



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 335 222**

51 Int. Cl.:
A61K 31/496 (2006.01)
A61P 25/14 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05717127 .4**
96 Fecha de presentación : **23.03.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1732557**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.12.2006**

54 Título: **Derivados de 1-[2H-1-benzopiran-2-ona-8-il]-piperazina para el tratamiento de trastornos del movimiento.**

30 Prioridad: **25.03.2004 EP 04101229**
25.03.2004 US 555959 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.03.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.03.2010

73 Titular/es: **Solvay Pharmaceuticals B.V.**
C.J. van Houtenlaan 36
1381 CP Weesp, NL

72 Inventor/es: **Bakker, Cornelis;**
Glennon, Jeffrey C.;
Hesselink, Mayke B.;
Thaete, Claudia;
McCreary, Andrew y
Van Scharrenburg, Gustaaf J.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 335 222 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

Derivados de 1-[2H-1-benzopiran-2-ona-8-il]-piperazina para el tratamiento de trastornos del movimiento.

5 La invención se refiere a un nuevo uso de los derivados conocidos de 1-[2H-1-benzopiran-2-ona-8-il]-piperazina, compuestos de enlace al receptor 5-HT de amplio espectro, que tienen entre otras actividades del receptor de serotonia funcional, potente actividad agonista del receptor 5-HT_{1A}, actividad antagonista del receptor 5-HT_{1D} y actividad agonista del receptor 5-HT₇. En realizaciones de la invención, se usan compuestos específicos descritos en este documento para la fabricación de medicamentos para tratar, mejorar o evitar trastornos del movimiento, en particular
10 epilepsia.

Los trastornos del movimiento son alteraciones neurológicas que implican uno o más músculos o grupos musculares, e incluyen la enfermedad de Parkinson, Corea de Huntington, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Wilson, síndrome de Tourette, epilepsia y diversos temblores crónicos, que incluyen temblor esencial, tics y distonías.
15 Los diferentes trastornos del movimiento observados clínicamente pueden localizarse a menudo en las mismas o similares áreas cerebrales. Las anomalías de los ganglios basales por ejemplo, se postulan como un factor causal en diversos trastornos del movimiento.

Los pacientes con trastornos del movimiento se someten a menudo a neurocirugía: invasiva, irreversible y no curativa en muchos casos. La terapia con fármacos en los trastornos del movimiento dejan mucho que desear. Muchos de los fármacos usados actualmente tienen efectos secundarios severos. El propranolol β -bloqueante por ejemplo, a menudo prescrito a pacientes con temblores, provoca significativos efectos secundarios cardiovasculares. Pacientes con trastornos por tics se tratan frecuentemente con antagonistas de dopamina: fármacos eficaces, aunque desafortunadamente caracterizados también por muchos efectos secundarios, que incluyen (*sic*) otros trastornos del movimiento
25 similares al Parkinsonismo. Un fenómeno pertinente con la terapia por fármacos en los trastornos del movimiento es la resistencia a la terapia farmacológica. Se sabe que se da con el 20% de los pacientes con epilepsia, e incluso en un mayor porcentaje de pacientes con enfermedad de Parkinson llegan a ser resistentes a la terapia con L-dopa. Los temblores resistentes al fármaco pueden incluir temblores en reposo (por ejemplo, en la enfermedad de Parkinson) y temblores en movimiento, que incluyen temblor esencial, temblores de la esclerosis múltiple, temblores post-traumáticos, temblores post-hemipléjicos (también conocidos como espasticidad post-ataque), temblores al escribir y
30 epilepsia.

Se ha sabido durante mucho tiempo que el potente y selectivo agonista de 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT [8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralina] es capaz de antagonizar la catalepsia inducida por haloperidol en ratas y atenuar la distonía inducida por neurolepticos en primates no humanos (J.M. Liebman *et al.*, *Psychopharmacology*, 97, 456, 1989). Estos descubrimientos han provocado la búsqueda dirigida a compuestos con una combinación de antagonismo de dopamina-D₂ y agonismo del receptor 5-HT_{1A} (véase el documento WO 97/36893 y R.W. Feenstra *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11, 2345-2349, 2001). Los efectos inducidos por fármacos en los sistemas motores no pueden compararse con trastornos del movimiento, y hasta tiempos recientes, el estado de la técnica no contenía
40 ningún incentivo sobre una posible eficacia de los agonistas de 5-HT_{1A} en los trastornos del movimiento.

Entonces, en la solicitud de patente US 2002/0156075 se sugirió que los compuestos que poseen actividad agonista de 5-HT_{1A} por serotonina pueden ser útiles para la prevención y/o tratamiento de un número de procesos agudos y crónicos, que incluyen la epilepsia. Para lo último se dio evidencia no experimental. Para comprobar si esta sugerencia de actividad anti-epiléptica podría sostenerse o no, se probaron varios agonistas de 5-HT_{1A} por su actividad anticonvulsiva
45 en ratones DBA/2, un modelo animal predictivo para la actividad anti-epiléptica. Entre otros, se probaron los potentes y selectivos agonistas de 5-HT_{1A}, flesinoxan y 8-OH-DPAT, además del monohidrato del ácido monoclorhídrico de 3-amino-8-(1-piperazinil)-2H-1-benzopiran-2-ona (denominado en adelante "compuesto 1"), un compuesto de enlace al receptor 5-HT de amplio espectro, que tiene entre otras actividades del receptor de serotonina funcional, potente actividad agonista de 5-HT_{1A} además de antagonista de 5-HT_{1D}.
50

Como más o menos se esperaba, los compuestos se encontraron activos en el ensayo para la actividad anti-epiléptica. Aunque sorprendentemente, se encontró que el "compuesto 1" agonista de 5-HT_{1A} no selectivo era al menos diez veces más potente que los agonistas de 5-HT_{1A} muy selectivos flesinoxan y 8-OH-DPAT (los valores ED₅₀ de 0,66 mg/kg para el compuesto 1 frente y 7,74 mg/kg y 15 mg/kg para flesinoxan y 8-OH-DPAT respectivamente, véase debajo). Esto fue sorprendente porque en otros ensayos *in vivo* específicos para el agonismo del receptor 5-HT_{1A} los tres compuestos eran casi equipotentes. En la "retracción del labio inferior" por ejemplo, los valores ED₅₀ son 0,12 mg/kg para el compuesto 1 frente a 0,22 mg/kg para flesinoxan (véase debajo). Tomados juntos, estos datos sugieren fuertemente la presencia de un mecanismo no agonista de 5-HT_{1A} inherente en el mecanismo del compuesto
60 1 de acción en la actividad anti-convulsión.

El compuesto 1 se conoce por ser un agonista de 5-HT_{1A} y antagonista de 5-HT_{1D} (documento EP 0 650 964). Estudios extensivos del enlace al receptor enseñaron que aparte de sus afinidades nanomolares por los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1D}, el compuesto también tiene una afinidad nanomolar para los receptores 5-HT₇ (véase *perfil de enlace*,
65 posterior).

Sorprendentemente, los estudios de interacción enseñaron que tanto el agonista selectivo de 5-HT_{1D}, sumatriptan, además del antagonista selectivo de 5-HT₇, SB 258741, antagonizaron parcialmente la actividad anti-epiléptica del

ES 2 335 222 T3

compuesto 1 (véase debajo), indicando claramente que estos subtipos del receptor de serotonina están implicados en las convulsiones. Hasta ahora no se han establecido enlaces entre el antagonismo de 5-HT_{1D} y/o el agonismo de 5-HT₇ y la epilepsia.

5 Así, el compuesto 1 y sus análogos son compuestos con una única combinación de actividades farmacológicas: actividad agonista del receptor 5-HT_{1A}, actividad antagonista del receptor 5-HT_{1D} y actividad agonista del receptor 5-HT₇, haciéndolos de mayor valor para usar en el tratamiento de la epilepsia que los compuestos como flesinoxan y 8-OH-DPAT, que son solo agonistas de 5-HT_{1A} extremadamente selectivos.

10 En base a los resultados de los estudios de interacción descritos anteriormente (y de los que se dan debajo el detalle experimental), también es probable que los compuestos que tienen la combinación de actividad antagonista del receptor 5-HT_{1D} y actividad agonista del receptor 5-HT₇, sean de valor cuando se usan en el tratamiento de la epilepsia. Lo mismo es cierto para compuestos que son tanto antagonistas del receptor 5-HT_{1D} como agonistas del receptor 5-HT₇.

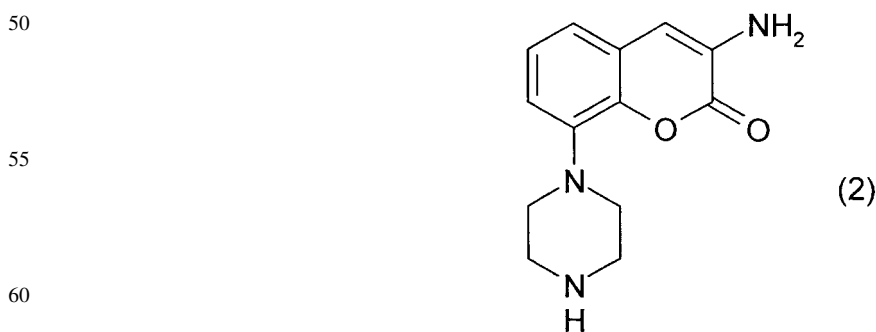
15 Los compuestos están desprovistos de efectos sedantes cuando se dan en dosificaciones de hasta 100 mg/kg p.o., y se mostró además que eran altamente activos como inductores de los factores de crecimiento. La última actividad es indicativa de efectos neuroprotectores y mejora de la plasticidad cerebral necesaria para la neuroregeneración. Se encontró también que los compuestos de la invención son activos en modelos animales experimentales con valor predictivo para la actividad contra los síntomas de la enfermedad de Parkinson en particular y disquinesias en general. Además, los compuestos muestran una buena biodisponibilidad cuando se dan de forma oral, lo que da por resultado alta potencia y larga duración de acción.

