

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 672**

51 Int. Cl.:

A61K 31/135 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2007 E 07764424 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2012 EP 2037904**

54 Título: **Acetofenonas básicas como inhibidores de NO-sintasas**

30 Prioridad:

07.07.2006 DE 102006031813

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

14.02.2013

73 Titular/es:

**CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITAT ZU KIEL
(100.0%)
CHRISTIAN-ALBRECHTS-PLATZ 4
24118 KIEL, DE**

72 Inventor/es:

**CLEMENT, BERND;
HEBER, DIETER;
BLUHM, ULLVI;
BUSS, UWE y
FRIEDRICH, FRIEDRIKE**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 395 672 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

[0001] La invención se refiere a acetofenonas básicas como inhibidores de NO-sintasas y al uso de las mismas en la producción de medicamentos.

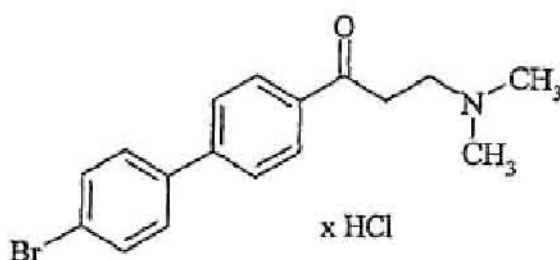
[0002] Las NO-sintasas (NOS) catalizan la conversión del aminoácido L-arginina para formar monóxido de nitrógeno (NO) y L-citrulina. Dado que una producción excesiva de monóxido de nitrógeno se asocia con numerosos procesos patofisiológicos (Stuehr, 1999, *Biochim. Biophys. Acta*, 1411, 217-230), el desarrollo de inhibidores de las NO-sintasas se considera una estrategia muy prometedora (Babu y Griffith, 1998, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2, 491-500). Un efecto agravante de la producción excesiva de monóxido de nitrógeno en procesos patológicos se presenta, p. ej., en la enfermedad de Alzheimer (Dorheim y col., 1994, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 205, 659-665), la diabetes sacarina (Li y Förstermann, 2000, *J. Pathol.*, 190, 244-254), la enfermedad de Parkinson (Schulz y col., 1995, *J. Neurochem.*, 64, 936-939), la esclerosis múltiple (Heales y col., 1999, *Biochim. Biophys. Acta*, 1410, 215-228), la artritis reumatoide (Stefanovic-Racic y col., 1993, *Arthritis Rheum.*, 36, 1036-1046), el choque séptico (Crossin, 1991, *Trends Biochim. Sci.*, 1991, 16, 81-82), el asma bronquial (Ligget y col., 1995, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 152, 394-402), las enfermedades intestinales inflamatorias crónicas (Boughton-Smith y col., 1993, *Lancet*, 342, 338-340) y la migraña (Olesen y col., 1994, *Trends Pharmacol. Sci.*, 15, 149-153). A la vista de esta situación, en los últimos años se han desarrollado numerosos inhibidores que, en parte, también han demostrado su eficacia en modelos animales de las enfermedades anteriormente mencionadas. Especialmente prometedor es el bloqueo farmacológico de las NO-sintasas en aquellos procesos de dolor asociados con un componente inflamatorio. En el modelo animal, los inhibidores de NOS actúan tanto sobre los nociceptores como sobre la transmisión (Stegmann y col., 2001, *Anesthesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.*, 36, 276-281). Sin embargo, hasta la fecha ninguno de dichos inhibidores ha podido desarrollarse de manera suficiente para su administración como medicamento (Roman y col., 2002, *Chem. Rev.*, 102, 1179-1189).

[0003] Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar compuestos que, en particular, actúen como inhibidores de NO-sintasas y que sean adecuados como agentes farmacéuticos en medicamentos.

[0004] De acuerdo con la presente invención, este objetivo se ha conseguido por las características de la reivindicación 1. Algunas realizaciones ventajosas de la presente invención se indican en las reivindicaciones subordinadas.

