

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 476**

51 Int. Cl.:

C07D 239/88 (2006.01)
C07D 239/90 (2006.01)
C07D 239/91 (2006.01)
A61K 31/517 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
C07D 239/92 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2005 E 05714346 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 1737831**

54 Título: **Compuestos neurológicamente activos**

30 Prioridad:

02.04.2004 AU 2004901802
02.04.2004 AU 2004901804
24.12.2004 AU 2004907359

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.10.2013

73 Titular/es:

PRANA BIOTECHNOLOGY LIMITED (100.0%)
LEVEL 2 ,369 ROYAL PARADE
PARKVILLE VIC 3052, AU

72 Inventor/es:

KOK, GAIK, BENG y
LEUNG, BRENDA, KWAN, YI

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 425 476 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos neurológicamente activos

5 La presente invención se refiere a compuestos neurológicamente activos, a procesos para su preparación y a dichos compuestos para usar como agentes farmacéuticos o veterinarios, en particular para el tratamiento de afecciones neurológicas, más específicamente enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer.

Antecedentes

10 Se cree que la duración de la vida está biológicamente determinada para cada especie, y que la longitud de la vida humana es incierta, pero puede ser hasta 120 años. Puesto que la esperanza de vida ha aumentado significativamente en este siglo, los ancianos son un segmento creciente de la población y sus necesidades de atención médica seguirán creciendo durante décadas.

15 Aunque el envejecimiento normal se caracteriza por modestas reducciones en la masa y el volumen del cerebro humano, que se puede deber a atrofia o muerte de células cerebrales, estos cambios son mucho más profundos en los cerebros de los pacientes que sucumben a una enfermedad neurodegenerativa. La mayoría de estas afecciones es esporádica (es decir, no se deben a mutaciones genéticas) y de causa desconocida, pero cientos de mutaciones diferentes en muchos genes han demostrado ser la causa de variantes familiares (hereditarias) de varias enfermedades neurodegenerativas. Muchas de las docenas o más de genes que albergan estas mutaciones fueron descubiertos en la búsqueda para determinar la base genética de enfermedades neurodegenerativas sólo en los últimos diez años. Las enfermedades neurodegenerativas evolucionan gradualmente después de un largo período de la función normal del cerebro, debido a la degeneración progresiva (es decir, la disfunción y la muerte de las células nerviosas) de regiones específicas del cerebro. Puesto que la expresión sintomática de la enfermedad ocurre cuando la pérdida de células nerviosas supera un "umbral" para la función continua (por ejemplo, memoria, movimiento) realizada por la región del cerebro afectada, el inicio real de la degeneración del cerebro puede preceder a la expresión clínica en muchos años.

20 Las facultades intelectuales y cognitivas superiores integradoras se deterioran progresivamente e interfieren con las actividades cotidianas en afecciones neurológicas que derivan en demencia. La prevalencia exacta de la demencia en la población anciana se desconoce, pero puede ser el 15% de las personas mayores de 65 años con un 5% severamente y un 10% leve a moderadamente demente. La prevalencia de demencia grave aumenta de 1% a los 65 años a 45% a los 85 años. Existen muchas causas de demencia, pero la enfermedad de Alzheimer (EA) representa al 50% de los pacientes con demencia mayores de 65 años de edad.

25 La EA es una enfermedad degenerativa primaria del cerebro que se caracteriza por un deterioro progresivo de las funciones cognitivas como memoria, pensamiento, comprensión, cálculo, lenguaje, capacidad de aprendizaje y juicio. Se diagnostica demencia cuando este deterioro es suficiente para afectar las actividades personales de la vida diaria. La EA presenta un inicio insidioso con un deterioro lento. Esta enfermedad debe ser claramente diferenciada del deterioro normal, relacionado con la edad, de las funciones cognitivas. El deterioro normal es mucho menor, mucho más gradual y deriva en discapacidades más leves. La aparición de la EA se produce generalmente después de los 65 años de edad, aunque no es infrecuente la aparición más temprana. A medida que la edad avanza, la incidencia aumenta rápidamente (se duplica aproximadamente cada 5 años). Esto tiene implicaciones obvias para el número total de personas con este trastorno dado que la esperanza de vida aumenta en la población.

30 La etiología de la demencia de la EA no es clara. Hay considerable evidencia de una predisposición hereditaria para algunas formas de la EA (revisado en St George-Hyslop, 2000), y la expresión de ciertas isoformas de ApoE también se ha relacionado con un mayor riesgo de EA (Corder et al, 1993; Czech et al 1994). La acumulación tóxica de aluminio ha sido sugerida como un agente causante de la EA, aunque en la actualidad esta hipótesis ha sido reemplazada en gran medida. Los cerebros de pacientes con EA tienen depósitos anormales que incluyen proteína β -amiloide ($A\beta$).

35 $A\beta$ es conocida por estar presente en el cerebro de las personas con ciertas enfermedades neurodegenerativas, pero no se sabe si es un síntoma de un proceso patológico subyacente, o está realmente implicada en la etiología de la enfermedad. Por ejemplo, algunos autores creen que los depósitos de $A\beta$ pueden ser indicativos de un mecanismo de defensa normal del cerebro, en el cual el cerebro intenta secuestrar la $A\beta$; dichos depósitos pueden estar presentes en el cerebro de individuos normales. Existe una mutación de la proteína tau en la cual están presentes en el cerebro ovillos neurofibrilares, pero no placas de amiloide, esta afección se conoce como tauopatía.

40 Una propuesta para el tratamiento de la EA es inhibir la producción de $A\beta$ en el cerebro. La escisión proteolítica de APP por BACE1 y γ -secretasa genera $A\beta$ de tamaño normal, que luego se libera de las células (Nunan y Small, 2000). Por lo tanto, los inhibidores de BACE1 o de la γ -secretasa pueden tener valor terapéutico. Alternativamente, un número de estudios han demostrado que el colesterol puede influir en la liberación de $A\beta$ (Simons et al., 1998; Hartmann, 2001; Fassbender et al., 2001; Frears et al., 1999; Friedhoff et al., 2001). Sin embargo, hay ciertas discrepancias en el área respecto al valor de bajar los niveles de colesterol, y algunos trabajadores consideran que

el colesterol es en realidad beneficioso. Por ejemplo, Ji et al., (2002) sugirieron que la unión de A β al colesterol podría prevenir la toxicidad de A β al inhibir su oligomerización.

En un enfoque alternativo, se ha propuesto que desentrañando el procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloidea (PPA), que genera el monómero del amiloide A β , pueden ser posibles varias potenciales dianas terapéuticas (Shearman et al., 2000; Sinha et al., 1999), y este enfoque está en una etapa temprana de desarrollo clínico. Los intentos de promover la depuración de A β del cerebro a través de la vacunación con A β , si bien es eficaz en un modelo de ratón transgénico para EA (Schenk et al. 1999), se encontró que tiene efectos adversos significativos (Brower, 2002).

Asimismo se ha sugerido que el depósito de fibrillas tipo amiloide también puede ser importante en otras enfermedades neurodegenerativas. Éstas incluyen la enfermedad de Parkinson, la demencia con formación de cuerpos de Lewy, la atrofia multisistémica, la enfermedad de Hallerboden-Spatz y la enfermedad difusa por cuerpos de Lewy.

Una de las teorías competidoras acerca de la etiología de la EA es que los pasos causantes se encuentran en la vía de la biogénesis intracerebral y la acumulación de la proteína amiloide A β (véanse revisiones recientes por Selkoe, 2001; Beyreuther et al., 2001; Bush, 2001). Sin embargo, hasta la fecha no hay drogas ni agentes dirigidos a esta vía que hayan demostrado tener un efecto duradero en la modificación de la expresión clínica de la enfermedad o la prevención o el mejoramiento del deterioro de la función cognitiva asociada a trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer.

Otra hipótesis es que la EA es causada por la acumulación tóxica de amiloide A β , debida en parte al exceso de unión de cobre y zinc, iones metálicos que son abundantes en las regiones más afectadas. Además, se ha sugerido que cuando los iones Zn²⁺ y Cu²⁺ interactúan con A β , se produce la agregación de A β en fibrillas y placas (Atwood et al., 1998); confirmado por los datos recientes de animales que carecen de Zn²⁺ sináptico (Lee et al., 2002). También se ha sugerido que las interacciones redox activas Cu²⁺-A β pueden generar H₂O₂ a partir de O₂ (Huang et al., 1999). Se ha demostrado que tanto el Cu²⁺ como el Zn²⁺ afectan las interacciones A β -membrana lipídica (Curtain et al., 2001).

El cerebro es un órgano que concentra iones metálicos y la evidencia reciente sugiere que una falla en la homeostasis de metales desempeña un papel fundamental en diversas enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad. Las características comunes de estas enfermedades incluyen el depósito de proteínas mal plegadas (cada enfermedad tiene su propia proteína amiloide específica) y daño celular sustancial como resultado del estrés oxidativo. De hecho en la actualidad se están acumulando rápidamente datos que indican que esas reacciones metaloquímicas podrían emerger como el denominador común subyacente a los trastornos neurológicos amiloidógenos como la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), las enfermedades priónicas - como la enfermedad de Creutzfeldt - Jakob (ECJ), las encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET), las cataratas, los trastornos mitocondriales, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington. En esos casos, la agregación patológica de una proteína específica es promovida por actividad redox anómala en un entorno fisiológico tipificado por la presencia de metales de transición y reductores disponibles. [Bush, 2000 (Curr Opin Chem Biol. 2000 Apr; 4(2):184-91)].

Un método de tratamiento de la EA que usa yodoclorohidroquinolina como antibiótico [también conocida como clioquinol (CQ)], se da a conocer y se reivindica en las patentes de los Estados Unidos N° 5,994,323 y 6,001,852 por P.N. Geromylatos S.A. y en la solicitud de patente de los Estados Unidos N° 09/972,913 por Bush et al. El CQ se retiró como antibiótico en 1970, debido a su asociación con un síndrome neurológico poco común, la neuropatía mieloóptica subaguda (NMOS), que se observó únicamente en Japón en la década de 1960, en pacientes que se pensaba que habían recibido el fármaco durante largos períodos y probablemente a dosis superiores que las recomendadas en el momento (Shiraki, 1975). No obstante, la evidencia reciente sugiere que NMOS fue causada por una deficiencia de vitamina B12 relacionada con el uso excesivo en una población excepcionalmente vulnerable, y por lo tanto podría ser rehabilitado para un estudio en un escenario clínico (Yassin et al., 2000; Bush y Masters, 2001).

Sin embargo, no se proporcionan resultados in vivo en modelos animales ni en seres humanos en las patentes para Geromylatos y Bush. US 5,994,323 da a conocer una composición que contiene CQ y vitamina B12, y su uso para el tratamiento de "enfermedades o trastornos que responden a la administración de CQ mientras inhiben los efectos secundarios perjudiciales" del CQ. Estas enfermedades incluyen la EA. US 6,001,852 da a conocer un método de tratamiento de la EA utilizando CQ, preferentemente junto con vitamina B12. Tanto US 5,994,323 como US 6,001,852 sugieren una dosis de 10-750 mg por día; US 5,994,323 recomienda que si el tratamiento es por un período largo CQ se debe administrar intermitentemente, por un máximo de 3 semanas cada vez seguido de un período de "reposo farmacológico" de 1 a 4 semanas.

En la solicitud US N° 09/972,913 se hace referencia a CQ exclusivamente en términos de su capacidad para desagregar los depósitos de A β . No se discute ningún otro mecanismo de neurotoxicidad. PCT/US99/05291 por el General Hospital Corporation da a conocer el uso de CQ en combinación con quelantes de cobre y zinc específicos

para promover la disolución de las placas de amiloide y la inhibición de la formación de placas de amiloide o la producción de ROS por A β .

US 6,001,852 también sugiere que se podría utilizar una composición que contenga CQ y vitamina B12 en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson; sin embargo, en este contexto se sugiere que CQ actúa principalmente mediante depuración de hierro de la sustancia negra.

La eficacia de CQ en el tratamiento de la EA se basa en su capacidad para penetrar en el CNS y luego secuestrar los metales de transición, Cu, Zn y Fe de diversas entidades de A β reduciendo así la toxicidad de A β y liberándola para la depuración. La eficacia de CQ está restringida por su escasa solubilidad en agua que limita su biodisponibilidad oral. CQ es conocido también por sufrir un importante metabolismo conjugativo y tiene antecedentes de toxicidad como hemos comentado antes. El hecho de que CQ sea un ligando de un metal bidentado hace necesario el confinamiento de al menos dos moléculas por cada ion metálico capturado. WO/030764180 da a conocer quinazolinonas como moduladores de los receptores nucleares.

Resumen

La presente invención proporciona compuestos como los definidos en la reivindicación 1 para utilizar en el tratamiento de afecciones neurológicas que incluyen las caracterizadas por una reacción anormal entre proteínas y metales.

La publicación de patente internacional N° WO2004/031161 describe compuestos heterocíclicos que tienen dos anillos de 6 miembros fusionados con un nitrógeno en la posición 1 y un grupo hidroxilo o mercapto en la posición 8, con al menos uno de los anillos aromático. Estos compuestos son útiles como agentes farmacéuticos o veterinarios, en particular para el tratamiento de afecciones neurológicas más específicamente enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer.

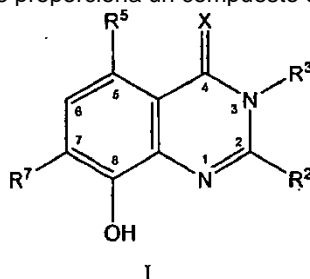
En la actualidad hemos desarrollado compuestos heterocíclicos que tienen dos anillos de 6 miembros fusionados, con átomos de nitrógeno en las posiciones 1 y 3, un grupo carboxi en la posición 4 y un grupo hidroxilo en la posición 8, con ambos anillos aromáticos, a través de la optimización colectiva de una o más de las propiedades siguientes:

- (a) quelación de metales (según se define más adelante);
- (b) solubilidad acuosa;
- (c) menor toxicidad celular;
- (d) propiedades de dispersión del amiloide;
- (e) adecuada permeabilidad de la membrana para la penetración del SNC; y
- (f) estabilidad metabólica.

Estos compuestos caen dentro del ámbito genérico de la publicación de patente internacional N° 2004/031161, pero no se dan a conocer específicamente en ese documento e incluyen ejemplos de productos terapéuticos que se concentran en el SNC mediante transporte activo, contienen actividad antioxidante además de sus propiedades de quelación de metales que en algunos casos conduce a mejores propiedades de quelación de metales y demuestran una estrategia profármaco que enmascara la porción 8-hidroxilo para favorecer la penetración del SNC y hacen uso de la actividad de esterasa conocida que reside en la superficie interna de la barrera hematoencefálica (BHE).

Sin desear regirnos por ninguna teoría, se cree que la naturaleza de los sustituyentes en las posiciones 2 y 3 puede ser importante para mejorar la desagregación de la placa. Es preferible que esos sustituyentes sean planos en términos 3D. Los sustituyentes planos en el sistema de anillo permiten que tanto el ligando libre como el quelato metálico interaccionen más eficazmente con, y desagreguen, las placas.

De acuerdo con la presente invención se proporciona un compuesto de fórmula I



en el cual

R² es H o CH₂NR¹R⁴ en el cual R¹ y R⁴ se seleccionan independientemente entre H, C₁₋₆ alquilo opcionalmente sustituido y C₃₋₆ cicloalquilo opcionalmente sustituido;

R³ es H; C₁₋₄ alquilo opcionalmente sustituido; C₂₋₄ alquenoilo opcionalmente sustituido; C₃₋₆ cicloalquilo opcionalmente sustituido; arilo de 6 miembros opcionalmente sustituido, opcionalmente condensado con un arilo o

heteroarilo de 6 miembros opcionalmente sustituido; heterociclilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido que contiene N, saturado o insaturado, opcionalmente condensado con un arilo o heteroarilo de 6 miembros opcionalmente sustituido; $(CH_2)_nR^6$ en el cual n es un número entero de 1 a 6 y R^6 es C_{1-4} alquilo opcionalmente sustituido, C_{3-6} cicloalquilo opcionalmente sustituido, heterociclilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido que contiene Nitrógeno, saturado o insaturado, o arilo de 6 miembros opcionalmente sustituido; NR^8R^9 en el cual R^8 y R^9 se seleccionan independientemente entre H, C_{1-4} alquilo opcionalmente sustituido, C_{3-6} cicloalquilo opcionalmente sustituido, heterociclilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido, que contiene N, saturado o insaturado, y arilo de 6 miembros opcionalmente sustituido; $NHCOR^{10}$ en el cual R^{10} es C_{1-4} alquilo opcionalmente sustituido, C_{3-6} cicloalquilo opcionalmente sustituido, heterociclilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido que contiene N, saturado o insaturado, o arilo de 6 miembros opcionalmente sustituido; $CH_2CONR^{11}R^{12}$ en el cual R^{11} y R^{12} se seleccionan independientemente entre H, C_{1-6} alquilo opcionalmente sustituido, C_{2-6} alquililo opcionalmente sustituido y heterociclilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido que contiene N, opcionalmente condensado con arilo de 6 miembros opcionalmente sustituido; y $(CH_2)_mNHR^{13}$ en el cual R^{13} se selecciona entre C_{1-6} alquilo opcionalmente sustituido y SO_2R^{14} en el cual R^{14} se selecciona entre C_{1-6} alquilo opcionalmente sustituido y arilo de 6 miembros opcionalmente sustituido y m es 1 a 6; R^5 y R^7 se selecciona independientemente entre H y halo; y X es O o S; donde, en las definiciones anteriores, los sustituyentes opcionales se seleccionan entre C_{1-4} alquilo, hidroxilo, halo, C_{1-4} alcoxi y C_{1-4} acilo; con la condición de que:

- (i) al menos uno de R^2 y R^3 no sea H;
- (ii) al menos uno de R^5 y R^7 sea halo;
- (iii) cuando X es O, R^5 y R^7 son Cl y R^2 es H, entonces R^3 no sea ciclopropilo ni parafluorofenilo; y
- (iv) cuando X es O, R^5 es H, R^7 es I y R^2 es H, entonces R^3 no sea C_{2-4} alquilo,

sus sales, hidratos, solvatos, tautómeros, estereoisómeros y/o isómeros geométricos.

La invención también proporciona el compuesto de fórmula I para utilizar como un producto farmacéutico, preferentemente un agente neuroterápico o neuroprotector, más preferentemente un antiamiloidógeno. Preferentemente, la afección neurológica es una enfermedad neurodegenerativa, más preferentemente amiloidosis neurodegenerativa como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson.

El compuesto de fórmula I se administra ventajosamente en forma de una composición farmacéutica o veterinaria junto con un portador aceptable para uso farmacéutico o veterinario.

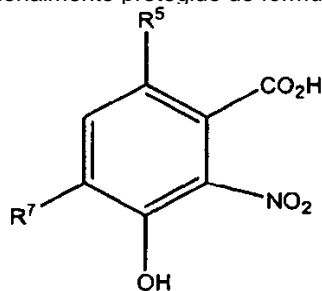
Por lo tanto, la presente invención proporciona además una composición farmacéutica o veterinaria que contiene el compuesto de fórmula I y un portador aceptable para uso farmacéutico o veterinario.

Además, de acuerdo con la presente invención se proporciona un compuesto de fórmula I para usar en el tratamiento, el mejoramiento o la profilaxis de una afección neurológica.

Además, de acuerdo con la presente invención se proporciona el uso del compuesto de fórmula I en la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento, el mejoramiento o la profilaxis de una afección neurológica.

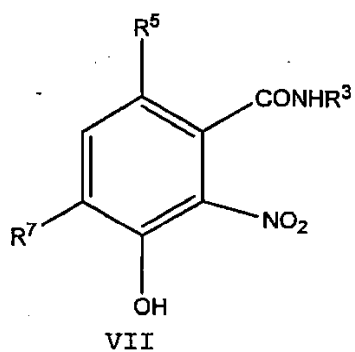
La invención también proporciona además un proceso para la preparación del compuesto de fórmula I definido antes que comprende los pasos de:

- (a) hacer reaccionar un compuesto opcionalmente protegido de fórmula V

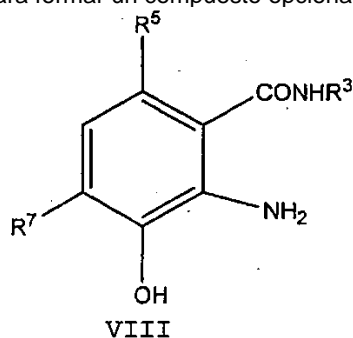


V

en el cual R^5 y R^7 son los definidos antes con H_2NR^3 en el cual R^3 es el definido antes, para formar un compuesto opcionalmente protegido de fórmula VII



reducir el compuesto de fórmula VII para formar un compuesto opcionalmente protegido de fórmula VIII

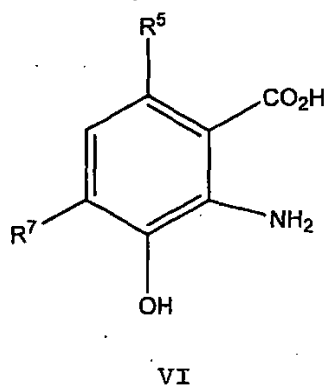


ciclar el compuesto de fórmula VIII para formar un compuesto opcionalmente protegido de fórmula I en el cual R² es H; o

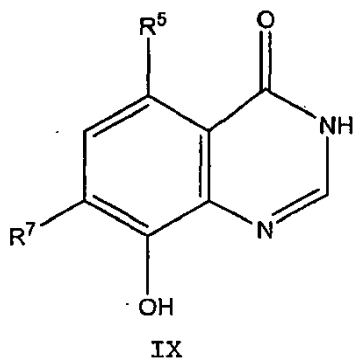
ciclar el compuesto de fórmula VIII en presencia de R²CHO, R²CO₂H o R²C(OR^x) en el cual R^x es C₁₋₄ alquilo opcionalmente sustituido o arilo de 6 miembros opcionalmente sustituido y R² es el definido antes.

La invención también proporciona un proceso para la preparación del compuesto de fórmula I definido antes en el cual R² es H, que comprende los pasos de:

(a) aminorar un compuesto opcionalmente protegido de fórmula VI



en el cual R⁵ y R⁷ son los definidos antes para formar un compuesto opcionalmente protegido de fórmula IX

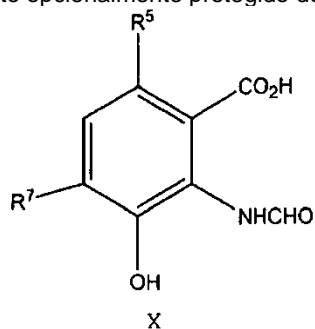


y

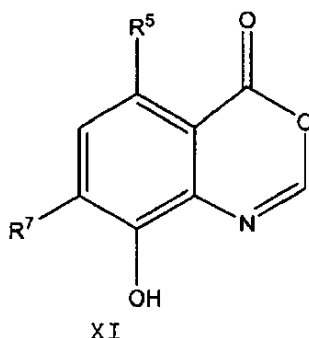
(b) hacer reaccionar el compuesto de fórmula IX con R^3-L o $R^3OSO_2R^x$ en el cual L es un grupo saliente, R^3 es el definido antes y R^x es el definido antes.

La invención también proporciona además un proceso para la preparación del compuesto de fórmula I definido antes en el cual R^2 es H, que comprende los pasos de:

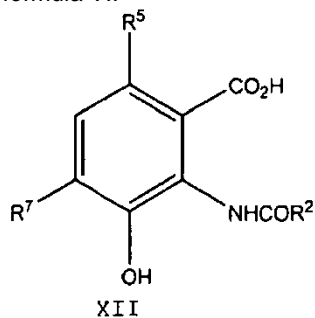
(a) hacer reaccionar el compuesto opcionalmente protegido de fórmula VI como el definido antes con un agente de formilación, para formar un compuesto opcionalmente protegido de fórmula X



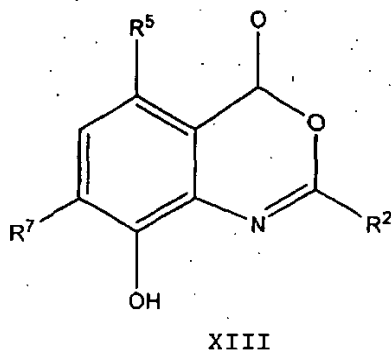
o un compuesto opcionalmente protegido de fórmula XI



(b) hacer reaccionar el compuesto de fórmula X o XI con un agente de acilación que contenga R^2 para formar un compuesto opcionalmente protegido de fórmula VII



en el cual R^2 es el definido antes o un compuesto de fórmula XIII



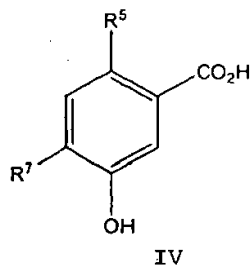
y

(c) hacer reaccionar el compuesto de fórmula XII o XIII con H_2NR^3 en el cual R^3 es el definido antes.

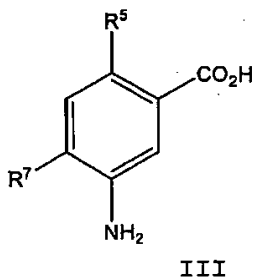
Se comprenderá que los grupos protectores cuando están presentes pueden ser eliminados en cualquier paso adecuado de los procesos descritos antes.

También encontramos un proceso menos complejo para preparar el precursor de los productos intermedios de las fórmulas V y VI descritos más adelante cuando tanto R^5 como R^7 son halo en una gran proporción.

Por lo tanto, además de acuerdo con la presente invención se proporciona un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula VI

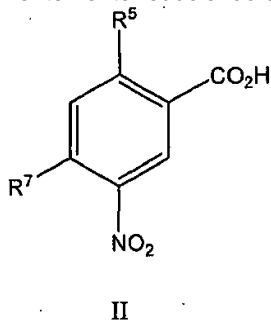


en el cual R^5 y R^7 se seleccionan independientemente de halo, que comprende el paso de diazotación de un compuesto de fórmula III



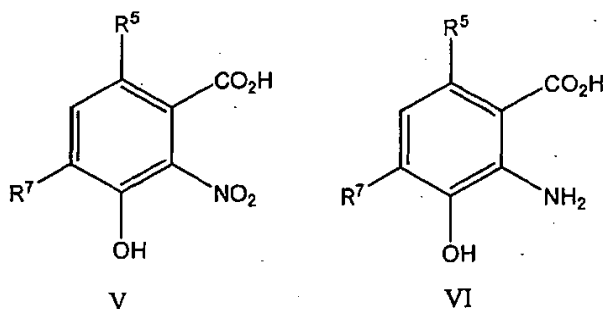
en el cual R^5 y R^7 son los definidos en la fórmula IV anterior.

El compuesto de fórmula III se prepara convenientemente reduciendo un compuesto de fórmula II



en el cual R^5 y R^7 son los definidos en la fórmula IV anterior.

El compuesto de fórmula IV es un precursor en la preparación de los productos intermedios de fórmulas V y VI



en los cuales R^5 y R^7 son los definidos en la fórmula IV anterior, que se pueden usar para preparar los compuestos de fórmula II.

Por lo tanto, la presente invención también proporciona un proceso para la preparación del compuesto de fórmula V como el definido antes en el cual R^5 y R^7 son los definidos en la fórmula IV anterior, que comprende los pasos de:

- (a) preparación del compuesto de fórmula IV mediante el proceso definido antes; y
- (b) nitración del compuesto de fórmula IV.

La presente invención proporciona además un proceso para la preparación del compuesto de fórmula VI como el definido antes en el cual R^5 y R^7 son los definidos en la fórmula IV anterior, que comprende los pasos de:

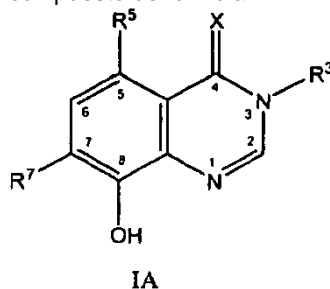
- (a) preparación del compuesto de fórmula V como el definido antes; y
- (b) reducción del compuesto de fórmula V definido antes.

Descripción detallada

En la especificación del título, excepto que el contexto requiera algo diferente debido al lenguaje expreso o implicación necesaria, las palabras "comprender" o variaciones como "comprende(n)" o "que comprende(n)" se utilizan en sentido inclusivo, es decir para especificar la presencia de las características establecidas pero no para excluir la presencia o la adición de otras características en diversas realizaciones de la invención.

Cabe destacar que, según se usa en la especificación del título, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen aspectos plurales a menos que el contexto claramente estipule lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un compuesto" incluye un único compuesto, así como dos o más compuestos; y así sucesivamente.

Un compuesto preferido de fórmula I es un compuesto de fórmula IA:



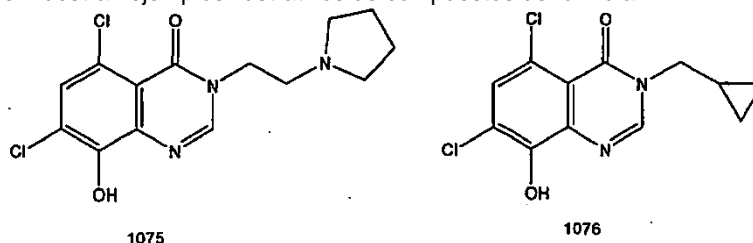
en el cual

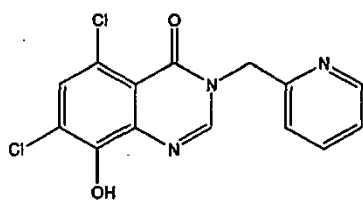
R^5 , R^7 y X son los definidos en la fórmula I anterior; y

R^3 es C_{1-4} alquilo opcionalmente sustituido; C_{2-4} alquienilo opcionalmente sustituido; un heterociclilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido que contiene N, saturado o insaturado, opcionalmente condensado con un arilo o heteroarilo de 6 miembros opcionalmente sustituido; $(CH_2)_nR^6$ en el cual n es 1 a 3 y R^6 es C_{3-6} cicloalquilo opcionalmente sustituido o un heterociclilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido que contiene N, saturado o insaturado; NR^8R^9 en el cual R^8 es H y R^9 es H o C_{1-4} alquilo opcionalmente sustituido o arilo de 6 miembros opcionalmente sustituido; $NHCOR^{10}$ en el cual R^{10} es C_{1-4} alquilo opcionalmente sustituido o arilo de 6 miembros opcionalmente sustituido.

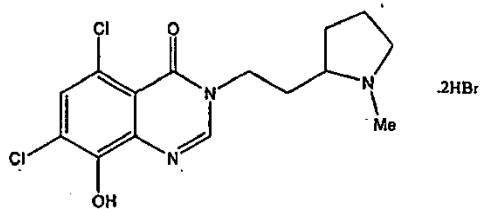
Preferentemente R^5 y R^7 son ambos halo, más preferentemente cloro.

