	Propiedades	IR (KBr) cm ⁻¹	¹ H-NMR (CDCl ₃)
18 *		polvo blanco (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 251-253°C	(sal 2-HCl) 3410, 2978, 2487, 1658, 1631, 1491, 1305, 1248, 1118, 1097	1.66-2.22 (6H, m), 2.08 (6H, s), 2.22 (6H, s), 2.89 & 2.92 (3H, todos s), 2.91 (2H, m), 3.47 (2H, brs), 3.55 (2H, s), 3.70 & 4.55 (1H, todos m), 4.31 & 4.34 (2H, todos s), 7.44 (2H, m), 7.60 (2H, m).
19 *		polvo blanco (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 226-229°C	(sal 2-HCl) 3404, 2940, 1667, 1462, 1421, 1248, 1097	1.65-2.22 (6H, m), 2.08 (6H, s), 2.21 (6H, s), 2.88 & 2.91 (3H, todos s), 2.93 (2H, m), 3.48 (2H, brs), 3.53 (2H, s), 3.66 & 4.54 (1H, todos m), 4.31 & 4.33 (2H, todos s), 4.39 (2H, m), 4.77 (2H, m), 5.74 & 6.12 (2H, brs)
20 *		polvo blanco (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 231-233°C	(sal 2-HCl) 3427, 2938, 1640, 1459, 1419, 1308, 1247, 1098, 1026, 746, 693	1.67-2.22 (6H, m), 2.08 (6H, s), 2.22 (6H, s), 2.63 (2H, m), 2.87 & 2.90 (3H, todos s), 3.03-3.07 (4H, m), 3.67 & 4.53 (1H, todos m), 4.11 & 4.13 (2H, todos s), 7.18 (1H, m), 7.27 (2H, m), 7.34 (2H, m)
21 *		polvo blanco (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 172-174°C	(sal 2-HCl) 3406, 2926, 2585 1638, 1459, 1420 1249, 1089	1.85-2.43 (7H, m), 2.09 & 2.22 & 2.24 & 2.28 (12H, todos s), 2.88 & 2.91 (3H, todos s), 2.97 (2H, m), 3.31 (2H, s), 3.47 (2H, brs), 3.68 & 4.56 (1H, m), 4.31 & 4.35 (2H, todos s)
22 *		polvo blanco (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 212-214°C	(sal 2-HCl) 3411, 2936, 1638 1454, 1420, 1249 1088, 1028	0.94 (3H, t), 1.46-2.26 (4H, m), 2.09 & 2.23 & 2.24 (12H, todos s), 2.30-2.55 (2H, m), 2.80-3.03 (4H, m), 2.89 & 2.92 (3H, todos s), 3.47 (3H, m), 3.63 & 4.54 (1H, m), 4.32 & 4.35 (2H, todos s), 7.13-7.33 (5H, m)
23 *		polvo blanco (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 220-221°C	(sal 2-HCl) 3408, 2939, 2592, 1657, 1463, 1415, 1251, 1107, 1079, 1024	0.01 & 0.43 (4H, todos m), 0.76 (1H, m), 1.34 & 1.35 (3H, d, J = 8.2 Hz), 1.50-1.83 (6H, m), 1.99 (6H, s), 2.08-2.23 (2H, m), 2.11 (6H, s), 2.72 & 2.76 (3H, todos s), 3.02 (2H, m), 3.36 (2H, brs), 3.60 & 4.43 (1H, todos m), 4.47 (1H, m)

