



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 327 834**

51 Int. Cl.:

C07C 275/42 (2006.01)	C07C 309/46 (2006.01)
C07D 209/40 (2006.01)	C07D 213/72 (2006.01)
C07D 231/56 (2006.01)	C07D 257/04 (2006.01)
C07D 271/07 (2006.01)	C07D 333/36 (2006.01)
A61K 31/17 (2006.01)	A61K 31/19 (2006.01)
A61K 31/381 (2006.01)	A61K 31/416 (2006.01)
A61K 31/4245 (2006.01)	A61K 31/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03770917 .7**

96 Fecha de presentación : **10.11.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1565429**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.08.2005**

54 Título: **Derivados de diarilureido y su uso médico.**

30 Prioridad: **21.11.2002 DK 2002 01803**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.11.2009

73 Titular/es: **NeuroSearch A/S**
Pederstrupvej 93
2750 Ballerup, DK

72 Inventor/es: **Valgeirsson, Jon;**
Nielsen, Elsebet Ostergaard y
Peters, Dan

74 Agente: **García-Cabrerizo y del Santo, Pedro María**

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 diarilureido y su uso médico.

Esta invención se refiere a nuevos derivados de diarilurea útiles como antagonistas selectivos y no competitivos del receptor ionotrópico GluR5.

Debido a su actividad biológica, los derivados de diarilurea de la invención se consideran útiles para tratar enfermedades que son sensibles a la modulación de un receptor de aspartato o uno de glutamato.

Además, la invención proporciona compuestos químicos para su uso de acuerdo con la invención, así como composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos químicos, y métodos para tratar enfermedades o trastornos o afecciones sensibles a la modulación de un receptor de aspartato o uno de glutamato.

Técnica antecedente

La neurotransmisión excitadora en el sistema nervioso central (SNC) de mamíferos está mediada principalmente por el aminoácido, L-glutamato, que actúa sobre receptores ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos, que responden a este aminoácido, se han dividido en los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), los receptores de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), y los receptores de ácido kaínico (KA). Además, estudios de biología molecular han establecido que estos receptores están compuestos de subunidades que pueden ensamblarse para formar canales funcionales, y se han identificado varias de dichas unidades.

De este modo se ha establecido que los receptores AMPA se ensamblan a partir de cuatro subunidades proteicas conocidas como GluR1 a GluR4, mientras que los receptores KA se ensamblan a partir de subunidades conocidas como GluR5 a GluR7, KA-1 y KA-2.

Debido a su distribución en diferentes tejidos de mamífero, los receptores GluR5 y las sustancias que actúan sobre los mismos han atraído particular atención.

El documento WO 94/22807 describe derivados de urea y amida útiles como agentes de apertura de los canales de potasio. El documento EP 0656350 describe derivados de diarilurea como agentes cardiovasculares.

Los documentos WO 97/45400, WO 97/45111, WO 98/47879 y WO 00/24707 describen derivados de difenilurea que contienen un grupo ácido y su uso como bloqueantes de los canales de cloruro.

El documento WO 02/039987 describe el uso de derivados de difenilurea como bloqueantes de los canales de aniones de la malaria para tratar la malaria.

El documento WO 02/064128 describe el uso de derivados de difenilurea para la modulación de la asociación de la caspasa-9 a Apaf-1 para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por muerte celular excesiva o insuficiente.

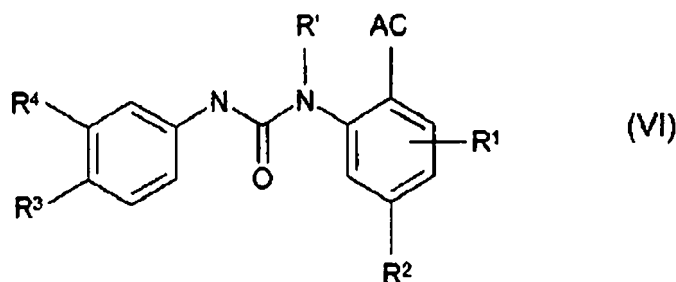
El documento WO 02/070467 describe derivados de difenilurea útiles como inhibidores de las vías de degradación de proteínas intracelulares.

Sin embargo, nunca se ha descrito el uso de derivados de difenilurea como moduladores del receptor ionotrópico GluR5.

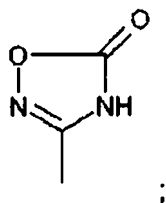
Sumario de la invención

Un objeto de la invención es proporcionar nuevos compuestos útiles como antagonistas selectivos y no competitivos del receptor ionotrópico GluR5.

