

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 977**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/48** (2006.01)

**A61P 25/18** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 31/5415** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2002 E 10182948 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012 EP 2275143**

54 Título: **Conjugado de perfenazina o flufenazina con ácidos carboxílicos**

30 Prioridad:

**27.09.2001 US 324936 P**

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

**04.04.2013**

73 Titular/es:

**RAMOT AT TEL AVIV UNIVERSITY LTD. (50.0%)**

**P.O. Box 39296**

**61392 Tel Aviv , IL y**

**BAR ILAN UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GIL-AD, IRIT;**

**WEIZMAN, AVRAHAM;**

**NUDELMAN, ABRAHAM y**

**REPHAELI, ADA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 399 977 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

Conjugado de perfenazina o flufenazina con ácidos carboxílicos

**Campo y antecedentes de la invención**

5 La presente invención se refiere a conjugados químicos novedosos de fármacos antipsicóticos y ácidos orgánicos, y a usos de los mismos. Más particularmente, la presente invención se refiere a nuevos conjugados químicos de fármacos antipsicóticos (que también pueden tener actividad antiproliferativa) y ácidos orgánicos seleccionados para reducir los efectos secundarios inducidos por los fármacos antipsicóticos y/o para ejercer una actividad antiproliferativa, y a usos de los mismos en el tratamiento de trastornos psicóticos y/o proliferativos. Los conjugados químicos novedosos de la presente invención se caracterizan por minimizar los efectos secundarios adversos en comparación con los fármacos antipsicóticos de la técnica anterior.

10 Los fármacos neurolépticos, también conocidos como agentes neurolépticos o neurolépticos, son fármacos antipsicóticos clásicos que se usan ampliamente en el tratamiento de enfermedades y trastornos psicóticos del sistema nervioso central tales como la esquizofrenia. La eficacia antipsicótica de los neurolépticos se atribuye a su capacidad para antagonizar/bloquear los receptores dopaminérgicos centrales. Los fármacos neurolépticos son conocidos como medicamentos antipsicóticos típicos e incluyen, por ejemplo, fenotiazinas, entre las que están las alifáticas (por ejemplo, clorpromazina), piperidinas (por ejemplo, tioridazina) y piperazinas (por ejemplo, flufenazina); butirofenonas (por ejemplo, haloperidol); tioxantenos (por ejemplo, flupentixol); oxoindoles (por ejemplo, molindona); dibenzoxazepinas (por ejemplo, loxapina) y difenilpiperidinas (por ejemplo, pimozida).

15 Sin embargo, la administración de los fármacos neurolépticos actualmente disponibles frecuentemente se asocia con efectos secundarios adversos. Se conoce bien en la técnica que los agentes neurolépticos inducen síntomas extrapiramidales, que incluyen rigidez, temblor, bradicinesia (movimiento lento) y bradifrenia (pensamiento lento), así como discinesia tardía, reacciones agudas distónicas y acatisia. De hecho, alrededor del 5 % de los pacientes que se tratan con terapia crónica de fármacos neurolépticos durante más de un año desarrollan patología de discinesia tardía.

20 Una clase diferente de fármacos antipsicóticos incluye los antipsicóticos atípicos. Los fármacos antipsicóticos atípicos tienen un perfil de unión al receptor que incluye la unión a receptores centrales de serotonina 2 (5-HT<sub>2</sub>), además de a receptores de dopamina D<sub>2</sub>. Los fármacos antipsicóticos atípicos incluyen, por ejemplo, clozapina, olanzapina y risperidona, y se caracterizan generalmente por una alta actividad contra la serotonina y una afinidad relativamente baja por receptores de dopamina D<sub>2</sub>. Algunos fármacos antipsicóticos atípicos tales como clozapina se conocen por antagonizar a receptores adrenérgicos, colinérgicos e histaminérgicos.

25 A diferencia de los neurolépticos, los antipsicóticos atípicos causan síntomas extrapiramidales mínimos y, por tanto, raramente causan discinesias tardías, acatisia o reacciones distónicas agudas. Sin embargo, la administración de los mismos implica otros efectos secundarios tales como aumento del peso corporal, alteraciones del humor, disfunción sexual, sedación, hipotensión ortostática, hipersalivación, umbral de convulsiones reducido y en particular, agranulocitosis.

30 Los efectos secundarios graves que están asociados tanto con fármacos antipsicóticos típicos como con fármacos antipsicóticos atípicos, denominados también en la presente memoria antipsicóticos, establecen una limitación importante para su uso y se han realizado esfuerzos de consideración para desarrollar fármacos antipsicóticos que no produzcan estos efectos secundarios.

35 La patente de los EE.UU. n.º 6.197.764 revela conjugados químicos de clozapina (un fármaco antipsicótico atípico) y un ácido graso de 12-26 átomos de carbono, preferentemente de 16-22 átomos de carbono. Estos conjugados se caracterizan por una efectividad terapéutica prolongada, que permite la administración de dosis más bajas de los mismos para proporcionar un efecto terapéutico antipsicótico, reduciendo así la posibilidad de desarrollar efectos secundarios graves. Por lo tanto, estos conjugados son beneficiosos y ventajosos frente a los fármacos antipsicóticos atípicos no conjugados. Sin embargo, la patente de los EE.UU. n.º 6.197.764 no revela dichos conjugados ventajosos que incluyen otros agentes antipsicóticos y además, se limita a conjugados que incluyen ácidos grasos de cadena larga. Debería señalarse que los conjugados de éster de otros antipsicóticos, principalmente, neurolépticos y ácidos grasos de cadena larga, se conocen bien en la técnica. No obstante, dichos conjugados se dirigen principalmente a facilitar la penetración cerebral del fármaco y no están diseñados para reducir o evitar activamente los efectos secundarios.

40 La patente de los EE.UU. n.º 3.966.930 revela derivados de fenotiazina fluoro-sustituídos que tienen propiedades neurolépticas pronunciadas y un grado relativamente bajo de efectos secundarios no deseados. Sin embargo, aunque algunos de los derivados de fenotiazina fluorosustituídos reivindicados de la patente de los EE.UU. n.º 3.966.930 incluyen un radical acilo que tiene 1-17 átomos de carbono en su cadena, los datos experimentales se limitan a derivados de fenotiazina que sólo incluyen radicales acilo derivados bien de ácido oxálico o de ácido maleico (es decir, ácidos orgánicos que incluyen 2 a 4 átomos de carbono, respectivamente). Los derivados de fenotiazina revelados tienen un efecto terapéutico más prolongado en comparación con otros neurolépticos conocidos y se caracterizan, por tanto, por un grado relativamente bajo de efectos secundarios inducidos. El efecto

terapéutico prolongado de estos compuestos se atribuye principalmente a los sustituyentes de fenotiazina (por ejemplo, fluoro y trifluorometilo), mientras que su conjugación con los ácidos orgánicos se dirige principalmente a facilitar su formulación farmacéutica.

5 Estudios recientes sobre el desarrollo de los síntomas extrapiramidales como resultado del tratamiento con fármacos antipsicóticos, principalmente neurolépticos, han sugerido un mecanismo que implica un desequilibrio en los receptores dopaminérgicos D1 y D2, que está acompañado además por una disminución de la actividad del sistema del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) en el cerebro.

10 El GABA es un neurotransmisor inhibitorio importante del cerebro, que se sabe que afecta a la actividad estabilizadora del humor, a la actividad ansiolítica y a la actividad de relajación muscular y conocido además por estar relacionado con algunos trastornos y enfermedades del sistema nervioso central. Los estudios recientes de los síntomas extrapiramidales sugieren que los agonistas de GABA se pueden usar además para reducir los efectos secundarios inducidos por neurolépticos y que, por tanto, tienen un potencial terapéutico adicional.

15 Hay estudios previos que ya han sugerido que los agonistas de GABA pueden interferir con otros neurotransmisores cerebrales y, en particular, con el sistema dopaminérgico. Así pues, se encontró que los agonistas de GABA pueden antagonizar el incremento inducido por neurolépticos de la sensibilidad a receptores de dopamina y que, por lo tanto, son capaces de mejorar la discinesia inducida por neurolépticos [1]. Además, se constató que algunos agonistas de GABA directos conocidos (por ejemplo, muscimol y SL 76002) producen un efecto bifásico sobre la catalepsia inducida por haloperidol, de modo que mientras que las dosis bajas del agonista inhiben el comportamiento de catalepsia estereotípica, las altas dosis del agonista potencian la catalepsia inducida por el haloperidol. Otros estudios han comunicado que los agonistas de GABA inducen además la actividad anticonvulsiva [2].

20 El uso de agonistas de GABA es limitado, ya que incluyen grupos funcionales hidrófilos (por ejemplo, un grupo ácido carboxílico libre y un grupo amino libre) y, por tanto, no atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica (BHE). Sin embargo, se ha encontrado que la conjugación química de dichos compuestos con aminoácidos grasos o péptidos podría facilitar sustancialmente su paso a través de la barrera hematoencefálica (BBE) [3].

25 Es más, las patentes de los EE.UU. n.º 3.947.579; 3.978.216; 4.084.000; 4.129.652 y 4.138.484 revelan que los compuestos de tipo GABA (compuestos que están farmacológicamente relacionados con el GABA) que se sabe que atraviesan la barrera hematoencefálica, tales como  $\gamma$ -hidroxibutrolactona,  $\gamma$ -hidroxibutirato, ácido aminooxiacético, 5-etil-5-fenil-2-pirrolidona, 1-hidroxil-3-amino-2-pirrolidona y ácido  $\beta$ -(4-clorofenil)- $\gamma$ -aminobutírico, cuando se coadministran con fármacos neurolépticos, permiten el uso de dosis algo inferiores de fármacos neurolépticos para obtener el mismo efecto antipsicótico que se obtiene con dosis más altas de fármaco neuroléptico sin administrar estos compuestos de tipo GABA y, al mismo tiempo, reducen en cierta medida los efectos secundarios extrapiramidales. Se dice que se obtiene el mismo efecto antipsicótico, aunque se usen dosis menores de fármacos neurolépticos, porque se dice que los compuestos de tipo GABA potencian la actividad antipsicótica del fármaco antipsicótico coadministrado.

35 Estudios recientes han revelado que algunos neurolépticos y, en particular, las fenotiazinas, ejercen además una potente actividad antiproliferativa en diferentes líneas celulares, tales como células neuronales, células gliales, células de melanoma, células de mama, células de colon, células de próstata, linfoma y leucemia, así como en queratocitos humanos primarios [4]. Las "fenotiazinas de tipo semimostaza nuevas" que se conocen por ejercer un efecto inhibitorio específico de la calmodulina, se probaron por el Instituto del Cáncer Nacional (NCI). La actividad antiproliferativa de las fenotiazinas se observó en el examen *in vitro* de 60 líneas celulares de cáncer humano diferentes. Algunas fenotiazinas mostraron además una inhibición significativa de crecimiento tumoral en modelos animales. Estos resultados son coherentes con la baja frecuencia de aparición de cáncer en pacientes esquizofrénicos en medicación neuroléptica, en comparación con la población general.

45 El documento WO 02/43652 enseña el uso de diversos agentes psicotrópicos típicos y atípicos en el tratamiento de enfermedades proliferativas. En particular, el documento WO 02/43652 enseña que los agentes psicotrópicos cíclicos pueden servir como agentes efectivos en el tratamiento de numerosos tumores, incluyendo glioma, melanoma, neuroblastoma, cánceres de colon, cánceres de pulmón y cánceres de próstata, así como en el tratamiento de células cancerosas resistentes a múltiples fármacos (MDR), como las células de melanoma B16 (conocidas por ser resistentes a la doxorubicina y colchicina) y neuroblastoma (SH-SY5T, resistente a 5-FU y doxorubicina). Es más, aparte de enseñar la actividad de agentes psicotrópicos en el tratamiento del cáncer MDR, el documento WO 02/43652 enseña además el uso de los fármacos psicotrópicos como quimiosensibilizadores, en concreto, como compuestos que, de forma efectiva, sensibilizan células cancerosas, en particular células cancerosas MDR, a fármacos citotóxicos.

55 Sin embargo, aunque las enseñanzas del documento WO 02/43652 son sumamente ventajosas, particularmente con respecto a la actividad antiproliferativa y de quimiosensibilización de agentes psicotrópicos en el tratamiento del cáncer MDR, el uso de estos agentes psicotrópicos está muy limitado por los efectos secundarios adversos inducidos de este modo.

El ácido butírico (BA) y el ácido 4-fenilbutírico (PBA), del que GABA es un derivado, se conocen también por actuar como agentes de diferenciación y como agentes antiproliferativos en un amplio espectro de células neoplásicas *in vitro* [5]. Tanto el ácido butírico como el ácido 4-fenilbutírico se conocen también como agentes pleotrópicos y una de sus actividades más notables es el incremento reversible del nivel de acetilación en histonas nucleares, lo que conduce a la relajación de la cromatina y a cambios en la actividad de transcripción. [6]. Se supone que este mecanismo de acción está relacionado con la actividad anticancerígena del ácido butírico y del ácido 4-fenilbutírico.

Por tanto, la técnica anterior enseña el uso de fármacos antipsicóticos típicos y atípicos en el tratamiento de la esquizofrenia, y de enfermedades y trastornos psicóticos del sistema nervioso central relacionados, así como en el tratamiento de enfermedades y trastornos proliferativos tales como tumores malignos y benignos, y cáncer MDR, como agentes antiproliferativos y como quimiosensibilizadores. La técnica anterior enseña además el uso de agonistas de GABA (incluyendo el propio GABA) como posibles agentes para reducir los efectos secundarios inducidos por neurolépticos, así como el uso de ácido butírico y derivados del mismo como agentes antiproliferativos.

No obstante, hay aún una necesidad ampliamente reconocida de fármacos antipsicóticos caracterizados por una mejor actividad terapéutica y menos efectos secundarios, que sería altamente ventajoso tener y que puedan servir también como fármacos antiproliferativos y como quimiosensibilizadores.

### **Sumario de la invención**

Según la presente invención, se proporcionan (i) conjugados químicos del fármaco antipsicótico perfenazina y ácidos orgánicos seleccionados entre ácido butírico, ácido valérico, ácido 4-fenilbutírico para reducir los efectos secundarios inducidos por dicho fármaco antipsicótico y/o para ejercer una actividad antiproliferativa; (ii) un conjugado químico del fármaco antipsicótico flufenazina y GABA; (iii) conjugados químicos del fármaco antipsicótico flufenazina y los agentes antiproliferativos ácido butírico y ácido 4-fenilbutírico; (vi) procedimientos para su síntesis; (v) uso de los mismos en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades y trastornos psicóticos, reduciendo a la vez los efectos secundarios característicos de los fármacos antipsicóticos convencionales; (v) dichos conjugados para su uso en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades y trastornos proliferativos.

En la presente memoria, se muestra que dichos conjugados químicos de fármacos antipsicóticos se caracterizan por una minimización de los efectos secundarios adversos (por ejemplo, síntomas extrapiramidales), una mayor actividad terapéutica antipsicótica y una mayor actividad antiproliferativa. Además, en la presente memoria, se muestra que dichos conjugados químicos proporcionan inesperadamente efectos sinérgicos en comparación con sus compuestos precursores tanto con respecto a sus efectos terapéuticos como con respecto a la minimización de los efectos secundarios.

Por tanto, según un aspecto de la presente invención, se proporciona un conjugado químico que comprende un primer resto químico unido covalentemente a un segundo resto químico, en el que el primer resto químico es un residuo de fármaco antipsicótico y, además, en el que el segundo resto químico es un residuo de ácido orgánico que se selecciona para reducir los efectos secundarios inducidos por el fármaco antipsicótico cuando se administra el fármaco antipsicótico *per se* y/o para ejercer actividad antiproliferativa.

En los conjugados reivindicados, el fármaco antipsicótico es perfenazina y el ácido orgánico es ácido butírico, ácido 4-fenilbutírico o ácido valérico, o el fármaco antipsicótico es flufenazina y el ácido orgánico es GABA. En el último caso, el GABA está unido a dicha flufenazina por un enlace éster entre el grupo carboxílico de dicho GABA y el grupo hidroxilo de de la flufenazina.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende, como un ingrediente activo, el conjugado químico de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica de la presente invención está preferentemente envasada en un material de envasado y está identificada en un impreso, o en el material de envasado, para usar en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno psicótico, para usar en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno proliferativo y/o para usar en quimiosensibilización, en combinación con un agente quimioterapéutico y/o en una afección médica para la que es beneficiosa la quimiosensibilización.

Según otro aspecto más de la presente invención, se proporcionan conjugados según lo definido en las reivindicaciones 1 y 2 para su uso en un procedimiento de tratar o prevenir un trastorno psicótico o una enfermedad psicótica en un sujeto, procedimiento que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado químico de la presente invención.

Según características adicionales de las realizaciones preferidas de la presente invención, descritas más adelante, el trastorno psicótico o la enfermedad psicótica se selecciona del grupo que consiste en esquizofrenia, paranoia, psicosis infantil, enfermedad de Huntington y síndrome de Gilles de la Tourette.

Según otro aspecto más de la presente invención, se proporcionan conjugados según lo definido en las reivindicaciones 1 y 2 para su uso en un procedimiento de tratamiento o prevención de un trastorno proliferativo o

una enfermedad proliferativa en un sujeto, procedimiento que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado químico de la presente invención.

5 Según características adicionales de realizaciones preferidas de la invención descritas más adelante, el trastorno proliferativo o la enfermedad proliferativa se seleccionan del grupo que consiste en un tumor cerebral, una metástasis cerebral y un tumor periférico.

Según otras características más de las realizaciones preferidas descritas, el trastorno proliferativo es cáncer, tal como cáncer resistente a múltiples fármacos.

Según otras características de las realizaciones preferidas de la invención, descritas más adelante, el sujeto tiene cáncer tal como un cáncer resistente a múltiples fármacos.

10 Según la presente invención, el residuo de fármaco antipsicótico es perfenazina o flufenazina y tiene una actividad antiproliferativa.

Según otras características más de las realizaciones preferidas descritas, el fármaco antipsicótico es perfenazina y el residuo de agente antiproliferativo se selecciona del grupo que consiste en un residuo de ácido butírico y un residuo de ácido 4-fenilbutírico.

15 Según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un procedimiento para sintetizar los conjugados químicos de la presente invención. El procedimiento comprende hacer reaccionar un ácido orgánico según lo definido en las reivindicaciones 1 y 2, y el fármaco antipsicótico perfenazina o flufenazina para obtener un residuo de dicho ácido orgánico unido covalentemente a un residuo de dicho fármaco antipsicótico.

20 Según la presente invención, el residuo del ácido orgánico según lo definido en la reivindicación 1 ó 2 está unido covalentemente al residuo del agente antipsicótico según lo definido en la reivindicación 1 ó 2 a través de un enlace de éster carboxílico, y el procedimiento comprende además, antes de hacerlo reaccionar, convertir el ácido orgánico en un derivado de cloruro de acilo del mismo.

25 En el caso del conjugado según lo definido en la reivindicación 2, en el que el ácido orgánico es GABA que comprende un grupo amino libre, el procedimiento comprende además proteger el grupo amino libre con un grupo protector, antes de hacerlo reaccionar, para obtener mediante la reacción un residuo amino-protegido del ácido orgánico unido covalentemente al residuo del fármaco antipsicótico, y eliminar el grupo protector tras la obtención del residuo amino-protegido del ácido orgánico unido covalentemente al residuo del fármaco antipsicótico. Preferentemente, el procedimiento comprende además, tras la protección y antes de la reacción, convertir el ácido orgánico en un derivado de acilimidazol del mismo.

30 La presente invención trata satisfactoriamente los defectos de las configuraciones actualmente conocidas, proporcionando nuevos y potentes conjugados químicos de fármacos antipsicóticos que inducen una minimización de los efectos secundarios adversos para el tratamiento y la prevención de trastornos psicóticos y/o proliferativos. Los conjugados de la presente invención se definen en las reivindicaciones 1 y 2.