Tabla 5

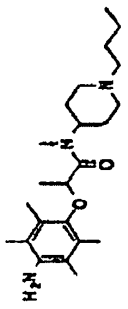
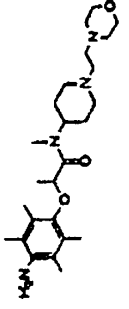
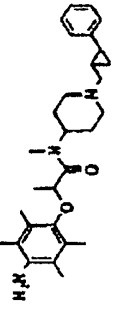
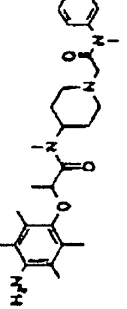
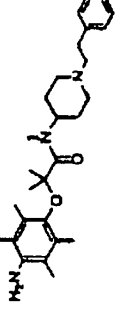
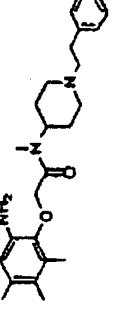
No.	Estructura Química	Propiedades	IR (KBr) cm ⁻¹	¹ H-NMR (CDCl ₃)
24 *		polvo blanco (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 228-231°C	(sal 2-HCl) 3428, 2931, 1630, 1484, 1374, 1249, 1080, 1024	(sal 2-HCl) : CD ₃ OD 1.02 (3H, m), 1.42 (3H, m), 1.46 (2H, m), 1.71-1.97 (4H, m), 2.19 (2H, m), 2.24 (6H, s), 2.29 (6H, s), 2.87 (3H, s), 3.06 (4H, m), 3.66 (2H, m), 4.12 & 4.50 (1H, todos m), 4.79 (1H, m)
25 *		polvo blanco (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 268-288°C	(sal 3-HCl) 3417, 2942, 2537, 1630, 1454, 1417, 1249, 1101	1.43 (3H, m), 1.54-2.19 (6H, m), 2.07 (6H, s), 2.19 (6H, s), 2.46 & 2.52 (6H, todos m), 2.98 (2H, m), 3.45 (2H, brs), 3.71 (4H, m), 3.71 & 4.52 (1H, todos m), 4.55 (1H, m)
26		polvo blanco (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH)	(sal 2-HCl) 3430, 2938, 1636, 1499, 1463, 1414, 1249, 1096, 700	0.81 (1H, m), 0.96 (1H, m), 1.22 (1H, m), 1.43 (3H, m), 1.55-2.39 (8H, m), 2.07 (6H, s), 2.16 & 2.18 (6H, todos s), 2.52 (1H, m), 2.78 & 2.83 (3H, todos s), 3.06 (2H, m), 3.44 (2H, brs), 3.71 & 4.53 (1H, todos m), 4.54 (1H, m), 7.03 (2H, m), 7.23 (1H, m), 7.26 (2H, m)
27 *		polvo blanco (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 185-197°C	(sal 2-HCl) 3436, 2938, 1653, 1496, 1462, 1414, 1368, 1248, 1071, 700	1.40 (3H, d, J = 6.5 Hz), 1.41-2.17 (6H, m), 2.08 & 2.17 & 2.21 (12H, todos s), 2.84 & 2.88 (3H, todos s), 2.92 (4H, m), 3.28 (3H, s), 3.46 (2H, brs), 3.59 & 4.45 (1H, todos m), 4.54 (1H, m), 7.18 (2H, d, J = 7.6 Hz), 7.31-7.44 (3H, m)
28		polvo blanco (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 205-208°C	(sal 2-HCl) 3405, 2940, 2554, 1625, 1463, 1402, 1250, 1145, 1092, 752, 702	1.41 (6H, s), 1.67-2.30 (4H, m), 2.07 & 2.08 & 2.11 & 2.13 (12H, todos s), 2.19 (2H, m), 2.58 (2H, m), 2.80 (2H, m), 2.90 & 3.35 (3H, todos s), 3.09 (2H, m), 3.48 (2H, brs), 4.54 & 4.86 (1H, todos m), 7.17-7.31 (5H, m)
29		polvo blanco (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 214-216°C	(sal 2-HCl) 3410, 2928, 2634 1638, 1603, 1496 1462, 1415, 1323, 1250, 1102, 703	(sal 2-HCl): CD ₃ OD 1.89-2.27 (4H, m), 2.23 & 2.25 & 2.31 & 2.34 (12H, todos s), 2.87 & 2.92 (3H, todos s), 3.06-3.40 (6H, m), 3.69-3.79 (2H, m), 3.85 & 4.66 (1H, m), 4.88 & 5.00 (2H, todos s), 7.31 (5H, m)