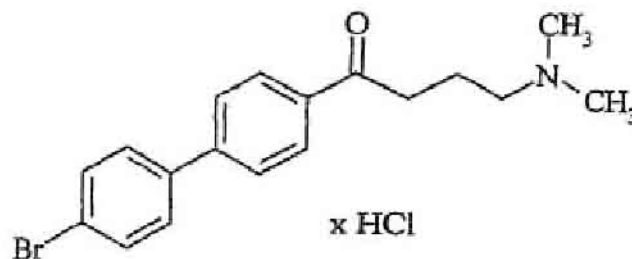
[0005] El uso de la invención de las sustancias reivindicadas también se refiere a aquellas sustancias que pueden estar presentes como tautómeros en forma de la sal o base de las mismas.

[0006] Como un ejemplo característico de una de las sustancias de acuerdo con la presente invención que muestra un efecto inhibitorio sobre NO-sintasas, ha de mencionarse el clorhidrato de 4'-(4-bromofenil)-3-dimetilaminopropiofenona:



[0007] En un sistema de ensayo *in vitro*, en el que L-arginina se convierte en L-citrulina y monóxido de nitrógeno en presencia de una NO-sintasa (ensayo de Griess), el clorhidrato de 4'-(4-bromofenil)-3-dimetilaminopropiofenona causa una inhibición dependiente de la concentración de hasta el 88% de la bNOS presente en el sistema nervioso central. Aunque el compuesto ya se conoce en la bibliografía (Niwa, H., 1957, *Tohoku Yakka Daigaku Kyo*, 4, 69-78), aún no se ha descrito ningún efecto inhibitorio sobre NOS.

[0008] Como otro ejemplo de una de las sustancias de acuerdo con la presente invención, ha de mencionarse el compuesto clorhidrato de 4'-(4-bromofenil)-4-dimetilaminobutiropfenona. Esta sustancia no se conoce en la bibliografía y causa una inhibición de la bNOS de hasta el 99%, que también depende de la concentración.



[0009] Por lo tanto, las acetofenonas básicas de acuerdo con la presente invención representan inhibidores de NO-sintasas de bajo peso molecular y gran eficacia. Pueden sintetizarse con gran pureza de manera fácil y económica de acuerdo con procedimientos estándar. Sorprendentemente, ha resultado ahora que las sustancias de acuerdo con la presente invención muestran selectividad para la bNOS que está presente en el sistema nervioso central y se asocia con enfermedades neuronales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple y la migraña. En este contexto, es de especial importancia que los inhibidores de acuerdo con la presente invención, es decir, aminas alifáticas con una fracción lipófila, sean capaces de penetrar a través de la barrera hematoencefálica después de la ingestión por vía oral y la absorción por el epitelio intestinal.

[0010] La actividad dependiente de la concentración de las sustancias de acuerdo con la presente invención se ilustra en los dibujos acompañantes. De este modo se muestra:

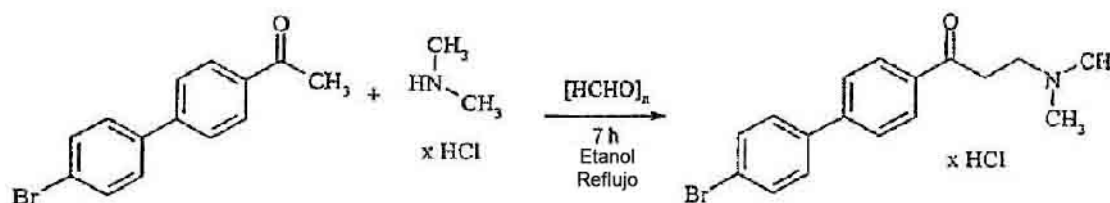
Figura 1: la actividad de bNOS en función de la concentración de clorhidrato de 4'-(4-bromofenil)-3-dimetilaminopropiofenona; y

Figura 2: la actividad de bNOS en función de la concentración de clorhidrato de 4'-(4-bromofenil)-4-dimetilaminobutirofenona.