20 La presente invención describe fármacos para la terapia de trastornos del movimiento, en particular epilepsia, que tienen un mecanismo de acción diferente del de los fármacos habituales en el mercado, dando lugar a menos efectos secundarios, y son menos propensos a desarrollar resistencia en pacientes, en particular en pacientes resistentes a terapia con fármaco anti-epiléptico (AED).

30 Los derivados de 1-[2H-1-benzopiran-2-ona-8-il]-piperazina, compuestos de enlace al receptor 5-HT de amplio espectro (véase perfil de enlace al receptor, debajo), que tiene entre otras actividades del receptor de serotonina funcional, potente actividad agonista de 5-HT_{1A} además de antagonista de 5-HT_{1D}, se desarrollaron originalmente como antidepresivos (documento EP 0 650 964). La presencia de antagonismo de 5-HT_{1D} se enseña por ser de valor terapéutico. Los receptores de 5-HT_{1D} se localizan de forma presináptica en el terminal nervioso y tienen una influencia moduladora negativa en la liberación de 5-HT. Por lo tanto, el bloqueo de estos receptores mejora la liberación de 5-HT de sus terminales. La presencia adicional de antagonismo de 5-HT_{1D} presináptico dará por resultado un efecto similar al observado después de la administración de inhibidores de reabsorción de 5-HT. Cuando se combina el antagonismo de 5-HT_{1D} con el agonismo de 5-HT_{1A}, se fortalece la última actividad.

40 Pueden obtenerse sales farmacéuticamente aceptables usando procedimientos patrón bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mezclando un compuesto de la presente invención con un ácido adecuado, por ejemplo un ácido inorgánico tal como ácido clorhídrico, o con un ácido orgánico. Los compuestos activos y sus sales pueden procesarse a composiciones por medio de métodos patrón, por ejemplo, píldoras, comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas, polvos y líquidos de inyección, usando sustancias auxiliares tales como materiales de soporte líquidos y sólidos.

45 La invención se refiere al compuesto 3-amino-8-(1-piperazinil)-2H-1-benzopiran-2-ona y las sales del mismo, es decir, el compuesto de fórmula (2):



65 Se prefiere especialmente es el monohidrato de ácido monoclórhídrico del compuesto con fórmula (2), denominado en adelante como "Compuesto 1".

ES 2 335 222 T3

Los compuestos de la invención son activos a dosis en el intervalo de 0,1-100 mg/kg después de la administración oral, y su único perfil farmacológico los hace particularmente útiles en el tratamiento de los trastornos del movimiento, incluyendo la enfermedad de Parkinson, Corea de Huntington, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Wilson, síndrome de Tourette, epilepsia sintomática y no sintomática, convulsiones, que incluyen convulsiones refractarias y convulsiones post-ataque y otros trastornos electroconvulsivos, diversos temblores crónicos que incluye temblor esencial, tics y distonías.

Dentro del contexto de este documento, se dan posteriormente descripciones más detalladas, de los trastornos enumerados anteriormente.

Enfermedad de Parkinson es un trastorno del movimiento de mayor incidencia en poblaciones ancianas. Es una enfermedad incapacitante que afecta aproximadamente al 1% de la población de más de 60 años, y el riesgo acumulativo de un desarrollo individual, es aproximadamente de 1 a 40. Los síntomas incluyen temblor pronunciado de las extremidades, bradiquinesia, rigidez y cambio postural. La enfermedad de Parkinson es un trastorno progresivo que puede empezar con rigidez límbica ligera y temblores no frecuentes y progresa durante un periodo de diez años o más a temblores frecuentes y pérdida de memoria, a temblores incontrolables y demencia.

Corea de Huntington es un trastorno heredado genéticamente caracterizado por rasgos neurológicos además de psiquiátricos. En la mayoría de los casos se desarrolla cuando la gente tiene cuarenta o cincuenta años. La enfermedad normalmente empieza con cambios en el estado neurológico o mental. Los síntomas neurológicos incluyen corea, unas series de movimientos parecidos al baile, entrecortados, breves, y movimientos de una parte del cuerpo a otra. Otros síntomas pueden ser torpeza, movimientos inquietos y nerviosos, además de movimientos faciales, en particular de la mandíbula. A menudo se encuentran dificultades con el andar y la postura. Los síntomas psiquiátricos pueden presentarse como paranoia, confusión y cambios de personalidad. Al progresar las enfermedades, se desarrolla una demencia significativa.

Parálisis supranuclear progresiva es un trastorno del movimiento en que los pacientes tienen una dificultad significativa para mover sus ojos de forma vertical (arriba y abajo) de forma inicial, seguido por la limitación de todos los movimientos oculares (oftalmoplegia). Los pacientes son propensos a desarrollar demencia, rigidez, bradiquinesia (movimientos lentos) y una propensión a caer.

Enfermedad de Wilson es una enfermedad que implica al sistema nervioso además de al hígado. Los síntomas neurológicos incluyen temblores, incoordinación, caídas, habla turbia, rigidez y convulsiones. Pueden darse problemas psiquiátricos y los pacientes pueden desarrollar daño hepático severo si este mal no se trata.

Síndrome de Tourette es un trastorno de tic (véase debajo) que empieza en la niñez o adolescencia, y es considerablemente más común en hombres. Están presentes tanto tics motores múltiples además de tics vocales. Los tics pueden cambiar por la implicación de una u otra parte corporal, y la enfermedad se caracteriza por periodos con una actividad mínima y otras veces con algunos pacientes que tienen un funcionamiento dificultoso. El síndrome de Tourette se acompaña a menudo por otras dificultades del neurocomportamiento tales como trastorno de hiperactividad con déficit de atención (ADHD), trastorno de déficit de atención (ADD) o comportamiento obsesivo compulsivo (OCD).

Epilepsia es el trastorno neurológico serio más común, que se estima que afecta entre un medio a uno por ciento de la población general. La epilepsia se caracteriza por convulsiones recurrentes resultantes de una descarga repentina de energía eléctrica en el cerebro. La descarga eléctrica de las células cerebrales provoca un cambio en la conciencia, movimiento y/o sensaciones de una persona. En seres humanos, las epilepsias están separadas en dos formas: sintomática y no sintomática. La epilepsia sintomática es un trastorno convulsivo relacionado con una causa conocida tal como enfermedad metabólica, malformaciones cerebrales o tumores cerebrales. En estos casos, las convulsiones se dan presumiblemente por un foco muy anormal en el cerebro. Las epilepsias no sintomáticas se definen cuando no se reconocen lesiones estructurales o metabólicas y los pacientes no tienen otros descubrimientos neurológicos entre los ataques. Este último grupo de pacientes es más probable que tenga una hiperexcitabilidad neuronal primaria que no está provocada por lesiones metabólicas, del desarrollo o estructurales.

En el contexto de esta descripción, "epilepsia" abarca (1) epilepsias focales que incluyen epilepsia occipital benigna, epilepsia rolándica benigna, epilepsia del lóbulo frontal, epilepsia del lóbulo occipital, epilepsia del lóbulo temporal medio y epilepsia de lóbulo parietal; (2) epilepsias idiopáticas generalizadas que incluyen epilepsia mioclónica benigna en niños, epilepsia mioclónica juvenil, epilepsia de ausencia de la niñez, epilepsia de ausencia juvenil y epilepsia con convulsiones clónicas tónicas generalizadas en la niñez; (3) epilepsias sintomáticas generalizadas que incluyen espasmos infantiles (síndrome de West), síndrome de Lennox-Gastaut y epilepsias mioclónicas progresivas, y; (4) epilepsias no clasificadas que incluyen epilepsia refractaria, epilepsia post-ataque, ataques febriles, epilepsia con pico continuo y ondas en un sueño de onda lenta, síndrome de Landau Kleffner, síndrome de Rasmussen y epilepsia y errores innatos del metabolismo.

Temblores se caracterizan por movimientos anormales involuntarios. Un temblor esencial es máximo cuando la parte afligida del cuerpo (a menudo el brazo o la mano) se está usando. Un temblor en reposo es común en la enfermedad de Parkinson, y es máximo cuando las extremidades están en reposo. Los temblores en reposo normalmente disminuyen cuando el paciente intenta movimientos precisos.

Trastornos de tic son movimientos repetidos estereotipados, muy rápidos, de vida corta. Los tics más comunes implican a los sistemas motores, o son de naturaleza vocal. Los tics motores a menudo implican los párpados, cejas u otros músculos faciales, además de los miembros superiores. Los tics vocales pueden incluir gruñidos, aclarados de la garganta, toses o maldiciones. El trastorno de tic mejor conocido es el síndrome de Tourette, aunque los tics también pueden asociarse con daño de la cabeza, envenenamiento con monóxido de carbono, ataque al corazón, (ab)uso de drogas y retraso mental.

