

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 888**

51 Int. Cl.:  
**C07C 257/14** (2006.01)  
**C07C 257/16** (2006.01)  
**C07C 279/04** (2006.01)  
**C07C 279/36** (2006.01)  
**A61K 31/155** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04020517 .1**  
96 Fecha de presentación: **30.08.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1512679**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.03.2005**

54 Título: **DERIVADOS DE ADAMANTANO NOVEDOSOS CON ACTIVIDADES NEUROPROTECTORAS, ANTIDEPRESIVAS Y ANTIISQUÉMICAS, Y PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR LOS MISMOS.**

30 Prioridad:  
**02.09.2003 IT to20030668**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.12.2011**

73 Titular/es:  
**ROTTAPHARM S.P.A.  
GALLERIA UNIONE 5  
20122 MILANO, IT**

72 Inventor/es:  
**Makovec, Francesco;  
Artusi, Roberto;  
Zanzola, Simona y  
Rovati, Lucio Claudio**

74 Agente: **de Justo Bailey, Mario**

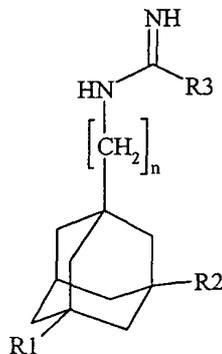
ES 2 369 888 T3

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 adamantano novedosos con actividades neuroprotectoras, antidepresivas y antiisquémicas, y procedimiento para preparar los mismos

La presente invención se refiere a derivados de amidina novedosos, de adamantano, que pueden representarse mediante la fórmula general (I) proporcionada a continuación



(I)

10 en la que:

- n es 2;
- R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son ambos un grupo metilo;
- R<sub>3</sub> se elige independientemente de un grupo alquilo lineal, ramificado o cíclico que contiene desde 1 hasta 3 átomos de carbono y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Los compuestos que son el objeto de la invención son antagonistas de receptores no competitivos para el receptor NMDA y pueden tener un uso favorable o bien para tratar enfermedades del sistema nervioso central (SNC), por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, demencia senil, isquemia cerebral y depresión, o bien para tratar formas periféricas neuropáticas, estando estas patologías posiblemente correlacionadas al menos parcialmente con disfunción del sistema glutamatérgico.

El receptor NMDA pertenece a la familia de receptores inotrópicos de ácido glutámico, junto con el receptor AMPA y el receptor de kainato. Los diversos receptores NMDA presentes en el sistema nervioso central se diferencian por la composición de las subunidades proteicas (NR1, NR2<sub>A-D</sub>, NR3) que forman el canal de calcio que distingue el receptor. Los sitios de unión para ácido glutámico (agonista) y glicina (coagonista) están presentes en la parte extracelular del receptor. Además, están presentes al menos otros dos sitios moduladores fuera del canal (poliamina y zinc) y dos dentro del canal (MK-801 y Mg<sup>2+</sup>).

La entrada de calcio en el canal de NMDA tiene lugar, en condiciones fisiológicas, cuando una neurona presináptica glutamatérgica libera, tras un potencial de acción, moléculas de ácido glutámico en la sinapsis. El glutamato liberado interacciona con el sitio catalítico del receptor NMDA en la neurona postsináptica y, una vez que el canal se libera del magnesio que lo ocupa en condiciones de reposo, permite la entrada de calcio desde el medio extracelular al interior del medio intracelular.

Si el canal de calcio asociado con el receptor NMDA permanece abierto a la entrada de calcio durante más de unos cuantos milisegundos (estado patológico), se inicia una cascada de reacciones intracelulares, que conduce a muerte neuronal (apoptosis). Por tanto, la intervención terapéutica puede tener lugar o bien bloqueando la entrada de iones calcio o bien interaccionando con los sitios de unión del receptor NMDA.

Los efectos de los compuestos según la invención se estudiaron en farmacología preclínica tanto *in vitro* como *in vivo*.

*In vitro*, algunos de éstos han demostrado que inhiben, en neuronas noradrenérgicas de hipocampo de rata, la activación del receptor inducida por NMDA en un intervalo de concentración submicromolar.

También se ha demostrado que algunos de los compuestos que forman el objeto de la invención aumentan la liberación basal de noradrenalina (NE) en cortes de hipocampo de rata, y que aumentan en el cuerpo estriado tanto la liberación basal de dopamina como la de acetilcolina. Algunos de éstos han demostrado que bloquean la liberación de aspartato provocada por una lesión isquémica.

