



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 360 150**

⑫ Número de solicitud: 200930903

⑬ Int. Cl.:
C07D 471/04 (2006.01)
A61K 31/4375 (2006.01)

⑭

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑮ Fecha de presentación: **26.10.2009**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **01.06.2011**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.06.2011

⑱ Solicitante/s:
Universidad Autónoma de Madrid (Titular al 50 %)
Ciudad Universitaria de Cantoblanco
c/ Einstein, 3
28049 Madrid, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
(Titular al 50 %)

⑲ Inventor/es: **Romero Martínez, Alejandro;**
García García, Antonio;
García López, Manuela;
Egea Maiquez, Javier;
Chioua, Mourad;
Villarroya Sánchez, Mercedes;
Soriano Santamaría, Elena;
León Martínez, Rafael;
Marco Contelles, José Luis;
Ríos Salgado, Cristóbal de los y
Samadi, Abdelouahid

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉑ Título: **Compuestos derivados de 1,8-naftiridinas y su uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.**

㉒ Resumen:

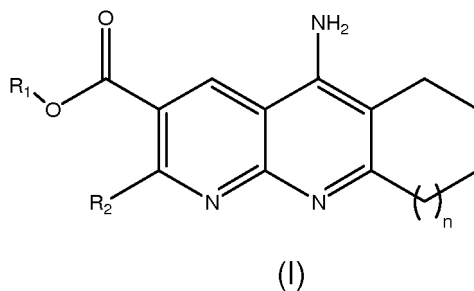
Compuestos derivados de 1,8-naftiridinas y su uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Compuestos derivados de 1,8-naftiridinas, su procedimiento de obtención y su uso como agentes para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central provocadas por una serie de procesos incluidos en lo que genéricamente se denomina neurodegeneración. Estas enfermedades se pueden seleccionar de la lista que comprende enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington.

ES 2 360 150 A1

DESCRIPCIÓN

Compuestos derivados de 1,8-naftiridinas y su uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

La presente invención se refiere a compuestos de fórmula general (I). La invención también se refiere a su procedimiento de obtención y su uso como agentes para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central provocadas por una serie de procesos incluidos en lo que genéricamente se denomina neurodegeneración. La presente invención se puede enmarcar en el campo de la industria farmacéutica.



Estado de la técnica anterior

El progresivo envejecimiento de la población mundial trae consigo la indeseada consecuencia de un aumento de las enfermedades neurodegenerativas y demencias seniles. Entre éstas, la enfermedad de Alzheimer, EA en lo sucesivo, es la enfermedad neurodegenerativa más común, responsable de aproximadamente dos tercios del total de casos de demencia (variando entre 42 y 81% según distintos estudios), con una prevalencia muy relacionada con la edad, que se aproxima al 50% en la población mayor de 85 años, y que afecta más a las mujeres que a los hombres.

Varios son los procesos bioquímicos afectados en los cerebros de pacientes de EA: metabolismo anómalo y agregación de la proteína amiloide, hiperfosforilación de la proteína tau, presencia incontrolada de especies oxidantes, alteraciones de la homeostasis de los iones calcio (Ca^{2+} en lo sucesivo), pérdida neuronal, problemas en la neurotransmisión colinérgica, etc., en los cerebros de pacientes de EA. Sin duda, una mejora de cualquiera de estas patologías por separado sería una aproximación correcta, si bien incompleta, al tratamiento de la enfermedad. En la actualidad, los fármacos empleados para el tratamiento de la EA son agentes que mejoran la neurotransmisión colinérgica, capaces de aliviar los déficits cognitivos y de memoria asociados a la EA, aunque sólo de manera temporal (*Arch. Gerontol. Geriatr. Suppl.* **2004**, 9, 297-307).

Ante esta situación, resulta obvia la conveniencia de disponer de fármacos capaces de actuar en los primeros estadios de la enfermedad o, mejor aún, que produzcan una actividad protectora en la fase inicial de la enfermedad, en el caso ideal de disponer de un sistema de diagnóstico precoz adecuado (*Ann. Neurol.* **2007**, 61, 120-129), y que sean capaces de restablecer o, al menos, mantener los procesos fisiológicos afectados en las enfermedades neurodegenerativas en los niveles más próximos posibles a la normalidad funcional.

Estudios llevados a cabo tanto en modelos animales como en humanos demuestran que la pérdida del equilibrio entre las especies oxidantes generadas por el metabolismo cerebral y los mecanismos protectores antioxidantes produce el llamado estrés oxidativo, cuando dichos sistemas defensivos disminuyen su eficacia y son desbordados. Este estrés oxidativo aumenta con la edad y se encuentra entre las primeras causas de la patogénesis de la EA (*Neurobiol. Aging* **2007**, 28, 1009-1014) posiblemente asociado a disfunciones de las mitocondrias neuronales. Asimismo, se conoce que los productos con propiedades antioxidantes son capaces de prevenir la apoptosis inducida por el péptido amiloide, así como las alteraciones de la homeostasis de Ca^{2+} en cultivos de neuronas corticales (*Life Sci.* **2000**, 66, 1879-1892).

Por otra parte, la hiperfosforilación de la proteína tau, asociada a la estabilidad de los microtúbulos celulares, da lugar a la formación de ovillos neurofibrilares en el interior de las neuronas que son reflejo de la destrucción de microtúbulos y neurofilamentos, lo que finalmente ocasiona daño y muerte neuronal.

Por otro lado, algunos derivados de 1,8-naftiridina se han descrito con actividad neuroprotectora (José Marco-Contelles *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14 (2006) 8176-8185; Rafael León, *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16 (2008) 7759-7769).

Descripción de la invención

La presente invención está relacionada con la capacidad de inhibidores de enzimas colinesterasas de ejercer mejoras sintomáticas en pacientes de Alzheimer, a través de un mecanismo de acción que no sólo implicaría la inhibición de este tipo de enzimas, sino que adicionalmente serían capaces de llevar a cabo otras actividades no colinérgicas,

mostrando globalmente un perfil neuroprotector de las neuronas sensibles a los estímulos disparados por el proceso neurodegenerativo. Estos efectos se han observado en la familia de compuestos descritos en la presente invención.

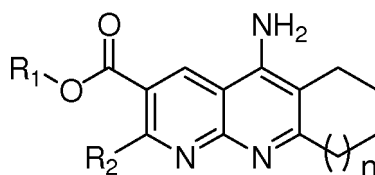
Más concretamente, la presente invención se refiere a una familia de compuestos con la característica estructural de ser derivados del sistema heterocíclico 1,8-naftiridina, que presentan propiedades farmacológicas potencialmente útiles para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como, por ejemplo, la EA.

En los estudios farmacológicos a que han sido sometidos, los compuestos de la presente invención han mostrado una serie de actividades potencialmente muy útiles en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, sin perjuicio de que en estudios mas profundos, vayan apareciendo nuevas propiedades biológicas de posible interés. Las actividades estudiadas, y que han mostrado resultados positivos, han sido:

- Inhibición de la enzima acetilcolinesterasa.
- Inhibición de la enzima butirilcolinesterasa.
- Efecto neuroprotector sobre una línea de neuroblastoma sometida a estrés oxidativo.
- Efecto neuroprotector sobre una línea de neuroblastoma sometida a hiperfosforilación de la proteína tau.