Este objeto se cumple proporcionando los nuevos derivados de diarilurea representados por la Fórmula VI,



cualquiera de sus enantiómeros o cualquier mezcla de sus enantiómeros, o una sal de adición farmacéuticamente aceptable de los mismos, donde AC representa un anillo heterocíclico de la estructura



R' representa hidrógeno o alquilo C₁₋₆;

R¹ representa hidrógeno, halo, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, nitro o ciano;

R² representa halo, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, nitro o ciano; y

R³ y R⁴, independientemente entre sí, representan hidrógeno, halo, hidroxi, alcoxi C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆ o fenilo;

o R³ y R⁴ juntos forman un anillo metilenodioxi de la estructura -O-CH₂-O-; o R³ y R⁴ juntos forman un anillo benzo-condensado, estando dicho anillo condensado opcionalmente sustituido una o más veces con sustituyentes seleccionados entre halo, hidroxi, alcoxi C₁₋₆ y haloalquilo C₁₋₆.

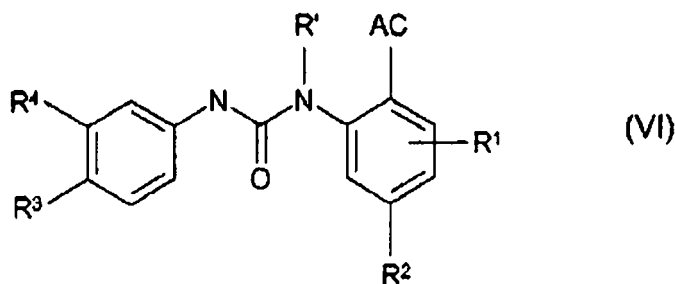
En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades terapéuticamente eficaces de un compuesto químico de la invención, o una sal de adición farmacéuticamente aceptable del mismo.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un compuesto químico de la invención, o una sal de adición farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de una composición farmacéutica/medicamento.

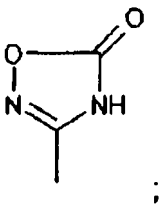
Otros objetos de la invención serán evidentes para los especialistas en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada y los ejemplos.

Descripción detallada de la invención

En su primer aspecto, la invención proporciona un derivado de diarilurea representado por la Fórmula VI



cualquiera de sus enantiómeros o cualquier mezcla de sus enantiómeros, o una sal de adición farmacéuticamente aceptable del mismo, donde AC representa un anillo heterocíclico de la estructura



R' representa hidrógeno o alquilo C₁₋₆;

R¹ representa hidrógeno, halo, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, nitro o ciano;

ES 2 327 834 T3

R² representa halo, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, nitro o ciano; y

R³ y R⁴, independientemente entre sí, representan hidrógeno, halo, hidroxilo, alcoxi C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆ o fenilo;

5 o R³ y R⁴ juntos forman un anillo metilenodioxo de la estructura -O-CH₂-O-; o R³ y R⁴ juntos forman un anillo benzo-condensado, estando dicho anillo condensado opcionalmente sustituido una o más veces con sustituyentes seleccionados entre halo, hidroxilo, alcoxi C₁₋₆ y haloalquilo C₁₋₆.

En una realización más preferida el derivado de diarilurea de la invención es

10 1-[5-cloro-2-(5-oxo-4,5-dihidro-[1,2,4]oxadiazol-3-il)-fenil]-3-(3-trifluorometil-fenil)-urea;

1-[5-cloro-2-(5-oxo-4,5-dihidro-[1,2,4]oxadiazol-3-il)-fenil]-3-(3-bromofenil)-urea; o

15 1-[5-cloro-2-(5-oxo-4,5-dihidro-[1,2,4]oxadiazol-3-il)-fenil]-3-naftalen-2-il-urea;

o un enantiómero o una mezcla de enantiómeros, o una sal de adición farmacéuticamente aceptable de los mismos.

20 Cualquier combinación de dos o más de las realizaciones descritas en este documento se considera dentro del alcance de la presente invención.

Definición de Sustituyentes

25 En el contexto de esta invención halo representa un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo.

En el contexto de esta invención un grupo alquilo indica una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada, univalente saturada. La cadena de hidrocarburo contiene de uno a seis átomos de carbono (alquilo C₁₋₆; alquilo inferior), incluyendo pentilo, isopentilo, neopentilo, pentilo terciario, hexilo e isohexilo. En una realización preferida alquilo representa un grupo alquilo C₁₋₄, incluyendo butilo, isobutilo, butilo secundario, y butilo terciario. En otra realización

30 preferida de esta invención alquilo representa un grupo alquilo C₁₋₃, que puede ser en particular metilo, etilo, propilo o isopropilo.