A continuación se muestran ejemplos ilustrativos de compuestos de fórmula IA.

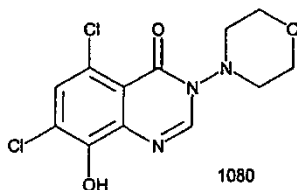




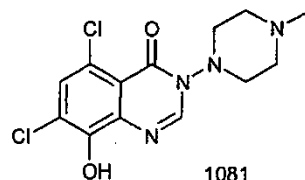
1077



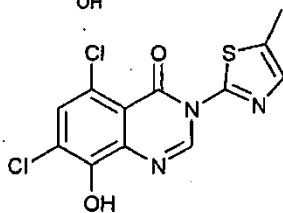
1078



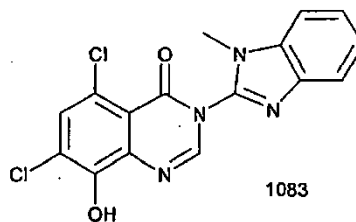
1080



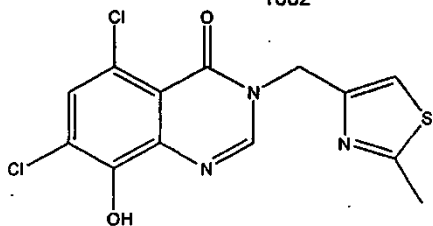
1081



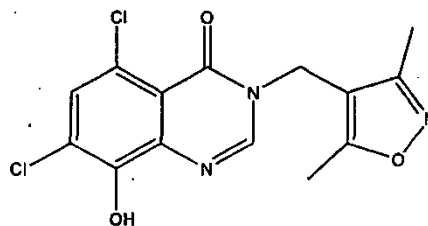
1082



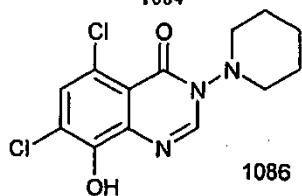
1083



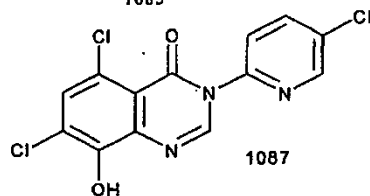
1084



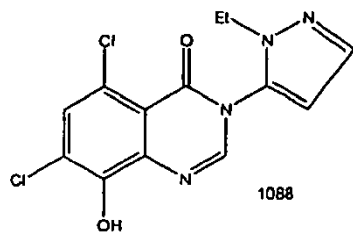
1085



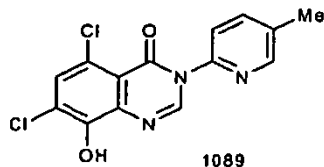
1086



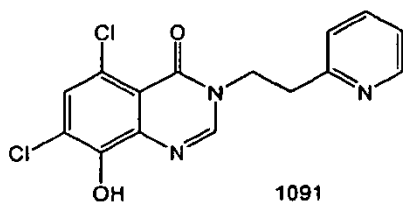
1087



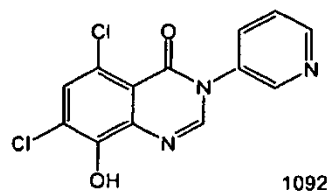
1088



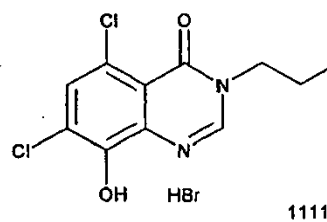
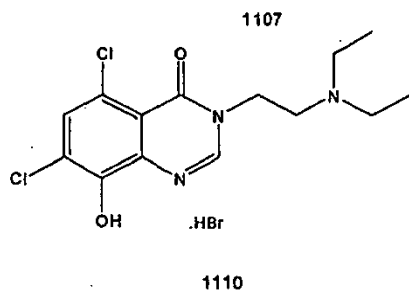
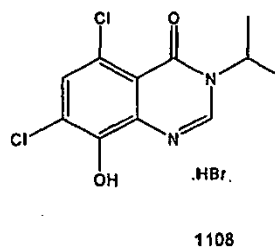
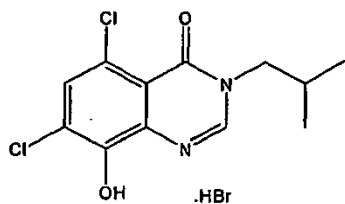
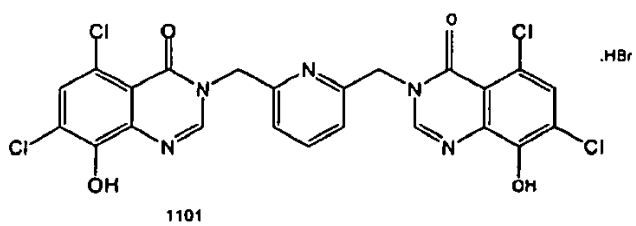
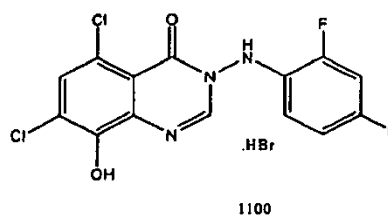
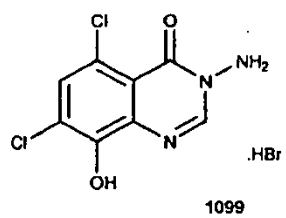
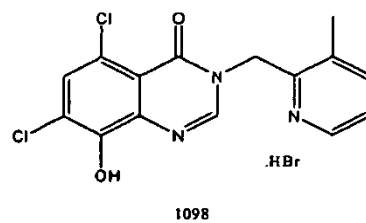
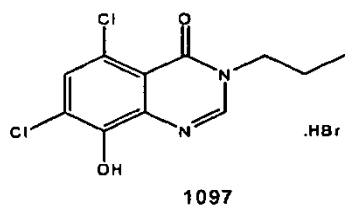
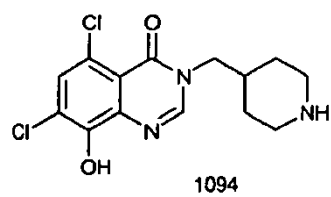
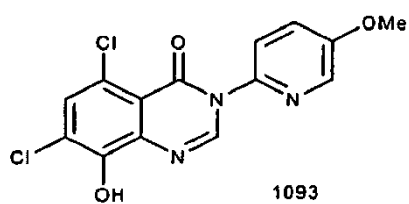
1089

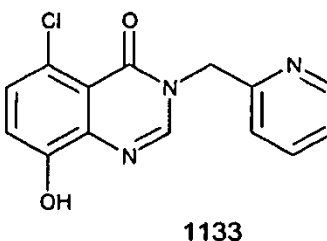
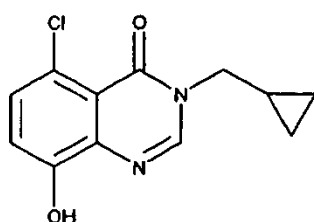
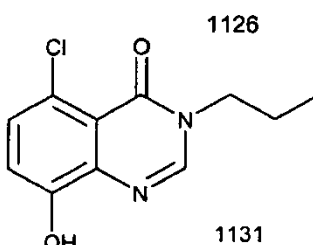
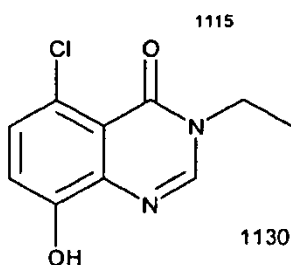
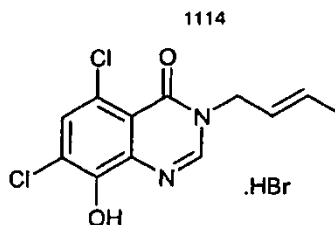
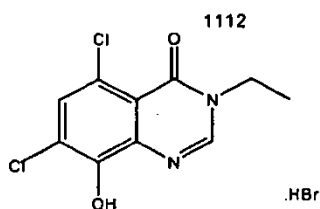
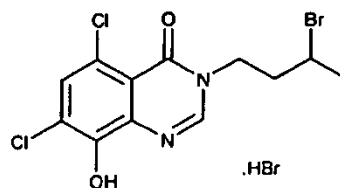
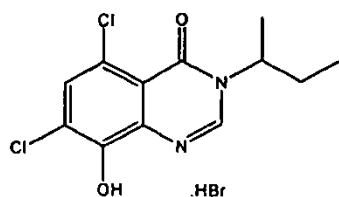


1091



1092

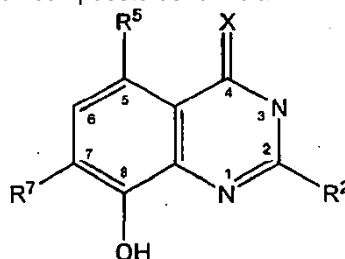




1132

En los ejemplos ilustrativos de los compuestos de fórmula IA, los compuestos 1076, 1077, 1082, 1083, 1084, 1085, 1087, 1088, 1089, 1091, 1092, 1093, 1097, 1098, 1099, 1100, 1101, 1107, 1108, 1109, 1110, 1112, 1115 y 1126 poseen sustituyentes planos en la posición 3, como, C₁₋₄ alquilo opcionalmente sustituido; C₂₋₄ alqueno opcionalmente sustituido; heterociclilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido que contiene N, saturado o insaturado, opcionalmente condensado con un arilo de 6 miembros opcionalmente sustituido, (CH₂)_nR⁶ en el cual n es 1 a 3 y R⁶ es C₃₋₆ cicloalquilo opcionalmente sustituido o un heterociclilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido que contiene N, saturado o insaturado; y NR⁸R⁹ en el cual R⁸ es H y R⁹ es H o C₁₋₄ alquilo opcionalmente sustituido o arilo de 6 miembros opcionalmente sustituido. De esos compuestos planos de fórmula IA, los compuestos 1100 y 1101 también poseen una muy buena desagregación.

Otro compuesto preferido de fórmula I es un compuesto de fórmula IB:

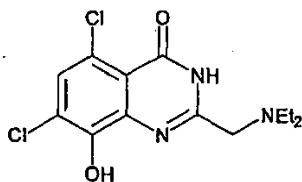


IB

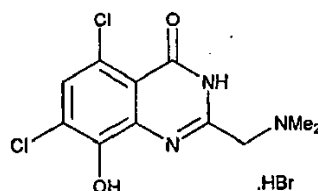
en el cual R², R⁵, R⁷ y X son los definidos en la fórmula I anterior.

Preferentemente R^2 es $CH_2NR^1R^4$ en el cual R^1 y R^4 se seleccionan independientemente entre H, C_{1-6} alquilo opcionalmente sustituido y C_{3-6} cicloalquilo opcionalmente sustituido.
Preferentemente R^5 y R^7 son ambos halo, más preferentemente cloro.

5 A continuación se muestran compuestos ilustrativos de fórmula IB.



.HBr

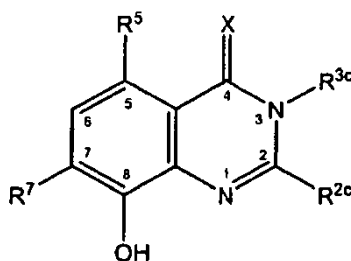
1128

.HBr

1147

Ambos ejemplos ilustrativos de fórmula IB poseen sustituyentes planos en la posición 2, como, $CH_2NR^1R^4$ en el cual R^1 y R^4 se seleccionan independientemente entre C_{1-6} alquilo opcionalmente sustituido. El compuesto 1128 también posee muy buena desagregación.

20 Otra subclase del compuesto de fórmula I es un compuesto de fórmula IC:

**IC**

en el cual

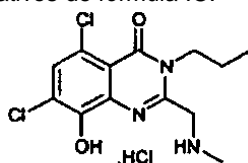
35 R^5 , R^7 y X son los definidos en la fórmula I anterior; y

R^{2c} es $CH_2NR^1R^4$ en el cual R^1 y R^4 se seleccionan independientemente entre H y C_{1-6} alquilo opcionalmente sustituido; y

40 R^{3c} es C_{1-4} alquilo opcionalmente sustituido.

Preferentemente R^5 y R^7 son ambos halo, más preferentemente cloro.

45 A continuación se muestran compuestos ilustrativos de fórmula IC.

**1095****1161**

El grupo 8-hidroxilo en los compuestos de fórmula I se puede bloquear para formar un profármaco, en particular un éster profármaco. El grupo 8-hidroxilo representa un sitio principal de metabolismo para el compuesto de fórmula I: la conjugación con ácido glucurónico o sulfato produce especies hidrófilas prontas para ser excretadas. Dichos conjugados probablemente no atraviesan la barrera hematoencefálica. El éster profármaco puede proteger el

compuesto de fórmula I de la conjugación. Las esterasas integrales de la barrera hematoencefálica pueden después liberar el C8-hidroxi en el pasaje a través de esa barrera activando el compuesto para su función en el SNC.

Sin desear regirnos por ninguna teoría, se cree que los sustituyentes R³ y R⁵ tienen generalmente un efecto limitado, electrónica o estéricamente, en las propiedades quelantes de los compuestos de la presente invención. Por consiguiente, se puede usar la sustitución para modular otros parámetros como la citotoxicidad y las propiedades físicoquímicas que incluyen el número de dadores y aceptores de enlaces de hidrógeno, la lipofilicidad (ClogP, ElogP y LogD), la solubilidad y la superficie polar. La modulación de esos parámetros contribuye a la optimización del perfil farmacocinético de los compuestos. También se postula que los sustituyentes R² y R⁷ además de modular la citotoxicidad y las propiedades físicoquímicas podrían también afectar la actividad si los sustituyentes proporcionan propiedades quelantes.

Los términos "C₁₋₆ alquilo" o "C₁₋₄ alquilo" utilizados solos o en frases como "C₁₋₄ alquilo opcionalmente sustituido" se refieren a grupos hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tienen de 1 a 6 y 1 a 4 átomos de carbono respectivamente. Son ejemplos ilustrativos de dichos grupos alquilo: metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, tert-butilo, pentilo, neopentilo o hexilo, preferentemente metilo, etilo o propilo.

Los términos "(CH₂)_n" o "(CH₂)_m" según se usan en este documento incluyen tanto cadenas lineales como ramificadas.

El término "C₂₋₆ alquínilo" utilizado solo o en frases como "C₂₋₆ alquínilo opcionalmente sustituido" se refiere a grupos hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tienen entre 2 y 6 átomos de carbono y además un triple enlace. Son ejemplos ilustrativos de dichos grupos: etinilo, 1-propinilo, 1- y 2-butinilo, 2-metil-2-propinilo, 2-pentinilo, 3-pentinilo, 4-pentinilo, 2-hexinilo, 3-hexinilo, 4-hexinilo y 5-hexinilo.

El término "C₃₋₆ cicloalquilo" utilizado solo o en frases como "C₃₋₆ cicloalquilo opcionalmente sustituido" se refiere a grupos carbocíclico saturados que tienen 3 a 6 átomos de carbono. Son ejemplos ilustrativos de dichos grupos: ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo, preferentemente ciclopropilo.

La expresión "grupo heterociclilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido que contiene N, saturado o insaturado, opcionalmente condensado con un arilo de 6 miembros opcionalmente sustituido" utilizada sola o en frases como "grupo heterociclilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido que contiene N, saturado o insaturado, opcionalmente condensado con un arilo de 6 miembros opcionalmente sustituido" se refiere a grupos heterocíclicos monocíclicos o policíclicos que contienen al menos un átomo de nitrógeno y opcionalmente otros heteroátomos seleccionados entre azufre y oxígeno.

Los grupos heterocíclicos adecuados incluyen grupos heterocíclicos que contienen N, como grupos heteromonocíclicos de 5 o 6 miembros insaturados que contienen de 1 a 4 átomos de nitrógeno, por ejemplo, pirrolilo, pirrolidinilo, imidazolilo, pirazolilo, piridilo, piridinilo, pirimidinilo, pirazinilo, piridazinilo, triazolilo o tetrazolilo; grupos heteromonocíclicos de 5 o 6 miembros saturados que contienen de 1 a 4 átomos de nitrógeno, como pirrolidinilo, imidazolidinilo, piperidino o piperazinilo; grupos heterocíclicos condensados insaturados que contienen de 1 a 5 átomos de nitrógeno, como indolilo, isoindolilo, indolizínilo, bencimidazolilo, quinolilo, isoquinolilo, indazolilo, benzotriazolilo o tetrazolopiridazinilo. grupos heteromonocíclicos de 5 o 6 miembros insaturados que contienen 1 a 2 átomos de oxígeno y 1 a 3 átomos de nitrógeno, como oxazolilo, isoxazolilo o oxadiazolilo; grupos heteromonocíclicos de 5 o 6 miembros saturados que contienen 1 a 2 átomos de oxígeno y 1 a 3 átomos de nitrógeno, como morfolinilo; grupos heteromonocíclicos de 5 o 6 miembros insaturados que contienen 1 a 2 átomos de azufre y 1 a 3 átomos de nitrógeno, como tiazolilo o tiadiazolilo; y grupos heteromonocíclicos de 3 a 6 miembros saturados que contienen 1 a 2 átomos de azufre y 1 a 3 átomos de nitrógeno, como tiazolidinilo;

Preferentemente el heterociclilo es un grupo heteromonocíclico de 5 o 6 miembros insaturado que contiene 1 a 3 átomos de nitrógeno, como pirazolilo, piridinilo o pirimidinilo; un grupo heteromonocíclico de 5 o 6 miembros saturado que contiene 1 a 4 átomos de nitrógeno, como pirrolidinilo o piperazinilo; un grupo heterocíclico condensado insaturado que contiene 1 a 5 átomos de nitrógeno, como bencimidazolilo; un grupo heteromonocíclico de 5 o 6 miembros saturado que contiene 1 a 2 átomos de oxígeno y 1 a 3 átomos de nitrógeno, como morfolinilo; o un grupo heteromonocíclicos de 5 o 6 miembros insaturado que contiene 1 a 2 átomos de azufre y 1 a 3 átomos de oxígeno, como tiazolilo.

La expresión "arilo de 6 miembros" utilizada sola o en frases como "arilo de 6 miembros opcionalmente sustituido" indica un grupo carbocíclico aromático de 6 miembros. Un ejemplo ilustrativo de dichos grupos arilo es fenilo. Preferentemente, el arilo es fenilo opcionalmente sustituido como 4-halofenilo, más preferentemente 4-fluorofenilo.

La expresión "heteroarilo de 6 miembros" utilizada sola o en frases como "heteroarilo de 6 miembros opcionalmente sustituido" indica un heterociclo aromático de 6 miembros que contiene uno o más heteroátomos. Los ejemplos

incluyen piridilo, pirazinilo, pirimidinilo y piridazinilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con metilo o metoxi.

El término "halo" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo, preferentemente flúor, yodo o cloro, más preferentemente cloro.

La expresión "opcionalmente sustituido" se refiere a un grupo que puede, o no, estar sustituido con uno o más grupos seleccionados entre C₁₋₄ alquilo, hidroxilo, halo, C₁₋₄ alcoxi o C₁₋₄ acilo.

La expresión "grupo protector" se refiere a una funcionalidad introducida que torna grupos funcionales particulares como hidroxilo, amino, carbonilo o carboxi en grupos no reactivos en las condiciones seleccionadas, y que luego puede ser opcionalmente eliminado para desenmascarar al grupo funcional. Un grupo protector de hidroxilo es aquel que puede tornar temporalmente no reactivo a un grupo hidroxilo. Un grupo protector de hidroxilo se refiere a un grupo hidroxilo que se ha tornado temporalmente no reactivo por un grupo protector de hidroxilo. Un grupo fenilo protegido es aquel en el cual los sustituyentes reactivos unidos, como OH, NH₂, están protegidos por un grupo protector. Los grupos protectores adecuados son conocidos en el área y se describen en Protective Groups in Organic Synthesis, tercera edición, T.W. Greene y P.G. White, John Wiley & Sons, Inc., 1999, así como métodos para su instalación y eliminación. Los ejemplos de grupos protectores que se pueden usar para proteger un grupo hidroxilo incluyen, pero no exclusivamente, grupos sililo (por ej. trimetilsililo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo), grupos bencilo (por ej. bencilo, metoxibencilo, nitrobencilo), grupos alquilo (por ej. metilo, etilo, n- e i-propilo, y n-, sec- y t-butilo) y grupos acilo (por ej. acetilo y benzoilo).

El grupo saliente puede ser de cualquier tipo conocido adecuado, como, por ejemplo, los grupos salientes dados a conocer en J. March, "Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure" 4ª edición, pp 352-357, John Wiley & Sons, Nueva York, 1992. Preferentemente, el grupo saliente es halógeno.

La expresión "quelante de metal" se usa en este documento en su sentido más amplio y se refiere a compuestos que tienen dos o más átomos dadores capaces de unirse a un átomo de metal preferentemente Cu, Zn o Fe donde al menos dos de los átomos dadores son capaces de unirse simultáneamente al átomo de metal y el complejo metálico resultante tiene una estabilidad termodinámica mayor o igual que la del complejo ion metálico:ligando biológico. El uso de quelantes de metales como tratamiento para trastornos neurológicos en la presente invención se distingue del concepto conocido previamente de "terapia de quelación". La "terapia de quelación" es un término asociado clínicamente a la eliminación de metales pesados como en la enfermedad de Wilson, la talasemia y la hemocromatosis. La falla en la homeostasis de los metales en estas enfermedades se puede describir como un evento catastrófico como un dique que se desborda produciendo una abrumadora inundación del metal problema. El mecanismo de acción de dichos compuestos es que el metal pesado es secuestrado por los quelantes y depurado por excreción. A modo de comparación la falla en la homeostasis de los metales asociada a las afecciones neurológicas de la presente invención es más parecida al constante goteo de un grifo que si se deja el tiempo suficiente causará con el tiempo un daño local durante un prolongado período de tiempo. La intención del "quelante de metales" de la presente invención es interrumpir una interacción metal-proteína anormal para lograr una sutil repartición de los metales y una posterior normalización de la distribución de los metales con el objetivo de que una vez superado el ciclo tóxico, los procesos endógenos de depuración puedan enfrentar más eficazmente la acumulación de la proteína amiloidógena.

Las sales del compuesto de fórmula I son preferentemente farmacéuticamente aceptables, pero se comprenderá que las sales que no son farmacéuticamente aceptables también están comprendidas por el alcance de la presente invención, puesto que son útiles como productos intermedios en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de cationes farmacéuticamente aceptables como sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, amonio y alquilamonio; sales de adición de ácido de ácidos inorgánicos farmacéuticamente aceptables como clorhídrico, ortofosfórico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, carbónico, bórico, sulfámico y bromhídrico; o sales de ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables como acético, propiónico, butírico, tartárico, maleico, hidroximaleico, fumárico, cítrico, láctico, mícico, glucónico, benzoico, succínico, oxálico, fenilacético, metanosulfónico, trihalometanosulfónico, toluenosulfónico, bencenosulfónico, salicílico, sulfanílico, aspártico, glutámico, edético, esteárico, palmítico, oleico, láurico, pantoténico, tánico, ascórbico y valérico.

Además, algunos de los compuestos de la presente invención pueden formar solvatos con agua o solventes orgánicos comunes. Dichos solvatos están comprendidos por el alcance de la presente invención.

El término "antioxidante" se usa en este documento en su sentido más amplio y se refiere a un grupo que tiene la capacidad de reaccionar con una especie reactiva de oxígeno con un radical hidroxilo de manera de generar un producto no tóxico. Los ejemplos incluyen fenoles como 3,4,5-trimetoxifenilo y 3,5-di-t-butil-4-hidroxifenilo, indolaminas como melatonina y flavonoides. Otros ejemplos se pueden encontrar en la bibliografía (Wright, 2001; Karbownik, 2001; Gilgun-Sherki, 2001).

El término "tautómero" se usa en este documento en su sentido más amplio para incluir compuestos de fórmula I que son capaces de existir en un estado de equilibrio entre dos formas isómeras. Dichos compuestos pueden diferir en el enlace que conecta dos átomos o grupos y la posición de esos átomos o grupos en el compuesto.

- 5 El término "isómero" se usa en este documento en su sentido más amplio e incluye isómeros estructurales, geométricos y estereoisómeros. Dado que el compuesto de fórmula I puede tener una o más centros quirales, es capaz de existir en formas enantioméricas.

10 Las composiciones de la presente invención contienen al menos un compuesto de fórmula I junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables y opcionalmente otros agentes terapéuticos. Cada portador, diluyente, adyuvante o excipiente debe ser farmacéuticamente "aceptable" en el sentido de que debe ser compatible con los otros ingredientes de la composición y no debe ser perjudicial para el sujeto. Las composiciones incluyen las adecuadas para administración oral, rectal, nasal, tópica (incluidas bucal y sublingual), vaginal o parenteral (como subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). Las composiciones se pueden presentar de manera
15 conveniente en formas farmacéuticas unitarias y se pueden preparar por cualquiera de los métodos conocidos en el área farmacéutica. Dichos métodos incluyen el paso de asociar el principio activo con el portador constituido por uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el principio activo con portadores líquidos, diluyentes, adyuvantes o excipientes, o portadores sólidos finamente divididos, o ambos, y luego si fuera necesario dando forma al producto.

20 La expresión "afección neurológica" se usa en este documento en su sentido más amplio y se refiere a afecciones en las cuales diversos tipos de células del sistema nervioso están degeneradas y/o han sido dañadas como resultado de lesiones o exposiciones o trastornos neurodegenerativos. En particular, el compuesto de fórmula I se puede usar para el tratamiento de afecciones resultantes, en las cuales el daño a las células del sistema nervioso se produjo debido a intervenciones quirúrgicas, infecciones, exposición a agentes tóxicos, tumores, déficits
25 nutricionales o trastornos metabólicos. Además, el compuesto de fórmula I se puede usar para el tratamiento de secuelas de trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple, la esclerosis lateral amiotrófica, la epilepsia, la toxicomanía o drogadicción (alcohol, cocaína, heroína, anfetamina o análogos), los trastornos o las lesiones de la médula ósea, la distrofia o degeneración de la retina neural (retinopatías) y las neuropatías periféricas, como neuropatía diabética o las neuropatías periféricas inducidas por toxinas.

La expresión "trastorno neurodegenerativo" según se usa en este documento se refiere a una anomalía en la que la integridad neuronal está amenazada. La integridad neuronal puede estar amenazada cuando las células neuronales
35 tienen menor supervivencia o cuando las neuronas ya no pueden propagar una señal.

Los trastornos neurológicos que pueden ser tratados con el compuesto de la presente invención incluyen porfiria intermitente aguda; cardiomiopatía inducida por adriamicina; demencia por sida y neurotoxicidad inducida por VIH-1; enfermedad de Alzheimer; esclerosis lateral amiotrófica; aterosclerosis; cataratas; isquemia cerebral; parálisis cerebral; tumor cerebral; daño orgánico inducido por quimioterapia; nefrotoxicidad inducida por cisplatino; cirugía de derivación aortocoronaria; enfermedad de Creutzfeldt-Jacob y su nueva variante asociada a la enfermedad de la "vaca loca"; neuropatía diabética; síndrome de Down; ahogamiento; epilepsia y epilepsia postraumática; ataxia de Friedrich; demencia frontotemporal; glaucoma; glomerulopatía; hemocromatosis; hemodíalisis; hemólisis; síndrome urémico hemolítico (enfermedad de Weil); accidente cerebrovascular hemorrágico; enfermedad de Hallerboden-Spatz; ataque cardíaco y lesión por reperfusión; enfermedad de Huntington; enfermedad por cuerpos de Lewy; claudicación intermitente; accidente cerebrovascular isquémico; enfermedad inflamatoria intestinal; degeneración macular; malaria; toxicidad inducida por metanol; meningitis (aséptica y tuberculosa); enfermedad de la neurona motora; esclerosis múltiple; atrofia multisistémica; isquemia miocárdica; neoplasia; enfermedad de Parkinson; asfixia perinatal; enfermedad de Pick; parálisis supranuclear progresiva; daño orgánico inducido por radioterapia; reestenosis posterior a angioplastia; retinopatía; demencia senil; esquizofrenia; septicemia; choque séptico; encefalopatías espongiiformes; hemorragia subaracnoidea/vasoespasma cerebral; hematoma subdural; traumatismo quirúrgico, incluida neurocirugía; talasemia; ataque isquémico transitorio (AIT); lesión cerebral traumática (LCT); lesión de médula ósea traumática; trasplante; demencia vascular; meningitis viral; y encefalitis viral.

55 Además, el compuesto de la presente invención también se puede usar para potenciar los efectos de otros tratamientos, por ejemplo para potenciar los efectos neuroprotectores del factor de crecimiento nervioso derivado del cerebro.

La invención apunta especialmente a afecciones que inducen daño oxidativo del sistema nervioso central, que incluyen los trastornos neurológicos agudos y crónicos como lesión cerebral traumática, lesión de la médula ósea, isquemia cerebral, accidente cerebrovascular (isquémico y hemorrágico), hemorragia subaracnoidea/vasoespasma cerebral, tumor cerebral, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob y su nueva variante asociada a la enfermedad de la "vaca loca", enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, ataxia de Friedrich, cataratas, demencia con formación de cuerpos de Lewy, atrofia multisistémica, enfermedad de Hallerboden-Spatz, enfermedad difusa por cuerpos de Lewy, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de la neurona motora, esclerosis
65

múltiple, insomnio familiar fatal, enfermedad de Gertsman Straussler Sheinker hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo Dutch.

Más particularmente, la invención apunta al tratamiento de la amiloidosis neurodegenerativa. Amiloidosis neurodegenerativa puede ser cualquier afección en la cual se produce daño neurológico como resultado de la formación de depósitos de amiloide. El amiloide puede ser formado por diferentes proteínas o polipéptidos precursores, incluidos, pero no exclusivamente, A β , sinucleína, huntingtina o proteína priónica.

Por lo tanto, la afección se selecciona preferentemente del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer esporádica o familiar, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de la neurona motora, cataratas, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob y su nueva variante asociada a la enfermedad de la "vaca loca", enfermedad de Huntington, demencia con formación de cuerpos de Lewy, atrofia multisistémica, enfermedad de Hallerboden-Spatz y enfermedad difusa por cuerpos de Lewy.

Más preferentemente la amiloidosis neurodegenerativa es una afección relacionada con A β , como la enfermedad de Alzheimer o la demencia asociada al síndrome de Down o una de las varias formas autosómicas dominantes de la enfermedad de Alzheimer familiar (revisado en St George-Hyslop, 2000). Muy preferentemente la afección relacionada con A β es la enfermedad de Alzheimer.

En una realización particularmente preferida de todos los aspectos de la invención, antes del tratamiento el sujeto tiene una función cognitiva moderada o gravemente deteriorada, evaluada según la escala de evaluación de la enfermedad de Alzheimer-prueba cognitiva (ADAS-cog), por ejemplo, un valor de ADAS-cog de 25 o mayor.