Se ha demostrado también que los compuestos que son el objeto de la invención son inhibidores de la NO (óxido

nítrico) sintetasa inducible (iNOS). Esta enzima, que se induce o bien en presencia de numerosas citocinas proinflamatorias o bien por endotoxina, se expresa en diversos tipos de células, por ejemplo, neutrófilos y macrófagos.

- 5 Por tanto, los compuestos según la invención también pueden usarse ventajosamente en enfermedades inflamatorias, por ejemplo, artritis reumatoide. Su actividad antagonista combinada sobre el receptor NMDA y sobre la enzima iNOS puede ser útil en el tratamiento de neuropatías periféricas o bien de origen mecánico (compresiones, contusiones, fracturas, etc.) o bien de origen metabólico, tal como en el caso de diabetes mellitus, y para tratar un
- 10 síndrome neurológico conocido como “complejo de demencia asociado al SIDA”, caracterizado tanto por pérdida neuronal difusa del SNC como por deterioro de los mecanismos de aprendizaje y memoria y de control motor.

El efecto neuroprotector de los compuestos que son el objeto de la invención también puede usarse satisfactoriamente en el tratamiento y la prevención de patologías cerebrales isquémicas.

- 15 Se ha demostrado que los compuestos que son el objeto de la invención tienen actividad antidepressiva, según diversos modelos experimentales en ratones que se reconocen como modelos válidos para evaluar la actividad antidepressiva de un fármaco.

- 20 Por tanto, en virtud de su mecanismo de acción particular, que consiste en la capacidad para modular la activación del complejo de receptor NMDA y los sistemas noradrenérgicos, dopaminérgicos y colinérgicos y de la inhibición de la enzima iNOS, los compuestos mencionados anteriormente pueden usarse ventajosamente en el tratamiento y la prevención de diversas enfermedades asociadas con un deterioro en o mal funcionamiento de las capacidades cognitivas, por ejemplo alteraciones de la capacidad mental, deterioro cognitivo senil y orgánico, enfermedad de Alzheimer, demencia senil, complejo de demencia asociado al SIDA, alteraciones del comportamiento y depresión,
- 25 para el tratamiento de neuropatías periféricas de cualquier origen y en isquemia cerebral.

- Se ha realizado un gran número de estudios en los últimos diez años en la búsqueda de fármacos para tratar demencias en general y la enfermedad de Alzheimer en particular. Entre estos fármacos, un papel particular lo desempeña la memantina, un derivado de aminoadamantilo. Desarrollado en las década de 1980 como fármaco antiparkinsoniano por su actividad dopaminomimética, se descubrió posteriormente que esta sustancia podía bloquear el flujo de iones calcio a través del canal asociado al receptor NMDA a concentraciones hasta 100 veces inferiores a las requeridas para promover la liberación de dopamina a niveles cortico-estriatales. Basándose en estos resultados, se consideró la memantina como un posible fármaco para tratar la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, aunque la memantina tiene una actividad comparable a los compuestos que son el objeto de la invención para inhibir la unión al receptor de MK-801 y para inhibir la liberación provocada por NE de NMDA en el hipocampo, es notablemente menos activa en la liberación basal de NE en el hipocampo y completamente inactiva en la liberación basal de Aco en el cuerpo estriado, al igual que es completamente inactiva en la inhibición de la enzima inducible iNOS.
- 30
- 35

- 40 Tal como se mencionó anteriormente, existe una amplia bibliografía de patentes referente a la actividad terapéutica para diversas clases de derivados de adamantano-amino además de la propia memantina: por tanto, por ejemplo, el documento GB 1 274 652 A publicado en 1972 reivindica y describe yodhidrato de 2-(1-adamantil)etilguanidina con actividad antidepressiva; el documento US 2002/028836 se refiere a derivados con actividad como “agentes de apertura de canales de potasio”, el documento WO99/42458 reivindica y describe compuestos que tienen alta afinidad por el receptor H3 histamínico; el receptor WO99/20599 describe derivados de adamantilo para tratar trastornos neurodegenerativos; el documento WO91/18868 describe ligandos de receptor sigma novedosos; el documento WO03/024401 se refiere a moduladores de receptor de quimiocinas novedosos; el documento US 5 061 703 (de 1991) reivindica derivados de aminoadamantilo para prevenir y tratar la isquemia.
- 45