Distonías son trastornos del movimiento involuntarios caracterizados por contracciones musculares continuas que pueden dar por resultado posturas contraídas torsionadas que implican el cuerpo o los miembros. Causas de distonía incluyen anomalías bioquímicas, trastornos degenerativos, disfunción psiquiátrica, toxinas, fármacos y trauma central. Distonías particulares incluyen tortícolis espasmódica (un síndrome que implica el giro involuntario del cuello a un lado), blefarospasmo (movimiento involuntario que implica el cierre fuerte intermitente de los párpados) y distonía del escribiente (una postura anormal de calambre que se desarrolla cuando uno está escribiendo, o llevando a cabo otras acciones con las manos. Los síntomas pueden progresar para implicar el brazo y el hombro). Para el tratamiento de distonías se prefieren a menudo procedimientos neuroquirúrgicos frente a la terapia con fármacos.

Preparados farmacéuticos

Los compuestos de la invención pueden estar en formas adecuadas para la administración por medio de procedimientos habituales usando sustancias auxiliares tal como material de soporte líquido o sólido. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse de forma entérica, oral, parenteral (de forma intramuscular o intravenosa), rectal o local (de forma tópica). Pueden administrarse en forma de disoluciones, polvos, comprimidos, cápsulas (que incluyen microcápsulas), ungüentos (cremas o gel) o supositorios. Excipientes adecuados para dichas formulaciones son las sustancias líquidas o sólidas farmacéuticamente habituales, rellenos y extensores, disolventes, emulsionantes, lubricantes, aromatizantes, colorantes y/o tampón. Las sustancias auxiliares frecuentemente usadas que pueden mencionarse son carbonato de magnesio, dióxido de titanio, lactosa, manitol y otros azúcares o alcoholes de azúcares, talco, lactoproteína, gelatina, almidón, celulosa y sus derivados, aceites animales y vegetales tales como aceite de hígado de pescado, aceite de girasol, cacahuete o sésamo, polietilenglicol y disolventes tales como, por ejemplo, agua estéril y alcoholes mono o polihídricos tales como glicerol.

Tipos de composiciones farmacéuticas que pueden usarse incluyen comprimidos, comprimidos masticables, cápsulas, disoluciones, disoluciones parenterales, supositorios, suspensiones, y otros tipos descritos en este documento o evidentes para la persona experta en la técnica a partir de la memoria y conocimiento general de la técnica. En realizaciones de la invención, se proporciona un paquete o estuche farmacéutico que comprende uno o más envases llenos de uno o más de los ingredientes de una composición farmacéutica de la invención. Asociados con dicho(s) envase(s) pueden estar diversos materiales escritos tales como instrucciones de uso o un anuncio en la forma prescrita por una agencia gubernamental reguladora de la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos, anuncio que refleja la aprobación por parte de la agencia de la fabricación, el uso o la venta para administración humana o veterinaria.

Métodos farmacológicos

Actividad anti-epiléptica: Actividad anticonvulsiva en ratones DBA/2

Animales

Ratones DBA/2 que pesan 6-12 g (22-26 días de edad; de ambos sexos, Harlan Italy Correzzana, Milano, Italia) se alojan en grupos de 8-10 en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (luces encendidas a las 7:00 a.m.) con comida y agua disponible *ad libitum*. El protocolo experimental está aprobado por el Comité Ético de la Universidad de Catanzaro. Todos los procedimientos son conformes a los National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (Publicación núm. 85-23, revisado en 1985) y European Communities Council Directive del 24 de noviembre de 1986 (norma 86/609 EEC).

Convulsiones audiogénicas en ratones DBA/2

Los experimentos se llevan a cabo según el método descrito previamente por De Sarro *et al.* (1984), Eur. J. Pharmacol., 104, 55-60. Los compuestos de la invención o el vehículo (controles) se dan de forma intraperitoneal (*i.p.*) y oral (*p.o.*) como disoluciones recién sonicadas en metilcelulosa al 1%. Para el tratamiento *i.p.*, los compuestos de la invención se dan en dosis de 0,1, 0,3, 3, 10, 15, 20 y 30 mg/kg; tiempo de pretratamiento a 30 y 60 min. Para un tratamiento oral, todos los animales se pretratan o bien a 30 o a 60 min usando los compuestos de la invención a dosis de 0,1, 0,3, 3, 6 y 10 mg/kg *p.o.* Se usan al menos 10 ratones por dosis. Después del tiempo de pretratamiento, cada ratón se coloca bajo una cúpula hemiesférica de polimetacrilato de metilo (58 cm de diámetro) y se deja 1 min para la habituación y evaluación de la actividad locomotora. Los animales se desafían con un tono sinusoidal de 12-16 kHz a 109 dB. La respuesta a la convulsión se evalúa por dos observadores independientes. El comportamiento evocado por el sonido se codifica usando la siguiente escala: 0= sin respuesta, 1= marcha natural, 2= clonus, 3= flexor y/o extensor tónico; 4= paro respiratorio, en base a la opinión concordante de los observadores. El estímulo sonoro se aplica durante 60 s, aunque se interrumpe más temprano, cuando el animal observado muestra convulsión extensora tónica. La respuesta máxima se graba para cada animal. La temperatura rectal se graba inmediatamente antes del ensayo auditivo usando un termómetro Elektrolaboratoriet del tipo T.E.3. Se observan cambios del comportamiento durante el periodo

ES 2 335 222 T3

entre la administración del fármaco y el ensayo auditivo. En estos experimentos se usan grupos separados tratados con vehículo y tratados con fármaco en cada tiempo de pretratamiento (15 min-60 min). El porcentaje de ratones que mostraban marcha natural, fase clónica o tónica y la duración de la actividad anticonvulsiva se comparan con el grupo de control y se analizan estadísticamente.

5

Análisis estadístico

La comparación estadística entre grupos de control y ratones DBA/2 tratados con fármaco se hace usando el ensayo de probabilidad exacta de Fisher (incidencia de las fases de convulsión). La incidencia en porcentaje de cada fase de la convulsión audiogénica se determina para cada fármaco. Estos valores se representan frente a las dosis correspondientes por una construcción informática de las curvas dosis-efecto para el cálculo de ED₅₀ (con límites de confianza de 95%). Los valores ED₅₀ para cada compuesto se calculan usando un programa informático del método de Litchfield y Wilcoxon (1949). Al menos 32 animales se usan para calcular cada valor ED₅₀.

Fármacos

Para las inyecciones sistémicas y las administraciones orales, todos los compuestos se dan de forma intraperitoneal (0,1 ml/10 g de peso corporal del ratón) como una disolución recién preparada en metilcelulosa al 1%. Para evitar la sensibilidad a la luz, el pesado y el manejo se lleva a cabo bajo lámparas de vapor de sodio y las sustancias se protegen de la luz durante los experimentos.

20

Actividad neuroprotectora: Inducción de los factores de crecimiento

Los compuestos de la invención (3 mg/kg, *p.o.*) o el vehículo, se administran una vez al día durante un periodo de 3 semanas (n=8 animales por grupo de tratamiento). 24 horas después de la última dosis los animales se sacrifican (usando anestesia de CO₂/O₂), se sacan los cerebros y se diseccionan. Se extrae ARN de las muestras de cerebros individuales y se determina la inducción de los factores de crecimiento BDNF y GDNF por PCR cuantitativo. El ARN total se aísla con el método Trizol (Invitrogen) a partir de los pedazos de cerebro. Se hace cADN empezando con 2 µg de ARN total (pretratado durante 30 min con ADNasa (Ambion) en tampón de primera hebra) usando la transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen). La cuantificación de mADN por PCR en tiempo real hace uso de la observación de que los primeros ciclos de PCR se caracterizan por un aumento exponencial en la amplificación diana. La acumulación del producto PCR se mide usando Sybergreen II. Los cebadores se diseñan usando el paquete de software Primer Express (Applied Biosystems). Los niveles de expresión de los genes de mantenimiento ornitina descarboxilasa (ODC_ex8) y alfa tubulina (TUBA) usados para la normalización y como control para la buena síntesis de cADN.

35

Actividad anti-parkinsoniana: Experimentos de vuelta en animales con lesiones de 6-hidroxidopamina unilaterales de la sustancia negra compacta

40

Animales

Ratas macho (Wistar, Harlan, Países Bajos; 400-500 g en el momento del experimento) se alojan en un medio controlado de temperatura (20-21±2°C) y humedad y reciben agua *ad libitum* excepto durante las sesiones experimentales. La comida se restringe a aproximadamente 15 g por rata y día. Se usa un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (luces encendidas de 07.00-19.00 horas).

45

Todos los procedimientos experimentales se llevan a cabo de acuerdo con la ley alemana y conforme a las estipulaciones del comité de cuidado y uso animal local.

50

Cirugía

Las lesiones de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) unilaterales de la *zona compacta de sustancia negra* se llevan a cabo usando un procedimiento estereotáxico. Una hora antes de la cirugía, se administra desmetil-imipramina (20 mg/kg, *i.p.*) para proteger las neuronas noradrenérgicas. Las ratas se anestesiaron con una mezcla de gas de halotano al 3% + 0,8 l/min de N₂O + 0,8 l/min de O₂ a 1013 mbar. Durante la cirugía, la mezcla de gas se ajusta a 1,75-2% de halotano, 0,6 l/min de N₂O y 0,6 l/min de O₂. La barra incisiva del instrumento estereotáxico (Kopf, California, USA) se coloca a -3,3 mm, un agujero de taladro se perforó sobre la pars compacta de la sustancia negra y se inyectan 3 µl de una disolución de 6-OHDA (3,33 mg/ml) (caudal=0,75 µl/min; la aguja se deja en el sitio durante 4 minutos antes de la retirada). Las coordenadas para este procedimiento son: anterior posterior +3,2 mm desde la línea interaural; medial/lateral +1,8 mm desde la media línea y ventral -8,2 desde la superficie del cráneo. Se dejan recuperarse a los animales durante aproximadamente 2 semanas antes del ensayo. Las ratas de buena vuelta se definen como las que obtienen al menos 20 vueltas contralaterales después de la anfetamina (2,5 mg/kg sc) en los 5 min de la época de tiempo que empieza 25 min después de la administración y una media de al menos 20 vueltas contralaterales grabadas durante un periodo de 30 min después de la administración de apomorfina (0,25 mg/kg *s.c.*). Un ensayo regular con apomorfina (0,1 o 0,25 mg/kg *s.c.*) se lleva a cabo para asegurar la fiabilidad de los animales en este procedimiento.