Además de frenar o detener el deterioro cognitivo de un sujeto, el compuesto y los métodos de la invención también pueden ser adecuados para usar en el tratamiento o la prevención de enfermedades neurodegenerativas, o pueden ser adecuados para usar en el alivio de los síntomas de las enfermedades neurodegenerativas. El compuesto puede ser capaz de proporcionar al menos una reversión parcial del deterioro cognitivo experimentado por los pacientes. Si se administra a un sujeto que se ha identificado que tiene un mayor riesgo de predisposición a enfermedades neurodegenerativas, o a un sujeto que presenta manifestaciones preclínicas de deterioro cognitivo, tales como el deterioro cognitivo leve o mínimo, o el deterioro cognitivo progresivo, estos métodos y compuestos pueden ser capaces de prevenir o retrasar la aparición de síntomas clínicos, además del efecto de frenar o reducir la velocidad del deterioro cognitivo.

Actualmente la enfermedad de Alzheimer y otras demencias generalmente no se diagnostican hasta que aparecen uno o más síntomas de advertencia. Estos síntomas constituyen un síndrome conocido como deterioro cognitivo leve (DCL), que recientemente fue definido por la Academia Americana de Neurología y se refiere al estado clínico de los individuos que tienen deterioro de la memoria, pero que por otra parte funcionan bien, y que no cumplen con los criterios clínicos de demencia (Petersen et al., 2001). Los síntomas del DCL incluyen:

- (1) Pérdida de memoria que afecta el rendimiento laboral
- (2) Dificultad para realizar tareas que le son familiares
- (3) Problemas para encontrar las palabras correctas
- (4) Desorientación en tiempo y espacio (perderse)
- (5) Pobreza o declinación del juicio
- (6) Problemas con el pensamiento abstracto
- (7) Extravío de objetos en forma reiterada
- (8) Cambios de humor o comportamiento
- (9) Cambios en la personalidad
- (10) Pérdida de iniciativa

El DCL se puede detectar mediante exámenes cognitivos convencionales, como el Mini Examen del Estado Mental y Detección del Deterioro de Memoria, y la detección con baterías neuropsicológicas.

El término "sujeto" según se utiliza en este documento se refiere a cualquier animal que tenga una enfermedad o afección que requiera tratamiento con un principio farmacéuticamente activo. El sujeto puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano, o puede ser un animal doméstico o de compañía. Si bien se prevé particularmente que el compuesto de la invención es adecuado para usar en el tratamiento médico de los seres humanos, también es aplicable al tratamiento veterinario, que incluye el tratamiento de animales de compañía como perros y gatos y animales domésticos como caballos, ponis, burros, mulas, llamas, alpacas, cerdos, ganado y ovejas, o animales de zoológico como primates, felinos, cánidos, bóvidos y ungulados.

Los mamíferos adecuados incluyen los miembros de la orden Primates, Rodentia, Lagomorpha, Cetacea, Carnivora, Perissodactyla y Artiodactyla. Los miembros de la orden Perissodactyla y Artiodactyla se prefieren particularmente debido a su biología similar y a su importancia económica.

Por ejemplo, Artiodactyla comprende aproximadamente 150 especies distribuidas en nueve familias: cerdos (Suidae), pecaríes (Tayassuidae), hipopótamos (Hippopotamidae), camellos (Camelidae), cervatillos (Tragulidae), jirafas y okapi (Giraffidae), ciervos (Cervidae), berrendos (Antilocapridae) y ganado, ovejas, cabras y antílopes (bóvidos). Muchos de esos animales se utilizan como animales de cría en varios países. Más importante aún, muchos de los animales económicamente importantes tales como cabras, ovejas, vacas y cerdos tienen una biología muy similar y comparten un alto grado de homología genómica.

La orden Perissodactyla comprende caballos y burros, que son ambos económicamente importantes y están estrechamente relacionados. De hecho, es bien sabido que los caballos y los burros se cruzan.

Según se usa en este documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un compuesto de la presente invención eficaz para producir una respuesta terapéutica deseada, por ejemplo, tratar, mejorar o prevenir una afección neurológica.

La "cantidad terapéuticamente eficaz" específica variará, evidentemente, con varios factores como la afección particular en tratamiento, la condición física del sujeto, el tipo de sujeto en tratamiento, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si la hubiera), y las formulaciones específicas empleadas y la estructura del compuesto.

El compuesto de la presente invención se puede combinar además con otros medicamentos para proporcionar una combinación operativa. Se pretende incluir cualquier combinación químicamente compatible de principios farmacéuticamente activos, en tanto la combinación no elimine la actividad del compuesto de fórmula I o II. Se comprenderá que el compuesto de la invención y el otro medicamento se pueden administrar por separado, consecutivamente o simultáneamente.

Otros medicamentos pueden incluir, por ejemplo, cuando la afección es una afección relacionada con β -amiloide, particularmente la enfermedad de Alzheimer, un inhibidor del sitio activo de la acetilcolinesterasa, por ejemplo fenserina, galantamina o tacrina; un antioxidante como vitamina E o vitamina C; un antiinflamatorio como flurbiprofeno o ibuprofeno opcionalmente modificado para liberar óxido nítrico (por ejemplo NCX-2216, producido por NicOx) o un estrógeno como 17- β -estradiol.

Los métodos y los portadores farmacéuticos para la preparación de composiciones farmacéuticas son bien conocidos en el área, como se indica en libros de texto como Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª edición, Williams & Wilkins, Pennsylvania, Estados Unidos.

Según se usa en este documento, un "portador farmacéutico" es un solvente un suspendente o un vehículo farmacéuticamente aceptable para administrar el compuesto de fórmula I o II al sujeto. El portador puede ser líquido o sólido y se selecciona con la manera planificada de administración en mente. Cada portador debe ser farmacéuticamente "aceptable" en el sentido de que debe ser compatible con los otros ingredientes de la composición y no debe ser perjudicial para el sujeto.

El compuesto de fórmula I se puede administrar por vía oral, tópica o parenteral en formulaciones en unidades de dosificación que contienen portadores, adyuvantes y vehículos no tóxicos convencionales farmacéuticamente aceptables. El término parenteral según se usa en este documento incluye inyecciones subcutáneas, aerosol para administración a los pulmones o la cavidad nasal, técnicas de inyección o infusión intravenosas, intramusculares, intratecales e intracraneales. La presente invención también proporciona formulaciones farmacéuticas tópicas, orales y parenterales adecuadas para utilizar en los métodos nuevos de tratamiento de la presente invención. Los compuestos de la presente invención se pueden administrar oralmente como comprimidos, suspensiones acuosas u oleosas, pastillas, trociscos, polvos, gránulos, emulsiones, cápsulas, jarabes o elixires. La composición para uso oral puede contener uno o más agentes seleccionados del grupo de los edulcorantes, saborizantes, colorantes y conservantes para producir preparaciones farmacéuticamente elegantes y agradables al paladar. Los edulcorantes adecuados incluyen sacarosa, lactosa, glucosa, aspartamo o sacarina. Los desintegrantes adecuados incluyen almidón de maíz, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, goma xantano, bentonita, ácido algínico o agar. Los saborizantes adecuados incluyen esencia de menta piperita, esencia de wintergreen, saborizantes de cereza, naranja o frambuesa. Los conservantes adecuados incluyen benzoato de sodio, vitamina E, alfatocoferol, ácido ascórbico, metilparabeno, propilparabeno o bisulfito de sodio. Los lubricantes adecuados incluyen estearato de magnesio, ácido esteárico, oleato de sodio, cloruro de sodio o talco. Los retardantes adecuados incluyen monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. Los comprimidos contienen el principio activo mezclado con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables que son adecuados para la fabricación de los mismos.

Estos excipientes pueden ser por ejemplo, (1) diluyentes inertes, como carbonato de calcio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; (2) granulantes y desintegrantes, como almidón de maíz o ácido algínico; (3) aglutinantes, como almidón, gelatina o acacia, y (4) lubricantes, como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden no recubrirse o recubrirse usando las técnicas conocidas para retardar la desintegración y absorción en el tubo digestivo y proporcionar así una acción sostenida durante un período de tiempo más prolongado. Por ejemplo, se puede emplear un material retardador como monoesterato de glicerilo o diesterato de glicerilo. El recubrimiento

también se puede realizar usando las técnicas descritas en las patentes de los Estados Unidos N° 4,256,108; 4,160,452; y 4,265,874 para preparar comprimidos terapéuticos osmóticos de liberación controlada.

El compuesto de fórmula I así como el principio farmacéuticamente activo útil en el método de la invención se pueden administrar, para aplicación in vivo, por vía parenteral mediante inyección o por perfusión gradual en el tiempo, independientemente o conjuntamente. La administración puede ser por vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intracavidad, transdérmica o por infusión mediante, por ejemplo, bomba osmótica. Para los estudios in vitro los agentes se pueden agregar o disolver en una solución amortiguadora biológicamente aceptable adecuada y agregar a una célula o un tejido.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones, acuosas o no acuosas, estériles. Los ejemplos de solventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas o acuosas, como solución salina y medios amortiguados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, solución de Ringer con dextrosa, dextrosa y cloruro de sodio, solución de Ringer lactada, los vehículos intravenosos incluyen reponedores de líquidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (como los basados en la solución de Ringer con dextrosa), y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos como, por ejemplo, antibióticos, antioxidantes, quelantes, factores de crecimiento, gases inertes y similares.

En general, los términos "tratar", "tratamiento" y análogos, se usan en este documento con el significado de afectar a un sujeto, tejido o célula para obtener un efecto farmacológico o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir parcial o completamente una enfermedad, o un signo o síntoma de ésta, y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o total de una enfermedad. "Tratar" según se usa en este documento cubre cualquier tratamiento o prevención de una enfermedad en un vertebrado, un mamífero, particularmente un humano e incluye: (a) prevenir la aparición de la enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a dicha enfermedad, pero que aún no se le ha diagnosticado; (b) inhibir la enfermedad, es decir detener su evolución; o (c) aliviar o mejorar los efectos de la enfermedad, es decir, causar la regresión de los efectos de la enfermedad.

La invención incluye diversas composiciones farmacéuticas útiles para mejorar la enfermedad. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con una realización de la invención se preparan llevando el compuesto de fórmula I, sus hidratos, solvatos, tautómeros, estereoisómeros, isómeros geométricos o sales, o combinaciones del compuesto de fórmula I y uno o más principios farmacéuticamente activos, a una forma adecuada para la administración a un sujeto utilizando portadores, excipientes y aditivos o auxiliares. Los portadores o auxiliares utilizados frecuentemente incluyen carbonato de magnesio, dióxido de titanio, lactosa, manitol y otros azúcares, talco, proteínas lácteas, gelatina, almidón, vitaminas, celulosa y sus derivados, aceites animales y vegetales, polietilenglicoles y solventes como agua estéril, alcoholes, glicerol y alcoholes polihídricos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de líquidos y nutrientes. Los conservantes incluyen antibióticos, antioxidantes, quelantes y gases inertes. Otros portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas, excipientes no tóxicos, que incluyen sales, conservantes, soluciones amortiguadoras y similares, como se describe, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª ed. Williams y Wilkins (2000) y The British National Formulary 43ª ed. (British Medical Association and Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, 2002; <http://bnf.rhn.net>). El pH y la concentración exacta de los diversos componentes de la composición farmacéutica se ajustan según la práctica de rutina en el área. Véase Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis for Therapeutics (7ª ed., 1985).

Las composiciones farmacéuticas se preparan y se administran preferentemente en forma farmacéuticas. Las formas farmacéuticas sólidas pueden ser comprimidos, cápsulas y supositorios. Para el tratamiento de un sujeto, dependiendo de la actividad del compuesto, la manera de administración, la naturaleza y gravedad del trastorno, la edad y el peso corporal del sujeto, se pueden usar dosis diarias diferentes. Bajo ciertas circunstancias, no obstante, pueden ser adecuadas dosis diarias mayores o menores. La administración de la dosis diaria se puede llevar a cabo mediante una sola administración de una forma farmacéutica individual o mediante la administración de varias formas farmacéuticas más pequeñas y también mediante administración múltiple de dosis subdivididas a intervalos específicos.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden administrar local o sistémicamente en una dosis terapéuticamente eficaz. Las cantidades eficaces para este uso dependerán, por supuesto, de la gravedad de la enfermedad y del peso y el estado general del sujeto. Habitualmente, las dosis utilizadas in vitro pueden proporcionar una guía útil acerca de las cantidades útiles para la administración in situ de la composición farmacéutica, y se pueden usar modelos animales para determinar dosis eficaces para el tratamiento de los efectos secundarios citotóxicos. Diversas consideraciones se describen, por ejemplo, en Langer, Science, 249: 1527, (1990). Las formulaciones para uso oral pueden estar en forma de cápsulas de gelatina dura en las que el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín. También pueden estar en forma de cápsulas de gelatina blanda en las que el principio activo se mezcla con agua o un medio oleoso, como aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Las suspensiones acuosas contienen normalmente los principios activos mezclados con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes pueden ser (1) suspendentes como carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma acacia; (2) dispersantes o humectantes que pueden ser (a) fosfátidos de origen natural como lecitina; (b) un producto de condensación de un óxido de alquileo con un ácido graso, por ejemplo, estearato de polioxietileno; (c) un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga, por ejemplo, heptadecaetilenoxietanol; (d) un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y hexitol como monooleato de polioxietileno sorbitol, o (e) un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de polioxietileno sorbitán.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una suspensión, acuosa u oleaginosa, inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular según métodos conocidos utilizando aquellos dispersantes o humectantes y suspendentes adecuados que han sido mencionados precedentemente. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o solvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que se pueden emplear se encuentran el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos estériles, como solvente o medio de suspensión. Con este fin, se puede utilizar cualquier aceite fijo suave incluidos los mono o diglicéridos sintéticos. Además, en la preparación de inyectables se pueden usar ácidos grasos como el ácido oleico.

Los compuestos de fórmula I también se pueden administrar tópicamente en forma de sistemas de administración de liposomas, como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Los liposomas se pueden formar a partir de diversos fosfolípidos, como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

Los compuestos de fórmula I también se pueden presentar para su uso en forma de composiciones veterinarias, que se pueden preparar, por ejemplo, por los métodos convencionales en esa área. Los ejemplos de dichas composiciones veterinarias incluyen las adaptadas para:

- (a) administración oral, aplicación externa, por ejemplo pócimas (por ej. soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas); comprimidos o bolos; polvos, gránulos o pellets para mezclar con raciones; pastas para aplicación a la lengua;
- (b) administración parenteral por ejemplo mediante inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa, por ej. como una solución o suspensión estéril; o (cuando corresponda) por inyección intramamaria donde una suspensión o solución es introducida en la ubre a través del pezón;
- (c) aplicaciones tópicas, por ej. como una crema, pomada o aerosol aplicado a la piel; o
- (d) intravaginalmente, por ej. como un pesario, crema o espuma.

Los niveles de dosificación del compuesto de fórmula I de la presente invención están en el orden entre aproximadamente 0.5 mg y aproximadamente 20 mg por kilogramo de peso corporal, con un rango de dosis preferido entre aproximadamente 0.5 mg y aproximadamente 10 mg por kilogramo de peso corporal por día (entre aproximadamente 0.5 g y aproximadamente 3 g por paciente por día). La cantidad de principio activo que se puede combinar con los materiales portadores para producir una sola dosis variará dependiendo del huésped tratado y del modo particular de administración. Por ejemplo, una formulación destinada a la administración oral a humanos puede contener entre aproximadamente 5 mg y 1 g de un principio activo con una cantidad adecuada y conveniente de material portador que puede variar entre aproximadamente 5 y 95 por ciento del total de la composición. Las formas de dosificación contendrán generalmente entre aproximadamente 5 mg y 500 mg de principio activo.

Opcionalmente, los compuestos de la invención se administran según un cronograma de dosis dividida, de modo que haya al menos dos administraciones en total en el cronograma. Las administraciones se hacen preferentemente al menos cada dos horas y hasta cada cuatro horas o más; por ejemplo el compuesto se puede administrar cada una hora o cada media hora. En una realización preferida, el régimen de dosis dividida comprende una segunda administración del compuesto de la invención luego de un intervalo entre la primera administración y suficientemente prolongado para que el nivel del principio activo en la sangre haya disminuido hasta aproximadamente 5 a 30% del nivel plasmático máximo alcanzado luego de la primera administración, de modo de mantener un contenido eficaz de principio activo en la sangre. Opcionalmente se pueden hacer una o más administraciones consecutivas a un intervalo correspondiente entre cada administración precedente, preferentemente cuando el nivel plasmático haya disminuido hasta aproximadamente 10 a 50% del máximo inmediatamente precedente.

Sin embargo, se comprenderá que el nivel de dosificación específico para cualquier paciente en particular, dependerá de varios factores como la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el género, la dieta, la hora de administración, la vía de administración y la velocidad de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad particular que se está tratando.

Ejemplos

La invención se describirá ahora en detalle por referencia sólo a los ejemplos no limitantes siguientes.

- 5 Para mayor claridad, los compuestos de esta invención se mencionan por número, por ejemplo 1-4 y 2-3. Las estructuras de los compuestos de ejemplo indicados de esa manera se muestran en las tablas 1-10.

En los ejemplos 1 a 6, se citan las referencias siguientes:

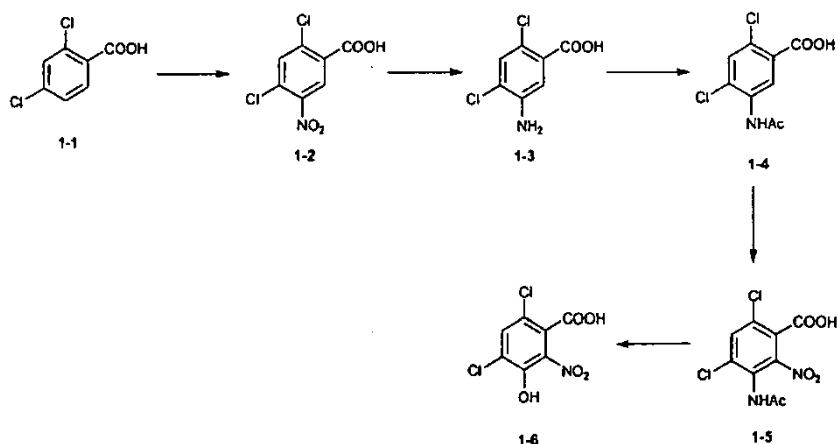
- 10 1. Dondoni, A. et al, Synthesis, 1996, 641 and 1987, 998.
 2. Goldstein, H. and Schaaf, E., Helv. Chim. Acta, 1957, 57(23), 132.
 3. March, J. in "Advanced Organic Chemistry, reactions, mechanisms and structure", 3rd edition, John Wiley & Sons, 1985, pg. 601, and references cited therein; for more specific reaction conditions, see for example: Giencke, A. and Lackner, H. Liebigs Ann. Chem., 1990, 569; Brown, L. L. et al, J. Med. Chem., 2002, 45, 2841;
 15 Koch, V. and Schnatterer, S. Synthesis, 1990, 499;
 4. Linderberg, M. et al, Eur. J. Med. Chem., 1999, 34, 729.
 5. T. W. Greene and P. G. M. Wuts (Eds) in "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, U.S.A.(1999).
 6. Follope, M. P. et al, Eur. J. Med. Chem., 1992, 27, 291; Giencke, A. et al, Liebigs Ann. Chem., 1990, 569.
 20 7. Bavetsias, V. et al, J. Med. Chem., 2002, 45, 3692.

Detalles experimentales generales

25 El ácido 2,4-diclorobenzoico (1-1) y el 2,4-dicloro-6-nitrofenol (2-1B) se compraron a Aldrich. Todos los reactivos/reactantes, a menos que se indique lo contrario, provinieron de Aldrich. El 4-amino-1,3,5-trimetilpirazol, la 2-amino-4,6-dihidroxipirimidina, el clorhidrato de 4-clorometil-3,5-dimetilisoxazol y de 2-clorometil-4-metiltiazol se compraron a Lancaster. El (2-aminometil)tiazol se preparó de acuerdo con la bibliografía.¹ Los solventes fueron de calidad analítica y se usaron como se recibieron. El THF se destiló de sodio y benzofenona en atmósfera de argón. Los espectros ¹H NMR (δ, con respecto a TMS) se registraron en un espectrómetro Varian Inova 400 a menos que se indique lo contrario; los valores J se informan en Hertz. Los datos espectrales de masas se registraron en un espectrómetro de masas Micromass Quattro II.

35 Una síntesis práctica y concisa del ácido 4,6-dicloro-3-hidroxi-2-nitrobenzoico (1-6), un producto intermedio clave utilizado para la preparación de una serie de 8-hidroxi-3H-quinazolin-4-onas y, específicamente, para la síntesis de derivados 5,7-dicloro sustituidos, se muestra en el esquema 1A. Por consiguiente, según Goldstein y Schaaf,²

Esquema 1A



55 se nitró ácido 2,4-diclorobenzoico (1-1) para dar ácido 2,4-dicloro-5-nitrobenzoico (1-2). El compuesto 1-2 se convierte, a través de la amina 1-3 y la acetamida 1-4, en ácido 3-acetamido-4,6-dicloro-2-nitrobenzoico (1-5). La hidrólisis básica subsiguiente de 1-5 da, luego del tratamiento con ácido, el ácido 2-nitrobenzoico 1-6. Todo los pasos tuvieron altos rendimientos (aproximadamente 90%) y se pueden llevar a escala. El compuesto 1-6 también se puede producir según la ruta que se muestra en el esquema 1B. Por lo tanto, la diazotación de 1-3 a través de las condiciones estándar o de rutina³ da el alcohol 1-7. El compuesto 1-7 se nitró después según las condiciones descritas previamente en la bibliografía⁴ para dar 1-6. Las rutas de síntesis que se muestran en ambos esquemas 1A y 1B para la preparación de 1-6 representan mejoras al método de la bibliografía⁴, y todo los pasos que se muestran tuvieron buenos rendimientos. La reducción de 1-6 con hierro en polvo en HOAc a 80 °C durante 45 - 50 minutos da, después del tratamiento estándar, la amina 1-8 correspondiente, en un 94% de rendimiento. Cabe

10

20



10

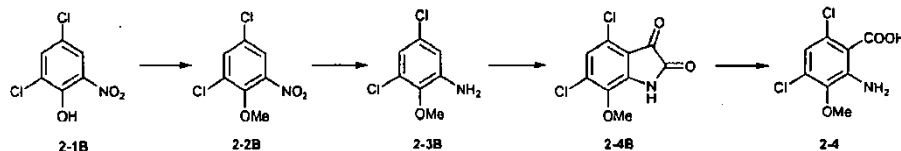


55

65

de hidroxilamina seguido de hidrólisis ácida da el producto intermedio isatina 2-4B. El tratamiento subsiguiente de 2-4B con peróxido de hidrógeno en condiciones básicas da el ácido antranílico 2-4.

Esquema 2B



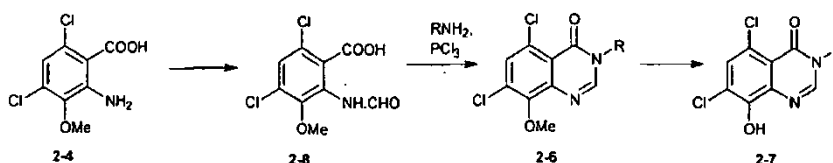
El tratamiento de 2-4 con formamida a una temperatura elevada, generalmente a 150 °C, da la 3H-quinazolin-4-ona 2-5. Después el compuesto 2-5 se hace reaccionar con el haluro de alquilo adecuado en presencia de una base, por ejemplo carbonato de potasio, para dar 2-6. Los ejemplos de haluros de alquilo que se pueden emplear en el proceso C incluyen, pero no exclusivamente, 2-(clorometil)piridina, (clorometil)ciclopropano, 1-(2-cloroetil)pirrolidina, 2-(2-cloroetil)-1-metilpirrolidina, 4-(2-cloroetil)morfolina, clorhidrato de 2-clorometil-4-metiltiazol, 2,6-bis(clorometil)piridina, 2-bromopropano, 1-cloropropano, 1-cloro-2-metilpropano, 2-cloroetil éter, clorhidrato de cloruro de (2-dietilamino)etilo, 1-clorobutano, 2-clorobutano, cloruro de crotilo y 4-clorometil-3,5-dimetilisoxazol. Los resultados están dispuestos en tablas (Tabla 1). La eliminación subsiguiente del grupo protector de 2-6, usando adecuadamente BBr₃ o con HBr acuoso a temperatura elevada, proporciona la correspondiente 3-N-(sustituida)-8-hidroxi-3H-quinazolin-4-ona 2-7. En el caso del derivado etil éter 2-6M, se obtuvo la sal de bromhidrato del alcohol 2-7M1 (Tabla 2). El tratamiento del alqueno 2-6P con HBr acuoso produjo la hidrobromación del doble enlace alquénico con la eliminación concomitante del grupo protector metoxi para dar el compuesto 2-7P1.

En los procesos B y C (Esquema 2A), el ácido antranílico 1-8 se puede tratar con anhídrido acético fórmico para dar el compuesto formilamino 2-8 o la benzo[d][1,3]oxazin-4-ona 2-9. Después el compuesto 2-8 (o 2-9) se hace reaccionar con una amina adecuada en presencia de un agente de condensación como tricloruro de fósforo u ortoformiato de trietilo a temperatura elevada, habitualmente utilizando tolueno o xileno a una temperatura próxima a la temperatura de reflujo, para producir las 8-hidroxi-3H-quinazolin-4-onas 2-7. Los ejemplos de aminas que se pueden emplear en los procesos B y C incluyen, pero no exclusivamente, 2-amino-5-metiltiazol, 2-(2-aminoetil)piridina, 3-aminopiridina, 4-aminomorfolina, 1-amino-4-metilpiperazina, 1-aminopirrolidina, 4-(aminometil)piperidina, 1-aminopiperazina, 5-amino-1-etilpirazol, 5-amino-2-metoxipiridina, 4-amino-1,3,5-trimetilpirazol, 2-amino-1-metilbenzamida, 2-amino-5-metilpiridina, 2-amino-5-cloropiridina y 4-aminopiperidina. Los resultados están dispuestos en tablas (Tabla 3). Otras 8-hidroxi-3H-quinazolin-4-onas que se pueden preparar según estos procesos se muestran en la tabla 4.

En el proceso D (Esquema 2A), el ácido 2-nitrobenzoico 1-6 se puede tratar primero con una amina adecuada en presencia de un activador como CDI para producir la N-(sustituida)benzamida 2-10 adecuada. La reducción subsiguiente del grupo nitro y el acoplamiento de la amina resultante 2-11, generalmente con ácido fórmico en presencia de un agente de condensación como CDI u ortoformiato de trietilo o con formamida, proporciona el derivado 3-N-sustituido 2-7 correspondiente.

Los procesos B y C (Esquema 2A) se pueden repetir utilizando un ácido antranílico O-prottegido adecuado como 2-4 (Esquema 3). En esos casos, las 8-hidroxi-3H-quinazolin-4-onas 2-7 se obtienen luego de la eliminación del grupo protector de O.

Esquema 3

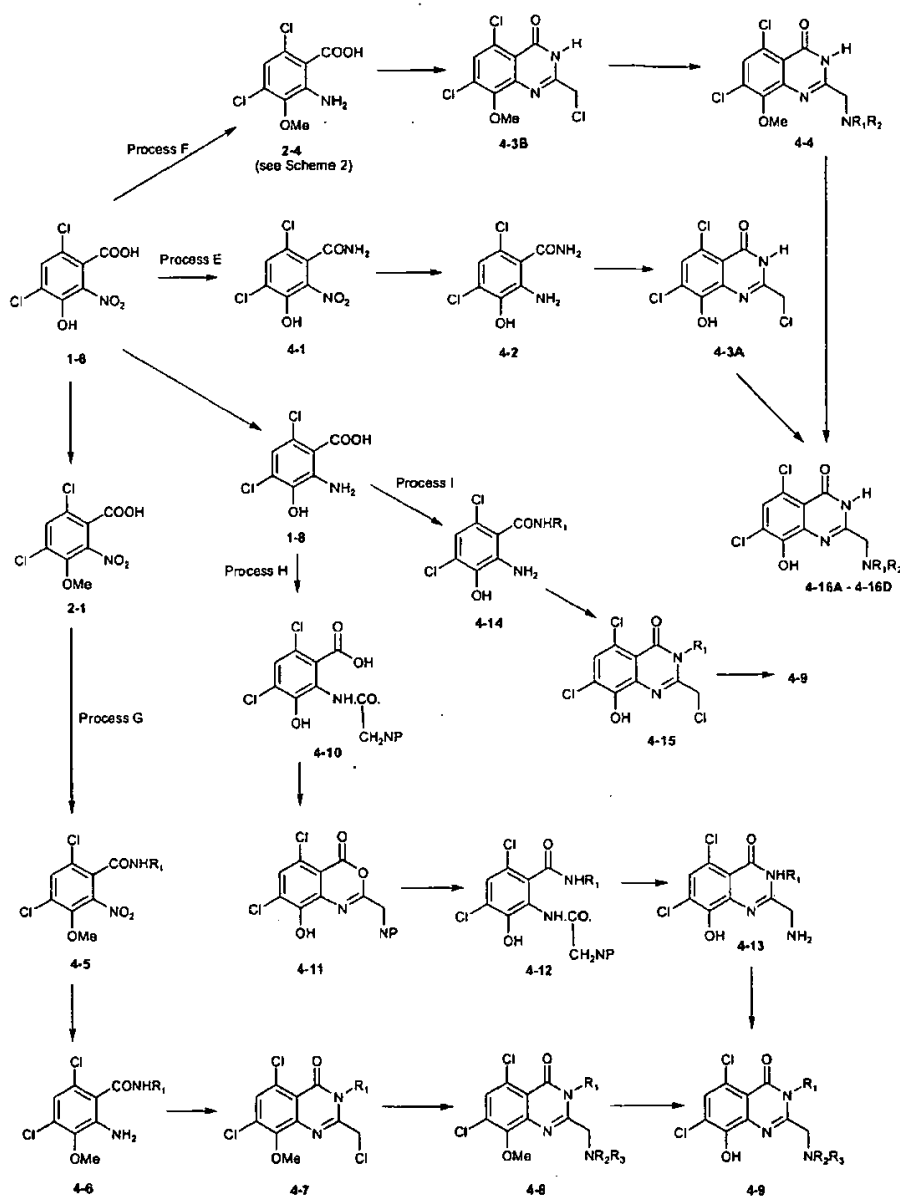


Las 2-sustituidas 8-hidroxi-3H-quinazolin-4-onas se pueden preparar según las rutas descritas en el esquema 4. Por consiguiente, según el proceso E, el tratamiento del ácido antranílico 1-6 con un activador como cloruro de tionilo y la subsiguiente reacción del producto intermedio ácido clorhídrico con amoníaco da la benzamida 4-1 correspondiente. La reducción del compuesto nitro 4-1, habitualmente con SnCl₂ o polvo de hierro/HOAc, da la amina 4-2 correspondiente. La amina 4-2, a su vez, se puede tratar con ácido cloroacetyl acético o 2-cloro-1,1,1-trimetoxietano para dar 5,7-dicloro-2-clorometil-8-hidroxi-3H-quinazolin-4-ona (4-3A). El compuesto 2-clorometilo también se puede preparar a partir del derivado metoxi del ácido antranílico 2-4 a través del proceso F. Por lo tanto, el tratamiento⁷ de 2-4 con cloroacetnitrilo en presencia de una base, generalmente metóxido de sodio, da 4-3B. La elaboración posterior del derivado 2-clorometilo 4-3A (o 4-3B) con una serie de aminas como, pero no exclusivamente, dimetilamina, metilamina y etilamina, proporciona varios derivados 2-sustituidos nuevos 4-16A - 4-16D.