Tabla 6

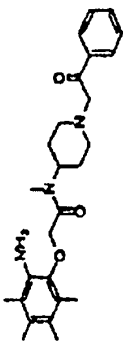
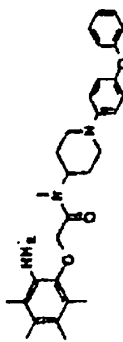
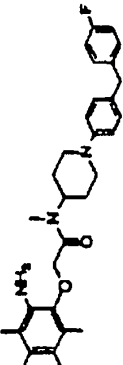
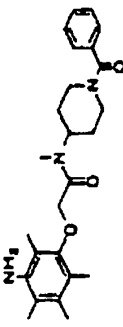
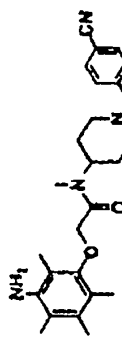
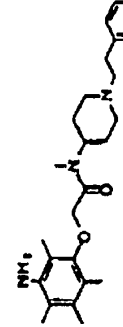
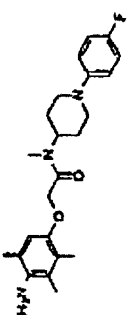
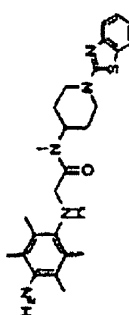
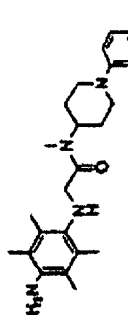
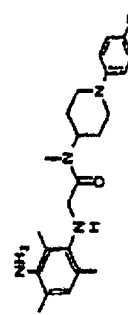
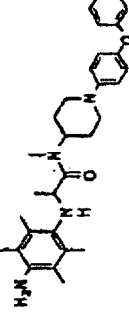
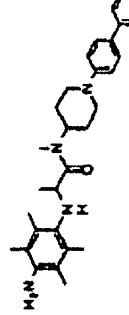
No.	Estructura Química	Propiedades	IR (KBr)	¹ H-NMR (CDCl ₃)
30 *		Polvero amarillo pálido (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 169-171°C	(sal 2.HCl) 3435, 2934, 2618 1694, 1639, 1598 1451, 1232, 1102 757	1.44-1.70 (2H, m), 1.81-2.34 (4H, m), 2.10 (3H, s), 2.13 (3H, s), 2.17 (3H, s), 2.22 & 2.23 (3H, todos s), 2.77 & 2.92 (3H, todos s), 3.10 (2H, m), 3.37 & 4.58 (1H, m), 3.82 & 3.85 (2H, todos s), 4.16 (2H, brs), 4.47 & 4.51 (2H, todos s), 7.46 (2H, t), 7.58 (1H, t), 7.98 (2H, d)
31 *		Polvero blanco (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 164-166°C	(sal 2.HCl) 3398, 2888, 2614 1841, 1588, 1508 1480, 1247, 1173 1098	1.72-2.09 (4H, m), 2.11 (3H, s), 2.14 (3H, s), 2.18 (3H, s), 2.23 (3H, s), 2.70 & 2.85 (2H, m), 2.79 & 2.95 (3H, todos s), 3.49 & 4.69 (1H, m), 3.66 (2H, m), 4.19 (2H, brs), 4.50 & 4.54 (2H, todos s), 6.88-7.08 (6H, m), 7.24-7.33 (3H, m)
32 *		Polvero amarillo pálido (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 165-167°C	(sal 2.HCl) 3410, 2918, 2614 1639, 1508, 1414 1323, 1221, 1158 820	1.69-2.07 (4H, m), 2.10 (3H, s), 2.14 (3H, s), 2.17 (3H, s), 2.23 (3H, s), 2.68 & 2.83 (2H, m), 2.77 & 2.92 (3H, todos s), 3.49 & 4.68 (1H, m), 3.70 (2H, m), 3.87 (2H, s), 4.20 (2H, brs), 4.49 & 4.53 (2H, todos s), 6.62-6.92 (2H, m), 6.95 (2H, t), 7.05 (2H, d), 7.08-7.16 (2H, m)
33 *		Polvero blanco (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 171-174°C	(sal 2.HCl) 3423, 2834, 2577, 1628, 1518, 1447, 1318, 1278, 1250, 1107, 1025, 711	(sal 2.HCl), CD ₃ OD 1.81 (4H, m), 2.29 & 2.32 (12H, todos s), 2.90 & 2.92 (3H, todos s), 2.91 & 3.25 & 3.82 (4H, todos m), 4.50 & 4.59 (2H, s), 4.75 (1H, m), 7.46 (5H, m)
34 *		Polvero blanco (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 203-205°C	(sal 2.HCl) 3408, 2936, 1637, 1480, 1418, 1322, 1305, 1249, 1086, 1031, 944, 827	1.59-2.22 (8H, m), 2.09 & 2.13 & 2.18 (12H, todos s), 2.90 (2H, s), 2.88 & 2.92 (3H, todos m), 3.54 (4H, brs), 3.67 & 4.55 (1H, todos m), 4.34 & 4.37 (2H, todos s), 7.43 (2H, m), 7.60 (2H, m)
35 *		Polvero blanco (sal 2-HCl) (Et ₂ O/MeOH) 157-158°C	(sal 2.HCl) 3421, 2940, 1638, 1492, 1457, 1420, 1312, 1248, 1099, 1032, 703	1.69-2.23 (4H, m), 2.09 & 2.14 & 2.18 (12H, todos s), 2.60 (2H, m), 2.79 (2H, m), 2.87 & 2.92 (3H, todos s), 3.08 (2H, m), 3.49 (2H, brs), 3.66 & 4.58 (1H, todos m), 4.35 & 4.38 (2H, todos s), 7.18-7.31 (5H, m)