En el contexto de esta invención un grupo haloalquilo indica un grupo alquilo como se define en este documento, estando dicho grupo alquilo sustituido una o más veces con halo, como se ha definido anteriormente. Los grupos haloalquilo preferidos de la invención incluyen trihalometilo, en particular trifluorometilo, y trihalometilo, en particular

35 2,2,2-trifluoroetilo.

En el contexto de esta invención un grupo cicloalquilo indica un grupo alquilo cíclico que contiene de tres a siete átomos de carbono (cicloalquilo C₃₋₇), incluyendo ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo.

40

En el contexto de esta invención un grupo alcoxi indica un grupo “alquil-O-”, donde alquilo es como se ha definido anteriormente. Los ejemplos de grupos alcoxi preferidos de la invención incluyen metoxi y etoxi.

Sales Farmacéuticamente Aceptables

45 Los derivados de diarilurea de la invención pueden proporcionarse en cualquier forma adecuada para la administración pretendida. Las formas adecuadas incluyen sales farmacéuticamente (es decir fisiológicamente) aceptables, y formas de pre- o profármaco del compuesto químico de la invención.

50 Ejemplos de sales de adición farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación, las sales de adición de ácidos inorgánicas y orgánicas no tóxicas tales como las sales clorhidrato, bromhidrato, nitrato, perclorato, fosfato, sulfato, formiato, acetato, aconato, ascorbato, bencenosulfonato, benzoato, cinamato, citrato, embonato, enantato, fumarato, glutamato, glicolato, lactato, maleato, malonato, mandelato, metanosulfonato, naftaleno-2-sulfonato derivado, ftalato, salicilato, sorbato, estearato, succinato, tartrato, tolueno-p-sulfonato, y similares. Dichas sales pueden formarse por

55 procedimientos bien conocidos y descritos en la técnica.

Las sales metálicas de los derivados de diarilurea de la invención incluyen sales de metales alcalinos tales como la sal sódica de un compuesto químico de la invención que contiene un grupo carboxi.

Isómeros Estéricos

Los derivados de diarilurea de la invención pueden existir en formas (+) y (-) así como en formas racémicas (±). Los racematos de estos isómeros y los propios isómeros individuales están dentro del alcance de la presente invención.

65 Las formas racémicas pueden resolverse en las antípodas ópticas por métodos y técnicas conocidos. Un modo para separar las sales diastereoméricas es por el uso de un ácido ópticamente activo, y liberando el compuesto de amina ópticamente activo por tratamiento con una base. Otro método para resolver racematos en las antípodas ópticas se basa en cromatografía en una matriz óptica activa. Los compuestos racémicos de la invención por tanto pueden

resolverse en sus antípodas ópticas, por ejemplo, por cristalización fraccionada de sales d o l (tartratos, mandelatos, o canforsulfonatos), por ejemplo.

Los derivados de diarilurea de la invención también pueden resolverse por la formación de amidas diastereoméricas por reacción de los compuestos químicos de la presente invención con un ácido carboxílico activado ópticamente activo tal como el derivado de (+) o (-) fenilalanina, (+) o (-) fenilglicina, ácido (+) o (-) camfánico o por la formación de carbamatos diastereoméricos por reacción del compuesto químico de la invención con un cloroformiato ópticamente activo o similares.

Se conocen métodos adicionales para resolver los isómeros ópticos en la técnica. Dichos métodos incluyen los descritos por Jaques J, Collet A, & Wilen S en "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley y Sons, New York (1981).

Los compuestos activos ópticos también pueden prepararse a partir de materiales de partida activos ópticos.

Métodos de Preparación

Los derivados de diarilurea de la invención pueden prepararse por métodos convencionales para síntesis química, por ejemplo los descritos en los ejemplos de trabajo. Los materiales de partida para los procesos descritos en la presente solicitud son conocidos o pueden prepararse fácilmente por métodos convencionales a partir de compuestos químicos disponibles en el mercado.

Un compuesto de la invención también puede convertirse en otro compuesto de la invención usando métodos convencionales.

Los productos finales de las reacciones descritas en este documento pueden aislarse por técnicas convencionales, por ejemplo por extracción, cristalización, destilación, cromatografía, etc.

Actividad Biológica

Se descubrió que los derivados de diarilurea de la presente invención son moduladores de los receptores ionotrópicos de glutamato, y en particular del receptor ionotrópico GluR5. En una realización preferida de la invención los derivados de diarilurea son útiles como antagonistas selectivos, no competitivos del receptor ionotrópico GluR5.

