

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 863**

51 Int. Cl.:  
**C07D 405/14** (2006.01)  
**A61K 31/44** (2006.01)  
**A61P 25/16** (2006.01)  
**A61P 25/18** (2006.01)  
**A61P 25/22** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08805280 .8**  
96 Fecha de presentación: **15.10.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2205594**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.07.2010**

54 Título: **DERIVADO DE TRIAZOL 1,3,5-TRISUSTITUIDO.**

30 Prioridad:  
**18.10.2007 EP 07118822**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**10.01.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**10.01.2012**

73 Titular/es:  
**JANSSEN PHARMACEUTICA N.V.**  
**TURNHOUTSEWEG 30**  
**2340 BEERSE, BE**

72 Inventor/es:  
**THURING, Johannes, Wilhelmus, John, F.;**  
**DINKLO, Theodorus y**  
**LESAGE, Anne, Simone, Josephine**

74 Agente: **Pérez Barquín, Eliana**

ES 2 371 863 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

Derivado de triazol 1,3,5-trisustituido.

La presente invención se refiere a 2-[3-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilamino)-5-(2,6-dimetil-piridin-4-il)-[1,2,4]triazol-1-il]-*N*-etil-acetamida y sus sales farmacéuticamente aceptables, procesos para su preparación, composiciones farmacéuticas que las contienen y su uso en terapia. La invención se refiere a moduladores alostéricos positivos selectivos y potentes de receptores nicotínicos  $\alpha 7$  de acetilcolina que tienen la capacidad de aumentar la eficacia de los agonistas de receptores nicotínicos.

**ANTECEDENTES Y TÉCNICA ANTERIOR**

EP 1044970 describe 3-alkilamino-1,2,4-triazoles como ligandos del receptor del neuropéptido Y.

El documento de Makara G.M., et al. (Organic Letters (2002) vol. 4 (10); 1751-1754) describe la síntesis en fase sólida de 3-alkilamino-1,2,4-triazoles e ilustra la síntesis infructuosa de *N*-(4-metoxifenil)-1-metil-5(4-metilfenil)-1*H*-1,2,4-triazol-3-amina [CAS No: 433710-55-5] y guarda silencio acerca de las posibles aplicaciones terapéuticas de este compuesto, en particular acerca de su uso como modulador alostérico positivo del receptor nicotínico  $\alpha 7$  de acetilcolina.

Chen Chen et al., en Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 11 (2001) 3165-3168, describe la síntesis de 1-alkil-3-amino-5-aryl-1*H*-[1,2,4]triazoles, en particular *N*-(2-metoxifenil)-1-metil-5-(2,4-diclorofenil)-1*H*-1,2,4-triazol-3-amina, y su uso como antagonistas del factor 1 liberador de corticotropina (CRF1).

WO 2007/118903 describe 3-anilin-5-aryl-1,2,4-triazoles como moduladores alostéricos positivos de receptores nicotínicos de acetilcolina.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Los receptores colinérgicos fijan normalmente el neurotransmisor endógeno acetilcolina (ACh), desencadenando con ello la apertura de canales iónicos. Los receptores ACh en el sistema nervioso central de los mamíferos pueden dividirse en los subtipos muscarínicos (mAChR) y nicotínicos (nAChR) basándose en las actividades agonistas de muscarina y nicotina, respectivamente. Los receptores nicotínicos de acetilcolina son canales iónicos con compuertas de ligando que contienen 5 subunidades. Los miembros de la familia de genes de la subunidad nAChR han sido divididos en dos grupos basándose en sus secuencias de aminoácidos; un grupo que contiene las denominadas subunidades  $\beta$ , y un segundo grupo que tiene subunidades  $\alpha$ . Se ha demostrado que tres clases de subunidades  $\alpha$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$  y  $\alpha 9$ , forman receptores funcionales cuando se expresan solas y se supone por ello que forman receptores homo-oligómeros pentámeros.

Se ha desarrollado un modelo de estado de transición alostérico de nAChR que implica al menos un estado de reposo, un estado activado y un estado "desensibilizado" de canales cerrados, un proceso por el cual los receptores se hacen insensibles al agonista. Diferentes ligandos de nAChR pueden estabilizar el estado de conformación de un receptor al que se fijan preferentemente aquéllos. Por ejemplo, los agonistas ACh y (-)-nicotina estabilizan respectivamente los estados activo y desensibilizado.

Los cambios de la actividad de los receptores nicotínicos han sido implicados en cierto número de enfermedades. Algunas de éstas, por ejemplo la miastenia grave y la epilepsia autosómica dominante nocturna del lóbulo frontal (ADNFLE) están asociadas con reducciones en la actividad de la transmisión nicotínica, sea debido a una disminución en el número de receptores o a una desensibilización incrementada.

Se ha emitido también la hipótesis de que las reducciones en los receptores nicotínicos median los déficits cognitivos observados en enfermedades tales como la enfermedad de Alzheimer y la esquizofrenia.

Los efectos de la nicotina del tabaco están mediados también por receptores nicotínicos y dado que el efecto de la nicotina consiste en estabilizar los receptores en estado desensibilizado, una actividad incrementada de los receptores nicotínicos puede reducir el deseo de fumar.

Compuestos que fijan nAChRs han sido propuestos para el tratamiento de una serie de enfermedades que implican función colinérgica reducida tales como déficit de aprendizaje, déficit cognitivo, déficit de atención o pérdida de memoria. Se espera que la modulación de la actividad del receptor nicotínico  $\alpha 7$  sea beneficiosa en cierto número de enfermedades que incluyen la enfermedad de Alzheimer, la Demencia de Cuerpos de Lewy, el Trastorno de Hiperactividad con Déficit de Atención, ansiedad, esquizofrenia, manía, maniaco-depresión, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, síndrome de Tourette, traumatismo cerebral u otros trastornos neurológicos, degenerativos o psiquiátricos en los cuales existe pérdida de sinapsis colinérgicas, que incluyen la alteración de los biorritmos por vuelos largos en el sentido de los paralelos (jetlag), la adición a la nicotina, y el dolor.

Sin embargo, el tratamiento con agonistas de los receptores nicotínicos que actúan en el mismo sitio que ACh es problemático, debido a que ACh no sólo activa, sino que bloquea también la actividad de los receptores por procesos que incluyen desensibilización y bloqueo no competitivo. Adicionalmente, la activación prolongada parece inducir una desac-

tivación de larga duración. Por esta razón, puede esperarse tanto que los agonistas de ACh reduzcan la actividad como que aumenten la misma.

En los receptores nicotínicos en general, y particularmente en el receptor nicotínico  $\alpha 7$ , la desensibilización limita la duración de acción de un agonista aplicado.

## 5 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

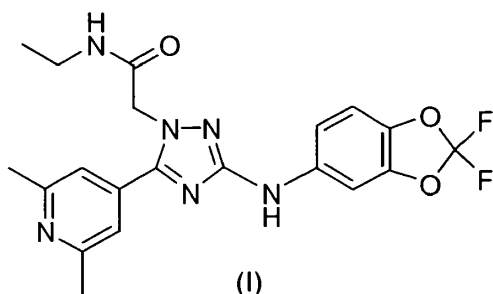
Sorprendentemente, se ha encontrado que la 2-[3-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilamino)-5-(2,6-dimetil-piridin-4-il)-[1,2,4]triazol-1-il]-N-etil-acetamida puede aumentar la eficacia de los agonistas en los receptores nicotínicos de acetilcolina. Se hace referencia a los compuestos que ejercen este tipo de acción como "moduladores alostéricos positivos" y son probablemente útiles para el tratamiento de afecciones asociadas con reducciones en la transmisión nicotínica. En un escenario terapéutico, un compuesto de este tipo podría restablecer la comunicación interneuronal normal sin afectar al perfil de activación temporal. Adicionalmente, no se espera que los moduladores alostéricos positivos produzcan desactivación a largo plazo de los receptores, como la que puede ocurrir después de aplicación repetida o prolongada de agonistas.