Como se ha descrito es el estado de la técnica anterior a la presente invención, y cada vez existe un mayor número de evidencias experimentales, la presencia de especies oxidantes por encima de niveles fisiológicamente aceptables, el llamado estrés oxidativo, se encuentra en el origen de la EA, y a su vez está fuertemente relacionado con entradas incontroladas de iones Ca^{2+} .

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I) (a partir de ahora compuestos de la invención):



(I)

donde:

R_1 y R_2 son grupos iguales o distintos y se seleccionan cada uno de forma independiente de un grupo alquilo (C_1 - C_{10}); y

n es un número entero de entre 0 a 5, y representa el número de átomos de carbono adicionales para cerrar el cicloalcano fusionado al heterociclo de 1,8-naftiridina. Preferiblemente n es 0, 1, 2 ó 3.

Por "compuesto de la invención" también se refiere en la presente invención a cualquiera de sus derivados, isómeros, sal farmacéuticamente aceptable y/o solvato del mismo.

El término "alquilo" se refiere en la presente invención a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, tert-butilo, sec-butilo, n-pentilo, n-hexilo, etc. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 6 átomos de carbono. Los radicales alquilo (R_1 y/o R_2) pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como un cicloalquilo, arilo, heteroarilo, alcoxilo, halógeno, haloalquilo, nitro, amino, aminoalquilo, aminocicloalquilo, amonioalquilo, amoniocicloalquilo o, en general, cualquier sustituyente situado en cualquier posición.

En una realización preferida de la presente invención, R_1 es metilo o etilo. En otra realización preferida, R_2 es metilo.

En otra realización más preferida, el compuesto de la invención se selecciona de la lista que comprende:

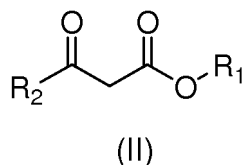
- 5-amino-2-metil-6,7,8,9-tetrahidrobenzo[b][1,8]naftiridina-3-carboxilato de metilo,

ES 2 360 150 A1

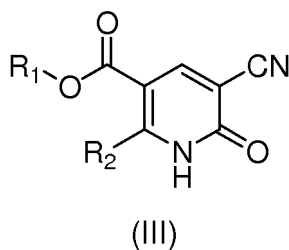
- 5-amino-2-metil-6,7,8,9-tetrahydrobenzo[*b*][1,8]naftiridina-3-carboxilato de etilo,
- 5-amino-2-metil-7,8-dihidro-6*H*-ciclopenta[*b*][1,8]naftiridina-3-carboxilato de metilo,
- 5-amino-2-metil-7,8-dihidro-6*H*-ciclopenta[*b*][1,8]naftiridina-3-carboxilato de etilo,
- 5-amino-2-metil-7,8,9,10-tetrahidro-6*H*-ciclohepta[*b*][1,8]naftiridina-3-carboxilato de metilo,
- 5-amino-2-metil-7,8,9,10-tetrahidro-6*H*-ciclohepta[*b*][1,8]naftiridina-3-carboxilato de etilo,
- 5-amino-2-metil-6,7,8,9,10,11-hexahidrocicloocta[*b*][1,8]naftiridina-3-carboxilato de metilo, y
- 5-amino-2-metil-6,7,8,9,10,11-hexahidrocicloocta[*b*][1,8]naftiridina-3-carboxilato de etilo.

Los compuestos de la presente invención de fórmula (I) pueden ser obtenidos o producidos mediante una vía sintética química u obtenidos a partir de una materia natural de distinto origen. Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de los compuestos de la invención de fórmula (I), o un isómero, sal farmacéuticamente aceptable y/o solvato del mismo, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

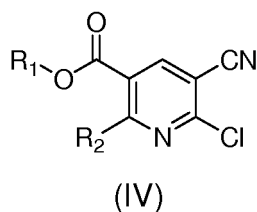
a) reacción de un acilacetato alquilo de fórmula (II),



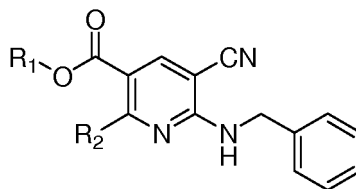
en que R_1 y R_2 representan los sustituyentes indicados más arriba al describir la fórmula general (I), en condiciones de sustitución con un diaalquilacetal de dimetilformamida. Esta reacción daría lugar a un aceptor Michael sustituido en posición beta con un grupo dimetilamino, el cual, por reacción con cianoacetamida en condiciones básicas con evolución de dimetilamina y la posterior ciclación 6-exo-trig, rinde la correspondiente 2-piridona (III).



b) sustitución nucleófila sobre la 2-piridona (III) mediante un exceso de oxiclорuro de fósforo para obtener la piridina (IV);

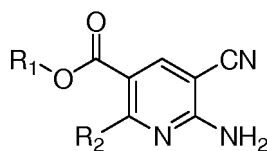


c) sustitución nucleófila sobre esta piridina (IV) para incorporar en la posición del átomo de Cl una amina, reacción que se puede hacer mediante burbujeo de amoniaco, o mediante tratamiento con benzilamina en un disolvente polar, obteniendo la piridina protegida (V).



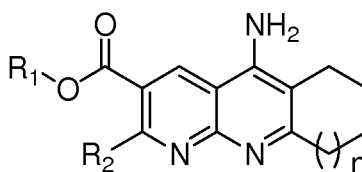
(V)

d) estas piridinas se someten a condiciones de desprotección para dejar el grupo amino liberado siguiendo métodos comunes y conocidos, como el tratamiento con ácido trifluorometanosulfónico en cualquier disolvente orgánico conocido por un experto en la materia, o el burbujeo de gas hidrógeno en presencia de cantidades catalíticas de paladio sobre un soporte de carbón activo, para obtener las piridinas del tipo (VI).



(VI)

e) reacción de condensación tipo Friedländer del sistema heterocíclico básico (VI) para conseguir los productos finales objeto de la presente invención, de fórmula general (I). Estos derivados se obtuvieron siguiendo metodologías particulares según la naturaleza de los grupos R₁ y R₂.



(I)

Otro aspecto más de la presente invención se refiere a cualquiera de los compuestos de fórmula general (I) para su uso como medicamento o composición farmacéutica, y preferiblemente un medicamento o composición farmacéutica que se utilice para el tratamiento de patologías o enfermedades provocadas por procesos oxidativos, por procesos de formación de ovillos neurofibrilares o, en general, de enfermedades susceptibles de beneficiarse de las actividades biológicas mostradas por los productos descritos en la presente invención, o bien de una sal, derivado, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I) pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo, Z y E), incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales en las cadenas R₁ y R₂. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I) presentan en posición 4 del heterociclo de naftiridina, un átomo de hidrógeno, careciendo por lo tanto de otro tipo de sustitución. Esta limitación estructural podría facilitar su unión al sitio catalítico de la enzima acetilcolinesterasa, según resultados computacionales previamente analizados.

Tal como aquí se utiliza, el término “derivado” incluye tanto a compuestos farmacéuticamente aceptables, es decir, derivados del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como derivados farmacéuticamente no aceptables ya que éstos pueden ser útiles en la preparación de derivados farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del derivado farmacéuticamente aceptable no es crítica, siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable.

Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran los profármacos de los compuestos de fórmula (I). El término “profármaco” tal como aquí se utiliza incluye a cualquier compuesto derivado de un compuesto de fórmula (I), por ejemplo, ésteres, incluyendo ésteres de ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, etc., carbamatos, amidas, etc., que, cuando se administra a un individuo es capaz de proporcionar, directa o indirectamente, dicho compuesto de fórmula (I) en dicho individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del compuesto de fórmula (I) cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación del compuesto de fórmula (I) en un receptor biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione el compuesto de fórmula (I) en un receptor biológico de un individuo. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

Los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos y se pretende que ambas formas están dentro del alcance de la presente invención. En este sentido, el término “solvato”, tal como aquí se utiliza, incluye tanto solvatos farmacéuticamente aceptables, es decir, solvatos del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no aceptables, los cuales pueden ser útiles en la preparación de solvatos o sales farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del solvato farmacéuticamente aceptable no es crítica, siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el solvato es un hidrato. Los solvatos pueden obtenerse por métodos convencionales de solvatación bien conocidos por los técnicos en la materia. Para su aplicación en terapia, los compuestos de fórmula (I), sus isómeros, sales, profármacos o solvatos, se encontrarán, preferentemente, en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que tenga un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el principio activo son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente superiores al 70%, más preferiblemente superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% del compuesto de fórmula (I), o de sus sales, solvatos o profármacos.

A menos que se indique lo contrario, los compuestos de la invención también incluyen compuestos que difieren sólo en la presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, compuestos que tienen dicha estructura, a excepción de la sustitución de un hidrógeno por un deuterio o por tritio, o la sustitución de un carbono por un carbono enriquecido en ^{13}C o ^{14}C o un nitrógeno enriquecido en ^{15}N , están dentro del alcance de esta invención.

Los compuestos descritos en la presente invención, sus sales farmacéuticamente aceptables, profármacos y/o solvatos así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados junto con otros fármacos adicionales para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o un profármaco, solvato, derivado o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica útil para el tratamiento de patologías o enfermedades del sistema nervioso que puedan ser provocadas por procesos oxidativos, por el desarrollo de ovillos neurofibrilares o que al menos dichos procesos jueguen un papel patológicamente significativo o, en general, de enfermedades susceptibles de beneficiarse de las actividades biológicas mostradas por los productos descritos en la presente invención, en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende un compuesto, en cantidad terapéuticamente efectiva, de fórmula (I), o mezclas de los mismos, una sal, profármaco, solvato o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo junto con un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable, para la administración a un paciente.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere a la composición farmacéutica de la invención en el grupo de enfermedades del sistema nervioso de carácter neurodegenerativo a que pertenecen, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención: EA, Creutzfeldt-Jakob, Parkinson o Huntington, la demencia con cuerpos de Lewy o, en general, las enfermedades resultado de un deterioro de las neuronas causado por procesos de oxidación, de formación de ovillos neurofibrilares o de otro tipo tales como desequilibrios en la concentración de iones calcio, sistemas de neurotransmisión, etc; que el sistema nervioso del paciente afectado no es capaz de controlar.

El alcance de un proceso neurodegenerativo en la presente invención se caracteriza por pérdida neuronal, fallos en los procesos de neurotransmisión o procesos derivados de fallos en el control de las especies oxidantes creadas en el cerebro que dan lugar a estrés oxidativo patológico o del desarrollo de ovillos neurofibrilares en el interior de las neuronas.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I) o mezcla de compuestos y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente dicha composición puede comprender otro principio activo.

Los “vehículos farmacéuticamente aceptables” que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de pacientes afectados por enfermedades del sistema nervioso central en las que tengan lugar procesos oxidativos incontrolados, depósito de ovillos neurofibrilares u otros procesos en los que los productos de la presente invención produzcan un efecto benéfico. Este tratamiento consiste en la administración a los individuos afectados por estas enfermedades de cantidades terapéuticamente efectivas de un compuesto de fórmula (I), o una composición farmacéutica que lo incluya. A título de ejemplo, enfermedades contempladas en esta invención son la EA, Creutzfeldt-Jakob, Parkinson o Huntington, la demencia con cuerpos de Lewy o, en general, las enfermedades resultado de un deterioro de las neuronas causado por procesos de tipo estrés oxidativo, desestabilización de los microtúbulos por formación de ovillos neurofibrilares, desequilibrios iónicos o fallos en algún sistema de neurotransmisión que el sistema nervioso del paciente afectado no es capaz de controlar.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de desarrollar la acción terapéutica determinada por sus propiedades farmacológicas, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

En otra realización particular, dicha composición terapéutica se prepara en forma de una forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se efectúa por vía oral, tópica, rectal o parenteral (incluyendo subcutánea, intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, intravenosa, etc.). Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en el “Tratado de Farmacia Galénica”, C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid, o en otros habituales o similares de las Farmacopeas Española y de Estados Unidos.

El uso de los compuestos de la presente invención es compatible con su uso en protocolos en que los compuestos de la fórmula (I), o sus mezclas se usan por sí mismos o en combinaciones con otros tratamientos o cualquier procedimiento médico.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Ejemplos

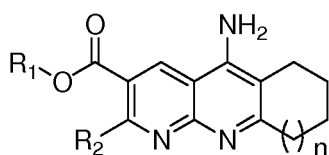
A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que desarrollan el proceso de selección de los compuestos de la invención.

1. Obtención de los compuestos de la invención

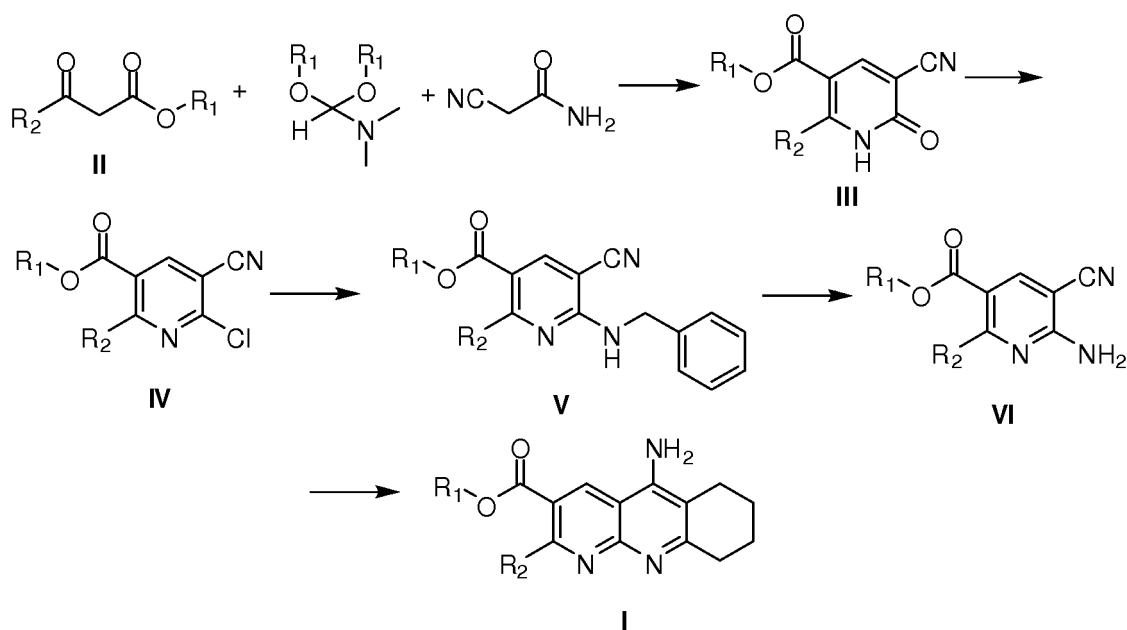
Los compuestos cuya actividad biológica es objeto de la presente invención se sintetizaron siguiendo un procedimiento general en síntesis orgánica. Dicho procedimiento está representado en el siguiente Esquema de reacciones:

Esquema 1

Síntesis de los compuestos de fórmula (I)



(I)



I

Esta síntesis en varios pasos parte del acilacetato (II), producto comercial u obtenido por procedimientos habituales en síntesis orgánica, de fácil ejecución por parte de cualquier experto en este campo. Este compuesto (II) se sometió a reacción con un derivado dialquilacetal de la dimetilformamida, para formar un intermedio de reacción con estructura de aceptor Michael, el cual, por reacción con cianoacetamida en condiciones básicas con evolución de dimetilamina y la posterior ciclación 6-exo-trig, rinde la correspondiente 2-piridona (III). En general, la piridona resultante se obtiene con pureza suficiente como para no ser necesaria una posterior purificación, el compuesto generado se aísla del medio de reacción por precipitación en medio ligeramente ácido. A partir de este producto de partida, se necesita sustituir el carbonilo en posición 2 por un grupo funcional amina. Para llevar a cabo esta transformación, se necesita transformar el carbonilo en un grupo fácilmente saliente, se eligió para ello la formación de 2-cloropiridina (IV). Este intermedio en la ruta de síntesis se forma en presencia de un exceso de electrófilo clorante, como el pentacloruro de fósforo o el oxiclورو de fósforo, pudiendo actuar como disolvente en la reacción. El uso de oxiclورو de fósforo facilita el proceso de aislamiento del producto ya que, una vez terminada la reacción (24h-2d), los derivados de 2-cloropiridina IV precipitan al añadir hielo. Así, se obtienen por filtración y secado, sin necesidad de mayor purificación. El intermedio clorado (IV) se somete a una sustitución nucleófila para incorporar en la posición del átomo de Cl una amina, reacción que se puede hacer de varias maneras, por ejemplo mediante burbujeo de amoníaco, o mediante tratamiento con bencilamina en un disolvente polar, obteniéndose la piridina protegida (V). El uso de bencilamina exige de un paso posterior. Sin embargo, es el método de elección porque evita el uso de amoníaco gas embotellado a alta presión, no exento de peligrosidad para el investigador. Así, se obtienen los precursores tipo (VI) a través de la eliminación del grupo bencilo en (V), en condiciones clásicas de desprotección de este tipo de funcionalidades, como es el burbujeo de gas hidrógeno en presencia de cantidades catalíticas de Pd sobre un soporte de carbón activo. Alternativamente y para evitar el uso de gases peligrosos, que necesitan a veces de un aumento de la presión en el reactor, se puede someter (V) a un tratamiento con ácido trifluorometanosulfónico en disolvente orgánico, que rinde análogamente las piridina del tipo (VI). Alternativamente, es posible llegar a la piridina VI a partir del éster alquílico del ácido β -aminocrotónico y el 2-etoximetilenmalononitrilo en presencia de ácido acético, en un solo paso de reacción, pero con bajo rendimiento. Estas piridinas son el sustrato necesario para la reacción de condensación tipo Friedländer con cetonas cíclicas en presencia de un ácido de Lewis, para conseguir los productos finales objeto de la

ES 2 360 150 A1

presente invención, de fórmula general (I). Los productos se obtienen con buen rendimiento, y si se considera todos los pasos de reacción, el rendimiento global de la ruta sintética desde productos comerciales está entorno al 18-26%. Este rendimiento se puede aumentar en el último paso de la condensación de Friedländer con la utilización de un aparato de microondas. Se ha probado este método con la síntesis del compuesto 2, aumentando el rendimiento en el último

5 paso de un 55 al 90%. Esta eficacia sintética permite considerar a estos compuestos accesibles para su preparación en planta piloto por la industria farmacéutica.

En particular, y siguiendo el protocolo de síntesis representado en el Esquema 1, se obtuvieron y caracterizado los siguientes compuestos:

10

Compuesto 1

5-amino-2-metil-6,7,8,9-tetrahidrobenzo[b][1,8]naftiridina-3-carboxilato de metilo. Sólido amarillo. Punto de fusión > 200°C; IR (KBr) ν 3338, 3229, 2941, 2862, 1716, 1620, 1601, 1568, 1543, 1437, 1361, 1284, 1246, 1116, 1070, 802, 779 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm) 8.82 (s, 1H, H4), 5.19 (bs, 2H, NH_2), 3.94 (s, 3H, CH_3O), 3.07 (m, 2H, H9), 2.95 [s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}(2)$], 2.59 (m, 2H, H6), 1.93 (m, 4H, H7, H8); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75.4 MHz) δ (ppm): 166.4 (C=O), 161.9 (C9a), 159.6 (C2), 154.1 (C10a), 150.9 (C5), 136.0 (C4), 119.7 (C3), 109.9 (C5a), 108.3 (C4a), 52.1 (CH_3O), 33.4 (C9), 25.2 [$\text{CH}_3\text{C}(2)$], 23.3 (C6), 22.1, 22.0 (C7, C8); EM (APIES+): m/z 272 [(M+1)⁺, 100], 248 (12), 205 (13). Pureza: Anal. Elem. Calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$: C, 66.40; H, 6.32; N, 15.49. Encontrado: C, 66.10; H, 6.61; N, 15.18.

20

Compuesto 2

5-amino-2-metil-6,7,8,9-tetrahidrobenzo[b][1,8]naftiridina-3-carboxilato de etilo. Sólido amarillo. Punto de fusión > 200°C; IR (KBr) ν 3374, 3324, 3182, 2934, 1717, 1664, 1602, 1577, 1546, 1434, 1363, 1350, 1252, 1222, 1120, 1072, cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) 8.82 (s, 1H, H4), 5.33 (bs, 2H, NH_2), 4.39 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.05 (m, 2H, H9), 2.91 [s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}(2)$], 2.58 (m, 2H, H6), 1.92 (m, 4H, H7, H8), 1.41 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75.4 MHz) δ (ppm) 166.7 (C=O), 163.9 (C9a), 162.0 (C2), 154.6 (C10a), 149.5 (C5), 135.0 (C4), 121.8 (C3), 111.5 (C5a), 109.0 (C4a), 61.8 (OCH_2CH_3), 34.2 (C9), 26.4 [$\text{CH}_3\text{C}(2)$], 23.9 (C6), 22.8 (C7, C8), 14.7 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); EM (APIES+): m/z 286 [(M+1)⁺, 100], 593 [(2×M+Na)⁺, 5], 308 [(M+Na)⁺, 4], 272 (10), 258 (12). Pureza: Anal. Elem. Calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2$: C, 67.35; H, 6.71; N, 14.73. Encontrado: C, 67.12; H, 6.54; N, 14.55.