Actualmente se cree que compuestos que modifican la neurotransmisión por interacción con los receptores de aspartato y glutamato son útiles en el tratamiento de una diversidad de trastornos del SNC y el SNP y trastornos de otro origen, incluyendo dolor crónico o agudo, dolor neuropático, dolor intratable, cefaleas por migraña, trastornos neurológicos y psiquiátricos, depresión, ansiedad, psicosis, esquizofrenia, psicosis dependiente de aminoácidos excitadores, trastornos cognitivos, demencia, demencia senil, demencia inducida por SIDA, trastornos psiquiátricos relacionados con el estrés, apoplejía, apoplejía isquémica o hemorrágica global y focal, hipoxia/isquemia cerebral, infarto cerebral o isquemia cerebral como resultado de apoplejía tromboembólica o hemorrágica, infarto cardíaco, traumatismo cerebral, edema cerebral, traumatismo craneal/cerebral, traumatismo de la médula espinal, lesiones de la médula ósea, hipoglucemia, anoxia, daño neuronal después de hipoglucemia, hipotonía, hipoxia, hipoxia perinatal, parada cardíaca, enfermedades o trastornos neurodegenerativos agudos y crónicos e isquemia cerebral de diverso origen, trastornos degenerativos del SNC, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson idiopática e inducida por fármacos, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), lesiones cerebrales después de fase aguda o enfermedades crónicas del sistema nervioso, déficit cerebrales después de cirugía de derivación cardíaca e injerto, asfixia perinatal, anoxia por ahogamiento, cirugía pulmonar y traumatismo cerebral, daño de las células nerviosas inducido por hipoxia (por ejemplo, en parada cardíaca u operación de derivación, o insuficiencia del neonato), epilepsia, *status epilepticus*, trastornos de ataques, vasoespasmo cerebral, espasmos mediados por el SNC, trastornos de motilidad, espasmos musculares, incontinencia urinaria, convulsiones, trastornos sensibles a anticonvulsivos; enfermedades autoinmunes, emesis, náuseas, obesidad, dependencias químicas y adicciones, síntomas de adicciones y abstinencia, déficit inducidos por fármacos o alcohol, adicción a fármacos, daño ocular, retinopatía, neuropatía retinal, tinnitus, disquinesia tardía.

En una realización más preferida, los derivados de diarilurea de la invención se usan para el tratamiento de trastornos cognitivos y neurodegenerativos, trastornos del movimiento, depresión, AD, ADHD, psicosis y déficit cognitivos asociados, psicosis inducida por fármacos, síntomas de abstinencia de fármacos, apoplejía, dolor, en particular dolor crónico o agudo, dolor neuropático, dolor intratable, o migraña y cefalea por migrañas, epilepsia y retinopatía.

En una realización particularmente preferida, los derivados de diarilurea de la invención se usan para el tratamiento de dolor, en particular dolor crónico o agudo, dolor neuropático y dolor intratable, migraña, cefaleas por migrañas.

En otra realización particularmente preferida, los derivados de diarilurea de la invención se usan para el tratamiento de epilepsia, *status epilepticus* o un trastorno de ataques.

Composiciones Farmacéuticas

En otro aspecto, la invención proporciona nuevas composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del derivado de diarilurea de la invención.

Aunque el derivado de diarilurea de la invención para su uso en terapia puede administrarse en forma del compuesto químico sin procesar, se prefiere introducir el ingrediente activo, opcionalmente en forma de una sal fisiológicamente aceptable, en una composición farmacéutica junto con uno o más adyuvantes, excipientes, vehículos, tampones, diluyentes, y/u otros auxiliares farmacéuticos habituales.

En una realización preferida, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el derivado de diarilurea de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable o derivado del mismo, junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables del mismo y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos y/o profilácticos, conocidos y usados en la técnica. El(los) vehículo(s) deben ser "aceptable(s)" en el sentido de ser compatible(s) con los otros ingredientes de la formulación y no dañinos para el destinatario de los mismos.

La composición farmacéutica de la invención puede administrarse por cualquier vía conveniente, que convenga a la terapia deseada. Las vías de administración preferidas incluyen administración oral, en particular en forma de comprimido, cápsula, gragea, polvo, o líquido, y administración, en particular inyección cutánea, subcutánea, intramuscular, o intravenosa. La composición farmacéutica de la invención puede fabricarla cualquier especialista en la técnica por el uso de métodos convencionales y técnicas convencionales apropiadas para la formulación deseada. Cuando se desee, pueden emplearse composiciones adaptadas para dar liberación sostenida del ingrediente activo.