Varias 2,3-disustituidas 8-hidroxi-3H-quinazolin-4-onas 4-9 se pueden preparar a través del ácido 2-1 según el proceso G, como se muestra en el esquema 4. Por consiguiente, 2-1 se puede tratar con una amina adecuada en presencia de un activador para obtener la benzamida 4-5 correspondiente que después es reducida, generalmente utilizando SnCl_2 o hierro en polvo/HOAc, a 4-6. El compuesto 4-6 se transforma a continuación en el derivado 2-clorometilo 4-7 y éste, a su vez, en 4-8 empleando condiciones de reacción similares a las descritas previamente en los procesos E y F. Después de la desprotección, habitualmente empleando HBr acuoso a una temperatura próxima a la temperatura de reflujo, 4-8 proporciona los derivados 2,3-disustituidos 4-9 correspondientes.

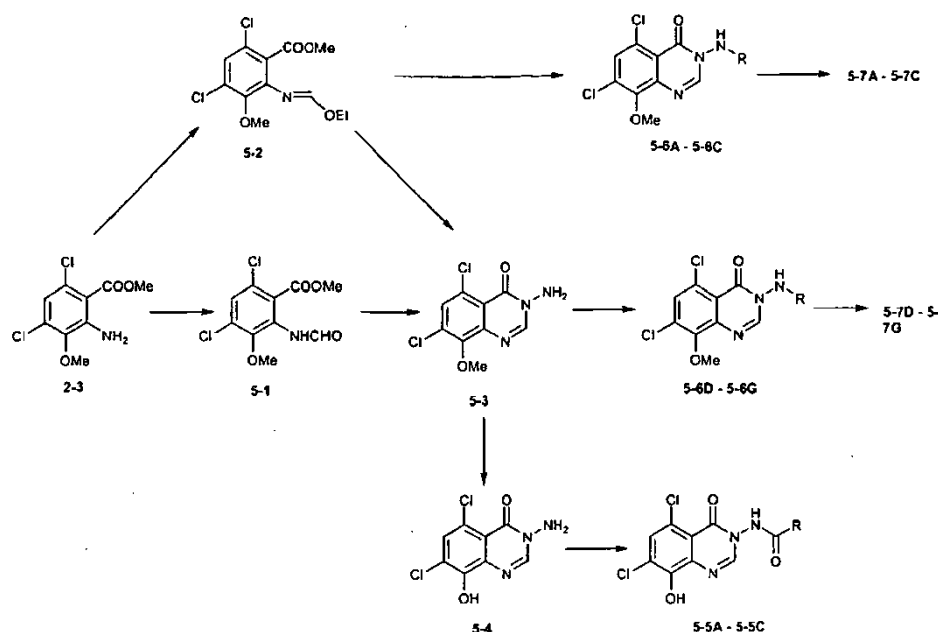
Las 2,3-disustituidas 8-hidroxi-3H-quinazolin-4-onas 4-9 también se pueden obtener a través de los procesos H e I (Esquema 4). En el proceso H, el ácido antranílico 1-8 es adecuadamente acilado con un acilante que contiene NP como cloruro de 2-azidoacetilo, cloruro de ftalil-glicilo y cloruro de [(fenilmetil)amino]acetilo. Concordantemente, los ejemplos de grupos NP son azido, ftalimido y bencilamino. La condensación subsiguiente del producto intermedio 4-10, la presencia de anhídrido acético a temperatura elevada, habitualmente próxima a la temperatura de reflujo, suministra la benzo[d][1,3]oxazin-4-ona 4-11. En presencia de una amina (R_1NH_2) adecuada, 4-11 da 4-12; 4-12, a su vez, da 4-13 a través de una condensación. Los agentes de condensación adecuados incluyen PCl_3 , ortoformiato de trietilo, CDI y Ac_2O . Las condiciones para la transformación de la porción -NP en el grupo amino dependerán del grupo NP particular; para los grupos mencionados antes, estas son respectivamente: reducción, dimetilamina e hidrogenólisis catalítica (más ejemplos de las condiciones⁵ para las últimas dos transformaciones se pueden encontrar en alguna otra parte). En el proceso I, la condensación del ácido antranílico 1-8 con una amina (NR_1R_2) adecuada, produce la amida 4-14. El tratamiento sucesivo subsiguiente de 4-14 con cloruro de cloroacetilo y una amina da 4-9.

Esquema 4



3-Amino-5,7-dicloro-8-hidroxi-3H-quinazolin-4-ona(5-4) y ciertas 3-(sustituidas)amino-3H-quinazolin-4-onas se pueden preparar según las rutas que se muestran en el esquema 5. La N-formilación del éster metílico 2-3, habitualmente utilizando anhídrido acético fórmico, proporciona 5-1. Alternativamente, el tratamiento de 2-3 con un ortoéster como ortoformiato de trietilo proporciona el éster imidato 5-2. Luego del tratamiento con hidrazina, 5-1 o 5-2 produce la 3-amino-3H-quinazolin-4-ona 5-3. La eliminación del grupo protector en 5-3, generalmente con HBr acuoso a 120 °C, da 5-4. La elaboración posterior del compuesto 3-amino-5-4 utilizando haluros de ácido adecuados proporciona los correspondientes derivados acilados 3-sustituidos, 5-5A -5-5C. Los derivados como 5-7A - 5-7C se pueden obtener a partir de 5-2 a través de la sustitución del hidrato de hidrazina por la hidrazina sustituida adecuada como la 4-fluorofenilhidrazina, 4-metoxifenilhidrazina o 2,4-difluorofenilhidrazina, seguido de desprotección. Con los haluros de alquilo en un solvente adecuado, generalmente etanol, seguido de desprotección, 5-3 proporciona los compuestos 5-7D - 5-7G. Alternativamente, los compuestos 5-7D - 5-7G también se pueden preparar a través del tratamiento de 5-2 con la hidrazina alquilada adecuada como etilhidrazina, propilhidrazina y (ciclopropil)metilhidrazina.

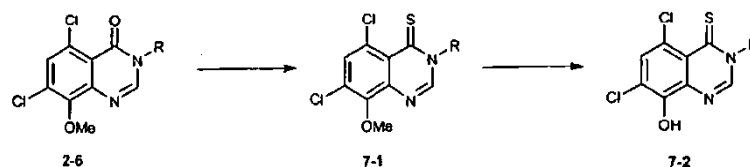
Esquema 5



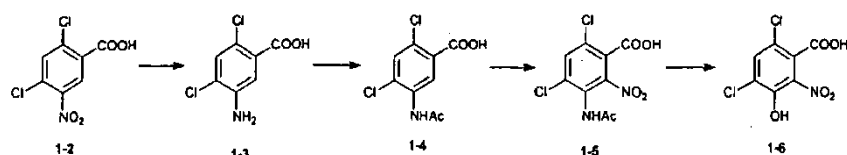
Las aminas 2-7F2, 2-7Q2, 2-7R2, 2-7S2 y 2-7X2 se pueden preparar en una serie de derivados como 6-1 - 6-6 a través del tratamiento con haluros de alquilo o reactivos acilantes. Los datos para 6-1 - 6-6 se presentan en tablas (Tabla 9).

Una serie de 3-sustituidas-3H-quinazolin-4-onas 7-2 se pueden preparar a partir de las 3H-quinazolin-4-onas 2-6 correspondientes, según el proceso que se muestra en el esquema 6. Por lo tanto, el tratamiento de 2-6 con P_4S_{10} o el reactivo de Lawesson proporciona la tiocetona 7-1. La eliminación subsiguiente del grupo protector, usando adecuadamente BBr_3 , da la 3-sustituida-3H-quinazolin-4-ona 7-2 deseada.

Esquema 6



Preparación de ácido 4,6-dicloro-3-hidroxi-2-nitrobenzoico (1-6)



Se agregó hidrato de cloruro de estaño(II) (50 g, 0.29 mol) a una solución de ácido 2,4-dicloro-5-nitrobenzoico (1-2)² (10.0 g, 0.045 mol) en EtOH (200 mL). La mezcla se agitó a 70 °C durante 0.5 h, se enfrió y se vertió sobre hielo. El pH de la mezcla se ajustó a 8 (NaHCO₃ saturado). La suspensión se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 5 h y se reacidificó hasta pH 5 (HOAc glacial). La suspensión blanca resultante se extrajo continuamente con acetato de etilo, los extractos se combinaron, se lavaron con solución saturada de cloruro de sodio, se secaron y se concentraron para obtener la amina deseada (1-3) como un sólido blancuzco (8.8 g, 96%).

Ácido 5-amino-2,4-diclorobenzoico (1-3): ¹H NMR (CD₃OD) : δ 7.30 (s, 1 H), 7.27 (s, 1 H).

Se agregó anhídrido acético (27 mL) al ácido 5-amino-2,4-diclorobenzoico (1-3) (8.0 g, 0.041 mol) en HOAc glacial (150 mL). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 0.5 h y se concentró para dar la acetamida (1-4) deseada como un sólido blanco (9.6 g, 96%).

Ácido 5-acetamido-2,4-diclorobenzoico (1-4): ¹H NMR (CD₃OD) : δ 8.32 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 2.19 (s, 3 H).

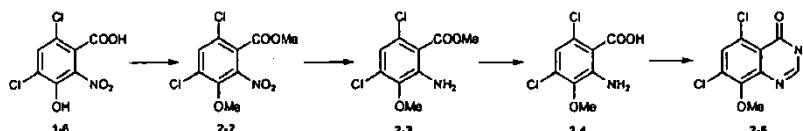
Se agregó ácido 5-acetamido-2,4-diclorobenzoico (1-4) (9.6 g, 0.039 mol) en pequeñas porciones en el transcurso de 30 min a una solución en agitación enfriada con hielo de ácido nítrico fumante (1.8 mL, 0.043 mol) y ácido sulfúrico concentrado (120 mL). Una vez que se completó la adición, se agregaron más ácido nítrico fumante (17 mL) y ácido sulfúrico concentrado (80 mL) a intervalos de 30 min y 60 min. La mezcla de reacción se dejó después en agitación durante otras 2.5 h a 0 °C, se permitió que alcanzara 12-16 °C y se dejó en agitación a esta temperatura hasta que todo el material de partida se consumió (alrededor de 3 h). La solución se vertió en hielo y se extrajo con acetato de etilo (3x). Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con solución saturada de cloruro de sodio, se secaron y se concentraron para dar ácido 3-acetamido-4,6-dicloro-2-nitrobenzoico (1-5) como un sólido anaranjado (9.8 g, 86%).

Ácido 3-acetamido-4,6-dicloro-2-nitrobenzoico (1-5): ¹H NMR (CD₃OD) : δ 8.01 (s, 1 H), 2.13 (s, 3 H).

Se agregó ácido 3-acetamido-4,6-dicloro-2-nitrobenzoico (1-5) (9.7 g, 0.033 mol) a una solución de KOH (18.7 g, 0.034 mol) en H₂O (85 mL). La solución se calentó a reflujo durante 18 h y se enfrió hasta temperatura ambiente. Se agregó HCl conc. para ajustar el pH a 0. La mezcla se diluyó con acetato de etilo y H₂O y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 30 min. Las capas se separaron; la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3x), los extractos combinados con la capa orgánica original, se lavaron con solución saturada de cloruro de sodio, se secaron y se concentraron para dar ácido 4,6-dicloro-3-hidroxi-2-nitrobenzoico (1-6) como un sólido rojo oscuro (7.4 g, 89%); p.f. 188-189 °C (bibl.⁴ p.f. 186 °C (dec)).

Ácido 4,6-dicloro-3-hidroxi-2-nitrobenzoico (1-6): ¹H NMR (CD₃OD) : δ 7.79 (s, 1 H); espectro de masas: m/z 250, 252, 254 (M⁺ - 1, 100%, 66%, 11%).

Preparación de 5,7-dicloro-8-metoxi-3H-quinazolin-4-ona (2-5)



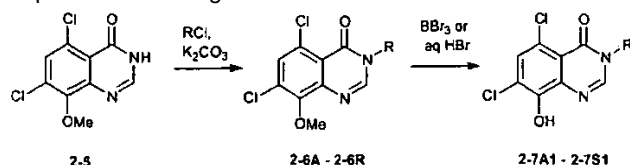
Se agregó sulfato de dimetilo (40 mL) a una mezcla en agitación de 1-6 (15.0 g, 0.059 mol), carbonato de potasio (66 g, 0.5 mol) y DMF (300 mL). La mezcla resultante se dejó en agitación a 60 °C durante toda la noche y después a 120 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío. El residuo marrón rojizo resultante se lavó con agua y se secó. Esto dio 2-2 como un sólido anaranjado (14.6 g, 88%). - ¹H NMR (CDCl₃) : δ 7.65 (s, 1 H), 4.01 (s, 3 H), 3.92 (s, 3 H).

Se agregó hierro en polvo (18.2 g, 0.33 mol) a una solución de 2-2 (13.3 g, 0.048 mol) en ácido acético (120 mL). La mezcla se agitó a 55 °C durante 1.5 horas y después se filtró mientras aún estaba caliente a través de celite (acetato de etilo). El filtrado se concentró, se le agregó acetato de etilo y carbonato de sodio saturado y la mezcla se filtró (celite). La capa orgánica se aisló, se lavó con agua, se secó (K₂CO₃), y se concentró para dar 2-3 como un sólido blancuzco (11.6 g, 97%). - ¹H NMR (CDCl₃) : δ 6.71 (s, 1 H), 3.89 (s, 3 H), 3.79 (s, 3 H).

A una solución en agitación de 2-3 (11.5 g, 0.046 mol) en metanol (250 mL) y agua, se le agregó NaOH 2 M (25 mL). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1 hora, se le agregó más NaOH 2 M (25 mL) y la mezcla se calentó a reflujo durante 1 hora más. La solución se enfrió y se concentró para eliminar el metanol. El concentrado se disolvió en agua, se extrajo con acetato de etilo y el pH se ajustó a 1-2 (HCl conc.). La suspensión lechosa se extrajo con acetato de etilo (3x). Los extractos combinados se lavaron con solución saturada de cloruro de sodio, se secaron y se concentraron para dar 2-4 como un sólido beige (10.4 g, 95%). - ¹H NMR (CD₃OD) : δ 6.70 (s, 1 H), 3.80 (s, 3 H).

Una suspensión en agitación de 2-4 (16.9 g, 0.072 mol) y formamida (150 mL) se calentó a 150 °C durante 8 horas y después se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Se le agregó agua, el precipitado resultante se aisló por filtración, se lavó con agua y se secó al vacío para dar 2-5 como un sólido marrón claro (13.0 g, 73%). - ¹H NMR (CD₃OD) : δ 8.08 (s, 1 H), 7.60 (s, 1H), 3.98 (s, 3 H).

Ejemplo 1 -Preparación de los compuestos 2-7A2 - 2-7R2 a través de la alquilación de 5,7-dicloro-8-metoxi-3H-quinazolin-4-ona (2-5) y desprotección subsiguiente



A una solución en agitación de 2-5 (1.5 g, 6.1 mmol) y el cloruro (7.3 mmol) en DMF anhidra (30 mL) se le agregó K₂CO₃ (9.3 mmol) y la mezcla resultante se calentó a 95 °C durante 16 horas, se enfrió y se concentró. El residuo se extrajo con acetato de etilo o diclorometano (3x), los extractos se combinaron y se lavaron sucesivamente con agua y solución saturada de cloruro de sodio, y se secaron. La purificación subsiguiente por trituración con un solvente adecuado, recristalización o cromatografía en gel de SiO₂, dio la 3-sustituida-8-metoxi-3H-quinazolin-4-ona (2-6) correspondiente.

Ejemplos de cloruros utilizados: 1-(2-cloroetil)pirrolidina da 2-6A, 2 (clorometil)ciclopropano da 2-6B, 2-(2-cloroetil)-1-metilpirrolidina da 2-6C, 2-(clorometil)piridina da 2-6D, 4-(2-cloroetil)morfolina da 2-6E, clorhidrato de 2-clorometil-4-metiltiazol da 2-6F, 4-clorometil-3,5-dimetilisoxazol da 2-6G, 2-bromopropano da 2-6H, 1-cloropropano da 2-6I, 1-cloro-2-metilpropano da 2-6J, 1-clorobutano da 2-6K, 2-clorobutano da 2-6L, 2-cloroetil etil éter da 2-6M, clorhidrato de cloruro de (2-dietilamino)etilo da 2-6N, clorhidrato de 2-clorometil-3-metilpiridina da 2-6O, cloruro de crotilo da 2-6P, 2,6-bis(clorometil)piridina da 2-6Q y 1-cloroetano da 2-6R. En los casos de clorhidrato de 1-(2-cloroetil)pirrolidina, clorhidrato de 2-clorometil-3-metilpiridina y clorhidrato de 2-clorometil-4-metiltiazol, se emplearon 2.2 equivalentes de K₂CO₃.

Preparación de clorhidrato de (2-clorometil)-3-metilpiridina

A una solución en agitación de 2,3-lutidina (5.00 g, 46.7 mmol) en cloroformo (100 mL) a 0 °C se le agregó en porciones ácido m-cloroperbenzoico (12.0 g de un reactivo 77% máx) en el transcurso de 5 min. La mezcla de reacción se agitó durante otros 30 min a 0 °C y después se permitió que alcanzara la temperatura ambiente. Después de 16 h, la mezcla de reacción se concentró hasta sequedad, se le agregó agua (20 mL) y el pH de la mezcla se ajustó a 8 (NaHCO₃ saturado). La mezcla se concentró y el residuo se extrajo con diclorometano/metanol (4:1). Los extractos se concentraron hasta obtener un sólido blanco. La purificación en columna subsiguiente (SiO₂; diclorometano/metanol, 9:1) dio 2,3-lutidina-N-óxido como un sólido blanco (4.80 g, 83%).

Una solución en agitación de 2,3-lutidina-N-óxido (4.80 g, 39.0 mmol) en anhídrido acético (50 mL) se calentó a reflujo durante toda la noche, se enfrió y después se concentró hasta sequedad para dar (2-acetoximetil)-3-metilpiridina como un aceite marrón (6.34 g). Una mezcla de la (2-acetoximetil)-3-metilpiridina cruda y K₂CO₃ (10.0 g, 72.4 mmol), metanol (60 mL) y agua (30 mL) se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. El sólido se filtró y el filtrado se concentró hasta sequedad. El residuo, luego de la cromatografía en columna (SiO₂; diclorometano/metanol, 9:1), dio (2-hidroximetil)-3-metilpiridina como un aceite marrón claro (2.86 g, 59% en 2 pasos).

(2-hidroximetil)-3-metilpiridina: ¹H NMR (CDCl₃): δ 8.41 (d, J = 4.9, 1 H), 7.48 (d, J = 7.5, 1 H), 7.16 (dd, J = 4.9 and 7.5, 1H), 4.69 (s, 2 H), 4.00 (br, 1 H), 2.22 (s, 3 H).

A una solución enfriada con hielo de (2-hidroximetil)-3-metilpiridina (1.00 g, 8.1 mmol) en diclorometano (30 mL) se le agregó gota a gota una solución de cloruro de tionilo (2.5 mL) en diclorometano (6 mL) en el transcurso de 10 min. Se retiró el baño de hielo, la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 h, se concentró y después se lavó con éter dietílico. Esto proporcionó clorhidrato de (2-clorometil)-3-metilpiridina como un sólido de color pajizo claro (1.44 g, 99%).

Clorhidrato de (2-clorometil)-3-metilpiridina: ¹H NMR (CD₃OD) : δ 8.72 (d, J = 5.9, 1 H), 8.54 (d, J = 8.1, 1 H), 8.00 (dd, J = 5.9 and 8.1, 1 H), 5.05 (s, 2 H), 2.64 (s, 3 H).

Los rendimientos y los datos espectrales para los compuestos 2-6A - 2-6R preparados se muestran en la tabla 1.

Desprotección

Método A: A una solución en agitación enfriada en hielo del derivado 8-metoxi 2-6 (1.9 g, 5.6 mmol) en diclorometano (15 mL) se le agregó BBr₃ (12 mL de una solución 1 M en diclorometano, 12 mmol). La solución se

agitó después a 45° durante 18 horas, se enfrió y se le agregó metanol (20 mL). La mezcla se concentró. El exceso de borato se eliminó agregando repetidamente metanol y evaporando. La sal de bromhidrato cruda del producto se lavó con éter (3x). Algunos compuestos se aislaron como la base libre: por lo tanto, se agregó Na₂CO₃ saturado (20 mL) y la mezcla se extrajo con diclorometano (5x). Los extractos combinados se lavaron con agua, se secaron y se concentraron. El residuo se purificó o bien simplemente lavando con un solvente adecuado, recristalización, o por cromatografía en columna de SiO₂ para dar el derivado 8-hidroxi 2-7 correspondiente.

Método B: Una solución de 3-sustituida-8-metoxi-3H-quinazolin-4-ona (2-6) (5.0 mmol) en ácido bromhídrico al 48% (25 mL) se calentó a reflujo en atmósfera de argón durante 16 - 18 horas y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad o el precipitado que se formó se aisló por filtración. Después el sólido crudo se lavó sucesivamente con éter dietílico, diclorometano y acetonitrilo, para dar el compuesto 8-hidroxi (2-7) correspondiente como la sal de bromhidrato. Algunos compuestos se aislaron como la base libre (véase método A antes por las condiciones).

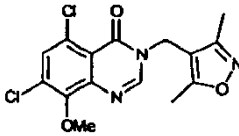
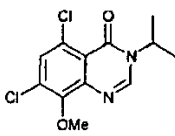
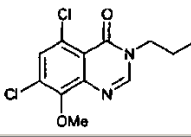
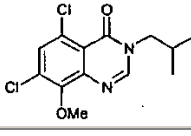
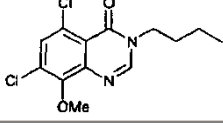
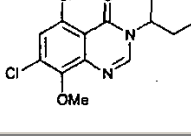
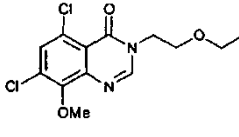
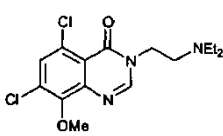
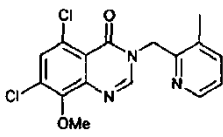
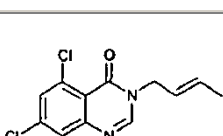
Método C: Una solución del compuesto 8-metoxi 2-6 (4.46 mmol) y ácido bromhídrico al 48% (23 mL) se calentó a 120 °C durante 2-10 horas y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Se le agregó agua (30 mL) y el pH se ajustó a 5 (NaOH en pellets). El precipitado resultante se aisló por filtración, se lavó con agua y se secó al vacío.

En el caso del derivado éter etílico 2-6M, se obtuvo la sal de bromhidrato del alcohol 2-7M1 (Tabla 2). El tratamiento del alqueno 2-6P con BBr₃ según el método A dio 2-7S1. Se obtuvo el bromuro 2-7P1 a través del tratamiento de 2-6P con HBr acuoso según el método B.

Los rendimientos y datos espectrales para 2-7A1 - 2-7S1 se muestran en la tabla 2.

Tabla 1 Compuestos de referencia 2-6A - 2-6R preparados según el ejemplo 1

Compuesto	Estructura	Rendimiento (%)	Datos de ¹ H-NMR	Datos espectrales de masas
2-6A		94	(CDCl ₃): δ 8.12 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 4.06 (t, J= 5.5, 1H), 4.04 (s, 3H), 2.84 (t, J= 5.5, 1H), 2.56 (m, 4H), 1.77 (m, 4H)	
2-6B		96	(CDCl ₃): δ 8.15 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 4.05 (s, 3H), 3.83 (d, J= 7.2, 2H), 1.31 (m, 1H), 0.66 (m, 2H), 0.42 (m, 2H)	
2-6C		99	(CDCl ₃): δ 8.12 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 4.04 (s, 3H), 4.00 (m, 2H), 3.08 (m, 1H), 2.30 (s, 3H), 2.25-1.55 (m, 8H)	m/z 356, 358, 360 (M ⁺ +1, 100%, 66%, 11%)
2-6D		99	(DMSO-d ₆): δ 8.62 (s, 1H), 8.47 (m, 1H), 7.80 (m, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.45 (d, J=8.0, 1H), 7.30 (m, 1H), 5.25 (s, 2H), 3.98 (s, 3H)	
2-6E		95	(CDCl ₃): δ 8.06 (s, 1H), 7.47 (s, 1H), 4.05 (t, J= 5.8, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.61 (m, 4H), 2.66 (t, J = 5.8, 2H), 2.46 (m, 4H)	
2-6F		98	(CDCl ₃): δ 8.42 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 5.17 (s, 2H), 4.04 (s, 3H), 2.67 (s, 3H)	m/z 356, 358, 360 (M ⁺ + 1, 100%, 66%, 11%)

Compuesto	Estructura	Rendimiento (%)	Datos de $^1\text{H-NMR}$	Datos espectrales de masas
2-6G		94	(CDCl_3): δ 8.23 (s, 1 H), 7.56 (s, 1 H), 4.92 (s, 2 H), 4.04 (s, 3 H), 2.54 (s, 3 H), 2.30 (s, 3 H)	m/z 354, 356, 358 ($\text{M}^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)
2-6H		56	(DMSO-d_6): δ 8.56 (s, 1 H), 7.72 (s, 1 H), 4.91 (quin, $J = 6.8$, 1 H), 3.34 (s, 3 H), 1.40 (d, $J = 6.8$, 6 H),	m/z 287, 289, 291 ($\text{M}^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)
2-6I		99	(DMSO-d_6): δ 8.49 (s, 1 H), 7.72 (s, 1 H), 3.95 (s, 3 H), 3.89 (m, 2 H), 1.68 (m, 2H), 0.89 (t, $J=73.3$, 3 H)	
2-6J		53	(DMSO-d_6): δ 8.45 (s, 1 H), 7.72 (s, 1 H), 3.95 (s, 3 H), 3.75 (d, $J = 7.2$, 2 H), 2.10 (m, 1 H), 0.88 (d, $J = 6.4$, 6 H).	m/z 301, 303, 305 ($\text{M}^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)
2-6K		46	(DMSO-d_6): δ 8.48 (s, 1 H), 7.71 (s, 1 H), 3.95 (s, 3 H), 3.92 (t, $J = 7.2$, 2H), 1.65 (m, 2 H), 1.31 (m, 2 H), 0.91 (m, 3 H).	m/z 301, 303, 305 ($\text{M}^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)
2-6L		28	(DMSO-d_6): δ 8.51 (s, 1 H), 7.72 (s, 1 H), 4.71 (quin, $J = 7.2$, 1 H), 3.95 (s, 3 H), 1.80 (m, 2 H), 1.39 (d, $J=6.8$, 3 H), 0.80 (t, $J = 7.2$, 3 H).	m/z 301, 303, 305 ($\text{M}^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)
2-6M		78	(DMSO-d_6): δ 8.37 (s, 1 H), 7.73 (s, 1 H), 4.10 (t, $J = 5.2$, 2 H), 3.94 (s, 3 H), 3.62 (d, $J = 5.2$, 2 H), 3.43 (q, $J = 6.8$, 2 H), 1.05 (t, $J = 6.8$, 3 H).	m/z 317, 319, 321 ($\text{M}^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)
2-6N		69	(DMSO-d_6): δ 8.35 (s, 1 H), 7.71 (s, 1 H), 3.94 (s, 3H), 2.62 (m, 4 H), 2.47 (m, 4 H), 0.82 (m, 6 H)	m/z 344, 346, 348 ($\text{M}^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)
2-6O		90	(DMSO-d_6): δ 8.55 (s, 1 H), 8.24 (d, $J = 3.7$, 1 H), 7.74 (s, 1H), 7.65 (d, $J = 7.5$, 1 H), 7.22 (dd, $J = 3.7$ and 7.5, 1 H), 5.26 (s, 2 H), 3.99 (s, 3 H), 2.43 (s, 3 H)	m/z 336, 338, 340 ($\text{M}^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)
2-6P		79	(DMSO-d_6): δ 8.45 (s, 1 H), 7.72 (s, 1 H), 5.70 (m, 2 H), 4.47 (d, $J = 6.4$, 2 H), 3.94 (s, 3 H), 1.65 (d, $J = 6.4$, 3 H)	m/z 299, 301, 303 ($\text{M}^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)

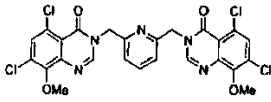
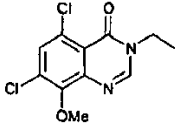
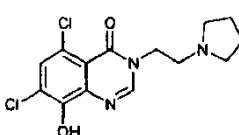
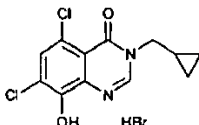
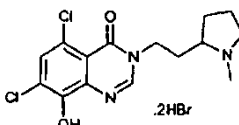
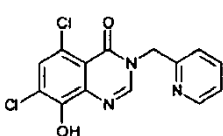
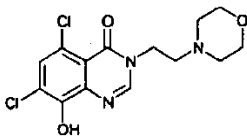
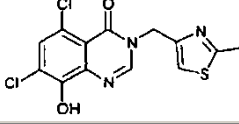
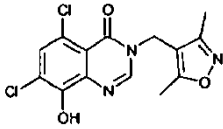
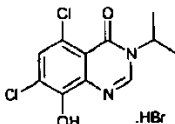
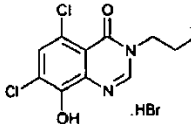
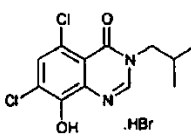
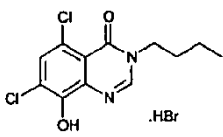
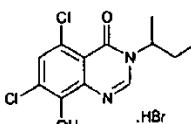
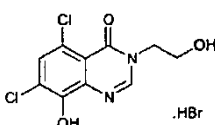
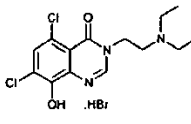
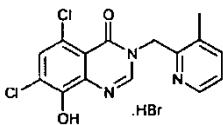
Compuesto	Estructura	Rendimiento (%)	Datos de $^1\text{H-NMR}$	Datos espectrales de masas
2-6Q		92	(DMSO- d_6): δ 8.33 (s, 2 H), 7.84 (t, $J=8$, 1 H), 7.51 (s, 2 H), 7.39 (d, $J=8.0$, 2 H), 5.16 (s, 4 H), 3.95 (s, 3 H), 3.93 (s, 3 H).	m/z 287, 289, 291 ($M^+ + 1$, 82%, 100%, 66%)
2-6R		26	(DMSO- d_6): δ 8.50 (s, 1 H), 7.71 (s, 1 H), 3.95 (q, $J=7.2$, 2 H), 3.94 (s, 3 H), 1.26 (t, $J=7.2$, 3 H)	m/z 273, 275, 277 ($M^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)

