



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 312 134**

(51) Int. Cl.:
A01N 43/54 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **06755417 .0**
(96) Fecha de presentación : **10.02.2006**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1845781**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **24.10.2007**

(54) Título: **Uso de compuestos derivados de pirimidintriona como inhibidores de la acetilcolinesterasa, composiciones que contienen estos derivados y sus usos.**

(30) Prioridad: **10.02.2005 FR 05 01328**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2009

(73) Titular/es:
**Centre National de la Recherche Scientifique
3, rue Michel Ange
75016 Paris, FR
Université de Montpellier II**

(72) Inventor/es: **Weill, Mylène;
Fort, Philippe y
Leonetti, Jean-Paul**

(74) Agente: **Martín Santos, Victoria Sofía**

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

Uso de compuestos derivados de pirimidinatrina como inhibidores de la acetilcolinesterasa, composiciones que contienen estos derivados y sus usos.

La presente invención se refiere al uso de compuestos derivados de pirimidinatrina de fórmula general (I) según se define a continuación como inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE), a su uso como insecticidas, así como a las composiciones que contienen dichos derivados.

Numerosas regiones del mundo realizan un control intensivo de los insectos por tratamiento a gran escala con insecticidas, lo que ha conducido progresivamente a la aparición de poblaciones de insectos resistentes a los tratamientos.

La aparición de poblaciones de insectos resistentes a los insecticidas utilizados de forma habitual constituye un importante problema de salud pública en la medida que algunos insectos son los vectores de transmisión de enfermedades al hombre, como por ejemplo los mosquitos que transmiten el paludismo (*Anopheles gambiae*), la fiebre amarilla y el dengue (*Aedes aegypti*) o las encefalopatías víricas (*Culex tritaeniorhynchus* y *Culex pipiens*).

Entre los insecticidas más usados se pueden citar los organofosforados y los carbamatos. La diana de las dos principales familias de insecticidas es la acetilcolinesterasa (AChE), es la enzima esencial que hidroliza la acetilcolina en las sinapsis colinérgicas. La inhibición de la AChE impide la desactivación de la señal sináptica, llevando así a una pérdida de control de la transmisión colinérgica.

Entre los mecanismos de resistencia, se ha observado en numerosos casos la selección de mutaciones que vuelven la AChE insensible a los insecticidas organofosforados y carbamatos (Anazawa Y., *Insect Biochem Mol Biol*, 2003, 33(5), 509-514; Fallang A., *Pest Manag Sci*, 2004, 60(12), 1163-1170; Li F., *Insect Biochem Mol Biol*, 2004, 34(4), 397-405; Menozzi P., *BMC Evol Biol*, 2004, 4(1), 4; Nabeshima T., *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313(3), 794-801; Vontas JG., *Insect Mol Biol*, 2002, 11(4), 329-336; Walsh SB., *Biochem J*, 2001, 359(Pt1), 175-181).

Así, los inventores han identificado previamente en los Culícidos (mosquitos) el gen que codifica la AChE, diana de organofosforados y carbamatos. Además, se ha encontrado la misma y única mutación (Glicina a Serina en la posición 119 según la nomenclatura AChE *Torpedo*) en todas las poblaciones de varias especies de mosquitos que muestran un elevado nivel de resistencia a los organofosforados y carbamatos, y en particular en *Culex pipiens*, *Anopheles gambiae* y *Anopheles albimanus*, es decir, los vectores principales de la fiebre amarilla, de la malaria y de las encefalopatías víricas. (Weill y col., *Insect Molecular Biology*, 2004, 13(1), 1-7; Weill y col., *Nature*, 2003, 423, 136-137).

Teniendo en cuenta lo anterior, parece que la puesta a punto de estrategias novedosas de lucha contra los insectos constituye una apuesta sanitaria y económica crucial.

Para sobrepasar estas resistencias establecidas, son numerosos los que buscan diversificar las dianas biológicas. Sin embargo, aunque dicha diversificación es deseable a largo plazo, no impedirá la aparición de poblaciones resistentes y necesitará un esfuerzo importante para alcanzar el nivel de conocimientos ya adquiridos sobre las dianas actualmente apuntadas.

Otra posibilidad consiste en buscar modificaciones eficaces de las formas resistentes de las dianas ya validadas. La ventaja principal de esta hipótesis es la menor probabilidad de que las dianas acepten una mutación suplementaria sin conllevar un efecto perjudicial debido a una reducción de su actividad.

Los Inventores han seleccionado esta segunda hipótesis, y se han esforzado en encontrar insecticidas novedosos capaces de matar las poblaciones de insectos que hayan desarrollado una resistencia a los insecticidas convencionales.