El modulador nAChR positivo de la presente invención es útil para tratamiento o profilaxis de trastornos psicóticos, trastornos o enfermedades de deterioro intelectual, enfermedades o afecciones inflamatorias en las cuales es beneficiosa la modulación del receptor nicotínico  $\alpha 7$ .

La presente invención se refiere a 2-[3-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilamino)-5-(2,6-dimetil-piridin-4-il)-[1,2,4]triazol-1-il]-N-etil-acetamida que tiene propiedades moduladoras alostéricas positivas, aumentando la eficacia de los agonistas en el receptor nicotínico  $\alpha 7$ . La invención se refiere adicionalmente a métodos para preparación y composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos. La invención se refiere también al uso de este derivado para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de trastornos psicóticos, trastornos de deterioro intelectual o enfermedades o afecciones en las cuales es beneficiosa la modulación del receptor nicotínico  $\alpha 7$ .

El compuesto de la presente invención y las sales del mismo difieren estructuralmente de los compuestos de la técnica anterior y farmacológicamente por su actividad incrementada como un modulador alostérico positivo del receptor de acetilcolina nicotínico  $\alpha 7$ , por su solubilidad incrementada en agua y por sus parámetros de seguridad cardiovascular mejorados *in vitro*, en particular afinidad reducida para el canal de potasio hERG.

La presente invención se refiere al compuesto (I)



o una sal o hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Para uso terapéutico, las sales del compuesto de acuerdo con la fórmula (I) son aquéllas en las cuales el ion de carga opuesta es farmacéuticamente aceptable. Sin embargo, las sales que no son farmacéuticamente aceptables pueden encontrar uso también, por ejemplo, en la preparación o purificación de un compuesto farmacéuticamente aceptable. Todas las sales, sean farmacéuticamente aceptables o no, están incluidas dentro del ámbito de la presente invención.

Debe entenderse que las sales de adición farmacéuticamente aceptables que se mencionan anteriormente en esta memoria o en lo sucesivo comprenden las formas de sal de adición de ácido terapéuticamente activas y no tóxicas que puede formar el compuesto (I). Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables pueden obtenerse convenientemente por tratamiento de la forma de base con dicho ácido apropiado. Ácidos apropiados comprenden, por ejemplo, ácidos inorgánicos tales como hidrácidos halogenados, v.g. ácido clorhídrico o bromhídrico, los ácidos sulfúrico, nítrico, fosfórico y análogos; o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, los ácidos acético, propanoico, hidroxiacético, láctico, pirúvico, oxálico (es decir etanodioico), malónico, succínico (es decir ácido butanodioico), maleico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, *p*-toluenosulfónico, ciclámico, salicílico, *p*-aminosalicílico, ácido pamoico y los ácidos análogos. Inversamente, las formas de sal pueden convertirse por tratamiento con una base apropiada en la forma de base libre.

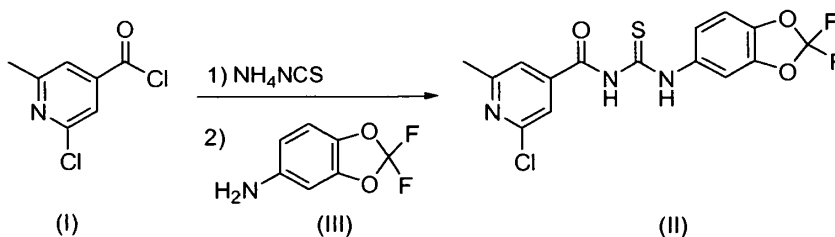
Los términos hidrato y solvato se refieren a hidratos y alcoholatos que pueden formar los compuestos de acuerdo con la fórmula (I) así como sus sales.

El compuesto de acuerdo con la fórmula (I) puede existir también en formas tautómeras. Dichas formas, aunque no se indican explícitamente en la fórmula anterior, deben considerarse incluidas dentro del alcance de la presente invención.

### Preparación de los compuestos

5 Un compuesto de acuerdo con la invención puede prepararse generalmente por una sucesión de pasos, cada uno de los cuales es conocido por las personas expertas. En particular, el compuesto en esta solicitud de patente puede prepararse de acuerdo con los métodos de preparación siguientes (Esquemas 1 a 5).

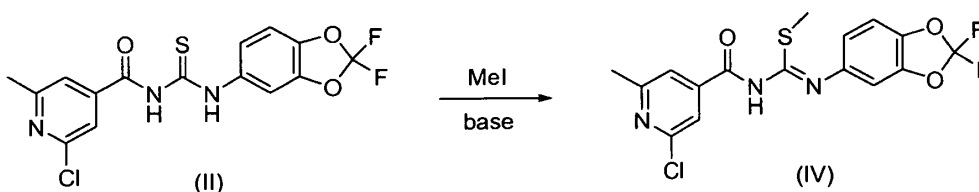
#### Esquema 1



10 La acil-tiourea (II) se obtiene en dos etapas. En una primera etapa, el cloruro de acilo (I) se hace reaccionar con un tiocianato de catión monovalente, tal como por ejemplo tiocianato de amonio, a fin de producir el acil-isotiocianato correspondiente. Esta reacción puede efectuarse utilizando acetona como disolvente y a una temperatura comprendida entre 0°C y 70°C, preferiblemente a la temperatura ambiente.

15 En una segunda etapa que puede realizarse ventajosamente en el mismo medio de reacción, sin aislamiento del acil-isotiocianato intermedio, se añade la anilina (III) para producir la *N*-acil-tiourea de la fórmula (II). Esta reacción se efectúa usualmente a una temperatura comprendida entre 0°C y 70°C, preferiblemente a la temperatura ambiente (Esquema 1).

#### Esquema 2



20 En un paso siguiente, la metilación en S de la *N*-acil-tiourea (II) proporciona el ácido *N*-acil-carboimidotioico, derivado éster metílico de fórmula (IV). Esta transformación requiere la presencia de una base, preferiblemente una base inorgánica fuerte, tal como NaH o carbonato de potasio, y se efectúa en un disolvente aprótico tal como por ejemplo DMF, THF y análogos, a una temperatura comprendida entre -70°C y la temperatura ambiente, preferiblemente 0°C (Esquema 2).