Pueden encontrarse detalles adicionales sobre técnicas para la formulación y administración en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, PA).

La dosificación real depende de la naturaleza y gravedad de la enfermedad que se esté tratando, y pertenece al criterio del médico, y puede variarse por valoración de la dosificación a las circunstancias particulares de esta invención para producir el efecto terapéutico deseado. Sin embargo, actualmente se contempla que las composiciones farmacéuticas que contienen de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 500 mg de ingrediente activo por dosis individual, preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg, más preferido de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg, son adecuadas para tratamientos terapéuticos.

El ingrediente activo puede administrarse en una o varias dosis por día. Puede obtenerse un resultado satisfactorio, en ciertos casos, a una dosificación tan baja como 0,1 $\mu\text{g/kg}$ i.v. y 1 $\mu\text{g/kg}$ p.o. El límite superior del intervalo de dosificación está considerado actualmente en aproximadamente 10 mg/kg i.v. y 100 mg/kg p.o. Intervalos preferidos son de aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/kg}$ a aproximadamente 10 mg/kg/día i.v., y de aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ a aproximadamente 100 mg/kg/día p.o.

Ejemplos

La invención se ilustra adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos, que no se pretende que sean de ningún modo limitantes del alcance de la invención reivindicada.

Ejemplo 1**Ejemplo Preparatorio***Materiales de partida**Ácido 2-amino-4-cloro-bencenosulfónico*

Se diluyó ácido sulfúrico concentrado (densidad relativa. 1,84) (13,9 ml, 250 mmol) con 100 ml de agua. Se añadió 3-cloro-anilina (31,9 g, 250 mmol) durante 30 minutos mientras la temperatura se mantenía a 85°C. Durante la adición sucedió algo de precipitación. La suspensión se dejó enfriar a temperatura ambiente y se formó una precipitación pesada. El sólido se filtró con succión para producir un sólido cristalino blando. El sólido se calentó lentamente a 200°C al vacío (bomba de agua) y equipado con un sifón de agua. El sólido se mantuvo a 200°C durante 7 horas. Se perdió agua del material cristalino. El sólido se dejó enfriar y después se disolvió en NaOH acuoso diluido y se precipitó con ácido clorhídrico. Se produjeron 25 g (48%) del compuesto del título en forma de un sólido cristalino blanco (p.f. >250°C).

2-Amino-4-cloro-N-hidroxi-benzamida

Se disolvió 2-amino-4-cloro-benzonitrilo (5,3 g, 35 mmol) en etanol (180 ml) ayudado por calentamiento. Se añadió una solución acuosa de clorhidrato de hidroxilamina (4,9 g, 70 mmol) y bicarbonato sódico (11,1 g, 105 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 8 horas. El disolvente después se redujo y se suspendió el producto en agua (100 ml) y se retiró por filtración para producir 5,6 g (86%) de un polvo blanco (p.f. 131-133°C).

ES 2 327 834 T3

3-(2-Amino-4-cloro-fenil)-4H-[1,2,4]oxadiazol-5-ona

Se disolvió metal sodio (0,92 g, 40 mmol) en 70 ml de etanol absoluto y se añadió 2-amino-4-cloro-N-hidroxi-benzamida (3,71 g, 20 mmol) y después se añadió carbonato de dietilo (9,44 g, 80 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 18 horas y después se redujo a sequedad al vacío y se trituró con HCl acuoso 0,5 M, se filtró y después se trituró con tolueno y se filtró para producir 3,4 g (80%) de un sólido marrón rojizo (p.f. 159-161°C).

Método D

1-[5-Cloro-2-(5-oxo-4,5-dihidro-[1,2,4]oxadiazol-3-il)-fenil]-3-(3-trifluorometil-fenil)-urea (Compuesto D1)

Se disolvió 3-(2-amino-4-cloro-fenil)-4H-[1,2,4]oxadiazol-5-ona (400 mg, 1,92 mmol) en 20 ml de THF seco y se añadió 3-trifluorometil-fenil-isocianato (450 mg, 2,40 mmol) y la reacción se agitó durante 16 horas. El disolvente se redujo al vacío y el producto se recristalizó en acetato de etilo y heptano para producir 480 mg (63%) de un sólido cristalino blanquecino (p.f. 246-248; descomposición).

1-[5-Cloro-2-(5-oxo-4,5-dihidro-[1,2,4]oxadiazol-3-il)-fenil]-3-(3-bromo-fenil)-urea (Compuesto D2)

Se hizo usando el método D (p.f. 210-211°C; descomposición).