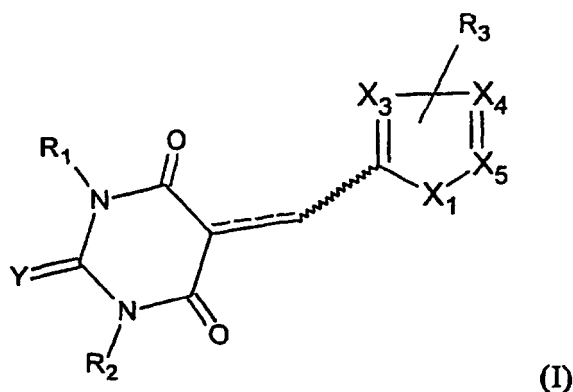
Así, los inventores han identificado una familia de compuestos capaz de inhibir la AChE, y de forma preferente, de actuar sobre la AChE insensible a los organofosforados y a los carbamatos. Dichos compuestos tienen, por tanto, propiedades insecticidas y son capaces de actuar notablemente de forma preferente sobre las poblaciones de insectos que han desarrollado una resistencia a los insecticidas convencionales.

Así, los compuestos según la presente invención pueden usarse ventajosamente para controlar el desarrollo de poblaciones resistentes a los organofosforados y a los carbamatos. Además, teniendo en cuenta la reducción de un 40% en la actividad específica ocasionada por la primera mutación, es poco probable que la AChE conserve una actividad suficiente tras una mutación suplementaria. El uso de compuestos insecticidas de este tipo permitirá por tanto impedir la extensión de las especies actualmente resistentes minimizando los riesgos de aparición de nueva resistencia a estos compuestos nuevos.

Además, la estructura de estos compuestos permite por ejemplo por química combinatoria obtener un gran número de variantes de estos compuestos, lo que debería permitir su adaptación rápida a la aparición de eventuales resistencias ulteriores. Estas moléculas son igualmente relativamente inestables en medio acuoso, lo que es una ventaja para la protección del medio ambiente (permanencia débil).

ES 2 312 134 T3

Según un primer aspecto, la invención tiene por objeto el uso de al menos un compuesto derivado de pirimidina-triona como inhibidor de la AChE, respondiendo dicho compuesto a la fórmula general (I) siguiente:



en la que:

--- representa un enlace que puede ser un enlace simple o un enlace doble;

R₁ representa un grupo seleccionado entre un átomo de hidrógeno y un grupo alquilo, saturado o insaturado, lineal, ramificado, o cíclico, en C₁-C₆, sustituido eventualmente por un grupo hidroxilo o un átomo de halógeno;

R₂ representa un grupo seleccionado entre un grupo arilo sustituido eventualmente y un grupo alquilo, saturado o insaturado, lineal, ramificado o cíclico, en C₁-C₄, sustituido eventualmente por uno o varios grupos seleccionados entre los átomos de halógeno, los grupos hidroxilo, los heterociclos que comprende de 1 a 5 átomos de carbono, y de 1 a 5 heteroátomos tales como oxígeno, el azufre y nitrógeno;

R₃ puede estar en posición 3, 4 ó 5 del ciclo y representa un grupo seleccionado entre un átomo de hidrógeno y un grupo alquilo, saturado o insaturado, lineal, ramificado o cíclico, en C₁-C₄, sustituido eventualmente por un grupo hidroxilo, o un átomo de halógeno;

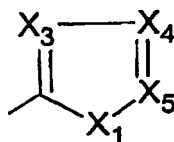
X₁ representa un átomo seleccionado entre azufre, nitrógeno y oxígeno;

X₃, X₄ y X₅, iguales o diferentes, se eligen entre un átomo de carbono y un átomo de nitrógeno, dos átomos como máximo entre X₃, X₄ y X₅ siendo átomos de nitrógeno; e

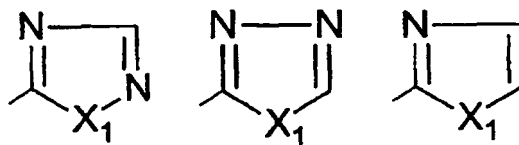
Y representa un átomo seleccionado entre oxígeno y azufre.

Cuando R₂ es un grupo arilo sustituido, está sustituido por un grupo alquilo o alquilo en C₁-C₄, como por ejemplo un grupo metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, terc-butilo, isobutilo, un grupo metoxi, etoxi, isopropoxi, butoxi. Puede igualmente estar sustituido por un grupo hidroxilo o un átomo de halógeno seleccionado entre cloro, bromo, yodo y flúor, y en particular cloro. Además, la sustitución del grupo arilo puede tener lugar en posición orto, meta o para, y preferentemente en meta o para.

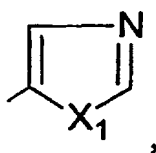
Entre los ciclos



que se pueden usar en la fórmula (I) anterior se pueden citar especialmente:



y



con la misma definición que anteriormente para X₁.

La Solicitud de Patente DE 3903404 divulga derivados de pirimidinatrina usados como insecticidas y especialmente como antihelmínticos.

La patente europea EP 0455300 divulga derivados del ácido barbitúrico y su uso como insecticidas; siendo las dianas previstas diferentes a mosquitos.