Tabla 7

No.	Estructura Química	Propiedades	IR (KBr) cm ⁻¹	¹ H-NMR (CDCl ₃)
36 *		polvo blanco (sal 2.HCl) (Et ₂ O/MeOH) 198-200°C	(sal 2.HCl) 3454, 2950, 2359 1655, 1514, 1492 1414, 1291, 1238 1134, 1101	1.70-2.08 (4H, m), 2.11 (3H, s), 2.16 (3H, s), 2.17&2.21 (3H, todos s), 2.68-2.87 (2H, m), 2.89&2.96 (3H, todos s), 3.37 (2H, bra), 3.60 (2H, m), 3.98&4.54-4.68 (1H, m), 4.59&4.64 (2H, todos s), 6.56&6.81 (1H, todos s), 6.83-7.00 (4H, m)
37 *		polvo blanco (sal 2.HCl) (Et ₂ O/MeOH) 190-194°C	(sal 2.HCl) 3424, 2929, 1624, 1540, 1468, 1412, 1282, 1126, 1095, 1018, 762	(sal 2.HCl); DMSO 1.85-1.87 (4H, m), 2.17 (6H, s), 2.22 (3H, s), 2.24 (3H, s), 2.77 & 2.80 (3H, todos s), 3.30 (2H, m), 3.98 (2H, s), 4.13 (2H, m), 4.59 (1H, m), 7.10 (1H, dd), 7.30 (1H, dd), 7.47 (1H, d), 7.78 (1H, d)
38 *		espuma amarillo pálido (sal 2.HCl) (Et ₂ O/MeOH) 231-235°C	(sal 2.HCl) 3420, 1651, 1511, 1451, 1407, 1237, 1166, 1101, 1012, 844	1.67-2.04 (4H, m), 2.13 (6H, s), 2.29 (6H, s), 2.65 & 2.82 (2H, todos m), 2.77 & 2.92 (3H, todos s), 3.46 (2H, m), 3.61 & 3.66 (2H, todos s), 1.70 (1H, m), 6.88-6.98 (4H, m)
39 *		polvo blanco (sal 2.HCl) (Et ₂ O/MeOH) 193-195°C	(sal 2.HCl) 3418, 2846, 2590 1638, 1575, 1513 1488, 1409, 1358 1238, 1104	1.63-2.07 (4H, m), 2.10&2.12&2.18&2.25&2.26 (9H, todos s), 2.58-2.86 (2H, m), 2.78&2.92 (3H, todos s), 3.38-3.55&4.85 (1H, m), 3.48 (2H, bra), 3.60 (2H, m), 3.72&3.76 (2H, todos s), 4.53 (1H, bra), 6.68&6.75 (1H, todos s), 6.84-7.00 (4H, m)
40 *		polvo blanco (sal 2.HCl) (Et ₂ O/MeOH) 197-200°C	(sal 2.HCl) 3365, 2928, 2470 1636, 1588, 1507 1488, 1248, 1200 1112, 1074	1.23&1.32 (3H, todos d), 1.41-1.98 (4H, m), 2.10 (3H, s), 2.11 (3H, s), 2.24 (3H, s), 2.27 (3H, s), 2.55-2.88 (2H, m), 2.71&2.78 (3H, todos s), 3.29-3.68 (4H, m), 3.45&4.62 (1H, m), 3.97 (1H, m), 6.84-7.33 (9H, m)
41 *		polvo blanco (sal 2.HCl) (Et ₂ O/MeOH) 175-177°C	(sal 2.HCl) 3384, 2922, 2478, 1638, 1573, 1486, 1452, 1393, 1364, 1335, 1075	(sal 2.HCl); CD ₃ OD 1.23&1.33 (3H, todos d), 1.45-1.98 (4H, m), 2.10 (3H, s), 2.11 (3H, s), 2.24 (3H, s), 2.27 (3H, s), 2.33-2.95 (2H, m), 2.70&2.79 (3H, todos s), 3.30-3.85 (4H, m), 3.47&4.66 (1H, m), 3.97 (1H, m), 6.92-7.03 (2H, m), 7.24-7.34 (3H, m), 7.40 (1H, m), 7.47-7.59 (3H, m)

ES 2 291 308 T3

El efecto de los derivados de aminofenoxiacetamida de la presente invención representados por la fórmula (I) se evaluó por los métodos de ensayo biológico siguientes.

- 5 Ensayo 1: Evaluación del efecto neuroprotector contra la neurodegeneración inducida por glutamato, por comparación de la administración del compuesto de ensayo antes de la adición de glutamato con la administración simultánea del compuesto de ensayo junto con el glutamato.
- 10 Ensayo 2: Evaluación del antagonismo contra la muerte celular por tratamiento de diversas clases de inhibidor del receptor y MTA [5-desoxi-5-metil-tioadenosina].
- 15 Ensayo 3: Evaluación del efecto del incremento de la producción de CalbindinD-28k.
- Ensayo 4: Evaluación del efecto inhibidor neuroprotector por oligonucleótidos antisentido.
- Ensayo 5: Evaluación del efecto supresor del edema cerebral.

20 Por utilización de los ensayos biológicos arriba mencionados, se realizó la selección de los compuestos que tienen efecto neuroprotector por activación del receptor de FGF, debido a la introducción de la CalbindinD-28k, una de las proteínas de fijación de Ca^{2+} , por combinación de todos los ensayos 1 a 4, por combinación de los ensayos 1 y 2, por combinación de los ensayos 1, 2 y 3, o por combinación de los ensayos 1, 3 y 4, respectivamente.

A continuación se da la descripción detallada de los métodos de ensayo.