#### Esquema 3

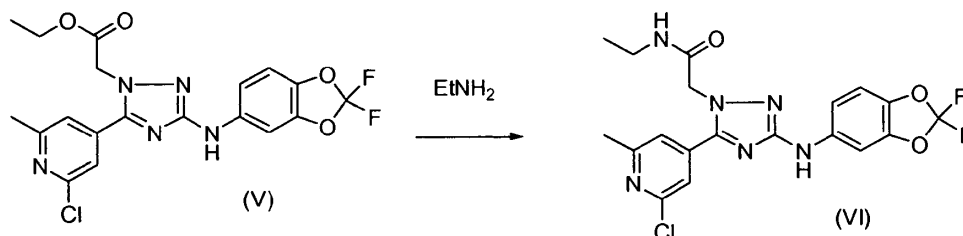


25 El ácido *N*-acil-carboimidotioico, derivado éster metílico de fórmula (IV) puede transformarse en el 1,2,4-triazol de fórmula (V) utilizando la sal hidroc্লoruro del éster etílico del ácido 2-hidracinilacético. Esta transformación se realiza típicamente en un disolvente prótico, tal como metanol o un alcohol superior y requiere una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y 150°C. En una realización particular, el alcohol superior es alcohol butílico terciario y la temperatura de reacción está comprendida entre 70° y 120°C, muy preferiblemente 100°C. Se prefiere la adición de una cantidad estequiométrica de una base. Dicha base puede ser una base inorgánica, tal como acetato de potasio o carbonato

30

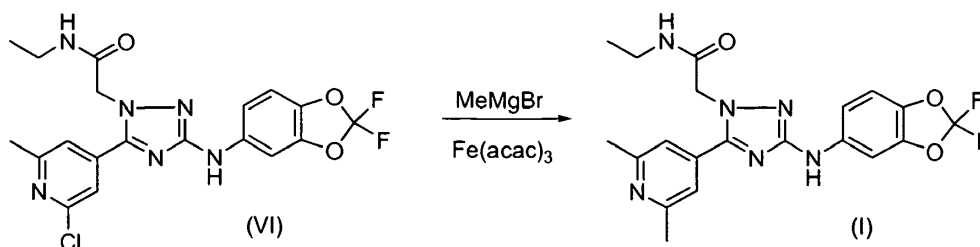
de potasio; sin embargo, más preferiblemente dicha base es una amina terciaria, tal como diisopropil-etil-amina o análogos (Esquema 3).

#### Esquema 4



- 5 El éster etílico del ácido [1,2,4]triazol-1-il)-acético de la fórmula (V) se convierte en la [1,2,4]triazol-1-il]-*N*-etil-acetamida (VI) correspondiente por tratamiento con una cantidad en exceso de etil-amina en un disolvente prótico a una temperatura comprendida entre 0° y 80°C, con preferencia a la temperatura ambiente (Esquema 4).

#### Esquema 5



- 10 El pirido-triazol final sustituido con dimetilo de la fórmula (I) se puede preparar por tratamiento del precursor 2-cloro-piridilo (VI) con un exceso (3-15 equiv.) de reactivo de Grignard MeMgBr en presencia de una cantidad catalítica de acetilacetato de hierro (III) en un sistema disolvente constituido por 75% a 85% de THF y 15% a 25% de NMP en volumen. Dicha transformación puede realizarse en un intervalo de temperatura comprendido entre 0°C y 50°C, muy preferiblemente entre 0°C y 25°C (Esquema 5).

#### 15 Farmacología

Se encontró que el compuesto de la presente invención es un modulador alostérico positivo del receptor nicotínico  $\alpha 7$ . El receptor nicotínico  $\alpha 7$  ( $\alpha 7$  nAChR) pertenece a la superfamilia de canales iónicos ionotrópicos de bucle cis con compuertas de ligando, que incluye las familias 5-HT<sub>3</sub>, GABA<sub>A</sub> y los receptores de glicina. El mismo es activado por acetilcolina y su producto de descomposición colina, siendo una característica principal del nAChR  $\alpha 7$  su rápida desensibilización en la presencia persistente de agonista. Es el segundo subtipo de receptor nicotínico más abundante en el cerebro, y es un regulador importante de la liberación de muchos neurotransmisores. El mismo tiene una distribución discreta en varias estructuras cerebrales con relevancia en procesos de atención y cognitivos, tales como el hipocampo y el córtex pre-frontal, y ha sido implicado en una diversidad de trastornos psiquiátricos y neurológicos en humanos. Está implicado también en el camino inflamatorio colinérgico.

- 25 La evidencia genética de su asociación con la esquizofrenia se aprecia en la forma de un enlace fuerte entre un marcador de esquizofrenia (déficit de compuertas sensoriales) y el locus  $\alpha 7$  en 15q13-14 y polimorfismos en la región promotora del núcleo del gen  $\alpha 7$ .

La evidencia patológica apunta a una pérdida de inmunoreactividad de  $\alpha 7$  y fijación de  $\alpha$ -Btx en al hipocampo, el córtex frontal y el córtex cingulado de los cerebros esquizofrénicos, en las enfermedades de Parkinson y de Alzheimer, y en el núcleo paraventricular y el nucleus reuniens en el autismo.

- 35 Evidencias farmacológicas tales como los hábitos marcados de fumar de los esquizofrénicos comparados con los individuos normales se han interpretado como un intento por los pacientes de automedicarse para compensar un déficit en la transmisión nicotérgica de  $\alpha 7$ . La normalización transitoria de los defectos de discriminación sensorial (inhibición pre-pulso (PPI) tanto en modelos animales como en modelos humanos después de la administración de nicotina y el restablecimiento temporal de la discriminación sensorial normal en los esquizofrénicos en situaciones de actividad colinérgica baja del prosencéfalo (v.g. el sueño de etapa 2) se han interpretado ambos como el resultado de la activación transitoria del receptor nicotínico  $\alpha 7$  seguida por desensibilización.

Así pues, existen buenas razones para suponer que la activación del nAChR  $\alpha 7$  tendrá efectos terapéuticamente beneficiosos en cierto número de trastornos del CNS (psiquiátricos y neurológicos).

Como ya se ha mencionado, el nAChR  $\alpha 7$  se desensibiliza rápidamente en la presencia persistente del transmisor natural acetilcolina así como de ligandos exógenos tales como nicotina. En el estado desensibilizado, el receptor permanece unido al ligando, pero funcionalmente inactivo. Ello no es un problema muy importante para transmisores naturales tales como acetilcolina y colina, dado que éstos son sustratos para mecanismos de descomposición (acetilcolinesterasa) y aclaramiento (transportadores de colina) muy potentes. Estos mecanismos de descomposición/aclaramiento de transmisores mantienen probablemente el equilibrio entre los nAChRs  $\alpha 7$  activable y desensibilizado dentro de un intervalo fisiológicamente útil. En cambio, se considera que los agonistas sintéticos, que no son sustratos para los mecanismos naturales de ruptura y aclaramiento, tienen una predisposición potencial tanto para sobre-estimulación como para impulsar el equilibrio de la población de nAChR  $\alpha 7$  hacia un estado persistentemente desensibilizado, que es indeseable en trastornos en los cuales juegan un papel las deficiencias en la expresión o función de nAChR  $\alpha 7$ . Los agonistas, por su naturaleza, tienen que dirigirse a la bolsa de fijación de ACh que está fuertemente conservada en todos los diferentes subtipos de receptores nicotínicos, lo que conduce a un potencial para reacciones adversas por activación inespecífica de otros subtipos de receptores nicotínicos. Por esta razón, a fin de evitar estas posibles tendencias, una estrategia terapéutica alternativa al agonismo de  $\alpha 7$  consiste en aumentar la sensibilidad de los receptores a los agonistas naturales con un modulador alostérico positivo (PAM). Un PAM se define como un agente que se fija a un sitio distinto del sitio de fijación del agonista, y por consiguiente no es de esperar que tenga propiedades agonistas o de desensibilización, pero mejora la sensibilidad del nAChR  $\alpha 7$  al transmisor natural. El valor de esta estrategia es que, para una cantidad dada de transmisor, la magnitud de la respuesta del nAChR  $\alpha 7$  se incrementa en presencia del PAM con relación al nivel de transmisión posible en su ausencia. Así, para trastornos en los cuales existe un déficit en la proteína nAChR  $\alpha 7$ , el aumento en la transmisión nicotínica de  $\alpha 7$  inducido por PAM puede ser beneficioso. Dado que un PAM está basado en la presencia del transmisor natural, el potencial para sobre-estimulación se ve limitado por mecanismos de descomposición/aclaramiento para el transmisor natural.