En cualquier caso, los compuestos descritos en estos dos documentos son diferentes a los que responden a la fórmula general (I) tal como se ha definido anteriormente. Además, ninguno de los documentos de la técnica anterior no sugiere ni menciona una actividad inhibidora de la AChE, en particular inhibidora de una forma de AchE resistente a los insecticidas organofosforados y carbamatos.

Según una forma preferida de la invención, cuando R₁ representa un grupo alquilo en C₁₋₆, éste es preferentemente un grupo alquilo en C₁₋₄, y aún más preferido un grupo metilo. Así, entre los compuestos preferidos según la invención, se puede concretamente citar los compuestos en los que R₁ se elige entre un átomo de hidrógeno y un grupo metilo.

Según otra forma preferida de la invención, R₂ representa un grupo arilo, sustituido eventualmente por un grupo seleccionado entre un alquilo en C₁₋₄ y un átomo de halógeno, y ventajosamente un fenilo eventualmente sustituido por un grupo seleccionado entre un alquilo en C₁₋₄ y un átomo de halógeno.

Entre los compuestos preferidos según la invención, se pueden citar concretamente los compuestos en los que R₂ se elige entre un metilo, un alilo, un grupo furilo sustituido eventualmente por un metilo, un butilo, un fenilo no sustituido, un fenilo sustituido por un grupo metilo en posición meta, un fenilo sustituido por un grupo metilo en posición para, un fenilo di-sustituido en posición meta y por un metilo, un fenilo sustituido por un etilo en posición para, un fenilo sustituido por un grupo metoxi en posición meta, un fenilo sustituido por un grupo metoxi en posición para, un fenilo sustituido por un etoxi en posición para, un fenilo sustituido por un isopropilo en posición para, un fenilo sustituido por un átomo de cloro en posición para, un fenilo sustituido por un átomo de bromo en posición para, un fenilo sustituido por un átomo de flúor en posición para. En los compuestos preferidos según la invención, Y representa ventajosamente un átomo de oxígeno.

Según una forma preferida de la invención, X₁ se elige entre oxígeno y azufre.

De manera ventajosa, los compuestos según la invención son compuestos en los que X₃, X₄ y X₅ son idénticos y todos ellos representan un átomo de carbono.

Entre los compuestos preferidos según la invención, se pueden citar concretamente los compuestos en los que R₃ se elige entre un átomo de hidrógeno y un grupo metilo. Además, R₃ está ventajosamente en posición 5 del ciclo de furano, tiofeno o pirrol.

Entre los compuestos de fórmula (I) anterior se pueden citar concretamente los compuestos preferidos siguientes, enumerados en la tabla I.

TABLA I

Compuestos	Nombres
(1)	5-[(5-metil-2-furil)metileno]-1-fenil-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(2)	1-(3-metilfenil)-5-[(5-metil-2-tienil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(3)	1-(3-metoxifenil)-5-[(5-metil-2-tienil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(4)	1,3-dimetil-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(5)	1-(4-metoxifenil)-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(6)	1-(4-clorofenil)-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(7)	1-(4-isopropilfenil)-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(8)	1-alil-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2-tioxodihidro-4,6(1H,5H)-pirimidinatriona
(9)	5-(2-furilmetileno)-1-fenil-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(10)	5-(2-furilmetileno)-1,3-dimetil-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(11)	5-[(5-metil-2-furil)metileno]-1-(4-metilfenil)-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(12)	1-(3-metoxifenil)-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(13)	1-(4-etoxifenil)-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(14)	1-(4-bromofenil)-5-[(5-metil-2-tienil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(15)	1-(4-clorofenil)-5-[(5-metil-2-tienil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(16)	1-(4-fluorofenil)-5-[(5-metil-2-tienil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(17)	1-(3,4-dimetilfenil)-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(18)	1-(2-furilmetil)-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2,4,6(1,3H,5H)-pirimidinatriona
(19)	1-(4-etilfenil)-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(20)	1-butil-5-[(5-metil-2-tienil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona

Los compuestos preferidos que se citan en la tabla anterior se conocen puesto que se han descrito, en particular en las publicaciones siguientes: Vvedenskii, VM., Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinenii, 1969, 6, 1092-1095; El-Badawi, M., Journal of Science, 1990, 14(2), 581-600. A pesar de ello, su actividad insecticida nunca se ha puesto en evidencia en la técnica anterior.

Del hecho de la actividad inhibidora de AChE que presentan los compuestos derivados de pirimidinatriona de fórmula general (I) según la presente invención, estos compuestos pueden usarse igualmente para la preparación de un medicamento destinado a tratar los trastornos asociados a una disfunción de la AChE y en particular las enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer. En efecto, los compuestos de la invención han mostrado una actividad inhibidora sobre la AChE humana recombinante.

Según un segundo aspecto, la invención tiene por objeto el uso de al menos un compuesto de la fórmula general (I) como insecticida.

Todos los compuestos de fórmula general (I) preferidos tales como se han definido anteriormente pueden usarse como insecticidas.