25 Ensayo biológico 1

Evaluación del efecto neuroprotector contra la muerte de las células neuronales inducida por glutamato

30 Se prepararon cultivos primarios a partir de cortezas cerebrales de ratas Wistar fetales (E18) de acuerdo con el método modificado de Mattson y Kater [M.P. Mattson *Brain Res. Rev.*, 13, 179 (1988)]. Después de disociación con papaína, se sembraron neuronas sobre placas de 96 pocillos recubiertas con poli-L-lisina (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) a una densidad de 5×10^4 células/pocillo y se cultivaron en 100 μl de medio DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco (Gibco) complementado con NaHCO_3 10 mM, KCl 15 mM, piruvato de sodio 1 mM, y 10% (vol/vol) de suero de caballo). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una incubadora modificada con 90% aire/10% CO_2 . Se añadió glutamato al cultivo el día 4 hasta la concentración final de 1 mM. Se determinó luego la supervivencia de las células un día más tarde utilizando bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT). Se disolvió MTT en solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) a 5 mg/ml y se filtró para esterilizar y eliminar una pequeña cantidad de residuo insoluble presente en algunas partidas de MTT, y se añadió a los cultivos a una concentración final de 0,5 mg/ml. Seis horas después de la incubación, se desechó el medio de cultivo para detener la reacción. Se añadió dimetil-sulfóxido a todos los pocillos y se mezcló concienzudamente para disolver los cristales de color azul oscuro. Después de unos cuantos minutos a la temperatura ambiente, se leyeron las placas utilizando un lector Micro ELISA a una longitud de onda del ensayo de 570 nm y una longitud de onda de la referencia de 650 nm.

45 El compuesto de ensayo (1 μM) se añadió 24 horas antes del tratamiento con glutamato y simultáneamente con glutamato.

El efecto del compuesto de ensayo se determinó como la tasa de supervivencia de células vivas (%) de acuerdo con la ecuación siguiente:

50 Tasa de supervivencia de células vivas (%) = $\frac{(\text{grupo de compuesto de ensayo} - \text{grupo tratado con ácido glutámico})}{(\text{grupo de control} - \text{grupo tratado con ácido glutámico})} \times 100$

55 Es decir, la tasa de supervivencia de las células vivas después de incubación del grupo de control se convirtió al 100%, y se calculó la tasa de supervivencia de las células vivas de los compuestos de ensayo.

Ensayo biológico 2

60 *Evaluación del antagonismo contra la muerte de las células neuronales por tratamiento de diversas clases de inhibidor de receptor de sustancias fisiológicamente activas y MTA*

Este ensayo biológico se realiza para determinar si el efecto neuroprotector de los compuestos de ensayo es debido a la activación de receptores de sustancias fisiológicamente activas o no, por utilización de un ensayo antagonista para anticuerpos neutralizantes y como inhibidor para FGF, NT-3, NT-4/5, BDNF, IGF-1/2, NGF, PDGF y estrógeno, respectivamente.

MTA (5-desoxi-5-metiltioadenosina) inhibe específicamente la autofosforilación del receptor de FGF en las células vivas [P.A. Mather, *J. Bio. Chem.*, 268, 4244 (1993)]. Por esta razón, el efecto neuroprotector de los compuestos de

ES 2 291 308 T3

ensayo es inhibido por tratamiento de MTA, dependiendo este efecto del efecto de transferencia de señales por la fosforilación del receptor de FGF.

Los inhibidores de las diversas clases de receptor se disolvieron en la concentración óptima, y se disolvió MTA en la concentración de 7,5 mM, inmediatamente antes de la utilización. 30 minutos antes del tratamiento de los compuestos de ensayo, se añadió la concentración óptima de cada inhibidor o 0,75 mM de MTA, y se determinó el efecto neuroprotector de los compuestos de ensayo por medio del método MTT.

Los resultados de cada uno de los ensayos biológicos 1 y 2 se presentan en la Tabla 8 siguiente.

TABLA 8

Compuesto No.	Tasa de supervivencia (%) (Compuesto: 1 µl)	Tasa de supervivencia (%) (Compuesto: 1 µl & tratamiento con MTA)
6	54	25
7	76	32
8*	78	24
9*	104	5
10*	86	31
11*	74	56
12*	54	33
13	65	13
16*	101	33
17*	85	55
18*	91	57
19*	96	28
22	79	32
24*	61	22
25*	87	16
28	103	46
32*	73	34
33*	120	46
34*	74	21
36*	97	25
37*	95	20
38*	124	19
39*	94	28

Ensayo biológico 3

Evaluación del efecto inductor de CalbindinD-28k

Se prepararon cultivos primarios a partir de cortezas cerebrales de ratas Wistar fetales (E18) de acuerdo con el método modificado de Mattson y Kater [M.P. Mattson *Brain Res. Rev.*, 13, 179 (1988)]. Después de disociación con papaína, se sembraron neuronas sobre placas de 6 pocillos recubiertas con poli-L-lisina (Falcon) a una densidad de 5500 células/mm² y se cultivaron en 2 ml de medio DMEM.

Se añadieron los compuestos de ensayo 5 días después de la iniciación de la incubación, y después de 7 días de incubación se extrajo la proteína con solución tampón homogeneizada [que contenía 20 mM de Tris-HCl (pH = 7,4), EDTA 1 mM, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,1 mM].