### **Breve descripción de las figuras**

35 En las figuras:

Las FIG. 1a y 1b muestran un gráfico de barras y líneas, obtenidos mediante estudios de relación entre la actividad y la estructura (SAR), que manifiestan el efecto de la perfenazina y sus conjugados químicos según la presente invención (AN 167, AN 168 y AN 130) sobre la catalepsia total (Figura 1a) y sobre los niveles de prolactina en sangre (Figura 1b) en ratas inyectadas intraperitonealmente con 5 mg/kg de peso corporal de perfenazina y dosis equimolares de sus conjugados químicos;

40 La FIG. 2 es una gráfica de barras que manifiesta la catalepsia total en ratas después del tratamiento con 5 mg/kg de perfenazina y dosis equimolares de sus conjugados químicos según la presente invención (estudios de SAR);

45 Las FIG. 3a y 3b muestran una gráfica de barras y líneas que manifiestan el efecto de la perfenazina (5 mg/kg), flufenazina (7,5 mg/kg) y sus conjugados químicos (AN 167, AN 168, AN 180 y AN 187) según la presente invención (administrados en dosis equimolares) sobre la catalepsia total en ratas (Figura 3a) y el efecto de la perfenazina, la flufenazina y sus conjugados químicos de GABA AN 168 y AN 187 sobre los niveles en sangre de la prolactina en ratas (Figura 3b);

50 Las FIG. 4a-b son gráficas comparativas que manifiestan el curso temporal de la catalepsia en ratas, inducido por perfenazina y sus conjugados químicos según la presente invención (Figura 4a) y flufenazina y sus conjugados químicos según la presente invención (Figura 4b);

Las FIG. 5a y 5b muestran una gráfica de barras y líneas comparativas que manifiestan el efecto de un conjugado químico de perfenazina y GABA (compuesto AN 168) de la presente invención y una dosis equivalente de una mezcla de perfenazina y GABA en la catalepsia en ratas;

55 La FIG. 6 es una gráfica de barras que manifiesta el efecto de los conjugados químicos AN 167 y AN 168 de la presente invención en la catalepsia total en ratas (promedios de cuatro experimentos independientes);

Las FIG. 7a y 7b muestran gráficas de barras que manifiestan el efecto del conjugado químico AN 168, una dosis equivalente de perfenazina y una dosis equivalente de una muestra de perfenazina y GABA sobre la catalepsia en ratones, medida en términos del porcentaje de animales que alcanzan el objetivo en 2 minutos (Figura 7a) y en términos del tiempo que les llevó a los animales alcanzar el objetivo (Figura 7b);

Las FIG. 8a y 8b presentan líneas comparativas que manifiestan el efecto de la perfenazina administrada por vía oral y de su conjugado químico AN 168 sobre la catalepsia en ratas, medido mediante la prueba del "piano" (la Figura 8b presenta los datos obtenidos en experimentos llevados a cabo 3 meses después de las pruebas presentadas en Figura 8a);

Las FIG. 9a y 9b presentan gráficas de barras que manifiestan la catalepsia total inducida en ratas por la perfenazina administrada oralmente y su conjugado químico AN 168, a diversas concentraciones, medida mediante la prueba del "piano" (la Figura 9b presenta los datos obtenidos en experimentos llevados a cabo 3 meses después de los experimentos presentados en la Figura 9a);

Las FIG. 10a y 10b son líneas comparativas y una gráfica de barras que manifiesta el efecto de diversas concentraciones de perfenazina administrada por vía oral y su conjugado químico AN 168 sobre el perfil de catalepsia (Figura 10a) y sobre la catalepsia total (Figura 10b) en ratas, medido mediante la prueba del "piano" durante 24 horas;

La FIG. 11 es un gráfico de barras que demuestra el efecto de la perfenazina y AN 168, administrados oralmente a diversas concentraciones, sobre la catalepsia total en ratas, medido mediante el ensayo de la "pared";

La FIG. 12 presenta líneas comparativas que manifiestan el efecto de la perfenazina y de AN 168 administrados oralmente sobre los niveles en sangre de prolactina en ratas;

La FIG. 13 presenta líneas comparativas que manifiestan el efecto de la perfenazina y sus conjugados químicos de la presente invención, AN 130, AN 167 y AN 168, sobre la proliferación de células de melanoma B16 murino;

La FIG. 14 presenta líneas comparativas que manifiestan el efecto de aumentar las concentraciones de perfenazina, AN 168, GABA, vincistina y cisplatino sobre la viabilidad de células de glioma de ratas C6;

La FIG. 15 presenta líneas comparativas que manifiestan el efecto de aumentar las concentraciones de perfenazina, AN 168 y dexametasona sobre la viabilidad de células de linfoma T de Jurkat;

La FIG. 16 es una gráfica de barras que manifiesta el efecto de diversas concentraciones de perfenazina y AN 168 sobre la viabilidad de células del glioma C6 de rata tratadas con vincistina 30  $\mu\text{M}$ ;

La FIG. 17 es una gráfica de barras que manifiesta el efecto del cisplatino (5-50  $\mu\text{M}$ ) y una combinación de cisplatino (5-50  $\mu\text{M}$ ) y AN 168 (10 y 15  $\mu\text{M}$ ) sobre la viabilidad de células de glioma de ratas C6;

La FIG. 18 es un gráfico de barras que manifiesta el efecto de la perfenazina, AN 168 y cisplatino en la fragmentación del ADN en células de glioma de ratas C6;

La FIG. 19 es una gráfica de barras que manifiesta el efecto de la perfenazina y sus conjugados químicos AN 130, AN 167 y AN 168 en las células cerebrales normales (valores  $\text{CI}_{50}$ );

La FIG. 20 es una gráfica de barras que manifiesta el efecto de las dosis equimolares de perfenazina y AN 168 sobre la viabilidad de la célula miocítica de rata; y

La FIG. 21 son líneas comparativas que manifiestan el curso temporal de la mortalidad en ratas inyectadas intraperitonealmente con perfenazina (per) y compuesto AN 167 de la presente invención.

#### **Descripción de las realizaciones preferidas**

La presente invención es de conjugados químicos de los fármacos antipsicóticos perfenazina y flufenazina unidos covalentemente a ácidos orgánicos según lo definido en las reivindicaciones 1 y 2, procedimientos para su preparación y dichos conjugados para su uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos psicóticos tales como la esquizofrenia, así como enfermedades y trastornos proliferativos tales como tumores cerebrales, metástasis cerebrales, tumores periféricos, cáncer MDR y otras enfermedades proliferativas.

Los principios y el funcionamiento de los conjugados químicos según la presente invención pueden entenderse mejor con referencia a las figuras y a las descripciones adjuntas.

En la concepción de la presente invención, se planteó la hipótesis de que un conjugado químico que acoplase covalentemente un fármaco antipsicótico (que puede tener también actividad antiproliferativa y/o actividad de quimiosensibilización) y un agonista de GABA o un agente antiproliferativo podía ejercer una alta actividad terapéutica antipsicótica o antiproliferativa, así como actividad de quimiosensibilización, asociadas con una minimización de los efectos secundarios adversos.

El fundamento subyacente para esta hipótesis es el siguiente: las enfermedades y los trastornos psicóticos tales como la esquizofrenia, se tratan mediante varios tipos de fármacos antipsicóticos que pueden dividirse en antipsicóticos típicos, tales como neurolepticos, y antipsicóticos atípicos. Sin embargo, la administración de los fármacos antipsicóticos está normalmente acompañada a corto y largo plazo de efectos secundarios adversos tales como síntomas extrapiramidales (inducidos principalmente por antipsicóticos típicos) y agranulocitosis (inducida principalmente por antipsicóticos atípicos). El desarrollo de estos efectos secundarios adversos, en particular, de los síntomas extrapiramidales, se atribuye a un desequilibrio inducido en los receptores dopaminérgicos D1 y D2 y a la disminución de la actividad del sistema del GABA en el cerebro.

Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que acoplar covalentemente un fármaco antipsicótico con un agonista de GABA daría como resultado un conjugado químico que ejercería actividad antipsicótica con una minimización de los efectos secundarios.

5 En particular, se asumió que dicho acoplamiento de un fármaco antipsicótico y un agonista de GABA sería muy beneficioso a este respecto, puesto que ello daría como resultado un compuesto que ejercería simultáneamente una actividad antipsicótica y una mayor actividad del GABA.

10 Se sabe que un aumento de la actividad del sistema del GABA, que en la actualidad se logra mediante la administración de agonistas de GABA o de compuestos de tipo GABA, reduce los efectos secundarios inducidos por antipsicóticos y proporciona además otros beneficios terapéuticos relacionados con el sistema del GABA (por ejemplo, estabilización del humor y relajación). Se sabe además que los agonistas de GABA antagonizan la sensibilidad aumentada de los receptores dopaminérgicos inducida por fármacos antipsicóticos. Sin embargo, la administración de ciertos agonistas de GABA está limitada por su naturaleza hidrófila.

15 Por lo tanto, se planteó la hipótesis adicional de que un conjugado químico obtenido acoplado covalentemente un fármaco antipsicótico y un agonista de GABA estaría caracterizado por (i) actividades aumentadas de GABA y antipsicóticas sinérgicas inducidas tanto por el resto de fármaco antipsicótico como por el resto agonista de GABA; (ii) efectos secundarios inducidos por antipsicóticos reducidos; (iii) características farmacocinéticas mejoradas con respecto al cruce de la barrera hematoencefálica del fármaco antipsicótico acoplado y el agonista de GABA en comparación con los compuestos precursores; y (iv) mayor afinidad por los receptores dopaminérgicos en el cerebro, lo que daría como resultado una actividad antipsicótica mejorada.

20 Por otra parte, en la técnica se sabe que ciertos fármacos antipsicóticos, en particular, fármacos neurolépticos tales como fenotiazinas, son agentes antiproliferativos potentes y pueden servir como quimiosensibilizadores cuando se usan en combinación con fármacos quimioterapéuticos. Por lo tanto, además se planteó la hipótesis de que un conjugado químico que acopla covalentemente un fármaco antipsicótico y un resto químico que tiene actividad antiproliferativa ejercería una actividad antiproliferativa y/o de quimiosensibilización incluso superior. Dicho conjugado químico podría ser muy beneficioso en el tratamiento de trastornos y enfermedades proliferativas, especialmente en el cerebro, debido a la afinidad del derivado antipsicótico por los receptores cerebrales y a sus propiedades farmacocinéticas cerebrales mejoradas.

25 Al reducir la presente invención a la práctica, como se ejemplifica además en el apartado de Ejemplos que figura a continuación, se encontró que el acoplamiento covalente del fármaco antipsicótico perfenazina o flufenazina y un resto químico según lo definido en las reivindicaciones 1 y 2 seleccionado para reducir los efectos secundarios provocados por el fármaco antipsicótico, tal como GABA, o seleccionado para ejercer actividad antiproliferativa, da como resultado conjugados químicos que están caracterizados sinérgicamente por (i) efectos secundarios adversos minimizados; (ii) actividad antipsicótica alta; (iii) actividad antiproliferativa alta; (iv) actividad de quimiosensibilización alta; y (v) toxicidad reducida, todo en comparación con la perfenazina y la flufenazina. El conjugado químico de la reivindicación 2 que incluye GABA se caracterizó además por actividades antipsicóticas e inducidas por GABA sinérgicas.

30 Así pues, los conjugados químicos se usan según la presente invención para tratar enfermedades y trastornos psicóticos, así como enfermedades y trastornos proliferativos, y como agentes antiproliferativos. Cada uno de los conjugados químicos que se usa para tratar enfermedades y trastornos psicóticos y/o proliferativos según la presente invención incluye un primer resto químico que está unido covalentemente a un segundo resto químico. El primer resto químico es un residuo de fármaco antipsicótico, mientras que el segundo resto químico es un ácido orgánico seleccionado para reducir los efectos secundarios causados por el fármaco antipsicótico cuando se administra *per se* y/o para ejercer actividad antiproliferativa.

35 En los conjugados reivindicados, el fármaco antipsicótico es perfenazina y el ácido orgánico es ácido butírico, ácido 4-fenilbutírico o ácido valérico, o el fármaco antipsicótico es flufenazina y el ácido orgánico es GABA. En el último caso, el GABA está unido a dicha flufenazina por un enlace de tipo éster entre el grupo carboxílico del GABA y el grupo hidroxilo de la flufenazina.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "resto químico" se refiere a un residuo derivado de un compuesto químico que mantiene su funcionalidad.

40 El término "residuo" se refiere en la presente memoria a una parte principal de una molécula que está covalentemente unida a otra molécula, como se acepta ampliamente en la técnica.

Por tanto, la expresión "residuo de fármaco antipsicótico" se refiere a una parte principal de un fármaco antipsicótico que está unida covalentemente a otro resto químico, como se ha definido esta expresión anteriormente en la presente memoria.

45 Los residuos de fármacos antipsicóticos a los que se hace referencia en la descripción se obtienen de fármacos antipsicóticos típicos o de fármacos antipsicóticos atípicos, e incluyen, por ejemplo, un residuo de clorpromazina, un residuo de perfenazina, un residuo de flufenazina, un residuo de zuclopentixol, un residuo de tiopropazato, un

- residuo de haloperidol, un residuo de benperidol, un resto de bromperidol, un residuo de droperidol, un residuo de espiperona, un residuo de pimozida, un residuo de piperacetazina, un residuo de amilsulprida, un residuo de sulpirida, un residuo de clotiapina, un residuo de ziprasidona, un residuo de remoxiprida, un residuo de sultoprida, un residuo de alizaprida, un residuo de nemonaprida, un residuo de clozapina, un residuo de olanzapina, un residuo de ziprasidona, un residuo de sertindol, un residuo de quetiapina, un residuo de fluoxetina, un residuo de afluvoxamina, un residuo de desipramina, un residuo de paroxetina, un residuo de sertralina, un residuo de ácido valproico y un residuo de fenitoína.
- 5 En la presente invención, el residuo de fármaco antipsicótico perfenazina o flufenazina ejerce además actividad antiproliferativa.
- 10 En la presente invención, el residuo antipsicótico perfenazina ejerce además actividad de quimiosensibilización.
- Como se usa en la presente memoria, el término "quimiosensibilización" significa un incremento o aumento de la citotoxicidad medida de un agente quimioterapéutico sobre células cancerosas, particularmente células de cáncer resistentes a múltiples fármacos, en presencia de un agente quimiosensibilizante, en comparación con el nivel de citotoxicidad ejercida por el agente quimioterapéutico en ausencia del agente quimiosensibilizante.
- 15 La expresión "agente quimiosensibilizante" y el término "quimiosensibilizador", que se usan indistintamente en la presente memoria, describen compuestos que vuelven las células cancerosas más sensibles a la quimioterapia.
- Como se ha indicado anteriormente, el residuo de fármaco antipsicótico, perfenazina o flufenazina, según la presente invención está acoplado covalentemente a un segundo resto químico que es un residuo de ácido orgánico según lo definido en las reivindicaciones 1 y 2.
- 20 La expresión "residuo de ácido orgánico" se refiere a un residuo, según lo definido en la presente memoria, que se obtiene de un ácido orgánico que incluye un grupo carboxílico libre.
- La expresión "grupo carboxílico libre" incluye un grupo "-C(=O)OH" bien en su forma protonada o en su estado ionizado o de sal.
- 25 El residuo de ácido orgánico, según la presente invención, se selecciona bien para reducir los efectos secundarios que podrían ser inducidos por el fármaco antipsicótico si se administrara solo o para ejercer una actividad antiproliferativa. Los residuos de ácido orgánico según la presente invención se citan en las reivindicaciones 1 y 2.
- El término "hidrocarburo" como se usa en la presente memoria se refiere a un compuesto orgánico que incluye, como su esqueleto básico, una cadena de átomos de carbono y átomos de hidrógeno que están unidos covalentemente.
- 30 Así pues, el residuo de hidrocarburo puede ser alquilo o cicloalquilo.
- Como se usa en la presente memoria, el término "alquilo" se refiere a un hidrocarburo alifático saturado que incluye grupos de cadena lineal y grupos de cadena ramificada. Preferentemente, el grupo alquilo tiene 1 a 20 átomos de carbono.
- 35 Siempre que se exponga un intervalo numérico, por ejemplo "1-20", en la presente memoria, significa que el grupo, en este caso el grupo alquilo, puede contener 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, etc., hasta 20 átomos de carbono incluidos. Más preferentemente, el alquilo es un alquilo de tamaño medio que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. Lo más preferentemente, el alquilo tiene de 3 a 5 átomos de carbono.
- 40 Como se usa en la presente memoria, el término "cicloalquilo" incluye un grupo de anillo monocíclico o condensado (es decir, anillos que comparten un par adyacente de átomos de carbono) todos de carbonos, en el que uno o más de los anillos no tienen un sistema de electrones pi completamente conjugado. Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen ciclopropano, ciclobutano, ciclopentano, ciclopenteno, ciclohexano, ciclohexadieno, cicloheptano, cicloheptatrieno y adamantano.
- 45 El residuo de hidrocarburo puede ser lineal o ramificado. El residuo de hidrocarburo pueden estar además saturado o insaturado. Cuando está insaturado, el residuo de hidrocarburo puede incluir un enlace doble o un enlace triple en su cadena de carbonos. Un residuo de hidrocarburo insaturado puede incluir además un arilo.
- Como se usa en la presente memoria, un grupo "arilo" se refiere a grupos monocíclicos o policíclicos de anillos condensados (es decir, anillos que comparten pares adyacentes de átomos de carbono) todos de carbonos que tienen un sistema de electrones pi completamente conjugados. Los ejemplos de grupos arilo incluyen fenilo, naftalenilo y antraceno.
- 50 El residuo de hidrocarburo puede estar además sustituido o no sustituido. Cuando está sustituido, el sustituyente puede ser, por ejemplo, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heteroalíclico, hidroxilo, alcoxilo, ariloxilo, ciano, halo, oxo, amido y amino.

- 5 Un grupo "heteroarilo" se refiere a un grupo de anillo monocíclico o condensado (es decir, anillos que comparten un par adyacente de átomos) que tiene en el/los anillo/s uno o más átomos tales como, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno y azufre, y además que tienen un sistema de electrones pi completamente conjugado. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, pirazol, piridina, pirimidina, quinolina, isoquinolina y purina. El grupo heteroarilo puede estar sustituido o no sustituido. Cuando está sustituido, el grupo de sustituyentes puede ser, por ejemplo, alquilo, cicloalquilo, hidroxilo, alcoxilo, ariloxilo, ciano, halo, oxo, amido y amino.
- 10 Un grupo "heteroalíclico" se refiere a un grupo de anillo monocíclico o condensado que tiene en el/los anillo/s uno o más átomos tales como nitrógeno, oxígeno y azufre. Los anillos pueden tener también uno o más dobles enlaces. No obstante, los anillos no tienen un sistema de electrones pi completamente conjugado. El heteroalíclico puede estar sustituido o no sustituido. Cuando está sustituido, el grupo de sustituyentes puede ser, por ejemplo, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, halo, trihalometilo, hidroxilo, alcoxilo, ariloxilo, ciano, oxo, amido y amino.
- 15 Un grupo "hidroxilo" se refiere a un grupo -OH.
- Un grupo "alcoxilo" se refiere tanto a un grupo -O-alquilo como a un grupo -O-cicloalquilo, según lo definido en la presente memoria.
- Un grupo "ariloxilo" se refiere tanto a un grupo -O-arilo como a un grupo -O-heteroarilo, según lo definido en la presente memoria.
- Un grupo "oxo" se refiere a un grupo -C(=O)-R', en el que R' puede ser, por ejemplo, alquilo, cicloalquilo o arilo.
- Un grupo "halo" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo.
- 20 Un grupo "trihalometilo" se refiere a un grupo -CX<sub>3</sub>, en el que X es un grupo halo según lo definido en la presente memoria.
- Un grupo "amino" se refiere a un grupo -NH<sub>2</sub>.
- Un grupo "amido" se refiere a un grupo -C(=O)-NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>, en el que R<sub>a</sub> y R<sub>b</sub> pueden ser, por ejemplo, hidrógeno, alquilo, cicloalquilo y arilo.
- 25 Un residuo de hidrocarburo puede incluir además uno o más heteroátomos intercalados dentro de su cadena. Los heteroátomos pueden ser, por ejemplo, oxígeno, nitrógeno y/o azufre.
- Un residuo de hidrocarburo puede ser además un residuo que tiene una fórmula general -Z-C(=O)-CHR<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>, en la que Z puede ser, por ejemplo, un enlace sencillo o un residuo de hidrocarburo sustituido o no sustituido según se ha descrito anteriormente en la presente memoria; R<sub>2</sub> puede ser, por ejemplo, hidrógeno o un residuo de alquilo que tiene de 1-10 átomos de carbono; y R<sub>3</sub> puede ser, por ejemplo, hidrógeno o un residuo de hidrocarburo según lo definido anteriormente.
- 30 Por lo tanto, los ejemplos representativos de ácidos orgánicos de los que puede obtenerse un residuo de ácido orgánico incluyen ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido ftálico, ácido isoftálico, ácido tetraftálico, ácido butírico, ácido 4-fenilbutírico, ácido 4-aminobutírico (GABA), ácido valérico, ácido propiónico, ácido retinoico, ácido acetilsalicílico e ibuprofeno.
- 35 Según una realización de la presente invención, el segundo resto químico del conjugado químico es GABA y el fármaco es flufenazina.
- Como se usa en la presente memoria, la expresión "residuo de agonista de GABA" se refiere a un residuo, como esta expresión se define en la presente memoria, de un agonista de GABA, mientras que la expresión "agonista de GABA" describe compuestos que son capaces de activar el sistema de GABA en el cerebro y, por tanto, están farmacológicamente relacionados con el GABA. Por consiguiente, se entiende que la expresión "agonista de GABA" incluye el propio GABA, mientras que la expresión "residuo de agonista de GABA" se entiende que incluye un residuo del propio GABA.
- 40 Así pues, los residuos de agonistas de GABA incluyen, además del residuo del propio GABA (ácido γ-aminobutírico), residuos de otro agonista de GABA que pueden acoplarse covalentemente a un fármaco antipsicótico.
- Los ejemplos de dichos residuos de agonistas de GABA incluyen un residuo de (±) baclofeno, un residuo de ácido isonipecótico, un residuo de ácido γ-hidroxi-butírico, un residuo de ácido amino-oxiacético, un residuo de ácido β-(4-clorofenil)-γ-aminobutírico, un residuo de ácido piperidin-4-sulfónico, un residuo de ácido 3-aminopropilfosfonoso, un residuo de ácido 3-aminopropilfosfínico, un residuo de ácido 3-(aminopropil)metilfosfínico y un residuo de ácido 3-(2-imidazolil)-4-aminobutanoico.
- 50 El segundo resto químico de los conjugados químicos de la presente memoria pero no reivindicados es un residuo de agente antiproliferativo seleccionado entre ácido butírico o ácido 4-fenilbutírico, y el fármaco es perfenazina.

La expresión "residuo de agente antiproliferativo", como se usa en la presente memoria, se refiere a un residuo, según lo definido en la presente memoria, de un compuesto que se caracteriza por una actividad antiproliferativa.

5 Los agentes antiproliferativos ácido butírico o ácido 4-fenilbutírico se conocen por ejercer actividad anticancerosa y se caracterizan además como compuestos de los que se obtiene el GABA, y pueden actuar además como agentes miméticos de GABA.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "enlace de éster carboxílico" incluye un enlace "-O-C(=O)-".

La expresión "enlace de tipo amida" incluye un enlace "-NH-C(=O)-".

La expresión "enlace de tipo tioéster" incluye un enlace "-SH-C(=O)-".

10 Se sabe que dichos enlaces de tipo éster son hidrolizables por enzimas derivadas del cerebro, tales como esterasas y amidasas, y por tanto, se asume y se demuestra además mediante los resultados experimentales descritos en la presente memoria (véanse, por ejemplo, las Figuras 5a-b) que los conjugados químicos de la presente invención actúan como profármacos que se metabolizan en el cerebro, y liberan de este modo al mismo tiempo el fármaco antipsicótico y el ácido orgánico manteniendo así cofarmacocinéticas ventajosas para el fármaco antipsicótico y el ácido orgánico.

15 Este procedimiento es muy ventajoso ya que proporciona (i) una acción simultánea del fármaco antipsicótico y el ácido orgánico, que de forma sinérgica produce una reducción de los efectos secundarios inducidos por el fármaco y una actividad dual de ambos restos; (ii) una mayor afinidad del profármaco por los receptores dopaminérgicos que da como resultado una actividad antipsicótica sinérgicamente superior y una actividad antiproliferativa sinérgicamente superior hacia los trastornos proliferativos del cerebro; y (iii) una mejor permeabilidad cerebral de  
20 ambos restos químicos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona además un procedimiento de sintetizar los conjugados químicos descritos anteriormente en la presente memoria. El procedimiento se efectúa, generalmente, haciendo reaccionar un ácido orgánico con un fármaco antipsicótico para obtener un residuo de ácido orgánico unido covalentemente a un residuo del fármaco antipsicótico.

