



(11) *Número de Publicação:* PT 776201 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6 )  
A61K031/19 A

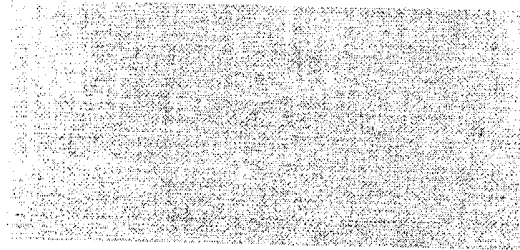
(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

<p>(22) <i>Data de depósito:</i> 1995.08.14</p> <p>(30) <i>Prioridade:</i> 1994.08.12 US 289957 1994.11.10 US 337349 1995.06.29 US 496710</p> <p>(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1997.06.04</p> <p>(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2001.10.17</p>	<p>(73) <i>Titular(es):</i> ELI LILLY AND COMPANY LILLY CORPORATE CENTER INDIANAPOLIS, IN 46285 US</p> <p>(72) <i>Inventor(es):</i> DAVID REED HELTON US JAMES ALLEN MONN US JOSEPH PATRICK TIZZANO US MARY JEANNE KALLMAN US DARRYLE DARWIN SCHOEPP US</p> <p>(74) <i>Mandatário(s):</i> ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VITOR CORDON, Nº 14 - 3º 1200 LISBOA PT</p>
--	--

(54) *Epígrafe:* COMPOSIÇÃO E MÉTODO PARA TRATAR A ANSIEDADE

(57) *Resumo:*

COMPOSIÇÃO E MÉTODO PARA TRATAR A ANSIEDADE



## DESCRIÇÃO

### "COMPOSIÇÃO E MÉTODO PARA TRATAR A ANSIEDADE"

A presente invenção relaciona-se com o tratamento da ansiedade e das perturbações a ela associadas.

A quarta edição do Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV™), publicada em 1994 pela American Psychiatric Association, Washington, DC, define a ansiedade e as perturbações a ela associadas. Estas são a perturbação de pânico sem agorafobia, a perturbação de pânico com agorafobia, a agorafobia sem história de perturbação de pânico, fobia específica, fobia social, perturbação obsessivo-compulsiva, perturbação pós-stress traumático, perturbação aguda de stress, perturbação da ansiedade generalizada, perturbação de ansiedade provocada por um estado físico geral, perturbação de ansiedade induzida por substância e perturbação da ansiedade sem outra especificação.

As perturbações de ansiedade são geralmente tratadas através de aconselhamento ou com fármacos. As classes dos fármacos que são largamente prescritas para o tratamento das perturbações de ansiedade incluem as benzodiazepinas (tais como o diazepam) e o hidrocloreto de buspirona.

As benzodiazepinas foram introduzidas durante os anos 60. Alcançaram grande aceitação, mas o seu uso está, no entanto, restrito devido ao seu perfil de efeitos secundários adversos, em particular à sua tendência para induzir à dependência.

O hidrocloreto de buspirona foi introduzido no início dos anos 80. Não tem efeitos secundários que conduzam à dependência, mas tem um início de acção lento (cerca de 4 semanas).

Existe, por conseguinte, a necessidade de novos fármacos para o tratamento da ansiedade e perturbações a ela associadas.

Foram desenvolvidos vários modelos animais que são reconhecidos na técnica como sendo proféticos da actividade ansiolítica. Estes incluem o modelo do choque potenciado pelo medo, descrito por Davis em *Psychopharmacology* 62:1; 1979 e *Behav. Neurosci.* 100:814; 1986, o modelo de mais elevação descrito por Lister em *Psychopharmacol.* 92:180-185; 1987, e o bem conhecido modelo de resposta à punição (conflito), descrito, por exemplo, em "Psychopharmacology of Anxiolytics and Antidepressants", editado por S.E. File, pp. 131-153, Raven Press, Nova Iorque, 1991.

No sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos, a transmissão de impulsos nervosos é controlada pela interacção entre um neurotransmissor, que é libertado por um neurónio transmissor, e um receptor de superfície num neurónio receptor, provocando a excitação deste neurónio receptor. Acredita-se que tanto as benzodiazepinas como o hidrocloreto de buspirona exortem o seu efeito ansiolítico pela ligação a esses receptores. Em particular, acredita-se que as benzodiazepinas actuem por ligação aos receptores GABA, enquanto se acredita que o hidrocloreto de buspirona se ligue aos receptores 5HT<sub>1a</sub>.

O L-Glutamato, que é o neurotransmissor mais abundante do SNC, medeia a via excitatória principal dos mamíferos, e é referido como um aminoácido excitador (AAE). Os receptores que respondem ao glutamato são chamados

receptores de amino-ácido excitador (receptores de AAE). A este respeito, ver Watkins & Evans, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **21**, 165 (1981); Monaghan, Bridges e Cotman, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **29**, 365 (1989); Watkins, Krogsgaard-Larsen, e Honore, *Trans. Pharm. Sci.*, **11**, 25 (1990). Os amino-ácidos excitadores são de grande importância fisiológica, desempenhando um papel numa série de processos fisiológicos, tais como a potenciação a longo prazo (aprendizagem e memória), o desenvolvimento da plasticidade sináptica, o controle motor, a respiração, a regulação cardiovascular, estados emocionais e percepção sensorial.