Tabla 2 Compuestos 2-7A1 - 2-7R1 preparados a partir de 2-6 según el ejemplo 1

Compuesto	Estructura	Rendimiento (%) y método de desprotección entre paréntesis	Datos de $^1\text{H-NMR}^{\#}$	Datos espectrales de masas
2-7A1 (1075)		56 (Método A)	(CD_3OD): δ 8.12 (s, 1 H), 7.51 (s, 1 H), 4.06 (t, $J=5.5$, 2 H), 4.04 (s, 3 H), 2.84 (t, $J=5.5$, 2 H), 2.56 (m, 4 H), 1.77 (m, 4 H).	
2-7B1 (1076)		98 (Método A)	(DMSO- d_6): δ 8.51 (s, 1 H), 7.59 (s, 1 H), 3.80 (d, $J=6.8$, 2 H), 1.28 (m, 1 H), 0.50 (m, 2 H), 0.41 (m, 2 H)	m/z 283, 285, 287 ($M^+ - 1$, 100%, 66%, 11%)
2-7C1 (1078)		89 (Método B)	(DMSO- d_6): δ 8.54 (s, 1 H), 7.61 (s, 1 H), 4.05 (m, 2 H), 3.32 (m, 1 H), 3.05 (m, 1 H), 2.81 (m, 3 H), 2.39 - 1.68 (m, 7 H)	m/z 342, 344, 346 ($M^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)
2-7D1 (1077)		75 (Método A)	(DMSO- d_6): δ 8.62 (s, 1 H), 8.46 (m, 1 H), 7.80 (m, 1 H), 7.59 (s, 1 H), 7.44 (d, $J=7.9$, 1 H), 7.29 (m, 1 H), 5.26 (s, 2 H)	m/z 322, 324, 326 ($M^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)
2-7E1 (1079)		69 (Método B)	(CD_3OD): δ 8.25 (s, 1 H), 7.48 (s, 1 H), 4.12 (t, $J=6.0$, 2 H), 3.65 (t, $J=4.8$, 4 H), 2.70 (t, $J=6.0$, 2 H), 2.53 (m, 2 H),	m/z 344, 346, 348 ($M^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)
2-7F1 (1084)		74 (Método C)	(CD_3OD): δ 8.44 (s, 1 H), 7.48 (s, 1 H), 7.36 (s, 1 H), 5.21 (s, 2 H), 2.66 (s, 3 H)	m/z 342, 344, 346 ($M^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)
2-7G1 (1085)		38 (Método C)	(DMSO- d_6): δ 8.66 (s, 1 H), 7.57 (s, 1 H), 4.91 (s, 2 H), 2.22 (s, 6 H)	m/z 340, 342, 344 ($M^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)

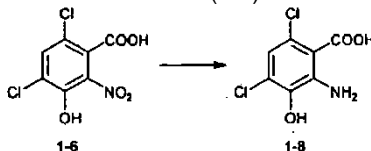
Compuesto	Estructura	Rendimiento (%) y método de desprotección entre paréntesis	Datos de $^1\text{H-NMR}^\#$	Datos espectrales de masas
				
2-7H1 (1108)		68 (Método B)	(DMSO- d_6): δ 8.46 (s, 1 H), 7.58 (s, 1 H), 4.92 (quin, J = 6.8, 1 H), 1.43 (d, J=6.8, 6 H)	m/z 271, 273, 275 ($M^+ - 1$, 100%, 66%, 11%)
2-7I1 (1097)		77 (Método B)	(DMSO- d_6): δ 8.50 (s, 1 H), 7.58 (s, 1 H), 3.90 (m, 2 H), 1.69 (m, 2 H), 0.89 (t, J = 6.3, 3 H)	m/z 273, 275, 277 ($M^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)
2-7J1 (1107)		79 (Método B)	(DMSO- d_6): δ 8.44 (s, 1 H), 7.58 (s, 1 H), 3.76 (d, J = 7.6, 2 H), 2.08 (m, 1 H), 0.88 (d, J = 6.8, 6 H)	m/z 285, 287, 289 ($M^+ - 1$, 100%, 66%, 11%)
2-7K1 (1111)		77 (Método B)	(DMSO- d_6): δ 8.48 (s, 1 H), 7.58 (s, 1 H), 3.93 (t, J = 7.6, 2 H), 1.65 (m, 2 H), 1.30 (m, 2 H), 0.91 (t, J = 7.2, 3 H).	m/z 285, 287, 289 ($M^+ - 1$, 100%, 66%, 11%)
2-7L1 (1112)		62 (Método B)	(DMSO- d_6): δ 8.43 (s, 1 H), 7.58 (s, 1 H), 4.71 (quin, J=6.8, 1 H), 1.82 (m, 2H), 1.40 (d, J = 6.8, 3 H), 0.80 (t, J = 7.2, 3 H).	m/z 285, 287, 289 ($M^+ - 1$, 100%, 66%, 11%)
2-7M1 (1109)		98 (Método B)	DMSO- d_6 : δ 8.48 (s, 1 H), 7.62 (s, 1 H), 4.34 (t, J = 6.4, 2 H), 3.82 (t, J = 6.4, 2 H)	m/z 273, 275, 277 ($M^+ - 1$, 100%, 66%, 11%)
2-7N1 (1110)		85 (Método B)	(DMSO- d_6): δ 8.53 (s, 1 H), 7.64 (s, 1 H), 4.30 (m, 2 H), 3.25 (m, 2 H), 2.54 (m, 2 H), 2.44 (m, 2 H), 1.23 (m, 6 H).	m/z 328, 330, 332 ($M^+ - 1$, 100%, 66%, 11%)
2-7O1 (1098)		83 (Método B)	(DMSO- d_6): δ 8.61 (s, 1 H), 8.43 (d, J = 4.7, 1 H), 8.08 (d, J = 3.0, 1 H), 7.63 (s, 1 H), 7.53 (m, 1 H), 5.38 (s, 2 H), 2.50 (s, 3 H)	m/z 336, 338, 340 ($M^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)
2-7P1 (1114)		99 (Método B)	(DMSO- d_6): δ 8.45 (s, 1 H), 7.58 (s, 1 H), 4.33 (m, 1 H), 4.14 (m, 1 H), 4.00	m/z 365, 367, 369 ($M^+ + 1$, 45%, 66%, 30%)

Compuesto	Estructura	Rendimiento (%) y método de desprotección entre paréntesis	Datos de $^1\text{H-NMR}^\#$	Datos espectrales de masas
			(m, 1 H), 2.22 (m, 2 H), 1.71 (d, J=6.8, 3 H)	
2-7Q1 (1101)		82 (Método B)	(DMSO- d_6): δ 8.42 (s, 2 H), 7.81 (t, J= 8, 1 H), 7.43 (s, 2 H), 7.32 (d, J=8, 2 H), 5.18 (s, 4 H)	m/z 562, 564, 566 ($M^+ - 1$, 82%, 100%, 66%)
2-7R1 (1115)		95 (Método B)	(DMSO- d_6): δ 8.51 (s, 1 H), 7.57 (s, 1 H), 3.97 (q, J = 7.2, 2 H), 1.27 (t, J= 7.2, 3 H)	m/z 259, 261, 263 ($M^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)
2-7S1 (1126)		44 (Método A)	(DMSO- d_6): δ 8.44 (s, 1 H), 7.59 (s, 1 H), 5.70 (m, 2 H), 4.49 (d, J= 5.6, 2 H), 1.65 (d, J= 6.0, 3 H)	m/z 285, 287, 289 ($M^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)

$^\#$ los desplazamientos químicos para el 8-OH y HBr (cuando corresponde) no fueron incluidos en las asignaciones

Preparación de ácido 2-amino-4,6-dicloro-3-hidroxibenzoico (1-8)

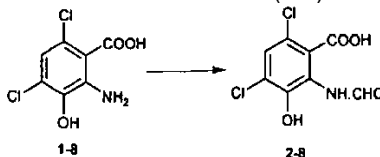
5



10 Una mezcla de ácido 4,6-dicloro-3-hidroxi-2-nitrobenzoico (1-6) (700 mg, 2.78 mmol), hierro en polvo (400 mg, 7.16 mmol) y ácido acético glacial (13 mL) se calentó a 80 °C durante 50 minutos, se enfrió y los sólidos se separaron por filtración. El filtrado se concentró hasta un sólido marrón. La cromatografía en columna en gel de SiO_2 subsiguiente (acetato de etilo/ HOAc , 100:1 - 100:3) dio ácido 2-amino-4,6-dicloro-3-hidroxibenzoico (1-8) como un sólido marrón claro (582 mg, 94%). - $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ 6.68 (s); esto es coherente con la bibliografía.⁴

15 Preparación de ácido 4,6-dicloro-2-formilamino-3-hidroxibenzoico (2-8)

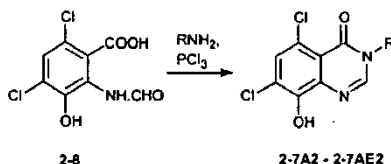
20



25 Una solución de ácido fórmico (1.04 mL de solución al 90%) y anhídrido acético (2 mL) se calentó a 50 - 60 °C durante 2 horas y se enfrió. Después se agregó en porciones ácido 2-amino-4,6-dicloro-3-hidroxibenzoico (1-8) (425 mg, 1.91 mmol) al anhídrido acético fórmico en agitación a temperatura ambiente. Después de 2.5 horas, la mezcla de reacción se vertió sobre la mezcla de hielo y agua; el sólido se aisló por filtración. Esto proporcionó ácido 4,6-dicloro-2-formilamino-3-hidroxibenzoico (2-8) como un sólido anaranjado (320 mg, 67%). - $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ 8.76 (s, 1 H), 8.29 (s, 1 H), 8.13 (s, 1 H); espectro de masas: m/z 248, 250, 252 ($M^+ - 1$, 100%, 66%, 11%).

30 Ejemplo 2 - Condensación mediada por PCl_3 de ácido 4,6-dicloro-2-formilamino-3-hidroxibenzoico (2-8) con aminas

35

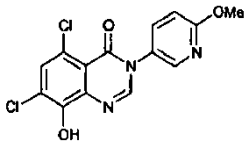
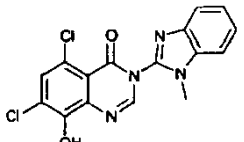
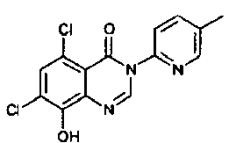
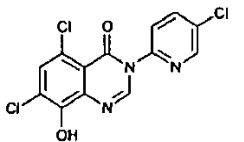
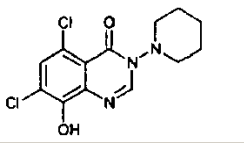
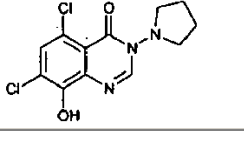


A una mezcla en agitación de ácido 4,6-dicloro-2-formilamino-3-hidroxibenzoico (2-8) (200 mg, 0.80 mmol), la amina (0.88 mmol) y tolueno (5 mL) se le agregó gota a gota una solución de PCl_3 (0.12 mL, 1.38 mmol) en tolueno (1 mL) en el transcurso de 2 minutos. La suspensión resultante se calentó a reflujo durante 4-16 horas y se enfrió. Se agregó NaHCO_3 saturado hasta pH 9. Después el pH de la mezcla se reajustó a 7 (HCl 5 N y se extrajo con diclorometano (3x), y los extractos se combinaron y se secaron (Na_2SO_4). Se eliminaron los volátiles que produjeron la 5,7-dicloro-8-hidroxi-3-(sustituida)-3H-quinazolin-4-ona (2-7). En algunos casos, el producto crudo se purificó a través de lavado con un solvente adecuado, generalmente éter dietílico o metanol al 5% en éter dietílico, o cromatografía en gel de SiO_2 o recristalización; los datos de caracterización para los compuestos 2-7A2 y 2-7M2 se muestran en la tabla 3. Otros compuestos 2-7 preparados a partir de 2-8 según el ejemplo 2 se muestran en la tabla 4.

Ejemplos de aminas utilizadas en el ejemplo 2: (C-tiazol-2-il)metilamina da 2-7A2, 2-(2-aminoetil)piridina da 2-7B2, 3-aminopiridina da 2-7C2, 4-aminomorfolina da 2-7D2, 1-amino-4-metilpiperazina da 2-7E2, 4-(aminometil)piperidina da 2-7F2, 5-amino-1-etilpirazol da 2-7G2, 5-amino-2-metoxipiridina da 2-7H2, 2-amino-1-metilbenzamidazol da 2-7I2, 2-amino-5-metilpiridina da 2-7J2, 2-amino-5-cloropiridina da 2-7K2, 1-aminopiperidina da 2-7L2 y 1-aminopirrolidina da 2-7M2. En el caso de sales de clorhidrato de amina, se agregaron equivalentes adecuados de una base como trietilamina a la mezcla de reacción. Otros compuestos preparados según el ejemplo 2 son 2-7O2 - 2-7AE2 (Tabla 4).

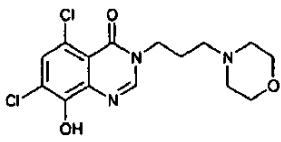
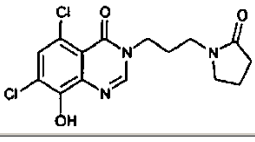
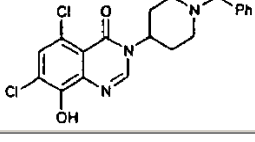
Tabla 3 Compuestos 2-7 preparados a partir de 2-8 según el ejemplo 2

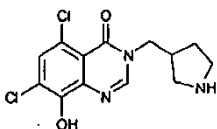
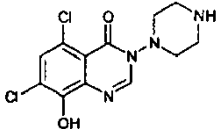
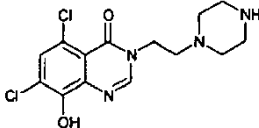
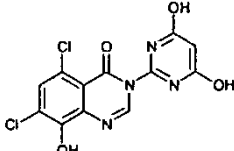
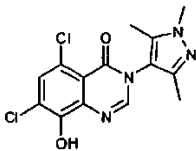
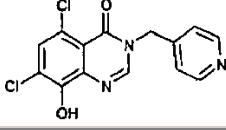
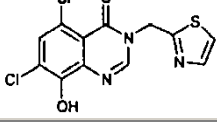
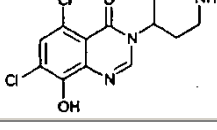
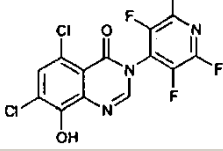
Compuesto	Estructura	Rendimiento (%)	Datos de $^1\text{H-NMR}^{\#}$	Datos espectrales de masas
2-7A2 (1082)		50	(DMSO- d_6): δ 9.23 (s, 1 H), 7.71 (s, 1 H), 7.53 (s, 1 H), 2.50 (s, 3 H)	m/z 326, 328, 330 ($M^+ - 1$, 100%, 66%, 11%)
2-7B2 (1091)		31	(DMSO- d_6): δ 10.6 (br, 1 H), 8.50 (d, J = 4.6, 1 H), 8.24 (s, 1 H), 7.71 (m, 1 H), 7.59 (s, 1 H), 7.29 (d, J = 7.9, 1 H), 7.25 (m, 1 H), 4.34 (t, J = 6.8, 2 H), 3.19 (t, J = 6.8, 2 H)	m/z 334, 336, 338 ($M^+ - 1$, 100%, 66%, 11%)
2-7C2 (1092)		60	(DMSO- d_6): δ 8.76 (d, J = 2.4, 1 H), 8.70 (d, J = 4.4, 1 H), 8.47 (s, 1 H), 8.03 (d, J = 8, 1 H), 7.67 (s, 1 H), 7.62 (dd, J = 8, 4.8, 1 H)	m/z 308, 310, 312 ($M^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)
2-7D2 (1080)		43	(CDCl_3): δ 8.18 (s, 1 H), 7.48 (s, 1 H), 4.22 (br, 2 H), 3.95 (br, 2 H), 3.78 (br, 2 H), 2.93 (br, 2 H)	m/z 314, 316, 318 ($M^+ - 1$, 100%, 66%, 11%)
2-7E2 (1081)		16	(CDCl_3): δ 8.15 (s, 1 H), 7.45 (s, 1 H), 4.30 (br, 2 H), 3.10 (br, 2 H), 2.59 (s, 3 H), 1.90 (br, 4 H)	m/z 329, 331, 333 ($M^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)
2-7F2 (1094)				m/z 328, 330, 332 ($M^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)
2-7G2 (1088)		42	(CDCl_3): δ 7.89 (s, 1 H), 7.49 (s, 1 H), 7.40 (s, 1 H), 6.22 (s, 1 H), 3.84 (m, 2 H), 1.32 (m, 3 H)	m/z 325, 327, 329 ($M^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)

Compuesto	Estructura	Rendimiento (%)	Datos de $^1\text{H-NMR}^{\#}$	Datos espectrales de masas
2-7H2 (1093)		45	(DMSO- d_6): δ 8.38 (s, 1 H), 7.74 (d, J = 4.0, 1 H), 7.64 (s, 1 H), 7.57 (dd, J = 2.4 and 9.6, 1 H), 6.42 (d, J = 9.6, 1 H), 3.91 (s, 3 H)	m/z 338, 340, 342 ($M^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)
2-7I2 (1083)		65	(DMSO- d_6): δ 8.17 (br, 1 H), 7.71 (m, 2 H), 7.41 (m, 2 H), 7.33 (m, 1 H), 3.70 (s, 3 H)	m/z 361, 363, 365 ($M^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)
2-7J2 (1089)		45	(DMSO- d_6): δ 8.55 (s, 1 H), 8.48 (s, 1 H), 7.88 (m, 1 H), 7.68 (m, 2 H), 2.40 (s, 3 H)	m/z 322, 324, 326 ($M^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)
2-7K2 (1087)		16	(DMSO- d_6): δ 8.76 (d, J = 2.4, 1 H), 8.59 (s, 1 H), 8.24 (dd, J = 2.4 and 8.4, 1 H), 7.86 (d, J = 8.4, 1 H), 7.70 (s, 1 H)	m/z 342, 344, 346 ($M^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)
2-7L2 (1086)		45	(DMSO- d_6): δ 8.27 (s, H), 7.59 (s, 1 H), 3.55 (s, 2 H), 3.15 (s, 2 H), 1.65 (m, 6 H).	m/z 314, 316, 318 ($M^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)
2-7M2 (1090)		33	(CDCl $_3$): δ 8.23 (s, 1 H), 7.36 (s, 1 H), 3.60 (m, 2 H), 3.37 (m, 1 H), 3.10 (m, 1 H), 1.91 (m, 4 H)	m/z 303, 305, 307 ($M^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)

[#]el desplazamiento químico para el 8-OH no se incluyó en las asignaciones

Tabla 4 Otros 2-7N2 - 2-7AE2 preparados a partir de 2-8 según el ejemplo 2

Compuesto	Estructura
2-7N2	
2-7O2	
2-7P2	

Compuesto	Estructura
2-7Q2	
2-7R2	
2-7S2	
2-7T2	
2-7U2	
2-7V2	
2-7W2	
2-7X2	
2-7Y2	
2-7Z2	

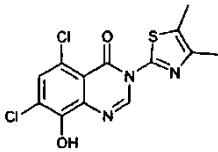
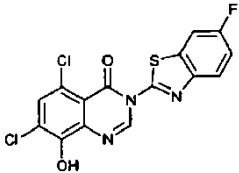
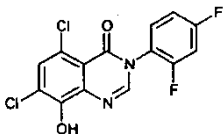
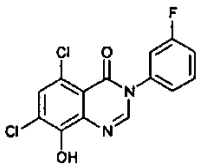
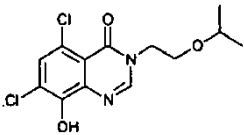
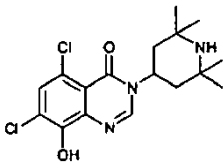
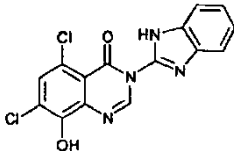
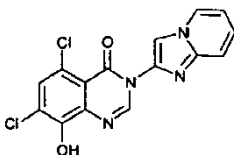
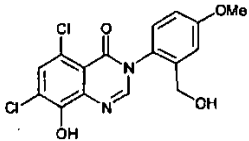
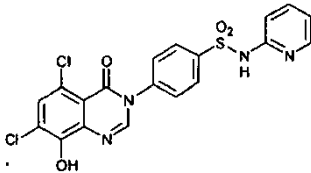
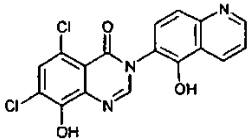
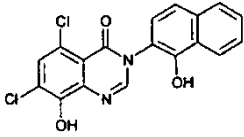
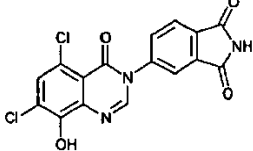
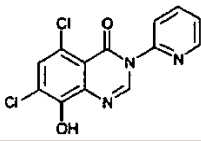
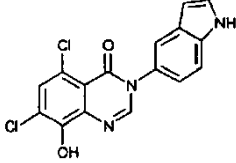
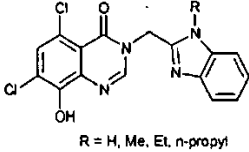
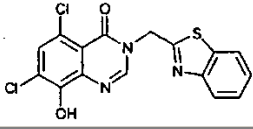
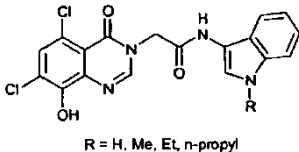
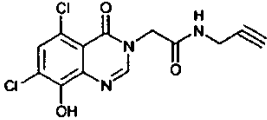
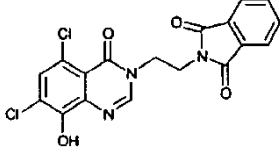
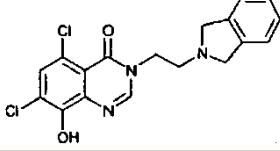
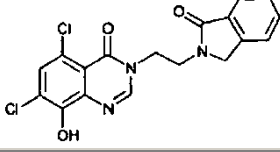
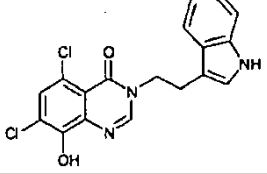
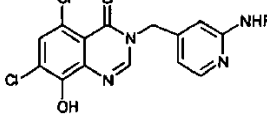
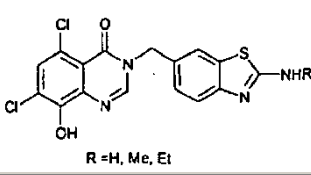
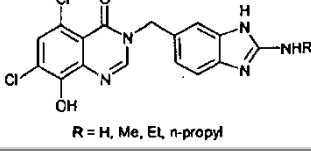
Compuesto	Estructura
	
2-7AA2	
2-7AB2	
2-7AC2	
2-7AD2	
2-7AE2	

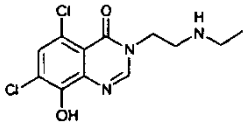
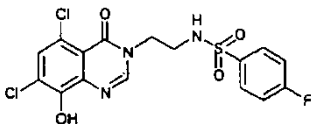
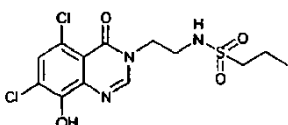
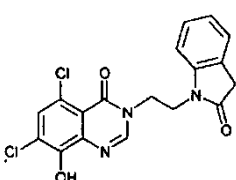
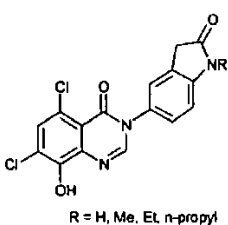
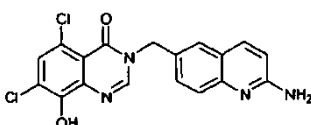
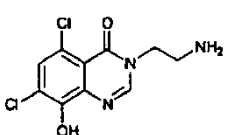
Tabla 5 Otros compuestos preparados según los ejemplos 1 y 2

Compuesto	Estructura
8A1	
8B1	
8C1	

Compuesto	Estructura
	
8D1	
8E1	
8F1	
8G1	
8H1	
8I1	
8J1	 <p>R = H, Me, Et, n-propyl</p>
8K1	
8L1	

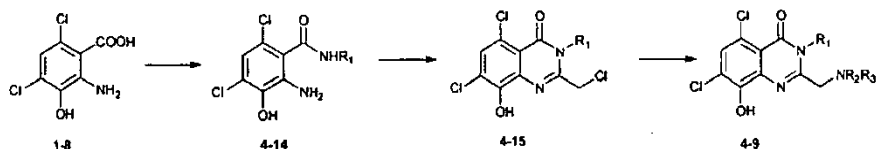
Compuesto	Estructura
8M1	 R = Me, Et, iso-propyl, n-propyl, n-butyl
8N1	
8O1	
8P1	
8Q1	
8R1	
8S1	 R = H, Me, Et, n-propyl
8T1	
8U1	

Compuesto	Estructura
	 <p>R = H, Me, Et, n-propyl</p>
8V1	
8W1	
8X1	
8Y1	
8Z1	
8A2	 <p>R = H, Me, Et</p>
8B2	 <p>R = H, Me, Et</p>
8C2	 <p>R = H, Me, Et, n-propyl</p>
8D2	

Compuesto	Estructura
	
8E2	
8F2	
8G2	
8H2	 R = H, Me, Et, n-propyl
8I2	
8J2	

Ejemplo 3 Preparación de 2,3-disustituidas-3H-quinazolin-4-onas (4-9)

5



- 10 Paso 1: A una solución del ácido 1-8 (1.00 g, 4.50 mmol) en benceno anhidro (8.3 mL) se le agregó gota a gota cloruro de tionilo (2.09 g, 17.6 mmol) en atmósfera de argón. La mezcla se calentó a reflujo durante 5 h tiempo luego del cual se eliminaron el exceso de cloruro de tionilo y benceno por evaporación. El residuo se disolvió en diclorometano anhidro (8.3 mL), se enfrió hasta 0 °C y se trató con n-propilamina (798 mg, 13.5 mmol). La mezcla se agitó a 0 °C durante 15 min, después se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante otras 16 h. La
- 15 evaporación y purificación del residuo crudo por cromatografía en columna (acetato de etilo/éter de petróleo, 3:7 - 1:1) produjo la benzamida, 2-amino-4,6-dicloro-3-hidroxi-N-(n-propil)benzamida (4-14, R₁ = n-propil), como un sólido anaranjado (550 mg, 46%).

2-amino-4,6-dicloro-3-hidroxi-N-propilbenzamida: ^1H NMR (DMSO-d_6): δ 8.39 (t, $J = 5.6$, 1 H), 6.67 (s, 1 H), 4.94 (br, 1 H), 3.16 (m, 2 H), 2.44 (m, 2 H), 1.50 (m, 2 H), 0.88 (m, 3 H).

- 5 Paso 2: A una solución de 2-amino-4,6-dicloro-3-hidroxi-N-propilbenzamida (1.00 g, 4.50 mmol) en ácido acético glacial (5.5 mL) se le agregó gota a gota cloruro de cloro acetilo (718 mg, 6.36 mmol) en atmósfera de argón. La mezcla se calentó a reflujo durante 2 h y después se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla de reacción se evaporó al vacío y el residuo se neutralizó con NaOH 2 M. El precipitado se aisló por filtración, se lavó con agua y se secó al vacío. Se agregó diclorometano (10 mL) al residuo resultante y el material insoluble se separó por filtración. El filtrado se concentró para producir el cloruro, 2-clorometil-5,7-dicloro-8-hidroxi-3-n-propil-3H-quinazolin-4-ona (4-15, $R_1 = n$ -propil), como un sólido anaranjado (600 mg, 89%).

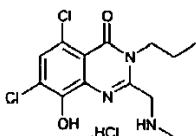
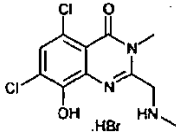
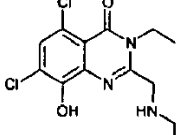
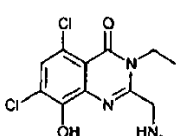
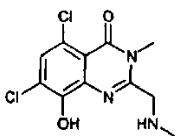
2-clorometil-5,7-dicloro-8-hidroxi-3-n-propil-3H-quinazolin-4-ona: ^1H NMR (DMSO-d_6): δ 7.86 (s, 1 H), 5.15 (s, 2 H), 4.27 (s, 2 H), 1.52 (m, 2 H), 0.93 (m, 3 H); espectro de masas: m/z 323, 325, 327 ($M^+ + 1$, 100%, 66%, 11%).

- 15 Paso 3: A una solución de 2-clorometil-5,7-dicloro-8-hidroxi-3-n-propil-3H-quinazolin-4-ona (285 mg, 0.886 mmol) en THF anhidro (1.3 mL) se le agregó gota a gota una solución de metilamina en etanol (7.5 mL de una solución 8.0 M, 60 mmol) en atmósfera de argón. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 h, después se concentró y al residuo resultante se le agregó HCl 2 M (5 mL).

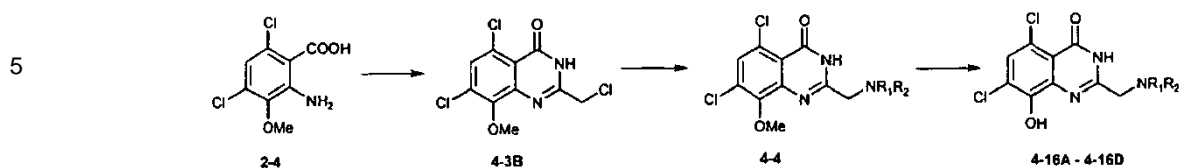
- 20 La mezcla se evaporó y se le agregó más HCl 2 M (5 mL). El residuo se evaporó y el procedimiento se repitió dos veces más. La mezcla se trituró con diclorometano y se secó al vacío para producir clorhidrato de 5,7-dicloro-8-hidroxi-2-metilaminanometil-3-n-propil-3H-quinazolin-4-ona (4-9A) como un sólido amarillo (157 mg, 50%) (Tabla 6).

- 25 Otras 2,3-disustituidas-3H-quinazolin-4-onas (4-9B-4-9E) preparadas a través de la sustitución de n-propilamina (Paso 1) y metilamina (Paso 3) en el ejemplo 3 para la(s) amina(s) adecuada(s) se muestran en la tabla 6.