65

ES 2 335 222 T3

Aparato

Ocho unidades de “rotámetro” comercialmente disponible (TSE systems Bad Homburg, Alemania), (tazones de plástico transparente; 57 x 55 x 52 cm) se usan para el ensayo. Las ratas se enjaezan y se atan a un sensor de rotación interconectado a un ordenador personal compatible IBM (usando el software del rotámetro TSE v.1.11, TSE systems Bad Homburg, Alemania) que registra el movimiento en el sentido del reloj o contra el sentido del reloj. Se usa un filtro de rotación del software interno de 10.

Protocolo

Después de la asignación aleatoria estadística de los grupos de tratamientos, las ratas se pretratan con compuestos de la invención (0,1-3 mg/kg *p.o.*) o de vehículo (2 ml/kg) y se colocan en los rotámetros, midiéndose entonces el comportamiento rotacional contralateral. En estudios adicionales, los efectos de la L-DOPA (1-10 mg/kg *p.o.*) se calculan en rotaciones contralaterales. Puede usarse el inhibidor de descarboxilasa periférica, benserazida (30 mg/kg *i.p.*). En estudios de combinación, pueden combinarse un intervalo de dosis de L-DOPA (1-10) y dosis de compuestos de la invención (0,1-3 mg/kg *p.o.*).

Experimentos de enlace al receptor

Los datos de enlace al receptor se obtuvieron por CEREP (128, rue Danton, 92500 Rueil-Malmaison, Francia) o en Solvay Pharmaceuticals B.V., usando procedimientos patrón bien documentados. La afinidad por los receptores 5-HT_{1A} por ejemplo, se determinó ensayando la capacidad de los compuestos de la invención para desplazar la [³H]-2-(di-n-propilamino)-8-hidroxitetralina ([³H]-8-OH-DPAT) de sus sitios específicos de enlace en homogeneizados de corteza frontal de rata. El ensayo se basa en el método descrito por Gozlan *et al.* (Nature, 305, (1983), páginas 140-142).

Agonismo *in vivo* de 5-HT_{1a}: Retracción del labio inferior (LLR)

La retracción del labio inferior se midió según el método descrito por Berendsen *et al.*, (Pharmacol. Biochem. Behav. 33, (1989), 821-827).

Dosis

La afinidad de los compuestos de la invención por los receptores de serotonina se determinó como se describe anteriormente. A partir de la afinidad de enlace medida para un compuesto dado de fórmula (1), uno puede estimar una dosis eficaz mínima teórica. A una concentración del compuesto igual a dos veces el valor K_i medido, el 100% de los receptores tiene que estar probablemente ocupados por el compuesto. Convertir esa concentración a mg de compuesto por kg de paciente, da una dosis eficaz mínima teórica, asumiendo ideal su biodisponibilidad. La farmacodinámica, farmacodinámica y otras consideraciones pueden alterar la dosis realmente administrada a un valor mayor o menor. La dosis administrada de forma conveniente es 0,001-1000 mg/kg, preferiblemente 0,1-100 mg/kg de peso corporal del paciente.

Ejemplo I

Materiales y métodos

Todas las reacciones que implican compuestos o condiciones sensibles a la humedad se llevan a cabo en una atmósfera de nitrógeno anhidro. Las reacciones se monitorizaron usando cromatografía de capa fina (TLC) en láminas de plástico recubiertas de sílice (gel de sílice pre-recubierto MERCK 60 F254) con el eluyente indicado. Las manchas se visualizaron por luz UV (254 nm) o I₂. La cromatografía en columna rápida se refiere a la purificación usando el eluyente indicado y gel de sílice Acros (0,030-0,075 mm). Los espectros de resonancia magnética nuclear (¹H RMN y ¹³C RMN, APT) se determinaron en el disolvente indicado con tetrametilsilano como un patrón interno. Los desplazamientos químicos se dan en ppm (escala δ) hacia abajo desde el tetrametilsilano. Las constantes de acoplamiento *J* se dan en hertzios (Hz). Las formas de los picos en los espectros de RMN se indican con los símbolos “q” (cuarteto), “dq” (doble cuarteto), “t” (triplete), “dt” (doble triplete), “d” (doblete), “dd” (doble doblete), “s” (singlete), “bs” (singlete ancho) y “m” (multiplete). Los puntos de fusión se grabaron en un aparato de punto de fusión Büchi B-545. Los rendimientos se refieren a productos puros aislados.

Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros RMN se grabaron en un espectrómetro Bruker AM400 o un espectrómetro Varian VXR400S. Los desplazamientos químicos (δ) se presentaron en ppm hacia abajo desde TMS como patrón interno. Una muestra de 10-50 mg se disolvió en un disolvente deuterado, normalmente CDCl₃ o una mezcla de DMSO-d₆/CDCl₃ (4:1 v/v).

ES 2 335 222 T3

El disolvente se seleccionó para asegurar la completa disolución de la muestra. Las decaencias de la inducción libre se obtuvieron generalmente a temperatura ambiente en las siguientes condiciones:

5	Resolución digital	: 0,2 Hz
	Anchura de la curva	: 18 ppm
	Anchura del pulso	: 20 grados
10	Tiempo de repetición del pulso	: 4,5 seg o más si se requiere para la completa relajación.
	Frecuencia de transporte	: 6,0 ppm
15	Número de adquisiciones	: 128 o más si es necesario. Las señales satélite C-13 a 0,5% de la intensidad de señal sería claramente visible.

El RMN se usó como método para determinar los contenidos relativos.

20 *Titrición (determinaciones en cloruro y agua)*

Para titraciones potenciométricas, se usó el modelo E636 de Metrohm (Suiza).

25 Las determinaciones potenciométricas de cloruro se usaron en esta síntesis para determinar el cloruro. La titrición se llevó a cabo con un electrodo de plata y un titrante de nitrato de plata combinados. El método es específico para el cloruro porque puede distinguir el cloruro del yoduro y bromo en base a los diferentes potenciales de electrodo.

30 Las titraciones voltamétricas para la determinación según Karl Fisher se llevaron a cabo usando un aparato Metrohm 633KF (Metrohm, Suiza) según el método USP.

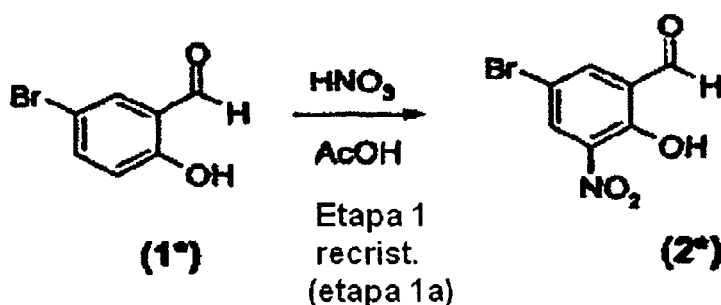
Ejemplo II

35 *Síntesis de 3-amino-8-(1-piperazinil)-2h-1-benzo-piran-2-ona y su monohidrato de ácido monoclórico (Compuesto 1)*

Etapa 1

40 *Nitración*

La primera etapa fue la nitración de 5-bromo-2-hidroxibenzaldehído (1*) dando 5-bromo-2-hidroxi-3-nitrobenzaldehído (2*):



60 Una disolución de 1,0 mol de 5-bromo-2-hidroxibenzaldehído (1*) en 3,75 litros de ácido acético (98%) se formó calentando la mezcla a aproximadamente 60°C. 1,5 moles de ácido nítrico concentrado (137 g = 97 ml) se añadió lentamente en aproximadamente 1 hora. Después de completarse la adición, se continuó la agitación a 65°C durante 10 minutos más. La disolución se enfrió entonces a 45°C, y el producto se precipitó por la adición de 4 litros de agua. Después de agitar durante al menos 3 horas, el producto se recogió en un filtro y se lavó con agua hasta que el pH de las aguas madres fue aproximadamente 6. El material se seca todo lo posible por centrifugación. El producto en bruto se disolvió en 800 ml de acetona bajo reflujo y agitación. 400 ml de acetona se eliminaron por destilación. Después de enfriar a 20°C, la mezcla se agitó durante 3 horas. El precipitado se recogió en un filtro y se lavó con éter de petróleo a 40-65°C. El sólido se secó toda la noche en una corriente de aire a 40°C. Finalmente, el compuesto en bruto (2*) se recristalizó desde acetona para dar un producto final con una pureza de 98% como se muestra por análisis de RMN.

65

ES 2 335 222 T3

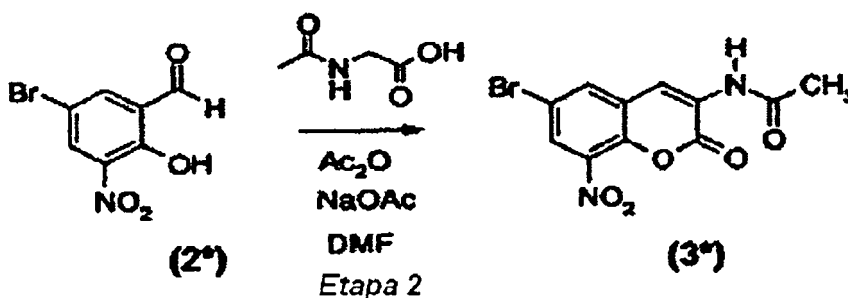
El 5-bromo-2-hidroxi-3-nitrobenzaldehído (1*) se identificó por su desplazamiento químico característico δ 9,84 ppm; el 5-bromo-2-hidroxi-3-nitrobenzaldehído (2*) tenía un desplazamiento químico característico de δ 10,4 ppm.