Método E

Ácido 4-cloro-2-(3-piridin-2-il-ureido)-benzoico (Compuesto E1)

Se suspendió ácido piridina-2-carboxílico (369 mg, 3 mmol) en 15 ml de tolueno seco y se añadió difenil-fosforil azida (958 mg, 3,5 mmol). Después se añadió gota a gota trietilamina (354 mg, 3,6 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 0,5 horas. La solución se calentó a 80°C y después de 2 horas se añadió ácido 2-amino-4-clorobenzoico (463 mg, 2,7 mmol) en 20 ml de THF y también se añadió trietilamina (0,354 g, 3,6 mmol). La mezcla se agitó durante 1 hora a 80°C y después a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se dejó enfriar y el disolvente se retiró a presión reducida. El residuo se recogió en acetato de etilo y se precipitó con heptano y se filtró con succión. Después de recristalización en acetato de etilo/heptano se produjeron 640 mg (73%) de un sólido cristalino blanco (p.f. 222-224°C).

1-[5-Cloro-2-(5-oxo-4,5-dihidro-[1,2,4]oxadiazol-3-il)-fenil]-3-naftalen-2-il-urea (Compuesto E8)

Se preparó usando el método E (p.f. 245°C; descomposición).

Ejemplo 2

Ensayo Funcional de GluR5 y GluR6

Este ejemplo describe ensayos basados en células realizados usando células HEK293 embrionarias humanas que expresan de forma estable los receptores GluR5 y GluR6, respectivamente, usándose en dichos ensayos la inhibición del aumento inducido por domoato en el Ca_i como una medida para la actividad antagonista de glutamato de las sustancias de ensayo.

La concentración de calcio libre intracelular (Ca_i) regula la mayoría de los procesos metabólicos en células de mamífero. Las elevaciones de Ca_i en tejidos excitables tales como neuronas se observan después de la activación específica de los canales de calcio accionados por el receptor (por ejemplo, receptores de glutamato), o después de la despolarización y accionamiento de los canales de calcio accionados por voltaje. Algunos neurotransmisores y neuromoduladores aumentan el Ca_i activando los ionóforos acoplados a proteína G o por la liberación de Ca_i desde los almacenes intracelulares mediante el segundo mensajero IP_3 .

El Ca_i se determina por métodos fluorométricos en un Lector de Placa de Imagen Fluorescente (Fluorescent Image Plate Reader (FLIPR)). Se cargan fluorocromos quelantes de calcio (ácidos tetracarboxílicos) en las células en forma de ésteres de acetoximetilo y posteriormente se liberan por una esterasa intracelular inespecífica. Los ácidos libres, que son impermeables a la membrana celular, se mantienen en la célula durante horas. El espectro de fluorescencia ($EX_{m\acute{a}x}$, $EM_{m\acute{a}x}$ o ambos) se cambia por la unión de calcio, y la fluorescencia es directamente proporcional al Ca_i .

El presente método usa los fluorocromos Fluo-3 o Fluo-4 como quelador de calcio. Fluo-3/Fluo-4 es casi no fluorescente sin calcio, pero los complejos calcio-Fluo-3/Fluo-4 muestran una fluorescencia brillante ($EM_{m\acute{a}x}$ = 526 nm) después de excitación a aproximadamente 500 nm ($EX_{m\acute{a}x}$ = 505 nm). Este espectro de fluorescencia es similar al espectro de la fluoresceína. Como la excitación y la emisión están en la región de luz visible del espectro, puede usarse un equipo convencional sin óptica de cuarzo.

ES 2 327 834 T3

El subtipo kainato de receptores ionotrópicos de glutamato existe de dos tipos de subunidades de elevada afinidad - KA1 y KA2, y tres subunidades de baja afinidad - GluR5-7. El canal de iones en el subtipo de receptor GluR5 puede hacerse permeable para el calcio por sustitución de una arginina (R) en una glutamina (Q) en la región de poro. Los receptores GluR5 humanos expresados de forma estable usados en este caso son permeables al calcio (Q), que los hace ideales para las mediciones de fluorescencia.

Cultivo celular

Se cultivan células HEK 293 que expresan GluR5, que expresan respectivamente GluR6 en DMEM que contiene suero de ternera fetal al 10%, en matraces de cultivo de poliestireno (175 cm²) en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% en aire, a 37°C. La confluencia de las células debe ser del 80-90% en el día de la siembra. Las células GluR5 se aclaran con 10 ml de PBS, después se añaden 1,5 ml de Tripsina-EDTA y se dejan en la incubadora durante 5 min. Después de la adición de 10 ml de medio de cultivo las células se re-suspenden por trituración con una pipeta de 10 ml 15 veces.

Las células se siembran a una densidad de 0,5 - 1 x 10⁶ células/ml (100 µl/pocillo) en placas de 96 pocillos, de fondo transparente, de pared negra pre-tratadas con solución PEI al 0,001% (75 µl/pocillo durante >30 min.). Las células sembradas se dejaron proliferar durante 24 h antes de cargarlas con colorante.

Carga con Fluo-4-AM

Se añade Fluo-4-AM (1 mg, Molecular Probes) 912 µl en DMSO que contiene 25 mg/150 µl de Pluoronic F-127 (Molecular Probes). La solución madre de Fluo-4-AM (1 mM) se diluye con DMEM a una concentración final de Fluo-4-AM 2 µM.

Se retira el medio de los pocillos, y se añaden 50 µl de la solución de carga Fluo-4-AM a cada pocillo. La placa se cierra herméticamente y se incuba a temperatura ambiente durante 60 min.

Mediciones de calcio

Después del periodo de carga, se aspira el medio de carga y las células se lavan dos veces con 100 µl de Ringer libre de Na⁺ (NN: HEPES 10 mM, cloruro de colina 140 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7,4) para retirar el colorante extracelular. Se añaden 100 µl de NN a cada pocillo, y se mide la fluorescencia en el FLIPR.

Las células se pre-incuban durante 1,5 min. con compuesto de ensayo (50 µl) antes de la adición de domoato (50 µl) a una concentración final de 2 µM cuando se determina sobre GluR5 y 0,2 µM cuando se determina en GluR6.

Se hacen soluciones madre de las sustancias de ensayo en etanol al 48%, DMSO al 50% o DMSO al 100%. La concentración final de etanol o DMSO en el pocillo no debe exceder el 0,1%. Las diluciones se hacen en NN en placas de fondo transparente en V.

Ajustes de FLIPR

Temperatura: 25°C

Preincubación: 50 µl de solución de ensayo a una velocidad de 30 µl/segundo y altura de partida de 100 µl

Fase antagonista: 50 µl de solución de domoato (8 µM) a una velocidad de 35 µl/segundo y altura de partida de 150 µl

Intervalos de lectura: preincubación -10 segundos x 7 y 3 segundos x 3 fase antagonista - 3 segundos x 17 y 10 segundos x 12

Las placas de adición (placa de compuesto diluido y placa de domoato) se colocan en las posiciones del extremo derecho e izquierdo en la bandeja de FLIPR. Las placas celulares se colocan en la posición central. Primero se procesa el ensayo de fase de preincubación usando los ajustes anteriores. El FLIPR cogerá la cantidad deseada de la placa de compuesto y la pipeteará en la placa celular. El FLIPR después tomará las mediciones apropiadas de acuerdo con los ajustes de intervalo anteriores.

Resultados

La fluorescencia en la estimulación con domoato o la sustancia de ensayo se corrige para la fluorescencia basal media (en NN).

La fluorescencia de domoato en presencia de sustancia de ensayo se expresa con relación a la respuesta de domoato sola.

ES 2 327 834 T3

Debe obtenerse el 25-75% de inhibición de la estimulación con domoato antes de calcular la CI_{50} .

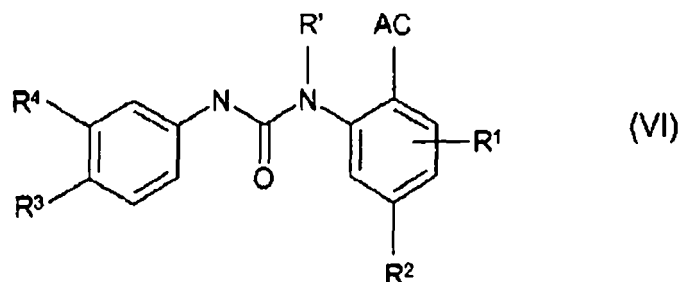
El valor de ensayo se dará como CI_{50} (la concentración (μM) de sustancia de ensayo, que inhibe el 50% de la elevación de Ca_i inducida por domoato), calculada a partir de una curva de respuesta a la concentración o a partir de la fórmula

$$CI_{50} = (\text{concentración sustancia de ensayo aplicada, } \mu M) \times \frac{1}{\frac{C_o}{C_x} - 1}$$

donde C_o es la acumulación de Ca_i estimulada con domoato en ensayos de control, y C_x es el Ca_i estimulado con domoato en presencia de compuesto de ensayo.