25 En la presente memoria, las expresiones "un residuo de un ácido orgánico" y "un residuo de un fármaco antipsicótico" son equivalentes a las expresiones "residuo de ácido orgánico" y "residuo de fármaco antipsicótico", respectivamente, según se han definido estas expresiones anteriormente en la presente memoria. Debería ser evidente para un experto en la técnica que haciendo reaccionar un ácido orgánico y un fármaco antipsicótico para formar de este modo un enlace covalente entre ellos, se produce un producto final que incluye residuos del ácido  
30 orgánico y se produce el fármaco antipsicótico.

Como se ha tratado además en detalle anteriormente en la presente memoria, en los conjugados químicos de la presente invención, el residuo de ácido orgánico y el residuo de fármaco antipsicótico están unidos covalentemente por un enlace de tipo éster que es un enlace de éster carboxílico.

35 El procedimiento para sintetizar los conjugados químicos de la presente invención se lleva a cabo preferentemente convirtiendo primero el ácido orgánico en su correspondiente derivado de cloruro de acilo para activar el ácido orgánico. Se hace reaccionar después el derivado de cloruro de acilo con el fármaco antipsicótico, que incluye un grupo hidroxilo libre, en una reacción de adición nucleófila bien conocida, para obtener el conjugado químico deseado que tiene el residuo de ácido orgánico unido covalentemente al residuo de fármaco antipsicótico por medio de un enlace de éster carboxílico. Esta reacción se lleva a cabo preferentemente en condiciones básicas para  
40 activar el fármaco antipsicótico y/o para neutralizar los compuestos que estén presentes como sus sales clorhidrato. Sin embargo, el ácido orgánico y/o el fármaco antipsicótico se pueden activar mediante cualquier otro procedimiento conocido.

45 En realizaciones de referencia en las que los residuos están unidos covalentemente por medio de un enlace de tipo tioéster, el procedimiento de síntesis de los conjugados químicos de referencia de la presente invención se efectúa preferentemente convirtiendo el fármaco antipsicótico de referencia en su correspondiente derivado de tiol y convirtiendo el ácido orgánico de referencia en su derivado de cloruro de acilo correspondiente, o en cualquier otro derivado activado del mismo. Entonces, se hace reaccionar el derivado de tiol con el ácido orgánico activado mediante procedimientos bien conocidos para obtener el conjugado químico de referencia deseado que tiene el  
50 residuo de ácido orgánico covalentemente unido al residuo de fármaco antipsicótico por medio de un enlace de tioéster. Debería destacarse que algunos de los fármacos antipsicóticos actualmente conocidos incluyen un grupo tiol libre y, por lo tanto, se pueden hacer reaccionar dichos fármacos directamente con un derivado de cloruro de acilo del ácido orgánico. Los fármacos antipsicóticos que no incluyen un grupo tiol libre pueden hacerse reaccionar fácilmente para obtener un derivado de tiol de los mismos mediante procedimientos bien conocidos en la técnica.

55 En realizaciones de referencia en las que los residuos están unidos covalentemente por un enlace de tipo amida, el procedimiento de síntesis de los conjugados químicos de referencia se efectúa preferentemente convirtiendo primero el ácido orgánico de referencia en su derivado de cloruro de acilo correspondiente para activar el ácido orgánico de

referencia y convirtiendo además el fármaco antipsicótico de referencia en un derivado de amina del mismo. Entonces, se hace reaccionar el derivado de cloruro de acilo con el grupo amino del fármaco antipsicótico de referencia en una reacción de adición nucleófila bien conocida o mediante cualquier otro de los procedimientos conocidos para producir un enlace de tipo amida para obtener el conjugado químico de referencia deseado que tiene el residuo de ácido orgánico de referencia unido covalentemente al residuo de fármaco antipsicótico de referencia por medio de un enlace de tipo amida. Debería destacarse que algunos de los fármacos antipsicóticos actualmente conocidos incluyen un grupo amina libre y, por lo tanto, se pueden hacer reaccionar dichos fármacos directamente con un derivado de cloruro de acilo del ácido orgánico. Los fármacos antipsicóticos que no incluyen un grupo amina libre pueden hacerse reaccionar fácilmente para obtener un derivado de amina de los mismos mediante procedimientos bien conocidos en la técnica.

Los procedimientos descritos anteriormente son normalmente eficaces cuando el ácido orgánico no tiene un grupo amino libre. Sin embargo, en realizaciones de referencia en las que el ácido orgánico incluye un grupo amino libre, como es el caso de los agonistas de GABA, por ejemplo, y en el caso de la realización de la presente invención en la que el ácido orgánico es GABA, el grupo amino debería protegerse durante la reacción descrita con el fármaco antipsicótico. Es necesario proteger el grupo amino libre, pues es un grupo relativamente químicamente activo que puede por lo tanto participar indeseablemente en la reacción.

Por lo tanto, un procedimiento preferido de síntesis del conjugado químico de la presente invención que incluye GABA que tiene un grupo amino libre preferentemente se efectúa protegiendo primero el grupo amino libre. La protección del grupo amino puede llevarse a cabo haciendo reaccionar el ácido orgánico con un grupo protector conocido tal como *terc*-butoxicarbonilo (Boc) y benciloxicarbonilo (Cbz). El ácido orgánico amino-protegido se hace reaccionar después con el fármaco antipsicótico perfenazina o flufenazina para obtener un residuo de ácido orgánico amino-protegido unido covalentemente al residuo de fármaco antipsicótico. Después, se elimina el grupo protector. Además, preferentemente, el ácido orgánico amino-protegido se convierte en su derivado de acilimidazol para activar el ácido orgánico antes de la reacción con el fármaco antipsicótico.

Además, según la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que incluye el conjugado químico de la invención como un ingrediente activo.

Como se usa en la presente memoria, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los conjugados químicos descritos en la presente memoria con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un sujeto.

De aquí en adelante, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo o un diluyente que no causa irritación significativa a un sujeto y no deroga la actividad biológica ni las propiedades del compuesto administrado. Los ejemplos de vehículos son propilenglicol, solución salina, emulsiones y mezclas de disolventes orgánicos con agua.

En la presente memoria, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar la administración de un compuesto. Los ejemplos de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Según una realización preferida de la presente invención, el vehículo farmacéutico es una solución acuosa de ácido láctico.

A este respecto, se debería señalar que algunos de los conjugados químicos de la presente invención, según las realizaciones preferidas, son fácilmente solubles en medios acuosos, por ello, se formulan fácilmente. Dicha formulación conveniente proporciona una ventaja adicional de los conjugados químicos de la presente invención frente a los conjugados de éster conocidos de fármacos antipsicóticos, que incluyen normalmente ácidos grasos de cadena larga y que son, por tanto, insolubles en medios acuosos y se administran en forma de formulación oleaginosa.

Las técnicas para la formulación y administración de fármacos pueden encontrarse en "Remington's Pharmacological Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

Las vías de administración pueden incluir, por ejemplo, administración oral, rectal, transmucosal, transdérmica, Intestinal o parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden elaborar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica; por ejemplo, por medio de procedimientos de mezclado, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización convencionales.

Así pues, las composiciones y formulaciones farmacéuticas para su uso según la presente invención se pueden formular de manera convencional usando uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y adyuvantes, que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden

usar farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

Para inyección, los conjugados químicos de la invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón de solución salina fisiológica con o sin disolventes orgánicos tales como propilenglicol, polietilenglicol.

5 Para la administración transmucosal, se usan penetrantes en la formulación. Dichos penetrantes se conocen generalmente en la técnica.

Para la administración oral, los conjugados químicos de la invención se pueden formular fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten a los conjugados de la invención formularse como comprimidos, píldoras, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones para la ingestión oral por un paciente. Las preparaciones farmacéuticas para un uso oral se pueden fabricar usando un excipiente sólido, opcionalmente, moliendo la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, añadiendo después adyuvantes adecuados si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes útiles son, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido alginico, o una sal de los mismos tal como alginato de sodio.

10

15

Los núcleos de las grageas se proporcionan con revestimientos adecuados. Para este propósito, se pueden usar soluciones de azúcar concentradas que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los revestimientos de comprimidos o grageas para su identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

20

Las composiciones farmacéuticas, que se pueden usar oralmente, incluyen cápsulas de dos piezas fabricadas de gelatina, así como cápsulas blandas, cápsulas selladas fabricadas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de dos piezas pueden contener los ingredientes activos mezclados con una carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizadores. Todas las formulaciones de administración oral deberían estar en dosis adecuadas para la vía de administración elegida.

25

30

Para la administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas formuladas de modo convencional.

Para la administración por inhalación, los conjugados químicos para su uso según la presente invención se administran convenientemente en forma de una presentación de pulverizado de aerosol desde un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosis se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y los cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador se pueden formular para que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

35

40

Los conjugados químicos descritos en la presente memoria también se pueden formular para una administración parenteral, por ejemplo, por inyección de bolo o por infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis, opcionalmente, con un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleaginosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, agentes estabilizantes y/o agentes dispersantes.

45

Las composiciones farmacéuticas de administración parenteral incluyen soluciones acuosas del compuesto activo en forma hidrosoluble. Además, se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos como suspensiones oleaginosas para inyección adecuadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumenten la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

50

Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

55

Los conjugados químicos de la presente invención también se pueden formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases de supositorios convencionales tales como

manteca de cacao u otros glicéridos.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria también pueden comprender vehículos o excipientes en fase sólida o en fase de gel adecuados. Los ejemplos de dichos vehículos o excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenoglicoles.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que el ingrediente activo está contenido en una cantidad eficaz para alcanzar el propósito previsto. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz quiere decir una cantidad de conjugado químico eficaz para evitar, aliviar o mejorar los síntomas de una enfermedad o para prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando.

La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz es competencia de los expertos en la técnica, especialmente, a la luz de la divulgación detallada proporcionada en la presente memoria.

Para cualquier conjugado químico usado en los procedimientos de la invención, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de actividad en cultivos celulares y/o animales. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentraciones en circulación que incluye la  $CI_{50}$  determinada por ensayos de actividad (por ejemplo, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición semimáxima de la actividad de proliferación). Dicha información se puede usar para determinar con más precisión dosis útiles en seres humanos.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los conjugados químicos descritos en la presente memoria se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en animales de experimentación, por ejemplo, determinando la  $CI_{50}$  y la  $DL_{50}$  (dosis letal que causa la muerte en un 50 % de los animales probados) para un compuesto objeto de estudio. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de actividad y estudios de animales se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosis para su uso en el ser humano.

La dosis puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación, la vía de administración y la dosis exactas puede seleccionarlas cada médico en vista de la afección del paciente. (Véase por ejemplo, *Fingl et al.*, 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", capítulo 1 página 1).

La cantidad y el intervalo de dosis se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles en plasma del resto activo que sean suficientes para mantener los efectos antipsicóticos y/o antiproliferativos, llamados la concentración mínima eficaz (CME). Las CME variarán para cada preparación, pero se pueden estimar a partir de datos *in vitro* y/o *in vivo*, por ejemplo, la concentración necesaria para alcanzar el 50-90 % de inhibición de la proliferación de ciertas células se puede determinar usando los ensayos descritos en la presente memoria. Las dosis necesarias para lograr las CEM dependerán de las características individuales y de la vía de administración. Para determinar las concentraciones en plasma, se pueden usar ensayos de CLAR o los bioensayos.

Los intervalos de dosis también se pueden determinar usando el valor de CEM. Las preparaciones se deberían administrar usando un régimen que mantenga los niveles en plasma por encima de las CEM durante el 10-90 % del tiempo, preferentemente durante el 30-90 % y lo más preferentemente durante el 50-90 %.

Dependiendo de la gravedad y la capacidad de respuesta de la afección que se vaya a tratar, la dosis también puede ser una sola administración de una composición de liberación lenta descrita en la presente memoria, con una duración del tratamiento de varios días a varias semanas o hasta que se efectúe la curación o se logre la disminución del estado patológico.

La cantidad de una composición que se va a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto que se esté tratando, de la gravedad de la afección, de la manera de administración, de la opinión del médico que la prescribe, etc.

Si se desea, las composiciones de la presente invención se pueden presentar en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contengan el ingrediente activo. El envase puede comprender, por ejemplo, una lámina de metal o de plástico, tal como un envase de tipo blíster. El envase o dispositivo dispensador puede estar acompañado de instrucciones para la administración. El envase o dispensador también puede estar acompañado de un aviso asociado con el envase en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la elaboración, el uso o la venta de productos farmacéuticos, aviso que refleje la aprobación por la agencia de la forma de las composiciones o de la administración humana o veterinaria. Dicho aviso, por ejemplo, puede ser de etiquetado aprobado por la U.S. Food and Drug Administration para fármacos de receta médica o de un inserto de producto aprobado. Las composiciones que comprenden un conjugado químico de la invención formulado en un vehículo farmacéutico compatible también se pueden preparar, introducirse en un recipiente apropiado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada. Las afecciones adecuadas indicadas en la etiqueta pueden incluir, por ejemplo, tratamiento de esquizofrenia, paranoia, psicosis infantil, enfermedad de Huntington, síndrome de Gilles de Tourette, trastornos proliferativos del cerebro y cáncer MDR, y quimiosensibilización, según se ha definido este término anteriormente en

la presente memoria.

5 Por lo tanto, según la presente invención, la composición farmacéutica está envasada en un material de envasado y se identifica con letras impresas, sobre o en el material de envasado, para uno o más de los siguientes usos: para usar en el tratamiento de enfermedades o trastornos psicóticos, para usar en el tratamiento de enfermedades o trastornos proliferativos cerebrales o periféricos, para usar en el tratamiento del cáncer tal como de cáncer MDR en combinación con un agente quimioterapéutico.

10 Además, según la presente invención, se proporcionan conjugados según la reivindicación 1 y 2 para su uso en un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno psicótico en un sujeto (por ejemplo, un ser humano). El procedimiento se efectúa administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más conjugados químicos de la invención a un sujeto tratado.

Como se usa en la presente memoria, el término "procedimiento" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una determinada tarea incluyendo aquellas maneras, medios, técnicas y procedimientos bien conocidos por, o fácilmente desarrollados a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por profesionales de las técnicas química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

15 En la presente memoria, el término "tratar" incluye abolir, inhibir sustancialmente, ralentizar o invertir la progresión de una enfermedad, mejorando sustancialmente los síntomas clínicos de una enfermedad o evitando sustancialmente la aparición de síntomas clínicos de una enfermedad.

20 Como se usa en la presente memoria, la expresión "enfermedad o trastorno psicótico" se refiere a una enfermedad o un trastorno caracterizado por una afección psicótica como resultado de un deterioro del sistema nervioso central. Los ejemplos de enfermedades y trastornos psicóticos que se pueden tratar usando los conjugados químicos de la invención, incluyen esquizofrenia, paranoia, psicosis infantil, enfermedad de Huntington y síndrome de Gilles de la Tourette.

25 El término "administración" como se usa en la presente memoria se refiere a un procedimiento para llevar los conjugados químicos de la presente invención a una zona o lugar del cerebro que esté afectado por la enfermedad o el trastorno psicótico.

El conjugado químico de la presente invención se puede administrar intraperitonealmente. Más preferentemente, se administra por vía oral.

El término "sujeto" se refiere a animales, normalmente mamíferos, que tienen una barrera hematoencefálica, incluyendo seres humanos.

30 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de conjugado químico que se está administrando que aliviará en algún grado uno o más de los síntomas de la enfermedad o del trastorno psicótico que se está tratando.

35 Una cantidad terapéuticamente eficaz según este procedimiento de la presente invención oscila preferentemente entre 1 mg/kg corporal y 50 mg/kg corporal, más preferentemente entre 2 mg/kg corporal y 30 mg/kg corporal, más preferentemente entre 2 mg/kg corporal y 20 mg/kg corporal y lo más preferentemente entre 2 mg/kg corporal y 10 mg/kg corporal.

Así pues, la presente invención se dirige a conjugados químicos que ejercen actividad antipsicótica. Los conjugados químicos de la presente invención son muy ventajosos, dado que ejercen una mayor actividad antipsicótica y se caracterizan además por una minimización de los efectos secundarios inducidos por los mismos.

40 La expresión "efectos secundarios" como se usa en la presente memoria se refiere a los síntomas adversos que se pueden desarrollar como resultado de administrar un cierto fármaco a un sujeto. Dichos síntomas pueden incluir, por ejemplo, síntomas extrapiramidales, como se detalla más adelante, y están normalmente asociados con la administración de fármacos antipsicóticos.

45 Además, según la presente invención, se proporcionan conjugados según la reivindicación 1 y 2 para su uso en un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad o un trastorno proliferativo en un sujeto (por ejemplo, un ser humano). El procedimiento se efectúa administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los conjugados químicos de la invención a un sujeto tratado.

50 Como se usa en la presente memoria, la expresión "enfermedad o trastorno proliferativo" se refiere a una enfermedad o un trastorno caracterizado por la proliferación celular. Las condiciones de proliferación celular que se pueden prevenir o tratar mediante la presente invención incluyen, por ejemplo, tumores malignos tales como cáncer y tumores benignos.

Como se usa en la presente memoria, el término "cáncer" se refiere a diversos tipos de neoplasmas malignos, la mayoría de los cuales pueden invadir tejidos circundantes y pueden metastatizar a diferentes sitios, según lo definido por el Diccionario de medicina de Stedman XXV edición (Hensyl ed., 1990). Los ejemplos de cánceres que

pueden tratarse por los conjugados químicos de la presente invención incluyen cánceres de piel y de cerebro. Estos cánceres se pueden descomponer en otros. Por ejemplo, los cánceres de cerebro incluyen glioblastoma multiforme, astrocitoma anaplásico, astrocitoma, ependioma, oligodendroglioma, meduloblastoma, meningioma, sarcoma, hemangioblastoma y tumor parenquimal pineal. Asimismo, los cánceres de piel incluyen melanoma y sarcoma de Kaposi. Otras enfermedades cancerosas tratables usando los conjugados químicos de la presente invención incluyen papiloma, blastoglioma, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, astrocitoma, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer pancreático, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, leucemia, linfoma, linfoma de Hodgkin y linfoma de Burkitt. Otros, trastornos proliferativos no cancerosos son también tratables usando los conjugados químicos de la presente invención. Dichos trastornos proliferativos no cancerosos incluyen, por ejemplo, estenosis, restenosis, estenosis de la endoprótesis, restenosis del injerto vascular, artritis, artritis reumatoide, retinopatía diabética, angiogénesis, fibrosis pulmonar, cirrosis hepática, aterosclerosis, glomerulonefritis, nefropatía diabética, síndromes de microangiopatía trómbica y rechazo de trasplante.

Como se demuestra en el apartado de Ejemplos que figura a continuación, los conjugados químicos de la presente invención ejercen una actividad antiproliferativa alta y potente sobre una amplia variedad de células de cáncer, incluyendo las células cancerosas MDR.

Como se demuestra además en el apartado de Ejemplos que figura a continuación, los conjugados químicos de la presente invención ejercen además una actividad de quimiosensibilización cuando se usan en combinación con diversos fármacos quimioterapéuticos.

La quimiosensibilización es particularmente útil en los casos en los que el sujeto tiene cáncer MDR tal como leucemia, linfoma, carcinoma o sarcoma. Según la presente invención el agente quimioterapéutico puede ser, por ejemplo, uno de los siguientes: un agente alquilante tal como una mostaza de nitrógeno, una etilenimina y un metilmelamina, un sulfonato de alquilo, una nitrosourea y un triazeno; un antimetabolito tal como un análogo del ácido fólico, un análogo de pirimidina y un análogo de purina; un producto natural tal como un alcaloide de vinca, una epipodofilotoxina, un antibiótico, una enzima, un taxano y un modificador de la respuesta biológica; agentes varios tales como un complejo de coordinación de platino, una antracenediona, una antraciclina, una urea sustituida, un derivado de metilhidrazina o un supresor adrenocortical; o una hormona o un antagonista tal como un adrenocorticosteroide, una progestina, un estrógeno, un antiestrógeno, un andrógeno, un antiandrógeno o un análogo de la hormona de liberación de la gonadotropina. Preferentemente, el agente quimioterapéutico es una mostaza de nitrógeno, una epipodofilotoxina, un antibiótico o un complejo de coordinación de platino. Un agente quimioterapéutico más preferido es cisplatino o vincistina.

Por tanto, la presente invención muestra conjugados químicos novedosos de fármacos antipsicóticos que ejercen una actividad antipsicótica superior, efectos secundarios sustancialmente inferiores y menor toxicidad que los antipsicóticos no conjugados correspondientes. Estos nuevos conjugados ejercen además actividad antiproliferativa y, por lo tanto, se pueden usar beneficiosamente en el tratamiento de trastornos proliferativos como profármacos caracterizados por efectos secundarios reducidos, toxicidad baja y afinidad alta hacia las células cerebrales.

## Ejemplos

A continuación, se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención.

### **Síntesis y análisis químicos**

Los conjugados químicos de la presente invención y los conjugados de referencia se sintetizaron haciendo reaccionar los agentes neurolépticos perfenazina y flufenazina con los ácidos grasos de cadena corta ácido propiónico, ácido butírico y ácido valérico y con ácido 4-fenilbutírico y ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). Los compuestos se prepararon en rendimientos elevados y se aislaron como sólidos cristalinos, solubles en ácido láctico al 1 % acuoso.

**Síntesis de conjugados químicos preparados a partir de perfenazina o flufenazina y un ácido orgánico - procedimiento general:** se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno durante 24 horas una mezcla de un agente neuroléptico perfenazina o flufenazina (1 equivalente), un derivado de cloruro de acilo de un ácido graso de cadena corta (1,1 equivalentes) y, opcionalmente,  $\text{Et}_3\text{N}$  (2 equivalentes) (usados para liberar materiales de partida encontrados en forma de sus sales de HCl) en 5-10 ml de dimetilformamida (DMF). Entonces, se repartió la mezcla entre acetato de etilo y agua. A continuación, se lavó la fase orgánica con  $\text{NaHCO}_3$  al 5 % y salmuera, se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y se evaporó, dando el producto deseado.