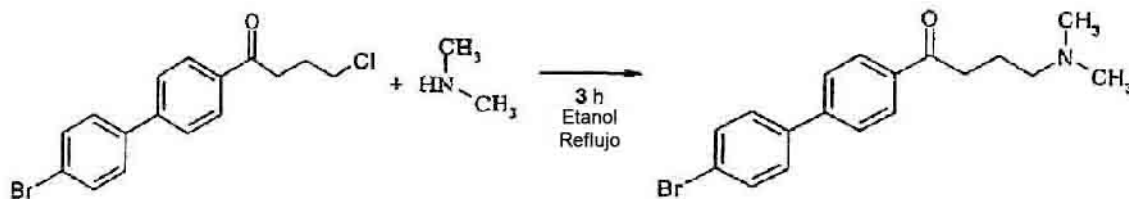
[0011] En las dos figuras 1 y 2, la actividad de la bNOS se mide por la formación de nitrito. El nitrito es el producto final del monóxido de nitrógeno en una disolución acuosa que contiene oxígeno. Como el 100% se han establecido incubaciones de control con todos los cofactores, pero sin la adición de los inhibidores. Los valores se indican como los valores medios \pm desviación estándar obtenidos de tres reacciones de incubación, medidos dos veces en cada caso.

[0012] La síntesis de los inhibidores de NO-sintasas de acuerdo con la presente invención, así como la implementación de los ensayos de eficacia *in vitro*, una parte de los cuales se muestra en las figuras 1 y 2, se describirá en más detalle a continuación.

[0013] Todas las sustancias de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante procedimientos convencionales. Los compuestos con una longitud de cadena de $n = 2$ pueden obtenerse por la conversión de acetofenonas parcialmente sustituidas con cloruro de dimetilamonio y paraformaldehído, según el principio de una reacción de Mannich. Los componentes de acetofenona no disponibles comercialmente se obtuvieron por medio de reacciones de acilación según Friedel-Crafts. A continuación se muestra, a modo de ejemplo, la reacción para el compuesto clorhidrato de 4'-(4-bromofenil)-3-dimetilaminopropiofenona:



[0014] Los compuestos con una longitud de cadena de $n = 3$ se obtuvieron por la reacción de derivados sustituidos de 4-clorobutirofenona con dimetilamina, según el principio de una sustitución nucleófila. A continuación se muestra esta reacción a modo de ejemplo, para el compuesto clorhidrato de 4'-(4-bromofenil)-4-dimetilaminobutirofenona:



[0015] La base libre indicada se precipitó subsiguientemente como clorhidrato. Los componentes de butirofenona no disponibles comercialmente se obtuvieron también por medio de reacciones de acilación según Friedel-Crafts.

[0016] Los puntos de fusión de las sustancias sintetizadas se registraron en un aparato para determinación del punto de fusión Büchi 510, equipado con un microscopio de platina calefactora Thermovar (empresa Reichert). Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro de resonancia magnética nuclear Broker ARX 300. Los espectros IR (como pastillas de KBr) se registraron en un espectrómetro Perkin-Elmer FT-IR 16 PC. Los espectros de masas se registraron en un aparato del tipo Hewlett Packard 5989. Los análisis elementales se llevaron a cabo en el Instituto de Química Inorgánica de la CAU de Kiel (Alemania), mediante un analizador CHNS de la empresa Hekatech GmbH. A menos que se indique lo contrario, los productos químicos se obtuvieron con la máxima pureza de la empresa Sigma Aldrich GmbH. El compuesto (6*R*)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterina, así como las NO-sintasas (bNOS, iNOS, eNOS) se obtuvieron de la empresa Axxora GmbH. Los compuestos cloruro de calcio hexahidratado, dimetilsulfóxido, ácido etilendiaminotetraacético, diclorhidrato de naftiletilendiamina y la sal de tetrasodio del dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida) se obtuvieron de la empresa Merck KGaA. El cloruro de magnesio hexahidratado y la L-arginina se obtuvieron de la empresa Fluka Chemie GmbH. El acetonitrilo se obtuvo de la empresa LGC Promochem GmbH. La calmodulina (purificada, derivada de cerebro porcino) se obtuvo de la empresa Roche Diagnostics GmbH. Las medidas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Varian Cary 50 Bio, equipado con un sistema PCB 150 de Walter Peltier y cubetas desechables con una altura del centro de 15 mm y un volumen de 70 a 550 µl (empresa Varian GmbH).