30

Compuesto 3

35

5-amino-2-metil-7,8-dihidro-6H-ciclopenta[b][1,8]naftiridina-3-carboxilato de metilo. Sólido amarillo. Punto de fusión > 200°C; IR (KBr) ν 3317, 3188, 2951, 2844, 1724, 1645, 1601, 1549, 1431, 1358, 1259, 1114, 802, 777 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm) 8.74 (s, 1H, H4), 4.76 (bs, 2H, NH_2), 3.97 (s, 3H, CH_3O), 3.16 (t, $J_{7,8} = 7.6$ Hz, 2H, H8), 2.98 [s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}(2)$], 2.86 (t, $J_{6,7} = 7.6$ Hz, 2H, H6), 2.23 (quintete, 2H, $J_{6,7,8} = 7.6$ Hz, H7); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75.4 MHz) δ (ppm) 171.8 (C=O), 166.5 (C8a), 158.9 (C2), 157.0 (C9a), 148.1 (C4), 135.8 (C5), 119.5 (C3), 114.1 (C5a), 109.0 (C4a), 52.1 (CH_3O), 35.1 (C8), 27.5 [$\text{CH}_3\text{C}(2)$], 25.3 (C6), 21.8 (C7); EM (APIES+): m/z 258 [(M+1)⁺, 100], 245 (11), 205 (10), 157 (10). Pureza: Anal. Elem. Calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$: C, 65.35; H, 5.88; N, 16.33. Encontrado: C, 65.21; H, 5.78; N, 16.09.

40

Compuesto 4

45

5-amino-2-metil-7,8-dihidro-6H-ciclopenta[b][1,8]naftiridina-3-carboxilato de etilo. Sólido amarillo. Punto de fusión > 200°C; IR (KBr) ν 3329, 3176, 2964, 1716, 1657, 1604, 1550, 1433, 1400, 1358, 1252, 1217, 1117, 1086, 1051, 806, 779 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm) 8.74 (s, 1H, H4), 4.80 (bs, 2H, NH_2), 4.44 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.16 (t, $J_{7,8} = 7.6$ Hz, 2H, H8), 2.98 [s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}(2)$], 2.88 (t, $J_{6,7} = 7.6$ Hz, 2H, H6), 2.23 (quintete, 2H, $J_{6,7,8} = 7.6$ Hz, H7), 1.45 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50.2 MHz) δ (ppm) 171.6 (C=O), 166.1 (C8a), 158.7 (C2), 156.9 (C9a), 148.0 (C4), 135.6 (C5), 120.0 (C3), 114.0 (C5a), 109.0 (C4a), 60.8 (OCH_2CH_3), 35.0 (C8), 27.5 (C6), 25.2 [$\text{CH}_3\text{C}(2)$], 21.8 (C7), 14.1 (OCH_2CH_3); EM (APIES+): m/z 272 [(M+1)⁺, 100], 258 (8), 245 (7). Pureza: Anal. Elem. Calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$: C, 66.40; H, 6.32; N, 15.49. Encontrado: C, 66.41; H, 6.61; N, 15.22.

55

Compuesto 5

5-amino-2-metil-7,8,9,10-tetrahidro-6H-ciclohepta[b][1,8]naftiridina-3-carboxilato de metilo. Sólido amarillo. Punto de fusión > 200°C; IR (KBr) ν 3330, 3199, 2918, 2850, 1720, 1651, 1601, 1579, 1543, 1429, 1361, 1346, 1257, 1105, 1082, 810, 779 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm) 8.77 (s, 1H, H4), 5.03 (bs, 2H, NH_2), 3.96 (s, 3H, CH_3O), 3.19 (m, 2H, H10), 2.96 [s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}(2)$], 2.75 (m, 2H, H6), 1.98-1.46 (m, 6H, H7, H8, H9); ^{13}C NMR (DMSO-d_6 , 75.4 MHz) δ (ppm) 169.1 (C=O), 166.4 (C10a), 159.0 (C2), 154.5 (C11a), 149.2 (C5), 136.0 (C4), 120.1 (C3), 114.9 (C5a), 109.2 (C4a), 52.0 (OCH_3), 39.2 (C10), 31.4 (C9), 27.3 (C8), 26.2 (C6), 25.0, 24.9 (C2, C7); EM (APIES+) m/z 286 [(M+1)⁺, 100], 248 (12), 205 (15). Pureza: Anal. Elem. Calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2 \cdot \frac{1}{4}\text{H}_2\text{O}$: C, 66.30; H, 6.78; N, 14.50. Encontrado: C, 66.60; H, 6.80; N, 14.12.

65

ES 2 360 150 A1

Compuesto 6

5-*amino-2-metil-7,8,9,10-tetrahidro-6H-ciclohepta[b][1,8]naftiridina-3-carboxilato de etilo*. Sólido amarillo. Punto de fusión >200°C; IR (KBr) ν 3381, 3327, 3153, 2923, 2850, 1714, 1670, 1603, 1576, 1543, 1344, 1288, 1254, 1223, 1111, 1082, 1049, 812, 781 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm) 8.75 (s, 1H, H4), 5.03 (bs, 2H, NH_2), 4.44 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.19 (m, 2H, H10), 2.96 [s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}(2)$], 2.75 (m, 2H, H6), 2.00-1.60 (m, 6H, H7, H8, H9), 1.44 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); ^{13}C NMR (DMSO-d_6 , 75.4 MHz) δ (ppm) 169.1 (C=O), 166.1 (C10a), 158.8 (C2), 154.6 (C11a), 149.1 (C5), 135.9 (C4), 120.5 (C3), 114.9 (C5a), 109.3 (C4a), 60.8 (OCH_2CH_3), 39.2 (C10), 31.5 (C9), 27.3 (C8), 26.2 (C6), 25.1, 25.0 (C2, C7), 14.1 (OCH_2CH_3); EM (APIES+) m/z 300 [(M+1) $^+$, 100], 205 (17), 157 (13). Pureza: Anal. Elem. Calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2$: C, 68.20; H, 7.07; N, 14.04. Encontrado: C, 68.12; H, 6.89; N, 13.92.

Compuesto 7

5-*amino-2-metil-6,7,8,9,10,11-hexahidrocicloocta[b][1,8]naftiridina-3-carboxilato de metilo*. Sólido blanco. Punto de fusión > 200°C; IR (KBr) ν 3349, 2923, 2851, 1725, 1713, 1620, 1600, 1571, 1541, 1432, 1361, 1351, 1291, 1260, 1249, 1109, 1093 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm) 8.80 (s, 1H, H4), 5.10 (bs, 2H, NH_2), 3.97 (s, 3H, CH_3O), 3.15 (m, 2H, H11), 2.98 [s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}(2)$], 2.88 (m, 2H, H6), 1.90 (m, 2H, H10), 1.73 (m, 2H, H7), 1.43 (m, 4H, H8, H9); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75.4 MHz) δ (ppm) 167.6 (C=O), 166.5 (C11a), 161.9 (C2), 148.2 (C12a), 146.2 (C5), 134.9 (C4), 121.4 (C3), 114.2 (C5a), 109.0 (C4a), 52.4 (OCH_3), 36.2 (C11), 30.8 (C10), 27.8 (C7), 26.3, 26.2 (C8, C9), 25.9 (C2), 24.7 (C6). EM (APIES+) m/z 300 [(M+1) $^+$, 100], 322 [(M+Na) $^+$, 13], Pureza: Anal. Elem. Calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2$: C, 68.20; H, 7.07; N, 14.04. Encontrado: C, 68.50; H, 7.31; N, 14.08.