Tabla 6 Compuestos 4-9A - 4-9E preparados según el ejemplo 3

Compuesto	Estructura	Datos de ^1H -NMR	Datos espectrales de masas
4-9A		(DMSO-d_6): δ 7.06 (s, 1 H), 4.57 (m, 2 H), 3.83 (t, $J = 6.0$, 2 H), 3.14 (m, 1 H), 2.80 (d, $J = 4.4$, 3 H), 1.49 (q, $J = 7.2$, 2 H), 0.90 (t, $J = 7.2$, 3 H)	m/z 316, 318, 320 ($M^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)
4-9B		(DMSO-d_6): δ 7.66 (s, 1 H), 4.52 (br, 2 H), 3.41 (s, 3 H), 3.15 (br, 1 H), 2.73 (br, 3 H)	m/z 288, 290, 292 ($M^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)
4-9C			
4-9D			
4-9E			

Ejemplo 4 - Preparación de 2-sustituidas-3H-quinazolin-4-onas (4-16A - 4-16D)

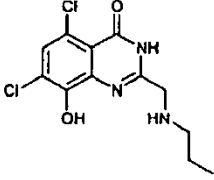
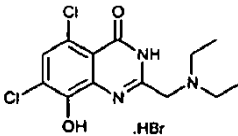
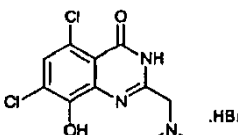


10 A una solución enfriada con hielo de metóxido de sodio en metanol (2.8 mL de una solución 0.32 M, 0.89 mmol) se le agregó gota a gota cloroacetonitrilo (0.25 mL, 3.90 mmol) en atmósfera de argón.⁷ La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se volvió a enfriar a 0 °C antes de la adición de una solución de 2-4 (0.80 g, 3.39 mmol) en metanol anhidro (14 mL). La solución se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 20 h y se calentó a reflujo durante otras 20 h. La evaporación y purificación del residuo resultante por cromatografía (acetato de etilo/éter de petróleo, 3:7) produjo el cloruro 4-3B como un sólido blanco (225 mg, 23%).

20 El tratamiento subsiguiente de 4-3B con una amina adecuada según las condiciones descritas en el paso 3 del ejemplo 3 dio la 2-sustituida-8-metoxi-3H-quinazolin-4-ona: etilamina dio 4-4A, 1-propilamina dio 4-4B, dietilamina dio 4-4C, y dimetilamina dio 4-4D. La respectiva eliminación subsiguiente del grupo protector 8-metoxi según el procedimiento de desprotección general (Ejemplo 1, Método A) dio 4-16A - 4-16D (Tabla 7).

Tabla 7 Compuestos 4-4A - 4-4D y 4-16A - 4-16D preparados según el ejemplo 4

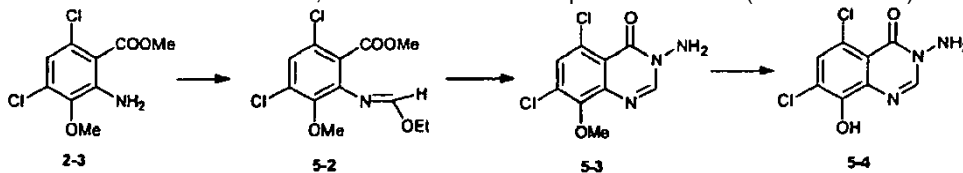
Compuesto	Estructura	Datos de ¹ H-NMR	Datos espectrales de masas
4-4A*			
4-4B*			
4-4C*		(DMSO-d ₆): δ 7.63 (s, 1 H), 3.94 (s, 3 H), 3.55 (s, 2 H), 2.61 (q, J = 7.2, 4 H), 0.98 (t, J=7.2,6H)	m/z 328, 330, 332 (M ⁺ + 1, 100%, 66%, 11%)
4-4D*		(DMSO-d ₆): δ 7.64 (s, 1 H), 3.95 (s, 3 H), 2.27 (s, 6 H)	m/z 302, 304, 306 (M ⁺ + 1, 100%, 66%, 11%)
4-16A			
4-16B			

Compuesto	Estructura	Datos de $^1\text{H-NMR}$	Datos espectrales de masas
			
4-16C		(DMSO- d_6): δ 7.36 (s, 1 H), 4.34 (s, 2 H), 3.28 (q, J = 7.2, 4 H), 1.20 (t, J = 7.2, 6 H)	m/z 316, 318, 320 ($M^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)
4-16D		(DMSO- d_6): δ 7.63 (s, 1 H), 4.39 (s, 2 H), 2.99 (s, 6 H)	m/z 288, 290, 292 ($M^+ + 1$, 100%, 66%, 11%)

*Sólo para referencia

Preparación del bromhidrato de 3-amino-5,7-dicloro-8-hidroxi-3H-quinazolin-4-ona (5-4 o PB 1099)

5



10 Una solución del éster metílico del ácido 2-amino-4,6-dicloro-3-metoxibenzoico (2-3) (6.35 g, 25.4 mmol) y ortoformiato de trietilo (60 mL, 361 mmol) se calentó a reflujo durante 5 días. La solución se enfrió hasta temperatura ambiente y se evaporó a presión reducida para producir el imidato, éster metílico del ácido 4,6-dicloro-2-etoximetilenoamino-3-metoxibenzoico (5-2), y el material de partida (7.80 g) como un aceite marrón; 5-2:2-3 - 9:1.

15 Éster metílico del ácido 4,6-dicloro-2-etoximetilenoamino-3-metoxibenzoico (5-2): $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ 7.99 (s, 1 H), 7.48 (s, 1 H), 4.22 (q, 2 H), 3.79 (s, 3 H), 3.62 (s, 3 H), 1.28 (t, J = 7.2, 3 H).

20 A una solución enfriada en hielo del imidato 5-2 (400 mg, 1.31 mmol) en etanol (12 mL), se le agregó hidrato de hidrazina (1.8 mL, 57.8 mmol) en atmósfera de argón. Luego de 15 min, la solución se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante otras 2 h. La suspensión espesa se diluyó con etanol y se filtró. El sólido se lavó con etanol frío y se secó al vacío para dar 3-amino-5,7-dicloro-8-metoxi-3H-quinazolin-4-ona (5-3) como un sólido esponjoso blanco (289 mg, 85%).

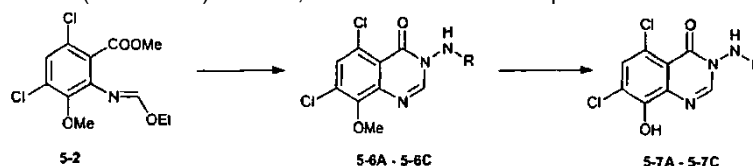
25 3-Amino-5,7-dicloro-8-metoxi-3H-quinazolin-4-ona (5-3): $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ 8.48 (s, 1 H), 7.74 (s, 1 H), 5.85 (s, 2 H), 3.94 (s, 3 H); espectro de masas: m/z 260, 262, 264 ($M^+ + 1$, 100%, 66%, 11%).

30 Una solución de 5-3 (60 mg, 0.231 mmol) y ácido bromhídrico acuoso al 48% (2 mL) se calentó a 120 °C durante 2 h. La solución se enfrió hasta temperatura ambiente y el precipitado se aisló por filtración, se lavó sucesivamente con diclorometano y éter dietílico, y se secó al vacío para proporcionar bromhidrato de 3-amino-5,7-dicloro-8-hidroxi-3H-quinazolin-4-ona (5-4) como un sólido blanco (44 mg, 58%).

Bromhidrato de 3-amino-5,7-dicloro-8-hidroxi-3H-quinazolin-4-ona (5-4): $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ 8.44 (s, 1 H), 7.60 (s, 1 H); m/z 246, 248, 250 ($M^+ + 1$, 100%, 66%, 11%).

35 Ejemplo 5 - Preparación de 3-(sustituidas)amino-5,7-dicloro-8-hidroxi-3H-quinazolin-4-onas

40



A una suspensión enfriada en hielo de clorhidrato de fenilhidrazina sustituida (1.61 mmol) en etanol (4 mL) se le agregó trietilamina (185 mg, 1.83 mmol) en atmósfera de argón. La mezcla se agitó a 0 °C durante 15 min previo a la adición de una solución del imidato 5-2 (180 mg, 0.59 mmol) en etanol (3 mL). La mezcla resultante se agitó a 0 °C durante 40 min, después a temperatura ambiente durante 4 días. La suspensión se filtró y el sólido blanco se lavó con etanol frío y se secó al vacío para producir el compuesto 8-metoxi-3-(sustituido)amino 5-6.

Ejemplos de hidrazinas utilizadas: el clorhidrato de 2,4-difluorofenilhidrazina da 5-6A, el clorhidrato de 4-metoxifenilhidrazina da 5-6B y el clorhidrato de 4-fluorofenilhidrazina da 5-6C.

Una solución del compuesto 8-metoxi (5-6A, 5-6B o 5-6C) (0.133 mmol) y ácido bromhídrico acuoso al 48% (3 mL) se calentó a 120 °C durante 6 horas, y se dejó que alcanzara la temperatura ambiente. El sólido se aisló por filtración, se lavó con diclorometano y éter dietílico y se secó al vacío para dar el compuesto 3-(sustituido)amino (5-7A, 5-7B o 5-7C) (Tabla 8).

Tabla 8 Compuesto preparados según el ejemplo 5

Compuesto	Estructura	Rendimiento (%)	Datos de ¹ H-NMR [#]	Datos espectrales de masas
5-6A*		32	(DMSO-d ₆): δ 9.16 (s, 1 H), 8.62 (s, 1 H), 7.80 (s, 1 H), 7.29 (td, J = 2.4 and 9.2, 1 H), 6.89 (m, 2 H), 3.99 (s, 3 H)	m/z 372, 374, 376 (M ⁺ + 1, 100%, 66%, 11%)
5-6B*				
5-6C*				
5-7A (1100)		23	(DMSO-d ₆): δ 9.15 (s, 1 H), 8.60 (s, 1 H), 7.66 (s, 1 H), 7.29 (m, 1 H), 6.81 (m, 2 H).	m/z 356, 358, 360 (M ⁺ - 1, 100%, 66%, 11%)
5-7B				
5-7C				

[#]los desplazamientos químicos para el 8-OH y HBr (cuando corresponde) no fueron incluidos en las asignaciones

*Sólo para referencia

Tabla 9 Compuestos preparados según los procesos descritos en el esquema 5

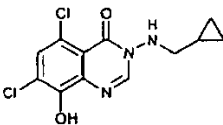
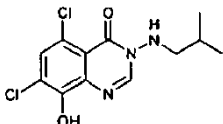
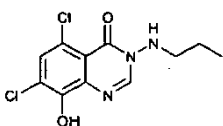
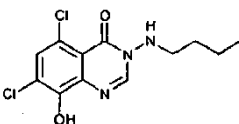
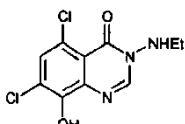
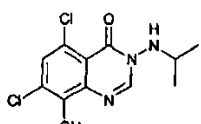
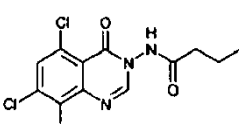
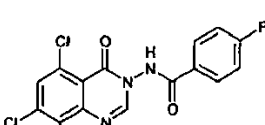
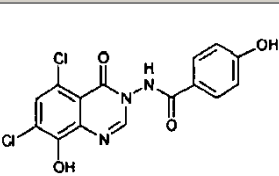
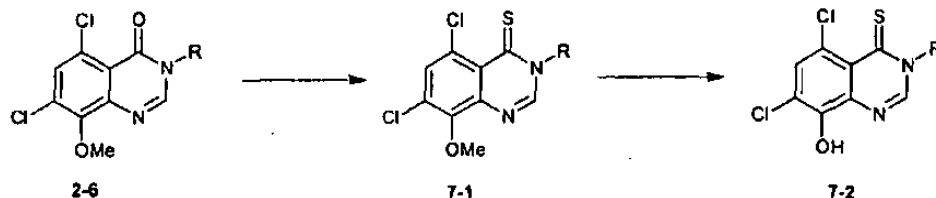
Compuesto	Estructura
5-7D	
5-7E	
5-7F	
5-7G	
5-7H	
5-7I	
5-5A	
5-5B	
5-5C	

Tabla 10 Compuestos preparados por alquilación o acilación de algunos de los compuestos de las tablas 1 y 2

Compuesto	Estructura	Precursor
6-1		2-7S2
6-2		2-7X2
6-3		2-7R2
6-4		2-7Q2
6-5		2-7I1
6-6		2-7S2

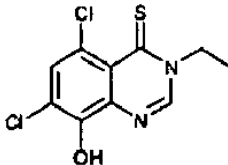
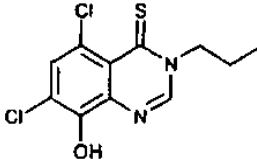
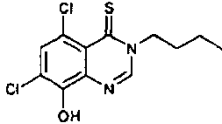
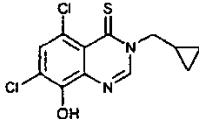
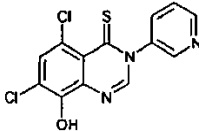
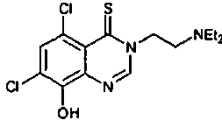
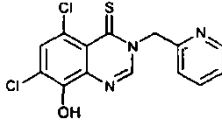
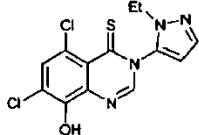
Ejemplo 6 - Preparación de 3-sustituida-3H-quinazolin-4-tiona (7-2)



Una mezcla de la 3-sustituida-3H-quinazolin-4-ona (0.70 mmol), P_4S_{10} (0.93 mmol) y piridina (5 mL) se calentó a reflujo. Cuando la reacción se completó, controlada por análisis de TLC, la mezcla se concentró hasta sequedad y el residuo resultante dio, después de la cromatografía en columna (SiO_2 ; eluyendo con acetato de etilo/metanol, 100:1), la 3H-quinazolin-4-tiona 7-1 correspondiente.

Una mezcla de la 3H-quinazolin-4-tiona 7-1 se trató con BBr_3 según las condiciones descritas previamente en el ejemplo 1. El tratamiento de la manera usual con metanol proporcionó la 3H-quinazolin-4-tiona 7-2 correspondiente (Tabla 11).

Tabla 11 Compuestos preparados según el ejemplo 6

Compuesto	Estructura
7-2A	
7-2B	
7-2C	
7-2D	
7-2E	
7-2F	
7-2G	
7-2H	

Ejemplo 7 - Evaluación de los compuestos de fórmula I

- 5 Los ensayos siguientes se utilizaron en la evaluación de los compuestos de fórmula I para determinar su idoneidad para ser utilizados en los métodos de la invención

Ensayo 1. Ensayo fluorométrico de H₂O₂

- 10 Se usó un ensayo fluorométrico para probar la capacidad de un compuesto de prueba para inhibir la generación de peróxido de hidrógeno por Aβ en presencia de cobre basado en diacetato de diclorofluoresceína (DCF; Molecular Probes, Eugene OR). La solución de DCF (5 mM) en dimetilsulfóxido al 100% (previamente purgado con argón durante 1 h a 20 °C) se desacetiló en presencia de NaOH 0.025 M durante 30 min y se neutralizó a pH 7.4 hasta una

concentración final de 1 mM. Se preparó una solución madre de peroxidasa de rábano (HRP) en una concentración de 1 μ M a pH 7.4. Las reacciones se llevaron a cabo en PBS, pH 7.4 en una placa de 96 pocillos (volumen total = 250 μ l/pocillo). Las soluciones de reacción contenían A β 1-42 a concentraciones en el rango de 50 nM a 1 μ M, quelato de cobre-glicina (Cu-Gly), se preparó agregando CuCl₂ a glicina en una relación 1:6 y se agregó a A β en la proporción 2Cu-Gly:1A β), reductores incluída dopamina (5 μ M) o ácido ascórbico, DCF desacetilada 100 μ M, y HRP, 0.1 μ M. EDTA 1-10 μ M u otro quelante también puede estar presente como control para el cobre libre, pero no fue necesario para que el ensayo funcionara. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 60 min. Pueden incluirse como controles positivos estándares de catalasa (4000 unidades/ml) y H₂O₂ (1-2.5 μ M) en PBS pH 7.4. La fluorescencia se registró utilizando un lector de placas con filtros de excitación y emisión a 485 nm y 530 nm, respectivamente. La concentración de H₂O₂ se puede establecer comparando la fluorescencia con los estándares de H₂O₂. La inhibición de la producción de H₂O₂ por A β se evaluó incluyendo una concentración conocida de compuesto(s) de prueba en los pocillos de prueba.

Ensayo 2. Ensayos de neurotoxicidad

Cultivos primarios de neuronas corticales

Se prepararon cultivos corticales según se describió previamente (White et al., 1998). Se extrajeron córtex embrionarios del día 14 de ratón BL6Jx129sv, se disecaron sin meninges y se disociaron en tripsina al 0.025% (peso/vol). Las células disociadas se distribuyeron en placas de cultivo de 48 pocillos a una densidad de 2×10^6 células/ml en MEM con 25% (vol/vol) de FCS y 5% (vol/vol) de HS y se incubaron a 37 °C durante 2 h. Después los medios se reemplazaron con medio Neurobasal (Invitrogen Life Technologies) y suplementos B27 (Invitrogen Life Technologies). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en 5% de CO₂. Antes de la experimentación, el medio de cultivo se reemplazó con medio neurobasal y B27 sin antioxidantes (Invitrogen Life Technologies).

Cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo

Se extrajeron cerebelos de ratones, 5-6 días después del nacimiento (P5-6) y se disecaron sin meninges y se disociaron en tripsina al 0.025%. Las neuronas granulares del cerebelo (CGN) se distribuyeron en placas de cultivo de 24 pocillos a una concentración de 350 000 células/cm² en BME (Invitrogen Life Technologies) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FCS), glutamina 2 mM y KCl 25 mM. Se agregó sulfato de gentamicina (100 μ g/mL) a todos los medios distribuidos en placas y los cultivos se mantuvieron a 37° C en 5% de CO₂.

Ensayo 3. Ensayos de viabilidad celular

(a) Ensayo MTS de viabilidad celular

Se determinó la viabilidad celular usando el ensayo MTS. El medio de cultivo se reemplazó con medio neurobasal recién preparado más suplementos B27 menos antioxidantes. Volumen 1/10 de solución MTS (Cell Titre 96 Aqueous One, Promega Corporation) y se incubó a 37 °C durante 2 h. Se midieron alícuotas de 200 microlitros con un espectrofotómetro a 560 nm.

(b) Ensayo LDH de viabilidad celular

Se determinó la muerte celular a partir de sobrenadantes de cultivo exentos de suero y residuos celulares usando el kit de detección de citotoxicidad de lactato deshidrogenasa (LDH) (Boehringer Ingelheim) según las instrucciones del fabricante.

(c) Ensayo de neurotoxicidad de A β y neuroprotección de A β

Se cultivaron células neuronales corticales durante cinco días según el ensayo 2. El día seis se reemplazaron los medios neurobasal (NB) (Invitrogen Life Technologies) y el suplemento B27 (Invitrogen Life Technologies) con medio NB y suplemento B27 (sin antioxidantes). El día seis, se agregaron individualmente los compuestos de prueba a los cultivos de células neuronales.

Los compuestos de prueba se disolvieron en DMSO al 100% hasta una concentración de 2.5 mM (10 mM si se había pesado un exceso del compuesto por vial - después diluida a 2.5 mM). Se diluyó serialmente 1 en 10 la solución madre 2.5 mM para dar soluciones de trabajo 250 μ M, 25 μ M, y 2.5 μ M. Preparación de A β :

A β se disolvió inicialmente en NaOH 20 mM hasta una concentración de 1 mM y se sometió a ultrasonido durante 5 minutos. Después el péptido se diluyó en H₂O y 10 X PBS hasta una concentración final de 200 μ M de A β en 1 X PBS. El péptido se volvió a someter a ultrasonido durante 5 minutos y luego se hizo girar a 14 000 rpm durante 5 min y se transfirió a un tubo nuevo.

Los compuestos de prueba se disolvieron en DMSO al 100% hasta una concentración de 2.5 mM (10 mM si se había pesado un exceso del compuesto por vial - después diluida a 2.5 mM). La solución 2.5 mM se diluyó

serialmente 1 en 10 [en medio NB y B27 (sin antioxidantes)] para dar soluciones de trabajo 250 μ M, 25 μ M, 2.5 μ M. Los compuestos de prueba no se agregaron directamente a las células, sino que se agregaron a la "placa de fármaco" de 48 pocillos según se indica a continuación:

5 Preparación de la "placa de fármaco".

A una placa de 48 pocillos agregar:

- 10 Pocillo 1: 515 μ l de NB + B27 (sin antioxidante)* + 24 μ l de compuesto de prueba 25 μ M + 60 μ l de diluyente de A β **
 Pocillo 2: 515 μ l de NB + B27 (sin antioxidante) + 24 μ l de compuesto de prueba 250 μ M + 60 μ l de diluyente de A β
 Pocillo 3: 515 μ l de NB + B27 (sin antioxidante) + 24 μ l de diluyente de compuesto de prueba*** + 60 μ l de A β 1-42
 15 Pocillo 4: 515 μ l de NB + B27 (sin antioxidante) + 24 μ l de compuesto de prueba 25 μ M + 60 μ l de A β 1-42
 Pocillo 5: 515 μ l de NB + B27 (sin antioxidante) + 24 μ l de compuesto de prueba 25 μ M + 60 μ l de A β 1-42
 Pocillo 6: 515 μ l de NB + B27 (sin antioxidante) + 24 μ l de compuesto de prueba 250 μ M + 60 μ l de diluyente de A β 1-42
 20 Pocillo 7: 515 μ l de NB + B27 (sin antioxidante) + 24 μ l de diluyente de compuesto de prueba + 60 μ l de diluyente de A β 1-42
 Pocillo 8: 600 μ l de NB + B27 (sin antioxidante)

N.B. 60 μ l de A β 1-42 equivale a 20 μ l de A β 1-42 por pocillo que equivale a A β 1-42 20 μ M

- 25 La placa de fármaco se incubó a 37 °C durante 15 minutos. Se agregaron 200 μ l de cada pocillo por triplicado a la placa de células correspondiente. La placa de células se incubó a 37 °C durante 4 días.

* Medio NB + B27 (sin antioxidantes),

** Diluyente de A β NaOH 2 mM, 1 X PBS

- 30 *** Diluyente de PBT DMSO al 10% en NB + B27 (sin antioxidantes)

Finalización del ensayo:

Al 4º día después de tratar las células el ensayo se finalizó agregando MTS a las células.

- 35 (d) Ensayo de citotoxicidad del compuesto de prueba

Se cultivaron células neuronales corticales durante cinco días según el ensayo 2 en medio NB y suplemento B27.

- 40 El día seis los compuestos de prueba se agregaron a los cultivos de células neuronales en medio NB y suplemento B27 sin los antioxidantes.

- 45 Los compuestos de prueba se disolvieron en DMSO al 100% hasta una concentración de 2.5 mM (10 mM si se se había pesado un exceso del compuesto por vial - después diluida a 2.5 mM). Se diluyó serialmente 1 en 10 la solución madre 2.5 mM para dar soluciones de trabajo 250 μ M, 25 μ M, y 2.5 μ M. Los compuestos de prueba no se agregaron directamente a las células, sino que se agregaron a la "placa de fármaco" de 48 pocillos según se indica a continuación:

Preparación de la "placa de fármaco".

- 50 A una placa de 48 pocillos agregar:

- 55 Pocillo 1: 576 μ l de NB + B27 (sin antioxidante)* + 24 μ l de compuesto de prueba 2.5 μ M
 Pocillo 2: 576 μ l de NB + B27 (sin antioxidante) + 24 μ l de compuesto de prueba 25 μ M
 Pocillo 3: 576 μ l de NB + B27(sin antioxidante) + 24 μ l de compuesto de prueba 250 μ M
 Pocillo 4: 576 μ l de NB + B27 (sin antioxidante) + 24 μ l de compuesto de prueba 2.5 μ M
 Pocillo 5: 576 μ l de NB + B27 (sin antioxidante) + 24 μ l de compuesto de prueba 25 μ M
 Pocillo 6: 576 μ l de NB + B27(sin antioxidante) + 24 μ l de compuesto de prueba 250 μ M
 Pocillo 7: 576 μ l de NB + B27 (sin antioxidante) + 24 μ l de diluyente del compuesto de prueba**
 60 Pocillo 8: 600 μ l de NB + B27 (sin antioxidante)

La placa de fármaco se incubó a 37 °C durante 15 minutos. Se agregaron 200 μ l de cada pocillo por triplicado a la placa de células correspondiente. La placa de células se incubó a 37 °C durante 4 días (se probaron dos compuestos en cada placa de células)

- 65 * Medio NB + B27 (sin antioxidantes),

** Diluyente de PBT DMSO al 10% en NB + B27 (sin antioxidantes)

Al finalizar el ensayo se agregó un volumen de 1/10 de MTS por cada pocillo de placa (es decir 25 µl/250 µl). Las placas se incubaron a 37 °C durante 2 horas y después se leyó la absorbancia a 560 nm.

Ensayo 4. Ensayo de caspasa

Para medir la actividad de caspasa en cultivos neuronales, se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron dos veces con solución salina de control (pH 7.4) y se agregó directamente a los cultivos tampón de extracción de células helado. El tampón de extracción consistía en Tris 20 mM (pH 7.4), sacarosa 1 mM, EDTA 0.25 mM, ditioneitol 1 mM (DTT), PMSF 0.5 mM, Tritón X-100 (Tx-100) al 1% y 1 µg/mL de pepstatina y aprotinina. Luego de la incubación durante 15 min en hielo, el tampón de extracción se retiró, se centrifugó durante 5 min a 4 °C en una microcentrífuga y se agregaron 100 µl de sobrenadante a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Se agregaron 100 µL de sustrato 200 µM (DEVD-pNA, VEID-pNA o IETD-pNA para caspasas 3, 6 y 8, respectivamente) a cada pocillo para dar una concentración final de sustrato 100 µM. Las placas se incubaron a 37 °C durante 2, 4, 6 o 24 h y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 415 nm (Abs 415). La lectura de absorbancia se comparó con un estándar conocido de pNA solo.

Ensayo 5. Ensayo de anexina V

Para determinar el nivel de unión de anexina V a las células, se lavaron dos veces los cultivos con solución salina de control (pH 7.4) seguido de la adición de anexina V-FITC a una concentración de aproximadamente 0.5 µg/mL en solución salina de control (pH 7.4). También se agregó yoduro de propidio (10 µg/mL) a los cultivos al mismo tiempo. Las células se incubaron en la oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente y a continuación se lavaron tres veces con solución salina de control recién preparada. El análisis de fluorescencia FITC (ex. 488 nm, em. 510 nm) se realizó con un microscopio Leica DMIRB. Se tomaron fotografías con un accesorio de cámara Leica MPS 60 usando película en color ASA400, y los negativos se escanearon en Adobe Photoshop v2.0.1.

Ensayo 6. Ensayo de oxidación de lipoproteína

Se pueden usar dos ensayos diferentes de peroxidación lipídica mediada por metal. El primer ensayo implica medir la actividad oxidativa de proteínas metalizadas. Esta se determina mezclando proteína metalizada dializada o nativa (en las concentraciones indicadas) con 0.5 mg/mL de LDL durante 24 horas (37 °C). La peroxidación lipídica (LPO) se mide utilizando un kit de ensayo de peroxidación lipídica (LPO 486, Oxis International Inc. Portland, OR) según las instrucciones del kit. El nivel de LPO se determina comparando la absorbancia (486 nm) con la de LDL sola (100% LPO). El segundo ensayo se usa para medir la actividad LPO de las proteínas nativas en presencia de Cu libre, no unido a proteínas. Esto implica agregar péptidos no metalizados (140 µM) a 0.5 mg/mL de LDL junto con Cu-gly 20 µM y determinar LPO como para las proteínas metalizadas. El nivel de LPO se determina comparando la absorbancia (486 nm) con la de LDL + Cu-gly (100% de LPO). Como control negativo, también se expone LDL a soluciones dializadas Cu-gly comparables a las utilizadas para metalizar con Cu las proteínas.

Ensayo 7. Citotoxicidad inducida por proteínas metalizadas con Cu

Se mezclan proteínas o péptidos sintéticos con soluciones de metal- glicina en una concentración equimolar o 2 veces la concentración de metal respecto a la concentración de proteína. Las mezclas de metal-proteína se incuban toda la noche a 37 °C y después se dializan extensivamente (24 h contra dos cambios de dH₂O (3 L/cambio) a temperatura ambiente) usando vasos de minidiálisis con un corte a 3500 kilodalton (Pierce, Rockford, IL). La diálisis de las proteínas contra PBS de pH 7.4 resultó en proteínas metalizadas con actividad idéntica a la diálisis con dH₂O.

Para determinar sus efectos neurotóxicos, las proteínas metalizadas, las proteínas nativas o los péptidos se agregan a cultivos primarios de neuronas corticales de 2 días de antigüedad. Los cultivos también se exponen a Cu-gly (5 o 10 µM) o LDL. Los cultivos de control positivos se tratan con Cu-gly + LDL o el producto de LPO, 4-hidroxi-nonenol (HNE, Sigma Chemicals). Los cultivos se analizan para determinar la muerte celular con el kit de ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH) (Roche Molecular Biochemicals, Nunawading, Australia) según las instrucciones del fabricante.

Ensayo 8. Ensayo de naranja de acridina para pérdida de acidificación lisosómica mediada por Ap.

Se tratan neuronas corticales de ratón cultivadas con Aβ1-42 (20 µM) durante 16 h y después se tiñen con naranja de acridina (NA) 5 mg/ml durante 5 min a 37 °C. La fluorescencia inducida por NA se mide con un filtro rojo en un microscopio de fluorescencia. NA es una base débil lisosomotrópica que se acumula en los compartimientos endosómicos/lisosómicos y presenta fluorescencia naranja durante la incubación. La NA es secuestrada dentro de los lisosomas, mientras haya un gradiente de protones sustancial en las membranas lisosómicas. El tratamiento de las células con Aβ1-42 interrumpe el gradiente de protones de la membrana lisosómica y relocaliza la NA en el citosol, como se indica por la pérdida de fluorescencia naranja dentro de 16-24 h.

Ensayo 9. Ensayo de solubilización de amiloide de cerebro humano

Este ensayo se llevó a cabo con el fin de evaluar la capacidad de un compuesto de prueba para movilizar A β desde la fase insoluble a la fase soluble de un extracto de tejido de un cerebro humano con EA post mortem.