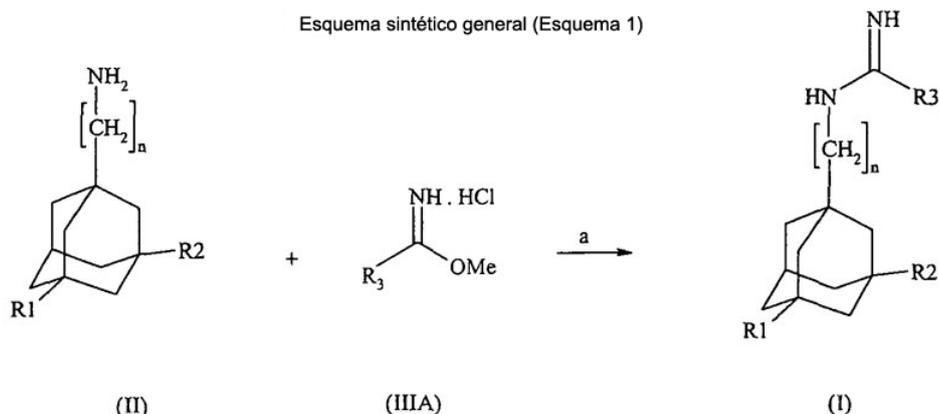
- 50 La base de datos Chemcats en línea, Chemical Abs. Ser. Columbus, Ohio, EE.UU., XP002305001 da a conocer 2-(3,5-dimetiladamant-1-il)etilguanidina.

- Sin embargo, ninguna de las patentes citadas reivindica derivados de adamantano sustituidos con grupos amidina o guanidina y que sean adecuados para insertar estos grupos, lo que ha proporcionado la posibilidad de modular simultáneamente la sobreactivación del complejo de receptor NMDA con inhibición de la enzima iNOS y con un aumento en la liberación basal de los mediadores NE, acetilcolina y dopamina.
- 55

- El procedimiento para preparar los derivados que son el objeto de la invención ilustrados por la fórmula I consiste en las siguientes operaciones, que pueden resumirse tal como sigue: hacer reaccionar la adamantilalquilamina adecuadamente sustituida de fórmula general (II) (véase el esquema sintético general), obtenido por medio de un procedimiento conocido en la bibliografía: (véase, por ejemplo: Novakov, I. A.; *et al.* Khim.-Farm. Zh., 1987, 21(4), 454-458) y en la que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y n tienen el significado proporcionado anteriormente, con una serie de reactivos, concretamente:
- 60

- a) alquilacetamidato de fórmula (IIIA) salificado en forma de clorhidrato, en la que R<sub>3</sub> tiene el significado proporcionado anteriormente; la reacción tiene lugar en presencia de un exceso de (IIIA) con respecto a (II) (preferiblemente 2 moles con respecto a 1) y en presencia de una cantidad estequiométrica en relación con (IIIA) de
- 65

una base terciaria, preferiblemente trietilamina, en un disolvente inerte anhidro, por ejemplo tetrahidrofurano, a una temperatura de entre 4°C y el punto de ebullición del disolvente, durante un tiempo de entre 2 y 72 horas, para dar los derivados finales correspondientes de fórmula (IA) en la que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y n tienen el significado proporcionado anteriormente (véase el esquema sintético general, etapa a);



5

Los ejemplos que siguen se proporcionan para ilustrar la invención más claramente.

### Ejemplo 1

10 Preparación de N-[2-(3,5-dimetil-1-adamantil)etil]-acetamida (compuesto 2 de la tabla 1)

Se suspenden 1,7 g de 1-[2-(3,5-dimetil-1-adamantil)etil]amina (8,20 mmoles) en 50 ml de tetrahidrofurano. Se añaden 2,3 ml de trietilamina (16,4 mmoles) y 1,73 g de clorhidrato de acetamido de metilo (16,4 mmoles), con agitación a temperatura ambiente; el pH de la suspensión es de aproximadamente 9. Tras 24 horas (el pH desciende hasta 7), se separa el sólido por filtración, lavando con una pequeña cantidad de tetrahidrofurano y etil éter. Se basifica el residuo recogido en agua con disolución de hidróxido de sodio 4 N hasta pH 11 y se agita durante 1 hora, y entonces se separa por filtración, se lava con agua y etil éter, y se seca a vacío sobre pentóxido de fósforo. Se suspende el sólido obtenido en isopropil éter y se acidifica con una disolución 8 M de HCl en isopropil éter dando el clorhidrato (2,1 g), y entonces se separa por filtración, se lava con isopropil éter y se recristaliza en acetonitrilo. Se obtienen 1,9 g.