Los compuestos de fórmula general (I) pueden usarse para controlar el desarrollo de poblaciones de diferentes tipos de insectos, más concretamente de los géneros *Aedes*, *Culiseta*, *Ochlerotatus*, *Uranotania*, *Anopheles* o *Culex*, y preferentemente del género *Anopheles* o *Culex*, más concretamente para la desinsectación de zonas habitadas o más generalmente, de zonas donde se ejerza una actividad humana como, por ejemplo, las zonas agrícolas.

Entre los insectos del género *Anopheles* o *Culex*, se pueden citar concretamente las especies elegidas entre *Culex deserticola*, *Culex hortensis*, *Culex pipiens pipiens*, *Culex pipiens*, *Culex pipiens quinquefasciatus*, *Culex pipiens molestus*, *Culex tigripes*, *Anopheles albimanus*, *Anopheles arabiensis*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles hyrcanus*, *Anopheles subpicus* y *Anopheles sundaicus*.

Según una forma preferida de la invención, los compuestos de fórmula general (I) se usan en poblaciones de insectos que han desarrollado una resistencia a los insecticidas organofosforados o a los carbamatos. En efecto, los inventores han constatado de manera sorprendente que aunque la actividad de estos compuestos sobre poblaciones de insectos sensibles a los carbamatos y a los organofosforados es comparable o incluso inferior a la de los insecticidas conocidos desde hace tiempo, estos compuestos son mucho más activos sobre las poblaciones de insectos resistentes a estos insecticidas convencionales.

Según otra forma preferida, los compuestos de fórmula general (I) según la presente invención se usan asociados con al menos otro insecticida clásico permitiendo así tratar las zonas en las que coexisten poblaciones de insectos más o menos sensibles o resistentes a los diferentes insecticidas convencionales. La asociación entre al menos un compuesto de fórmula general (I) y al menos un insecticida seleccionado entre los carbamatos y los organofosforados constituye otro objeto de la invención.

Se puede realizar la aplicación de forma clásica, por ejemplo, por riego, pulverización, aspersión, difusión, enlucido, desinfección en seco, desinfección por vía húmeda, desinfección por inmersión, desinfección por suspensión o incrustación.

Según las propiedades insecticidas que presentan los derivados de pirimidinatriona de fórmula general (I) según la presente invención, estos compuestos pueden igualmente usarse como producto comparativo en la puesta en práctica de los ensayos de evaluación de propiedades insecticidas.

Respecto de las cuestiones prácticas de uso, los compuestos de fórmula general (I) según la presente invención se presentan en forma de composiciones.

Es así que según un tercer aspecto, la invención tiene por objeto una composición insecticida que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I) asociado a un soporte adecuado al uso de la composición como insecticida.

En la composición según la presente invención, los compuestos se mezclan con un soporte sólido, o se disuelven o dispersan en un soporte líquido.

Los compuestos pueden igualmente asociarse a sustancias auxiliares como emulsionantes, agentes mojantes, agentes de dispersión y estabilizantes. Los compuestos derivados de pirimidinatriona de fórmula general (I) y las composiciones que los contienen según la presente invención pueden incorporarse a formulaciones clásicas como soluciones, emulsiones, suspensiones, polvos, espumas, pastas, granulados, aerosoles, etc. Dichas formulaciones se preparan mediante técnicas clásicas conocidas del experto en la técnica.

Según una forma preferida, la composición insecticida de la invención comprende además otro compuesto dotado con actividad insecticida, y en particular un compuesto insecticida seleccionado entre los organofosforados y los carbamatos.

Además, la composición insecticida puede adicionalmente contener una o varias otras sustancias activas tales como por ejemplo acaricidas, fungicidas, bactericidas, abonos, fertilizantes, etc.

Las composiciones según la invención son eficaces contra las poblaciones de insectos de sensibilidad normal o resistentes a los organofosforados o a los carbamatos, así como para todos los estadios de desarrollo de los insectos. En efecto, puesto que la actividad acetilcolinesterasa es necesaria para una transmisión correcta del flujo nervioso, los compuestos de la invención son inhibidores de la AChE (G119S salvaje o mutada) y son por tanto activos en el momento en que se necesita la actividad de la enzima (las larvas sensibles mueren desde la eclosión es decir en el estado L1 del desarrollo).

Las formas de aplicación como las descritas anteriormente respecto al uso de los derivados de pirimidinatriona de fórmula general (I) en tanto que insecticidas (riego, pulverización, etc.) se aplican igualmente a las composiciones que los comprenden, contengan éstas adicionalmente o no otras sustancias activas o auxiliares.

Finalmente, según un último aspecto, la invención tiene por objeto un kit insecticida que comprende al menos una composición como se ha definido anteriormente asociada a un medio de difusión que permita la aplicación de dicha composición a un territorio constituido por una o varias zonas agrícolas y/o de vivienda y/o forestal y/o pantanosa y/o de estepa y/o de sabana.