Compuesto 8

5-*amino-2-metil-6,7,8,9,10,11-hexahidrocicloocta[b][1,8]naftiridina-3-carboxilato de etilo*. Sólido blanco. Punto de fusión > 200°C; IR (KBr) ν 3345, 2920, 2846, 1716, 1618, 1599, 1570, 1541, 1431, 1356, 1350, 1290, 1259, 1242, 1167, 1107, 1090, 818, 779 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm) 8.75 (s, 1H, H4), 5.02 (bs, 2H, NH_2), 4.43 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.14 (m, 2H, H11), 2.97 [s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}(2)$], 2.87 (m, 2H, H6), 1.88 (m, 2H, H10), 1.72 (m, 2H, H7), 1.43 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.38 (m, 4H, H8, H9); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75.4 MHz) δ 166.6 (C11a), 166.1 (C=O), 159.3 (C2), 154.6 (C12a), 149.9 (C5), 136.0 (C4), 120.5 (C3), 112.5 (C5a), 108.8 (C4a), 60.8 (OCH_2CH_3), 35.7 (C11), 30.7 (C10), 27.8 (C7), 26.0, 25.8 (C8, C9), 25.1 [$\text{CH}_3\text{C}(2)$], 23.7 (C6), 14.1 (OCH_2CH_3); MS (APIES+) m/z 314 [(M+1) $^+$, 100], 205 (12). Pureza: Anal. Elem. Calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2$: C, 68.98; H, 7.40; N, 13.41. Encontrado: C, 68.69; H, 7.68; N, 13.12.

2. Actividades biológicas estudiadas en los compuestos de la invención

2.1 Propiedades neuroprotectoras de los compuestos de la invención

Se evaluó el efecto citoprotector de los compuestos en células de neuroblastoma humano, concretamente el potencial neuroprotector de estos compuestos frente a (i) el estrés oxidativo producido por rotenona y oligomicina A, bloqueantes de la cadena respiratoria de la mitocondria según se describe en *J. Neurochem.* **1992**, 59, 1609-1623 y en *Toxicological Sciences* **2004**, 79, 137-146, respectivamente, y (ii) la hiperfosforilación de la proteína tau inducida por ácido okadaico que es un modelo aceptado para la muerte neuronal que ocurre en la EA y que está relacionada con la hiperfosforilación de tau (*Neuroscience* **2004**, 126, 277-284; *Neurosci Lett.* **1997**, 235, 149-153).

El parámetro de viabilidad que se midió en el primer caso era la actividad de la enzima lactatodeshidrogenasa (LDH en lo sucesivo), una enzima que se libera al medio extracelular cuando muere la célula (*J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, 315, 1346-1353). En los experimentos con ácido okadaico se utilizó para medir la supervivencia celular el ensayo que se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul (formazan), lo que permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas (*J. Immunol. Meth.* **1983**, 65, 55-63). El ácido okadaico produce cambios mitocondriales en las células tratadas con dicho tóxico, originando disminución del potencial de membrana mitocondrial (*Toxicology in Vitro* **2001**, 15, 199-208), iniciándose así el proceso que llevará a la muerte celular. Por ello, se consideró más adecuado un método como el de MTT que nos permite conocer el estado metabólico de la mitocondria en las células sometidas a incubación con ácido okadaico.

El método experimental utilizado, siguiendo un procedimiento previamente descrito (*Neuropharmacology* **2004**, 46, 103-114) es el siguiente: las células SHSY5Y de neuroblastoma humano fueron sembradas y cultivadas en un medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) conteniendo 15 aminoácidos no esenciales y suplementada con un 10% de suero fetal de ternera, glutamina 1 milimolar, 50 unidades por mililitro de penicilina y 50 microgramos por mililitro de estreptomycin, manteniéndolas a 37°C en aire humidificado conteniendo 5% de dióxido de carbono. En los ensayos, las células SH-SY5Y fueron subcultivadas en placas de 48 pocillos con una densidad de sembrado de 1×10^5 células por pocillo. En los experimentos de citotoxicidad, las células así preparadas fueron tratadas con los compuestos a medir en DMEM libre de suero.

Para estudiar la acción citoprotectora de los diferentes compuestos contra la muerte celular inducida por una combinación de rotenona con oligomicina A 30 micromolar y 10 micromolar respectivamente o con ácido okadaico 30 nanomolar, todos los compuestos (1 a 8) fueron evaluados a la concentración de 1 micromolar. Para ello, las células fueron tratadas con el producto a evaluar durante 24 horas. Después, los medios fueron reemplazados por medios frescos que aún contenían el compuesto más los agentes citotóxicos, y fueron así mantenidos por un período adicional de 24 horas. La viabilidad celular fue comprobada en el caso de la incubación con la combinación rotenona/oligomicina A midiendo la actividad de la enzima LDH mediante el kit "Cytotoxicity Cell Death" (Roche-Boehringer Mannheim) siguiendo las instrucciones del fabricante de dicho kit. Las muestras se analizaron espectrofotométricamente en un lector de placas (LabSystems iEMS Reader MF), empleando el filtro adecuado (490 nm), obteniendo los valores de absorbancia mediante el programa DeltaSOFTII Versión 3,71 EMS. La actividad LDH total fue definida como la suma de las actividades LDH intra y extracelular. La actividad LDH liberada por las células al morir fue definida como el porcentaje de la actividad LDH extracelular frente a la actividad LDH total.

Cuando el citotóxico empleado fue el ácido okadaico la evaluación de la viabilidad se hizo midiendo la reducción de una sal de tetrazolio (MTT) soluble, de color amarillo, a un formazán insoluble de color azul. Para ello, se añadió 50 microlitros del reactivo de MTT comercial (Sigma) a cada pocillo con 500 microlitros de medio manteniendo las placas de cultivo durante 3 horas en oscuridad y a 37°C. Transcurrido este tiempo se retiró suavemente el medio sobrenadante, quedando depositado un precipitado que se disolvió con 300 microlitros de dimetilsulfóxido (DMSO). Tras 10 minutos agitando se tomaron muestras de los pocillos y se leyó la absorbancia en un lector de placas (LabSystems iEMS Reader MF) a una longitud de onda de 540 nanómetros. Los valores de absorbancia obtenidos con el tóxico solo y con cada compuesto en presencia del tóxico se restaron del valor de absorbancia obtenido en condiciones basales, sin tratamiento. El valor obtenido de la resta de los valores de absorbancia basal menos tóxico solo, se consideró el 100% de muerte y los valores obtenidos con los compuestos en presencia de tóxico se normalizaron como porcentajes de dicho valor. Para calcular el porcentaje de supervivencia, se restaron estos valores de 100.

En todos los ensayos farmacológicos se utilizó un control positivo como comparación y para evaluar la bondad del método empleado. En el caso de los experimentos con rotenona/oligomicina A se utilizó N-acetilcisteína (NAC), un bien conocido antioxidante; cuando se empleó ácido okadaico como tóxico se utilizó como control positivo galantamina, que en trabajos previos había demostrado un efecto protector (*J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, 315, 1346-1353).

Los resultados obtenidos para los compuestos descritos como compuestos 1 a 8 que se muestran en las Tablas 1 y 2, vienen expresados en porcentaje de la actividad neuroprotectora.

TABLA 1

Porcentaje de neuroprotección frente a la mezcla de rotenona (30 μ M) y oligomicina A (10 μ M) de los derivados de 1,8-naftiridina a la concentración de 1 micromolar

<u>Compuesto</u>	<u>% protección a 1 μM</u>
1	25.8*
2	41.5*
3	29.1*
4	28.7*
5	27.5*
6	21.9*
7	34.6*
8	32.6*
NAC	24.4*

Los resultados son la media de 4 experimentos independientes (por triplicado). *p< 0.05.