Los compuestos de la presente invención se clasifican como tipos 1-4, basándose en propiedades cinéticas cualitativas, como se determinan por registros de pinzas de voltaje de células enteras. Esta clasificación está basada en el efecto de un compuesto PAM  $\alpha 7$ , como se describe anteriormente en esta memoria, sobre la señal provocada por la aplicación de un agonista. En particular, dicho agonista es colina a una concentración de 1 mM. En un escenario experimental preferido, se aplican simultáneamente a la célula dicho compuesto PAM  $\alpha 7$  y colina, como se describe más adelante en esta memoria. La desensibilización, como se describe más adelante en esta memoria, es el cierre del receptor como resultado de la activación durante la aplicación del agonista en medidas electrofisiológicas de pinzas de voltaje de células enteras observado como la reducción de la corriente de salida después de la activación inicial por el agonista.

La definición de los tipos 1-4 de PAM se describe a continuación:

De acuerdo Los compuestos **tipo 1** aumentan la magnitud del efecto de la corriente provocada por colina 1 mM, pero alteran mínimamente la cinética del receptor. En particular, la tasa y el grado de desensibilización, provocados por el agonista, no se ven afectados. Por consiguiente, la respuesta modulada por el compuesto a colina 1 mM, es una escalación cuasi-lineal de la respuesta a colina 1 mM en ausencia del compuesto PAM  $\alpha 7$ .

Los compuestos **tipo 2** aumentan la magnitud del efecto de la corriente provocada por colina 1 mM mientras que reducen la tasa y/o el grado de desensibilización.

Los compuestos **tipo 3** aumentan la magnitud del efecto de la corriente provocada por colina 1 mM. Cuando se testan a concentraciones mayores hasta 10  $\mu$ M, los mismos inhiben por completo la desensibilización, en particular una aplicación de colina 1 mM de 250 milisegundos.

Los compuestos **tipo 4** permiten una desensibilización inicial del receptor seguida por una reapertura del receptor durante la aplicación del agonista. A concentraciones de baja potencia del compuesto PAM  $\alpha 7$ , la activación inducida por el agonista, que va seguida por desensibilización, puede separarse todavía de la reapertura inducida por el compuesto como un máximo inicial de corriente hacia el interior. A mayores concentraciones de potencia del compuesto PAM  $\alpha 7$ , la reapertura ocurre más rápidamente que el cierre debido a desensibilización, con lo cual desaparece el máximo de corriente inicial.

con ello, es un objeto de la presente invención proporcionar métodos de tratamiento que incluyen administrar, o bien un modulador alostérico positivo como la única sustancia activa, modulando así la actividad de los agonistas de receptores nicotínicos endógenos tales como acetilcolina o colina, o bien administrar un modulador alostérico positivo junto con un agonista del receptor nicotínico. En una forma particular de este aspecto de la invención, el método de tratamiento comprende el tratamiento con un modulador alostérico positivo del receptor nicotínico  $\alpha 7$  como se describe en esta memoria y un agonista o agonista parcial del receptor nicotínico  $\alpha 7$ . Ejemplos de compuestos adecuados con actividad agonista del receptor nicotínico  $\alpha 7$  incluyen, pero sin carácter limitante:

- monohidrocloreto del éster 4-bromofenílico del ácido 1,4-diazabicyclo-[3.2.2]nonano-4-carboxílico (SSR180711A);
- (-)-espiro[1-azabicyclo[2.2.2]octano-3,5'-oxazolidina]-2'-ona;
- dihidrocloreto de 3-[(2,4-dimetoxi)bencilideno]-anabaseína (GTS-21);

- [hidrocloruro de N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il]-4-clorobenzamida] (PNU-82987).

5 El compuesto de la presente invención es útil para tratamiento o profilaxis de trastornos psicóticos, trastornos de deterioro intelectual o enfermedades o afecciones en las cuales es beneficiosa la modulación de la actividad del receptor nicotínico  $\alpha 7$ . Un efecto particular del método de la invención es un método de tratamiento para déficit de aprendizaje, déficit de cognición, déficit de atención o pérdida de memoria, esperándose que la modulación de la actividad del receptor nicotínico  $\alpha 7$  sea beneficiosa en cierto número de enfermedades que incluyen enfermedad de Alzheimer, Demencia de Cuerpos de Lewy, Trastorno de Hiperactividad con Déficit de Atención, ansiedad, esquizofrenia, manía, maniaco-depresión, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, síndrome de Tourette, traumatismo cerebral u otros trastornos neurológicos, degenerativos o psiquiátricos en los cuales existe pérdida de sinapsis colinérgicas, con inclusión de jetlag, adición a la nicotina, y dolor.

10 El o los compuestos pueden encontrar también uso terapéutico como medicamento(s) anti-inflamatorio(s) debido a que la subunidad  $\alpha 7$  del receptor nicotínico de acetilcolina es esencial para inhibir la síntesis de citoquinas por el camino inflamatorio colinérgico. Ejemplos de indicaciones que pueden ser tratadas con el o los compuestos son endotoxemia, choque endotóxico, sepsis, artritis reumatoide, asma, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad inflamatoria biliar, enfermedad de Crohn, pancreatitis, insuficiencia cardíaca, y rechazo de aloinjertos.

15 Teniendo en cuenta las propiedades farmacológicas arriba descritas, el compuesto y sus sales de adición farmacéuticamente aceptables pueden utilizarse como medicamento. En particular, el presente compuesto puede utilizarse para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de trastornos psicóticos, trastornos de deterioro intelectual o enfermedades o afecciones en las cuales es beneficiosa la modulación del receptor nicotínico  $\alpha 7$ .

20 Teniendo en cuenta la utilidad del compuesto, se proporciona un método de tratamiento de animales de sangre caliente, con inclusión de los humanos, que padecen enfermedades en las cuales es beneficiosa la modulación del receptor nicotínico  $\alpha 7$ , o un método de prevención de las mismas, tales como esquizofrenia, manía, maniaco-depresión, ansiedad, enfermedad de Alzheimer, déficit de aprendizaje, déficit de cognición, déficit de atención, pérdida de memoria, Demencia de Cuerpos de Lewy, Trastorno de Hiperactividad con Déficit de Atención, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, síndrome de Tourette, traumatismo cerebral, jetlag, adición a la nicotina, y dolor. Dichos métodos comprenden la administración, a saber, la administración sistémica o local, preferiblemente administración oral, de una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), con inclusión de todas las formas estereoquímicamente isómeras del mismo, una sal de adición farmacéuticamente aceptable, un solvato, o un hidrato del mismo, a animales de sangre caliente, con inclusión de los humanos.

25 Un experto en la técnica reconocerá que una cantidad terapéuticamente eficaz de los PAM's de la presente invención es la cantidad suficiente para modular la actividad del receptor nicotínico  $\alpha 7$ , y que esta cantidad varía *inter alia*, dependiendo del tipo de enfermedad, la concentración del compuesto en la formulación terapéutica, y el estado del paciente. Generalmente, la cantidad de PAM a administrar como agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades en las cuales la modulación del receptor nicotínico  $\alpha 7$  es beneficiosa, tales como esquizofrenia, manía, maniaco-depresión, ansiedad, enfermedad de Alzheimer, déficit de aprendizaje, déficit de cognición, déficit de atención, pérdida de memoria, Demencia de Cuerpos de Lewy, Trastorno de Hiperactividad con Déficit de Atención, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, síndrome de Tourette, traumatismo cerebral, jetlag, adición a la nicotina, y dolor, será determinada sobre una base casuística por el médico encargado del tratamiento.