**Síntesis de 4-fenilbutirato de perfenazina (AN 130):** se hicieron reaccionar perfenazina y cloruro de 4-fenilbutirilo (el cloruro de acilo de ácido 4-fenilbutírico) como se ha descrito anteriormente. Se purificó el residuo en bruto obtenido mediante cromatografía en gel de sílice, usando una mezcla de metanol:acetato de etilo 1:10 como eluyente. El producto se obtuvo como un aceite amarillo (rendimiento del 78 %).

RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1,94$  (quint,  $J = 6$  Hz, 4 H,  $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ,  $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2$ ),  $2,32$  (t,  $J = 6$  Hz, 2H,  $\text{CO}_2\text{CH}_2$ ),  $2,64$  (m, 12H, seis  $\text{NCH}_2$ ),  $3,93$  (t,  $J = 5,6$  Hz, 2H,  $\text{ArNCH}_2$ ),  $4,17$  (t,  $J = 5,3$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ),  $6,82$ - $7,30$  (m, 12H, Ar, Ph) ppm.

5 RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 23,25$  ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2$ ),  $26,46$  ( $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2$ ),  $33,56$  ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ),  $35,06$  ( $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ),  $45,10$  ( $\text{ArNCH}_2$ ),  $52,23$  (dos  $\text{NCH}_2$ ),  $52,72$  (dos  $\text{NCH}_2$ ),  $55,25$  ( $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ),  $57,04$  ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ),  $61,32$  ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), ( $\text{C}_1$ ,  $\text{C}_{10}$ ),  $122,51$  ( $\text{C}_3$ ),  $123,15$  ( $\text{C}_8$ ),  $123,86$  ( $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_2)_2$ ),  $125,13$  ( $\text{C}_2$ ),  $126,02$  ( $p$ -Ph),  $127,56$  ( $\text{C}_9$ ),  $127,63$  ( $\text{C}_7$ ),  $128,01$  ( $o$ -Ph),  $128,41$  ( $m$ -Ph),  $128,49$  ( $\text{C}_4$ ),  $173,33$  ( $\text{CO}_2$ ) ppm.

EM (Cl,  $i$ -Bu):  $m/z$  (%) = 550 ( $\text{MH}^+$ , 1,7).

10 **Síntesis de butirato de perfenazina (AN 167):** se hicieron reaccionar perfenazina y cloruro de butirilo (el cloruro de acilo de ácido butírico) como se ha descrito anteriormente. El producto se obtuvo como un aceite amarillo (rendimiento del 74 %) y se usó sin purificación adicional.

RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0,93$  (t,  $J = 7,36$  Hz, 3H, Me),  $1,63$  (sext,  $J = 7,44$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Me}$ ),  $1,95$  (quint,  $J = 6,7$  Hz, 2H,  $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2$ ),  $2,27$  (t,  $J = 7,46$  Hz, 2H,  $\text{CO}_2\text{CH}_2$ ),  $2,43$  (m, 10H, cinco  $\text{NCH}_2$ ),  $2,57$  (t,  $J = 5,96$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ),  $3,66$  (t,  $J = 5,96$  Hz, 2H,  $\text{ArNCH}_2$ ),  $4,18$  (t,  $J = 5,9$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ),  $6,66$  (m, 7H, Ar) ppm.

15 RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 13,54$  ( $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ),  $18,29$  ( $\text{MeCH}_2$ ),  $24,06$  ( $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2$ ),  $36,03$  ( $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ),  $45,15$  ( $\text{ArNCH}_2$ ),  $53,09$  (dos  $\text{NCH}_2$ ),  $53,23$  (dos  $\text{NCH}_2$ ),  $55,30$  ( $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ),  $56,51$  ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ),  $61,48$  ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ),  $115,64$  ( $\text{C}_1$ ,  $\text{C}_{10}$ ),  $122,02$  ( $\text{C}_3$ ),  $122,69$  ( $\text{C}_8$ ),  $123,27$  ( $\text{C}_5$ ),  $124,52$  (Ce),  $127,23$  ( $\text{C}_7$ ),  $127,29$  ( $\text{C}_9$ ),  $127,68$  ( $\text{C}_4$ ),  $133,00$  ( $\text{C}_2$ ),  $144,32$  ( $\text{C}_2$ ),  $146,29$  ( $\text{C}_{11}$ ),  $173,37$  ( $\text{CO}_2$ ) ppm.

EM (Cl,  $\text{NH}_3$ ):  $m/z$  (%) = 473 ( $\text{M}^+$ , 100), 474 ( $\text{MH}^+$ , 82,64).

20 **Síntesis de propionato de perfenazina de referencia (AN 177):** se hicieron reaccionar perfenazina y cloruro de propionilo (el cloruro de acilo de ácido propiónico) como se ha descrito anteriormente. El producto se obtuvo como un aceite amarillo (rendimiento del 85 %) y se usó sin purificación adicional.

25 RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1,12$  (t,  $J = 7,53$  Hz, 3H, Me),  $1,95$  (quint,  $J = 6,8$  Hz, 2H,  $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2$ ),  $2,32$  (c,  $J = 7,57$  Hz, 2H,  $\text{CO}_2\text{CH}_2$ ),  $2,51$  (m, 10H, cinco  $\text{NCH}_2$ ),  $2,61$  (t,  $J = 5,95$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ),  $3,89$  (t,  $J = 6,8$  Hz, 2H,  $\text{ArNCH}_2$ ),  $4,16$  (t,  $J = 9,92$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ),  $6,98$  (m, 7H, Ar) ppm.

RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 9,01$  ( $\text{CH}_3$ ),  $24,08$  ( $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2$ ),  $27,44$  ( $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ),  $45,18$  ( $\text{ArNCH}_2$ ),  $53,09$  (dos  $\text{NCH}_2$ ),  $53,26$  (dos  $\text{NCH}_2$ ),  $55,32$  ( $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ),  $56,50$  ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ),  $61,63$  ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ),  $115,67$  ( $\text{C}_1$ ,  $\text{C}_{10}$ ),  $122,05$  ( $\text{C}_3$ ),  $122,72$  ( $\text{C}_8$ ),  $123,30$  ( $\text{C}_5$ ),  $124,56$  ( $\text{C}_6$ ),  $127,26$  ( $\text{C}_7$ ),  $127,33$  ( $\text{C}_9$ ),  $127,71$  ( $\text{C}_4$ ),  $133,03$  ( $\text{C}_2$ ),  $144,35$  ( $\text{C}_{12}$ ),  $146,32$  (Cu),  $174,24$  ( $\text{CO}_2$ ) ppm.

30 EM (Cl,  $\text{NH}_3$ ):  $m/z$  (%) = 459 ( $\text{MH}^+$ , 100), 458 (M, 47,63).

**Síntesis de valerato de perfenazina (AN 178):** se hicieron reaccionar perfenazina y cloruro de valerilo (el cloruro de acilo del ácido valérico) según se describe. Se purificó el residuo en bruto obtenido mediante cromatografía en gel de sílice, usando una mezcla de acetato de etilo:hexano 7:4 como eluyente. El producto se obtuvo como un aceite amarillento (rendimiento del 75 %).

35 RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0,86$  (t,  $J = 7,23$  Hz, 3H, Me),  $1,29$  (sext,  $J = 6,97$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Me}$ ),  $1,56$  (quint,  $J = 7,09$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2$ ),  $1,87$  (quint,  $J = 6,79$  Hz, 2H,  $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2$ ),  $2,26$  (t,  $J = 7,64$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ),  $2,37$  (m, 10H, cinco  $\text{NCH}_2$ ),  $2,54$  (t,  $J = 5,93$  Hz, 2H,  $\text{ArNCH}_2$ ),  $4,14$  (t,  $J = 5,95$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ),  $6,53$ - $7,14$  (m, 7H, Ar) ppm.

40 RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 13,51$  ( $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ),  $22,02$  ( $\text{CH}_2\text{Me}$ ),  $23,89$  ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Me}$ ),  $26,82$  ( $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2$ ),  $33,80$  ( $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ),  $45,07$  ( $\text{ArNCH}_2$ ),  $53,00$  (dos  $\text{NCH}_2$ ),  $53,16$  (dos  $\text{NCH}_2$ ),  $55,09$  ( $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ),  $56,46$  ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ),  $61,42$  ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ),  $111,68$  (c,  $J = 3,77$  Hz,  $\text{C}_1$ ),  $115,73$  ( $\text{C}_{10}$ ),  $118,74$  (c,  $J = 3,77$  Hz,  $\text{C}_3$ ),  $122,85$  ( $\text{C}_8$ ),  $123,77$  ( $\text{C}_6$ ),  $124,02$  (c,  $J = 272$  Hz,  $\text{CF}_3$ ),  $127,20$  ( $\text{C}_7$ ),  $127,29$  ( $\text{C}_9$ ),  $127,42$  ( $\text{C}_4$ ),  $129,34$  (c,  $J = 32$  Hz,  $\text{C}_2$ ),  $129,69$  ( $\text{C}_5$ ),  $144,08$  (Cu),  $145,51$  ( $\text{C}_2$ ),  $173,45$  ( $\text{CO}_2$ ) ppm.

EM (Cl, Cl/ $\text{NH}_3$ ):  $m/z$  (%) = 522 ( $\text{MH}^+$ , 100).

45 **Síntesis de propionato de flufenazina de referencia (AN 179):** se hicieron reaccionar flufenazina y cloruro de propionilo (el cloruro de acilo de ácido propiónico) como se ha descrito anteriormente. El producto se obtuvo como un aceite amarillento (95 % de rendimiento) y se usó sin purificación adicional.

RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1,12$  (t,  $J = 7,55$  Hz, 3H, Me),  $1,91$  (quint,  $J = 7,18$  Hz, 2H,  $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2$ ),  $2,32$  (c,  $J = 7,56$  Hz, 2H,  $\text{CO}_2\text{CH}_2$ ),  $2,45$  (m, 10H, cinco  $\text{NCH}_2$ ),  $2,59$  (t,  $J = 5,92$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ),  $3,93$  (t,  $J = 7,12$  Hz, 2H,  $\text{ArNCH}_2$ ),  $4,17$  (t,  $J = 5,95$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ),  $6,67$ - $7,14$  (m, 7H, Ar).

50 RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,91$  (Me),  $23,87$  ( $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2$ ),  $27,33$  ( $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ),  $45,05$  ( $\text{ArNCH}_2$ ),  $52,98$  (dos  $\text{NCH}_2$ ),  $53,17$  (dos  $\text{NCH}_2$ ),  $55,07$  ( $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ),  $56,42$  ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ),  $61,54$  ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ),  $111,65$  (c,  $J = 3$  Hz,  $\text{C}_1$ ),  $115,71$  ( $\text{C}_{10}$ ),  $118,73$  (c,  $J = 3,77$  Hz,  $\text{C}_3$ ),  $122,84$  ( $\text{C}_8$ ),  $123,73$  ( $\text{C}_6$ ),  $123,99$  (c,  $J = 272$  Hz,  $\text{CF}_3$ ),  $127,18$  ( $\text{C}_7$ ),  $127,27$  ( $\text{C}_9$ ),  $127,41$

(C<sub>4</sub>), 129,30 (c, *J* = 32 Hz, C<sub>2</sub>), 129,65 (C<sub>5</sub>), 144,05 (Cu), 145,48 (C<sub>12</sub>), 174,10 (CO<sub>2</sub>).

EM (Cl, Cl/NH<sub>3</sub>): *m/z* (%) = 494 (MH<sup>+</sup>, 100).

5 **Síntesis de butirato de flufenazina de referencia (AN 180):** se hicieron reaccionar la flufenazina y el cloruro de butirilo como se ha descrito anteriormente. El producto se obtuvo como un aceite amarillento (al 97 % de rendimiento) y se usó sin purificación adicional.

RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ = 0,93 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H, Me), 1,32 (sext, *J* = 7,4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Me), 1,92 (quint, *J* = 7,18 Hz, 2H, ArNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2,27 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2,45 (m, 10H, cinco NCH<sub>2</sub>), 2,58 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3,93 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H, ArNCH<sub>2</sub>), 4,17 (t, *J* = 5,98 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 6,67-7,13 (m, 7H, Ar) ppm.

10 RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): δ = 13,42 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 18,20 (MeCH<sub>2</sub>), 23,85 (ArNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 35,92 (CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>), 45,02 (ArNCH<sub>2</sub>), 52,97 (dos NCH<sub>2</sub>), 53,14 (dos NCH<sub>2</sub>), 55,04 (ArNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 56,43 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 61,39 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 111,62 (c, *J* = 3 Hz, C<sub>1</sub>), 115,68 (C<sub>10</sub>), 118,68 (c, *J* = 3,77 Hz, C<sub>3</sub>), 122,80 (C<sub>8</sub>), 123,70 (C<sub>6</sub>), 123,98 (c, *J* = 272 Hz, CF<sub>3</sub>), 127,15 (C<sub>7</sub>), 127,24 (C<sub>9</sub>), 127,38 (C<sub>4</sub>), 129,27 (c, *J* = 32 Hz, C<sub>2</sub>), 129,62 (C<sub>5</sub>), 144,03 (Cu), 145,46 (C<sub>12</sub>), 173,23 (CO<sub>2</sub>) ppm.

EM (Cl/CH<sub>4</sub>): *m/z* (%) = 507,18 (M<sup>+</sup> 75,3), 508,18 (MH<sup>+</sup>, 57,57), 419,13 (M-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>, 82).

15 **Síntesis de valerato de flufenazina de referencia (AN 181):** se hicieron reaccionar flufenazina y cloruro de valerilo (el cloruro de acilo de ácido valérico) como se describe. El residuo en bruto obtenido se purificó por cromatografía en gel de sílice, usando una mezcla de acetato de etilo:hexano 7:4 como eluyente. El producto se obtuvo como un aceite amarillento (rendimiento del 75 %).

20 RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ = 0,86 (t, *J* = 7,23 Hz, 3H, Me), 1,29 (sext, *J* = 6,97 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Me), 1,56 (quint, *J* = 7,09 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>), 1,87 (quint, *J* = 6,79 Hz, 2H, ArNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2,26 (t, *J* = 7,64 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>), 2,37 (m, 10H, cinco NCH<sub>2</sub>), 2,54 (t, *J* = 5,93 Hz, 2H, ArNCH<sub>2</sub>), 4,14 (t, *J* = 5,95 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 6,53-7,14 (m, 7H, Ar) ppm.

25 RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): δ -13,51 (Me), 22,02 (CH<sub>2</sub>Me), 23,89 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Me), 26,82 (ArNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 33,80 (CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>), 45,07 (ArNCH<sub>2</sub>), 53,00 (dos NCH<sub>2</sub>), 53,16 (dos NCH<sub>2</sub>), 55,09 (ArNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 56,46 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 61,42 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 111,68 (c, *J* = 3,77 Hz, C<sub>1</sub>), 115,73 (C<sub>10</sub>), 118,74 (c, *J* = 3,77 Hz, C<sub>3</sub>), 122,85 (C<sub>8</sub>), 123,77 (C<sub>6</sub>), 124,02 (c, *J* = 272 Hz, CF<sub>3</sub>), 127,20 (C<sub>7</sub>), 127,29 (C<sub>9</sub>), 127,42 (C<sub>4</sub>), 129,34 (c, *J* = 32 Hz, C<sub>2</sub>), 129,69 (C<sub>5</sub>), 144,08 (Cu), 145,51 (C<sub>12</sub>), 173,45 (CO<sub>2</sub>).

EM (Cl, Cl/NH<sub>3</sub>): *m/z* (%) = 522 (MH<sup>+</sup>, 100).

30 **Síntesis de los conjugados químicos preparados a partir de perfenazina o flufenazina y aminoácidos orgánicos - procedimiento general:** se agitó una mezcla de un aminoácido *N*-protegido (1 equivalente) y carbonildiimidazol (CDI) (1,1 equivalentes) en 10 ml de DMF en atmósfera de nitrógeno durante 1 hora. Tras ello, se añadió perfenazina o flufenazina (1 equivalente) y se agitó la mezcla en atmósfera de nitrógeno a 90 °C durante 24 horas. Se evaporó la suspensión resultante y se fraccionó entre acetato de etilo y agua. Se extrajo la fase acuosa dos veces con acetato de etilo y se lavó la capa orgánica combinada tres veces con NaHCO<sub>3</sub>, dos veces con salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó. El producto *N*-protegido se obtuvo como un aceite amarillo.

35 El grupo *N*-protector se retiró del producto de la siguiente manera: a una solución del producto *N*-protegido en acetato de etilo, se añadió gota a gota una solución de HCl 4 N en acetato de etilo. Se agitó la mezcla durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras ello, se evaporó el disolvente y se secó más el residuo bajo un alto vacío. Se cristalizó el producto obtenido, como una sal de triclorhidrato, en una mezcla de metanol/éter, se filtró y se secó.

40 **Síntesis de *N*-boc-4-aminobutirato de perfenazina de referencia:** se hicieron reaccionar perfenazina y *N*-*t*-boc-GABA (ácido 4-aminobutírico protegido por *N*-*t*-boc) como se ha descrito anteriormente. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en gel de sílice, usando una mezcla de acetato de etilo:etanol 20:1 como eluyente. El producto se obtuvo como un aceite amarillento (rendimiento del 63 %).

45 RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,43 (s, 9H, *t*-Bu), 1,82 (quint, *J* = 7,18 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc), 1,90 (quint, *J* = 7,18 Hz, 2H, ArNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2,35 (t, *J* = 8,97 Hz, 2H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2,42 (m, 10H, cinco NCH<sub>2</sub>), 2,60 (t, *J* = 5,98 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3,16 (c, *J* = 6,85 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NHBoc), 3,84 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H, ArNCH<sub>2</sub>), 4,18 (t, *J* = 5,98 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 5,10 (s ancho, 1H, NH), 6,83 (m, 7H, Ar) ppm.

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): δ = 23,92 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc), 24,98 (ArNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28,21 (*t*-Bu), 39,50 (CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>), 45,05 (ArNCH<sub>2</sub>), 52,89 (dos NCH<sub>2</sub>), 53,03 (dos NCH<sub>2</sub>), 55,15 (ArNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 56,34 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 60,13 (CH<sub>2</sub>NHBoc), 61,29 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 78,80 (CMe<sub>3</sub>), 115,60 (C<sub>1</sub>, C<sub>10</sub>), 121,96 (C<sub>3</sub>), 122,65 (C<sub>8</sub>), 123,22 (C<sub>5</sub>), 124,45 (C<sub>6</sub>), 127,21 (C<sub>7</sub>, C<sub>4</sub>), 127,62 (C<sub>9</sub>), 132,93 (C<sub>2</sub>), 144,23 (C<sub>12</sub>), 146,23 (Cu), 155,79 (NCO<sub>2</sub>), 172,92 (CO<sub>2</sub>) ppm.

50 **Síntesis de *N*-boc-4-aminobutirato de flufenazina:** se hicieron reaccionar flufenazina y *N*-*t*-boc-GABA (ácido 4-aminobutírico *N*-*t*-boc-protegido) como se ha descrito anteriormente. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en gel de sílice, usando una mezcla de acetato de etilo:etanol 20:1 como eluyente. El producto se obtuvo como un aceite amarillento (rendimiento del 75 %).

RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1,49 (s, 9H, *t*-Bu), 1,77 (quint,  $J$  = 6,38 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$ ), 1,90 (quint,  $J$  = 6,96 Hz, 2H,  $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2$ ), 2,35 (t,  $J$  = 6,38 Hz, 2H,  $\text{CO}_2\text{CH}_2$ ), 2,45 (m, 10H, cinco  $\text{NCH}_2$ ), 2,58 (t,  $J$  = 5,8 Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3,14 (c,  $J$  = 5,8 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{NHBoc}$ ), 3,94 (t,  $J$  = 6,38 Hz, 2H,  $\text{ArNCH}_2$ ), 4,2 (t,  $J$  = 5,8 Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 4,92 (s ancho, 1H, NH), 6,8-7,2 (m, 7H, Ar) ppm.

5 RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 23,88 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$ ), 25,07 ( $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2$ ), 28,28 (*t*-Bu), 39,60 ( $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ), 45,13 ( $\text{ArNCH}_2$ ), 52,94 (dos  $\text{NCH}_2$ ), 53,04 (dos  $\text{NCH}_2$ ), 55,13 ( $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 56,43 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 60,22 ( $\text{CH}_2\text{NHBoc}$ ), 61,36 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 78,92 ( $\text{CMe}_3$ ), 111,77 (c,  $J$  = 3 Hz, d), 115,82 ( $\text{C}_{10}$ ), 118,85 (c,  $J$  = 3,77 Hz,  $\text{C}_3$ ), 122,97 ( $\text{C}_8$ ), 123,91 (Ce), 124,05 (c,  $J$  = 272 Hz,  $\text{CF}_3$ ), 127,30 ( $\text{C}_7$ ), 127,39 ( $\text{C}_9$ ), 127,52 ( $\text{C}_4$ ), 129,42 (c,  $J$  = 32 Hz,  $\text{C}_2$ ), 129,82 ( $\text{C}_5$ ), 144,12 ( $\text{C}_{11}$ ), 145,58 ( $\text{C}_{12}$ ), 155,82 ( $\text{NCO}_2$ ), 173,01 ( $\text{CO}_2$ ) ppm.

10 **Síntesis de triclóridato de 4-aminobutirato de perfenazina de referencia (AN 168):** se hizo reaccionar *N*-boc-4-aminobutirato de perfenazina, preparado como se ha descrito anteriormente, con HCl como se ha descrito anteriormente. El producto de triclóridato se obtuvo como un aceite semisólido viscoso (rendimiento cuantitativo).

15 RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1,93 (quint,  $J$  = 7,14 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 2,23 (m, 2H,  $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2$ ), 2,61 (t,  $J$  = 7,14 Hz, 2H,  $\text{CO}_2\text{CH}_2$ ), 3,01 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 3,33 (m, 2H,  $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3,48-3,87 (m, 10H, cinco  $\text{NCH}_2$ ), 4,10 (t,  $J$  = 6,4 Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 4,48 (m, 2H,  $\text{ArNCH}_2$ ), 7-7,31 (m, 7H, Ar) ppm.

RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 22,34 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 22,93 ( $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2$ ), 31,11 ( $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ), 39,56 ( $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 44,76 ( $\text{ArNCH}_2$ ), 49,42 (dos  $\text{NCH}_2$ ), 49,61 (dos  $\text{NCH}_2$ ), 55,29 ( $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 56,08 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 58,64 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 116,69 ( $\text{C}_{10}$ ), 117,20 ( $\text{C}_1$ ), 123,49 ( $\text{C}_3$ ), 124,19 ( $\text{C}_8$ ), 125,44 ( $\text{C}_5$ ), 126,42 (Ce), 128,20 ( $\text{C}_7$ ), 128,56 ( $\text{C}_9$ ), 128,80 ( $\text{C}_4$ ), 134,23 ( $\text{C}_2$ ), 144,97 ( $\text{C}_{12}$ ), 147,37 (Cu), 173,04 ( $\text{CO}_2$ ) ppm.