Estos resultados indican que los compuestos objeto de la presente invención son capaces de reducir de manera moderada la presencia de especies radicáticas con el consiguiente efecto neuroprotector, lo que los convierte en potenciales fármacos para el tratamiento de patologías generadas o favorecidas por estrés oxidativo o presencia de especies radicáticas en general.

TABLA 2

Porcentaje de neuroprotección frente a ácido okadaico 30 nM de los derivados de 1,8-naftiridina a la concentración de 1 micromolar

<u>Compuesto</u>	<u>% protección a 1 μM</u>
1	47.2***
2	58.6***
3	59.4**
4	52.3***
5	50.8***
6	16.8***
7	56.1**
8	47.6***
Galantamina	46.9*

Los resultados son la media de 8 experimentos independientes (por triplicado). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Estos resultados muestran que la mayor parte de los compuestos objeto de la presente invención protegen de manera notable frente a la muerte inducida por la formación de ovillos neurofibrilares, con valores cercanos al 60% de protección para algunos de ellos.

2.2 Propiedades de los compuestos objeto de la invención como inhibidores de las enzimas acetil y butirilcolinesterasa

Se evaluó la actividad inhibidora de las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE) de los compuestos estudiados por el método de Ellman (*Biochem. Pharmacol.* **1961**, 7, 88-95). Se eligió como modelo neuronal la enzima acetilcolinesterasa de anguila eléctrica (*Electrophorus electricus*), de gran analogía a la neuronal humana. Para analizar comparativamente la hipotética inhibición periférica, potencialmente asociada a los efectos adversos encontrados en la administración de anticolinesterásicos, se evaluó la actividad inhibidora de la AChE extraída de eritrocitos humanos. Para evaluar la inhibición de BuChE, se eligió la extraída de suero equino.

La inhibición de las enzimas colinesterasas es la diana terapéutica predominante en la clínica para el tratamiento de la EA. Este abordaje terapéutico se basa en la denominada hipótesis colinérgica (*Science* **2006**, 314, 777-781), la cual sugiere que la pérdida selectiva de neuronas colinérgicas en la EA provoca un déficit del neurotransmisor acetilcolina (ACh) en regiones específicas del cerebro que controlan el aprendizaje y la memoria (*Lancet Neurol.* **2003**, 2, 539-547). Así, existen tres fármacos aprobados por las administraciones reguladoras del medicamento internacionales (donepecilo, galantamina y rivastigmina) que mejoran los síntomas de la EA a través de la inhibición de AChE, la enzima responsable de hidrolizar ACh, elevando consecuentemente los niveles de este neurotransmisor en la hendidura sináptica (*Pharmacol. Res.* **2004**, 50, 441-451). Recientemente se ha generado un renovado interés por los inhibidores de AChE, estimulado por el potencial papel de la AChE en acelerar la formación de fibrilas amiloides en el cerebro y la generación de complejos estables con $A\beta$ (*Neuron* **1996**, 16, 881-891). Esta característica implica al sitio de unión periférico aniónico (PAS) de la AChE, como lo demuestra el hecho de que yoduro de propidio, que se une al PAS, afecta a la agregación de $A\beta$ *in vitro*, mientras que los inhibidores que se unen al sitio catalítico no presentan este efecto.

El método experimental utilizado, siguiendo el procedimiento previamente descrito (*Biochem. Pharmacol.* **1961**, 7, 88-95) es el siguiente: para la medida de la inhibición de AChE (ya sea extraída de anguila eléctrica o de suero humano) se llevó a cabo la reacción en pocillos con un volumen final de 3 ml de una solución tampón de PBS a pH 8, conteniendo 0,035 unidades/ml de AChE y 0,35 mM de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), utilizado para producir el anión de color amarillo ácido 5-tio-2-nitrobenzoico. Las curvas de inhibición con los diferentes compuestos se realizaron por cuadruplicado incubando con al menos 9 concentraciones de los compuestos durante 10 min. Pasado este tiempo, se añadió el sustrato de yoduro acetiltiocolina a 0,35 mM, desde una solución madre 10 mM. Para la medida de la inhibición de BuChE extraída de suero equino se llevó a cabo la reacción en pocillos con un volumen final de 3 ml de una solución tampón de PBS a pH 8, conteniendo 0,05 unidades/ml de BuChE y 0,35 mM de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB). Las curvas de inhibición con los diferentes compuestos se realizaron por cuadruplicado incubando con al menos 9 concentraciones de los compuestos durante 10 min. Pasado este tiempo, se añadió el sustrato de yoduro butiriltiocolina a 0,5 mM, desde una solución madre 10 mM. En los dos tipos de experimentos (AChE y BuChE), una muestra por cuadruplicado sin compuesto estuvo siempre presente para rendir el 100% de la actividad enzimática. A los 15 min se midió la producción de color a 412 nm en un lector espectrofotométrico de placas de 96 pocillos como señal de la actividad enzimática.

La concentración de fármaco que produce la inhibición del 50% de la actividad enzimática (CI_{50}) se calculó por regresión sigmoïdal de la representación logarítmica de la concentración. Los resultados se expresaron como media $\pm$ error estándar de al menos tres experimentos. Los resultados obtenidos para los compuestos descritos como compuestos 1 a 8 se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3

Actividad inhibidora de enzimas colinesterasas por parte de los compuestos derivados de 1,8-naftiridina

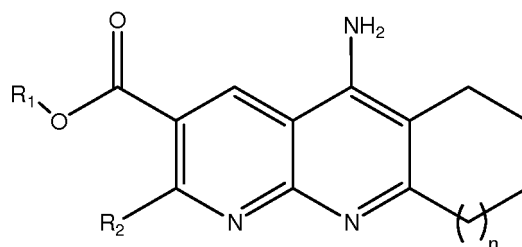
Compuesto	$CI_{50} \pm eem$ (nM)			
	eeAChE	hAChE	eqBuChE	S(BuChE/eeAChE)
1	93 $\pm$ 5	1000 $\pm$ 141	3400 $\pm$ 315	37
2	60 $\pm$ 6	780 $\pm$ 84	12000 $\pm$ 1000	200
3	120 $\pm$ 12	1900 $\pm$ 202	5000 $\pm$ 1075	42
4	350 $\pm$ 43	2100 $\pm$ 240	39000 $\pm$ 7387	111
5	360 $\pm$ 74	2000 $\pm$ 290	490 $\pm$ 32	1,4
6	310 $\pm$ 16	2000 $\pm$ 282	2100 $\pm$ 209	6,8
7	250 $\pm$ 34	1800 $\pm$ 163	4070 $\pm$ 74	16
8	400 $\pm$ 18	1800 $\pm$ 284	5300 $\pm$ 307	13
Galantamina	560 $\pm$ 64	600 $\pm$ 43	12000 $\pm$ 1325	21
Tacrina	27 $\pm$ 2	100 $\pm$ 13	5,2 $\pm$ 0,2	0,19
Donepecilo	13,4 $\pm$ 0,9	8,2 $\pm$ 0,4	840 $\pm$ 47	63

Los resultados son la media de al menos 3 experimentos independientes (por cuadruplicado). Donde S(BuChE/eeAChE) se refiere a la selectividad BuChE/eeAChE.