30 Por regla general, la dosis adecuada es una que da como resultado una concentración del PAM en el sitio de tratamiento comprendida en el intervalo de 0,5 nM a 200  $\mu$ M, y más usualmente 5 nM a 50  $\mu$ M. Para obtener estas concentraciones de tratamiento, se administrará a un paciente que se encuentre en necesidad de tratamiento una cantidad comprendida entre 0,005 mg/kg y 10 mg/kg de peso corporal, en particular de 0,1 mg/kg a 0,50 mg/kg de peso corporal. La cantidad de un compuesto de acuerdo con la presente invención, al que se hace referencia también en esta memoria como el ingrediente activo, que se requiere para conseguir un efecto terapéutico variará por supuesto sobre una base casuística con el compuesto particular, la ruta de administración, la edad y el estado del receptor, y el trastorno o enfermedad particular de que se trate. Un método de tratamiento puede incluir también la administración del ingrediente activo en un régimen comprendido entre 1 y 4 tomas al día. En estos métodos de tratamiento, los compuestos de acuerdo con la invención se formulan preferiblemente antes de la admisión. Como se describe más adelante en esta memoria, formulaciones farmacéuticas adecuadas se preparan por procedimientos conocidos utilizando ingredientes bien conocidos y fácilmente disponibles.

35 La presente invención proporciona también composiciones para prevención o tratamiento de enfermedades en las cuales la modulación del receptor nicotínico  $\alpha 7$  es beneficiosa, tales como esquizofrenia, manía, maniaco-depresión, ansiedad, enfermedad de Alzheimer, déficit de aprendizaje, déficit de cognición, déficit de atención, pérdida de memoria, Demencia de Cuerpos de Lewy, Trastorno de Hiperactividad con Déficit de Atención, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, síndrome de Tourette, traumatismo cerebral, jetlag, adición a la nicotina, y dolor. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la fórmula (I) y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Si bien es posible que el ingrediente activo se administre solo, es preferible presentar el mismo como una composición farmacéutica. De acuerdo con ello, la presente invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que

comprende un compuesto de acuerdo con la presente invención, junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. El vehículo o diluyente tiene que ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la composición y no perjudicial para los receptores de la misma.

5 Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden preparar por cualesquiera métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia, por ejemplo, utilizando métodos tales como los descritos en Gennaro et al. Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed., Mack Publishing Company, 1990, véase especialmente la Parte 8: Pharmaceutical preparations and their Manufacture). Una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto particular, en forma de base o forma de sal de adición, como el ingrediente activo se combina en mezcla íntima con un vehículo farmacéuticamente aceptable, el cual puede tomar una gran diversidad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para administración. Estas composiciones farmacéuticas se encuentran deseablemente en forma de dosificación unitaria adecuada, preferiblemente, para administración sistémica tal como la administración oral, percutánea o parenteral; o administración local, por ejemplo por vía de inhalación, pulverización nasal, gotas oftálmicas o por medio de una crema, gel, champú o análoga. Por ejemplo, en la preparación de las composiciones en forma de dosificación oral, puede emplearse cualquiera de los medios farmacéuticos usuales, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes y análogos en el caso de preparaciones orales líquidas tales como suspensiones, jarabes, elixires y soluciones; o vehículos sólidos tales como almidones, azúcares, caolín, lubricantes, aglomerantes, agentes desintegradores y análogos en el caso de polvos, píldoras, cápsulas y tabletas. Debido a su facilidad de administración, tabletas y cápsulas representan la forma unitaria de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso se emplean obviamente vehículos farmacéuticos sólidos. Para composiciones parenterales, el vehículo comprenderá usualmente agua estéril, al menos en gran parte, aunque pueden incluirse otros ingredientes, por ejemplo, para favorecer la solubilidad. Pueden prepararse, por ejemplo, soluciones inyectables, en las cuales el vehículo comprende solución salina, solución de glucosa o una mixtura de solución salina y solución de glucosa. Pueden prepararse también suspensiones inyectables, en cuyo caso se pueden emplear vehículos líquidos, agentes de suspensión y análogos apropiados. En las composiciones adecuadas para administración percutánea, el vehículo comprende opcionalmente un agente mejorador de la penetración y/o un agente humectante adecuado, combinado opcionalmente con aditivos adecuados de cualquier naturaleza en menores proporciones, aditivos que no causan efecto significativo alguno de deterioro en la piel. Dichos aditivos pueden facilitar la administración a la piel y/o pueden ser útiles para preparar las composiciones deseadas. Estas composiciones pueden administrarse de diversas maneras, v.g., como un parche transdérmico, como un toque o como un ungüento.

30 Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas arriba mencionadas en forma de dosificación unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de dosificación unitaria, como se utiliza en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas hace referencia a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada del ingrediente activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Ejemplos de dichas formas de dosificación unitarias son tabletas (con inclusión de tabletas ranuradas o recubiertas), cápsulas, píldoras, paquetes de polvos, pastillas, soluciones o suspensiones inyectables, cucharaditas de té, cucharadas de mesa y análogas, y múltiplos segregados de las mismas.

40 Los presentes compuestos pueden utilizarse para administración sistémica tal como administración oral, percutánea o parenteral; o administración local, por ejemplo por vía de inhalación, pulverización nasal, gotas oftálmicas o por medio de una crema, gel, champú o análogos. Los compuestos se administran preferiblemente por vía oral. La dosis y frecuencia exacta de administración dependen del compuesto particular de acuerdo con la fórmula (I) utilizado, la afección particular de que se trate, la gravedad de la condición de que se trate, la edad, el peso, el sexo, el grado de trastorno y el estado físico general del paciente particular, así como de otra medicación que pueda estar tomando el individuo, como es bien conocido por los expertos en la técnica. Adicionalmente, es evidente que dicha cantidad diaria eficaz puede reducirse o aumentarse dependiendo de la respuesta del individuo tratado y/o dependiendo de la evaluación del médico que prescriba los compuestos de la presente invención.

50 Los compuestos de acuerdo con la fórmula (I) pueden utilizarse también en combinación con otros agonistas del receptor nicotínico  $\alpha 7$  convencionales, tales como por ejemplo monohidrocloreto del éster 4-bromofenílico del ácido 1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonato-4-carboxílico, (SSR180711A); (-)-espiro[1-azabicyclo[2.2.2]octano-3,5'-oxazolidina]-2'-ona; dihidrocloreto de 3-[(2,4-dimetoxi)bencilideno]-anabaseína (GTS-21); o hidrocloreto de [N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il]-4-clorobenzamida] PNU-282987). Así pues, la presente invención se refiere también a la combinación de un compuesto de acuerdo con la fórmula (I) y un agonista del receptor nicotínico  $\alpha 7$ . Dicha combinación puede utilizarse como medicamento. La presente invención se refiere también a un producto que comprende (a) un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), y (b) un agonista del receptor nicotínico  $\alpha 7$ , como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de enfermedades en las cuales es beneficiosa la modulación del receptor nicotínico  $\alpha 7$ . Los diferentes fármacos pueden combinarse en una sola preparación junto con vehículos farmacéuticamente aceptables.