20 EM ( $\text{Cl}/\text{CH}_4$ ):  $m/z$  (%) = 403,09 ( $\text{MH}^+ - \text{C}_4\text{H}_7\text{NO}$ , 100), 489,18 ( $\text{MH}^+$ , 1,7).

**Síntesis de triclóridato de 4-aminobutirato de flufenazina (AN 187):** se hace reaccionar *N*-boc-4-aminobutirato de flufenazina con HCl, como se ha descrito anteriormente. El producto se obtuvo como un sólido blanco (rendimiento del 75 %).

25 RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1,93 (quint,  $J$  = 7,25 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 2,29 (quint,  $J$  = 5,42 Hz, 2H,  $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2$ ), 2,49 (t,  $J$  = 7,14 Hz, 2H,  $\text{CO}_2\text{CH}_2$ ), 2,99 (t,  $J$  = 7,54 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 3,39 (t,  $J$  = 4,87 Hz, 2H,  $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3,40 (t,  $J$  = 5,42 Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 3,4-4,0 (m, 8H, cuatro  $\text{NCH}_2$ ), 3,91 (m, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 4,18 (t,  $J$  = 6,12 Hz, 2H,  $\text{ArNCH}_2$ ), 7,02-7,33 (m, 7H, Ar) ppm.

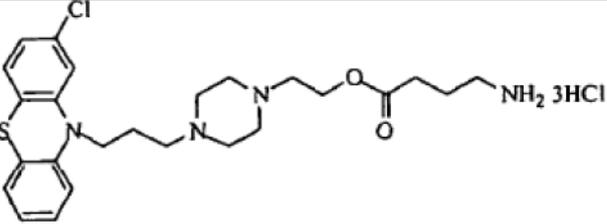
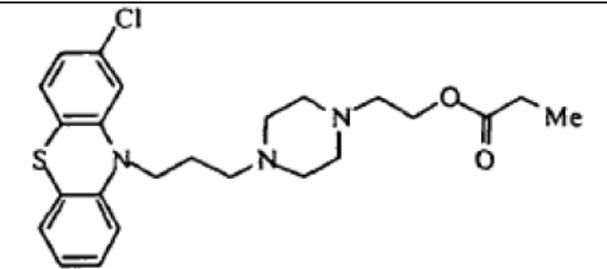
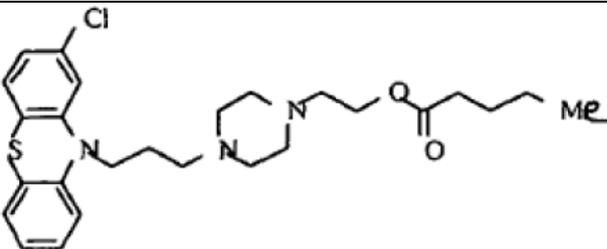
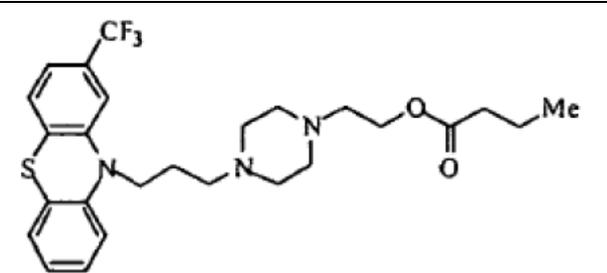
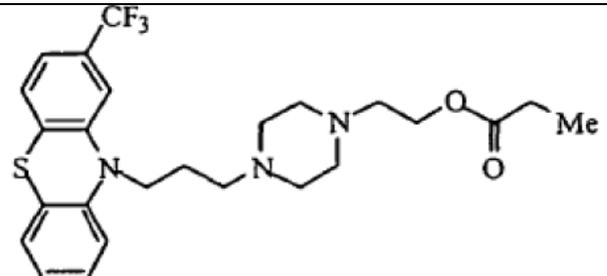
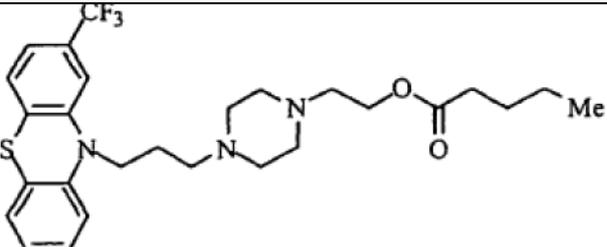
30 RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 22,76 ( $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2$ ), 23,36 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 31,49 ( $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ), 39,96 ( $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 45,21 ( $\text{ArNCH}_2$ ), 49,57 (dos  $\text{NCH}_2$ ), 50,02 (dos  $\text{NCH}_2$ ), 55,72 ( $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 56,48 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 58,99 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 113,41 (c,  $J$  = 3,77 Hz,  $\text{C}_1$ ), 117,80 ( $\text{C}_{10}$ ), 120,70 (c,  $J$  = 3,77 Hz,  $\text{C}_3$ ), 124,89 ( $\text{C}_8$ ), 126,24 ( $\text{C}_6$ ), 125,59 (c,  $J$  = 272 Hz,  $\text{CF}_3$ ), 128,75 ( $\text{C}_7$ ), 128,97 ( $\text{C}_9$ ), 129,25 ( $\text{C}_4$ ), 130,96 (c,  $J$  = 32 Hz,  $\text{C}_2$ ), 132,51 ( $\text{C}_5$ ), 145,12 (Cu), 147,25 ( $\text{C}_{12}$ ), 173,48 ( $\text{CO}_2$ ) ppm.

EM ( $\text{Cl}/\text{CH}_4$ ):  $m/z$  (%) = 523 ( $\text{MH}^+$ , 0,5), 280 ( $\text{M} - \text{C}_{14}\text{H}_9\text{NF}_3\text{S}$ , 100).

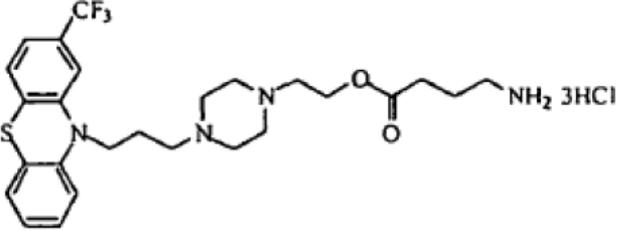
35 La siguiente Tabla 1 presenta los conjugados químicos sintetizados mediante los procedimientos descritos anteriormente en la presente memoria.

AN-130	4-Fenilbutirato de perfenazina $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{ClN}_3\text{O}_2\text{S}$ 550,16	
AN-167	Butirato de perfenazina $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{ClN}_3\text{O}_2\text{S}$ 474,06	

(continuación)

<p>AN-168</p>	<p>Triclorhidrato de 4-aminobutirato de perfenazina C<sub>25</sub>H<sub>33</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S.3HCl 598,46</p>	
<p>AN-177</p>	<p>Propionato de perfenazina C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S 460,03</p>	
<p>AN-178</p>	<p>Valerato de perfenazina C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S 488,09</p>	
<p>AN-180</p>	<p>Butirato de flufenazina C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S 507,61</p>	
<p>AN-179 (NSK-I-52)</p>	<p>Propionato de flufenazina C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S 493,59</p>	
<p>AN-181 (NSK-I-42)</p>	<p>Valerato de flufenazina 521,64 C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S</p>	

(continuación)

AN-187	Triclorhidrato de 4-aminobutirato de flufenazina C <sub>26</sub> H <sub>33</sub> F <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S.3HCl 632,01	
--------	--	--

### Materiales y métodos experimentales

**Líneas celulares:** se usaron en este estudio carcinoma de próstata humano (PC-3), carcinoma de colon humano (HT-29), melanoma murino (B-16) y su subclón resistente a fármacos (B-16 MDR), fibroblastos de ratón (3T3), leucemia mieloide (HL60) y su subclón resistente a fármacos (HL 60 MX2), línea celular de endometrio (MES SA) y su subclón resistente a fármacos (MES DX5), linfoma Jurkat T y leucemia monocítica (U-937).

Los cultivos primarios de fibroblastos de rata se obtuvieron a partir de ratas recién nacidas usando procedimientos conocidos [7].

Las neuronas y las células gliales se prepararon a partir de cerebros de embriones de ratonas ICR preñadas (días 14-15). Se diseccionaron los cerebros y se homogeneizaron en una mezcla de medio L-15 de Leibowitch (Beth Aemek), gentamicina 75 µg/ml y glutamina 0,2 mM. Las células, 300-500 K/pocillo, se sembraron en microplacas de 96 pocillos tratadas con poli-D-lisina. El cultivo neuronal seleccionado se obtuvo añadiendo, 48 horas a partir de entonces, 5-fluorodeoxiuridina (FUDR) y uridina a la mitad de las placas. Los cultivos no tratados incluyeron una mezcla de células neuronales y células gliales. Las células se cultivaron en RPMI o en medio DMEM suplementado con FCS al 10 % (suero bovino fetal) y con glutamina 2 mM, y se incubaron a 37 °C en un incubador de CO<sub>2</sub> humidificado al 5 %.

El cultivo de miocitos de rata se preparó a partir de ratas recién nacidas Wistar de 1-2 días de edad (Harlan). Se usaron treinta ratas recién nacidas obteniendo aproximadamente 25-30 millones de células. Para este fin, se diseccionaron los corazones y se sometieron a disociación tisular enzimáticamente a temperatura ambiente usando RDB™ (una proteasa aislada de extracto de higuera). Se repitió este protocolo cinco veces hasta que las células se dispersaron completamente. Las células dispersas se sembraron previamente en matraces de cultivo de tejidos, 3 x 10<sup>6</sup> /ml en medio DMEM durante 45 minutos y se transfirieron después a una placa de microvaloración revestida de gelatina durante 24 horas para reducir las células no miocíticas. Después, se añadió el agente citotóxico ARO-C al cultivo, eliminando de este modo las células en división y dejando sólo los miocitos que no se dividen en el cultivo. Se incubaron las células durante 4 días y, tras ello, se llevó a cabo un examen microscópico.

**Proliferación de células cancerosas y normales:** la proliferación se midió mediante un ensayo de rojo neutro [8] o un ensayo fluorométrico cuantificando el contenido de ADN [9]. En el ensayo de rojo neutro, el rojo neutro es absorbido por los lisosomas, causando así la coloración de las células vivas. El análisis cuantitativo se realiza mediante un ensayo colorimétrico (lector de ELISA a 550 nm). En el ensayo fluorométrico, se usa azul de alamar como un indicador de rédox. Se midió la fluorescencia del azul de alamar a una longitud de onda de excitación de 544 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm (FLUOstar BMG Lab Technologies, Offenburg, Alemania).

**Apoptosis y fragmentación del ADN:** la fragmentación de los núcleos celulares se estudió mediante un análisis citométrico de flujo de células teñidas con yoduro de propidio. Este análisis se llevó a cabo usando un FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA) equipado con un láser iónico de argón ajustado a una longitud de onda de excitación de 480 nm y con un Módulo de Discriminación de Doblete (DDM). Se usó el programa informático de lisis II (Becton Dickinson) para la adquisición de datos. Los cambios nucleares apoptóticos se evaluaron según los criterios de Nicolletti *et al.* [13].

**Quimiosensibilización:** se midió *in vitro* el efecto quimiosensibilizante de perfenazina y su conjugado químico AN 168. Se administraron conjuntamente diversas concentraciones de perfenazina o de AN 168 de referencia con un agente quimioterapéutico bien a células de glioma de ratas C6 o a células de linfoma T de Jurkat. Se midieron como se ha descrito anteriormente la viabilidad de células y/o la fragmentación del ADN tras el tratamiento bien con el agente quimioterapéutico, perfenazina, con AN 168 de referencia, o con una combinación del agente quimioterapéutico y perfenazina o con una combinación de un agente quimioterapéutico con AN 168 de referencia.

**Animales:** se adquirieron ratas machos adultos jóvenes (150-230 g) en Harlan (Israel). Se dividieron 2-5 animales/jaula y se albergaron en condiciones controladas en el animalario durante una semana antes de los experimentos. Se llevaron a cabo los experimentos con animales no inmunizados, en un procedimiento de doble ciego. En cada experimento se probaron diversos grupos de tratamiento (aproximadamente de 5-10 animales cada uno).

Se adquirieron ratones machos y hembras adultos jóvenes en Harlan (Israel). Los animales se albergaron durante 4-7 días en condiciones controladas antes de la experimentación. Los experimentos se llevaron a cabo en un procedimiento de doble ciego. En cada experimento se probaron diversos grupos de tratamiento (aproximadamente de 10 animales cada uno).

5 **Catalepsia en ratas:** se evaluó la manifestación de los efectos secundarios extrapiramidales inducidos por  
neurolépticos típicos mediante la aparición del comportamiento cataleptico estereotípico en ratas tras el tratamiento  
neuroléptico. La catalepsia se determinó mediante dos procedimientos: (i) midiendo el tiempo necesario que un  
animal que está colgando en la pared de una jaula necesita para mover sus patas traseras y alcanzar una superficie  
10 plana (la prueba de la "pared"); y (ii) colocando las ratas en una superficie plana con sus extremidades anteriores  
inclinadas en una barra plana (5,5 cm de altura) como si estuvieran tocando un piano. La catalepsia se determinó  
por el tiempo que necesitó un animal para descender y alcanzar la superficie plana (la prueba del "piano"). El tiempo  
máximo de seguimiento fue de 2 minutos y estas mediciones se llevaron a cabo cada hora e individualmente para  
cada animal. Estas pruebas proporcionan una evaluación de la actividad bloqueadora de la dopamina central (DA) y  
15 son criterios aceptables para síntomas extrapiramidales inducidos por fármacos antipsicóticos [10]. Se midieron la  
catalepsia inducida total y el curso del tiempo de la misma para la perfenazina, la flufenazina y para los compuestos  
AN 167, AN 168 de referencia, AN 177 de referencia, AN 178, AN 180 de referencia y AN 187 (véase la Tabla 1 más  
adelante) comparando diferentes grupos de compuestos y diferentes afecciones. En general, se inyectaron a los  
animales intraperitonealmente 5 mg/kg del fármaco precursor perfenazina y 7,5 mg/kg de flufenazina y dosis  
20 equimolares de sus conjugados químicos relacionados de la presente invención, disueltos en ácido láctico al 1 %. En  
un conjunto diferente de mediciones, se administraron oralmente a los animales AN 168 de referencia y perfenazina,  
disueltos en ácido láctico al 1 %.

**Catalepsia en ratones:** La aparición de comportamiento cataleptico estereotípico en ratones tras el tratamiento  
neuroléptico se midió en dos conjuntos diferentes de experimentos.

25 En el primer conjunto, se dividieron los machos adultos en grupos y cada grupo se trató bien con perfenazina (1,5  
mg/kg, 9 ratones), una mezcla de perfenazina y una dosis equimolar de GABA (7 ratones), o con una dosis  
equimolar de AN-168 de referencia (8 ratones) o sin tratamiento (grupo control, 6 ratones). La catalepsia se  
determinó usando un sistema de dos jaulas y una barra entre ellas. El ratón se colgó en medio de la barra y se hizo  
un seguimiento del porcentaje de animales que alcanzaban el objetivo en 2 minutos 1 hora, 2 horas y 3 horas  
después del tratamiento.

30 En el segundo conjunto, se dividieron las hembras jóvenes en grupos y cada grupo se trató bien con 2,5 mg/kg de  
perfenazina (6 ratones), con una mezcla de perfenazina y una dosis equimolar de GABA (6 ratones), con una dosis  
equimolar de AN-168 (7 ratones) o sin tratamiento (grupo control, 7 ratones). La catalepsia se determinó usando el  
sistema descrito anteriormente en la presente memoria. Se colgó el ratón en medio de la barra y se midió el tiempo  
que le llevó al animal alcanzar el objetivo.

35 **Secreción de prolactina:** los neurolépticos típicos inducen la hiperprolactinemia, que está frecuentemente asociada  
con la galactorrea y con la disfunción gonadal y sexual [11]. Por lo tanto, se usó la medida del nivel de prolactina en  
plasma circulatorio como un marcador bioquímico sensible para la actividad antipsicótica de los neurolépticos  
conocidos y los conjugados químicos de la presente invención, tras la administración intraperitoneal u oral de los  
mismos. Por tanto, se recogió sangre de la órbita ocular puncionada de ratas anestesiadas con éter y el ensayo se  
40 llevó a cabo usando el kit de ensayo inmunométrico de enzima prolactina de ratas Millenia (DPC, EE.UU.).

**Criterios de comportamiento:** se observó la sedación de los animales tratados por los conjugados químicos de la  
presente invención y se valoró como se describe más adelante (Tabla 2). El grado de sedación y movilidad de los  
animales en los diversos grupos tratados se evaluó usando una puntuación de 0 a 3, de modo que una puntuación  
de 0 representa animales activos y móviles, una puntuación de 1 representa animales tranquilos y móviles, una  
45 puntuación de 2 representa animales tranquilos e inmóviles y una puntuación de 3 representa animales  
completamente atáxicos y en estado de no alerta. El comportamiento de los animales tratados proporcionó una  
estimación de la eficacia neuroléptica de los neurolépticos conocidos probados y de los conjugados químicos, así  
como de la gravedad de los síntomas extrapiramidales inducidos por los mismos.

50 **Toxicidad:** la toxicidad *in vitro* se determinó midiendo el efecto de los compuestos probados (bien los neurolépticos  
conocidos o los conjugados químicos de la invención) sobre cultivos primarios de neuronas y sobre neuronas y  
células gliales del cerebro completo obtenidos de los cerebros de ratones neonatales. También se determinó la  
toxicidad *in vitro* de la perfenazina y su conjugado químico de referencia AN 168 con miocitos de rata. Se evaluó la  
toxicidad aguda *in vivo* determinada mediante la DL<sub>50</sub> en ratones ICR de 2 meses de edad tras la administración de  
una sola dosis de bolo intraperitoneal de fármaco.

## 55 Resultados experimentales

**Actividad de catalepsia inducida y antipsicótica de la perfenazina y de los conjugados químicos que  
contienen la misma:** se midió la actividad de catalepsia inducida y antipsicótica de 5 mg/kg de perfenazina y  
concentraciones equimolares de sus conjugados químicos AN 130, AN 167 y AN 168 (véase Tabla 1 que figura más

adelante) inyectando intraperitonealmente los compuestos, disueltos en ácido láctico al 1 %, a ratas macho Wistar adultas jóvenes (que pesaban 150-200 gramos), divididas 5 por jaula y se determinó mediante el ensayo de la "pared" descrito anteriormente. Se trató un grupo de animales control sólo con el vehículo (ácido láctico). Se hizo un seguimiento de los efectos del tratamiento tanto en catalepsia como en secreción de prolactina durante un período de 2 horas y los resultados se presentan en las Figuras 1a y 1b.

La Figura 1a muestra los datos obtenidos para la catalepsia inducida como la suma de 3 determinaciones que se llevaron a cabo por duplicado a los 0, 60 y 120 minutos del tratamiento. Cada columna representa el promedio de 5 animales. El tiempo total se normalizó con respecto a la perfenazina (por ejemplo, al 100 %). Los datos obtenidos muestran que con el tratamiento de perfenazina y AN 130 se produjo catalepsia, mientras que con AN 167 y AN 168 de referencia no se produjo catalepsia en absoluto.

La Figura 1b muestra los niveles en sangre de prolactina medidos a 0, 60 y 120 minutos del tratamiento y representa la suma de tres determinaciones en cada referencia temporal. El nivel de prolactina en sangre sirve como un marcador bioquímico para la actividad antipsicótica de los compuestos. Los datos obtenidos muestran perfiles similares del nivel de prolactina en sangre en los animales cuando se trataron con perfenazina, referencia AN 130, AN 167 o AN 168 de referencia, que alcanzó el máximo a los 60 minutos y disminuyó a partir de entonces. Los niveles de prolactina en sangre, en cada punto temporal, de los animales tratados con los conjugados químicos AN 130, AN 167 y AN 168 de referencia son similares a los de la perfenazina, indicando que la actividad antipsicótica de los conjugados químicos es similar a la del fármaco precursor. En los animales control, tratados sólo con el vehículo (ácido láctico al 1 %) el nivel de prolactina no varió.

**Estudios de SAR (relación entre la actividad y la estructura):** se realizaron estudios de SAR para la perfenazina y los conjugados químicos que incluyen la misma. Se midió la catalepsia inducida como se ha descrito anteriormente y se determinó mediante la prueba de la "pared". Los resultados se presentan en la Figura 2. Se descubrió que el conjugado de referencia de perfenazina y GABA, AN 168, era el más efectivo, dando como resultado una reducción casi máxima de la catalepsia inducida, seguido por el conjugado AN 178 que contiene valerato, el conjugado AN 177 de referencia que contiene propionato y el conjugado AN 167 que contiene butirato. Este experimento muestra una reducción significativa de la catalepsia inducida tras el tratamiento con los conjugados químicos en comparación con la catalepsia inducida mediante el tratamiento con perfenazina *per se*.

**Catalepsia y comportamiento animal inducidos por perfenazina, flufenazina y conjugados químicos que contienen las mismas:** se analizó la catalepsia total inducida por la perfenazina, la flufenazina y los conjugados químicos que contienen ácido butírico y GABA de las mismas (AN 167, AN 168 de referencia, AN 180 y AN 187, véase la Tabla 1), el curso del tiempo de la catalepsia inducida y el comportamiento animal tras la administración de los mismos. Las mediciones se llevaron a cabo tras inyecciones intraperitoneales de 5 mg/kg de perfenazina, concentraciones equimolares de AN 167 y AN 168 de referencia, 7,5 mg/kg de flufenazina y concentraciones equimolares de AN 180 de referencia y AN 187. La catalepsia se determinó mediante la prueba de la "pared".