Estos resultados indican que los compuestos objeto de la presente invención son capaces de inhibir las enzimas colinesterasas de manera moderada y dual, exceptuando 1 y 2, que muestran una potente actividad inhibidora y selectiva para AChE. Es destacable su mayor actividad sobre AChE de anguila eléctrica, isoforma muy parecida a la humana neuronal, que sobre la AChE de eritrocitos humanos. Este descubrimiento es importante en cuanto que podría significar una menor incidencia de efectos secundarios asociados a la inhibición de esta enzima periférica. Estos resultados los convierten en potenciales fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I):



(I)

donde

R_1 y R_2 son iguales o distintos y se seleccionan de forma independiente de un grupo alquilo (C_1 - C_{10}); y n es un número entero con un valor de entre 0 a 5.

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde R_1 y/o R_2 son un grupo alquilo (C_1 - C_6).

3. Compuesto según la reivindicación 2, donde R_1 es metilo o etilo.

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, donde R_2 es metilo.

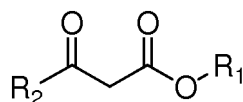
5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde n es 0, 1, 2 ó 3.

6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, seleccionado de la lista que comprende:

- 5-amino-2-metil-6,7,8,9-tetrahidrobenzo[*b*][1,8]naftiridina-3-carboxilato de metilo,
- 5-amino-2-metil-6,7,8,9-tetrahidrobenzo[*b*][1,8]naftiridina-3-carboxilato de etilo,
- 5-amino-2-metil-7,8-dihidro-6*H*-ciclopenta[*b*][1,8]naftiridina-3-carboxilato de metilo,
- 5-amino-2-metil-7,8-dihidro-6*H*-ciclopenta[*b*][1,8]naftiridina-3-carboxilato de etilo,
- 5-amino-2-metil-7,8,9,10-tetrahidro-6*H*-ciclohepta[*b*][1,8]naftiridina-3-carboxilato de metilo,
- 5-amino-2-metil-7,8,9,10-tetrahidro-6*H*-ciclohepta[*b*][1,8]naftiridina-3-carboxilato de etilo,
- 5-amino-2-metil-6,7,8,9,10,11-hexahidrocicloocta[*b*][1,8]naftiridina-3-carboxilato de metilo, y
- 5-amino-2-metil-6,7,8,9,10,11-hexahidrocicloocta[*b*][1,8]naftiridina-3-carboxilato de etilo.

7. Procedimiento de obtención de los compuestos de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende los siguientes pasos:

a. hacer reaccionar un acilacetato alquilo de fórmula (II),



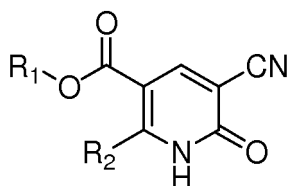
(II)

donde: R_1 y R_2 se ha descrito en la reivindicación 1,

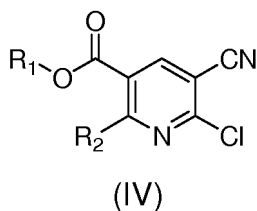
con un dialquilacetato de dimetilformamida y posteriormente con cianoacetamida en condiciones básicas;

ES 2 360 150 A1

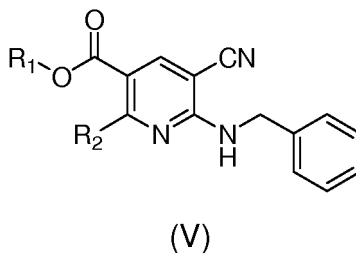
- b. sustitución nucleófila sobre la 2-piridona de fórmula (III) obtenida en el paso (a) mediante un exceso de oxicloruro de fósforo:



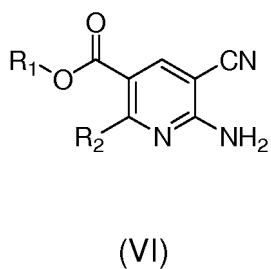
- c. sustitución nucleófila sobre la piridina de fórmula (IV), obtenida en el paso (b), incorporando en la posición del átomo de Cl una amina:



- d. desprotección de las piridinas de fórmula (V), obtenidas en el paso (c), dejando libre el grupo amino, y



- e. condensación tipo Friedländer del sistema heterocíclico básico de fórmula (VI), obtenido en el paso (d):



8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el paso (c) se lleva a cabo mediante burbujeo de amoníaco o mediante tratamiento con benzilamina en un disolvente polar.

9. Procedimiento según cualquier de las reivindicaciones 7 u 8, en el que el paso (d) se lleva a cabo por tratamiento con ácido trifluorometanosulfónico en disolvente orgánico o por burbujeo de gas hidrógeno en presencia de cantidades catalíticas de paladio sobre un soporte de carbón activo.

10. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la elaboración de un medicamento.

11. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

12. Uso del compuesto según la reivindicación anterior, donde las enfermedades neurodegenerativas se seleccionan de la lista que comprende enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington.

ES 2 360 150 A1

13. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I) junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptable.

5 14. Composición farmacéutica según la reivindicación anterior, que además comprende uno o más agentes terapéuticos activo.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930903

②② Fecha de presentación de la solicitud: **26.10.2009**

③② Fecha de prioridad: **00-00-0000**
00-00-0000
00-00-0000

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C07D 471/04** (2006.01)
A61K 31/4375 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	J L MARCO et al., Bioorganic Medicinal Chemistry 2001, vol 9, págs 727-732. "Synthesis and acetylcholinesterase/inhibition activity of new tacrine-like analogues" todo el documento, en particular página 728, esquema 3 compuestos 5 y 6.	1-14
A	J L MARCO et al., Bioorganic Medicinal Chemistry 2004, vol 12, págs 2199-2218. "Synthesis, biological avaluation and molecular modelling of diversely functionalized heterocyclic derivatives as inhibitors of acetylcholinesterase/butirylcholinesterase" todo el documento, en particular página 2200, compuestos 2,15-29,63-67.	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
29.09.2010

Examinador
P. Fernández Fernández

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07D, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC,WPI,CAS,REGISTRY

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.09.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SÍ
	Reivindicaciones _____	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SÍ
	Reivindicaciones _____	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Bioorganic Medicinal Chemistry 2001,vol 9,págs 727-732	2001
D02	Bioorganic Medicinal Chemistry 2004,vol 12,págs 2199-2218	2004

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud se refiere a los derivados de 1,8-naftiridinas de fórmula (I) (reivindicación 1), el procedimiento para su obtención (reivindicaciones 7-9) y su uso para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (reivindicaciones 10-14).

El documento D1 divulga compuestos de fórmula C (ver página 728 y esquema 3 compuestos 5 y 6). El documento D2 divulga compuestos de fórmula B (ver página 2200 y compuestos 2,15-29 y 63-67) análogos a los descritos en D1 y su potencial utilidad en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Los compuestos de fórmula (I) de la solicitud se diferencian de los divulgados en D1 y D2 en la sustitución en posición 4 del heterociclo de naftiridina, los primeros están sustituidos en posición 4 por un hidrógeno, mientras que en los compuestos divulgados en D1 y D2 este sustituyente es siempre un fenilo sustituido o no. Por otra parte, no existe evidencia ni puede deducirse a priori que cambiar el sustituyente en posición 4 por un hidrógeno conlleve mejores resultados en cuanto a su aplicación farmacéutica.

Por tanto, se considera que las reivindicaciones 1-14 de la solicitud cumplen los requerimientos de novedad y actividad inventiva según los Art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.