El efecto de los compuestos de ensayo se determinó por la técnica de la transferencia Western utilizando como anticuerpo anti CalbindinD-28k policlonal Swant (Swant Co., Ltd.).

ES 2 291 308 T3

La Tabla 9 muestra los resultados del ensayo. En la tabla, la cantidad de CalbindinD-28k inducida del grupo de control (grupo sin tratamiento) se indicó como 100%.

TABLA 9

Compuesto No.	Cantidad de CalbindinD-28k inducida (% frente al control) (Compuesto: 1 μ M)
6	163
Control	100

Ensayo biológico 4

Evaluación del efecto inhibitor neuroprotector por oligonucleótidos antisentido

Es necesario producir la proteína protectora para la acción de transferencia de señales de las células por la fosforilación del receptor FGF para el efecto neuroprotector de los compuestos de ensayo, y la CalbindinD-28k es una de dichas proteínas protectoras que tienen función de amortiguación de Ca^{2+} . Por esta razón, el ensayo siguiente determinó si la CalbindinD-28k está implicada en el efecto neuroprotector de los compuestos de ensayo por utilización de un oligonucleótido antisentido.

Se prepararon cultivos primarios a partir de cortezas cerebrales de ratas Wistar fetales (E18). Después de disociación con papaína, se sembraron neuronas sobre placas de 96 pocillos recubiertas con poli-L-lisina (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) a una densidad de 4×10^4 células/pocillo y se cultivaron en 100 μ l de medio DMEM.

A partir de dos días después de la incubación hasta 8 días, se añadieron respectivamente 100 μ l de medio Neurobasal/2% de suplemento B-27 y 5 μ M de tres clases de oligonucleótidos antisentido, cada 24 horas. Siete días después de la incubación, se añadieron 1 μ M y 10 μ M de los compuestos de ensayo, y 8 días después de la incubación, se añadieron 300 μ M de ácido glutámico. Se determinó luego la supervivencia de las células un día más tarde utilizando MTT. Seis horas después de la incubación, se desechó el medio de cultivo para detener la reacción. Se añadió dimetilsulfóxido a todos los pocillos y se mezcló concienzudamente para disolver los cristales de color azul oscuro. Después de unos cuantos minutos a la temperatura ambiente, se leyeron las placas utilizando un lector Micro ELISA a una longitud de onda de ensayo de 570 nm y con una longitud de onda de referencia de 650 nm.

El efecto de los compuestos de ensayo se determinó como la tasa de supervivencia de células vivas (%) de acuerdo con la ecuación que se ha indicado en el Ensayo Biológico 1: es decir, la tasa de supervivencia de células vivas después de incubación del grupo de control se convirtió a 100%, y se calculó la tasa de supervivencia de las células vivas de los compuestos de ensayo.

Las secuencias de los oligonucleótidos antisentido a utilizar en este ensayo se indican a continuación:

Calbindin antisentido 1: 5-TGA CTG CAG GTG GGA TTC TGC-3

Calbindin antisentido 2: 5-ACC GTC GAA ATG AAG CCA GA-3

Calbindin antisentido 3: 5-CGT ATC ATC CAC GGT CTT GTT-3

La Tabla 10 muestra los resultados del ensayo.

TABLA 10

Compuesto de ensayo	Tasa de supervivencia (%) [antisentido(-)]	Tasa de supervivencia (%) [antisentido(+): 5 μ M]
BEGF (1 ng)	71	8
BEGF (10 ng)	101	35
No. 6 (0.1 μ M)	103	30
No. 6 (1 μ M)	108	34
No. 38* (0.1 μ M)	100	28
No. 38* (1 μ M)	106	33

Ensayo biológico 5

Evaluación del efecto supresor del edema cerebral

5 Ratas Wistar macho adultas que pesaban 210-230 g se utilizaron en el presente estudio y se alojaron en un ambiente artificialmente controlado con un ciclo luz/oscuridad de 12 horas. Los animales se anestesiaron con pentobarbital-sodio (50 mg/kg de peso corporal, i.p., Nembutal Dinabott, Japón) y se dispusieron en un aparato estereotáxico. Se dejó al descubierto el cráneo y se practicó un orificio en el hueso parietal; 1,5 mm en posición posterior y 0,8 mm en posición lateral al bregma. Todos los procedimientos se realizaron bajo un microscopio quirúrgico para evitar una irritación
10 excesiva de las meninges y el cerebro subyacente. Se insertó en el orificio un tornillo de latón con punta roma (1,0 mm de diámetro y 3,0 mm de longitud, Biomedica, Japón). La punta del tornillo que sobresalía intracranalmente medía aproximadamente 2,5 mm, que penetraba en la parte parietal del cerebro derecho a través de las meninges. En las ratas operadas falsamente, se cerró el cuero cabelludo sin fijar un tornillo en el orificio. Después de la cirugía, todas las ratas se mantuvieron en sus jaulas originales hasta el sacrificio. Se dejó que las ratas se alimentaran con comida y agua
15 *ad libitum*.