Hasta 0.5 g de corteza que contenía placa sin meninges se homogeneizó usando un homogeneizador DIAX 900 (Heudolph y Co, Kelheim, Alemania) u otro dispositivo adecuado durante tres períodos de 30 segundos a toda velocidad en hasta 2 ml de solución salina amortiguada con fosfato helada, pH 7.4. Para obtener la fracción extraíble con la solución salina amortiguada con fosfato, el homogeneizado se centrifugó a 100 000 x g durante 30 min y se eliminó el sobrenadante. Alternativamente, el tejido se liofilizó, después se pulverizó para formar un polvo que luego se pesó en alícuotas para extraer como se mencionó antes. Se retiró una alícuota de 10 μ l del sobrenadante después de la centrifugación y se mezcló con un volumen igual de tampón de muestra 2XTris-Tricina SDS, pH 8.3, que contenía 8% de SDS y 10% de 2-mercaptoetanol. Después las muestras se calentaron durante 10 min a 90 °C y se separaron por electroforesis en gel. La fracción insoluble de las muestras corticales se obtuvo resuspendiendo la muestra sedimentada inicial en 1 ml de solución salina amortiguada con fosfato. Después una alícuota de 50 μ l de esta suspensión se llevó a ebullición en 200 ml de tampón de muestra como el indicado antes.

La electroforesis en gel de poliacrilamida con Tris-Tricina se realizó cargando muestras apropiadamente diluidas en geles de gradiente de 10% a 20% (Novex, San Diego, CA) seguido de transferencia a una membrana de nitrocelulosa 0.2 μ m (Bio-Rad, Hercules, CA). A β se detectó utilizando un anticuerpo monoclonal W02, que detecta residuos 5 a 8, 17 (u otro anticuerpo adecuado) junto con anti-IgG de ratón en conejo conjugado a peroxidasa de rábano (Dako, Dinamarca) y se visualizó usando quimioluminiscencia mejorada (por ej. ECL; Amersham Life Science, Buckinghamshire, Reino Unido). Cada gel incluyó tres carriles que contenían 0.5, 1 y 2 ng de A β ₄₀ sintético (Keck Laboratory, Yale University, New Haven, CT) como estándares de referencia.

Las membranas de inmunotransferencia se leyeron utilizando un dispositivo de imagenología adecuado por ejemplo Fuji LAS3000 y la densitometría se realizó utilizando el software adecuado, por ejemplo Multigauge. Se estableció el rango lineal de la intensidad de la señal para el análisis densitométrico de las bandas de A β mono - y dimérica con relación a estándares de A β conocidos. Los porcentajes calculados en la tabla 13 representan las lecturas promedio del grupo de ratones en tratamiento con respecto al grupo de ratones tratados con vehículo.

Todas las muestras se analizaron varias veces y las diluciones y cargas de los geles se ajustaron para que estuvieran en la región cuantificable de la curva estándar. La A β insoluble estuvo compuesta por la fracción sedimentable derivada de la placa de amiloide insoluble de las muestras corticales anteriores y la fracción soluble que contiene A β soluble monomérica y/u oligomérica.

Se corrieron varios geles por cada compuesto de prueba con un control de PBS incluido en cada gel. Cada gel contenía diversas concentraciones del compuesto de prueba. Se utilizó una prueba t de student para comparar la media del valor más alto obtenido por el compuesto de prueba para cada gel a cualquier concentración, con la media de los valores de PBS tomados de los múltiples geles. Por consiguiente se puede hacer una determinación de si el aumento promedio en la solubilización obtenido por cualquier compuesto de prueba es significativo en comparación con PBS solo. Los compuestos de prueba con una puntuación (+) son compuestos que lograron un aumento estadísticamente significativo en la solubilización de la placa con respecto a la del PBS solo. Un compuesto de prueba con una puntuación (-) es un compuesto que no logra un aumento estadísticamente significativo en la solubilización de la placa con respecto a la del PBS solo.

Ensayo 10. Partición de metal

Para analizar los efectos de la partición de diversos metales, incluidos zinc y cobre, después de la extracción de tejido cerebral en presencia de un compuesto de prueba, se prepararon fracciones solubles e insolubles de un extracto de tejido cerebral humano para el ensayo de solubilización de amiloide. Se analizaron los metales en las dos fracciones mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente luego del pretratamiento apropiado con ácido nítrico y/o peróxido de hidrógeno, en caso necesario.

Ensayo 11. Efecto de la administración de los compuestos de prueba sobre los depósitos de A β en animales transgénicos

Se dispone de modelos de ratón transgénicos para una serie de trastornos neurológicos, que incluyen la enfermedad de Alzheimer (Games et al., 1995; Hsiao et al., 1996); la enfermedad de Parkinson (Masliah et al., 2000); la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Gurney et al., 1994); la enfermedad de Huntington (Reddy et al., 1998); y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) (Telling et al., 1994). Encontramos que uno de los modelos transgénicos para la enfermedad de Alzheimer, el ratón transgénico APP2576 (Hsiao et al., 1996) también tiene una alta incidencia de cataratas. Estos modelos animales son adecuados para probar los métodos de la invención.

Se utilizaron ratones transgénicos de la cepa APP2576 (Hsiao et al., 1996). Se eligieron ratonas de 8 a 9 meses de vida y se dividieron en grupos para el tratamiento.

Las ratonas se sacrificaron a intervalos, y se examinaron sus cerebros para determinar si el tratamiento con compuestos de prueba había disminuido la formación de amiloide en el cerebro, y la identificación del protocolo de administración más eficaz. Se determinaron los niveles de A β soluble e insoluble en el cerebro y el suero utilizando inmunotransferencias tipo Western calibradas según la metodología descrita para el ensayo 9.

Se analizaron otras ratonas de cada grupo durante un período de hasta ocho meses respecto al desempeño cognitivo, utilizando un laberinto acuático de Morris según métodos estándar. Un operador a ciegas midió cada día la salud general y el bienestar de los animales, utilizando una escala de cinco puntos enteros que subjetivamente califica una combinación de características, que incluyen actividad motora, alerta y signos de salud general.

Ensayo 12. Propiedades fisicoquímicas

Cálculos de superficie polar (SP)

Los valores de superficie polar se calcularon usando el programa basado en la web disponible a través de "Molinspiration", un paquete para el cálculo de propiedades moleculares.

Mediciones turbidimétricas de solubilidad

La estimación de solubilidad se midió tanto a pH 2.0 como a pH 6.5. Estos valores están dentro del rango de pH que se puede prever a lo largo del tracto gastrointestinal proximal en los seres humanos.

Los compuestos se disolvieron en DMSO a concentraciones adecuadas y luego se agregaron en concentraciones conocidas a HCl 0.01 M (pH aprox. = 2.0) o a solución amortiguadora isotónica de fosfato de pH 6.5, la concentración final de DMSO fue de 1%. Luego las muestras se analizaron por nefelometría para determinar un rango de solubilidad. [según D. Bevan y R. S. Lloyd, Anal. Chem. 2000, 72, 1781-1787].

Valores de cLog P

Se terminaron los valores de Log P teóricos usando el software de ACD Log P. Los valores citados se calcularon a partir de una base de datos sin entrenamiento y se refirieron a las especies no ionizadas.

Ensayo 13. Penetración de la barrera hematoencefálica

Los compuestos de prueba se disolvieron en DMSO y se les agregó solución salina amortiguada con fosfato (PBS) para obtener soluciones a una concentración de 50 μ M en PBS con 1.25-2.5% de DMSO. Se agregaron trazas de 14 C-sacarosa a cada solución madre de infusión (aprox. 0.01 μ Ci/mL) para que actuara como marcador impermeable a la barrera hematoencefálica (BHE) para evaluar la integridad de la BHE durante cada perfusión y para estimar el volumen del espacio vascular residual (EVR) en muestras de tejido cerebral (es decir el volumen de líquido remanente dentro del lumen de los vasos sanguíneos al final de cada perfusión).

Se anestesiaron ratas Spague Dawley macho adultas (180-190 g) con inyecciones intraperitoneales de uretano (25% p/v) a una dosis de 1.0 mL/100 g de peso corporal. Se expuso quirúrgicamente la arteria carótida común derecha y se canuló para perfusión de la circulación cerebral. Después la arteria carótida externa derecha (que abastece a los tejidos fuera del cráneo) se ligó distal a su bifurcación de la arteria carótida común derecha para que toda la solución de infusión pasara al cerebro a través de la arteria carótida interna derecha remanente. Después se expuso el corazón y se seccionó transversalmente inmediatamente antes del comienzo de la infusión. La velocidad de la infusión se controló mediante una bomba para que administrara 3.2 mL/min (aprox. 85% del suministro normal de sangre al cerebro para este tamaño de rata). La cánula de infusión contenía inicialmente un prelavado de 0.5 mL de PBS heparinizada (10 UI/mL) cuya función es enjuagar los vasos sanguíneos y evitar que la sangre coagule y bloquee los vasos pequeños.

Después de 1.5 minutos, la bomba de infusión se detuvo automáticamente, se retiró la cánula de la arteria carótida y luego se recogió una muestra de la solución de infusión (1-1.5 mL) de la punta de la cánula de infusión. Después se separó el cerebro por disección y se dividió en 3 partes; el hemisferio derecho junto con el mesencéfalo derecho, el hemisferio izquierdo junto con el mesencéfalo izquierdo y el cerebelo (cerebelo, puente de Varolio y tronco encefálico). Sólo la parte derecha del cerebro se usó para las mediciones sucesivas porque la perfusión a través de la arteria carótida interna derecha abastece preferencialmente al hemisferio derecho y al mesencéfalo derecho (el hemisferio izquierdo y el cerebelo reciben una perfusión colateral variable). Las muestras de tejido cerebral de cada animal se congelaron a -30° C, se analizaron alícuotas, homogeneizadas y pesadas, por LC-MS para obtener la concentración cerebral total. El análisis se llevó a cabo usando el instrumento Micromass Triple Quad. La fase móvil consistió en un gradiente de acetonitrilo/agua (que contenía ácido fórmico al 0.05%) y la columna fue una Phenomenex Luna CN.

Se analizaron pequeñas alícuotas de cada muestra de tejido cerebral y la correspondiente solución de infusión mediante recuento de centelleo líquido para determinar el nivel de 14 C-sacarosa. El espacio vascular residual (EVR) en cada muestra de tejido del cerebro se calculó dividiendo la concentración medida de sacarosa en el tejido

cerebral (dpm/mg) entre su concentración en la solución de infusión correspondiente (dpm/ μ L). Este es el volumen de líquido que permanece dentro de los vasos sanguíneos al final de cada perfusión. Multiplicando este EVR por la concentración del compuesto de prueba en la solución de infusión se obtiene la cantidad residual total de compuesto de prueba que está presente dentro de los vasos sanguíneos en cada muestra de tejido cerebral (es decir: lo que no cruzó la BHE). Restando esto de la concentración cerebral total se obtiene la cantidad de fármaco en cada muestra de tejido cerebral que está fuera de los vasos sanguíneos (es decir: que cruzó la BHE). Dividiendo esta concentración cerebral corregida por el EVR cerebro se obtiene el coeficiente de absorción del cerebro (ecuación 1).

Ecuación 1.

$$\text{Coeficiente de absorción cerebral} = \frac{[\text{cerebro ng.mg}^{-1}] - [\text{EVR ng.}\mu\text{L}^{-1}]}{[\text{solución de infusión ng.}\mu\text{L}^{-1}]}$$

Se realizaron en total 5 a 6 experimentos de perfusión cerebral para cada uno de los compuestos de prueba y se calcularon coeficientes medios de absorción cerebral.

Los coeficientes mayores a 50% indican compuestos que entran en el cerebro extremadamente rápido; los coeficientes entre 10 y 50% indican compuestos que entran en el cerebro bien; los coeficientes menores de 10% (no observados) indicarían compuestos que entran muy lentamente en el cerebro y no serían adecuados para la administración terapéutica; los coeficientes menores de 1% (no observado) indicarían compuestos que están efectivamente excluidos del cerebro.

Ensayo 14. Inmunohistoquímica de cerebro de ratón transgénico

En este ensayo se utilizó el ratón transgénico APP2576 (Hsiao et al., 1996) al que se hace referencia en el ensayo 11. Se cortó coronariamente el tejido contralateral cerebral de ratón fijado con formalina. Se tomaron cortes (10 μ m) de los sitios correspondientes y se trataron con ácido fórmico al 80% para recuperar el antígeno. El anticuerpo primario utilizado fue el anticuerpo monoclonal 1E8, que reconoce epítomos entre los residuos 18 y 22 de A β (SmithKline Beecham, Reino Unido). Se desarrolló inmunorreactividad con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa de rábano (usando un cromógeno 3,3'-diaminobencidina) (Dako) y fosfatasa alcalina (usando fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indoxilo y cromógeno cloruro de nitroazul de tetrazolio) (Dako). La abundancia de placa por corte fue evaluada por dos operadores a ciegas respecto al tratamiento, según la escala siguiente:

0 = no hay placas aparentes

1 = placas presentes pero muy escasas

2 = varias placas presentes

3 = numerosas placas visibles en zonas restringidas

4 = placas abundantes y no restringidas a ningún área en particular.

Cuando correspondió se asignaron valores intermedios por ejemplo 2.5. Se usó la prueba t de student para comparaciones entre grupos.

Ensayo 15. Perfil farmacocinético

- Se administró infusión intravenosa de compuesto de prueba a 2 ratas; 2 mg/kg en un vehículo adecuado y se tomaron muestras de sangre arterial hasta 24 horas después.
- Se realizó la administración oral de compuesto de prueba a 2 ratas; 30 mg/kg en un vehículo adecuado a través de sonda nasogástrica y se tomaron muestras de sangre arterial hasta 24 horas después.
- Se determinaron las concentraciones plasmáticas de compuesto de prueba por un método analítico adecuado.

Cálculos:

$$CL_{\text{total}} = \frac{\text{Dosis}_{\text{IV}}}{AUC_{\text{IV}}} \quad V_{d\beta} = \frac{CL_{\text{total}}}{\beta} \quad BA(\%) = \frac{AUC_{\text{oral}} * \text{Dosis}_{\text{IV}}}{AUC_{\text{IV}} * \text{Dosis}_{\text{oral}}}$$

CL_{total} = depuración plasmática total después de la administración IV

$V_{d\beta}$ = volumen de distribución durante la fase de eliminación después de la administración IV

BA = biodisponibilidad oral

AUC_{IV} = área bajo la curva de concentración plasmática en función del tiempo desde el tiempo cero hasta el infinito después de la administración IV

AUC_{oral} = área bajo la curva de concentración plasmática en función del tiempo desde el tiempo cero hasta el infinito después de la administración oral

B = constante de velocidad de eliminación terminal después de la administración IV

Ensayo 16. Determinación de los niveles plasmáticos de los compuestos de prueba en el ratón

PB 1075

La administración oral a cuatro ratones de PB 1075 a una concentración de 30 mg/kg como una suspensión en Na-carboximetilcelulosa (CMC), se realizó por sonda nasogástrica. Dos ratones se sacrificaron 30 minutos después de la administración y dos ratones se sacrificaron 60 minutos después de la administración. Se obtuvo sangre por punción cardíaca y el plasma se separó por centrifugación.

Se determinó la concentración de PB 1075 por LC/MS usando el instrumento de triple cuadrupolo. La fase móvil consistió en un gradiente de acetonitrilo (ACN)/agua (que contenía ácido fórmico al 0.05%) y la columna fue una columna Phenomenex Luna 5 μ m C8 (50 x 2 mm).

Las muestras suministradas de plasma de ratón con toxicidad aguda se inyectaron directamente después de una precipitación de proteínas con ACN. El método analítico en plasma fue lineal en el rango de 10 a 10 000 ng/ml ($R^2 = 0.994$). La recuperación de PB 1075 del plasma fue ~ 100%.

Las concentraciones de PB 1075 en las muestras de plasma de ratón se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Concentraciones de PB 1075 en plasma de ratón después de la dosificación oral de 30 mg/kg

Exp. no	Tiempo (min)	Conc. (ng/ml)
2459	30	431.26
2470	30	298.46
2495	60	424.81
2781	60	519.56

PB 1076

La administración oral a cuatro ratones de PB 1076 a una concentración de 30 mg/kg como una suspensión en Na-carboximetilcelulosa (CMC), se realizó por sonda nasogástrica. Dos ratones se sacrificaron 30 minutos después de la administración y dos ratones se sacrificaron 60 minutos después de la administración. Se obtuvo sangre por punción cardíaca y el plasma se separó por centrifugación.

Se determinó la concentración de PB 1076 por LC/MS usando el instrumento de triple cuadrupolo. La fase móvil consistió en un gradiente de acetonitrilo (ACN)/agua (que contenía ácido fórmico al 0.05%) y la columna fue una columna Phenomenex Luna 5 μ m C8 (50 x 2 mm).

Las muestras de plasma de ratón se inyectaron directamente luego de la precipitación de proteínas con ACN. El método analítico en plasma fue lineal en el rango de 500 a 10 000 ng/ml ($R^2 = 0.999$). La recuperación de PB 1076 del plasma fue ~ 85%.

La concentración de PB 1076 en plasma de ratón después de la dosificación oral de 30 mg/kg se muestra en la tabla 13.

Tabla 13. Concentraciones de PB 1076 en plasma de ratón después de la dosificación oral de 30 mg/kg

ID del ratón	Tiempo (min)	Conc. (ng/ml)
3036	30	2325.77
3041	30	1593.61
3014	60	2697.62
3015	60	1167.52

PB 1077

La administración oral a cuatro ratones de PB 1077 a una concentración de 30 mg/kg como una suspensión en Na-carboximetilcelulosa (CMC), se realizó por sonda nasogástrica. Dos ratones se sacrificaron 30 minutos después de

la administración y dos ratones se sacrificaron 60 minutos después de la administración. Se obtuvo sangre por punción cardíaca y el plasma se separó por centrifugación.

Se determinó la concentración de PB 1077 por LC/MS usando el instrumento de triple cuadrupolo. La fase móvil consistió en un gradiente de acetonitrilo (ACN)/agua (que contenía ácido fórmico al 0.05%) y la columna fue una columna Phenomenex Luna 5 µm C8 (50 x 2 mm) .

Las muestras de plasma de ratón se inyectaron directamente luego de la precipitación de proteína con ACN. El método analítico en plasma fue lineal en el rango de 5 a 5000 ng/ml ($R^2 = 0.999$). La recuperación de PB 1077 del plasma fue ~ 92%.

La concentración de PB 1077 en plasma de ratón después de la dosificación oral de 30 mg/kg se muestra en la tabla 14,

Tabla 14. Concentraciones de PB 1077 en plasma de ratón después de la dosificación oral de 30 mg/kg

ID del ratón	Tiempo (min)	Conc. (ng/ml)
3062	30	731.2
3060	30	984.7
3093	60	752.8
3095	60	495.1

Ensayo 17. Ensayo de desagregación de la placa de amiloide sintética

Este ensayo mide la capacidad de los compuestos de prueba para disolver los agregados del péptido A-beta de 42 residuos sintético de la enfermedad Alzheimer, formado por precipitación con zinc.

El ensayo de desagregación de la placa sintética es un ensayo basado en fluorescencia de tioflavina T que mide la capacidad de un compuesto de prueba para desagregar los agregados sintéticos generados por la incubación de la proteína A-beta amiloide (Aβ) de la enfermedad de Alzheimer en presencia de zinc.

El A-beta de 42 residuos que es la forma más prevalente en las placas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer se precipita mediante adición de sales de cinc para formar un agregado con conformación en hoja beta fisicoquímicamente congruente con los núcleos cristalinos de las placas de amiloide. Se incorpora tioflavina T, un agente que exhibe fluorescencia específica cuando se intercala en una estructura de hoja beta, en el agregado A-beta/Zn durante el proceso de agregación. La solubilización de los agregados unidos al metal por un compuesto de prueba resultará en reducción de la fluorescencia, a medida que se pierde la conformación en hoja beta. La actividad de un compuesto en este ensayo es una combinación de sus propiedades quelantes de metales, solubilidad, hidrofobicidad y elementos estructurales que influyen en la interacción con la masa de amiloide.

El ensayo modela el proceso por el cual actúa un compuesto de prueba, ya sea para competir por los metales unidos con Aβ o alternativamente para desplazar los metales uniéndose competitivamente en el sitio de unión del metal, resultando en la solubilización de Aβ precipitada por zinc, como un modelo in vitro de desagregación de la placa.

Reactivos del ensayo

Se prepararon alícuotas de péptido sintético Aβ para mayor comodidad. Aβ se disolvió en agua destilada y se evaluó la concentración del péptido por absorción a 214 nm contra una curva estándar validada. En cada ensayo se incluyeron agregados de Abeta/Zn en presencia sólo de solvente (DMSO) y vehículo de control (PBS) como controles negativos.

Los compuestos de prueba se disolvieron en DMSO hasta una concentración de 5 mM. Se hicieron diluciones en DMSO según el caso hasta 100 veces la concentración final deseada y se añadieron inmediatamente a los agregados de A-beta.

Método

Se incubó A-beta 1-42 con $ZnCl_2$ y tioflavina T (ThT) en una relación molar de (1:2:2) durante 24 horas a 37 °C en una rueda giratoria en PBS de pH 6.6. Luego de la incubación, se incubaron los agregados con compuesto de prueba durante otras 2 horas a 37 °C con rotación. En cada experimento se incluyeron blanco de PBS, agregados sin tratar y controles de DMSO. Después de 2 horas de incubación, se midió la fluorescencia de ThT en las muestras usando un fluorímetro LS55 (Perkin Elmer) en una cubeta.

Los datos se generaron en el software FL Winlab (Perkin Elmer) y se analizaron usando software GraphPad Prism v4.0. Los datos se calcularon como el promedio de múltiples lecturas.

Resultados

- 5 Los resultados se presentan en forma de tablas como la concentración (μM) a la cual se obtiene 50% de desagregación (CI_{50}) y como porcentaje de desagregación a una concentración $5 \mu\text{M}$ (expresado como 5/% de reducción). Los dos valores juntos proporcionan una medida de la eficiencia de la desagregación
- 10 Si el compuesto no alcanza 50% de desagregación en el rango de concentración probado el resultado se registra como $>20 \mu\text{M}$, que corresponde a la concentración máxima a la cual se prueba el compuesto. Este resultado indica que el compuesto de prueba es relativamente malo en su capacidad para desagregar los agregados de A β 1-42. Un compuesto de prueba capaz de alcanzar una CI_{50} a una concentración menor de $20 \mu\text{M}$ y que tiene una puntuación mayor de 20% de desagregación a una concentración de $5 \mu\text{M}$ se considera “bueno”. Un compuesto de prueba capaz de alcanzar una CI_{50} a una concentración menor de $20 \mu\text{M}$ y que tiene una puntuación mayor de 40% de desagregación a una concentración de $5 \mu\text{M}$ se considera “muy bueno”.
- 15

Tabla 15

Ensayo	Ensayo 1	Ensayo 3(d)	Ensayo 3(c)	Ensayo 12	Ensayo 16	Ensayo 11 y Ensayo 14	Ensayo 17
	Peróxido Cl50 (µM)	Citotoxicidad (% de viables a 1 y 10 µM)	Neuroprotección (% de inhibición de toxicidad de Abeta)	ClogP	Concentración plasmática en ratones	Ratones GT -Fracción soluble: % de cambio en comparación con los ratones de control solo vehículo. -Fracción insoluble: % de cambio en comparación con los ratones de control solo vehículo. -La puntuación de las placas representa una puntuación promedio por grupo de tratamiento en relación con la puntuación promedio del grupo tratado con vehículo (simulando).	Desagregación CE ₅₀ (µM) y porcentaje de desagregación a 5 µM
1075	0.73	99,87		2.58	Hasta 520 ng/mL en ratones	+ 9% (insol), -19% (sol), -22% (placa)	
1076	0.45	116,105		2.74	Hasta 2698 ng/mL en ratones	-21% (insol) -24% (sol) -29% (placa)	
1077	0.48	101,86		2.03	Hasta 984 ng/mL en ratones	Efecto despre-ciable en la insol. -17% (sol), -30% (placa)	
1078	0.73	94,94		2.87		Hasta 262 ng/mL en ratones.	
1080	0.44	105,70	15	1.84			
1081	0.55		7	2.41		Hasta 207ng/mL	
1082	4.5		94, 70	1.76			
1083	2.3		105,97	2.67			
1084	0.36	100,93	2	2.37	Hasta 2439 ng/mL	-17% (insol), -29% (sol) -21% (placa)	
1085	0.37	99,72	7	1.95	Hasta 3644 ng/mL		
1086	0.39	98,51		2.94			
1087	1.52	94,58	11	2.53			
1088	0.84	102,94	3	1.94		Hasta 3896 ng/mL en ratones	
1089	0.78	96,83	13	2.31			
1091	0.46	100,92	-8	2.36			
1092	0.86	95,81		1.81			
1093	0.39	122,13		2.58			
1094		97,96	1	1.99			
1097	0.28	99,78		2.19	Hasta 261 ng/mL en ratones	-22% (sol) +1% (insol)	

1098	0.44	99,88			2.48		Hasta 439 ng/mL en ratones	-3% (placa)	
1099	0.69	103,101			2.50				
1100	0.42	100,92			3.13				17 µM, 42 5/%
1101	<4.1	89,17			3.42				11,7 µM, 45 5/%
1107	0.4	92,59			3.22			Hasta 1802 ng/mL en ratones	
1108	0.25	100,53			2.6		Hasta 383 ng/mL en ratones		
1110	0.46	107,77			3.24				
1111	0.32	93,67			3.35				
1112	0.33	89,46			3.13		Hasta 2949 ng/mL en ratones		
1114	0.58	101,73							
1115	0.73	101,73							
1126	0.37				3.07				
1128	0.34				2.55				13.2 µM, 41 5/%
1130	0.88				1.89				
1131	0.5				2.42				
1132	0.47				2.34				15.2 µM, 16 5/%
1133	0.79				1.63				
1147	0.26				1.50				
1161	0.14				1.13				

En las páginas siguientes se enumeran las referencias citadas en la descripción y en los ejemplos.

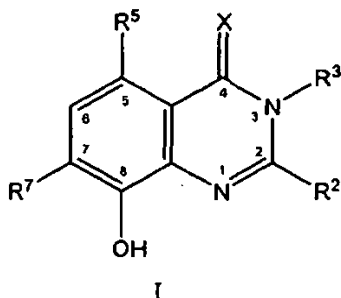
REFERENCIAS

- 5 Ariga, T., Kobayashi, K., Hasegawa, A., Kiso, M., Ishida, H., and Miyatake, T. (2001) Characterization of high-affinity binding between gangliosides and amyloid β -protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 388, 225-230.
Atwood et al., *J. Biol. Chem.*, 1998, 273(21), 12817-12826.
Beyreuther K, Christen Y, Masters CL (eds) *Neurodegenerative Disorders: Loss of Function Through Gain of Function*. Springer. Berlin. 2001. 189pp.
- 10 Brower V. Harnessing the immune system to battle Alzheimer's: Some of the most promising approaches to fight Alzheimer's diseases aim to develop vaccines. *EMBO Rep* 2002;3:207-9.
Bush AI, Masters CL. Clioquinol's return. *Science* 2001; 292:2251-2252.
Bush AI. Therapeutic targets in the biology of Alzheimer's disease. *Current Opinion in Psychiatry* 2001; 14:341-348.
- 15 Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Haines, J. L., and Pericak-Vance, M. A. (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in the late onset familial disease. *Science* 261, 921-923.
Curtain, C.C., Ali, F., Volitakis, I., Cherny, R.A., Norton, R.S., Beyreuther, K., Barrow, C.J., Masters, C.L., Bush, A.I., and Barnham, K.J. (2001) Alzheimer's disease amyloid β binds copper and zinc to generate an allosterically ordered membrane-penetrating structure containing superoxide dismutase-like subunits. *J. Biol. Chem.* 276, 20466-20473.
- 20 Czech, C., Forstl, H., Hentschel, F., Monning, U., Besthorn, C., Geigerkabisch, C., Sattel, H., Masters, C., and Beyreuther, K. (1994) Apolipoprotein E-4 gene dose in clinically diagnosed Alzheimer's disease: prevalence, plasma cholesterol levels and cerebrovascular change. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 243, 291-292.
Fassbender, K., Simons, M., Bergmann, C., Stroick, M., Lutjohann, D., Keller, P., Runz, H., Kuhl, S., Bertsch, T., von Bergmann, K., Hennerici, M., Beyreuther, K., and Hartmann, T. (2001) Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease β -amyloid peptides A β 42 and A β 40 in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 5856-5861.
- 25 Frears, E. R., Stephens, D. J., Walters, C. E., Davies, H., and Austen, B. M. (1999) The role of cholesterol in the biosynthesis of β -amyloid. *NeuroReport* 10, 1699-1705.
Friedhoff, L. T., Cullen, E. I., Geoghegan, N. S., and Buxbaum, J. D. (2001) Treatment with controlled-release lovastatin decreases serum concentrations of human β -amyloid (A β) peptide. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 4, 127-130.
- 30 Games D., Adams D., Alessandrini R., Barbour R., Berthelette P., Blackwell C., Carr T., Clemens J., Donaldson T., Gillespie F., Guido T., Hagopian S., Johnsonwood K., Khan K., Lee M., Leibowitz P., Lieberburg I., Little S., Masliah E., Mcconlogue L., Montoyazavala M., Mucke L., Paganini L., Penniman E., Power M., Schenk D., Seubert P., Snyder B., Soriano F., Tan H., Vitale J., Wadsworth S., Wolozin B., Zhao J., *NATURE*, 1995, 373 (6514): 523-527.
- 35 Gilgun-Sherki Y., Melamed E., Offen D., *Neuropharmacology*, 2001, 40 (8): 959-975.
Gurney M.E., Pu H.F., Chiu A.Y., Dalcanto M.C., Polchow C.Y., Alexander D.D., Caliendo J., Hentati A., Kwon Y.W., Deng H.X., Chen W.J., Zhai P., Sufit R.L., Siddique T., *SCIENCE*, 1994, 264 (5166): 1772-1775.
Hartmann, T. (2001) Cholesterol, A β and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 24, S45-S48.
- 40 Hertel, C., Terzi, E., Hauser, N., Jakob-Rotne, R., Seelig, J., and Kemp, J. A. (1997) Inhibition of the electrostatic interaction between β -amyloid peptide and membranes prevents β -amyloid-induced toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 9412-9416.
Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., Cole, G. (1996) Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice *SCIENCE*; 274(5284):99-102.
- 45 Huang X, Atwood CS, Hartshorn MA et al. The A β peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry* 1999; 38:7609-7616.
Ji, S. R., Wu, Y., and Sui, S. F. (2002) Cholesterol is an important factor affecting the membrane insertion of β -amyloid peptide (A β 1-40), which may potentially inhibit the fibril formation. *J. Biol. Chem.* 277, 6273-6279.
- 50 Karbownik M., Lewinski A., Reiter R.J., *Int. J. Biochemistry & Cell Biology*, 2001, 33 (8): 735-753.
Lee J-Y, Cole TB, Palmiter RD, Suh SW, Koh J-Y. Contribution by synaptic zinc to the gender-disparate plaque formation in human Swedish mutant APP transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002: Early edition.
- 55 Manfredini S, Pavan B, Vertuani S, Scaglianti M, Compagnone D, Biondi C, Scatturin A, Tanganelli S, Ferraro L, Prasad P, Dalpiaz A, *JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY*, 45 (3): 559-562 JAN 31 2002
Masliah E., Rockenstein E., Veinbergs I., Mallory M., Hashimoto M., Takeda A., Sagara Y., Sisk A., Mucke L., *SCIENCE*, 2000, 287 (5456): 1265-1269.
- 60 Nunan, J., and Small, D. H. (2000) Regulation of APP cleavage by α -, β - and δ -secretases. *FEBS Lett.* 483, 6-10.
Petersen, R.C., Stevanus, J.C., Ganguli, M., Tangalos, E.G., Cummings, J.L., and DeKosky, S.T. Practice parameter: Early detection of dementia: Mild cognitive impairment *Neurology* 2001 56 1133-1142
Reddy P.H., Williams M., Charles V., Garrett L., Pike-Buchanan L., Whetsell W.O., Miller G., Tagle D.A., *NATURE GENETICS*, 1998, 20 (2): 198-202.
- 65 Rogers SL, Farlow MR, Doody RS, Mohs R, Friedhoff LT. A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. Donepezil Study Group. *Neurology* 1998; 50:136-45.
Rosen WG, Mohs RC, Davis KL. A new rating scale for Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry* 1984; 141:1356-64.
Sakaeda T, Tada Y, Sugawara T, Ryu T, Hirose F, Yoshikawa T, Hirano K, Kupczyk-Subotkowska L, Siahaan TJ, Audus.KL, Stella VJ, *JOURNAL OF DRUG TARGETING*, 9 (1): 23-37 2001.

- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandervert, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D., and Seubert, P. (1999) Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer's disease like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400, 173-177.
- 5 Selkoe, D.J. Alzheimer's disease: genes, proteins and therapy. *Physiol Rev* 81 (2): 741-766.
- Shearman MS, Behr D, Clarke EE et al. L-685,458, an aspartyl protease transition state mimic, is a potent inhibitor of amyloid β -protein precursor β -secretase activity. *Biochemistry* 2000; 29:8698-704.
- Shiraki, H. The neuropathology of subacute myelo-optico-neuropathy (SMON) in the humans: With special reference to the quinoform intoxication. *Jpn J Med Sci Biol* 1975; 28 (suppl): 101-164.
- 10 Simons M, Schwärzler F, Lütjohann D et al. Treatment with simvastatin in normocholesterolemic patients with Alzheimer's disease: a 26-week randomised, placebo-controlled, double-blind trial. *Ann of Neurol* In Press.
- Sinha S, Anderson JP, Barbour R et al. Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain. *Nature* 1999;402:537-40.
- St George-Hyslop, P.H. (2000) Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry* 47, 183-199.
- 15 T.C. Wang, Y.L. Chen, K.H. Lee and C.C. Tzeng, *Tetrahedron Lett.*, 1996, 37, 6369-6370.
- Telling G.C., Scott M., Hsiao K.K., Foster D., Yang S.L., Torchia M., Sidle K.C.L., Collinge J., Dearmond S.J., Prusiner S.B., *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, 11 Oct 1994, 91 (21): 9936-9940.
- Valdez-Gonzalez, T., Inagawa, J., and Ido, T. (2001) Neuropeptides interact with glycolipid receptors: a surface plasmon resonance study. *Peptides* 22; 1099-1106.
- 20 White et al., *J Neuroscience*, (1998) 18, 6207-6217.
- Wright, J.S. Johnson, E.R. and DiLabio, G.A. *J.Am.Chem.Soc* 2001 123 1173-1183.
- Yassin MS, Ekblom J, Xilinas M, Gottfries CG, Oreland L. Changes in uptake of vitamin B(12) and trace metals in brains of mice treated with clioquinol. *J Neurol Sci* 2000; 173:40-44.
- 25 Será obvio para un experto en la materia, que, aunque la invención se ha descrito con cierto detalle con fines de claridad y comprensión, pueden realizarse diversas modificaciones y alteraciones a las realizaciones y métodos descritos en el presente documento sin alejarse del alcance del concepto de la invención que se publica en esta memoria descriptiva.
- 30

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I



en el cual

R^2 es H o $\text{CH}_2\text{NR}^1\text{R}^4$ en el cual R^1 y R^4 se seleccionan independientemente entre H, C_{1-6} alquilo opcionalmente sustituido y C_{3-6} cicloalquilo opcionalmente sustituido;

R^3 es H; C_{1-4} alquilo opcionalmente sustituido; C_{2-4} alqueno opcionalmente sustituido; C_{3-6} cicloalquilo opcionalmente sustituido; arilo de 6 miembros opcionalmente sustituido, opcionalmente condensado con un arilo o heteroarilo de 6 miembros opcionalmente sustituido; heterociclilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido que contiene N, saturado o insaturado, opcionalmente condensado con un arilo o heteroarilo de 6 miembros opcionalmente sustituido; $(\text{CH}_2)_n\text{R}^6$ en el cual n es un número entero de 1 a 6 y R^6 es C_{1-4} alquilo opcionalmente sustituido, C_{3-6} cicloalquilo opcionalmente sustituido, heterociclilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido que contiene Nitrógeno, saturado o insaturado, o arilo de 6 miembros opcionalmente sustituido; NR^8R^9 en el cual R^8 y R^9 se seleccionan independientemente entre H, C_{1-4} alquilo opcionalmente sustituido, C_{3-6} cicloalquilo opcionalmente sustituido, heterociclilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido, que contiene N, saturado o insaturado, y arilo de 6 miembros opcionalmente sustituido; NHCOR^{10} en el cual R^{10} es C_{1-4} alquilo opcionalmente sustituido, C_{3-6} cicloalquilo opcionalmente sustituido, heterociclilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido que contiene N, saturado o insaturado, o arilo de 6 miembros opcionalmente sustituido;

$\text{CH}_2\text{CONR}^{11}\text{R}^{12}$ en el cual R^{11} y R^{12} se seleccionan independientemente entre H, C_{1-6} alquilo opcionalmente sustituido, C_{2-6} alquino opcionalmente sustituido y heterociclilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido que contiene N, opcionalmente condensado con arilo de 6 miembros opcionalmente sustituido; y $(\text{CH}_2)_m\text{NHR}^{13}$ en el cual R^{13} se selecciona entre C_{1-6} alquilo opcionalmente sustituido y SO_2R^{14} en el cual R^{14} se selecciona entre C_{1-6} alquilo opcionalmente sustituido y arilo de 6 miembros opcionalmente sustituido y m es 1 a 6;

R^5 y R^7 se seleccionan independientemente entre H y halo; y

X es O o S;

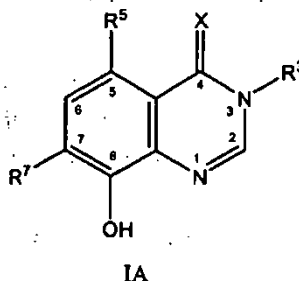
donde, en las definiciones anteriores, los sustituyentes opcionales se seleccionan entre C_{1-4} alquilo, hidroxi, halo, C_{1-4} alcoxi y C_{1-4} acilo;

con la condición de que:

- (i) al menos uno de R^2 y R^3 no sea H;
- (ii) al menos uno de R^5 y R^7 sea halo;
- (iii) cuando X es O, R^5 y R^7 son Cl y R^2 es H, entonces R^3 no sea ciclopropilo ni parafluorofenilo; y
- (iv) cuando X es O, R^5 es H, R^7 es I y R^2 es H, entonces R^3 no sea C_{2-4} alquilo,

sus sales, hidratos, solvatos, tautómeros, estereoisómeros y/o isómeros geométricos.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es un compuesto



de fórmula IA:

en el cual

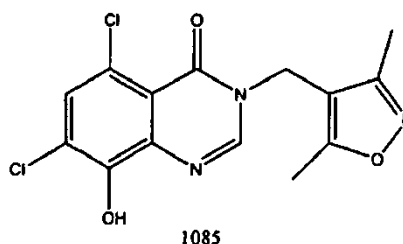
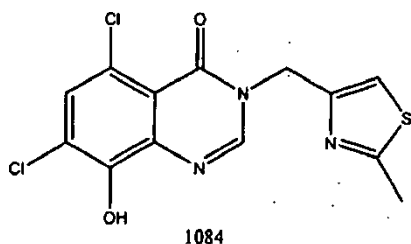
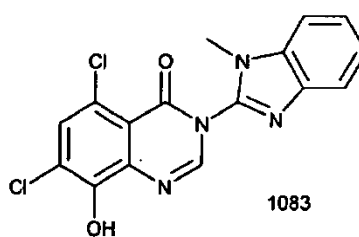
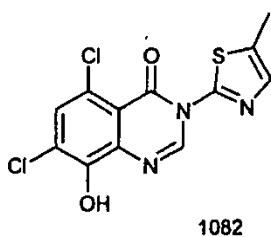
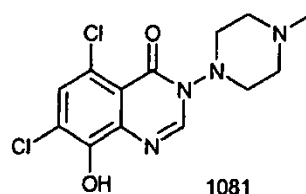
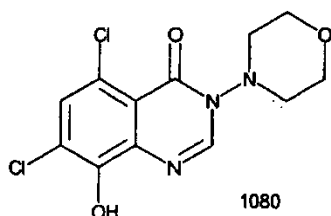
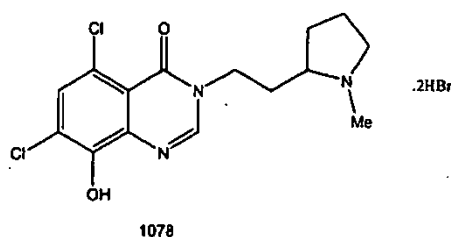
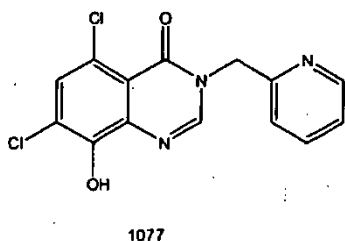
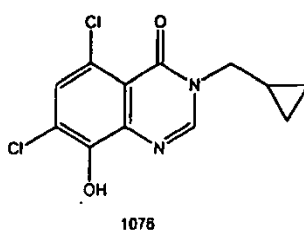
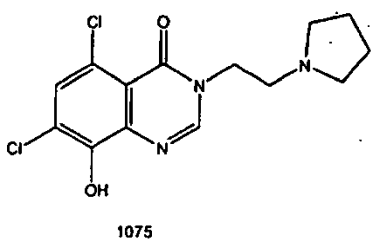
R^5 , R^7 y X son los definidos en la reivindicación 1; y

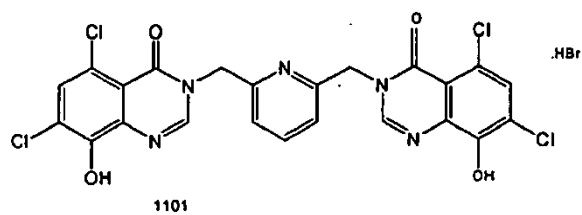
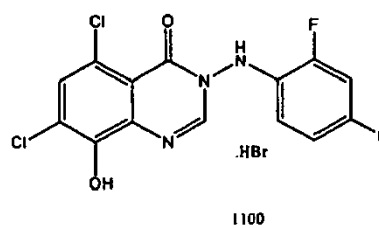
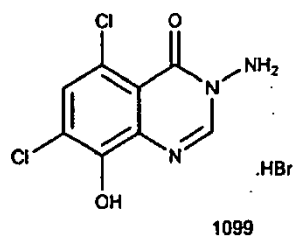
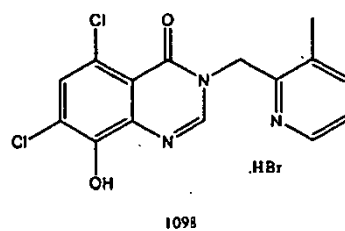
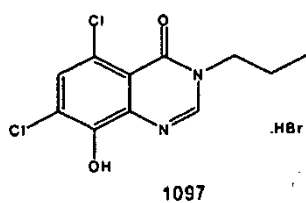
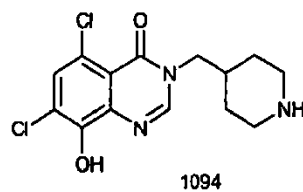
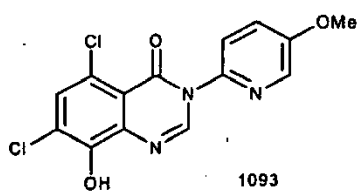
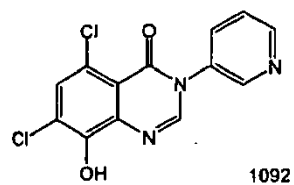
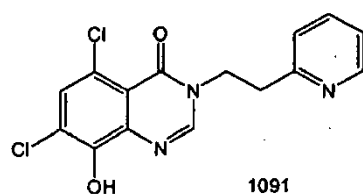
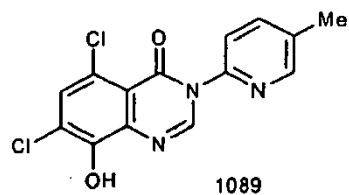
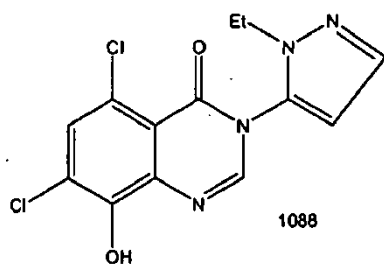
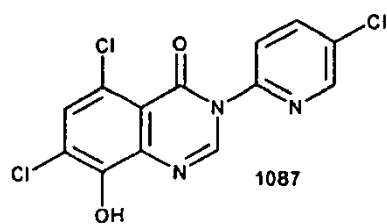
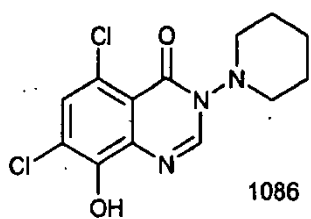
R^3 es C_{1-4} alquilo opcionalmente sustituido; C_{2-4} alqueno opcionalmente sustituido; un heterociclilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido que contiene N, saturado o insaturado, opcionalmente condensado con un arilo o heteroarilo de 6 miembros opcionalmente sustituido; $(\text{CH}_2)_n\text{R}^6$ en el cual n es 1 a 3 y R^6 es C_{3-6} cicloalquilo opcionalmente sustituido o un heterociclilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido que contiene N, saturado

o insaturado; NR^8R^9 en el cual R^8 es H y R^9 es H o C_{1-4} alquilo opcionalmente sustituido o arilo de 6 miembros opcionalmente sustituido; NHCOR^{10} en el cual R^{10} es C_{1-4} alquilo opcionalmente sustituido o arilo de 6 miembros opcionalmente sustituido.

- 5 3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2 en el cual R^3 es C_{1-4} alquilo opcionalmente sustituido; C_{2-4} alquenilo opcionalmente sustituido; un heterociclilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido que contiene N, saturado o insaturado, opcionalmente condensado con un arilo o heteroarilo de 6 miembros opcionalmente sustituido; $(\text{CH}_2)_n\text{R}^6$ en el cual n es 1 a 3 y R^6 es C_{3-6} cicloalquilo opcionalmente sustituido o un heterociclilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido que contiene N, saturado o insaturado; o NR^8R^9 en el cual R^8 es H y R^9 es H o C_{1-4} alquilo opcionalmente sustituido o arilo de 6 miembros opcionalmente sustituido.

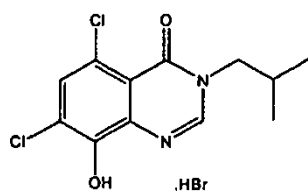
4. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que es como sigue:



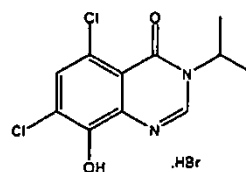


5

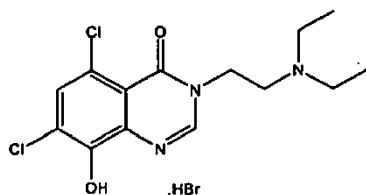
10



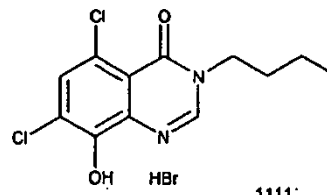
1107



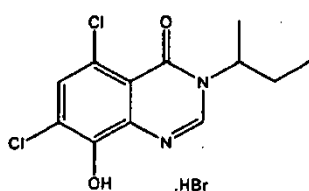
1108



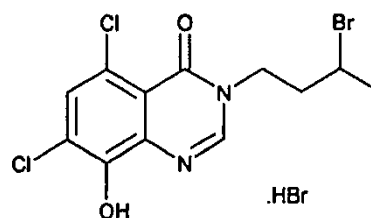
1110



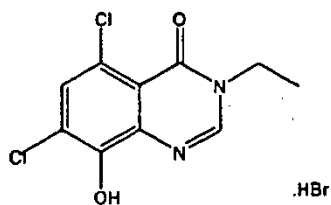
1111



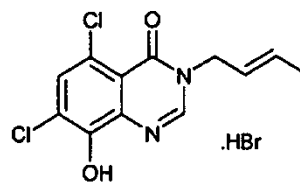
1112



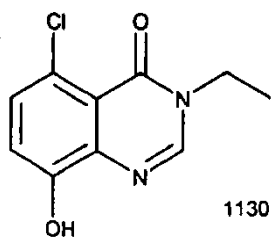
1114



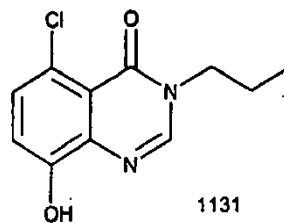
1115



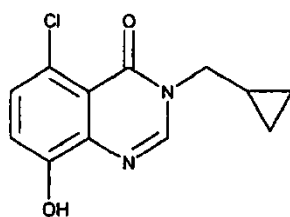
1126



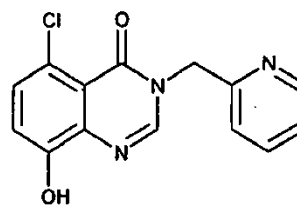
1130



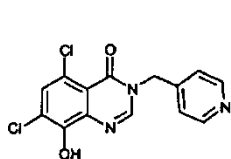
1131



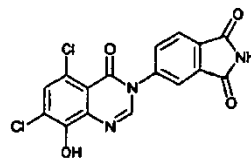
1132



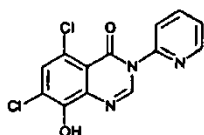
1133



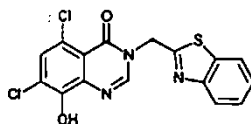
27V2 y sus sales



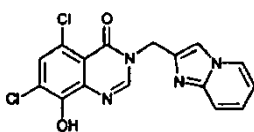
8G12 y sus sales



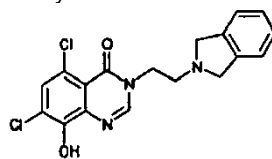
8H1 y sus sales



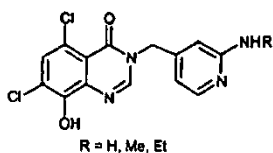
8K1 y sus sales



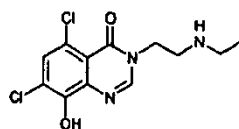
8L1 y sus sales



8X1 y sus sales

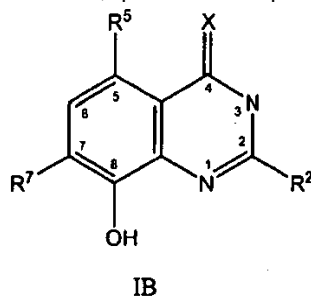


8A2 y sus sales



8D2 y sus sales

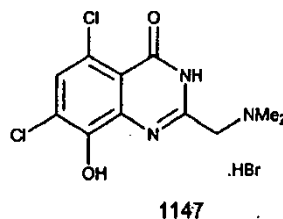
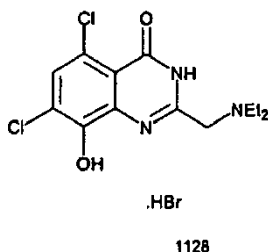
5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es un compuesto de fórmula IB:



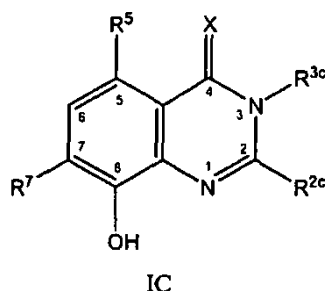
en el cual R^2 , R^5 , R^7 y X son los definidos en la reivindicación 1.

6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, en el cual R^2 es H o $\text{CH}_2\text{NR}^1\text{R}^4$ en el cual R^1 y R^4 se seleccionan independientemente entre H, C_{1-6} alquilo opcionalmente sustituido y C_{3-6} cicloalquilo opcionalmente sustituido.

7. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 5 o 6 que es como sigue:



8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es un compuesto de fórmula 1C



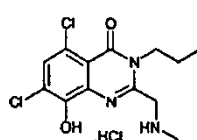
en el cual

R^5 , R^7 y X son los definidos en la reivindicación 1; y

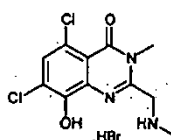
5 R^{2c} es $CH_2NR^1R^4$ en el cual R^1 y R^4 se seleccionan independientemente entre H y C_{1-6} alquilo opcionalmente sustituido; y

R^{3c} es C_{1-4} alquilo opcionalmente sustituido.

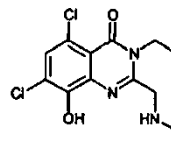
9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 8 que es como sigue:



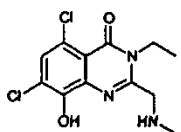
1095



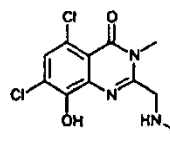
1161



4-9C y sus sales



4-9D y sus sales



4-9E y sus sales

15 10. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el cual R^5 y R^7 son ambos halo.

11. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 9 en el cual R^5 y R^7 son ambos cloro.

20 12. Un compuesto de fórmula I como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para usar en terapia.

13. Un compuesto de fórmula I como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para usar como neuroterápico o neuroprotector.

25 14. Un compuesto de fórmula I como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para usar como un antiamiloidógeno.

15. Una composición farmacéutica o veterinaria que contiene el compuesto de fórmula I como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y un portador aceptable para uso farmacéutico o veterinario.

30 16. Una composición de acuerdo con la reivindicación 15 que contiene además otro medicamento.

17. Una composición de acuerdo con la reivindicación 16, en la cual el otro medicamento es un inhibidor del sitio activo de la acetilcolinesterasa, un antioxidante, un antiinflamatorio o un estrógeno.

35 18. El uso de un compuesto de fórmula I como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento, el mejoramiento o la profilaxis de una afección neurológica.

19. El uso de acuerdo con la reivindicación 18, donde la afección neurológica es un trastorno neurodegenerativo.

40 20. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, donde el trastorno neurodegenerativo es amiloidosis neurodegenerativa.

21. El uso de acuerdo con la reivindicación 19 o la reivindicación 20, donde el trastorno neurodegenerativo es enfermedad de Alzheimer esporádica o familiar, esclerosis lateral amiotrófica, cataratas, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob y su nueva variante asociada a la enfermedad de la "vaca loca", enfermedad de Huntington, demencia con formación de cuerpos de Lewy, atrofia multisistémica, enfermedad de Hallerboden-Spatz, enfermedad difusa por cuerpos de Lewy, insomnio familiar fatal, enfermedad de Gertsman Straussler Sheinker hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo Dutch, esclerosis múltiple, tauopatías, enfermedad de la neurona motora o enfermedades priónicas.

22. El uso de acuerdo con la reivindicación 21, donde el trastorno neurodegenerativo es la enfermedad de Parkinson.

23. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, donde el trastorno neurodegenerativos es una afección relacionada con A β .

24. El uso de acuerdo con la reivindicación 23, donde la afección relacionada con A β es la enfermedad de Alzheimer o demencia asociada al síndrome de Down o una de las varias formas dominantes autosómicas de la enfermedad de Alzheimer familiar.

25. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 24, donde el medicamento frena, reduce o detiene el deterioro cognitivo.

26. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 25, donde el medicamento está destinado a la administración por separado, consecutiva o simultánea de otro medicamento.

27. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 25, donde el medicamento consta además de otro medicamento.

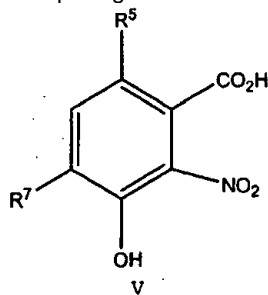
28. El uso de acuerdo con la reivindicación 26 o la reivindicación 27, donde el otro medicamento es un inhibidor del sitio activo de la acetilcolinesterasa, un antioxidante, un antiinflamatorio o un estrógeno.

29. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 28, donde el compuesto de fórmula I se administra por vía oral, tópica o parenteral.

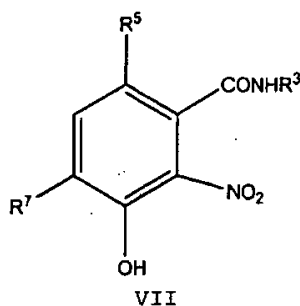
30. Un compuesto de fórmula I como el definido en las reivindicaciones 1 a 11, destinado al tratamiento, el mejoramiento o la profilaxis de una afección neurológica.

31. Un proceso para la preparación del compuesto de fórmula I como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que comprende los pasos de:

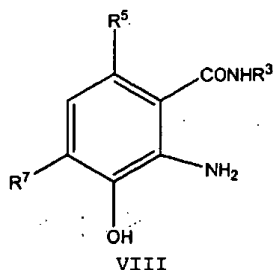
(a) hacer reaccionar un compuesto opcionalmente protegido de fórmula V



en el cual R⁵ y R⁷ son los definidos en la reivindicación 1 con H₂NR³ en el cual R³ es el definido en la reivindicación 1, para formar un compuesto opcionalmente protegido de fórmula VII



(b) reducir el compuesto de fórmula VII para formar un compuesto opcionalmente protegido de fórmula VIII

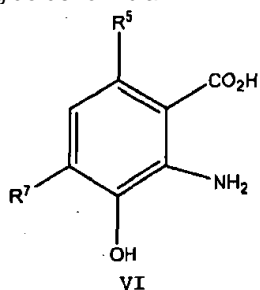


(c) ciclar el compuesto de fórmula VIII para formar un compuesto opcionalmente protegido de fórmula I en el cual R² es H; o

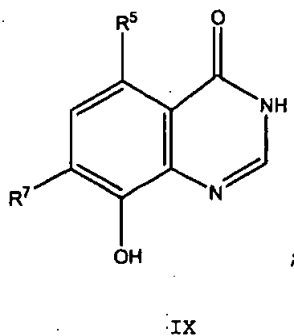
(d) ciclar el compuesto de fórmula VIII en presencia de R²CHO, R²CO₂H o R²C(OR^x)₃ en el cual R^x es C₁₋₄ alquilo opcionalmente sustituido o arilo de 6 miembros opcionalmente sustituido y R² es el definido en la reivindicación 1.

32. Un proceso para la preparación del compuesto de fórmula I como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en el cual R² es H que comprende los pasos de:

(a) aminorar un compuesto opcionalmente protegido de fórmula VI



en el cual R⁵ y R⁷ son los definidos en la reivindicación 1 para formar un compuesto opcionalmente protegido de fórmula IX

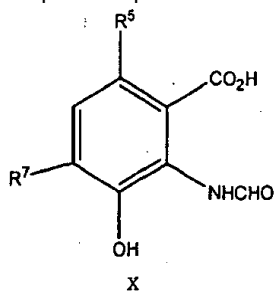


y

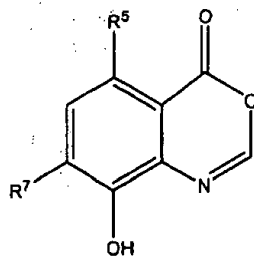
(b) hacer reaccionar el compuesto de fórmula IX con R³-L o R³OSO₂R^x en el cual L es un grupo saliente, R³ es el definido en la reivindicación 1 y R^x es el definido en la reivindicación 31.

33. Un proceso para la preparación del compuesto de fórmula I como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que comprende los pasos de:

(a) hacer reaccionar el compuesto opcionalmente protegido de fórmula VI como el definido en la reivindicación 32 con un agente de formilación para formar un compuesto opcionalmente protegido de fórmula X

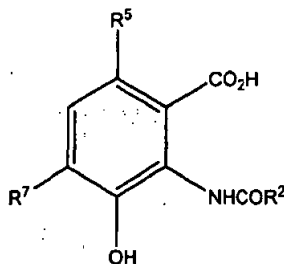


o
un compuesto opcionalmente protegido de fórmula XI



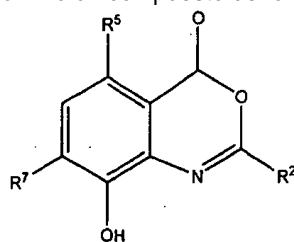
XI

- 5 (b) hacer reaccionar el compuesto de fórmula X o XI con un agente de acilación que contenga R^2 para formar un compuesto opcionalmente protegido de fórmula XII



XII

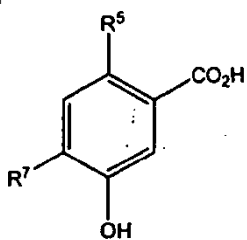
en el cual R^2 es el definido en la reivindicación 1 o un compuesto de fórmula XIII



XIII

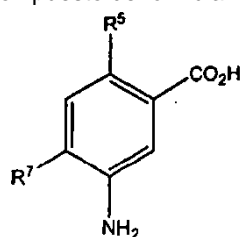
- 10 y
(c) hacer reaccionar el compuesto de fórmula XII o XIII con H_2NR^3 en el cual R^3 es el definido en la reivindicación 1.

34. Un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula IV



IV

- 15 en el cual R^5 y R^7 se seleccionan independientemente entre halo que comprende el paso de diazotación de un compuesto de fórmula III



III

en el cual R^5 y R^7 son los definidos en la fórmula IV anterior.

35. Un proceso para la preparación del compuesto de fórmula V como el definido en la reivindicación 31 en el cual R^5 y R^7 son los definidos en la reivindicación 34 que comprende:

- (a) la preparación del compuesto de fórmula IV mediante el proceso de la reivindicación 34; y
- (b) la nitración del compuesto de fórmula IV.

5

36. Un proceso para la preparación del compuesto de fórmula VI como el definido en la reivindicación 32 en el cual R^5 y R^7 son los definidos en la reivindicación 34 que comprende los pasos de:

- (a) preparación del compuesto de fórmula IV mediante el proceso de la reivindicación 35; y
- (b) reducción del compuesto de fórmula V.