## **PARTE EXPERIMENTAL**

60 En los ejemplos que siguen se ilustran varios métodos para preparación de los compuestos de esta invención. A no ser que se indique otra cosa, todos los materiales de partida se obtuvieron de suministradores comerciales y se utilizaron sin purificación ulterior.



En lo que sigue y lo que antecede, "DMF" significa *N,N*-dimetilformamida; "NMP" significa 1-metil-2-pirrolidinona; "THF" significa tetrahidrofurano y "DIPE" significa diisopropiléter.

Para la caracterización por LCMS de los compuestos intermedios y el compuesto de la presente invención, se utilizaron los métodos siguientes.

#### 5 *Procedimiento General*

La medida por HPLC se realizó utilizando un sistema Alliance HT 2790 (Waters) que comprendía una bomba cuaternaria con desgasificador, un tomamuestras automático, un horno de columna (ajustado a 60°C para el procedimiento LCMS 1 y a 40°C para el procedimiento LCMS 2), un detector de red de diodos (DAD) y una columna como se especifica más adelante en los métodos respectivos. El flujo de la columna se dividió a un espectrómetro MS. El detector MS estaba configurado con una fuente de ionización por electropulverización. Los espectros de masas se adquirieron por escaneo desde 100 a 1000 en 1 segundo utilizando un tiempo de residencia de 0,1 segundo. El voltaje de la aguja capilar era 3 kV, y la temperatura de la fuente se mantenía a 140°C. Se utilizó nitrógeno como el gas nebulizador. La adquisición de los datos se realizó con un sistema de datos Waters-Micromass MassLynx-Openlynx.

#### *Procedimiento LCMS 1*

15 Además del procedimiento general: la HPLC de fase inversa se llevó a cabo en una columna XTerra MS C18 (3,5 µm, 4,6 x 100 mm) con un régimen de flujo de 1,6 ml/min. Se emplearon 3 fases móviles (fase móvil A: 95% acetato de amonio 25 mM + 5% acetonitrilo; fase móvil B: acetonitrilo; fase móvil C: metanol) para ejecutar una condición de gradiente desde 100% A a 50% B y 50% C en 6,5 min, hasta 100% B en 0,5 min, mantenimiento de estas condiciones durante 1 min y reequilibración con 100% A durante 1,5 min. Se utilizó un volumen de inyección de 10 µl. El voltaje del cono era 10 V para modo de ionización positivo y 20 V para modo de ionización negativo.

#### *Procedimiento LCMS 2 (utilizado sólo para los compuestos intermedios)*

25 Además del procedimiento general A: La HPLC de fase inversa se realizó en un Chromolith (4,6 x 25 mm) con un régimen de flujo de 3 ml/min. Se emplearon tres fases móviles (fase móvil A: 95% acetato de amonio 25 mM + 5% acetonitrilo; fase móvil B: acetonitrilo; fase móvil C: metanol) para ejecutar una condición de gradiente desde 96% A, 2% B y 2% C a 49% B y 49% C en 0,9 minuto, a 100% B en 0,3 minutos y se mantuvieron durante 0,2 minutos. Se utilizó un volumen de inyección de 2 µl. El voltaje del cono era 10 V para modo de ionización positivo y 20 V para modo de ionización negativo.

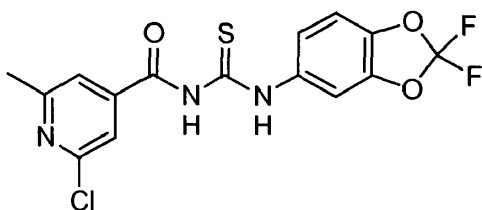
#### *Punto de Fusión*

30 El punto de fusión (p.f.) se determinó con un instrumento DSC823e (Mettler-Toledo). Los puntos de fusión se midieron con un gradiente de temperatura de 30°C/minuto. La temperatura máxima era 400°C. Los valores se obtienen con las incertidumbres experimentales que están asociadas comúnmente con este método analítico.

### **A. Preparación de los compuestos intermedios**

#### *Descripción 1*

#### **1-(2-Cloro-6-metil-piridina-4-carbonil)-3-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-il)-tiourea (D1)**



35

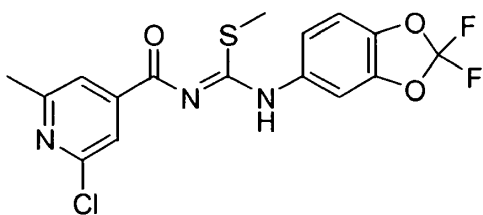
Se agitó ácido tiocianico, sal de amonio (1:1) (9,35 g; 0,1230 moles) en 2-propanona (300 ml) a la temperatura ambiente. Se añadió luego cloruro de 2-cloro-6-metil-4-piridinacarbonilo (22,2 g; 0,1170 moles) y la mixtura de reacción se agitó durante 2 horas a la temperatura ambiente. Se añadió 2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-amina (19,2 g; 0,1110 moles) en un poco de 2-propano, y la mixtura de reacción se agitó durante una hora a la temperatura ambiente. La mixtura de reacción se vertió luego en hielo y el residuo se separó por filtración y se secó. Rendimiento: 38,1 g de **compuesto intermedio D1**.

40

LCMS, tiempo de retención: 1,03; pico [M-H]<sup>-</sup>: 384; LCMS procedimiento 2

#### *Descripción 2*

#### **2-Cloro-N-[(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilamino)-metilsulfanil-metil]-6-metil-iso-nicotinamida (D2)**

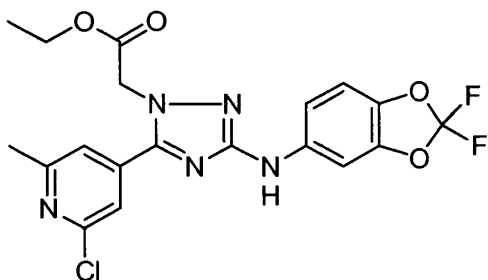


5 Se agitó NaH, 60% (2,2 g; 0,0550 moles) en THF (170 ml) en un baño de hielo bajo N<sub>2</sub>. Se añadió luego **compuesto intermedio D1** (19,3 g; 0,500 moles) y se agitó durante una hora a 0°C. Se añadió después CH<sub>3</sub>I (7,8 g; 0,0550 moles) y se dejó calentar la mezcla de reacción a la temperatura ambiente durante una noche. Se añadió agua y se evaporó el THF a vacío. El precipitado se separó por filtración, se lavó con agua y se secó. Rendimiento: 22,86 g de **compuesto intermedio D2**.

LCMS, tiempo de retención: 1,15; pico [M-H]<sup>-</sup>: 398; LCMS procedimiento 2

Descripción 3

10 **Ácido [5-(2-cloro-6-metil-piridin-4-il)-3-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilamino)-[1,2,4]-triazol-1-il]-acético, éster etílico (D3)**

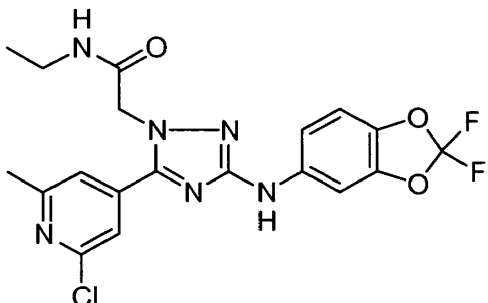


15 Se mantuvieron a reflujo **compuesto intermedio D2** (13,6 g, 0,0340 moles), hidrocloreto del éster etílico del ácido 2-hidracinilacético (1:1) (10,5 g; 0,0680 moles), *N*-etil-*N*-(1-metiletil)-2-propanamina (13,2 g; 0,1020 moles) y *t*-BuOH (400 ml), durante 2 horas. La mezcla de reacción se evaporó luego. Se añadió agua y el producto se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó a vacío. El residuo se calentó luego a 60°C en etanol/HCl durante una hora. La mezcla de reacción se evaporó parcialmente, y el precipitado se separó por filtración y se secó. Rendimiento: 4,57 g de **compuesto intermedio D3**.