La Figura 3a demuestra la catalepsia total inducida por los compuestos probados. Los datos obtenidos son una suma de las determinaciones tomadas a 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240 y 420 minutos tras la administración, con la normalización del tiempo total con respecto a la perfenazina y la flufenazina (= 100 %). Ambos conjugados químicos que contienen ácido butírico, AN 167 y AN 180 de referencia, redujeron la catalepsia significativamente. Los conjugados de perfenazina que contenían GABA, AN 168 de referencia, la suprimieron, mientras que el conjugado de flufenazina que contenía GABA, AN 187, la redujo considerablemente.

La Figura 3b muestra el nivel de prolactina en sangre medido a 0, 60 y 120 minutos después del tratamiento con perfenazina, su conjugado de GABA AN 168, flufenazina y su conjugado de GABA AN 187. Los datos obtenidos muestran perfiles similares del nivel de prolactina en sangre en los animales cuando se tratan con perfenazina, flufenazina o con sus conjugados químicos de GABA, que alcanzaron el máximo a 60 minutos y disminuyeron a partir de entonces. Los niveles de prolactina en sangre, en cada punto temporal, en los animales tratados con AN 168 de referencia y AN 187 fueron similares a los de la perfenazina y la flufenazina, respectivamente.

La Figura 4a demuestra el curso del tiempo de la catalepsia inducida por la perfenazina y los conjugados químicos que contienen la misma, durante un período de 7 horas. La catalepsia inducida por la perfenazina alcanzó su máximo después de 2 horas y disminuyó a partir de entonces. El conjugado que contiene ácido butírico AN 167 indujo una catalepsia reducida en comparación con la perfenazina, mientras que los animales tratados con el conjugado de referencia que contiene GABA AN 168 no tuvieron catalepsia en todo el período de 7 horas del estudio.

La Figura 4b demuestra el curso del tiempo de la catalepsia inducida por la flufenazina y los conjugados químicos que contienen la misma durante un período de 7 horas. Los animales tratados con flufenazina presentaron catalepsia durante las 7 horas medidas, mientras que aquellos tratados con AN 180 de referencia y con AN 187 mostraron una catalepsia inferior. La catalepsia inducida por AN 180 de referencia fluctuó durante el tiempo de medición, mientras que la catalepsia inducida por AN 187 se suprimió al final del período de 7 horas. Ninguno de los animales del estudio tuvo catalepsia después de 24 horas.

5 El efecto de la administración del compuesto probado sobre el comportamiento de los animales se midió evaluando el grado de sedación y movilidad de los animales tras el tratamiento descrito anteriormente, usando una puntuación de 0 a 3. Una puntuación de 0 representa animales activos y móviles, 1 representa animales tranquilos y móviles, 2 representa animales tranquilos e inmóviles y 3 representa animales completamente atáxicos y en estado de no alerta. Las puntuaciones obtenidas se resumen en la Tabla 2 que figura a continuación, y demuestran el efecto reducido de los conjugados químicos sobre el comportamiento de los animales en comparación con el de los fármacos conocidos.

Tabla 2

	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min	240 min
Perfenazina	1	2	2	3	2	2
AN-167	0	1	1	2	2	2
AN-168	0	0	1	1	1	1
Flufenazina	1	2	3	3	2	2
AN-180	1	2	3	2	1	1
AN-187	1	2	2	2	1	1

10 **Catalepsia inducida en ratas por AN 168 de referencia y una mezcla de perfenazina y GABA:** se comparó el efecto de AN 168 de referencia, el conjugado que contiene GABA de perfenazina, sobre la catalepsia inducida en ratas con la catalepsia inducida por una mezcla de sus fármacos precursores -perfenazina y GABA no conjugados. La catalepsia se midió a los 60, 90 y 120 minutos de una inyección intraperitoneal del conjugado o de la mezcla descrita y se determinó mediante la prueba de la "pared".

15 La Figura 5a muestra los datos obtenidos para la catalepsia total inducida por los diversos tratamientos. Los animales del grupo tratado con AN 168 mostraron catalepsia muy baja, mientras que la catalepsia en el grupo tratado con la mezcla de perfenazina y GABA fue alta.

La figura 5b muestra el curso del tiempo de la catalepsia tras ambos tratamientos, y demuestra una catalepsia reducida en los animales tratados con AN 168, que se suprimió después de 120 minutos.

20 **Catalepsia inducida en ratas por AN 167 y AN 168 de referencia:** se analizó la catalepsia total inducida por AN 167 y AN 168 en cuatro experimentos independientes y se comparó con la catalepsia inducida por la perfenazina en las mismas condiciones experimentales.

El promedio de la catalepsia total tras dosis equimolares de AN 167 y AN 168 de referencia, como un porcentaje de la catalepsia inducida por la perfenazina, se muestra en la Figura 6. Aunque AN 167 indujo una catalepsia más baja en comparación con la perfenazina, AN 168 de referencia redujo la catalepsia inducida casi hasta cero.

25 **Catalepsia inducida en ratones por la perfenazina, por una mezcla de perfenazina y GABA y por AN 168 de referencia:** se comparó el efecto de AN 168 de referencia, el conjugado de perfenazina que contiene GABA, sobre la catalepsia inducida en ratones con la catalepsia inducida por la perfenazina sola y por una mezcla de los fármacos precursores: perfenazina no conjugada y GABA. La catalepsia se midió a los 60, 90 y 120 minutos de una inyección intraperitoneal del tratamiento, y se determinó como se ha descrito anteriormente en la presente memoria.

30 La Figura 7a muestra los datos obtenidos para la catalepsia inducida por los diversos tratamientos en términos de porcentaje de animales que alcanzan los objetivos en dos minutos. Los animales del grupo tratado con AN 168 de referencia presentaron una discapacidad sustancialmente más baja, mientras que los animales de los grupos tratados con perfenazina sola y con una mezcla de perfenazina y GABA presentaron una catalepsia más alta.

35 La Figura 7b muestra los datos obtenidos para la catalepsia inducida por los diversos tratamientos, 2 y 3 horas después de los tratamientos anteriores, en términos del tiempo que les lleva a los animales alcanzar el objetivo. Los animales del grupo tratado con AN 168 fueron mucho más rápidos que los animales tratados con perfenazina sola y con una mezcla de perfenazina y GABA.

40 **Catalepsia inducida, comportamiento animal inducido y actividad antipsicótica de la perfenazina y su conjugado de GABA AN 168 de referencia administrados oralmente:** como AN 168 de referencia, se encontró que, actualmente, el conjugado químico de perfenazina y GABA es el conjugado químico más efectivo cuando se administra intraperitonealmente. Se llevaron a cabo experimentos comparativos adicionales con el fin de determinar la eficacia oral de este conjugado químico en comparación con la perfenazina. Con este fin, se midieron la catalepsia inducida, los niveles de prolactina en sangre y el comportamiento animal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, tras administrar bien de AN 168 de referencia o perfenazina sola a ratas. Los animales, divididos

5 por jaula, se trataron mediante la administración oral de perfenazina o de AN-168 disueltos en ácido láctico al 1 %. Los animales control sólo recibieron vehículo (ácido láctico).

La catalepsia inducida por la administración oral de diversas concentraciones de AN 168 de referencia y perfenazina se midió mediante la prueba de la "pared" y la prueba del "piano" descritas anteriormente en la presente memoria. El curso del tiempo de la catalepsia se midió durante 4-24 horas tras la administración oral de 2,5, 5, 10 y 20 mg/kg de perfenazina y dosis equimolares respectivas 3,5, 7, 14 y 28 mg/kg de AN-168 de referencia. La catalepsia total representa la suma de la catalepsia media por grupo tratado durante las 4-24 horas de seguimiento.

La Figura 8a muestra el curso del tiempo de la catalepsia tras los diversos tratamientos medida mediante la prueba del "piano" durante 4-6 horas, y demuestra la reducción constante del comportamiento cataléptico a todas las concentraciones de AN 168 de referencia. El análisis estadístico indicó que la reducción fue más significativa ( $p < 0,05$ ) a la dosis baja e intermedia de AN 168 de referencia (7 y 14 mg/kg) en comparación con sus respectivas dosis equimolares de perfenazina. A dosis más altas del conjugado químico (14 y 28 mg/kg), los síntomas catalépticos detectados fueron sistemáticamente menores que los de la perfenazina, aunque las diferencias fueron menos sustanciales. Se asume, sin embargo, que estas diferencias más pequeñas entre la catalepsia inducida por el fármaco y el conjugado químico a las dosis más altas resultan del procedimiento de valoración. Debido a consideraciones prácticas, la señal cataléptica máxima medida se limitó a 120 segundos. Sin embargo, en realidad, se estima que la señal cataléptica máxima inducida por la perfenazina es más alta que la facilitada por el conjugado químico. Esta estimación está además respaldada por las diferencias superiores y sustanciales entre el AN-168 de referencia y la perfenazina que se observaron, a dosis altas, tanto para la catalepsia determinada mediante la prueba de la "pared" como por la puntuación de sedación, que se describe más adelante. Además, los experimentos realizados mostraron que sólo se observaron rigidez muscular y taquipnea en los animales tratados con las dosis intermedias y altas de perfenazina (10 y 20 mg/kg) y no en los animales tratados con las dosis equimolares respectivas del conjugado químico.

La Figura 8b muestra el curso del tiempo de la catalepsia tras los diversos tratamientos medida mediante la prueba del "piano" durante 4-6 horas en experimentos separados llevados a cabo 3 meses después de los experimentos presentados en la Figura 8a. Los datos obtenidos indican que a dosis altas de AN 168 de referencia (14 y 28 mg/kg), se indujo catalepsia más alta en comparación con los experimentos de procedimiento. La espectrometría de RMN mostró que tuvo lugar una descomposición lenta, debida probablemente a la hidrólisis y, por lo tanto, las propiedades únicas del conjugado químico se vieron afectadas. Estos resultados sugieren que este compuesto se debería almacenar en viales sellados y exponerlo sólo antes de usar. Debería destacarse a este respecto que el conjugado químico análogo de flufenazina, AN 187, no parece ser higroscópico y, por lo tanto, no tiende a descomponerse tras un almacenamiento prolongado.

Las Figuras 9a y 9b muestran la catalepsia total inducida por la administración oral de 5,10 y 20 mg/kg de perfenazina y las dosis equimolares respectivas de 7, 14 y 28 mg/kg de AN-168 de referencia observada durante 4-6 horas. La Figura 9b presenta los datos obtenidos en experimentos llevados a cabo 3 meses después de los experimentos presentados en Figura 9a. Aunque la reducción del comportamiento cataléptico inducida por AN 168 de referencia en comparación con la perfenazina es menos significativa en los datos presentados en la Figura 9b, se demuestra claramente que la catalepsia inducida por AN 168 de referencia es sistemáticamente más baja que la inducida por la perfenazina.

Las Figuras 10a y 10b muestran el perfil de catalepsia (Figura 10a) y la catalepsia total (Figura 10b) medidos mediante la prueba del "piano" durante 24 horas tras los diversos tratamientos. Los datos obtenidos demuestran que el efecto cataléptico máximo tanto de la perfenazina como de AN-168 de referencia se logró a las 5-6 horas del tratamiento y que, 24 horas después del tratamiento, la catalepsia se redujo en todos los grupos de tratamiento. Estos datos están en línea con el curso del tiempo clínico observado para la perfenazina administrada a pacientes (una vez al día).

La Figura 11 muestra la catalepsia total tras los diversos tratamientos medida mediante la prueba de la "pared" y demuestra claramente que los síntomas catalépticos fueron casi suprimidos tras el tratamiento con todas las dosis probadas de AN 168.

El efecto de la administración oral del conjugado químico AN 168 de referencia en el comportamiento animal se midió evaluando el grado de sedación y movilidad animal 4-6 horas después de los tratamientos orales con diversas concentraciones de AN 168 de referencia y perfenazina, usando una puntuación de 0 a 3, como se ha descrito anteriormente en la presente memoria. Las puntuaciones obtenidas se resumen en la Tabla 3 que figura a continuación y demuestran el efecto reducido del conjugado químico en el comportamiento animal en comparación con la perfenazina.

Tabla 3

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Puntuación de sedación
perfenazina	20	3
perfenazina	10	2
perfenazina	5	1
perfenazina	2,5	0
AN 168 de referencia	28	2
AN 168 de referencia	14	1
AN 168 de referencia	7	0
AN 168 de referencia	3,5	0
control		0

Como marcador para la actividad dopaminérgica de los compuestos administrados oralmente, se midieron los niveles de prolactina en sangre 0, 90 y 180 minutos después de los diversos tratamientos descritos anteriormente. Los datos obtenidos se resumen en la Figura 12 y demuestran los perfiles similares del nivel de prolactina en sangre en los animales tratados con perfenazina y AN 168 de referencia. Los niveles de prolactina en sangre, en cada punto temporal, en los animales tratados con AN 168 de referencia fueron similares a los de la perfenazina, a dosis bajas e intermedias, mientras que a una dosis más alta el nivel de prolactina en sangre en los animales tratados con AN 168 de referencia fue mucho mayor en comparación con los animales tratados con perfenazina.

Estos resultados demuestran que AN 168 de referencia es muy eficaz y, por lo tanto, relevante para un uso clínico a dosis bajas (por ejemplo, 3,5 y 7 mg/kg), cuando se administra oralmente. Se muestra además en la presente memoria que a estas dosis bajas, AN 168 de referencia causó síntomas extrapiramidales mínimos y, por lo tanto, prácticamente carece de actividad antagonista en la vía nigroestriada.

**Actividad antiproliferativa:** la actividad antiproliferativa de la perfenazina, los conjugados químicos de la misma AN 167 de referencia, AN 168 y AN 177, la flufenazina, los conjugados químicos de la misma AN 179 de referencia, AN 180 de referencia, AN 181 de referencia y AN 187 y de ácido butírico (BA), ácido 4-fenilbutírico (PBA) y GABA se midió mediante las pruebas de proliferación llevadas a cabo (normalmente, en más de un experimento independiente) con células normales y transformadas. Se subclonaron las células y se añadieron los compuestos probados a las mismas a concentraciones crecientes. Los valores de  $CI_{50}$  se determinaron mediante regresión lineal del porcentaje de supervivencia de las células. Los valores de  $CI_{50}$  obtenidos para los compuestos probados con las diversas líneas celulares probadas se resumen en la Tabla 4 y en la Tabla 5 que figura a continuación.

Tabla 4

Células Fármacos	B16 MDR	B16	HT-29	PC-3	3T3	Fibroblastos de ratas normales
Perfenazina	18,45 ± 5,4 n = 3*	12,5 ± 1,29 n = 4	8,85 ± 2,7 n = 4	23,1 ± 2,3 n = 2	26,6	
BA	8.000 ± 546 n = 3	1.300 ± 113 n = 3	7.170 ± 2.034 n = 4			5540
GABA	> 20.000 n = 3	> 20.000 n = 3	> 20.000 n = 3			> 20.000
AN-167	41,5 ± 1,8 n = 3	17,3 ± 4,5 n = 5	13,3 ± 2,4 n = 4	49,1	21,7	31,64
AN-168	23 ± 16 n = 3	26,8 ± 1,8 n = 3	23,1 ± 9 n = 3	45,5	25	45,8
AN-130	58	36,5 ± 8,1 n = 5	17,27 ± 3,07 n = 5	52,9 ± 28,7 n = 3		41,9 ± 16,8 n = 2
AN-177			25,8		24,6	
AN-178			11,5		18,6	

\* Número de experimentos independientes.

Tabla 5

Células	HL60	HL 60 MX2 (MDR)	MES SA	MES SA DX5 (MDR)	JURKAT	U-937
Fármacos						
Perfenazina	19,76	22,55	15,31	16,24	11,34	21,30
AN167	17,29	19,86	17,23	20,90	11,40	23,28
AN 168	15,14	18,36	18,20	17,16	11,35	14,23
AN177	15,13	17,59				
Flufenazina	20,94	21,77	14,79	13,74	14,30	21,51
AN 179	18,25	21,42				
AN 180	19,00	18,76	11,96	12,74	10,43	12,25
AN 181	14,79	16,69				
AN-187	18,57	17,10	14,37	9,47	10,31	18,86

Estos resultados muestran que aunque GABA, por sí solo, no demuestra una actividad antiproliferativa significativa ( $Cl_{50} > 20$  mM), y BA (intervalo de  $Cl_{50}$  de 1-8 mM) y PBA (intervalo de  $Cl_{50}$  de 2-12 mM, datos no mostrados) mostraron actividad antiproliferativa apreciable pero relativamente baja, sus respectivos conjugados de perfenazina y flufenazina tuvieron una actividad significativamente alta (intervalo de  $Cl_{50}$  de 8-60  $\mu$ M).

Estos resultados demuestran además la actividad antiproliferativa versátil de los conjugados químicos de la presente invención en una amplia variedad de líneas celulares, incluyendo células resistentes a múltiples fármacos (MDR) tales como HL 60 MX2, subclón B16 MDR y MES SA DX5.

La Figura 13 muestra los resultados obtenidos en un experimento representativo en el que se midió el efecto de la perfenazina y los conjugados químicos de la misma sobre la proliferación de células de melanoma B16 murino. Se encontró que AN 167 y AN 168 de referencia eran relativamente activos como fármacos antiproliferativos.

Se midió el efecto citotóxico de la perfenazina, el GABA y los conjugados químicos de los mismos AN 168 de referencia, y se comparó con el efecto citotóxico de los fármacos quimioterapéuticos conocidos cisplatino y vincistina sobre las células de glioma de rata C6. Se subcultivaron las células y se añadieron los compuestos probados a concentraciones crecientes de hasta 100  $\mu$ M. Se determinó la viabilidad de las células tras estos tratamientos (24 horas) mediante el procedimiento de rojo neutro descrito anteriormente, y los resultados se presentan en la Figura 14. Se determinaron los valores de  $Cl_{50}$  de la perfenazina y el AN 168 como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, resultando ser de 19,2  $\mu$ M y 24,2  $\mu$ M, respectivamente.

Como se muestra en la Figura 14, los datos obtenidos demuestran la actividad antiproliferativa superior de los conjugados químicos de la presente invención en comparación con los fármacos quimioterapéuticos conocidos representativos. Las células de glioma C6 se conocen como células MDR, y en efecto, se encontró que la actividad antiproliferativa de los fármacos quimioterapéuticos conocidos es sustancialmente baja. En contraste, se encontró que AN 168 de referencia ejerce una actividad antiproliferativa alta, causando muerte celular sustancial a concentraciones relativamente bajas (aproximadamente 20  $\mu$ M).

La Figura 15 presenta los datos obtenidos tras el tratamiento de células de linfoma T Jurkat con concentraciones crecientes de perfenazina, AN 168 y dexametasona. Los resultados se presentan en términos de viabilidad celular, determinada mediante el procedimiento de azul de alamar, y demuestran el efecto citotóxico superior de AN 168 y la perfenazina, en comparación con la dexametasona. Los valores de  $Cl_{50}$  de la perfenazina y AN 168 fueron 16  $\mu$ M y 19  $\mu$ M, respectivamente.

Se debería destacar además que aunque la perfenazina, la flufenazina y sus conjugados químicos ejercen actividad antiproliferativa aproximadamente en la misma medida, el uso clínico de los conjugados químicos de la presente invención es muy superior al uso clínico de los fármacos neurolépticos, ya que la administración de los conjugados químicos carece casi completamente de efectos secundarios adversos.

**Efecto quimiosensibilizante de la administración conjunta de perfenazina o AN 168 de referencia y fármacos quimioterapéuticos:** se midieron los efectos quimiosensibilizantes de perfenazina 5, 10 y 15  $\mu$ M y dosis equimolares de su conjugado químico de referencia AN 168 producidos por la administración conjunta de estos compuestos con concentraciones variables de fármacos quimioterapéuticos conocidos tales como vincistina, cisplatino y dexametasona. Se compararon la viabilidad celular y/o la fragmentación del ADN, determinadas como se describe en la presente memoria en el apartado de procedimientos, tras estos tratamientos combinados con los resultados obtenidos tras tratamientos con el fármaco quimioterapéutico solo.

La Figura 16 presenta los datos obtenidos tras el tratamiento de 24 horas de línea celular de glioma de rata C6 (células MDR) con vincistina (30  $\mu$ M), perfenazina, AN 168 de referencia y combinaciones de los mismos. Los

resultados demuestran claramente el efecto quimiosensibilizante de AN 168 de referencia que, cuando se administra junto con el fármaco quimioterapéutico, potencia sustancialmente el efecto citotóxico del mismo, incluso a concentraciones bajas de conjugado químico (por ejemplo, de 5  $\mu\text{M}$ ), en comparación con la actividad citotóxica del fármaco cuando se administra solo.

5 La Figura 17 presenta los datos obtenidos tras el tratamiento de la línea celular de glioma de rata C6 (MDR) con cisplatino a diversas concentraciones entre 5  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ , y con una combinación de cisplatino, y 10 y 15  $\mu\text{M}$  de AN 168 de referencia. Los resultados se presentan en términos de viabilidad celular, medida mediante el procedimiento de rojo neutro, y demuestran claramente que mientras que las células eran completamente resistentes al cisplatino a todas las concentraciones probadas, el tratamiento combinado de cisplatino y AN 168 de referencia volvió a las células susceptibles al fármaco quimioterapéutico.

10 La Figura 18 presenta los datos de fragmentación del ADN obtenidos tras el tratamiento de células de glioma C6 de rata con cisplatino (30  $\mu\text{M}$ ), perfenazina (25 y 50  $\mu\text{M}$ ), AN 168 de referencia (25, 50  $\mu\text{M}$ ), una combinación de cisplatino (30  $\mu\text{M}$ ) y AN 168 (50  $\mu\text{M}$ ), comparada con células no tratadas. La fragmentación del ADN se determinó mediante el procedimiento citométrico de flujo de yoduro de propidio descrito anteriormente. Los resultados demuestran que mientras que el cisplatino solo no tiene ningún efecto de fragmentación del ADN, tanto la perfenazina como el AN 168 de referencia indujeron un aumento espectacular de la fragmentación del ADN. Estos resultados sugieren que el efecto quimiosensibilizante de los conjugados químicos de la presente invención se debe a esta actividad de los mismos.