Bajo anestesia, los hemisferios cerebrales diana se procesaron respecto a contenido de agua post- TBI día 6 (n = 6). Los hemisferios cerebrales diseccionados se pesaron, se secaron durante 24 horas a 110 grados (Celsius) y se pesaron después nuevamente. La cantidad sustraída de los pesos húmedo y seco se consideró como agua tisular de la diana, y
20 se utilizó para el análisis del edema cerebral.

El contenido de agua se calculó utilizando la fórmula siguiente:

$$25 \quad \text{Contenido de agua (\%)} = \frac{[(\text{peso húmedo del hemisferio} - \text{peso seco del hemisferio}) / \text{peso húmedo del hemisferio}] \times 100}{}$$

Los compuestos de ensayo se administraron por vía intravenosa inmediatamente después de la operación a través de la vena del rabo de las ratas.
30

La Tabla 11 muestra los resultados del ensayo.

TABLA 11

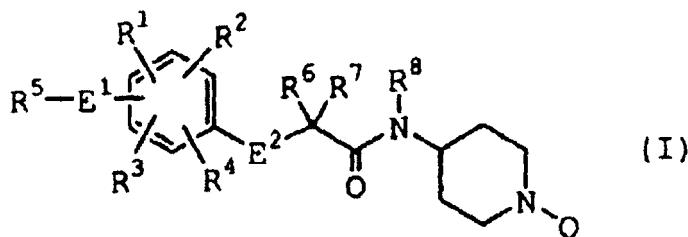
35	Compuesto No. (cantidad de administración)	Tasa de supresión del edema cerebral (%)
	6 (3 mg/kg)	24.9
40	8* (1 mg/kg)	14.0
	12* (3 mg/kg)	14.7
	13 (3 mg/kg)	13.1
45	14* (1 mg/kg)	18.7
	15* (1 mg/kg)	14.7
	18* (1 mg/kg)	22.1
50	24* (1 mg/kg)	10.6
	25* (1 mg/kg)	19.1
	26 (3 mg/kg)	11.9
55	27* (3 mg/kg)	11.8
	29 (1 mg/kg)	13.8

60 **Aplicabilidad industrial**

Como se ha descrito arriba, la presente invención proporciona compuestos de peso molecular relativamente bajo, especialmente derivados de aminofenoxiacetamida de la fórmula (I), que inducen la CalbindinD-28k, una de las proteínas de fijación de Ca^{2+} , y pueden administrarse fácilmente. Dado que la inducción de CalbindinD-28k causada por la administración del compuesto proporcionado por la presente invención causa un efecto neuroprotector y un efecto
65 de mejora y tratamiento de los trastornos cerebrales funcionales y orgánicos, puede comprenderse que el agente de la presente invención es sumamente aplicable en el campo farmacéutico.

REIVINDICACIONES

1. Un derivado de aminofenoxiacetamida representado por la fórmula (I) siguiente:



en donde

R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son metilo;

R^5 , R^6 , R^7 y R^8 son, independientemente unos de otros, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C_1-C_6 ;

cuando E^1 es un átomo de oxígeno, E^2 es el grupo $-NR^9-$; o

cuando E^1 es el grupo $-NR^{10}-$, E^2 es un átomo de oxígeno; en donde R^9 y R^{10} son un átomo de hidrógeno; un grupo alquilo C_1-C_5 de cadena lineal o ramificado que puede estar sustituido con halógeno; un grupo arilo C_4-C_{14} que puede estar sustituido con sustituyentes seleccionados del grupo constituido por átomos de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C_1-C_5 de cadena lineal o ramificado y un grupo alquilo C_1-C_5 de cadena lineal o ramificado que puede estar sustituido con átomos de halógeno; o un grupo aralquilo C_5-C_{12} que puede estar sustituido con sustituyentes seleccionados del grupo constituido por átomos de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C_1-C_5 de cadena lineal o ramificado y un grupo alquilo C_1-C_5 de cadena lineal o ramificado que puede estar sustituido con átomos de halógeno;

Q es un grupo de $-X-Y-Q'$, en donde X es un enlace de conexión, un grupo alquilenilo C_1-C_6 o un grupo alquenilenilo C_2-C_4 ; Y es un grupo de conexión, $C(=O)NH$ o $NHC(=O)$; y Q' es un grupo fenilo, un grupo piridilo, un grupo quinolilo, un grupo isoquinolilo, un grupo benzotiazol o un grupo bencimidazol, cada uno de los cuales puede estar sustituido con sustituyentes seleccionados del grupo constituido por átomos de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C_1-C_5 de cadena lineal o ramificado y un grupo alquilo C_1-C_5 de cadena lineal o ramificado que puede estar sustituido con átomos de halógeno;