LCMS, tiempo de retención: 1,03; pico [M-H]<sup>-</sup>: 450; LCMS procedimiento 2

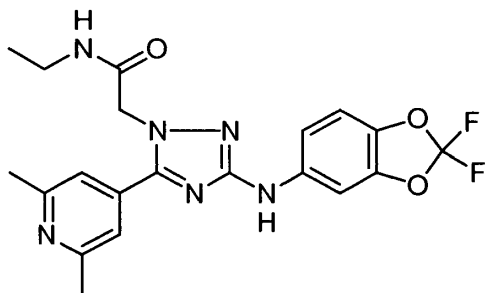
Descripción 4

20 **2-[5-(2-Cloro-6-metil-piridin-4-il)-3-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilamino)-[1,2,4]triazol-1-il]-*N*-etil-acetamida (D4)**



25 Se agitaron **compuesto intermedio D3** (1 g; 0,0022 moles) y etilamina en CH<sub>3</sub>OH (40 ml; 2 M) a la temperatura ambiente durante una noche. El producto cristalizó a partir de la mezcla de reacción. Los cristales se separaron por filtración y se secaron. Rendimiento: 700 mg de **compuesto intermedio D4**.

LCMS, tiempo de retención: 0,95; pico [M-H]<sup>-</sup>: 449; LCMS procedimiento 2

**B. Preparación del compuesto final****2-[3-(2,2-Difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ilamino)-5-(2,6-dimetil-piridin-4-il)-[1,2,4]triazol-1-il]-N-etil-benzamida (E1)**

5 Se agitaron **compuesto intermedio D4** (0,70 g; 0,0016 moles), acetilacetato de hierro (III) (0,067 g; 0,0002 moles), THF (20 ml) y 1-etil-2-pirrolidiona (5 ml) a 0°C bajo N<sub>2</sub>. Se añadió un exceso de CH<sub>3</sub>MgBr en éter dietílico (2 M) y la mixtura se llevó a la temperatura ambiente. La mixtura de reacción se descompuso luego con CH<sub>3</sub>OH y se evaporó a vacío. Se añadieron agua y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y la mixtura se filtró sobre dicalita. Se evaporó el filtrado y se añadieron agua y DIPE. Se filtró el precipitado, se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó a vacío. El residuo se agitó en agua, se separó el precipitado por filtración y se secó. Rendimiento: 400 mg de **compuesto E1**.

10 Punto de fusión: 242,28°C.

LCMS, tiempo de retención: 5,12; pico [M+H]<sup>+</sup>: 431; LCMS procedimiento 1

<sup>1</sup>H NMR (Bruker DPX 360 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 9,62 (s), 8,37 (t, *J*=5,4 Hz), 7,67 (d, *J*=2,1 Hz), 7,38 (s), 7,29 (d, *J*=8,8 Hz), 7,22 (dd, *J*=8,8, 2,2 Hz), 4,84 (s), 3,13 (qd, *J*=7,2, 5,5 Hz), 2,50 (s), 1,03 (t, *J*=7,2 Hz)

**C. Ejemplos farmacológicos**15 **Ejemplo C.1 b: *Obtención de imagen del flujo de Ca<sup>2+</sup>* (FDSS)***Materiales*

## a) Tampón de ensayo

20 Solución salina tamponada de Hanks (HBSS, Invitrogen, Bélgica), complementada con HEPES 10 mM (Invitrogen, Bélgica), CaCl<sub>2</sub> hasta una concentración final de 5 mM, 0,1% de seroalbúmina bovina (Sigma-Aldrich NV, Bélgica).

## b) Tinte sensible al calcio - Fluo-4AM

Se disolvió Fluo-4AM (Molecular Probes, EE.UU.) en DMSO que contenía 10% de ácido Pluronic (Molecular Probes, EE.UU.) para dar una solución stock que se diluyó en tampón de ensayo complementado con probenecid 5 mM (Sigma, Aldrich, NV, Bélgica) para dar una concentración final de 2 μM.

## 25 c) Placas de 384 pocillos

Placas negras de 384 pocillos con fondo negro/clara, pre-recubiertas con PDL (Corning, Incorporated, EE.UU.)

## d) Medida del flujo de calcio

Se utilizó un sistema funcional de clasificación de fármacos (FDSS, Hamamatsu) para medir las señales intracelulares del flujo de calcio libre.

30 *Método*

Se dejaron crecer monocapas de células GH4C1 hα7-wt que expresaban nAChR en placas multipocillo, en particular placas de 384 pocillos con paredes negras y fondo transparente recubiertas con poli-D-lisina durante 24 horas antes de cargarlas con un indicador fluorescente de calcio, cargándolas en una realización particular con fluo-4 AM durante hasta 120 minutos.

35 Se detectó la actividad de PAM en tiempo real por aplicación del compuesto a testar a las células cargadas junto con un agonista del receptor nicotínico α7 bajo monitorización constante de la movilización del calcio celular por fluorescencia en un FDSS. Se consideró que los compuestos que proporcionaban respuestas fluorescentes pico mayores que la respuesta debida al agonista solo eran PAM's nAChR α7. En una realización particular, el agonista del receptor nicotínico α7 era colina, y en una realización más particular se aplicó colina a una concentración sub-máxima de 100 μM. En un

escenario adicional de la presente invención, los compuestos a testar se aplicaron antes que el agonista del receptor nicotínico  $\alpha 7$ , y en una realización particular hasta 10 minutos antes que el agonista.

5 Se calculó una respuesta de control a la colina en cada placa a partir de la diferencia en el pico de fluorescencia en pocillos que recibieron colina o tampón de ensayo solo. El compuesto de la presente invención se testó en un intervalo de concentración de 0,01  $\mu\text{M}$  a 30  $\mu\text{M}$ . Se consideró que los compuestos tenían una actividad interesante cuando los mismos potenciaban la señal de colina al menos en un 250% cuando se testaron a una concentración de 30  $\mu\text{M}$  (la eficacia de la colina 100  $\mu\text{M}$  se definió como 100% en ausencia de un PAM).

10 Los valores  $\text{CE}_{50}$  (potencia), el efecto máximo (% de eficacia), y las pendientes de Hill se estimaron por ajuste de la ecuación sigmoideal a los datos utilizando GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Se determinó un valor  $\text{CE}_{50}$  (o  $\text{pCE}_{50}$ ) como una concentración relativa a la mitad del efecto máximo, cuando se obtuvo una curva sigmoideal clara con meseta superior.

El compuesto de la presente invención tiene también un efecto de potenciación sobre la respuesta a la colina cuando se mide por electrofisiología con pinzas de voltaje de células enteras en células GH4C1 que sobre-expresan de manera estable el receptor  $\alpha 7$  humano de tipo salvaje, como se describe más adelante en esta memoria.