La presente invención se comprenderá mejor con ayuda del complemento de descripción que sigue, que se refiere a ejemplos de puesta en evidencia de la propiedades de inhibición de la AChE de varios compuestos derivados de pirimidinatriona de fórmula general (I) conformes à la invención, de puesta en evidencia de la propiedad insecticida de estos compuestos, así como la preparación de una composición que comprende estos compuestos.

Ejemplo 1

Propiedad de inhibición de la actividad AChE de los compuestos de fórmula general (I)

Los compuestos derivados de pirimidinatriona de fórmula general (I) según la invención que se agrupan en la Tabla II siguiente se ensayaron respecto de su actividad inhibidora de la AChE. Todos estos compuestos se comercializan por la empresa Chembridge Corporation (San Diego, USA).

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA II

Compuestos	Nombres
(1)	5-[(5-metil-2-furil)metileno]-1-fenil-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(2)	1-(3-metilfenil)-5-[(5-metil-2-tienil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(3)	1-(3-metoxifenil)-5-[(5-metil-2-tienil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(4)	1,3-dimetil-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(5)	1-(4-metoxifenil)-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(6)	1-(4-clorofenil)-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(7)	1-(4-isopropilfenil)-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(8)	1-alil-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2-tioxodihidro-4,6(1H,5H)-pirimidinatriona
(9)	5-(2-furilmetileno)-1-fenil-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(10)	5-(2-furilmetileno)-1,3-dimetil-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(11)	5-[(5-metil-2-furil)metileno]-1-(4-metilfenil)-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(12)	1-(3-metoxifenil)-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(13)	1-(4-etoxifenil)-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(14)	1-(4-bromofenil)-5-[(5-metil-2-tienil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-

	pirimidinatriona
(15)	1-(4-clorofenil)-5-[(5-metil-2-tienil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)- pirimidinatriona
(16)	1-(4-fluorofenil)-5-[(5-metil-2-tienil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)- pirimidinatriona
(17)	1-(3,4-dimetilfenil)-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)- pirimidinatriona
(18)	1-(2-furilmetil)-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2,4,6(1,3H,5H)- pirimidinatriona
(19)	1-(4-etilfenil)-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)- pirimidinatriona
(20)	1-butil-5-[(5-metil-2-tienil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)- pirimidinatriona

Las propiedades inhibitoras de los compuestos de la tabla I anterior se ensayaron para la actividad AChE usando tanto una AChE recombinante normal o G119S como extractos de larvas de mosquito sensibles (portadoras de la AChE normal) o resistentes (portadoras de la AChE mutada G119S) a los organofosforados y carbamatos.

Se midió la actividad AChE usando el procedimiento descrito por Bourguet y col., Pest Biochem. Physiol., 1996, 55, 122-128 y que hace referencia al procedimiento espectroscópico descrito por Ellman GL. y col. (Biochem Pharmacol., 1961, 7, 88-95) usando acetilcolina como sustrato.

1) Propiedad de inhibición de la actividad de una AChE recombinante

Se ensayaron las propiedades inhibitoras de los compuestos según la invención sobre la actividad de una AChE1 de *Culex pipiens* recombinante normal o mutada G119S según el protocolo descrito por Weill y col., Nature, 2003, 423, 136-137.

Cada compuesto según la invención se ensaya a diferentes concentraciones sobre lisados de células S2 de *Drosophila* transfectadas con un vector de expresión vacío o que expresa la AChE1 normal o mutada. Tras la expresión, las células se centrifugaron 15 minutos a 14000 rpm y a continuación se lisaron en tampón fosfato 0,25 M, conteniendo Triton X100 al 1%.

Se incubaron 100 μ l de sobrenadante procedente de la centrifugación de los lisatos celulares 3 minutos a 10000 rpm durante 15 minutos con 10 μ l de cada compuesto según la invención a varias concentraciones. La actividad de inhibidores conocidos de la AChE, es decir tacrina y propoxur (insecticida tipo carbamato) se ensayaron de la misma forma en paralelo respecto de la actividad AChE (tacrina y propoxur están comercialmente disponibles de ICN Biomedical y Bayer AG, respectivamente).

Se determinó para cada compuesto ensayado la concentración que producía un 50% de inhibición de la actividad AChE (CI50 en μ M). La eficacia de los diferentes compuestos respecto de la actividad AChE mutada relativa a la de la AChE normal se estimó mediante la relación sensible/insensible.

ES 2 312 134 T3

Los resultados obtenidos (CI50 en μM y relación sensible/insensible) se resumen a continuación en la tabla III.