20

Fórmula: C<sub>16</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub> (PM 284,87). Rendimiento del 80%.

CCF: (butanol/ácido acético/agua 5/2/2) rf 0,78. P.f. 169°C.

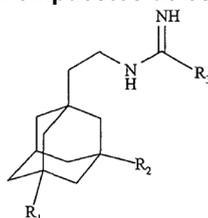
<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>), ppm: 0,85 (s, 6H); 1,05-1,50 (m, 15H); 2,18 (s, 3H); 3,20 (m, 2H); 9,08 (sa, 3H).

25

Se preparan todos los derivados de fórmula IA (véase el esquema 1) de una manera similar usando el alquilacetamido apropiado.

30 Varios derivados, obtenidos según la invención, se proporcionan en la tabla 1 a continuación, junto con varias características fisicoquímicas que los identifican.

Tabla 1: Compuestos de estructura:



Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Fórmula empírica	p.f. (disolvente de cristalización)*	CCF (R <sub>f</sub> )**
2	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> ·HCl	169 (A)	0,78 (I)
7	Me	Me	ciclopropilo	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub>	96 (A)	0,66 (I)

\*Disolvente de cristalización: A (acetonitrilo); B (etanol al 95%)

35 \*\*Eluyente: (I) butanol/ácido acético/agua (5/2/2) (v/v); (II) cloroformo/metanol/agua/amoníaco acuoso (85/25/2/1) (v/v).

**Actividad farmacológica *in vitro****Estudios de unión a membranas sinaptosómicas corticales de rata*

Se evaluó la afinidad de los compuestos según la invención por el receptor NMDA por medio de estudios de unión usando como trazador el compuesto MK-801, que es un compuesto dotado de actividad anticonvulsivante, que actúa como antagonista de NMDA potente, selectivo y no competitivo.

Se usaron preparaciones de membrana sinaptosómica de rata, con ligeros cambios con respecto al método descrito por Foster *et al.* [(Br. J. Pharmacol. 91, 403-409 (1987)]. Brevemente, se incubaron membranas corticales junto con el trazador  $H^3$ -MK-801 durante 45 minutos a 23°C junto con los compuestos de prueba. Se terminó la reacción separando el radioligando unido del radioligando libre, mediante filtración sobre filtros de fibra de vidrio, que, tras el lavado, se pusieron en contacto con un centelleador líquido (contador  $\beta$ ), determinando así la radioactividad unida al sedimento. La unión específica se determina como la diferencia entre la unión en ausencia y en presencia de MK-801  $10^{-4}$  M frío.

Los resultados así obtenidos se expresan como  $CI_{50}$ , es decir, la concentración (en  $\mu$ moles/litro) del antagonista que puede desplazar el 50% del ligando (MK-801) del receptor. A partir de los datos obtenidos, puede deducirse que algunos de los compuestos que son el objeto de la invención muestran actividad inhibitoria apreciable sobre la unión de MK-801 a los receptores de membrana cortical de rata.

Por ejemplo, el compuesto 2 mostró una capacidad de desplazamiento de aproximadamente 40  $\mu$ M.

Memantina, un fármaco antagonista de NMDA no competitivo comparativo, era ligeramente menos activo en las mismas condiciones experimentales ( $CI_{50}$  80  $\mu$ M).

*Estudios en cortes cerebrales de rata en perfusión**a) Estudios sobre la liberación basal de neurotransmisores tritizados a partir de cortes cerebrales de rata*

Se sacrificaron los animales y se extrajeron rápidamente los cerebros del cráneo y se transfirieron inmediatamente a 4°C a líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa) aireado con una mezcla de gases compuesta por el 95% de oxígeno y el 5% de dióxido de carbono. Entonces, se seccionaron los cerebros a una temperatura de 4°C y se extrajeron las zonas encefálicas de interés (hipocampo y cuerpo estriado) y se sumergieron en la disolución mencionada anteriormente.