El rendimiento total de esta etapa fue aproximadamente del 60% (compuesto bruto en compuesto bruto).

Etapa 2

Condensación en Erlenmeyer

La segunda etapa fue la condensación en Erlenmeyer de 5-bromo-2-hidroxi-3-nitrobenzaldehído (2*) con N-acetilglicina para dar N-(6-bromo-8-nitro-2-oxo-2H-1-benzopirán-3-il)acetamida (3*).



A una mezcla de 1,0 mol de 5-bromo-2-hidroxi-3-nitrobenzaldehído (2*), se añadieron 1,0 mol de N-acetilglicina y 1,0 mol de acetato sódico anhidro, 800 ml de N-metil-2-pirrolidona. La mezcla se agitó y se calentó a 50°C. Después se hicieron marchar 2,2 moles de anhídrido acético en el recipiente de reacción en aproximadamente 30 minutos. La mezcla de reacción se calentó a 100°C. Durante el calentamiento la mezcla de reacción se volvió homogénea por un rato; poco después se formó un sólido, haciendo complicada la agitación. Después de calentar a 100°C durante 4 horas, la mezcla se enfrió a 80°C y se añadieron 1.100 ml de ácido acético (98%). Después la agitación de la mezcla fue fácil. Después, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente, y se agitó durante 60 minutos. El precipitado se recogió en un filtro y se lavó dos veces con 625 ml de ácido acético (80%), cinco veces con 900 ml de agua, y una vez con 300 ml de acetona. El producto se secó en una corriente de aire a 40°C durante 24 horas, y tuvo una pureza de 98% como se muestra por el análisis de RMN.

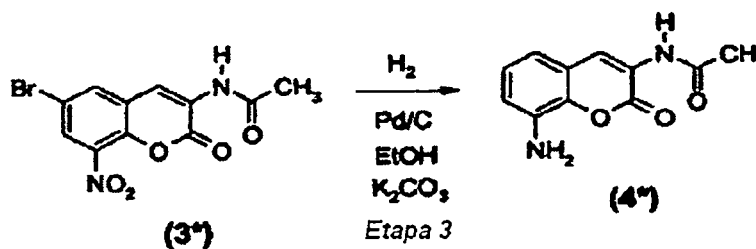
El 5-bromo-2-hidroxi-3-nitrobenzaldehído (2*) tenía un desplazamiento característico de δ 10,4 ppm; el desplazamiento químico característico de N-(6-bromo-8-nitro-2-oxo-2H-1-benzopirán-3-il)acetamida (3*) fue δ 8,72 ppm.

El rendimiento total de esta etapa fue aproximadamente del 80% (compuesto bruto en compuesto bruto).

Etapa 3

Reducción

La tercera etapa fue la hidrogenación catalítica de N-(6-bromo-8-nitro-2-oxo-2H-1-benzopirán-3-il)acetamida (3*) a N-(8-amino-2-oxo-2H-1-benzopirán-3-il)acetamida (4*).



Una mezcla de 1,0 mol de N-(6-bromo-8-nitro-2-oxo-2H-1-benzopirán-3-il)acetamida (3*), 50 g de pasta de paladio en carbono al 10% (que contiene 61% de agua), 1,0 mol de carbonato de potasio y 15 litros de etanol se calentó a 60°C. A esta temperatura el material de partida se redujo con hidrógeno a una sobrepresión de 4 bar a 1400 rpm. Después de completar la reacción (1 hora), el catalizador se eliminó por filtración usando un auxiliar de filtro, y se lavó con 4,5 litros de metiletilcetona (MEK). El filtrado se concentró a 2 litros, y se añadieron 2,3 litros de MEK para

cambiar el disolvente de etanol a MEK, 2 litros de la mezcla de disolventes se destiló a presión normal y se añadieron 2 litros de MEK. Esto se repitió 4 veces. Después se añadieron 5 litros de MEK y 2,6 litros de agua y la mezcla se agitó. Las fases se separaron. La superior se concentró más tarde a presión normal a aproximadamente 3,5 litros. El residuo se enfrió a 25°C. Durante este enfriamiento el producto cristalizó. Entonces la mezcla se enfrió a -10°C y se agitó durante dos horas. El sólido se filtró y se lavó tres veces con 800 ml de hexano. El producto se secó (50°C, 20 cm Hg, N₂) hasta peso constante.

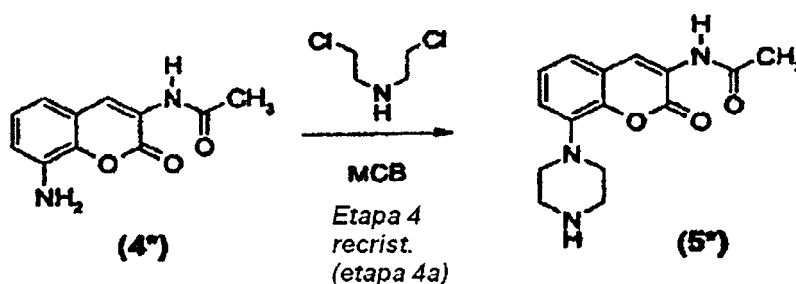
La N-(6-bromo-8-nitro-2-oxo-2H-1-benzopirán-3-il)acetamida (3*) tenía un desplazamiento químico característico de δ 8,72 ppm; el de la N-(8-amino-2-oxo-2H-1-benzo-pirán-3-il)-acetamida (4) fue δ 8,55 ppm.

El rendimiento total de esta etapa fue aproximadamente del 70% (compuesto bruto en compuesto bruto).

Etapa 4

Construcción del sistema anular de piperazina

La etapa 4 fue la alquilación de N-(8-amino-2-oxo-2H-1-benzopirán-3-il)-acetamida (4*) con la bis-cloroetilamina dando N-(8-(1-piperazinil)-2-oxo-2H-1-benzo-pirán-3-il-) acetamida (5*).



Una mezcla de 2,5 litros de monoclorobenceno, 1,0 mol de N-(8-amino-2-oxo-2H-1-benzo-pirán-3-il)-acetamida (4*) y 1,2 moles de hidrocloreuro de biscloroetilamina se calentó a reflujo en nitrógeno. Parte del monoclorobenceno (0,5 litros) se destiló. Esta mezcla se puso a reflujo durante 10 días. La reacción se siguió por HPLC. Después de la reacción, la mezcla se enfrió a 20°C y se agitó toda la noche. El producto sólido se recogió en un filtro y se lavó una vez con 360 ml de monoclorobenceno y 3 veces con 360 ml de etanol. El producto se secó al vacío a 50°C.

La mitad del producto en bruto se disolvió en 3 litros de agua. Después de añadir 18 g de Celite y 50 g de carbón vegetal, la mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la filtración, la disolución se concentró por destilación de agua. Entretanto, la segunda mitad del producto en bruto se trató como se describe anteriormente. Cuando el volumen total de las disoluciones acuosas combinadas fue de aproximadamente 1,5 litros, la destilación se paró y la mezcla se enfrió a temperatura ambiente. Entonces se añadieron 125 g de bicarbonato sódico en porciones. Después de agitar durante 1,5 horas a 15°C, el precipitado formado se recogió en un filtro. Después de lavar con 360 ml de agua y 2 veces con 270 ml de etanol, el producto se secó al vacío a 50°C.

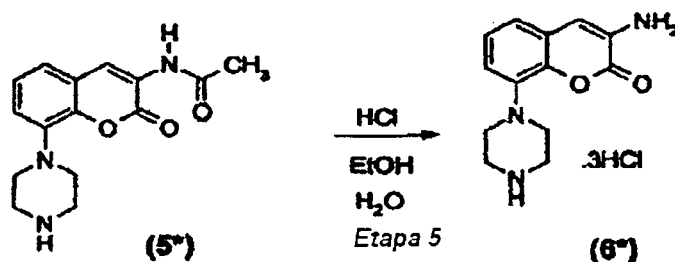
La N-(8-amino-2-oxo-2H-1-benzopirán-3-il)acetamida (4*) tenía un desplazamiento químico característico de δ 8,55 ppm; el de la N-(8-(1-piperazinil)-2-oxo-2H-1-benzo-pirán-3-il)-acetamida (5*) fue δ 8,57 ppm.

El rendimiento total de esta etapa fue aproximadamente del 50% (compuesto bruto en compuesto bruto).

Etapa 5

Hidrólisis de amida

La etapa 5 fue la hidrólisis de la función amida de N-(8-(1-piperazinil)-2-oxo-2H-1-benzopirán-3-il)-acetamida (5*) usando ácido clorhídrico. Esto dio por resultado la sal del ácido triclorhídrico de 3-amino-8-(1-piperazinil)-2H-1-benzopirán-2-ona (6*).