[0017] La incubación de las sustancias sintetizadas con las NO-sintasas respectivas se llevó a cabo de la manera siguiente. Las mezclas de incubación estándar presentaron la composición siguiente:

- 60 µl de una disolución de la enzima (en todas las reacciones solamente se usaron isoenzimas humanas recombinantes), el sustrato y los cofactores,
- 10 µl del tampón de incubación respectivo,
- 10 µl de una disolución de los inhibidores potenciales, que había sido ya preparada a una concentración 8 veces superior, en que primeramente se llevó a cabo una solubilización por medio de dimetilsulfóxido al 10%;

en las mezclas de control, en lugar de la disolución del inhibidor se pipetearon otros 10 µl del tampón.

[0018] Después de su preparación, las mezclas se incubaron durante 20 min (iNOS y eNOS) o 30 min (bNOS) en un baño de agua con agitación a 37°C. A continuación, se pipetearon en cada mezcla 20 µl de una disolución que contenía piruvato de sodio (1,6 mM en el tampón de incubación respectivo) y lactato-deshidrogenasa (20 U/ml en el tampón de incubación respectivo). Después de otros 20 min de incubación en un baño de agua con agitación a 27°C, la incubación se detuvo mediante la adición de 50 µl de acetonitrilo enfriado en hielo. A continuación, se eliminó por centrifugación cualquier precipitado potencialmente presente (centrifuga de laboratorio sin refrigeración, 10.000 rpm, 5 min). En cada caso, se mezclaron 120 µl de los sobrenadantes con 24 µl de una disolución de sulfanilamida y diclorhidrato de naftiletilendiamina. Después de una incubación de 5 min a temperatura ambiente, las disoluciones se midieron a una longitud de onda de 543 nm, en que la muestra que no contenía enzimas se usó como valor del blanco. En el ensayo de Griess se utiliza el hecho de que el monóxido de nitrógeno se convierte en nitrito de manera equimolar en disoluciones acuosas (Ignarro y col., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 8103-8107). La determinación cuantitativa del nitrito puede realizarse por medio de una reacción con sulfanilamida y naftiletilendiamina en un entorno ácido. Se produce un colorante azoico que puede medirse espectrofotométricamente. La disolución contenía diclorhidrato de naftiletilendiamina 5,8 mM y sulfanilamida 52 mM. Como disolvente se usó HCl 1N. Los valores relativos de la formación de nitrito se determinaron con respecto a las mezclas de control, que no contenían ningún inhibidor. Una visión general de todos los aditivos, concentraciones de sustrato y cofactores usados en las mezclas de incubación estándar se presentan en la tabla siguiente; como disolventes se usaron los tampones de incubación respectivos. En el caso de la tetrahydrobiopterina, se usó HCl 0,1 mM por razones de estabilidad:

Aditivo de incubación	Concentración final	Almacenamiento
L-arginina (bNOS)	0,5 mM	4°C
L-arginina (iNOS y eNOS)	1 mM	4°C
Tetrahidrobiopterina	10 µM	-20°C
CaCl ₂ (bNOS y eNOS)	0,5 mM	4°C
Calmulina (bNOS y eNOS)	10 µg/ml	-20°C
Dinucleótido de flavina y adenina, forma reducida	5 µM	-20°C
Mononucleótido de flavina, forma reducida	5 µM	-20°C
MgCl ₂ (iNOS)	1 mM	4°C
Dinucleótido de nicotinamida, forma reducida	0,5 mM	-20°C

Tampón A (incubación con bNOS):

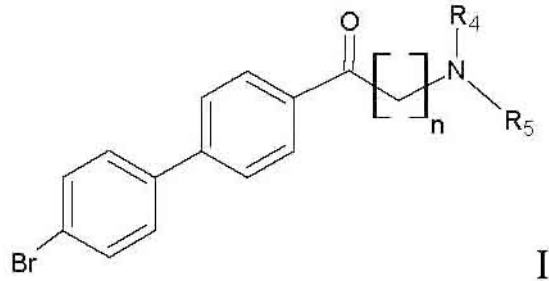
- 5 **[0019]** El tampón usado para la incubación con bNOS tenía la composición siguiente: trietanolamina 50 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]propanosulfato 1 mM, ácido etilendiaminotetraacético 0,5 M. Después de su preparación, el pH se ajustó a 7,0.

Tampón B (incubación con iNOS y eNOS):

- 10 **[0020]** El tampón B se compuso de una disolución de trietanolamina 50 mM ajustada a pH = 7,5.

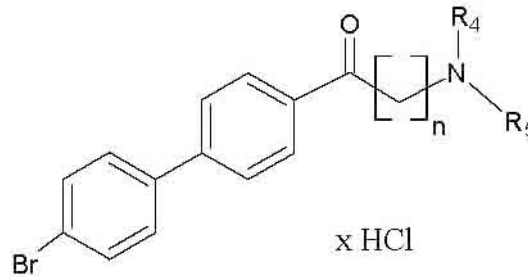
REIVINDICACIONES

1. Uso de una sustancia con la fórmula estructural general

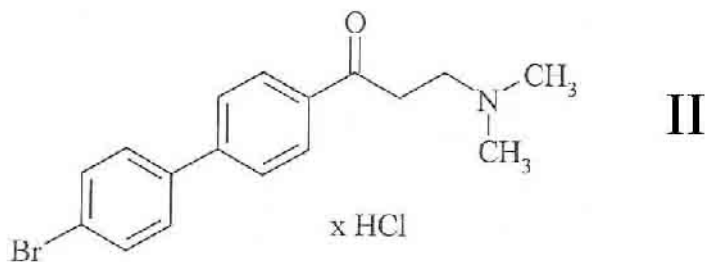


5

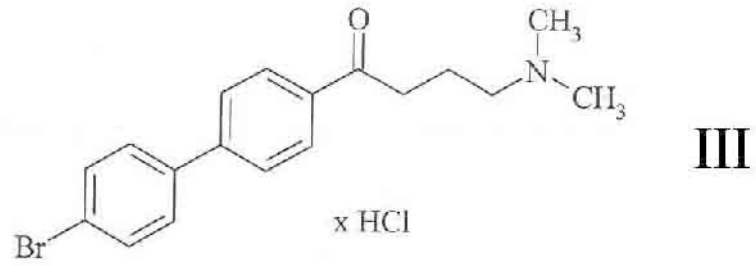
- o de una sustancia con la fórmula estructural general



- 10 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, el choque séptico, el asma bronquial o la migraña, en el que
- R₄ y R₅ son cada uno un grupo metilo y
 - n es igual a 2 ó 3.
- 15 2. El uso de la reivindicación 1, **caracterizado porque** la sustancia es clorhidrato de 4'-(4-bromofenil)-3-dimetilaminopropiofenona con la fórmula estructural (II).