Os receptores de amino-ácidos excitadores são classificados em dois tipos gerais. Os receptores que estão directamente acoplados à abertura dos canais de catião na membrana celular dos neurónios são denominados "ionotrópicos". Este tipo de receptor foi subdividido em pelo menos três subtipos, que são definidos pelas acções de despolarização dos agonistas selectivos de *N*-metil-D-aspartato (NMDA), ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico ( $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-methylisoxazole-4-propionic acid, AMPA), e ácido cáinico (Kainic Acid, KA). O segundo tipo geral de receptor é o receptor de proteína G ou receptor "metabotrópico" de amino-ácido excitador ligado ao segundo mensageiro. Este segundo tipo está acoplado a múltiplos sistemas de segundo mensageiro que levam à hidrólise aumentada dos fosfoinosítídeos, à activação da fosfolipase D, a aumentos ou decréscimos na formação do cAMP, e a mudanças na função dos canais de iões. Schoepp e Conn, *Trends in Pharmacol. Sci.*, **14**, 13 (1993). Ambos os tipos de receptores parecem não apenas mediar a transmissão sináptica normal ao longo das vias excitatórias, mas também participar na modificação das conexões sinápticas durante o desenvolvimento e ao longo da vida. Schoepp, Bockaert, e Sladeczek, *Trends in Pharmacol. Sci.*, **11**, 508 (1990); McDonald e Johnson, *Brain Research Reviews*, **15**, 41 (1990).

Os receptores metabotrópicos de glutamato são uma família altamente heterogénea de receptores de glutamato que estão ligados a múltiplas vias de segundo mensageiro. Geralmente, estes receptores funcionam a fim de modular a libertação pré-sináptica do glutamato, e a sensibilidade pós-sináptica da célula neurónica à excitação pelo glutamato. Os receptores metabotrópicos de glutamato (metabotropic glutamate receptors, mGluR) foram divididos farmacologicamente em dois sub-tipos. Um grupo de receptores está acoplado positivamente à fosfolipase C, o que provoca a hidrólise dos fosfoinosítídeos (PI) celulares. Este primeiro grupo é designado como o dos receptores metabotrópicos de glutamato ligados ao PI. O segundo grupo de receptores está acoplado negativamente à ciclase do adenil, o que evita a acumulação de monofosfato de adenosina cíclica (cyclic Adenosine Monophosphate, cAMP) estimulada por forescolina. Schoepp e Conn, *Trends Pharmacol. Sci.*, **14**, 13 (1993). Os receptores pertencentes a este segundo grupo são designados como receptores metabotrópicos de glutamato ligados ao cAMP.

Foi agora descoberto que um composto que é um agonista que actua selectivamente nos receptores metabotrópicos de glutamato ligados ao cAMP acoplados negativamente é eficaz nos modelos de ansiedade de choque potenciado pelo medo e de labirinto mais elevação, mas não têm uma eficácia semelhante à das benzodiazepinas no modelo de resposta à punição (conflito)).

A presente invenção fornece o uso de um agonista que actua nos receptores metabotrópicos de glutamato ligados ao cAMP acoplados negativamente para o fabrico de um medicamento para o tratamento da ansiedade e perturbações a ela associadas.

Descobriu-se que um composto inovador que actua selectivamente como um agonista nos receptores metabotrópicos de glutamato ligados ao cAMP

acoplados negativamente, o ácido (+)-2-aminobicyclo(3.1.0)hexano-2,6- dicarboxílico, é eficaz nos modelos de ansiedade de choque potenciado pelo medo e de labirinto mais elevação. Uma vez que as benzodiazepinas e o hidrocloreto de buspirona são eficazes nestes modelos e são úteis de modo geral no tratamento das perturbações de ansiedade, acredita-se que as perturbações de ansiedade serão passíveis de ser tratadas utilizando qualquer agonista que actue nos receptores metabotrópicos de glutamato acoplados negativamente ligados ao cAMP, especialmente um agonista que actue selectivamente.

Os modelos de choque potenciado pelo medo e mais elevação medem ambos a capacidade de um composto de teste para proteger um animal de teste do efeito da exposição a um ambiente provocador de ansiedade. No teste anterior, o ambiente provocador de ansiedade compreende um estímulo neutro, tal como uma luz, que o animal de teste está condicionado a associar a um estímulo adverso, tal como um choque eléctrico. Neste último teste, o ambiente provocador de ansiedade compreende um espaço aberto, pelo qual os roedores têm uma aversão natural.

De acordo com um aspecto preferido, por conseguinte, a presente invenção fornece a utilização de um agonista que actua nos receptores metabotrópicos de glutamato acoplados negativamente ligados ao cAMP para o fabrico de um medicamento para proteger um mamífero do efeito de um ambiente provocador de ansiedade, preferencialmente um agonista que actua selectivamente.

Verificar-se-á que o efeito de um ambiente provocador de ansiedade num mamífero pode ser condicionado (como medido no modelo de choque potenciado pelo medo) ou natural (como medido no modelo de labirinto mais elevação). De acordo com isto, um ambiente particular pode produzir ansiedade apenas em indivíduos específicos ou no geral de uma população.

Exemplos de perturbações de ansiedade que podem ser produzidos em indivíduos específicos são aqueles que são descritos no Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, publicado em 1994 pela American Psychiatric Association, Washington, D.C.

A dose específica de agonista administrada de acordo com esta invenção será, claro está, determinada pelas circunstâncias específicas que rodeiam o caso, incluindo a actividade do agonista específico administrado, a via de administração, a situação particular a ser tratada, e considerações semelhantes. O agonista pode ser administrado através de uma diversidade de vias, incluindo a via oral, rectal, transdérmica, subcutânea, intravenosa, intramuscular, ou intranasal. Alternativamente, o agonista pode ser administrado através de infusão contínua. Uma dose diária típica conterà de cerca de 0,001 mg/kg a cerca de 100 mg/kg do agonista. Preferencialmente, as doses diárias serão de cerca de 0,05 mg/kg a cerca de 50 mg/kg, mais preferencialmente de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 20 mg/kg.