ES 2 335 222 T3

Se añadieron 2,9 litros de ácido clorhídrico concentrado a temperatura ambiente a una suspensión de 1,0 mol de N-(8-(1-piperazinil)-2-oxo-2H-1-benzopiran-3-il)-acetamida (5*) y 1,4 litros de etanol absoluto en aproximadamente 10 minutos. Durante esta adición, la temperatura subió a 40°C. Después de la adición, la mezcla se agitó a una temperatura de 50°C durante 1,5 horas. La mezcla se enfrió a 20°C y, después de que hubo empezado la cristalización, se añadieron 1,4 litros de etanol absoluto. Después la mezcla se agitó durante 1 hora a 20°C y durante 2 horas a 0°C. Los cristales se aislaron por filtración y se lavaron dos veces con 0,6 litros de acetona. El producto aislado se secó al vacío (40°C, 200 mm Hg, N₂, 24 horas).

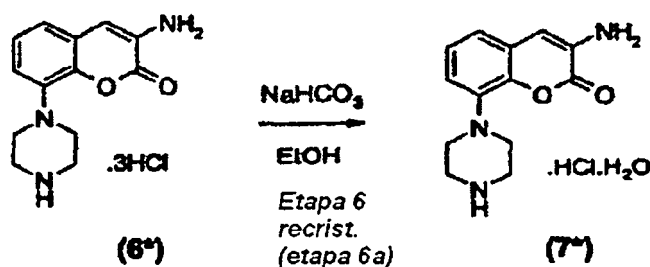
La N-(8-(1-piperazinil)-2-oxo-2H-1-benzopiran-3-il)-acetamida (5*) tenía un desplazamiento químico característico de δ 8,57 ppm; la sal de ácido triclorhídrico de 3-amino-8-(1-piperazinil)-2H-1-benzopiran-2-ona (6*) tenía un desplazamiento químico característico de δ 6,77 ppm.

El rendimiento total de esta etapa fue aproximadamente del 85% (compuesto bruto en compuesto bruto).

Etapa 6

Neutralización parcial

La etapa final, la sexta, fue la neutralización parcial de la sal de ácido triclorhídrico (6*) con bicarbonato sódico para producir el producto deseado: Compuesto 1, el monohidrato de ácido monoclorhídrico de 3-amino-8-(1-piperazinil)-2H-1-benzopiran-2-ona (7*).



A una suspensión de 1,0 mol de la sal de ácido triclorhídrico (6*) en 3,5 litros de etanol, se añadió una disolución de 2,2 moles de bicarbonato sódico en 2,8 litros de agua en aproximadamente 30 minutos. La temperatura estuvo entre 20°C y 25°C. La suspensión se agitó entonces durante 3 horas. La mezcla de reacción se filtró y posteriormente se lavó con 1,1 litros de agua, 1,1 litros de etanol y 1,1 litros de hexano. El producto en bruto aislado se secó al vacío (40°C, 200 mm Hg, N₂, 24 horas).

El producto seco (1 mol) se disolvió en 9 litros de metanol por calentamiento a temperatura de reflujo. La disolución no quedó completamente clara. Después de enfriar a 20°C, la mezcla se filtró. 300 ml de agua y 150 ml de metanol se añadieron al filtrado, después de lo cual se destilaron aproximadamente 3 litros de mezcla de disolvente a presión normal. El procedimiento completo se repitió con otro mol del producto seco. Después las fracciones combinadas se concentraron a un volumen de aproximadamente 12 litros por destilación. Después de la adición de 6 litros de etanol, 6 litros de la mezcla de disolventes se eliminó por destilación a presión normal. Entonces la mezcla se enfrió a 0°C y se agitó durante 2 horas. El precipitado se recogió en un filtro y se lavó dos veces con 750 ml de acetona. El producto se secó al vacío (40°C, 200 mm Hg, N₂, 24 horas), y después se homogeneizó por molido y, si fuera necesario, por micronización.

La sal de ácido triclorhídrico de 3-amino-8-(1-piperazinil)-2H-1-benzopiran-2-ona (6*) tenía un desplazamiento químico característico de δ 6,77 ppm; la del producto final, Compuesto 1, fue δ 6,7 ppm.

El rendimiento total de esta etapa fue aproximadamente del 85% (compuesto bruto en compuesto bruto).

El compuesto 1, el monohidrato del ácido monoclorhídrico de 3-amino-8-(1-piperazinil)-2H-1-benzopiran-2-ona, tenía una fórmula molecular C₁₃H₁₈ClN₃O₃ y una masa molecular de 299,5. El producto puro (99,8%, RMN) fue un polvo blanco a amarillento. Su contenido en cloruro fue 11,7% (masa a masa), como se determina por titración. Su contenido en agua, determinado por la titración del ensayo en agua de Karl Fisher, fue 6,5% (masa a masa).

Ejemplo III

Formulación del compuesto 1

5 *Para administración oral (p.o.):* a la cantidad deseada (0,5-15 mg) de Compuesto 1 en un tubo de cristal, se añadieron algunas bolitas de cristal y la sustancia se molió por agitación excéntrica durante 2 minutos. Después de la adición de 1 ml de una disolución de metilcelulosa al 1% en agua, el compuesto se suspendió por agitación excéntrica durante 10 minutos. Para concentraciones hasta y superiores a 1 mg/ml, las partículas restantes en la suspensión se suspendieron adicionalmente usando un baño ultrasónico.

10 *Para administración intraperitoneal (i.p.):* a la cantidad deseada (0,5-15 mg) del compuesto sólido 1 en un tubo de cristal, se añadieron algunas bolitas de cristal y el sólido se molió por agitación excéntrica durante 2 minutos. Después de la adición de 1 ml de una disolución de metilcelulosa al 1% y manitol al 5% en agua, el compuesto se suspendió por agitación excéntrica durante 10 minutos. Finalmente el pH se ajustó a 7.

15

Ejemplo IV

Resultados del ensayo farmacológico

20

*Actividad antiepiléptica**Administración intraperitoneal del compuesto 1 en ratones DBA/2*

25 El Compuesto 1, administrado de forma intraperitoneal (i.p.) como disolución recién sonicada en ratones DBA/2, mostró propiedades anticonvulsivas dependientes de la dosis frente a convulsiones audiogénicas (*para una descripción de este método: véase anteriormente*). En particular, 30 min después de la administración i.p., el compuesto 1 (10, 15, 20 y 30 mg/kg) antagonizó significativamente la fase tónica y clónica de las convulsiones audiogénicas, mientras la dosis menor de 3 mg/kg solo fue capaz de antagonizar significativamente la fase tónica. Además, 60 min después de la administración i.p., el compuesto 1 (10, 15, 20 y 30 mg/kg) antagonizó significativamente la fase tónica y clónica de las convulsiones audiogénicas, mientras el compuesto 1 (3 y 0,3 mg/kg) solo fue capaz de antagonizar significativamente la fase tónica de convulsiones audiogénicas. Otras dosis no presentadas anteriormente no fueron capaces de modificar significativamente la incidencia de convulsiones tónicas y/o clónicas. Los valores ED₅₀ respectivos (\pm 95% de límites de confianza) se presentan en la Tabla 1. A ninguna de las dosificaciones ensayadas, los ratones que recibieron compuesto 1 mostraron ningún cambio del comportamiento.

35

Administración intraperitoneal de flesinoxan en ratones DBA/2

40 El flesinoxan, administrado de forma intraperitoneal (i.p.) como disolución reciente (solución salina estéril) en ratones DBA/2, mostró los siguientes efectos contra las convulsiones audiogénicas. En particular, 30 min después de la administración i.p., el Flesinoxan (0,3, 1, 3, 5 y 7,5 mg/kg) no antagonizó significativamente la fase tónica y clónica de las convulsiones audiogénicas. Por el contrario, las dosis de 10 y 15 mg/kg fueron capaces de antagonizar significativamente ($P < 0,01$) la fase tónica y clónica de las convulsiones audiogénicas (Tabla 1). A ninguna de las dosificaciones ensayadas, los ratones que recibieron flesinoxan mostraron ningún cambio del comportamiento.

45

Administración intraperitoneal de 8-OH-DPAT en ratones DBA/2

50 El 8-OH-DPAT, administrado de forma intraperitoneal (i.p.) como disolución reciente (solución salina estéril) en ratones DBA/2, mostró los siguientes efectos del comportamiento contra las convulsiones audiogénicas. En particular, 30 min después de la administración i.p., el 8-OH-DPAT (0,3, 1, 3, 10, 15 y 20 mg/kg) no antagonizó significativamente la fase clónica de las convulsiones audiogénicas, y las dosis de 0,3, 1, 3, 10 mg/kg no antagonizaron significativamente la fase tónica de convulsiones audiogénicas. Por el contrario, las dosis de 15 y 20 mg/kg fueron capaces de antagonizar significativamente ($P < 0,01$ y $P < 0,05$) la fase tónica de las convulsiones audiogénicas (Tabla 1). A ninguna de las dosificaciones ensayadas, los ratones que recibieron 8-OH-DPAT mostraron ningún cambio del comportamiento.

55

Administración intraperitoneal de SB258741 en ratones DBA/2

60 El SB258741, administrado de forma intraperitoneal (i.p.) como disolución reciente (solución salina estéril) en ratones DBA/2, mostró los siguientes efectos contra las convulsiones audiogénicas. En particular, 30 min después de la administración i.p., el SB258741 (1, 3, 10 y 15 mg/kg) no antagonizó significativamente la fase clónica de las convulsiones audiogénicas. Por el contrario, la dosis de 15 mg/kg fue capaz de antagonizar significativamente ($P < 0,01$) la fase tónica de las convulsiones audiogénicas (Tabla 1). A ninguna de las dosificaciones ensayadas, los ratones que recibieron compuesto SB258741 mostraron ningún cambio del comportamiento.