Entonces, se prepararon cortes cerebrales de 400  $\mu$ m de espesor usando un "cortador" McIlwain. Se incubaron los cortes de hipocampo con 0,08  $\mu$ M de [ $^3H$ ] noradrenalina y los cortes del núcleo estriado con 0,01  $\mu$ M de [ $^3H$ ] dopamina y/o con 0,09  $\mu$ M de [ $^3H$ ] colina a una temperatura de 37°C durante 20 minutos. Se incubaron los cortes marcados con [ $^3H$ ] noradrenalina en presencia de 6-nitroquipazina 0,1  $\mu$ M y GBR 12909 0,1  $\mu$ M, que son inhibidores selectivos de la captación de serotonina y dopamina, respectivamente, con el fin de impedir el posible marcaje falso de terminaciones sinápticas serotoninérgicas y dopaminérgicas.

Por las mismas razones, se incubaron los cortes marcados con [ $^3H$ ] dopamina en presencia de 6-nitroquipazina 0,1  $\mu$ M y nisoxetina 0,1  $\mu$ M, que son inhibidores selectivos de la captación de serotonina y noradrenalina. Tras la incubación durante 20 minutos, se lavaron los cortes con LCRa en ausencia de trazador y se transfirieron a cámaras de perfusión paralelas a una tasa de un corte por cámara, y se perfundieron a una velocidad de 1 ml por minuto a una temperatura constante de 37°C. Tras la perfusión durante 45 minutos para equilibrar el sistema, se recogieron 9 fracciones de 5 minutos cada una. Se añadieron los compuestos de prueba al líquido de perfusión 10 minutos tras el inicio de la recogida de las fracciones. Se consideró el porcentaje de neurotransmisor tritizado liberado de los cortes en las dos primeras fracciones recogidas en ausencia de fármacos como control interno para cada corte.

Al final del experimento, las muestras recogidas y los cortes perfundidos (disueltos en tolueno) se sometieron a recuento de la radioactividad presente en cada fracción y/o corte usando un centelleador para muestras líquidas. Se calculó la liberación fraccionada de neurotransmisores tritizados como la cantidad de radioactividad presente en cada fracción dividida entre la radioactividad total presente en el corte en el momento en que se recogió. Por tanto, se calcularon las razones entre la liberación fraccionada en un momento dado de la perfusión y la liberación fraccionada en la primera fracción recogida para cada corte. Se expresaron los efectos de los compuestos como un porcentaje de aumento de la liberación de los neurotransmisores estudiados con respecto a los cortes de control perfundidos en ausencia de fármacos (tabla 2). Los datos muestran la concentración micromolar de compuesto que puede aumentar la liberación basal de neurotransmisores en el 100%.

**Tabla 2: Estudios sobre la liberación basal de neurotransmisores trititados a partir de cortes cerebrales de rata**

	Compuesto 2 ( $\mu\text{M}$ )	Memantina ( $\mu\text{M}$ )
Liberación basal de [ $^3\text{H}$ ]NE en cortes de hipocampo	6	130
Liberación basal de [ $^3\text{H}$ ]DA en cortes de núcleo estriado	2	Inactivo (30 $\mu\text{M}$ )
Liberación basal de [ $^3\text{H}$ ]Aco en cortes de núcleo estriado	Inactivo (30 $\mu\text{M}$ )	Inactivo (100 $\mu\text{M}$ )

5 A partir de los datos proporcionados en la tabla 2, se observa que algunos de los compuestos que son el objeto de la invención, por ejemplo el compuesto 2, pueden aumentar la liberación basal de NE y dopamina a concentraciones micromolares. En cambio, la memantina muestra poca o ninguna actividad, y es inactiva de manera similar en la liberación de Aco.

10 *b) Estudios sobre la liberación de [ $^3\text{H}$ ]noradrenalina estimulada por ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) en cortes de hipocampo de rata*

15 La preparación de los cortes es análoga a la descrita anteriormente. Se perfundieron los cortes en presencia de [ $^3\text{H}$ ]noradrenalina con un LCRa que carecía de iones  $\text{Mg}^{2+}$ . Tras la perfusión durante 45 minutos para equilibrar el sistema, se recogieron 7 fracciones de 5 minutos cada una. Se añadieron los compuestos de prueba al líquido de perfusión 10 minutos antes de iniciar la recogida de las fracciones, mientras que se añadió NMDA 100  $\mu\text{M}$  sólo a la fracción 4, a partir del minuto quince tras el inicio de la recogida.