TABLA III

Compuestos	AChE1 mutada (proteína insensible)	AChE1 normal (proteína sensible)	Relación insensible/sensible
Tacrina	1,57	0,65	0,41
(1)	23	34	1,47
(2)	43	39	0,90
(3)	62	102	1,65
(4)	31	73	2,40
(5)	22	30	1,36
(6)	43	70	1,63
(7)	72	128	1,78
(8)	29	61	2,08
(9)	737	1394	1,89
(10)	357	1189	3,34
(11)	3,5	4,5	1,27
(12)	3,5	3,4	0,96
(13)	2,9	7,1	2,40
(14)	11,1	9,6	0,87
(15)	8,7	8,7	1,00
(16)	8,6	17,1	1,99
(17)	8,5	15,7	1,85
(18)	4,8	10,1	2,10
(19)	3,4	1,9	0,58
(20)	15,5	12,1	0,78
Propoxur	6348	9	0,0014

2) Propiedad de inhibición sobre extractos de larvas de mosquitos

Se sumergieron larvas de mosquitos *Culex pipiens* sensibles o resistentes al propoxur en 400 μl de tampón fosfato 0,25M que contenía Triton X100 al 1%. Los homogenatos se centrifugaron 3 minutos a 10000 rpm.

Se midió la inhibición de la actividad AChE1 en el sobrenadante según el procedimiento descrito en el apartado 1), es decir, que 100 μl de sobrenadante se incubaron durante 15 minutos con 10 μl de compuestos según la invención a diversas concentraciones. Se ensayó igualmente en paralelo la actividad de los inhibidores conocidos de la AChE, es decir tacrina y propoxur. Se estimó la eficacia de los diferentes compuestos sobre las larvas resistentes relativa a las larvas sensibles por la relación sensibles/resistentes.

ES 2 312 134 T3

Los resultados obtenidos (CI50 en μM y relación sensibles/resistentes) se resumen a continuación en la tabla IV.

TABLA IV

Compuestos	Larvas resistentes	Larvas sensibles	Relación sensibles/resistentes
Tacrina	5,5	3,5	0,6
(1)	6,2	29,4	4,7
(2)	28	442	15,5
(3)	33	118	3,5
(4)	7,5	74,3	9,8
(5)	81	592	7,3
(6)	27	330	12,0
(7)	21	132	6,1
(8)	51	91,6	1,8
(11)	14	111	7,7
(12)	6	54	8,5
(13)	89	236	2,7
(14)	142	2121	15,0
(5)	177	1220	6,9
(16)	22	490	22,5
(17)	35	424	12,2
(18)	37	260	7,1
(19)	19	312	16,7
(20)	152	153,0	1,0
Propoxur	31820	4,9	0,00015

El conjunto de estos resultados muestra que los compuestos de fórmula (I) según la invención son capaces de inhibir eficazmente la actividad AChE, y en particular la actividad de una AChE mutada.

Ejemplo 2

Propriedad insecticida de los compuestos de fórmula general (I)

Se ensayo la actividad insecticida de los compuestos según la invención relacionados en la Tabla IV anterior en larvas de mosquitos *Culex pipiens* sensibles o resistentes a la acción de propoxur.

Las larvas resistentes o sensibles a propoxur se incubaron en placas de 24 pocillos, a razón de 15 larvas en estado 4 por pocillo, en 1 ml de agua de grifo que contenía diferentes concentraciones de compuestos comprendidas entre 0,31 y 50 $\mu\text{g/ml}$.

Se midió la mortalidad larval tras 24 horas de incubación. Para cada compuesto se estimó la mortalidad del 50% (DL50 en μM) con ayuda del programa log-Probit (Raymond, M. (1985). Présentation d'un programme Basic d'analyse log-probit pour μ -ordinateur. Cahiers ORSTOM, serie Entomologie médicale et Parasitologie, 23(2), 117-121; Raymond, M., Prato, G., & Ratsira, D. (1993). PROBIT, CNRS-UMI, Licencia L93019. Avenix, 34680 St. Georges d'Orques, Francia.), probando la homogeneidad de la dosis-respuesta. Se estimó la eficacia de los diferentes compuestos sobre las larvas resistentes respecto de las larvas sensibles mediante la relación sensibles/resistentes.

Los resultados obtenidos (DL50 en μM y relación sensibles/resistentes) se resumen a continuación en la tabla V siguiente.

TABLA V

Compuestos	Larvas resistentes	Larvas sensibles	Relación sensibles/resistentes
(1)	143	310	2,2
(2)	170	455	2,7
(3)	122	389	3,2
(4)	200	576	2,9
(5)	206	300	1,5
(6)	192	762	4,0
(8)	123	223	1,8
Propoxur	2700	1,7	0,00063

Estos resultados demuestran claramente que los compuestos de fórmula I según la invención son eficaces como insecticidas, y en particular sobre las poblaciones de insectos que son resistentes a los insecticidas clásicos de tipo propoxur.