- 20 3. El uso de la reivindicación 1, **caracterizado porque** la sustancia es clorhidrato de 4'-(4-bromofenil)-4-dimetilaminobutirofenona con la fórmula estructural (III).



4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la sustancia es un tautómero de la sustancia con la fórmula estructural (II) o (III).

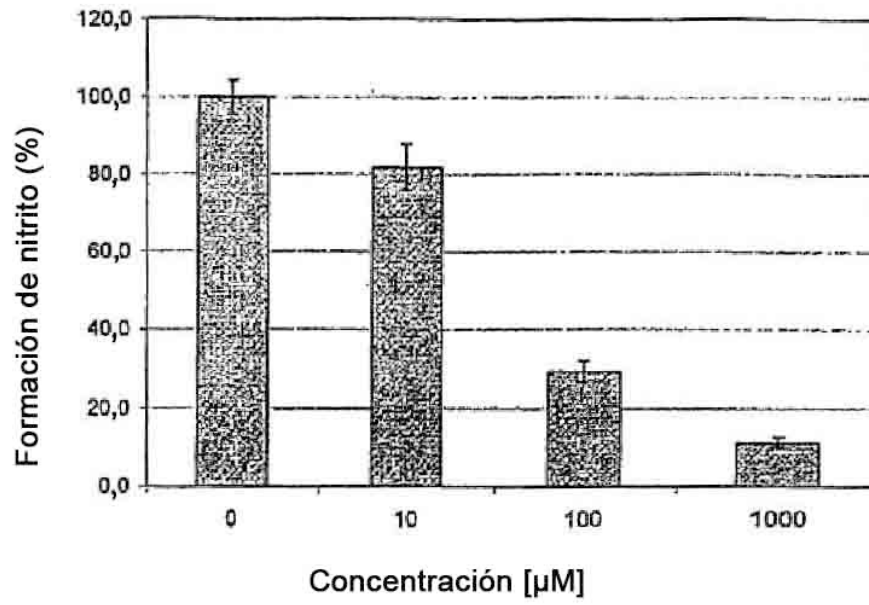


FIG. 1

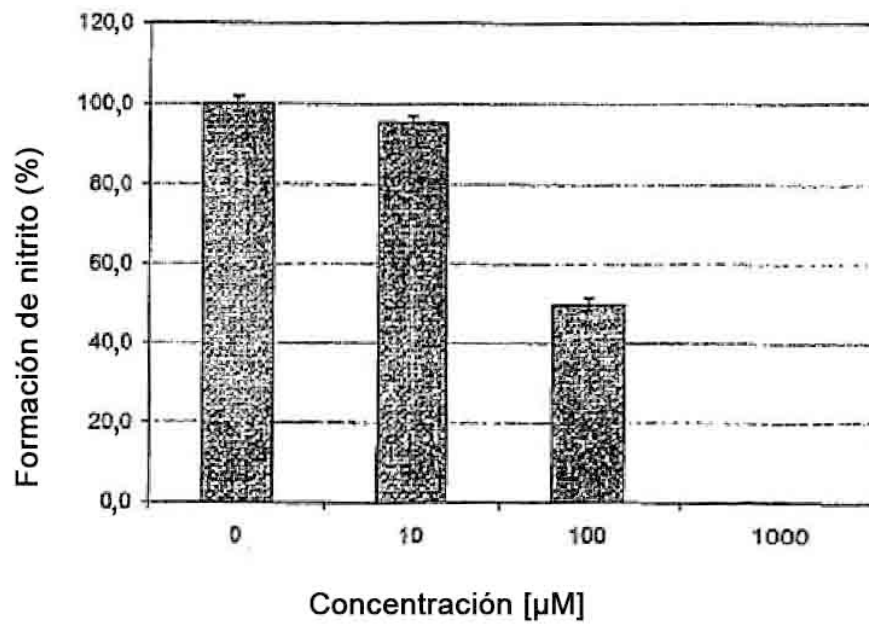


FIG. 2