20 Al final del experimento, se contó la radioactividad presente tal como se describió anteriormente. Para cada muestra, se determinó la razón en porcentaje entre la liberación fraccionada en la fracción 4 en presencia de NMDA y la liberación fraccionada en la primera fracción recogida. Se expresó la actividad de los fármacos de prueba como un valor de porcentaje medio del número de experimentos realizados con respecto al aumento en porcentaje de la liberación de [ $^3\text{H}$ ] noradrenalina en las cámaras de control estimuladas con NMDA en ausencia de antagonistas.

25 Algunos de los compuestos que son el objeto de la invención, por ejemplo el compuesto 2, mostraron una potente capacidad para antagonizar el efecto de 100  $\mu\text{M}$  de NMDA. Su valor de  $\text{CI}_{50}$  era de 0,8 y 0,5  $\mu\text{M}$ . La memantina mostró en esta prueba una actividad similar o ligeramente inferior, con un valor de  $\text{CI}_{50}$  de 1,6  $\mu\text{M}$ .

### 30 Actividad neuroprotectora

*Estudio de la liberación de [ $^3\text{H}$ ]D-asparto provocada por 30 mM de KCl en condiciones hipoglucémicas en cortes parieto-occipitales de rata.*

35 Se diseñó este modelo experimental *in vitro* para imitar un estado de dolor neuronal y es una modificación del modelo notificado por Zablocka B. y Domanska-Janik K., [NeuroReport 6, 85-88 (1994)].

40 Se extrae la corteza parieto-occipital de rata y se secciona en cortes coronales de 400  $\mu\text{m}$ . Se incuban los cortes corticales a 37°C durante 30 minutos con [ $^3\text{H}$ ]D-aspartato y entonces, tras lavar durante 45 minutos, se estimulan durante 5 minutos con una disolución de potasio hipertónica (30 mM). Una vez que se han restaurado las condiciones basales, se perfunden los cortes con un medio libre de glucosa durante 20 minutos. En este momento, se añaden los compuestos de prueba a un medio convencional que contiene glucosa y se perfunden hasta el final del experimento. A 10 minutos del final del periodo hipoglucémico, una estimulación con potasio hipertónico adicional despolariza la membrana neuronal, lo que provoca un aumento de aproximadamente el 75% en la liberación de [ $^3\text{H}$ ]D-aspartato provocada en condiciones control.

45 El compuesto 2 y también la memantina usada como fármaco comparativo pudieron antagonizar completamente el aumento inducido por la hipoglucemia en la liberación de [ $^3\text{H}$ ]D-aspartato. El compuesto 2 mostró una mejor potencia ( $\text{CI}_{50} = 2,5 \mu\text{M}$ ) que la memantina.

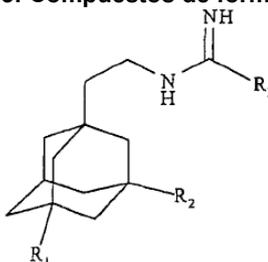
### 50 Actividad antagonista de NO-sintetasa (NOS)

55 a) Se estudió *in vitro* la actividad inhibidora sobre la formación de NO, medida como  $\text{NO}_2^-$  (nitrito), en medios de cultivo de condrocitos articulares de conejo estimulados con la citocina IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) durante 48 horas. Para la preparación de los condrocitos, se siguió el método descrito por Berenbaum *et al.* [FEBS Letters 340, 51-55 (1994)]. Brevemente, se trituraron finamente fragmentos de cartílago esterilizado de hombro, tobillo y cabezas articulares de rodilla de conejo y se digirieron a 37°C con disoluciones de hialuronidasa, tripsina y colagenasa dando, tras la filtración a través de una gasa estéril y centrifugación a 600 x g y dilución adecuada con DMEM-FCS al 10%, una concentración de aproximadamente  $1 \times 10^5$  células por pocillo.

Se mantuvieron las células en estas condiciones hasta el punto de confluencia (aproximadamente 15 días), cambiándose el medio cada 3 días. En este momento, se añadieron los productos de prueba disueltos en el medio a cada muestra y, 20 minutos después, se añadieron 350  $\mu$ l de IL-1 $\beta$ , para tener una concentración final de 1 ng/ml. La estimulación duró 48 horas a 37°C (incubación en aire-7% de CO<sub>2</sub>). A continuación, se realizó un ensayo de los nitritos en el sobrenadante celular según el método descrito por Green *et al.* [Anal. Biochem. 126, 131-138 (1982)].