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

2. El derivado de aminofenoxiacetamida de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, en donde X e Y son ambos un enlace de conexión;

o sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

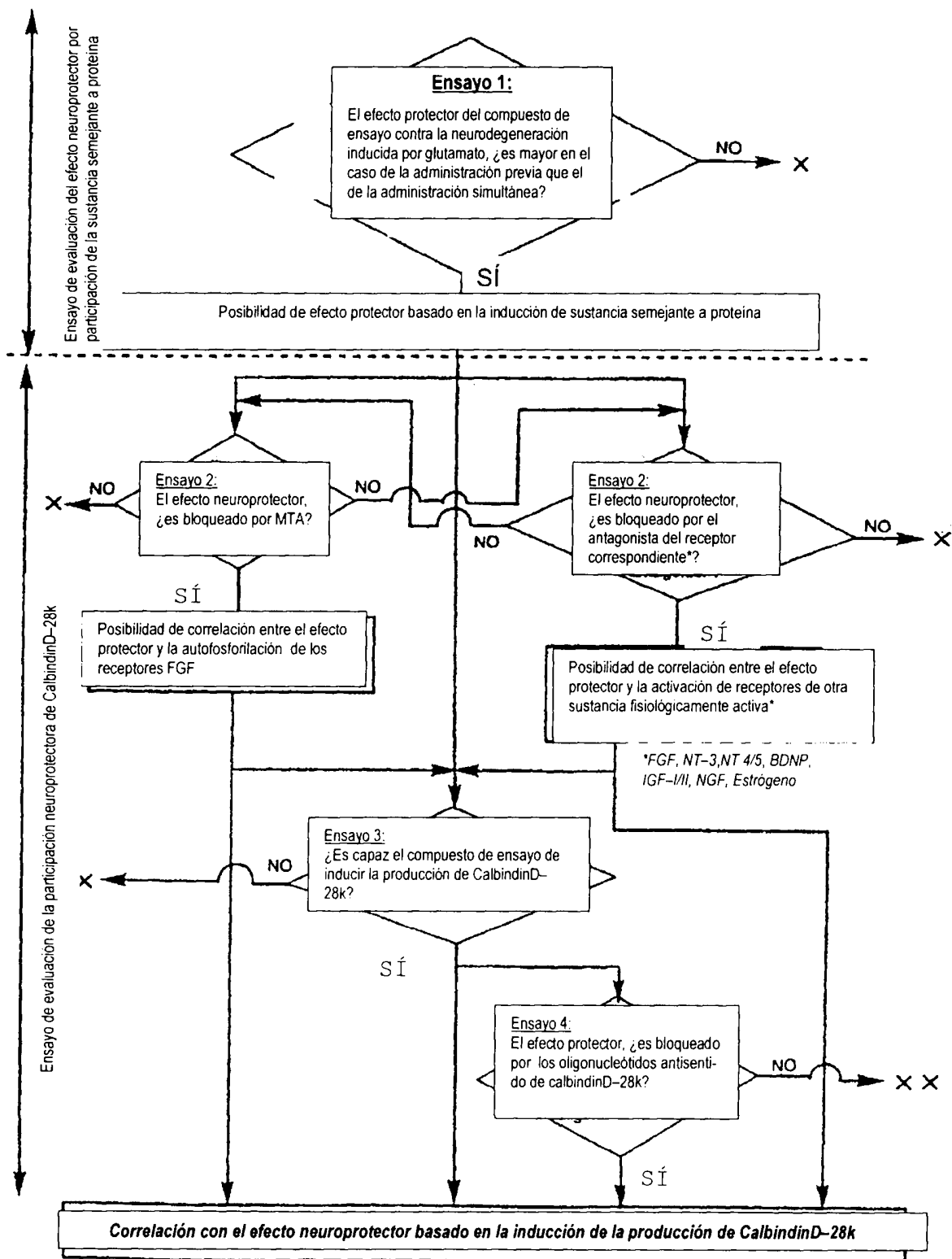
3. Medicamento que contiene un derivado de aminofenoxiacetamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo representada por la fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, como ingrediente activo.

4. Agente de inducción de la producción de CalbindinD-28k, que es una proteína de fijación de Ca^{2+} , que contiene un derivado de aminofenoxiacetamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo representada por la fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, como ingrediente activo.

5. Un agente mejorador o terapéutico de una función cerebral funcional y orgánica que contiene un derivado de aminofenoxiacetamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo representada por la fórmula (I), de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, como ingrediente activo.

6. Medicamento para el tratamiento o la mejora de trastornos cerebrales funcionales debidos a diversos trastornos isquémicos tales como infarto cerebral, hemorragia intracerebral y arterioesclerosis cerebral, así como trastornos cerebrales orgánicos tales como demencia senil, lesión cerebral, operación cerebral, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, y esclerosis lateral amiotrófica, que contiene un derivado de aminofenoxiacetamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo representada por la fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, como ingrediente activo.

Método de selección de compuestos neuroprotectores basado en la inducción de la producción de CalbindinD-28k



x: Compuesto fuera de selección

xx: El compuesto produce CalbindinD-28k, pero el efecto neuroprotector principal está correlacionado con algo distinto