15 **Toxicidad:** se midió la toxicidad *in vitro* de perfenazina, AN 167 y AN 168 de referencia en cultivos primarios de células neuronales y en una mezcla de células neuronales y gliales, obtenida de cerebros de ratones neonatales. Los cultivos celulares se trataron con los compuestos probados durante 24 horas y se determinó su viabilidad a partir de entonces mediante la prueba colorimétrica de rojo neutro. Los valores de  $\text{CI}_{50}$  obtenidos en estas pruebas demuestran que la perfenazina y AN 167 tuvieron toxicidad similar mientras que AN 168 de referencia presentó una toxicidad significativamente más baja hacia células cerebrales normales, como se muestra en la Figura 19. Además, se midió la toxicidad *in vitro* de la perfenazina y AN 168 de referencia en miocitos de ratas cultivados. La Figura 20 presenta la viabilidad celular, determinada según se ha descrito anteriormente en la presente memoria, tras el tratamiento con diversas concentraciones de perfenazina o AN 168. Los datos obtenidos muestran que AN 168 de referencia no causó descenso alguno de la viabilidad celular a todas las concentraciones, mientras que la perfenazina causó una disminución del 20 % de la viabilidad celular a concentraciones altas.

20 Se evaluó la toxicidad *in vivo* de la perfenazina y AN 167 tras la administración intraperitoneal de una dosis individual de los mismos a ratones. Los valores de  $\text{DL}_{50}$ , determinados dos semanas después del tratamiento, fueron 109 mg/kg para la perfenazina y 120 mg/kg para AN 167 de referencia. Además de la toxicidad más baja de AN 167 en comparación con la perfenazina (per), la mortalidad causada por el compuesto conjugado se retrasó, como se muestra en la Figura 21.

25 Los resultados experimentales definidos anteriormente en la presente memoria demuestran la eficacia alta y ventajosa de los nuevos conjugados químicos de la presente invención en ejercer actividad antipsicótica, actividad antiproliferativa y actividad quimiosensibilizadora, con toxicidad minimizada para células normales y efectos secundarios minimizados.

#### Referencias citadas con números

30 (En el texto, se citan otras referencias adicionales)

1. Lloyd K. G., Morselli P. L., Depoortere H., Fournier V., Zivkovic B., Scatton B., C. Broekkamp, Worms P., Bartholini G., "The potential use of GABA agonists in psychiatric disorders: evidence from studies with progabide in animal models and clinical trials". *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1983, 18, 957-66.
2. Capasso A., Biondi A., Palagiano F., Bonina F. P., Montenegro L., de Caprariis P., Pistorio E., Sorrentino L., "Anticonvulsive activity of a new GABA mimetic drug". *Eur. Neuropsychopharmacol.* 1997, 7, 57-63.
3. Toth I., "A novel chemical approach to drug delivery: lipid amino conjugates". *J. Drug Target.* 1994, 2, 217-39.
4. Nordenberg J., Fenig E., Landau M., Weizman R., Weizman A., "Effects of psychotropic drugs on cell proliferation and differentiation". *Biochem. Pharmacol.* 1999 58, 1229-369.
5. a) Prasad K. N., "Butyric acid: A small fatty acid with diverse biological functions". *Life Sci* 1980, 27, 1351-1358. b) Kruh J., "Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture". *Mol. Cell Biochem.* 1982, 42, 65-82.
6. Wolffe A., "Transcriptional control. Sinful repression". *Nature* 1997, 387, 16-17.
7. Shalitin N., Friedman M., Schlesinger H., Barhum Y., Levy M. J., Schaper W., Kessler-Icekson G., "The effect of angiotensin II on myosin heavy chain expression in cultured myocardial cells". *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 1996, 32, 573-8.
8. Kopf-Maier P., Kolon B., "An organoid culture assay (OCA) for determining the drug sensitivity of human tumor". *Int. J. Cancer* 1992, 51, 99-107.
9. Me Cafferty T. A. et al., *In Vitro Cellular Develop. Biol.*, 1988, 24, 247.
10. Worms P., Kan J. P., Wermuth C. G., Biziere K., "Dopamine-like activities of an aminopyridazine derivative",

CM 30366: a behavioural study. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1986, 334, 246-5.

11. a) Pieron C., "Effect of centrally acting drugs on serum prolactin levels in rhesus monkeys". *Neuroendocrinology*, 1978, 27, 136-47; b) Rubin R.T., "Prolactin and schizophrenia in: Psychopharmacology The Third Generation of Progress". Meitzer H.I. (Ed) Nueva York, Raven Press 1987, 803-8.

5 12. a) Yale L. H., Sowinski F. A., Bernstaein J., "Trifluoromethylphenothiazines". US 3.227.708, 4 de enero, 1966; b) Buus J. L. M., Lassen N., "Phenothiazine derivatives, compositions thereof and methods of preparation thereof". US 3.966.930, 29 de junio, 1976.

10 13. Nicolletti I., Migliorato G., Pagliacci M. C., Grimsani F. y Riccardi C., "A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium-iodide staining and flow cytometry". *J. Immunol. Methods*, 139, 271-79 1991.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un conjugado químico que comprende un primer resto químico unido covalentemente a un segundo resto químico, en el que dicho primer resto químico es un residuo de perfenazina y en el que dicho segundo resto químico es un residuo de un ácido orgánico seleccionado del grupo que consiste en ácido butírico, ácido valérico y ácido 4-fenilbutírico, en el que dicho ácido orgánico está unido a dicha perfenazina a través de un enlace de tipo éster entre un grupo carboxílico de dicho ácido orgánico y un grupo hidroxilo de dicha perfenazina.
2. Un conjugado químico que comprende un residuo de flufenazina y un residuo de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) unido covalentemente a dicha flufenazina a través de un enlace de tipo éster entre un grupo carboxílico de dicho GABA y un grupo hidroxilo de la flufenazina.
- 10 3. Una composición farmacéutica que comprende, como un ingrediente activo, el conjugado químico de la reivindicación 1 ó 2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, que está envasada en un material de envasado e identificada en letras impresas, sobre o en dicho material de envasado, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno psicóticos.
- 15 5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, en la que dicha enfermedad o dicho trastorno psicótico se seleccionan del grupo que consiste en esquizofrenia, paranoia, psicosis infantil, enfermedad de Huntington y síndrome de Gilles de la Tourette.
- 20 6. La composición farmacéutica de la reivindicación 3 que comprende el conjugado químico de la reivindicación 1, en la que dicho ácido orgánico se selecciona del grupo que consiste en ácido butírico y ácido 4-fenilbutírico, estando la composición envasada en un material de envasado e identificada con letras impresas en o sobre el material de envasado, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno proliferativos.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 3 que comprende el conjugado químico de la reivindicación 2, estando la composición envasada en un material de envasado e identificada con letras impresas en o sobre el material de envasado, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno proliferativos.
- 25 8. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 6 y 7, en la que dicho trastorno proliferativo es cáncer.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, en la que dicho cáncer es un cáncer resistente a múltiples fármacos.
- 30 10. El conjugado químico de la reivindicación 1 ó 2 identificado para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno psicóticos en un sujeto.
11. El conjugado químico de la reivindicación 10, en el que dicha enfermedad o dicho trastorno psicóticos se seleccionan del grupo que consiste en esquizofrenia, paranoia, psicosis infantil, enfermedad de Huntington y síndrome de Gilles de la Tourette.
- 35 12. El conjugado químico de la reivindicación 1, en el que dicho ácido orgánico se selecciona del grupo que consiste en ácido butírico y ácido 4-fenilbutírico, estando el conjugado identificado para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno proliferativos en un sujeto.
13. El conjugado químico de la reivindicación 2 identificado para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno proliferativos en un sujeto.
- 40 14. El conjugado químico de cualquiera de las reivindicaciones 12 y 13, en el que dicho trastorno proliferativo es cáncer.
15. El conjugado químico de la reivindicación 14, en el que dicho cáncer es un cáncer resistente a múltiples fármacos.

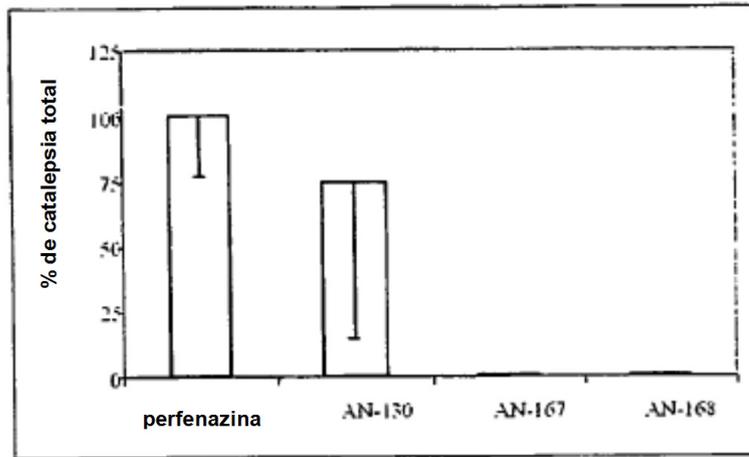


Figura 1a

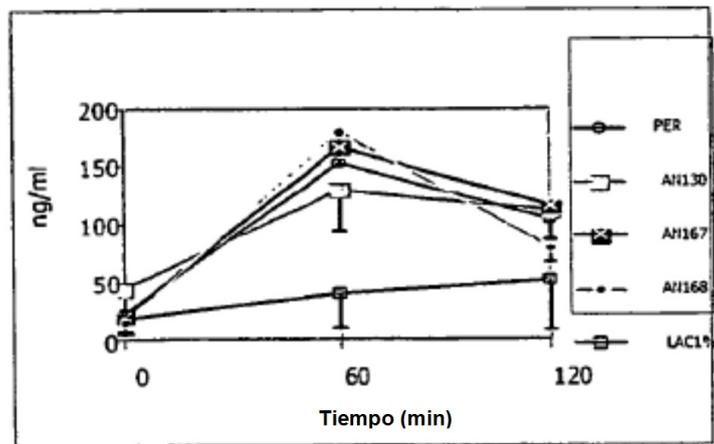


Figura 1b

Figura 2

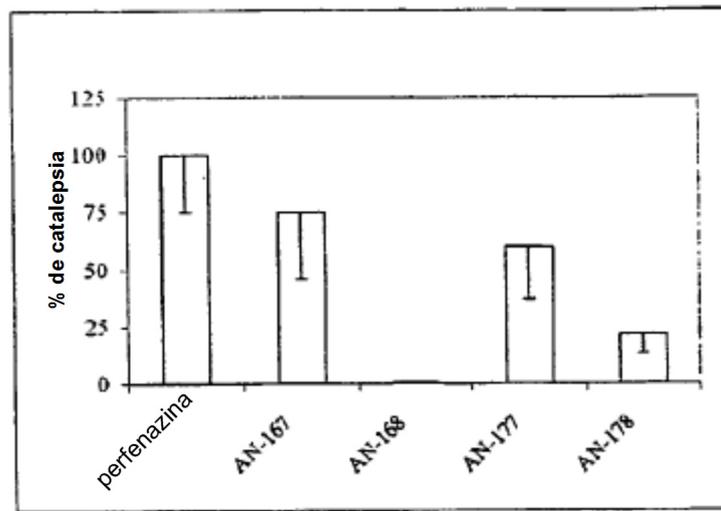


Figura 3a

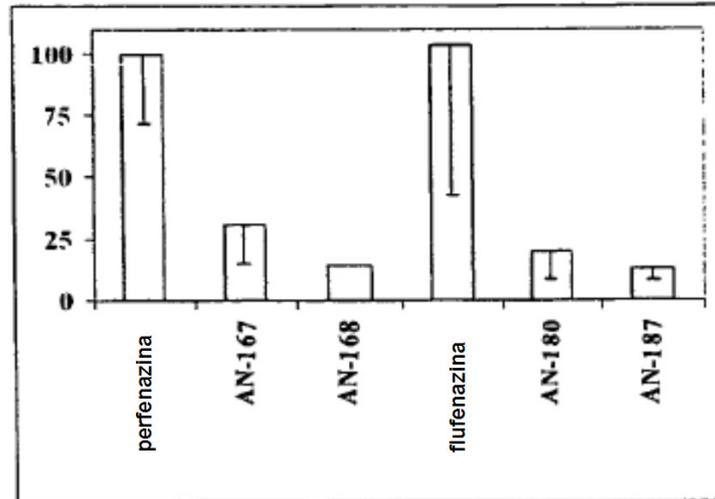


Figura 3b

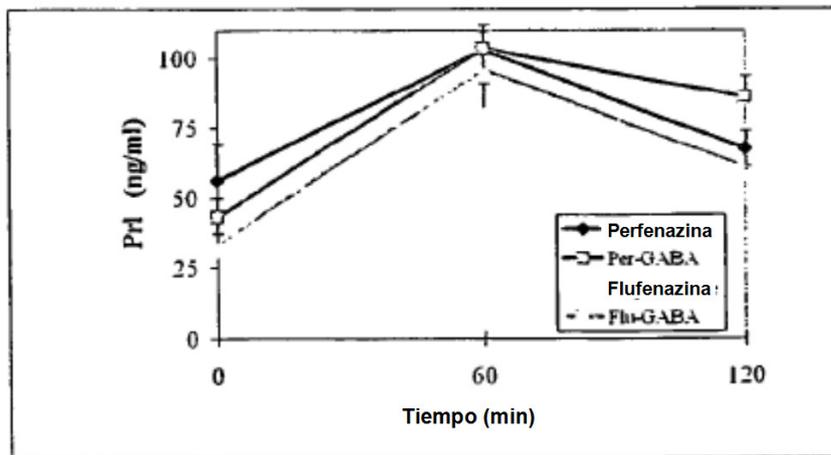


Figura 4a

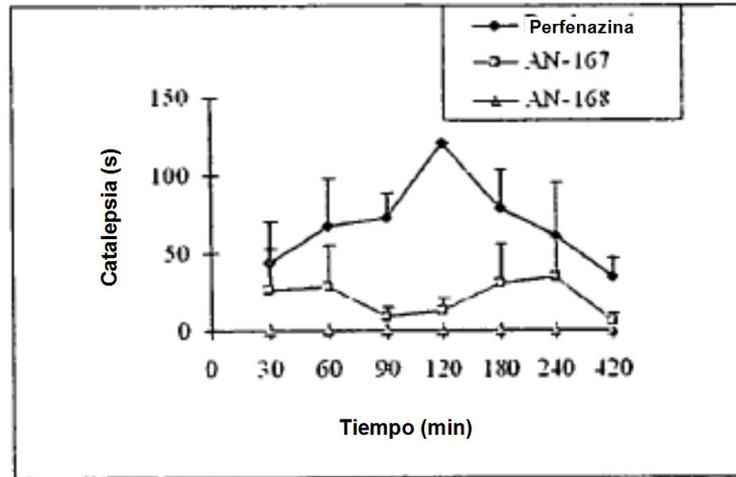


Figura 4b

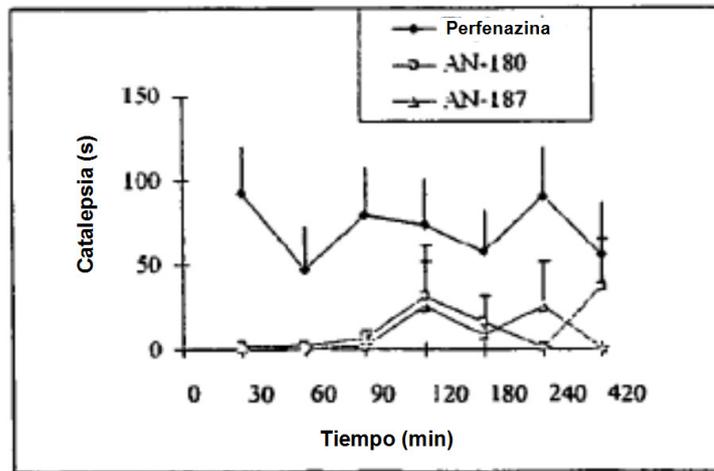


Figura 5a

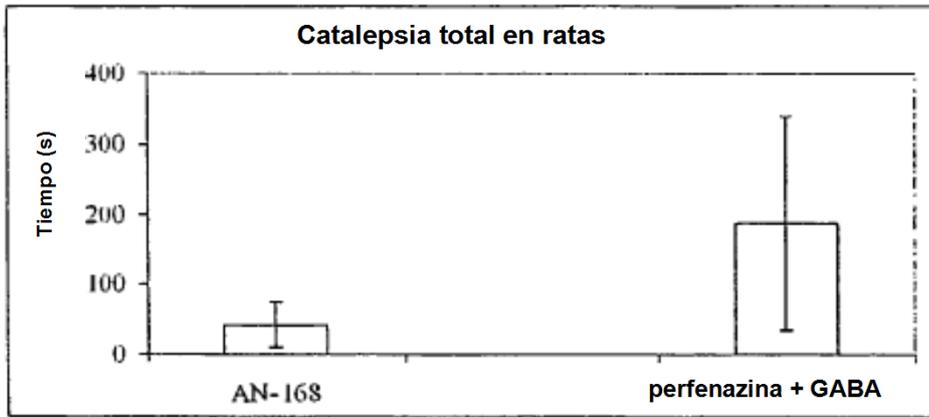


Figura 5b

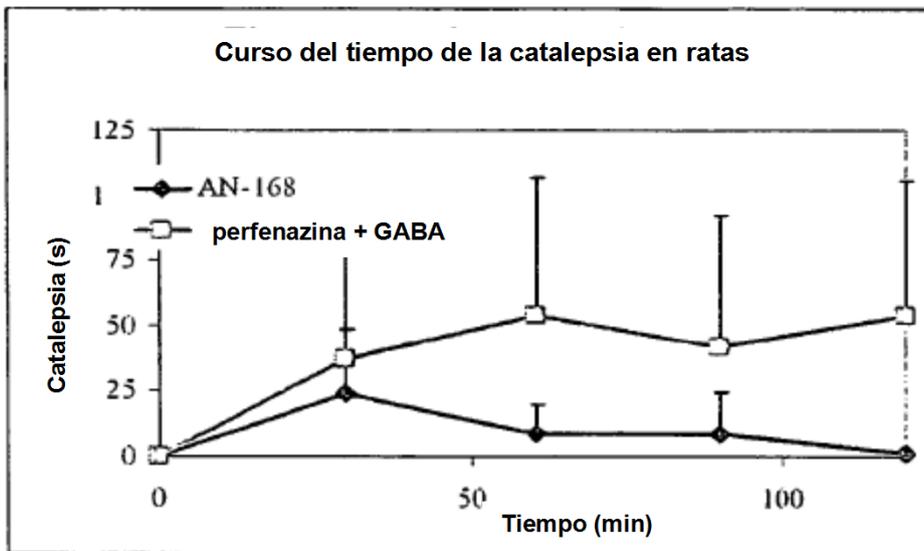


Figura 6

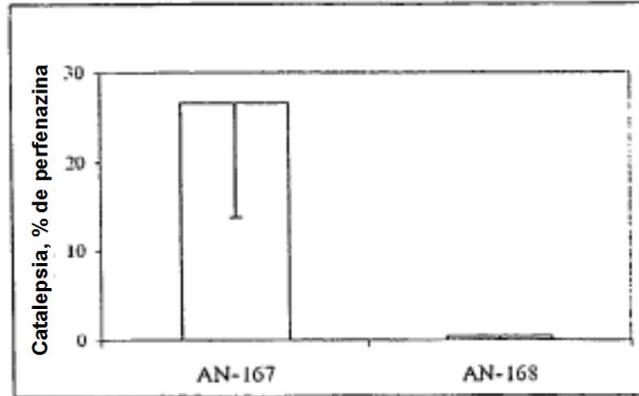


Figura 7a

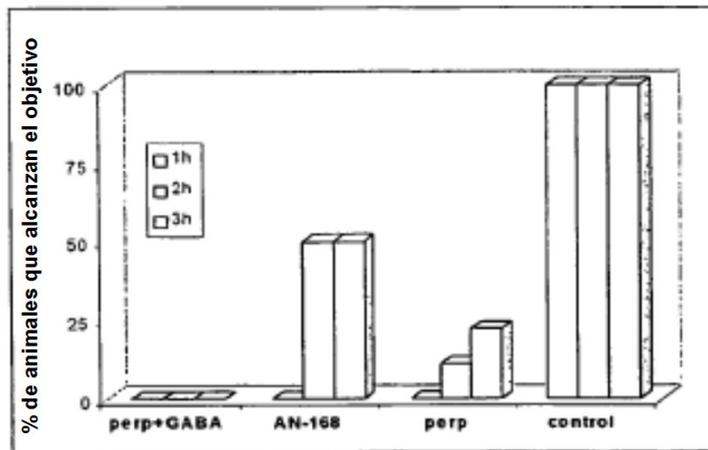
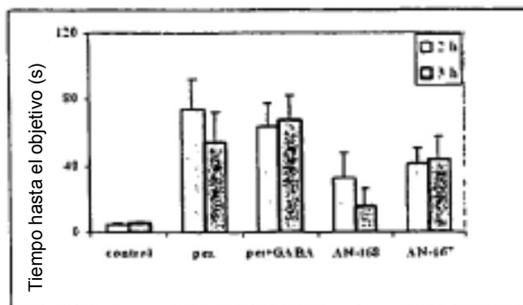