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3, que proporciona, para algunos de los compuestos que son el objeto de la invención en comparación con memantina y L-NAME, un inhibidor de NOS no selectivo, el valor de CI<sub>50</sub>, es decir, la concentración (micromolar) de antagonista que puede inhibir el 50% de la formación de nitrito con respecto al grupo de control, es decir, con respecto a las células estimuladas con IL-1 $\beta$  pero sin la adición de antagonistas.

Tabla 3: Compuestos de fórmula:



Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Condrocitos articulares de conejo % de inhibición (CI <sub>50</sub> x 10 <sup>-6</sup> M)
2	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	25,5 (7,5 – 87,2)
Memantina	-	-	-	IN (>300)
L-NAME	-	-	-	340 (181 – 638)

Nota: Los límites de confianza (95%) se proporcionan entre paréntesis

A partir de los datos proporcionados en la tabla, puede deducirse que el compuesto 2 que es el objeto de la invención muestra un efecto inhibitorio potente, a nivel micromolar, sobre la producción de nitrito. El compuesto inhibidor de referencia L-NAME es aproximadamente diez veces menos activo, mientras que la memantina es completamente inactiva hasta la concentración máxima sometida a prueba (3 x 10<sup>-4</sup> M).

### Actividad farmacológica *in vivo*

#### 25 *Evaluación de la actividad antidepressiva*

Otros aspecto ventajoso de la actividad farmacológica mostrada por estos productos es la potente actividad antidepressiva que algunos de ellos demostraron en modelos experimentales, en los que se induce experimentalmente un estado de depresión.

#### 30 a) Método de Porsolt

Procedimiento: El procedimiento es similar al descrito por Porsolt *et al.* (Arch. Int. Pharmacodyn. 229, p. 327-336 (1977)).

Se sometieron ratones sin tratamiento previo (no condicionados) a natación forzada durante 15 minutos en un cilindro de vidrio que contenía 20 cm de agua a una temperatura de 25°C. Se midieron el periodo de inmovilidad desde el tercer hasta el sexto minuto (incluidos) y el tiempo hasta alcanzar la inmovilidad total desde el sexto hasta el decimoquinto minuto. Inmovilidad total se define como el tiempo latente requerido con el fin de que el animal permanezca inmóvil durante al menos 30 segundos. Se administraron los compuestos por vía oral 60 minutos antes de la prueba.

#### 40 b) Prueba de "pellizco de la cola" en ratones

Procedimiento: El procedimiento es similar al descrito por Steru *et al.* [Psychopharmacol. 85, p. 367- (1985)]. Se suspendieron los animales por la cola 75 cm por encima de la superficie de la mesa de trabajo. Se mide la duración de la inmovilidad a lo largo de un periodo de 5 minutos: se consideró que los animales están inmóviles sólo cuando cuelgan de manera pasiva y completamente inmóviles. Se administraron los compuestos por vía oral 30 minutos antes de la prueba. Los resultados obtenidos se proporcionan en la tabla 5.

Tabla 5: Efecto del compuesto 2 y de la memantina en la prueba de "pellizco de la cola" en ratones

Compuesto 2				Memantina			
Dosis (mg/kg)	Número de animales	Tiempo de inmovilidad (s)	% de efecto frente al	Dosis (mg/kg)	Número de animales	Tiempo de inmovilidad (s)	% de efecto frente al

## ES 2 369 888 T3

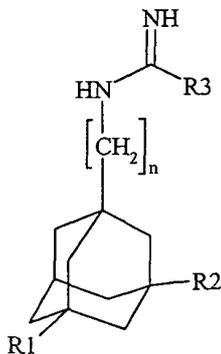
control				control			
0	25	76,2	-	0	10	78,9	-
0,3	15	56,6	25,7	0,1	10	49,9	36,8
1	5	48,0	37,0	1	10	48,9	38,0
3	15	42,6	44,1	10	10	40,1	49,2
10	15	35,1	53,9				
DE <sub>50</sub> : 6,0 (4,2 – 8,7) mg/kg				DE <sub>50</sub> : 24,9 mg/kg			

El compuesto 2 mostró alta actividad antidepressiva, reduciendo el tiempo de inmovilidad de los animales a lo largo de los 5 minutos del experimento de una manera dependiente de la dosis en el intervalo de 0,3-10 mg/kg. La DE<sub>50</sub> calculada era de 6 mg/kg. La memantina es menos activa, siendo su DE<sub>50</sub> de 24,9 mg/kg.