65

ES 2 335 222 T3

TABLA 1

Efectos contra las convulsiones audiogénicas en ratones DBA/2

		Valores ED₅₀ en mg/kg después de la administración i.p.		
compuesto	Tiempo¹	Extensión tónica	Convulsiones clónicas	Marcha natural
comp. 1	30	0,66 (0,22-2,01)	3,70 (1,73-7,94)	39,04 (17,54-86,89)
comp. 1	60	0,26 (0,07-0,94)	1,90 (0,72-5,08)	20,51 (9,73-43,25)
flesinoxan	30	7,74 (5,9-10,13)	9,37 (7,20-12,18)	> 15
8-OH-DPAT	30	± 15	> 20	> 20
SB258741	30	± 12	> 15	> 15

Tiempo¹: minutos después de la administración del fármaco. Todos los datos presentados anteriormente se expresan como mg/kg i.p. y se calcularon según el método de Litchfield y Wilcoxon (1949). Los valores entre paréntesis están en límites de confianza de ±95%.

Estudios de interacción en ratones DBA/2: compuesto 1 + vehículo, sumatriptan o SB 258741

El Compuesto 1, administrado de forma intraperitoneal (i.p.) como disolución recién sonicada en ratones DBA/2, mostró propiedades anticonvulsivas dependientes de la dosis frente a convulsiones audiogénicas. En particular, 30 min después de la administración i.p., el Compuesto 1 (10, 15 y 20 mg/kg) antagonizó significativamente ($P < 0,01$) la fase tónica y clónica de las convulsiones audiogénicas, mientras la dosis menor de 3 mg/kg solo fue capaz de antagonizar significativamente ($P < 0,01$) la fase tónica. La dosis de 0,3 no fue capaz de modificar significativamente la incidencia de las convulsiones tónicas y/o clónicas. El pre-tratamiento con o bien SB 258741 (3 mg/kg, i.p., 5 min antes) o sumatriptan (3 mg/kg, i.p., 5 min antes) fue capaz de desplazar la curva de respuesta a la dosis del Compuesto 1 a la derecha. El sumatriptan demostró ser más potente que el SB 258741. A ninguna de las dosificaciones ensayadas, los ratones que recibieron Compuesto 1+ vehículo, Compuesto 1 + SB 258741 o Compuesto 1 + sumatriptan, mostraron cambios del comportamiento.

TABLA 2

Estudios de interacciones: Efectos contra las convulsiones audiogénicas en ratones DBA/2

Porcentaje de respuesta animal						
Extensión tónica				Convulsiones clónicas		
Dosis ¹	Cp 1 ²	Cp 1 + S ³	Cp 1 + SB ⁴	Cp 1 ²	Cp 1 + S ³	Cp 1 + SB ⁴
0,3	60	90	90	90	100	100
3	40	60	50	80	100	90
10	0	20	10	40	60	50
15	0	0	0	20	40	30
20	0	0	0	10	20	20

Dosis¹ = dosis de Compuesto 1 en mg/kg; Cp 1² = Compuesto 1 + vehículo, Cp 1 + S³ = Compuesto 1 + 3 mg/kg (i.p.) de sumatriptan, Cp 1 + SB⁴ = Compuesto 1 + 3 mg/kg (i.p.) de SB 258741

Actividad antiepiléptica

Administración oral del compuesto 1 en ratones DBA/2

El Compuesto 1, administrado de forma oral (*o.p.*) como disolución recién sonicada en ratones DBA/2, mostró propiedades anticonvulsivas dependientes de la dosis frente a convulsiones audiogénicas. En particular, 30 min después de la administración oral, el compuesto 1 (6 y 10 mg/kg) antagonizó significativamente la fase tónica y clónica de las convulsiones audiogénicas, mientras la dosis menor de 3 mg/kg solo fue capaz de antagonizar significativamente la fase tónica. Además, 60 min después de la administración oral, el compuesto 1 (3, 6 y 10 mg/kg) antagonizó significativamente la fase tónica y clónica de las convulsiones audiogénicas, mientras el compuesto 1 0,3 mg/kg solo fue capaz de antagonizar significativamente la fase tónica de convulsiones audiogénicas. Otras dosis no presentadas anteriormente no fueron capaces de modificar significativamente la incidencia de convulsiones tónicas y/o clónicas. Los valores ED₅₀ respectivos (\pm 95% de límites de confianza) se presentan en la Tabla 3.

A ninguna de las dosificaciones ensayadas, los ratones que recibieron Compuesto 1 mostraron ningún cambio del comportamiento.

ES 2 335 222 T3

TABLA 3

Efectos contra las convulsiones audiogénicas en ratones DBA/2: Administración oral

		Valores ED ₅₀ en mg/kg después de la administración p.o.		
compuesto	Tiempo ¹	Extensión tónica	Convulsiones clónicas	Marcha natural
comp. 1	30	1,19 (0,53-2,70)	4,91 (2,11-11,43)	ND
comp. 1	60	0,27 (0,07-1,01)	1,34 (0,45-3,98)	ND

Tiempo¹: minutos después de la administración del fármaco. Todos los datos presentados anteriormente se expresan como mg/kg i.p. y se calcularon según el método de Litchfield y Wilcoxon (1949). Los valores entre paréntesis están en límites de confianza de ±95%. ND= no detectado.

Inducción de los factores de crecimiento

El tratamiento con Compuesto 1 aumentó los niveles de ARN de GDNF y BDNF en el tálamo, el estriado, corteza prefrontal, nucleus accumbens e hipocampo (tabla).

TABLA 4

Regulación del ARN del factor de crecimiento por tratamiento con Compuesto 1 como se determina por PCR cuantitativo. Los datos se expresan como veces de aumento comparado con el tratamiento de vehículo

Área cerebral	GDNF	BDNF
tálamo	2,6 (p<0,001)	2,3 (p<0,0001)
estriado	2,2 (p<0,00005)	1,8 (p=0,12)
corteza prefrontal	1,3 (p=0,24)	2,1 (p<0,0005)
nucleus accumbens	1,5 (p<0,05)	5,1 (p<0,05)
hipocampo	1,7 (p<0,001)	2,4 (p<0,0001)

Actividad anti-parkinsoniana: Experimentos de vuelta en animales con lesiones de 6-hidroxidopamina unilaterales de la sustancia negra compacta

El compuesto 1 indujo una rotación contralateral dependiente de la dosis [F(4.35) = 3,87, p<0,01, dosis mínima eficaz de 0,75 mg/kg] al lado de una lesión de 6-OHDA que sugiere que el compuesto podría tener propiedades antiparkinsonianas potenciales.

ES 2 335 222 T3

TABLA 5

Número de rotaciones contralaterales a la dirección de una lesión de 6-OHDA

Dosis (mg/kg p.o.) de compuesto 1	Número medio de vueltas
0	-3,3
0,3	20,925
0,5	22,988
0,75	106,35*
1,0	77,1*

* indica significativamente diferente a los animales tratados con vehículo (ANOVA de 1 dirección seguido por ensayo de Dunnett post-hoc). (- indica rotación ipsilateral).

Agonismo in vivo de 5-HT_{1A}: Retracción del labio inferior (LLR)

Los valores ED₅₀ en el modelo de “retracción del labio inferior” (véase arriba) se encontró que eran 0,12 mg/kg y 0,22 mg/kg respectivamente para el compuesto 1 y flesinoxan, 60 minutos después de la administración oral.

Perfil de enlace al receptor del compuesto 1

Los datos de enlace recogidos en la tabla posterior se obtuvieron o bien por CEREP (128, rue Danton, 92500 Rueil-Malmaison, Francia) o de Solvay Pharmaceuticals B.V., usando procedimientos patrón bien documentados.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 335 222 T3

receptor	S1	radioligando	K _i (nM) Compuesto 1
5-HT _{1A}	h	[³ H]-8-OH-DPAT	0,25
5-HT _{1B}	r	[¹²⁵ I]-cianopindolol	2,0
5-HT _{1D}	b	[³ H]-serotonina	13
5-HT _{2A}	h	[³ H]-cetanserina	630
5-HT _{2B}	h	[³ H]-LSD	320
5-HT _{2C}	h	[¹²⁵ I]-DOI	> 1.000
5-HT ₃	h	[³ H]-BRL 43694	250
5-HT ₄	h	[³ H]-GR 113808	> 1.000
5-HT ₅	h	[³ H]-LSD	100
5-HT ₆	h	[³ H]-LSD	> 1.000
5-HT ₇	h	[³ H]-LSD	3,2
5-HT _{reabsorción}	h	[³ H]-paroxetina	> 1.000
α ₁ -adrenérgico	r	[³ H]-prazosina	> 1.000
α _{1A} -adrenérgico	r	[³ H]-prazosina	630
α _{1B} -adrenérgico	r	[³ H]-prazosina	> 1.000
α ₂ -adrenérgico	r	[³ H]-RX 821002	> 1.000
β ₁ -adrenérgico	h	[³ H]-CGP 12177	50
β ₂ -adrenérgico	h	[³ H]-CGP 12177	40
β ₃ -adrenérgico	h	[¹²⁵ I]- yodocianopindolol	> 1.000
NA _{reabsorción}	h	[³ H]-nisoxetina	> 1.000