Figura 7b



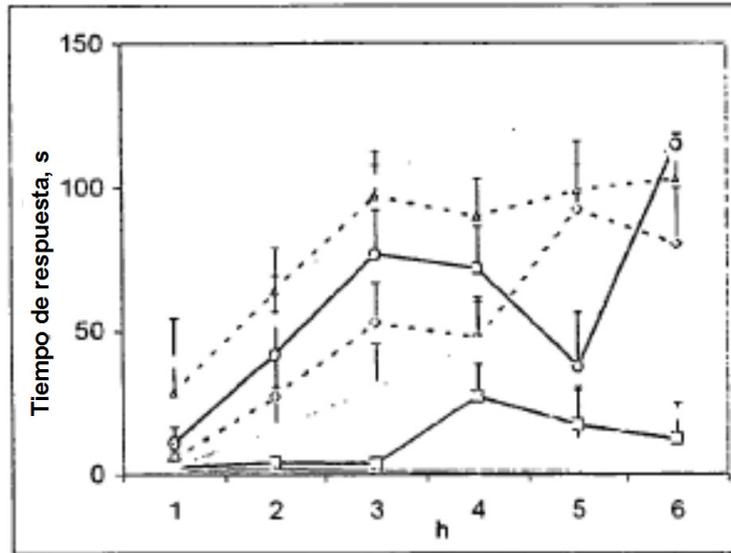


Figura 8a

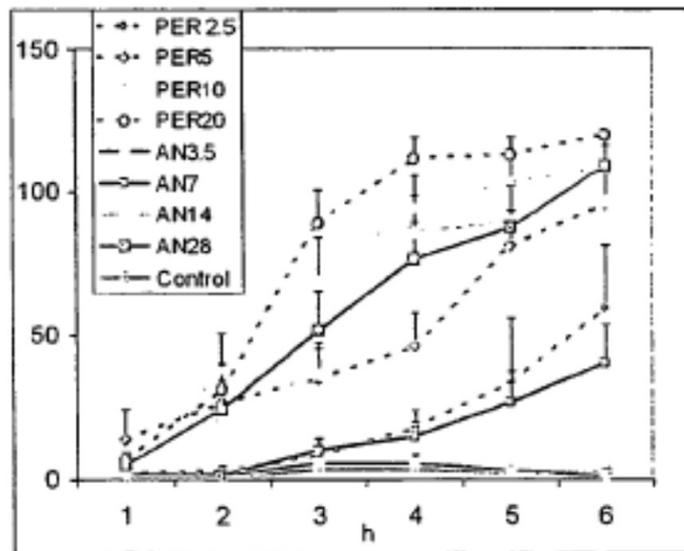


Figura 8b

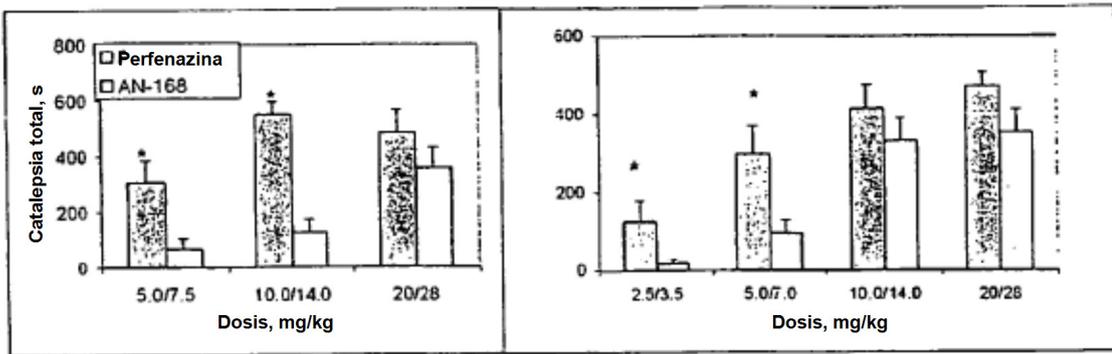


Figura 9a

Figura 9b

Figura 10a

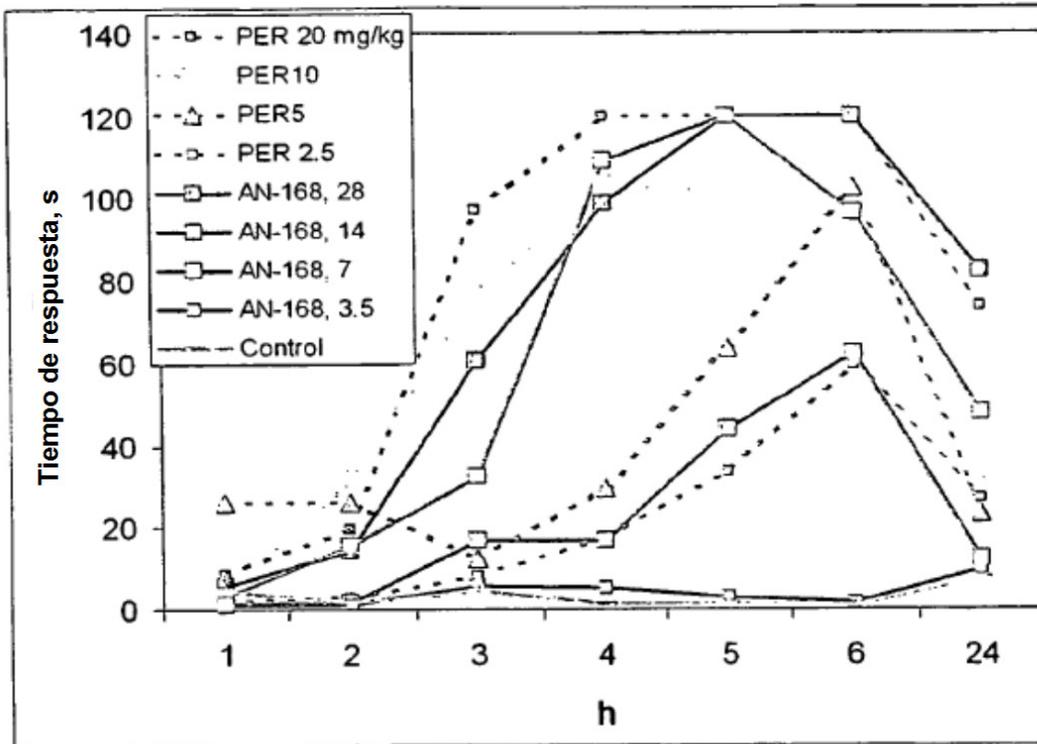


Figura 10b

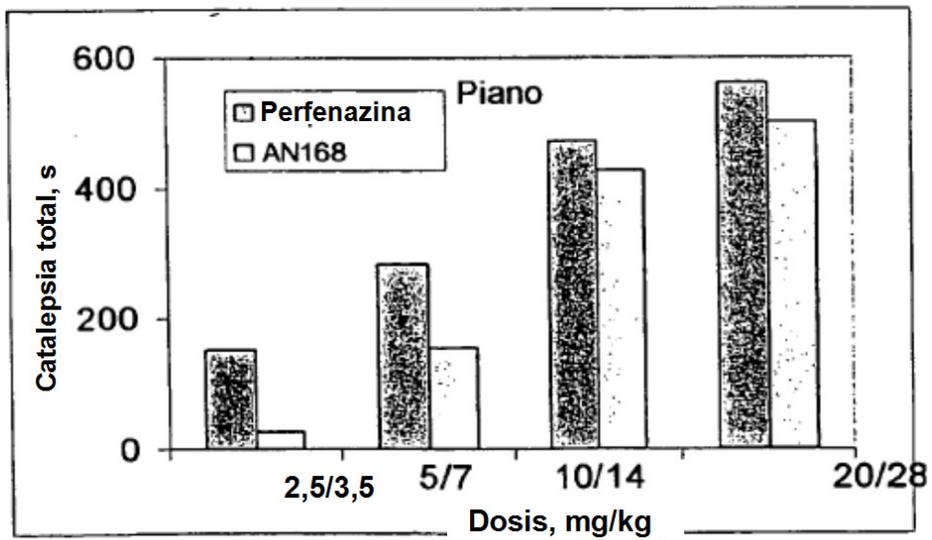


Figura 11

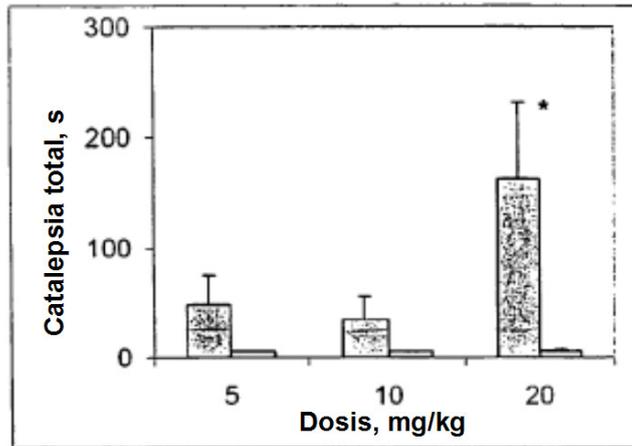


Figura 12

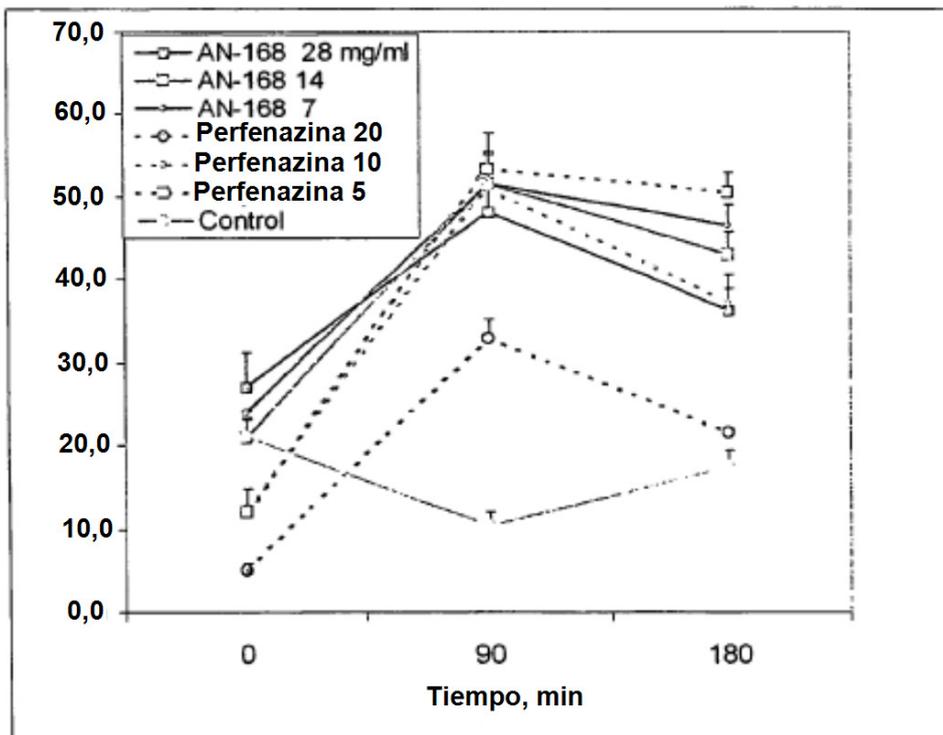


Figura 13

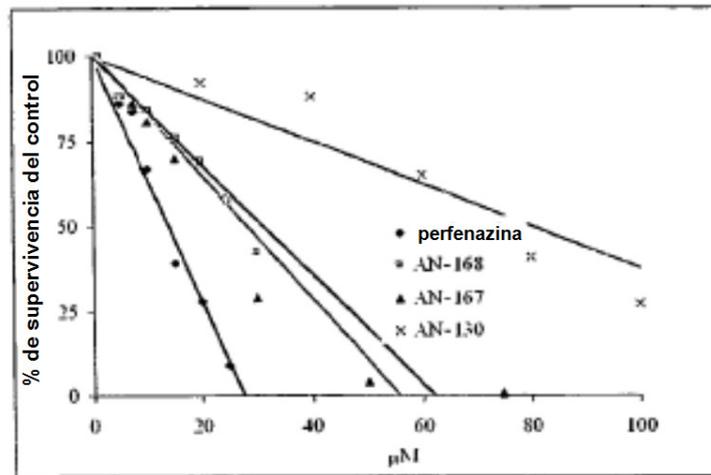


Figura 14

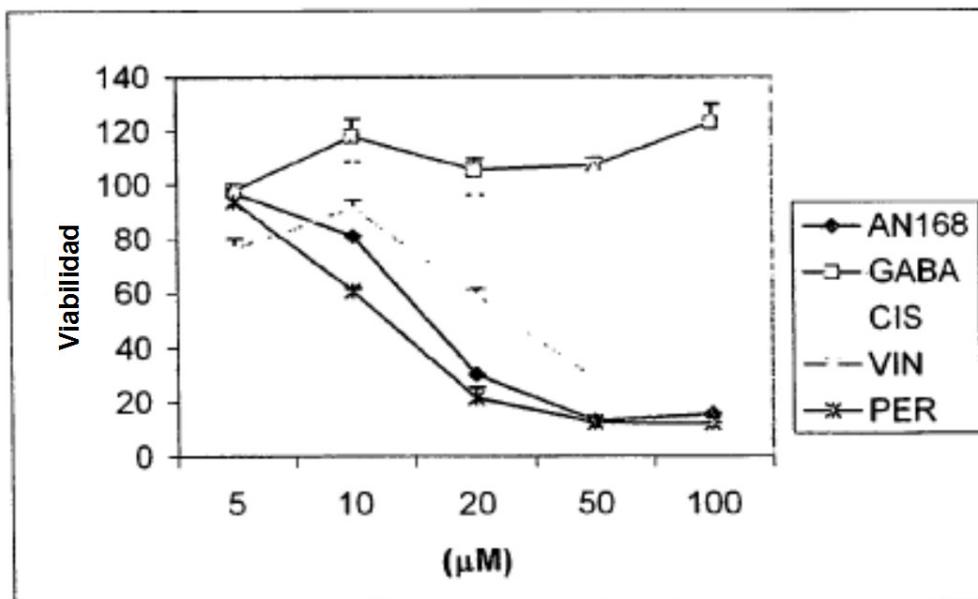


Figura 15

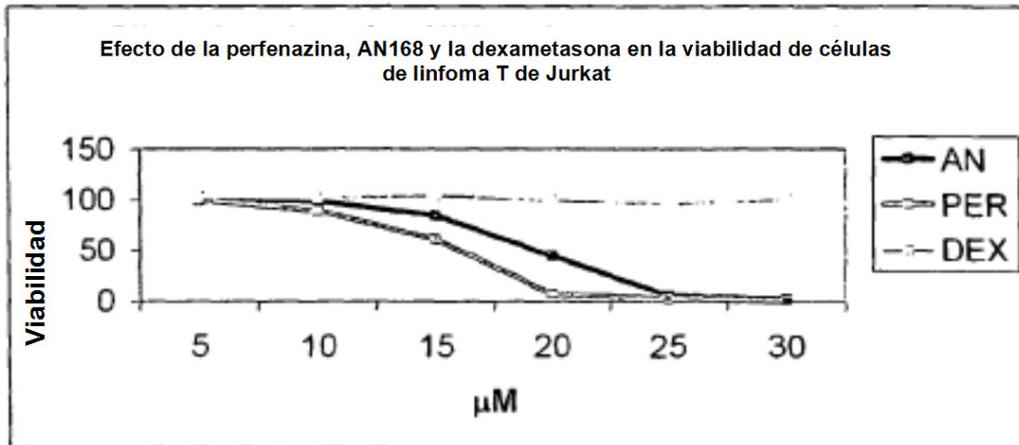


Figura 16

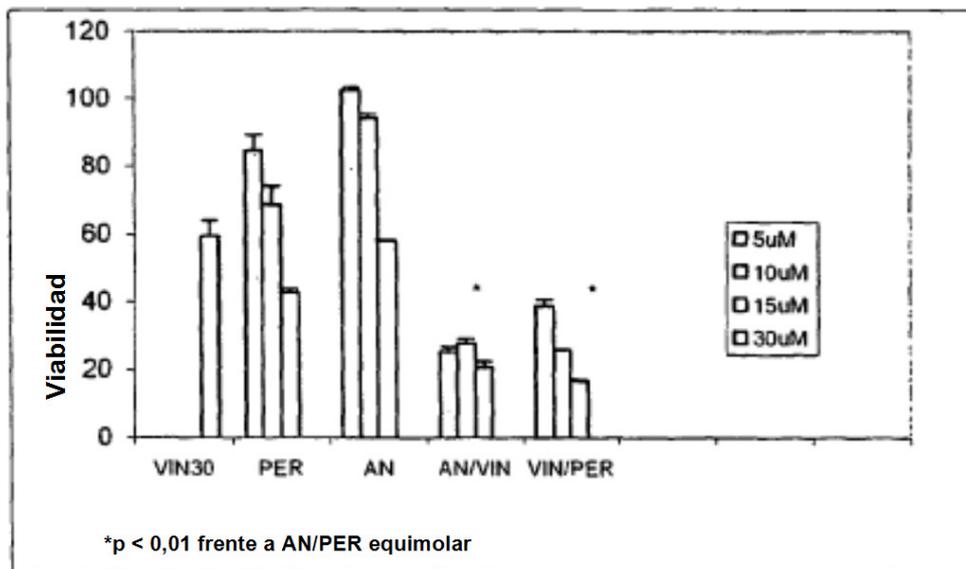


Figura 17

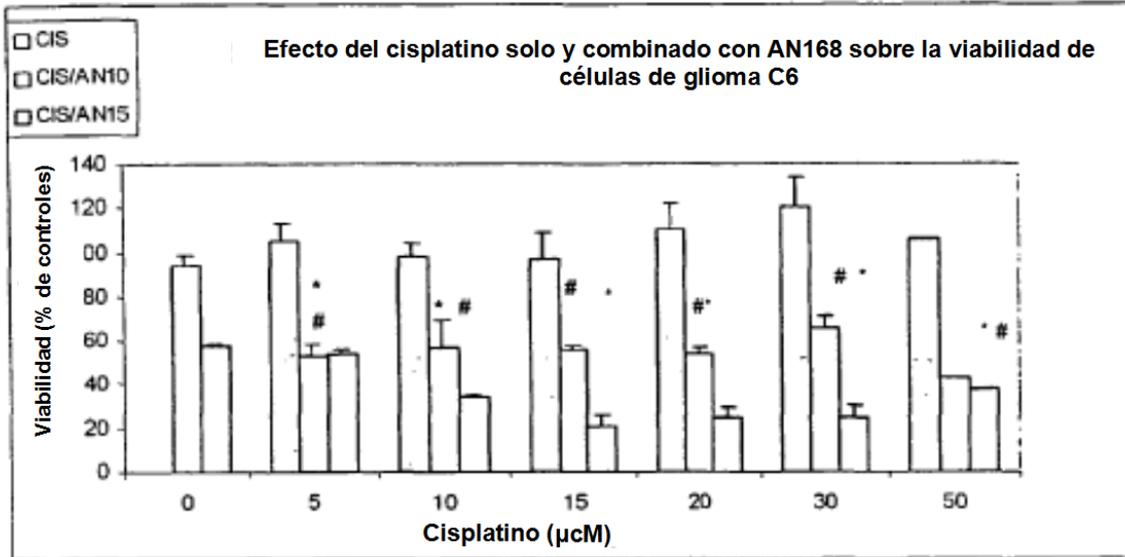


Figura 18

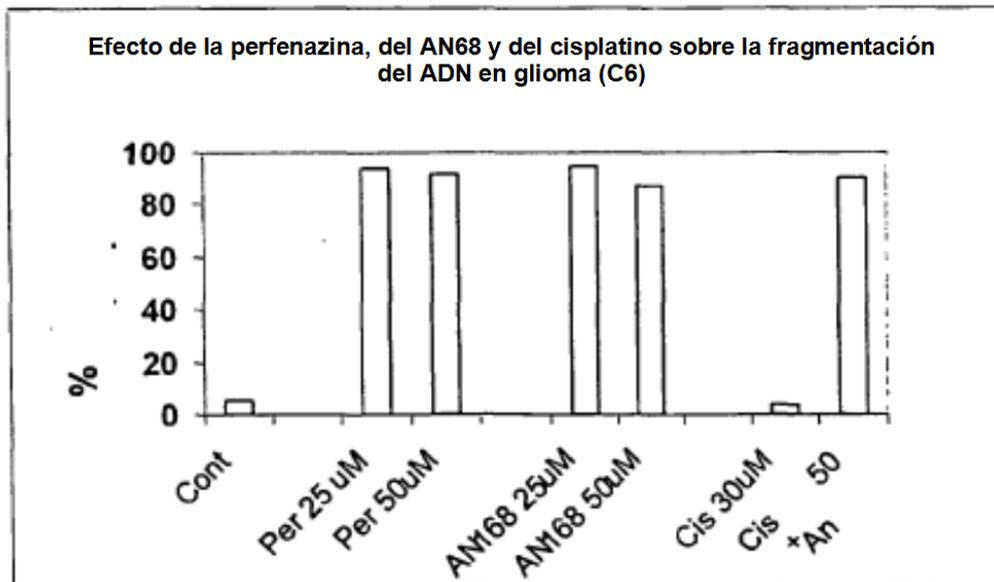


Figura 19

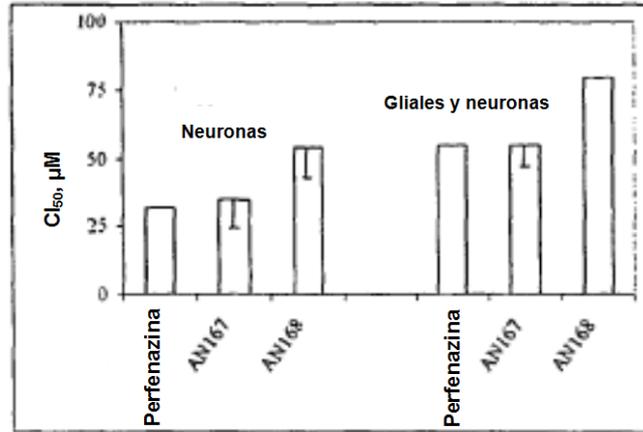


Figura 20

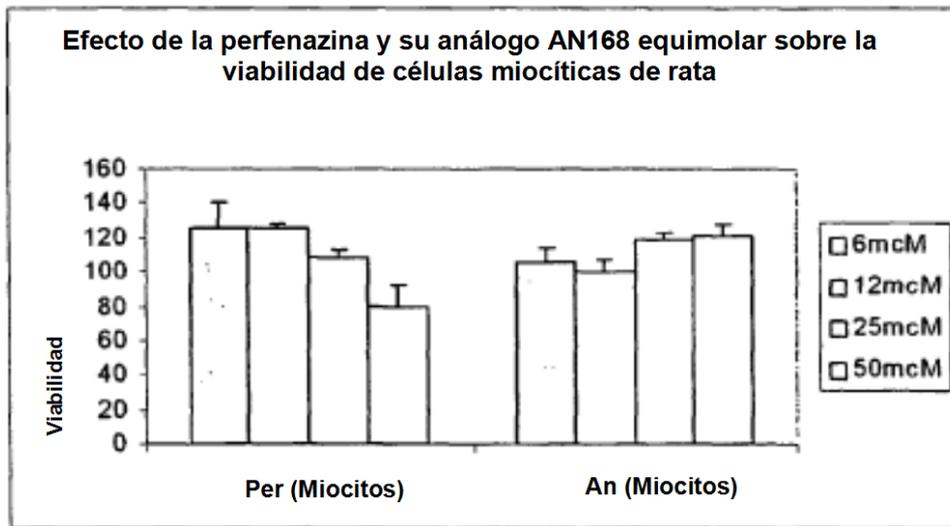


Figura 21