Os agonistas que actuam nos receptores metabotrópicos de glutamato acoplados negativamente ligados ao cAMP podem ser identificados utilizando o procedimento experimental a seguir. Primeiramente, a afinidade de um composto de teste com os receptores metabotrópicos de glutamato pode ser demonstrada pelo deslocamento selectivo da ligação do [<sup>3</sup>H]glutamato sensível ao ácido (1*S*, 3*R*)-1-aminociclopentano-1,3-dicarboxílico às membranas celulares do cérebro dos ratos. A ligação do [<sup>3</sup>H]glutamato ([<sup>3</sup>H]Glu) é conduzida com membranas cruas do prosencéfalo dos ratos, como descrito por Schoepp e True. Schoepp e True, *Neuroscience Lett.*, **145**, 100-104 (1992); Wright, McDonald, e Schoepp, *J. Neurochem.*, **63**, 938-945 (1994). A afinidade de um composto de teste com o receptor pode ser expressa como a concentração do composto de teste

que inibe 50% da ligação ( $IC_{50}$ ), ou a percentagem de deslocamento do [ $^3H$ ]Glu a uma concentração de 10  $\mu M$  ou 100  $\mu M$  do composto da fórmula I. Neste teste, descobriu-se que o  $IC_{50}$  para o ácido (+)-2-aminobicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico é de 0,18  $\mu M$ .

A capacidade de um composto de teste para actuar como um agonista nos receptores metabotrópicos de glutamato acoplados negativamente ligados ao cAMP pode ser medida utilizando o método a seguir. Os compostos de teste são testados para verificar a sua capacidade para diminuir a formação de cAMP estimulada por foforescolina no hipocampo dos ratos e no córtex cerebral dos ratos, utilizando os procedimentos descritos em Schoepp e Johnson. Schoepp e Johnson, *Neurochem. Int.*, **22**, 277-283 (1993). Neste teste, verificou-se que o ácido (+)-2-aminobicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico dava o resultado apresentado na Tabela II abaixo.

**Tabela II. Inibição da Formação de cAMP Estimulada por Foforescolina**

	$EC_{50}$ ( $\mu M$ )
Córtex cerebral dos ratos	$0,055 \pm 0,017$
Hipocampo dos ratos	$0,036 \pm 0,015$

A capacidade dos compostos de fórmula I para tratar a ansiedade ou uma perturbação a ela associada pode ser demonstrada utilizando os bem conhecidos modelos de ansiedade de choque potenciado pelo medo e de labirinto mais elevação.

No modelo de choque potenciado pelo medo, os animais são expostos a um estímulo neutro tal como luz (estímulo condicionado) com um estímulo adverso tal como um choque (estímulo não condicionado). A seguir ao

condicionamento, quando os animais são confrontados com um estímulo acústico de alto volume de som, as maiores respostas de choque são produzidas quando o estímulo de choque é precedido por luz.

O modelo de labirinto mais elevação baseia-se na aversão natural dos roedores à altura e aos espaços abertos.

O diazepam e o hidrocloreto de buspirona, que são ansiolíticos clinicamente testados, são eficazes na redução do medo (resposta de choque aumentado) associado à confrontação com luz no modelo de choque potenciado, e na redução do medo dos espaços abertos no modelo de elevação mais labirinto.

Ratos Long Evans machos (180-400 g) ou ratinhos Suíços NIH machos (18-35 g) foram obtidos através da Harlan Sprague-Dawley, Cumberland, IN, EUA e aclimatados pelo menos 3 dias antes de serem submetidos aos testes. Os animais foram guardados a  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  (30% a 70% de humidade relativa) e alimentados com Purina Certified Rodent Chow e água ad libitum. O fotoperíodo foi de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão, com o estabelecimento da escuridão aproximadamente às 1800 horas.

compostos de teste foram dissolvidos num veículo de água purificada e neutralizados com 5 N NaOH a um pH de 7-8 quando aplicável. Diazepam (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) foi suspenso em água purificada através da adição gota a gota de Tween 80. Os animais de controle receberam o veículo respectivo.

**Choque potenciado pelo medo:** Foram usadas câmaras SL-LAB (San Diego Instruments, San Diego, CA) para sessões de condicionamento e para a produção e registo das respostas de choque. Foi usado um procedimento de condicionamento clássico para produzir a potenciação das respostas de choque.

Resumidamente, nos primeiros 2 dias os ratos foram colocados em câmaras de choque escuras, nas quais foram instaladas grelhas de choque. Passado um período de 5 minutos de aclimação, cada rato recebeu um choque eléctrico de 1mA (500 ms) precedido por uma confrontação de 5 segundos com luz (15 watt) que se manteve acesa durante o tempo de duração do choque. Foram efectuadas dez confrontações da luz e do choque em cada sessão de condicionamento, os ratos foram submetidos a gavagem com uma solução de composto de teste e água e as sessões de teste de choque foram conduzidas. No início da sessão foi apresentado um bloco de 10 confrontações consecutivas de estímulos de choque acústicos (110 dB, não sincronizados com a luz) a fim de minimizar as influências da fase rápida inicial de habituação ao estímulo. Isto foi seguido por 20 experimentações alternadas do ruído por si só ou do ruído precedido por luz. Excluindo o bloco de experimentação inicial, as amplitudes de resposta ao choque para cada tipo de experimentação (ruído por si só versus luz + ruído) foram avaliadas relativamente a cada rato ao longo de toda a sessão de teste. Os dados são apresentados como a diferença entre ruído por si só e luz + ruído. Verificou-se que o ácido (+)-2-Aminobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico deu um ED<sub>50</sub> de 0,3 mg/kg, p.o. neste teste.

**Elevação Automatizada Mais Labirinto:** A construção da elevação mais labirinto foi baseada numa concepção validada para ratos por Lister (1987). O labirinto foi na sua totalidade construído de Plexiglas transparente. O labirinto era composto de dois braços abertos (30x5x0,25 cm) e dois braços fechados (30x5x15 cm). O piso de cada braço do labirinto era corrugado para conferir textura. Os braços estendiam-se a partir de uma plataforma central e a um ângulo de 90° em relação uns aos outros. O labirinto era elevado a uma altura de 45 cm acima do piso e iluminado por luz vermelha. Foram montadas células de infravermelhos individuais ao longo de cada braço do labirinto a fim de monitorar a actividade fechada, aberta e de introdução do focinho. Os ratos

foram colocados individualmente sobre a plataforma central do labirinto e o número de contagem de braço fechado, braço aberto, e de introdução do focinho (introduzir a cabeça apenas no braço aberto a partir do braço fechado do labirinto) foi registado e utilizado como uma medida de entradas nos braços e de tempo gasto nas várias secções do labirinto durante um período de teste de cinco minutos.

A administração oral de ácido (+)-2-aminobicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico produziu aumentos significativos na actividade do braço aberto em doses de 1, 3 e 10 mg/kg. A contagem de introdução do focinho mostrou um aumento significativo a 3 mg/kg. A contagem da actividade do braço fechado não foi alterada de forma significativa a nenhuma dose do composto.

O ácido (+)-2-aminobicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico pode ser preparado reagindo brometo de carboximetildimetilssulfónio com 2-ciclopenten-1-ona na presença de uma base, tal como 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-eno a fim de proporcionar 2-oxobicyclo[3.1.0]hexano-6-carboxilato de etilo. Este éster pode então ser reagido com uma solução aquosa de cianeto de potássio ou cianeto de sódio e carbonato de amónio a fim de produzir uma hidantoína intermediária, (a reacção de Bucherer-Bergs), que é então hidrolizada utilizando hidróxido de sódio, a fim de proporcionar uma mistura diastereomérica de 2-aminobicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilatos de dietilo. O diastereómero desejado pode ser obtido através de cristalização com ácido oxálico. Este diastereómero pode então ser re-solvido formando um sal cristalino com ácido (+)-di-p-toluoil-D-tartárico e recuperando 2-aminobicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxilato de (-)-dietilo. A hidrólise deste diéster utilizando hidróxido de sódio aquoso dá ácido (+)-2-aminobicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico. Alternativamente, o ácido etil 2-oxobicyclo[3.1.0]hexano-6-carboxílico pode

ser hidrolizado utilizando hidróxido de sódio a fim de dar ácido 2-oxobiciclo[3.1.0]hexano-6-carboxílico. Este ácido pode então ser re-solvido formando um sal cristalino com (S)-1-fenietilamina e recuperando ácido (+)-2-oxobiciclo[3.1.0]hexano-6-dicarboxílico. Este ácido pode então ser convertido em ácido (+)-2-aminobiciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico por reacção com uma solução aquosa de cianeto de potássio ou cianeto de sódio e carbonato de amónio a fim de produzir uma hidantoína intermediária (a reacção de Bucherer-Bergs) seguida de hidrólise da hidantoína utilizando hidróxido de sódio. Este procedimento também pode ser modificado realizando o passo de re-solução sobre a hidantoína em vez de sobre o ácido 2-oxobiciclo[3.1.0]hexano-6-carboxílico. Neste caso, descobriu-se que a (R)-1-fenietilamina é um agente re-solvente adequado.

Os agonistas são preferencialmente formulados antes da administração em combinação com um ou mais veículos farmacêuticamente aceitáveis, diluentes, ou excipientes. As formulações farmacêuticas são preparadas através de procedimentos conhecidos utilizando ingredientes bem conhecidos e prontamente disponíveis. Na execução das composições, o ingrediente activo será geralmente misturado com um veículo, ou diluído por um veículo, ou encerrado dentro de um veículo, e pode ser na forma de uma cápsula, saqueta, papel, ou outro recipiente. Quando o veículo serve como um diluente, pode ser um material sólido, semi-sólido ou líquido que actua como veículo, excipiente, ou meio para o ingrediente activo. As composições podem ser na forma de comprimidos, pílulas, pós, pastilhas, saquetas, hóstias, elixires, suspensões, emulsões, soluções, xaropes, aerossóis, unguento contendo, por exemplo até 10% em peso de composto activo, cápsulas de gelatina macia ou dura, supositórios, soluções injectáveis estéreis, adesivo dérmico, implante subcutâneo, e pós embalados estéreis.

Alguns exemplo de veículos adequados, excipientes, e diluentes incluem lactose, dextrose, sacarose, sorbitol, manitol, amidos, gomas, acácia, fosfato de cálcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de cálcio, celulose microcristalina, polivinilpirrolidona, celulose, xarope de água, metil celulose, hidroxibenzoatos de metilo e propilo, talco, estearato de magnésio, ácido esteárico, e óleo mineral. As formulações podem conter adicionalmente agentes lubrificantes, agentes humedecedores (tensioactivos), agentes emulsionantes e de suspensão, agentes preservantes, agente adoçantes, ou agentes aromatizantes. As composições podem ser formuladas de modo a proporcionar um fornecimento rápido, sustentado ou retardado do ingrediente activo após administração ao paciente empregando procedimentos bem conhecidos na arte.

As composições são formuladas preferencialmente numa forma de dosagem unitária, contendo cada dosagem de cerca de 1 mg a cerca de 500 mg, mais preferencialmente cerca de 5 mg a cerca de 200 mg do ingrediente activo. O termo “forma de dosagem unitária” refere-se a uma unidade fisicamente discreta adequada como dosagens unitárias para sujeitos humanos e outros mamíferos, contendo cada unidade uma quantidade predeterminada de material activo calculado para produzir o efeito terapêutico desejado, em associação com um veículo, diluente, ou excipiente farmacologicamente adequado. Os exemplos de formulações a seguir são apenas ilustrativos.

### **Formulação 1**

Cápsulas de gelatina dura são preparadas utilizando os seguintes ingredientes:

---

	Quantidade (mg/cápsula)
Ácido 2-aminobicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico	250
Amido, seco	200
Estearato de magnésio	10
Total	460 mg

---

Os ingredientes acima são misturados e colocados dentro de cápsulas de gelatina dura em quantidades de 460 mg.

### Formulação 2

Um comprimido é preparado utilizando os ingredientes abaixo:

---

	Quantidade (mg/comprimido)
Ácido 2-aminobicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico	250
Celulose, microcristalina	400
Dióxido de silicone, fumado	10
Ácido esteárico	5
Total	665 mg

---

Os componentes são misturados e prensados para formar comprimidos pesando cada um 665 mg.

### Formulação 3

Uma solução de aerossol é preparada contendo os seguintes componentes:

	Peso %
Ácido 2-aminobíciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico	0,25
Etanol	29,75
Propulsor 22 (clorodifluorometano)	70,00
Total	100,00

O composto activo é misturado com etanol e a mistura adicionada a uma porção do Propulsor 22, arrefecida até  $-30^{\circ}\text{C}$  e transferida para um dispositivo de enchimento. A quantidade requerida é então alimentada a um recipiente de aço inoxidável e diluída com o restante do propulsor. As unidades de válvulas são então instaladas no recipiente.

#### Formulação 4

Comprimidos contendo cada um 60 mg de ingrediente activo são feitos como a seguir:

	Quantidade (mg/comprimido)
Ácido 2-aminobíciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico	60 mg
Amido	45 mg
Celulose microcristalina	35 mg
Polivinilpirrolidona	4 mg
Carboximetilamido de sódio	4,5 mg
Estearato de magnésio	0,5 mg
Talco	1 mg
Total	150 mg

O ingrediente activo, amido e celulose são passados através de um crivo de orifícios de  $45 \times 10^{-4}$  m (malha U.S. No. 45) e muito bem misturados. A solução de polivinilpirrolidona é misturada com os pós resultantes, que são então passados através de um crivo de orifícios de  $1,25 \times 10^{-3}$  (malha U.S. No. 14). Os grânulos produzidos desta forma são secos a  $50^{\circ}\text{C}$  e passados através de um crivo de orifícios de  $10^{-3}$  m (malha U.S. No. 18). O carboximetilamido de sódio, estearato de magnésio, e talco, previamente passados através de um crivo de orifícios de  $2,5 \times 10^{-3}$  m (malha U.S. No. 60), são então adicionados aos grânulos que, depois de misturados, são prensados numa máquina de fazer comprimidos a fim de proporcionar comprimidos pesando cada um 150 mg.

#### Formulação 5

Cápsulas contendo cada uma 80 mg de ingrediente activo são feitas como a seguir:

---

Ácido 2-aminobíciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico	80 mg
Amido	59 mg
Celulose microcristalina	59 mg
Estearato de magnésio	2 mg
Total	200 mg

---

O ingrediente activo, a celulose, o amido e o estearato de magnésio são misturados, passados através de um crivo de orifícios de  $4 \times 10^{-4}$  m (malha U.S. No. 45), e colocados dentro de cápsulas de gelatina dura em quantidades de 200 mg.

#### Formulação 6

Supositórios contendo cada um 225 mg de ingrediente activo

podem ser feitos como a seguir:

---

Ácido 2-aminobíciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico	225 mg
Ácidos glicéridos gordos saturados	2.000 mg
Total	2.225 mg

---

O ingrediente activo é passado através de um crivo de orifícios de  $2,5 \times 10^{-4}$  m (malha U.S. No. 60), e suspenso nos glicéridos de ácidos gordos saturados previamente fundido utilizando o mínimo de calor necessário. A mistura é então vertida para dentro de um molde de supositório de capacidade nominal de 2 g e deixado a arrefecer.

#### Formulação 7

Suspensões contendo cada uma 50 mg de ingrediente activo por dose de 5 ml são feitas como a seguir:

---

Ácido 2-aminobíciclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico	50 mg
Carboximetilcelulose de sódio	50 mg
Xarope	1,25 ml
Solução de ácido benzóico	0,10 ml
Aromatizante	q.b.
Corante	q.b.
Água purificada para perfazer	5 ml

---

O fármaco é passado através de um crivo de orifícios de  $4 \times 10^{-4}$  m (malha U.S. No. 45) e misturado com a carboximetilcelulose de sódio e xarope a fim de formar uma pasta lisa. A solução de ácido benzóico, o aromatizante e o corante são diluídos com parte da água e adicionados, com agitação. É então

adicionada água suficiente para produzir o volume requerido.

### Formulação 8

Uma formulação intravenosa pode ser preparada como a seguir:

Ácido 2-aminobicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico	100 mg
Manitol	100 mg
Hidróxido de sódio 5 N	200 ml
Água purificada para perfazer	5 ml

Os Exemplos a seguir ilustram ainda métodos para a sua síntese de ácido (+)-2-aminobicyclo[3.1.0]hexano-2,6-dicarboxílico.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados sob uma pressão positiva de nitrogénio seco ou argón. Todos os solventes e reagentes foram adquiridos de fontes comerciais e utilizados tal como foram recebidos, salvo indicação em contrário. Tetrahydrofurano (THF) seco foi obtido por destilação a partir de sódio ou benzofenonacetil de sódio antes de usar. Os espectros de ressonância magnética nuclear de protão ( $^1\text{H}$  RMN) foram obtidos num espectrómetro GE QE-300 a 300,15 MHz, um espectrómetro Brucker AM-500 a 500 MHz, ou um espectrómetro Brucker AC-200P a 200 MHz. Foi realizada espectroscopia de massa de bombardeamento de átomos livres (FABMS) num instrumento VG ZAB-2SE. Foi realizada espectroscopia de massa de dessorção de campo (FDMS) utilizando um instrumento VG 70SE ou um Varian MAT 731. As rotações ópticas foram medidas com um polarímetro Perkin-Elmer. A separação cromatográfica num Waters Prep 500 LC foi geralmente levada a cabo utilizando um gradiente linear dos solventes indicados no texto. As reacções foram geralmente monitoradas para conclusão utilizando

cromatografia de camada fina (TLC). A cromatografia de camada fina foi realizada utilizando placas E. Merck Kieselgel 60 F254, de 5 cm x 10 cm, com espessura de 0,25 mm. As manchas foram detectadas utilizando uma combinação de UV e detecção química (placas mergulhadas numa solução de molibdato de amónio cérico [75 g de molibdato de amónio e 4 g de sulfato de cério (IV) em 500 ml de ácido sulfúrico aquoso a 10%] e depois aquecidas numa placa quente). Foi realizada cromatografia “flash” como descrito por Still, *et al.*, Still, Kahn, e Mitra, *J. Org. Chem.*, 43, 2923 (1978). Foram determinadas análises elementares para carbono, hidrogénio, e nitrogénio num Control Equipment Corporation 440 Elemental Analyser, ou foram realizadas pelo Centro Analítico da Universidade Complutense (Facultad de Farmacia, Madrid, Espanha). Os pontos de fusão foram determinados em capilares de vidro abertos num aparelho de ponto de fusão de banho de ar quente Gallenkamp ou um aparelho de ponto de fusão Büchi, e estão sem correcção. O número entre parêntesis depois do nome do composto refere-se ao número do composto.

### Preparação 1

#### Brometo de Carbetoximetildimetilssulfónio

Uma solução de bromoacetato de etilo (265 g) e sulfureto de dimetilo (114 g) em acetona (500 mL) foi agitada à temperatura ambiente. Depois de três dias, o composto do título foi isolado por filtração da mistura de reacção. Ponto de fusão 88-90°C.

### Exemplo 1

(1SR, 5RS, 6SR)-2-oxobiciclo[3.1.0]hexano-6-carboxilato de etilo

Uma suspensão de brometo de carbetoximetildietilssulfónio (45,5

g) em tolueno (350 mL) foi tratada com 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (30,2 g). A mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente. Ao fim de uma hora, a mistura de reacção foi tratada com 2-ciclopenten-1-ona (19,57 g). Depois de 18 horas adicionais, a mistura de reacção foi adicionada a uma solução de 1 N ácido clorídrico/cloreto de sódio. A mistura resultante foi extraída com éter dietílico. Os extractos combinados de éter foram secos sobre sulfato de magnésio, filtrados, e concentrados *in vacuo*. O resíduo foi purificado utilizando cromatografia de gel de sílica, eluindo com um gradiente linear de acetato de etilo/hexanos a 10% a acetato de etilo/hexanos a 50%, a fim de proporcionar 22,81 g do composto do título. Ponto de fusão: 36-38°C.

FDMS:  $m/z = 168 (M^+)$ .

Análise calculada para  $C_9H_{12}O_3$ : C, 64,27; H, 7,19.

Encontrado: C, 64,54; H, 7,11.

## Exemplo 2

(1*SR*, 2*RS*, 5*RS*, 6*SR*)-2-Aminobicyclo[3.1.0]-hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo e (1*SR*, 2*SR*, 5*RS*, 6*SR*)-2-Aminobicyclo[3.1.0]-hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo

Uma solução do composto preparado como descrito no Exemplo 1 (22,81 g) em etanol (200 mL) foi tratada com uma solução aquosa de cianeto de potássio (9,71 g) e carbonato de amónio (21,2 g) em água (200 mL). A mistura resultante foi aquecida até cerca de 50° C. Passadas cerca de 18 horas, a mistura de reacção foi deixada a arrefecer até à temperatura ambiente e tratada com hidróxido de sódio (16,2 g). A mistura resultante foi aquecida até ao refluxo. Passadas cerca de 18 horas, a mistura de reacção foi deixada a arrefecer até à

temperatura ambiente, depois arrefecida até 0° C. O pH da mistura fria foi ajustado para pH1 pela adição de ácido clorídrico concentrado. Esta mistura foi concentrada até à secagem *in vacuo*. O resíduo foi dissolvido em etanol, arrefecido até aos 0° C, e tratado com cloreto de tionilo (80,6 g). A mistura resultante foi aquecida até ao refluxo. Passadas cerca de 48 horas, a reacção foi concentrada até à secagem *in vacuo*. O resíduo foi tratado com 1 N hidróxido de sódio, e a mistura resultante extraída com éter dietílico. Os extractos combinados de éter foram secos sobre carbonato de potássio, filtrados, e concentrados *in vacuo* a fim de proporcionar 24,6 g de uma mistura dos compostos do título.

### Exemplo 3

(1SR, 2SR, 5RS, 6SR)-2-Aminobiciclo[3.1.0]-hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo

Uma solução dos compostos preparados como descrito no Exemplo 2 (20,71 g) em acetato de etilo (200 mL) foi tratada com uma solução de ácido oxálico (15,46 g) em etanol (50 mL). A mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente. Ao fim de uma hora, a mistura de reacção foi tratada com etanol adicional (50 mL). Passadas 18 horas, a mistura foi filtrada, e o filtrado foi evaporado até à secagem *in vacuo*. O resíduo foi tratado com 1 N hidróxido de sódio, e a mistura resultante extraída com éter dietílico. Os extractos combinados de éter foram lavados com salmoura, secos sobre carbonato de potássio, filtrados, e concentrados *in vacuo*. O resíduo foi purificado por cromatografia de gel de sílica, eluindo com cloreto de metileno: de hidróxido de amónio/metanol a 5% (97:3), a fim de proporcionar 15,41 g do composto do título.

FDMS:  $m/z = 242$  (M+H).

Análise calculada para  $C_{12}H_{19}NO_4$ : C, 59,74; H, 7,94; N, 5,81. Encontrado: C,

59,78; H, 8,13; N, 5,77.

#### Exemplo 4

##### (-)-2-Aminobiciclo[3.1.0]-hexano-2,6-dicarboxilato de dietilo

Uma solução da mistura racêmica de compostos preparados como descrito no Exemplo 3 (6,56 g) em acetato de etilo (100 mL) foi tratada com uma solução de ácido (+)-di-*p*-toluolil-D-tartárico (12,0 g) em acetato de etilo (100 mL). Depois de repousar de um dia para o outro à temperatura ambiente, o sólido cristalino foi removido por filtração e seco a fim de proporcionar 14,7 g. O sólido cristalino adicional foi obtido arrefecendo o filtrado até 0° C. Os sólidos cristalinos combinados foram dissolvidos em acetato de etilo quente, contendo 2-propanol suficiente para uma dissolução completa. Depois de arrefecer até 0° C, o sólido cristalino foi isolado por filtração, a fim de proporcionar 2,3 g de um sólido tendo um excesso enantiomérico de = 95%. A forma de base livre foi obtida através da partição do sal entre bicarbonato de sódio aquoso e acetato de etilo. A fase orgânica foi separada, seca sobre carbonato de potássio, filtrada, e concentrada *in vacuo* a fim de proporcionar 0,77 g do composto do título.

FDMS:  $m/z = 242$  (M+H).

Rotação óptica:  $\alpha_D = -5,15^\circ$  (c = 1, EtOH).

Análise calculada para C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>: C, 59,74; H, 7,94; N, 5,81. Encontrado: C, 59,68; H, 8,13; N, 5,58.

#### Exemplo 5

##### Ácido (+)-2-Aminobiciclo[3.1.0]-hexano-2,6-dicarboxílico

Uma solução do composto preparado como descrito no Exemplo 4 (0,69 g) em tetrahidrofurano (10 mL) foi tratada com 1 N hidróxido de sódio (10 mL), e a mistura resultante foi vigorosamente agitada à temperatura ambiente. Ao fim de vários dias, o composto foi isolado por cromatografia de permuta aniônica (Bio-Rad AG1-X8), eluindo com ácido acético/água a 50%, a fim de proporcionar 0,53 g do composto do título.

FDMS:  $m/z = 186$  (M+H).

Rotação óptica:  $\alpha_D = 21,32^\circ$  ( $c = 1$ , 1 N HCl).

Análise calculada para  $C_8H_{11}NO_4 \cdot 1,25 H_2O$  : C, 46,26; H, 6,55; N, 6,74.

Encontrado: C, 46,68; H, 6,47; N, 6,49.

### Exemplo 6

#### Ácido 2-Oxobiciclo[3.1.0]-hexano-6-carboxílico

Uma mistura de 60 g de 2-oxobiciclo [3.1.0] hexano-6-carboxilato de (1SR, 5RS, 6SR) etilo e 300 ml de 1 N hidróxido de sódio foi agitada a 25-30° C. Ao fim de 2,5 horas, foi adicionado ácido clorídrico concentrado a fim de ajustar o pH para 0,8-1,2. A solução resultante foi extraída com acetato de etilo. Os extractos foram secos sobre sulfato de magnésio, filtrados, e concentrados a fim de proporcionar 49,1 g (98%) do material bruto.

A recristalização a partir de 100 ml de acetato de etilo proporcionou o composto do título, pf 123,5-128° C.

FDMS:  $m/z = 140$  (M+).

Análise calculada para  $C_7H_8O_3$ : C, 60,00; H, 5,75. Encontrado: C, 60,14; H, 5,79.

### Exemplo 7

Sal de ácido 2-Oxobicyclo[3.1.0]-hexano-6-carboxílico com (S)-1-feniletilamina

Uma solução de 14 g do composto preparado no Exemplo 6 em 140 ml de etanol a 25% em acetato de etilo foi combinada com (S)-1-feniletilamina (1 eq.). Após agitação de um dia para o outro, o sal precipitado foi isolado através de filtração e seco a fim de proporcionar 11,87 g (45,4%) do sal desejado. A conversão do sal no ácido 2-oxobicyclo[3.1.0]-hexano-6-carboxílico parcialmente re-dissolvido pelo método do Exemplo 8 e a análise indicaram que o sal era 68% ee. O excesso enantiomérico foi determinado por conversão no metil éster com diazometano com posterior HPLC quiral numa coluna Chiralpak AS a 40° C eluída com isonopropanol a 10%/hexano a 90% a 1 ml/min com detecção a 210 nm.

### Exemplo 8

Ácido (+)-2-Oxobicyclo[3.1.0]-hexano-6-carboxílico

Uma mistura de 1,31 g do produto do Exemplo 7 e 10 ml de ácido clorídrico 1N foi agitada durante 5 minutos e extraída com acetato de etilo. Os extractos foram secos sobre sulfato de sódio, filtrados, e concentrados a fim de proporcionar 0,61 g do composto do título, pf 110-115° C. Determinou-se que o produto era 68% ee através de HPLC quiral (método do Exemplo 7).

FDMS:  $m/z = 141 (M^+)$ .

Rotação óptica:  $\alpha_D - 49,85^\circ$

### Exemplo 9

#### Ácido (-)-2-Spiro-5'-hidantoinbicyclo[3.1.0]-hexano-6-carboxílico

Uma solução do composto preparado como descrito no Exemplo 8 (68% ee, 1 eq.), cianeto de potássio (1,25 eq.), e carbonato de amónio (2,5 eq.) foi combinada e agitada em etanol/água a 25° C durante 40 horas. A mistura foi acidificada com 6N ácido clorídrico, concentrada, diluída com água, e filtrada a fim de dar um rendimento de 79% de uma mistura de 90:10 de diastereómeros, pf 286-290° C. A mistura diastereomérica foi recristalizada a partir de isopropanol/água a fim de dar um rendimento de 48% do composto do título em pureza 100% diastereomérica e 100% enantiomérica (taxa enantiomérica determinada através de HPLC quiral numa coluna Chiralcel OD-H de 4,6 x 150 mm, eluída com isopropanol a 15% /hexano a 85% a 1 ml/min a 40° C com detecção a 220 nm; taxa diastereomérica determinada por HPLC numa coluna Zorbax SB-fenil a 40° C com eluição com 90:10 de tampão/acetonitrilo eluído a 2 ml/min com detecção a 220 nm (tampão = monohidrato de fosfato dibásico de sódio 0,1 M ajustado para um pH de 2,1 com ácido fosfórico).

FDMS:  $m/z = 211$  (M+H)

Rotação óptica:  $\alpha_D = 25,98^\circ$

Análise calculada para  $C_9H_{10}N_2O_4$ : C, 51,43; H, 4,79; N, 13,33. Encontrado: C, 51,38; H, 4,80; N, 13,26.

### Exemplo 10

#### 2-Spiro-5'-hidantoinbicyclo[3.1.0]-hexano-6-carboxilato de Etilo

Uma mistura de 5,05 g de 2-oxobicyclo[3.1.0]-hexano-6-carboxilato

de etilo, 2,15 g de cianeto de potássio, 5,77 g de carbonato de amónio, 30 ml de 2B-3 etanol e 12 ml de água foi agitada a 35° C até a reacção estar completa por HPLC. Ao fim de 15 horas, a mistura de reacção foi arrefecida até aos 0° C e foram adicionados à mistura 33 ml de água. Passadas 2 horas a 0° C, o precipitado foi isolado por filtração e seco a fim de proporcionar 5,23 g (73%) do composto do título, pf 217-220° C.

FDMS:  $m/z = 238,1$  (M+)

Análítico calculado para  $C_{11}H_{14}N_2O_4$ : C, 55,46; H, 5,92; N, 11,76. Encontrado: C, 55,74; H, 5,88; N, 11,50.

### Exemplo 11

Ácido 2-Spiro-5'-hidantoinbiciclo[3.1.0]-hexano-6-carboxílico

Uma mistura de 16,32 g do produto do Exemplo 10 e 137 ml de 2N NaOH foi agitada a 25° C. Ao fim de 1 hora, foi adicionado ácido clorídrico concentrado para ajustar o pH para 1,0. O precipitado resultante foi isolado por filtração e seco a fim de proporcionar 13,70 g (95%) do composto do título, pf 277-279° C.

FDMS:  $m/z = 210,1$  (M+)

Análise calculada para  $C_9H_{10}N_2O_4$ : C, 51,43; H, 4,79; N, 13,33. Encontrado: C, 51,70; H, 4,93; N, 13,43.

### Exemplo 12

Ácido 2-Spiro-5'-hidantoinbiciclo[3.1.0]-hexano-6-carboxílico, sal de (S)-1-feniletilamina

Uma mistura de 1,05 g do produto do Exemplo 11 e 16,6 ml de uma solução de acetona:água na proporção de 1,6:1 foi agitada a 25° C enquanto se adicionavam 1,53 g de R-(+)-1-feniletilamina. A mistura foi agitada durante 2 horas à temperatura ambiente. Os cristais foram filtrados, enxaguados com acetona, e secos a fim de proporcionar 0,74 g (45%) do composto do título, pf 205-212° C.

Rotação Óptica:  $\alpha_D = -31,88^\circ$  (c = 1, metanol)

### Exemplo 13

Ácido (-)-2-Spiro-5'-hidantoinbíciclo[3.1.0]-hexano-6-carboxílico

Uma mistura de 0,74 g do produto do Exemplo 12 e 10 ml de água foi agitada a 25° C enquanto o pH era ajustado de 6,81 para 1,0 usando 1N HCl. A mistura de reação foi agitada durante 1 hora e o produto foi recolhido por filtração e seco a fim de proporcionar 0,35 g (75%) do composto do título, pf 310° C (decomp).

FDMS: 210,1 (M<sup>+</sup>)

Rotação Óptica:  $\alpha_D = -24,22^\circ$  (c = 1, metanol)

Análise calculada para C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: C, 51,43; H, 4,80; N, 13,33. Encontrado: C, 51,67; H, 4,87; N, 13,61.

### Exemplo 14

Ácido (+)-2-aminobíciclo[3.1.0]-hexano-2,6-dicarboxílico

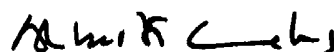
Uma solução de 184 g de ácido (-)-2-spiro-5'-hidantoinbíciclo[3.1.0] hexano-6-carboxílico e 1750 ml de 3N NaOH foi aquecida até ao refluxo até a

reacção estar completa por HPLC. Ao fim de 28 horas, a solução foi arrefecida até à temperatura ambiente e filtrada através de papel de vidro a fim de remover quantidades diminutas de material insolúvel. O pH da solução foi ajustado para 3,0 usando HCl concentrado. A mistura de reacção foi agitada durante 1 hora à temperatura ambiente e duas horas a 0° C. O produto precipitado foi recolhido por filtração, lavado com 170 ml de água fria e seco a fim de proporcionar 152,5 gramas (86%) do composto do título.

FDMS: m/z - 186,1 (M+1)

Rotação Óptica:  $\alpha_D = -23,18^\circ$  (c = 1, 1N HCl)

Lisboa, 6 de Dezembro de 2001



ALBERTO CANELAS  
Agente Oficial da Propriedade Industrial  
RUA VICTOR CORDON, 14  
1200 LISBOA

## REIVINDICAÇÕES

1. O uso de um agonista que actua nos receptores metabotrópicos de glutamato ligados ao cAMP acoplados negativamente para o fabrico de um medicamento para o tratamento da ansiedade e perturbações a ela associadas.

2. Uso como reivindicado na Reivindicação 1, no qual o agonista actua selectivamente.

3. O uso de um agonista que actua nos receptores metabotrópicos ligados ao cAMP acoplados negativamente para o fabrico de um medicamento para fornecer protecção do efeito de exposição a um ambiente provocador de ansiedade.

4. Uso como reivindicado na Reivindicação 3, no qual o agonista actua selectivamente.

5. Uso como reivindicado na Reivindicação 2, no qual o agonista é ácido (+)-2-aminobiciclo[3.1.0]-hexano-2,6-dicarboxílico.

6. Uso como reivindicado na Reivindicação 4, no qual o agonista é ácido (+)-2-aminobiciclo[3.1.0]-hexano-2,6-dicarboxílico.

Lisboa, 6 de Dezembro de 2001



ALBERTO CANELAS  
Agente Oficial da Propriedade Industrial  
RUA VICTOR CORDON, 14  
1200 LISBOA