ES 2 335 222 T3

receptor	S1	radioligando	K _i (nM) Compuesto 1
Dopamina-D ₁	h	[³ H]-SCH 23390	> 1.000
Dopamina-D ₂	h	[³ H]-espiperona	> 1.000
Dopamina-D ₃	h	[³ H]-espiperona	> 1.000
Dopamina-D ₄	h	[³ H]-espiperona	> 1.000
Dopamina-D ₅	h	[³ H]-SCH 23390	> 1.000
Dopamina _{reabsorción}	h	[³ H]-GBR 12935	> 1.000
Muscarina-M ₁	h	[³ H]-pirenzepina	> 1.000
Muscarina-M ₂	h	[³ H]-AFDX-384	> 1.000
Muscarina-M ₃	h	[³ H]-4-DAMP	> 1.000
Muscarina-M ₄	h	[³ H]-4-DAMP	> 1.000
Muscarina-M ₅	h	[³ H]-4-DAMP	> 1.000
Histamina-H ₁	h	[³ H]-pirilamina	> 1.000
Histamina-H ₂	h	[¹²⁵ I]-APT	> 1.000
Histamina-H ₃	r	[³ H]-α-metilhistamina	> 10.000
triptamina	r	[³ H]-triptamina	> 10.000
melatonina	c	[¹²⁵ I]-2-yodomelatonina	> 10.000
nicotina	r	[³ H]-citisina	> 10.000
μ-opiato	r	[³ H]-DAMGO	> 1.000
κ-opiato	r	[³ H]-U 69593	> 1.000
δ-opiato	r	[³ H]-DPDPE	> 1.000
nociceptina (ORL ₁)	h	[³ H]-nociceptina	> 1.000
sigma	r	[³ H]-DTG	> 1.000
sigma-SG ₁	g	[³ H]-pentazocona	> 1.000
sigma-SG ₂	r	[³ H]-DTG	> 1.000

ES 2 335 222 T3

receptor	S1	radioligando	K _i (nM) Compuesto 1
cannabinoide-CB ₁	h	[³ H]-WIN 55.212-2	> 10.000
canal Ca ⁺⁺	p	[³ H]-fluspirileno	> 10.000
canal Ca ⁺⁺	r	[³ H]-nitrendipino	> 10.000
canal Ca ⁺⁺	r	[³ H]-diltiazem	> 10.000
canal Ca ⁺⁺	r	[¹²⁵ I]-Ω-conotoxina	> 1.000
canal Ca ⁺⁺	r	[³ H]-D-888	130
canal Ca ⁺⁺	r	[³ H]-devapamil	> 10.000
canal Na ⁺	r	[³ H]-batracotoxinina	> 10.000
canal K ⁺	r	[¹²⁵ I]-α-dendrotoxina	> 1.000
canal K ⁺	r	[¹²⁵ I]-apamina	> 1.000
Adenosina-A ₁	h	[³ H]-DPCPX	> 1.000
Adenosina-A _{2A}	h	[³ H]-CGS 21680	> 1.000
Adenosina-A ₃	h	[³ H]-AB-MECA	> 1.000
Purina-P2X	r	[³ H]-ab-MeATP	> 1.000
GABA _A	r	[³ H]-muscimol	> 10.000
GABA _B	r	[³ H]-PK 11195	> 1.000
Glicina	r	[³ H]-estricnina	> 10.000
Glicina _{estricn. ins.}	r	[³ H]-MDL105519	> 10.000
NMDA	r	[³ H]-CGS 19755	> 10.000
angiotensina-AT1	h	[¹²⁵ I]-angiotensina II	> 1.000
angiotensina-AT2	h	[¹²⁵ I]-CPG 42112A	> 1.000
benzodiazepina	r	[³ H]-diazepam	> 10.000
bombesina	r	[¹²⁵ I]-bombesina	> 1.000
bradiquinina	h	[³ H]-bradiquinina	> 1.000
CCK _A	h	[³ H]-devazepida	> 1.000
CCK _B	h	[³ H]-CCK8	> 1.000
CCR1	h	[¹²⁵ I]-MIP-1a	> 1.000
CGRP	h	[¹²⁵ I]-CGRPa	> 1.000
CRF	h	[¹²⁵ I]-oCRF	> 10.000

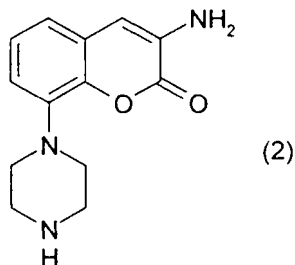
ES 2 335 222 T3

receptor	S1	radioligando	K _i (nM) Compuesto 1
Endotelina-ET _A	h	[¹²⁵ I]-endotelina-1	> 1.000
Endotelina-ET _B	h	[¹²⁵ I]-endotelina-1	> 1.000
Galanina-GAL ₁	h	[¹²⁵ I]-galanina	> 1.000
Galanina-GAL ₂	h	[¹²⁵ I]-galanina	> 1.000
Interleuquina-6	h	[¹²⁵ I]-interleuquina-6	> 10.000
Interleuquina-8	h	[¹²⁵ I]-interleuquina-8	> 1.000
LTB ₄	g	[³ H]-LTB ₄	> 10.000
LTD ₄	g	[³ H]-LTD ₄	> 10.000
melanocortina	h	[¹²⁵ I]-NDP-a-MSH	> 1.000
Neuroquinina-NK ₁	h	[³ H]-sustancia P	> 1.000
Neuroquinina-NK ₂	h	[¹²⁵ I]-neuroquinina _A	> 1.000
Neuroquinina-NK ₃	h	[³ H]-SR 142801	> 1.000
Neuropéptido Y ₁	h	[¹²⁵ I]-PYY	> 1.000
Neuropéptido Y ₂	h	[¹²⁵ I]-PYY	> 1.000
Neurotensina-NT ₁	h	[¹²⁵ I]-neurotensina	> 1.000
PACAP	r	[¹²⁵ I]-PACAP 1-27	> 1.000
Prostaglandina-I ₂	h	[³ H]-iloprost	> 1.000
Prostaglandina-H ₂	h	[³ H]-SQ 29548	> 1.000
somatostatina	m	[¹²⁵ I]-somatostatina	> 1.000
TRH	r	[³ H]-TRH	> 10.000
Tumor de necrosis f.	r	[¹²⁵ I]-TNFα	> 1.000
Vasopresina-V _{1A}	h	[³ H]-vasopresina	> 1.000
VIP ₁	h	[¹²⁵ I]-VIP	> 1.000

S¹: **b** = bovino, **c** = pollo, **g** = cobaya, **h** = ser humano, **m** = ratón, **p** = cerdo; **r** = rata.

REIVINDICACIONES

1. El uso de 3-amino-8-(1-piperazinil)-2H-1-benzopiran-2-ona, que tiene la fórmula (2):



y todos los esteroisómeros y sales farmacológicamente aceptables de la misma, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento, mejora o prevención de la enfermedad de Parkinson, Corea de Huntington, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Wilson, síndrome de Tourette, epilepsia sintomática y no sintomática, convulsiones, que incluyen convulsiones refractarias y convulsiones post-ataque y otros trastornos electroconvulsivos, diversos temblores crónicos, que incluyen temblor esencial, tics y distonías.

2. El uso según la reivindicación 1, en el que la sal farmacológicamente aceptable es el monohidrato de ácido monoclórhídrico.

3. El uso según las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha epilepsia sintomática y no sintomática son epilepsia occipital benigna, epilepsia rolándica benigna, epilepsia del lóbulo frontal, epilepsia de lóbulo occipital, epilepsia del lóbulo temporal mesial y epilepsia del lóbulo parietal; epilepsias idiopáticas generalizadas que incluyen epilepsia mioclónica benigna en niños, epilepsia mioclónica juvenil, epilepsia de ausencia de la niñez, epilepsia de ausencia juvenil y epilepsia con convulsiones clónicas tónicas generalizadas en la niñez; epilepsias sintomáticas generalizadas que incluyen espasmo infantil (síndrome de West), síndrome de Lennox-Gastaut y epilepsias mioclónicas progresivas, y epilepsias no clasificadas que incluyen epilepsia refractaria, epilepsia post-ataque, ataques febriles, epilepsia con pico continuo y ondas en un sueño de onda lenta, síndrome de Landau Kleffner, síndrome de Rasmussen y epilepsia y errores innatos del metabolismo.

4. El monohidrato de ácido monoclórhídrico de 3-amino-8-(1-piperazinil)-2H-1-benzopiran-2-ona para usar en el tratamiento, mejora o prevención de la enfermedad de Parkinson, Corea de Huntington, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Wilson, síndrome de Tourette, epilepsia sintomática y no sintomática, convulsiones, que incluyen convulsiones refractarias y convulsiones post-ataque y otros trastornos electroconvulsivos, diversos temblores crónicos, que incluyen temblor esencial, tics y distonías.

5. El monohidrato de ácido monoclórhídrico de 3-amino-8-(1-piperazinil)-2H-1-benzopiran-2-ona para usar en el tratamiento, mejora o prevención de epilepsia occipital benigna, epilepsia rolándica benigna, epilepsia del lóbulo frontal, epilepsia del lóbulo occipital, epilepsia del lóbulo temporal mesial y epilepsia del lóbulo parietal; epilepsias idiopáticas generalizadas que incluyen epilepsia mioclónica benigna en niños, epilepsia mioclónica juvenil, epilepsia de ausencia de la niñez, epilepsia de ausencia juvenil y epilepsia con convulsiones clónicas tónicas generalizadas en la niñez; epilepsias sintomáticas generalizadas que incluyen espasmo infantil (síndrome de West), síndrome de Lennox-Gastaut y epilepsias mioclónicas progresivas, y epilepsias no clasificadas que incluyen epilepsias refractarias, epilepsia post-ataque, ataques febriles, epilepsia con pico continuo y ondas en sueño de onda lenta, síndrome de Landau Kleffner, síndrome de Rasmussen y epilepsia y errores innatos del metabolismo.