5

## REIVINDICACIONES

1. Compuestos de fórmula general (I) proporcionada a continuación:



(I)

5

en la que:

- n es 2;
- R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son ambos un grupo metilo;
- R<sub>3</sub> se elige independientemente de un grupo alquilo lineal, ramificado o cíclico que contiene desde 1 hasta 3 átomos de carbono y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

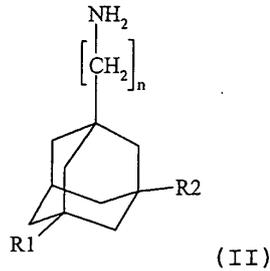
10

2. Compuestos según la reivindicación 1, en los que R<sub>3</sub> es un grupo metilo.
3. Compuesto según la reivindicación 1, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como producto medicinal para tratar estados patológicos asociados con el deterioro o mal funcionamiento de las capacidades cognitivas, que comprenden demencia senil, enfermedad de Alzheimer, complejo de demencia asociado al SIDA, alteraciones del comportamiento y depresión.
4. Compuesto según la reivindicación 1, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como producto medicinal para tratar isquemia cerebral.
5. Compuesto según la reivindicación 1, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso como producto medicinal para tratar neuropatías periféricas de origen o bien mecánico o bien metabólico.
6. Compuesto según la reivindicación 1, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como producto medicinal para tratar fenómenos inflamatorios degenerativos, incluyendo artritis reumatoide.
7. Preparación farmacéutica que comprende como principio activo al menos uno de los compuestos según la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
8. Preparación farmacéutica según la reivindicación 7, para su uso en el tratamiento de diversos estados patológicos del sistema nervioso central, que comprenden demencia senil, enfermedad de Alzheimer, complejo de demencia asociado al SIDA, alteraciones del comportamiento y depresión.
9. Preparación farmacéutica según la reivindicación 7, para su uso en el tratamiento de isquemia cerebral.
10. Preparación farmacéutica según la reivindicación 7, para su uso en el tratamiento de neuropatías periféricas de origen o bien mecánico o bien metabólico.
11. Preparación farmacéutica según la reivindicación 7, para su uso en el tratamiento de fenómenos inflamatorios degenerativos, particularmente artritis reumatoide.
12. Preparación farmacéutica según la reivindicación 7, que comprende también componentes inactivos farmacéuticamente aceptables elegidos del grupo que consiste en vehículos, aglutinantes, aromatizantes, edulcorantes, agentes disgregantes, agentes conservantes y humectantes, y mezclas de los mismos, o componentes que facilitan la absorción parenteral, transdérmica, transmucosa o rectal o que permiten la liberación controlada a lo largo del tiempo del principio activo.
13. Procedimiento para preparar un derivado de fórmula (I) según la reivindicación 1, en la que n, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> tienen el significado proporcionado en la reivindicación 1, caracterizado por las siguientes operaciones:

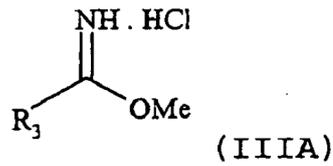
45

50

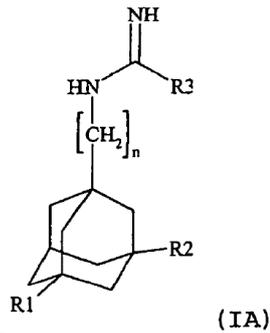
a) hacer reaccionar la adamantilalquilamina de fórmula (II)



en la que n, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> tienen el significado proporcionado anteriormente, con el alquilacetimidato de fórmula (III A)



5 salificado en forma de clorhidrato, en la que R<sub>3</sub> tiene el significado proporcionado anteriormente, en presencia de una base terciaria, preferiblemente trietilamina, en un disolvente inerte anhidro, preferiblemente tetrahidrofurano, durante un tiempo de entre 2 y 72 horas, para dar los derivados finales correspondientes de fórmula (IA)



10 en la que n, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> tienen el significado proporcionado anteriormente; los compuestos de fórmula (IA) se recuperan de la masa de reacción en forma no modificada o como sales farmacéuticamente aceptables y se purifican mediante métodos convencionales.