Ejemplo 3

Preparación de una composición insecticida según la invención

Se introdujeron 42 mg del compuesto (1) en 100 ml de agua del grifo, a continuación se agitó la mezcla.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante pretende únicamente ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aun cuando se ha puesto el mayor esmero en su elaboración, no pueden excluirse errores u omisiones y la EPO declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- DE 3903404 [0017]
- EP 0455300 A [0018]

Documentos no de patentes citados en la descripción

- ANAZAWA Y. *Insect Biochem Mol Biol*, 2003, vol. 33 (5), 509-514 [0005]
- FALLANG A. *Pest Manag Sci*, 2004, vol. 60 (12), 1163-1170 [0005]
- LI F. *Insect Biochem Mol Biol*, 2004, vol. 34 (4), 397-405 [0005]
- MENOZZI P. *BMC Evol Biol*, 2004, vol. 4 (1), 4 [0005]

ES 2 312 134 T3

• **NABESHIMA T.** *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, vol. 313 (3), 794-801 [0005]

• **VONTAS JG.** *Insect Mol Biol*, 2002, vol. 11 (4), 329-336 [0005]

5 • **WALSH SB.** *Biochem J*, 2001, vol. 359 (1), 175-181 [0005]

• **WEILL** y col. *Insect Molecular Biology*, 2004, vol. 13 (1), 1-7 [0006]

10 • **WEILL** y col. *Nature*, 2003, vol. 423, 136-137 [0006] [0050]

• **VVEDENSKII, VM.** *Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinenii*, 1969, vol. 6, 1092-1095 [0027]

• **BADAWI, M.** *Journal of Science*, 1990, vol. 14 (2), 581-600 [0027]

15 • **BOURGUET** y col. *Pest Biochem. Physiol.*, 1996, vol. 55, 122-128 [0049]

• **ELLMAN GL** y col. *Biochem Pharmacol*, 1961, vol. 7, 88-95 [0049]

20 • **RAYMOND, M.** *Présentation d'un programme Basic d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. Cahiers ORS-TOM, serie Entomologie médicale et Parasitologie*, 1985, vol. 23 (2), 117-121 [0061]

• **RAYMOND, M.; PRATO, G; RATSIRA, D.** *PROBIT, CNRS-UMII, Licencia L93019*, 1993 [0061]

25

30

35

40

45

50

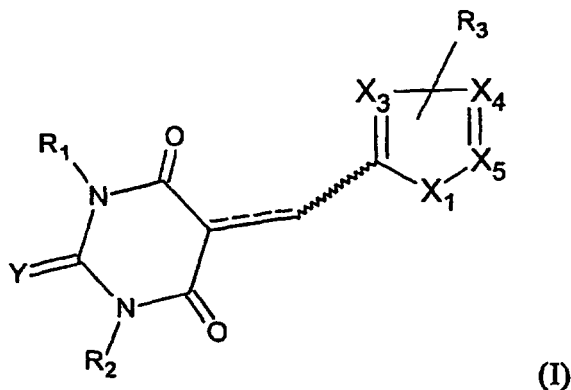
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Uso de al menos un compuesto que responde a la fórmula general (I) siguiente:



en la que:

--- representa un enlace que puede ser un enlace simple o un enlace doble;

R₁ representa un grupo seleccionado entre un átomo de hidrógeno y un grupo alquilo, saturado o insaturado, lineal, ramificado o cíclico, en C₁-C₆, sustituido eventualmente por un grupo hidroxilo o un átomo de halógeno;

R₂ representa un grupo seleccionado entre un grupo arilo sustituido eventualmente y un grupo alquilo, saturado o insaturado, lineal, ramificado o cíclico, en C₁-C₄, sustituido eventualmente por uno o varios grupos seleccionados entre átomos de halógeno, grupos hidroxilos, heterociclos que comprenden de 1 a 5 átomos de carbono y de 1 a 5 heteroátomos tales como oxígeno, azufre y nitrógeno;

R₃ puede estar en posición 3, 4 ó 5 del ciclo y representa un grupo seleccionado entre un átomo de hidrógeno y un grupo alquilo, saturado o insaturado, lineal, ramificado o cíclico, en C₁-C₄, sustituido eventualmente por un grupo hidroxilo o un átomo de halógeno;

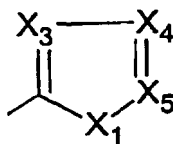
X₁ representa un átomo seleccionado entre el azufre, nitrógeno y el oxígeno;

X₃, X₄ y X₅, iguales o diferentes, se eligen entre un átomo de carbono y un átomo de nitrógeno, dos átomos como máximo entre X₃, X₄ y X₅ siendo átomos de nitrógeno; e

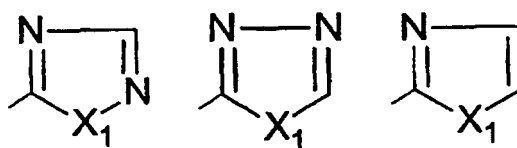
Y representa un átomo seleccionado entre oxígeno y azufre,

como inhibidor de la acetilcolinesterasa.

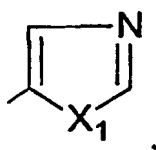
2. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el compuesto responde a la fórmula general (I) en la que el ciclo



se elige entre



y



teniendo X_1 el mismo significado que el que se define en la reivindicación 1.

3. Uso según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque el compuesto responde a la fórmula general (I) en la que R_1 representa un grupo alquilo en C_1-C_4 .