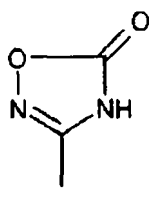
REIVINDICACIONES

1. Un derivado de diarilurea representado por la Fórmula VI,



cualquiera de sus enantiómeros o cualquier mezcla de sus enantiómeros, o una sal de adición farmacéuticamente aceptable del mismo, donde

AC representa un anillo heterocíclico de la estructura



R' representa hidrógeno o alquilo C₁₋₆;

R¹ representa hidrógeno, halo, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, nitro o ciano;

R² representa halo, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, nitro o ciano; y

R³ y R⁴, independientemente entre sí, representan hidrógeno, halo, hidroxilo, alcoxi C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆ o fenilo;

o

R³ y R⁴ juntos forman un anillo metilenodioxio de la estructura -O-CH₂-O-; o R³ y R⁴ juntos forman un anillo benzo-condensado, estando dicho anillo condensado opcionalmente sustituido una o más veces con sustituyentes seleccionados entre halo, hidroxilo, alcoxi C₁₋₆ y haloalquilo C₁₋₆.

2. El derivado de diarilurea de la reivindicación 1, que es

1-[5-cloro-2-(5-oxo-4,5-dihidro-[1,2,4]oxadiazol-3-il)-fenil]-3-(3-trifluorometil-fenil)-urea;

1-[5-cloro-2-(5-oxo-4,5-dihidro-[1,2,4]oxadiazol-3-il)-fenil]-3-(3-bromofenil)-urea; o

1-[5-cloro-2-(5-oxo-4,5-dihidro-[1,2,4]oxadiazol-3-il)-fenil]-3-naftalen-2-il-urea;

o un enantiómero o una mezcla de enantiómeros, o una sal de adición farmacéuticamente aceptable de los mismos.

3. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del derivado de diarilurea de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, o una sal de adición farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Uso del derivado de diarilurea de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, o una sal de adición farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de una composición farmacéutica/medicamento.

5. Uso del derivado de diarilurea de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, o una sal de adición farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de una composición farmacéutica/medicamento para el tratamiento, prevención o alivio de una enfermedad o un trastorno o una afección de un mamífero, incluyendo un ser humano, siendo sensible dicha enfermedad, trastorno o afección a la modulación del receptor ionotrópico GluR5.

6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde la enfermedad, trastorno o afección es dolor crónico o agudo, dolor neuropático, dolor intratable, cefaleas por migraña, trastornos neurológicos y psiquiátricos, depresión, ansiedad, psicosis, esquizofrenia, psicosis dependiente de aminoácidos excitadores, trastornos cognitivos, demencia, demencia

senil, demencia inducida por SIDA, trastornos psiquiátricos relacionados con el estrés, apoplejía, apoplejía isquémica o hemorrágica global y focal, hipoxia/isquemia cerebral, infarto cerebral o isquemia cerebral como resultado de apoplejía tromboembólica o hemorrágica, infarto cardiaco, traumatismo cerebral, edema cerebral, traumatismo craneal/cerebral, traumatismo de la médula espinal, lesiones de la médula ósea, hipoglucemia, anoxia, daño neuronal después de hipoglucemia, hipotonía, hipoxia, hipoxia perinatal, parada cardiaca, enfermedades o trastornos neurodegenerativos agudos y crónicos e isquemia cerebral de diverso origen, trastornos degenerativos del SNC, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson idiopática e inducida por fármacos, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), lesiones cerebrales después de fase aguda o enfermedades crónicas del sistema nervioso, déficit cerebrales después de cirugía de derivación cardiaca e injerto, asfixia perinatal, anoxia por ahogamiento, cirugía pulmonar y traumatismo cerebral, daño de las células nerviosas inducido por hipoxia (por ejemplo, en parada cardiaca u operación de derivación, o insuficiencia del neonato), epilepsia, *status epilepticus*, trastornos de ataques, vasoespasma cerebral, espasmos mediados por el SNC, trastornos de motilidad, espasmos musculares, incontinencia urinaria, convulsiones, trastornos sensibles a anticonvulsivos; enfermedades autoinmunes, emesis, náuseas, obesidad, dependencias químicas y adicciones, síntomas de adicciones y abstinencia, déficit inducidos por fármacos o alcohol, adicción a fármacos, daño ocular, retinopatía, neuropatía retinal, tinnitus, disquinesia tardía.

7. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde el trastorno, la enfermedad o la afección es dolor crónico o agudo, dolor neuropático, dolor intratable, migraña o cefaleas por migraña.

8. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde el trastorno, la enfermedad o la afección es epilepsia, *status epilepticus* o un trastorno de ataques.