#### 15 Ejemplo C.2: Registro de pinzas de voltaje de células enteras

El registro de pinzas de voltaje de células enteras a partir de células de mamífero ha proporcionado un medio poderoso de evaluación de la función de las proteínas de membrana que se cree son subunidades de canales iónicos con comportas de ligando. La activación de tales proteínas por ligandos endógenos o exógenos causa la apertura de un poro asociado con el receptor a través del cual fluyen los iones en sentido decreciente a lo largo de su gradiente electroquímico. En el caso de la línea de células recombinante GH4C1 h $\alpha 7$ -wt que expresan nAChR, la permeabilidad preferente al calcio de este receptor significa que el calcio fluye hacia el interior de la célula después de la activación por ACh, colina y otros ligandos nicotínicos, dando lugar a una corriente de calcio. Dado que este receptor se desensibiliza rápidamente en presencia de un agonista, es importante que se utilice un sistema de aplicación que sea capaz de cambio muy rápido de las soluciones (< 100 ms) a fin de prevenir la desensibilización parcial o completa de las respuestas de los receptores coincidentes con el tiempo de aplicación del agonista. Por consiguiente, una segunda técnica conveniente para evaluar la mejora de la eficacia nicotínica es el registro con pinzas de voltaje de células enteras a partir de células GH4C1 h $\alpha 7$ -wt que expresan nAChR, acoplado con un sistema de aplicación rápida.

#### *Materiales*

##### a) Tampones de ensayo

30 La solución de registro externa estaba constituida por NaCl 152 mM, KCl 5 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, calcio 1 mM, HEPES 10 mM; pH 7,3. La solución de registro interna estaba constituida por CsCl 140 mM, HEPES 10 mM, EGTA 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, pH 7,3.

35 b) El registro patch-clamp se realizó utilizando un amplificador de pinzamiento en parche (Multiclamp 700A, Axon Instruments Ca, EE.UU.). El potencial de membrana de las células GH4C1 h $\alpha 7$ -wt que expresaban nAChR se seleccionó por voltaje en la configuración de células enteras (Hamill et al., 1981) con un electrodo de vidrio de borosilicato de resistencia en la punta 1,5-3 M $\Omega$  cuando estaba lleno con la solución de registro interna. Se realizaron registros sobre células con resistencia de membrana > 500 M $\Omega$  y más preferiblemente 1G $\Omega$  y resistencia en serie < 15 M $\Omega$  con una compensación de resistencia en serie de al menos 60%. El potencial de membrana se pinzó a -70 mV.

##### 40 c) Agonistas

Ach y colina, que se adquirieron de Sigma-Aldrich NV, Bélgica.

##### d) Aplicación del compuesto

45 Se utilizó un sistema DF-16 Microfluidics Dynaflow de 16 canales (Collectricon, Suecia) para cambio rápido de las soluciones (tiempo de resolución de cambio < 100 ms) para aplicar los compuestos de control, el agonista y PAM a las células GH4C1 h $\alpha 7$ -wt que expresaban nAChR.

#### *Método*

50 Las células GH4C1 h $\alpha 7$ -wt que expresaban nAChR se extendieron en placas en solución de registro externa en la cámara de perfusión Dynaflow y se dejaron sedimentar durante hasta 20 minutos. Se parchearon células individuales como células enteras y se desprendieron suavemente del fondo de la cámara con la pipeta de parcheo en una corriente de perfusión que fluía continuamente (0,75  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) de solución de registro externa. Se detectó la actividad de PAM en tiempo real por aplicación previa de los compuestos a testar a las células cargadas seguida por un agonista del receptor nicotínico  $\alpha 7$  bajo monitorización constante de la corriente celular de membrana. Se consideró que los compuestos que daban respuestas de corriente mayores que la respuesta debida al agonista solo, eran PAM's  $\alpha 7$  nAChR. En una reali-

zación particular, el agonista del receptor nicotínico  $\alpha 7$  se activó por un agonista nicotínico no selectivo; en una realización más particular el agonista era colina, y en una realización aún más particular colina aplicada a una concentración sub-máxima de 1 mM. En un escenario ulterior de la presente invención, los compuestos a testar se aplicaron antes del agonista del receptor nicotínico  $\alpha 7$ , y en una realización más particular hasta 30 segundos antes del agonista. Se calculó una respuesta de control a partir del área bajo la curva de la corriente provocada en cada célula para una aplicación de colina sub-máxima durante 250 ms. El área bajo la curva es la integración de la corriente neta a lo largo del tiempo y es una representación común del flujo iónico total a través del canal. Los aumentos en la eficacia agonista provocados por un modulador alostérico positivo se calcularon como potenciación porcentual del "área bajo la curva" (AUC) de la respuesta del agonista. Una potenciación mayor que la AUC del control causada por el compuesto de la invención indica que es de esperar que el mismo tenga una actividad terapéutica útil.

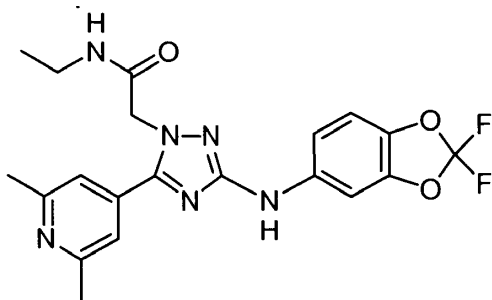
**Tabla 3: Potencia ( $pCE_{50}$ ) y % de eficacia para el compuesto E1.**

Comp. No.	$pCE_{50}$	% eficacia	Tipo de PAM
E1	6,51	1920	2

Un compuesto tipo 2 reduce la tasa y el grado de desensibilización.

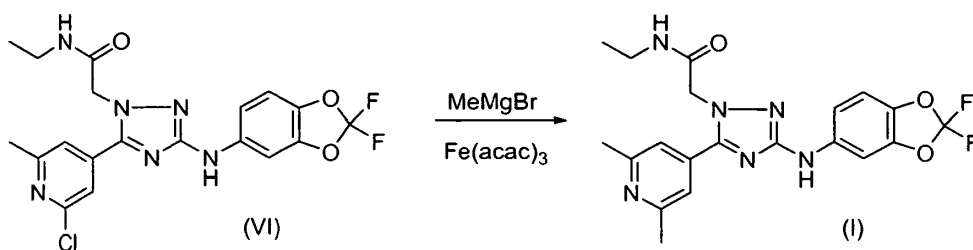
## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I)



o una sal o un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 2. Un compuesto como se define en la reivindicación 1 para uso en el tratamiento o la profilaxis de trastornos psicóticos, trastornos o enfermedades de deterioro intelectual, o enfermedades inflamatorias.
3. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y, como ingrediente activo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1.
- 10 4. Un proceso de preparación de una composición de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque un vehículo farmacéuticamente aceptable se mezcla íntimamente con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1.
5. Un producto que comprende
- (a) un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, y
- 15 (b) un agonista del receptor nicotínico  $\alpha 7$ , como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en la prevención o el tratamiento de enfermedades en las cuales es beneficiosa la modulación del receptor nicotínico  $\alpha 7$ .
6. Un proceso de preparación de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende el paso de hacer reaccionar un compuesto intermedio de fórmula (VI) con un exceso de



- 20 reactivo de Grignard MeMgBr en presencia de una cantidad catalítica de acetilacetonato de hierro(III) en un sistema disolvente constituido por 75% a 85% de THF y 15% a 25% de NMP en volumen en un intervalo de temperatura de 0°C a 50°C.