4. Uso según la reivindicación 3, **caracterizado** porque R_1 se selecciona entre un átomo de hidrógeno y un grupo metilo.

5. Uso según la reivindicación 4, **caracterizado** porque R_1 representa un grupo metilo.

6. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el compuesto responde a la fórmula general (I) en la que R_2 representa un grupo arilo, sustituido eventualmente por un grupo seleccionado entre un alquilo en C_1-C_4 y un átomo de halógeno.

7. Uso según la reivindicación 6, **caracterizado** porque R_2 representa un fenilo, sustituido eventualmente por un grupo seleccionado entre un alquilo en C_1-C_4 y un átomo de halógeno.

8. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque el compuesto responde a la fórmula general (I) en la que R_2 se selecciona entre un metilo, un alilo, un grupo furilo sustituido eventualmente por un metilo, un butilo, un fenilo no sustituido, un fenilo sustituido por un grupo metilo en posición meta, un fenilo sustituido por un grupo metilo en posición para, un fenilo di-sustituido en posición meta y para por un metilo, un fenilo sustituido por un etilo en posición para, un fenilo sustituido por un grupo metoxi en posición meta, un fenilo sustituido por un grupo metoxi en posición para, un fenilo sustituido por un etoxi en posición para, un fenilo sustituido por un isopropilo en posición para, un fenilo sustituido por un átomo de cloro en posición para, un fenilo sustituido por un átomo de bromo en posición para, un fenilo sustituido por un átomo de flúor en posición para.

9. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el compuesto responde a la fórmula general (I) en la que X_1 se selecciona entre oxígeno y azufre.

10. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el compuesto responde a la fórmula general (I) en la que X_3 , X_4 y X_5 son idénticos y todos representan un átomo de carbono.

11. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el compuesto responde a la fórmula general (I) en la que R_3 se selecciona entre un átomo de hidrógeno y un grupo metilo.

12. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el compuesto responde a la fórmula general (I) en la que R_3 está en posición 5 del ciclo de furano, tiofeno o pirrol.

13. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el compuesto que responde a la fórmula general (I) se elige entre:

Compuestos	Nombres
(1)	5-[(5-metil-2-furil)metileno]-1-fenil-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(2)	1-(3-metilfenil)-5-[(5-metil-2-tienil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(3)	1-(3-metoxifenil)-5-[(5-metil-2-tienil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(4)	1,3-dimetil-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(5)	1-(4-metoxifenil)-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(6)	1-(4-clorofenil)-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(7)	1-(4-isopropilfenil)-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(8)	1-alil-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2-tioxodihidro-4,6(1H,5H)-pirimidinatriona
(9)	5-(2-furilmetileno)-1-fenil-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(10)	5-(2-furilmetileno)-1,3-dimetil-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(11)	5-[(5-metil-2-furil)metileno]-1-(4-metilfenil)-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(12)	1-(3-metoxifenil)-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(13)	1-(4-etoxifenil)-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(14)	1-(4-bromofenil)-5-[(5-metil-2-tienil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona
(15)	1-(4-clorofenil)-5-[(5-metil-2-tienil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona

	pirimidinatriona
(16)	1-(4-fluorofenil)-5-[(5-metil-2-tienil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)- pirimidinatriona
(17)	1-(3,4-dimetilfenil)-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)- pirimidinatriona
(18)	1-(2-furilmetil)-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2,4,6(1,3H,5H)- pirimidinatriona
(19)	1-(4-etilfenil)-5-[(5-metil-2-furil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)- pirimidinatriona
(20)	1-butil-5-[(5-metil-2-tienil)metileno]-2,4,6(1H,3H,5H)- pirimidinatriona

14. Uso de al menos un compuesto de fórmula general (I) como se define en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, como insecticida.

15. Uso según la reivindicación 14, **caracterizada** porque está destinada a controlar el desarrollo de poblaciones de insectos del género *Anopheles* o *Culex*.

16. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 14 y 15, sobre poblaciones de insectos que han desarrollado una resistencia a los insecticidas organofosforados o a los carbamatos.

17. Composición insecticida que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I) como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 asociado con un soporte apropiado al uso de la composición como insecticida.

18. Composición insecticida según la reivindicación 17, **caracterizada** porque comprende además al menos otro compuesto dotado de actividad insecticida.

19. Composición insecticida según la reivindicación 18, **caracterizada** porque el otro compuesto dotado de actividad insecticida se selecciona entre los organofosforados y los carbamatos.

20. Composición insecticida según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, **caracterizada** porque contiene además una o varias sustancias activas elegidas entre acaricidas, fungicidas, bactericidas, abonos y fertilizantes.

21. Kit insecticida que comprende al menos una composición según se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20 asociado a un medio de difusión que permite la aplicación de dicha composición a un territorio constituido por una o varias zonas agrícolas y/o de población y/o forestal y/o pantanosa y/o de estepa y/o de sabana.

22. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 13, para la preparación de un medicamento destinado a tratar enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer.