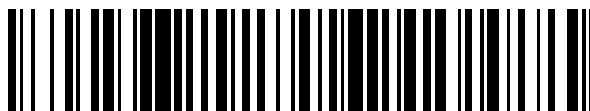


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 263**

51 Int. Cl.:

**C07C 233/25** (2006.01)

**A61P 25/04** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

**A61K 31/167** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2008** **E 08789930 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013** **EP 2188245**

54 Título: **Derivados de paracetamol que liberan óxido nítrico**

30 Prioridad:

**17.08.2007 IN DE17532007**

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

**03.02.2014**

73 Titular/es:

**COUNCIL OF SCIENTIFIC & INDUSTRIAL  
RESEARCH (100.0%)**

**(An Indian registered body Incorporated under  
the, Registration of Societies Act (Act XXI of  
1860)), Anusandhan Bhawan, Rafi Marg  
New Delhi 110 001, IN**

72 Inventor/es:

**BHARDWAJ, TILAK RAJ;  
KUMAR, MANOJ;  
MEHTA, NEERAJ y  
DHINGRA, NEELIMA**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 441 263 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

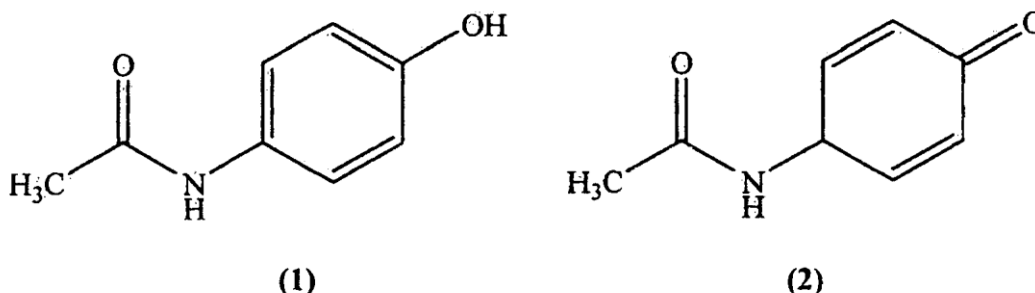
Derivados de paracetamol que liberan óxido nítrico

## CAMPO DE LA INVENCION

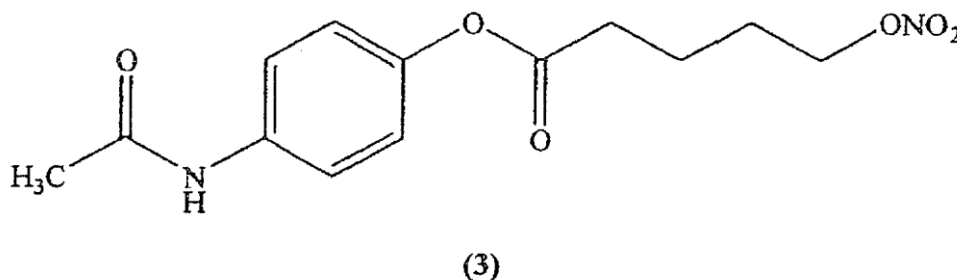
La presente invención se refiere a derivados de paracetamol que liberan óxido nítrico. Especialmente, la presente invención se refiere a nuevos ésteres de nitrato de paracetamol. La presente invención se refiere a un proceso de preparación de ésteres de nitrato de paracetamol. Más en particular, la invención se refiere a derivados de paracetamol que liberan óxido nítrico que muestran mejores actividades analgésicas y antiinflamatorias y disminución de las hepatotoxicidades como resulta aparente de su perfil bioquímico e histológico.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El paracetamol (paracetamol 1) está entre los analgésicos más mayoritariamente utilizados. Este reduce de forma eficaz la fiebre y el dolor de leve a moderado, y se contempla, en general, como un fármaco muy seguro. No obstante, la sobredosis (deliberada) es una causa frecuente de lesión hepática, siendo responsable de ~40% de los casos de insuficiencia hepática aguda en EE. UU. [Wu, C. C. Nitric oxide and inflammation. Curr. Med Chem.- Anti-inflammatory & anti-allergy agents, 2004, 3, 217-222; Joshi, G. P. NCX-701. NicOx. Curr. Opin. Investig. Drugs, 2004, 5, 755-759 y Moore, P. K.; Marshall, M. Nitric oxide releasing paracetamol (nitroparacetamol). Dig. Liver Dis., 2003, 35]. Es un agente analgésico y antipirético eficaz y, a diferencia de otros AINES (**fármacos antiinflamatorios no esteroideos**), se ha publicado que tiene pocos efectos antiinflamatorios [Fiorucci, S.; Antonelli, E.; Mencarelli, A.; Palazzetti, B.; Alvarez-Miller, L.; Muscara, M.; del Soldato, P.; Sanpaolo, L.; Wallace, J. L.; Morelli, A. A NO-releasing derivative of paracetamol spares the liver by acting at several checkpoints in the Fas pathway. Br. J. Pharmacol., 2002, 135, 589-599]. Se metaboliza en el hígado por tres vías: glucuronación, sulfonación (ambas responsables del 95% del metabolismo) o a través del sistema enzimático del citocromo P450 (5%) en el que convierte en un metabolito tóxico (N-acetil-p-benzoquinona imina, 2) que además se convierte en perjudicial a través de una interacción con el antioxidante endógeno glutatión.



Pero la sobreproducción de este metabolito tóxico induce la depleción de las reservas de glutatión en el hígado y la acumulación adicional del metabolito tóxico causa lesiones en el tejido y muerte celular [Futter, L. E.; al-Swayeh, O. A.; Moore, P. K. A comparison of the effect of nitroparacetamol and paracetamol on liver injury. Br. J Pharmacol., 2000, 132, 10-12]. Se han sintetizado numerosos derivados de paracetamol para obtener un fármaco no hepatotóxico seguro. Uno de los principales logros ha sido obtenido por Nocox en Italia. Se ha diseñado NCK-701 (**3**) añadiendo un resto NO al paracetamol, a través de un espaciador alifático para mejorar la actividad antiinflamatoria del paracetamol en base a la actividad bien demostrada del NO sobre la síntesis de citoquinas y la regulación de mediadores proinflamatorios [Wallace, J. L. Paracetamol hepatotoxicity: NO to the rescue. Br. J Pharmacol., 2004, 143, 1-2].



El NO puede modular la excitabilidad de las neuronas espinales y sensoriales a través de múltiple mecanismos que pueden mejorar la actividad antinociceptiva del paracetamol. En los documentos WO 01/12584, WO 02/30866, WO

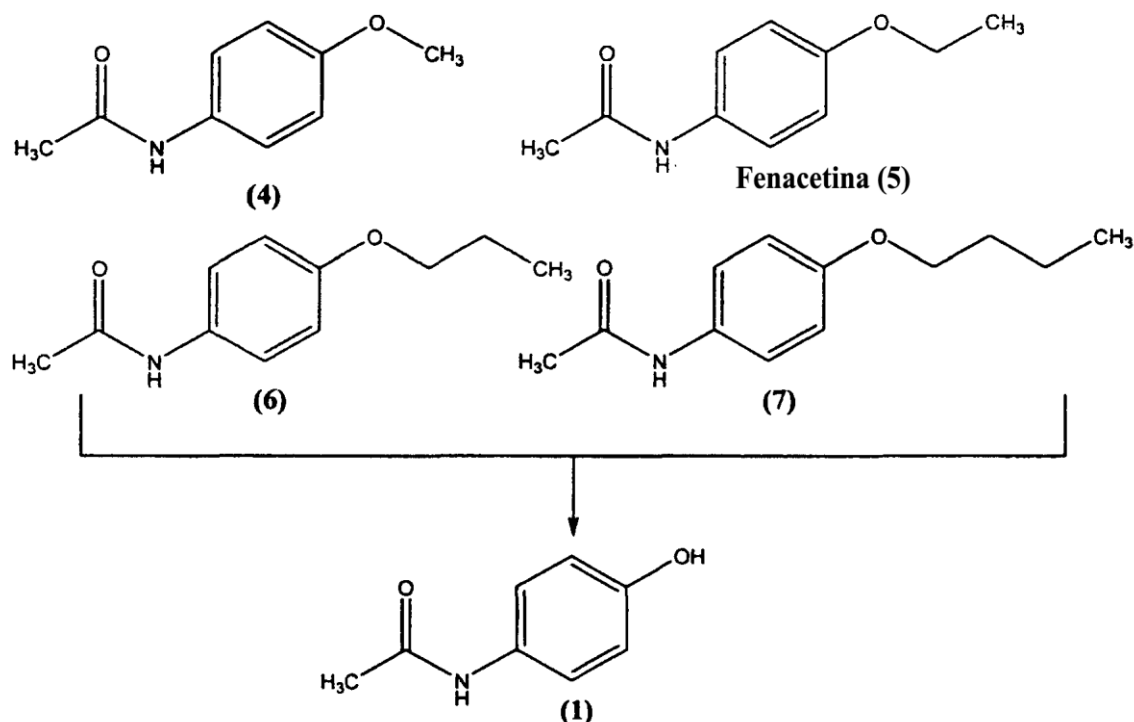
03/084550 y WO 2005/054175 se describen compuestos farmacéuticos con grupos NO o NO<sub>2</sub>. El perfil farmacológico de NCX 701 se ha revisado [Marshall, M.; Moore, P. K. Effect of nitric oxide releasing paracetamol and flurbiprofen on cytokine production in human blood. Eur. J Pharmacol., 2004, 483, 317-322 y al-Swayeh, O. A.; Futter, L. E.; Clifford, R. H.; Moore, P. K. Nitroparacetamol exhibits anti-inflammatory and anti-nociceptive activity. Br. J Pharmacol., 2000, 130, 1453-1456; Romero-Sandoval y col, CNS Drug Reviews Vol. 13, N.º 3, págs. 279-295]. Comparado con los AINES; el paracetamol posee una actividad antiinflamatoria pequeña en humanos y no induce daño de la mucosa gástrica aunque podría causar daño hepático (o incluso intoxicación) cuando se consume a altas dosis. El objetivo de conjugar el paracetamol con NO ha sido, por tanto, mejorar su actividad antiinflamatoria, y también para explotar las propiedades citoprotectoras del NO para reducir el posible daño hepático. Con respecto a la seguridad, varios estudios han destacado el perfil de protección del hígado de NCX 701 en comparación con el paracetamol. Se ha supuesto que el efecto protector beneficioso sobre el hígado está relacionado con el hecho de que el NO puede reducir la síntesis de varias citoquinas proinflamatorias [Wallace, J. L. Paracetamol hepatotoxicity: NO to the rescue. Br. J Pharmacol., 2004, 143, 1-2]. La actividad antiinflamatoria relacionada con la liberación de NO se ha mostrado *in vitro* e *in vivo*, [Marshall, M.; Moore, P. K. Effect of nitric oxide releasing paracetamol and flurbiprofen on cytokine production in human blood. Eur. J Pharmacol., 2004, 483, 317-322.; al-Swayeh, O. A.; Futter, L. E.; Clifford, R. H.; Moore, P. K. Nitroparacetamol exhibits anti-inflammatory and anti-nociceptive activity. Br. J. Pharmacol., 2000, 130, 1453-1456. y Paul Clark, M. J.; Howat, D.; Flower, R. J.; Moore, P. K.; Perretti, M. Nitroparacetamol (NCX-701) exhibits anti-inflammatory activity in the zymosan air pouch. Inflamm. Res., 2001, 50, S158] lo que demuestra que NCX-701 no sólo es un fármaco más seguro que el paracetamol, sino que también posee una acción más extensa debido a mecanismos aditivos. En varios artículos se ha comparado la actividad antinociceptiva de NCX 701 con la del paracetamol [Romero-Sandoval, E. A.; Mazario, J.; Howat, D.; Herrero, J. F. NCX-701 (nitroparacetamol) is an effective antinociceptive agent in rat withdrawal reflexes and wind-up. Br. J Pharmacol., 2002, 135, 1556-1562.; Romero-Sandoval, A. E.; Del Soldato, P.; Herrero, J. F. The effects of sham and full spinalization on the antinociceptive effects of NCX-701 (nitroparacetamol) in monoarthritic rats. Neuropharmacology, 2003, 45, 412-419 y Gaitán, G.; Del Soldato, P.; Herrero, J. F. Low doses of nitroparacetamol or dexketoprofen trometamol enhance fentanyl antinociceptive activity. Eur. J Pharmacol., 2003, 481, 181-188]. mostrando con regularidad la superioridad de NCX-701. Además, las dosis subeficaces de NCX-701 han potenciado la actividad antinociceptiva del agonista del receptor opioide  $\mu$  fentanilo. En un ensayo clínico en fase II se ha demostrado que 1g de NCX-701 proporciona una eficacia analgésica similar a 1 g de paracetamol en el dolor dental postoperatorio, por tanto con una reducción de la exposición a paracetamol, lo que confirma la contribución del NO a los mecanismos antinociceptivos de NCX-701.

Se ha demostrado que la O-dealquilación de una serie de homólogos de alcoxiacetanilidas [p-metoxi, p-etoxi:fenacetina, p-(n)-propoxi y p-(n)-butoxi acetanilidas, 4-7] libera paracetamol.

Los compuesto (6 y 7) estaban estructuralmente relacionados con fenacetina (5) y se sintetizaron para comprobar si liberaban paracetamol (1) tras la O-dealquilación, lo que sí hacían. La longitud de la cadena en los compuestos sintetizados se varió para estudiar el efecto de alargar la cadena sobre la tasa de liberación de paracetamol.

[Chul-Ho, Y., Miller, G.P., Guengerich, F. P. Oxidations of p-Alkoxyacylanilides Catalyzed by Human Cytochrome P450 1A2: Structure-Activity Relationships and Simulation of Rate Constants of Individual Steps in Catalysis Biochemistry 2001, 40, 4521-4530].

Los compuestos (4, 6 y 7) están estructuralmente relacionados con la fenacetina (5) y, por tanto, durante su metabolismo liberarán paracetamol (1).



#### Liberación de paracetamol (1) a partir de alxociacetamidas (4-7)

5 Existía la necesidad de desarrollar nuevas moléculas que tengan una mejor actividad analgésica y antiinflamatoria. La ventaja de la presente invención son que estos compuestos que liberan NO han mostrado una mejor actividad analgésica y antiinflamatoria que el fármaco original y menos hepatotoxicidad en estudios bioquímicos e histopatológicos.

#### 10 OBJETOS DE LA INVENCIÓN

El principal objeto de la presente invención es proporcionar nuevos ésteres de nitrato de paracetamol.

15 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un proceso para la preparación de nuevos ésteres de nitrato de paracetamol.

Aún otro objeto de la presente invención es desarrollar derivados de paracetamol que liberan óxido nítrico que muestren un mejor perfil analgésico, antiinflamatorio, bioquímico (niveles de SGOT y FA) e histopatológico.

20 Un objeto adicional de la presente invención es desarrollar una composición farmacéutica que comprenda derivados de paracetamol que liberan óxido nítrico.

Todavía aún otro objeto de la presente invención es inhibir la enzima COX-2 *in vitro* y liberan NO *in vivo*.

25 Se ha demostrado que el compuesto (13) presenta una mejor actividad de inhibición de COX-2 (*in vitro*), esto es, del 32,5%, que el fármaco original paracetamol (1) que tenía el 24,0%. Los compuestos 12 y 13 también liberan NO *in vivo*.

#### 30 RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a la síntesis de derivados de paracetamol que liberan NO y su evaluación. Los compuestos mostraron un mejor perfil analgésico, antiinflamatorio, bioquímico e histopatológico. La presente invención se refiere especialmente a nuevos ésteres de nitrato de paracetamol. Los ésteres de nitrato de paracetamol se preparan haciendo reacciona el paracetamol con compuestos dihaloalquilo seguido de una reacción con nitrato de plata para obtener los correspondientes derivados del éster de nitrato.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1:** actividad analgésica del paracetamol (1) y los **NO-AINES** (12 y 13). 10 y 11 son solo compuestos intermedios que se convirtieron posteriormente en restos  $-\text{ONO}_2$  durante el tratamiento con  $\text{AgNO}_3$ .

**Figura 2:** porcentaje de aumento de los niveles de SGOT a las 6 horas.

**Figura 3:** porcentaje de aumento de los niveles de FA a las 6 horas

(Explicación para la figura 2 y la figura 3).

La sobreproducción del metabolito tóxico 2 induce la depleción de las reservas de glutatión en el hígado y la acumulación adicional del metabolito tóxico causa lesiones en el tejido y muerte celular. Enzimas como la fosfatasa alcalina (FA), EC 3.1.3.1, la transaminasa glutamato piruvato sérica (SGPT) o alanina aminotransferasa (ALT) (EC 2.6.1.2) y las proteínas totales se consideran marcadores plasmáticos de la lesión hepática. Se evaluó el efecto de los derivados de paracetamol que liberan óxido nítrico (12 y 13) sobre los marcadores de lesión hepática, como las enzimas FA y SGPT/ALT. Se encontró que los niveles en plasma de estas enzimas aumentaban en el caso de hepatotoxicidad. La gráfica indica que la elevación (en comparación con el valor inicial) en el caso de 1 es mucho mayor que en el caso de los derivados que liberan NO (12 y 13), lo que demuestra que estos causan una menor hepatotoxicidad que el fármaco original paracetamol (1).

**Figura 4:** concentración de iones nitrito ( $\mu\text{mol/l}$ ) en el suero después de 6 horas.

La gráfica indica que la concentración de NO en suero 6 horas después de la administración de 12 y 13 era mayor que el control (cloruro sódico al 0,9% p/v que contenía Tween-80 al 20% v/v) lo que confirma que estos compuestos liberan NO *in vivo*.

**Figura 5:** histopatología (tinción con hematoxilina y eosina) de muestras hepáticas.

El análisis mediante microscopía óptica de las muestras hepáticas obtenidas a partir de ratones tratados con el control (cloruro sódico al 0,9% p/v que contenía Tween-80 al 20% v/v), paracetamol (1), (12) y (13), a dosis de 1.000 mg/kg, por vía intraperitoneal se muestra en las secciones (A), (B), (C) y (D), respectivamente. A continuación se resume la interpretación de los resultados obtenidos a partir de estudios histopatológicos:

(i) El control no causaba ningún daño hepático. Solo se observó una leve inflamación de la triada portal.

(ii) El paracetamol (1), agente hepatotóxico comprobado, produjo balonización, descongestión sinusoidal, inflamación de la triada portal y necrosis focal en la zona I.

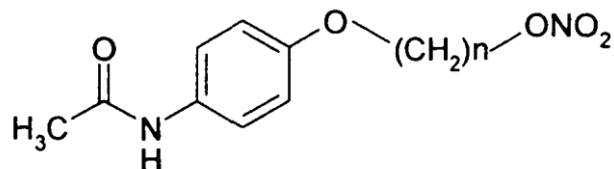
(iii) Sólo se observó una leve balonización en el caso del compuesto 12.

(iv) El compuesto 13 tampoco produjo ningún daño significativo en el hígado.

Estos resultados apoyaban en resumen que la liberación de NO contrarresta los efectos secundarios de hepatotoxicidad del paracetamol (1).

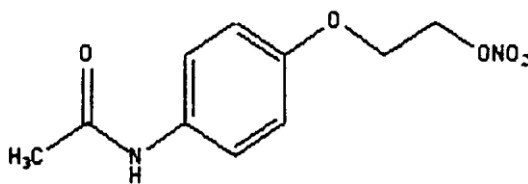
## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Por consiguiente, la presente invención proporciona derivados de éster de nitrato del paracetamol de formula general A, donde el valor de n se selecciona entre 2 y 5.

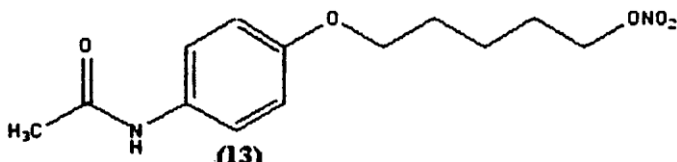


Fórmula A

En una realización de la invención la fórmula estructural A comprende:



(12)



(13)

En una realización de la invención los compuestos representativos de la fórmula general A comprenden:

- (i) *N*-[4-(2-nitrooxi-etoxi)-fenil]-acetamida (12)
- (ii) *N*-[4-(5-nitrooxi-pentoxi)-fenil]-acetamida (13)
- (iii) *N*-[4-(3-nitrooxi-propoxi)-fenil]-acetamida (18)
- (iv) *N*-[4-(4-nitrooxi-butoxi)-fenil]-acetamida (19)

En otra realización de la invención el compuesto de fórmula A tiene mejor actividad analgésica periférica y una actividad antiinflamatoria significativa en comparación con el paracetamol.

Aún en otra realización de la invención los compuestos poseen mejor actividad analgésica y antiinflamatoria y carecen de toxicidad en comparación con el fármaco original paracetamol (1).

Todavía en otra realización de la invención los compuestos 12 y 13 mostraron un aumento del  $32,68 \pm 1,45\%$  y  $31,15 \pm 1,31\%$  a las 2 h y del  $26,44 \pm 0,10\%$  y  $28,45 \pm 1,28\%$  a las 4 h, respectivamente en el volumen de la pata en comparación con el  $38,37 \pm 1,26\%$  y  $58,92 \pm 1,56\%$  (a las 2 h y 4 h, respectivamente) en el caso de paracetamol a una dosis de 100 mg/kg de peso corporal.

En una realización adicional de la invención los compuestos 12 y 13 mostraron un aumento en el nivel de NO sérico del  $354,2 \pm 2,17$  y  $265,4 \pm 2,47$ , respectivamente con respecto al control ( $182,1 \pm 0,68$ ) a dosis de 100 mg/kg de peso corporal.

En una realización de la invención el compuesto 13 mostró una actividad inhibidora de Cox-2 (ovina) *in vitro* del 32,5% en comparación con el 24,0% del control.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un proceso para la preparación de derivados de éster de nitrato del paracetamol que comprende los pasos de:

- a) hacer reaccionar el paracetamol con alcano de dibromo en un solvente orgánico en presencia de carbonato alcalino durante un periodo de hasta 12 horas,
- b) filtrar la mezcla de reacción seguido de evaporación del solvente para obtener un residuo sólido,
- c) disolver el residuo en un solvente no miscible con agua y lavar con una solución de hidróxido sódico seguido de un lavado con agua y evaporación del solvente hasta obtener el derivado O-bromo alquilado de paracetamol.
- d) hacer reaccionar el derivado O-bromoalquilado de paracetamol con nitrato de plata a reflujo en un solvente aprótico hasta 12 horas, filtración adicional y evaporación del filtrado para obtener los ésteres de nitrato derivados de paracetamol de fórmula general A en los que el valor de n se selecciona entre 2-5.

En una realización de la invención el dihalo alcano puede seleccionarse entre el grupo compuesto por 1,2-dibromoetano, 1,3-dibromopropano, 1,4-dibromobutano y 1,5-dibromopentano.

En una realización de la invención el solvente orgánico utilizado puede seleccionarse entre el grupo compuesto por etil metil cetona, acetona, acetonitrilo y mezcla de los mismos.

En una realización de la invención el solvente aprótico utilizado puede seleccionarse entre el grupo compuesto por acetonitrilo, benceno, hexano y mezcla de los mismos.

5 La composición farmacéutica puede prepararse usando los compuestos de fórmula general A junto con los excipientes farmacéuticamente aceptables.

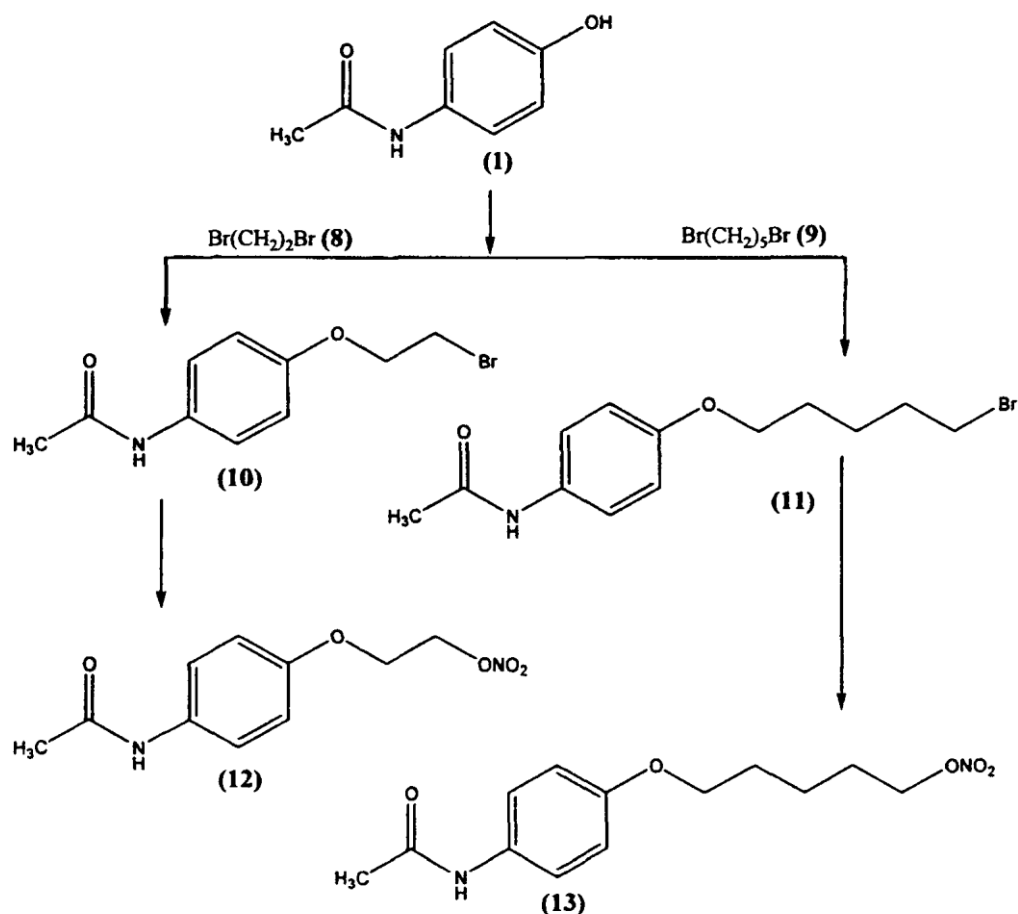
10 Los compuestos 12 y 13 son nuevos y no se ha informado de ellos anteriormente. El compuesto (13) ha mostrado tener una mejor actividad de inhibición de COX-2 (*in vitro*) que el fármaco original paracetamol. Los datos de actividad analgésica y antiinflamatoria complementan y apoyan exactamente esto. Por tanto, puede concluirse que el compuesto que libera NO muestra mejor actividad que el fármaco candidato original y, además, los estudios bioquímicos e histopatológicos realizados indican que el compuesto provoca menos hepatotoxicidad que el paracetamol.

15 Los derivados de paracetamol que liberan NO (12) y (13) mostraron mejor actividad antiinflamatorio en comparación con el fármaco original, a ambos intervalos de 2 y 4 h. No se observó actividad significativa en el caso del paracetamol (1). Los derivados O-alkilados del paracetamol (1) que liberan NO (12-13) mostraron una mejor respuesta que el fármaco original según indicaba un mayor porcentaje de inhibición de los retorcimientos. Los compuestos intermedios 10 y 11, que presentaban un Br terminal (el cual se convertía a continuación en un resto -ONO<sub>2</sub> tras el tratamiento con AgNO<sub>3</sub>) mostraron un porcentaje de inhibición insignificante en los retorcimientos lo que indicaba que la liberación de NO es responsable de la mejor actividad analgésica de los compuestos 12 y 13 (que tienen restos -ONO<sub>2</sub> que liberan NO). En la actividad de liberación de NO también mostraron un aumento significativo del nivel de NO. La liberación de NO de estos compuestos podría ser la fuerza motora que hay detrás de sus mejores actividades analgésica y antiinflamatoria en comparación con las del fármaco original. El compuesto (13) de la invención ha mostrado tener una mejor actividad de inhibición de COX-2 (*in vitro*) que el fármaco original paracetamol. En el caso de los estudios bioquímicos, el paracetamol (1) producía un aumento significativo en los niveles séricos de FA en comparación con los derivados que liberan NO (12 y 13), lo que indicaba su hepatotoxicidad. Se encontró que ambos derivados aumentaban los niveles de FA pero no más que el fármaco. El aumento en los niveles de SGPT (ALT) 6 h después de la administración de paracetamol (1) justificaba su hepatotoxicidad, con un aumento del % en más del 80%. El aumento en el caso de ambos derivados (12 y 13) no era tan significativo. En estudios histopatológicos, el daño provocado por 12 y 13 en el hígado era también menor en comparación con el paracetamol (1). Por tanto, los compuestos 12 y 13 mostraron mejor actividad y menor toxicidad que el fármaco original 1.

35 El paracetamol (1), un agente hepatotóxico comprobado y que no presenta actividad antiinflamatoria por sí mismo, se ha convertido en los compuestos que liberan NO 12 y 13 más activos y menos tóxicos.

40 Se desarrollan derivados de paracetamol que liberan óxido nítrico (**12 y 13**) (**figura 2**), que han mostrado un mejor perfil analgésico, antiinflamatorio, bioquímico (niveles de SGOT y FA) e histopatológico. Además se ha demostrado que estos derivados inhiben COX-2 *in vitro* y liberan NO *in vivo*. El fármaco hepatotóxico paracetamol (1) que carece de actividad antiinflamatoria se ha convertido en derivados menos hepatotóxicos y más activos. Brevemente, el paracetamol se agitó en una solución de 1,2-dibromoetano (**8**) y 1,5-dibromopentano (**9**) en etil metil cetona y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> durante 8-10 horas.

45 La solución resultante se filtró, seco y evaporó hasta obtener un residuo sólido. El residuo se disolvió en CHCl<sub>3</sub> y se lavó con NaOH al 5% (3 x 100 ml) y agua (3 x 100 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y la solución se evaporó para obtener los derivados O-alkilo 10 y 11, respectivamente. Estos se calentaron a reflujo en una solución de AgNO<sub>3</sub> y acetonitrilo durante toda la noche, se filtraron y evaporaron para obtener los ésteres de nitrato 12 y 13, respectivamente.



#### Síntesis de los derivados (12 y 13) de paracetamol (1) que liberan NO.

- 5 Los ejemplos siguientes se proporcionan a modo de ilustración y no se interpretarán como una limitación del alcance de la invención.

#### Ejemplo 1

#### 10 N-[4-(2-bromo-etoxy)-fenil]-acetamida (10)

Una solución de N-(4-hidroxifenil)-acetamida (paracetamol) (1) (1,50g, 0,01 moles) y 1,2-dibromoetano (8) (10,0 ml) en etil metil cetona (25,0 ml) que contenía carbonato de potasio (5,0 g) se agitó durante 8 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró, el residuo se lavó con etil metil cetona y el solvente se evaporó bajo presión reducida para obtener el residuo. El residuo se disolvió en cloroformo (200,0 ml), se lavó con una solución de NaOH al 5% (3 x 100 ml) y con agua (3 x 50 ml), se secó, filtró y cristalizó a partir de metanol para obtener el producto deseado N-[4-(2-bromo-etoxy)-fenil]-acetamida (10) (2,01 g, 78,51 %), pf 126-127°C.

Análisis:

IR (KBr): 3.302, 3.024, 1.662, 1.551, 1.242, 1.029 y 828 cm<sup>-1</sup>  
 20 RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 2,10 (s, 3H, -NHCOCH<sub>3</sub>), 3,65 (t, 2H, J = 5,9 Hz, CH<sub>2</sub>Br), 4,26 (t, 2H, J = 5,9 Hz, -OCH<sub>2</sub>), 6,83 (d, 2H, Ar-H), 7,49 (d, 2H, Ar-H), 9,42 (s, 1H, -NH, intercambiable con D<sub>2</sub>O)  
 RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): δ 23,49 (-NHCOCH<sub>3</sub>), 29,03 (-CH<sub>2</sub>Br-), 67,66 (-OCH<sub>2</sub>-), 114,40 (2 x 2° Ar-C), 121,06 (2 x 2° Ar-C), 132,20 (1 x 3° Ar-C), 153,72 (1 x 3° Ar-C) y 168,26 (-NHCOCH<sub>3</sub>)  
 Calcd. a partir de C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>BrNO<sub>2</sub> : C, 46,53; H, 4,69; N, 5,43. Encontrado: C, 46,77; H, 4,17; N, 5,24.

#### 25 N-[4-(2-nitrooxi-etoxy)-fenil]-acetamida (12)

Una mezcla de N-[4-(2-bromo-etoxy)-fenil]-acetamida (10) (1,30 g, 0,005 moles), nitrato de plata (5,0 g) y acetonitrilo recién destilado (50,0 ml) se calentó a reflujo durante 10 h, se enfrió, se vertió sobre hielo picado y extrajo con cloroformo (3 x 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron, se filtraron y se eliminó el solvente bajo presión reducida para obtener un residuo que se cristalizó a partir de metanol para obtener N-[4-(2-nitrooxi-etoxy)-fenil]-acetamida (12) (0,91 g, 75,83 %), pf 106-107° C.



Anal.

IR (KBr): 3.324, 3.060, 2.920, 1.667, 1.634, 1.522, 1.238, 1.046 y 861  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,15 (s, 3H,  $-\text{NHCOCH}_3$ ), 4,21 (t, 2H,  $J = 4,6$  Hz,  $-\text{OCH}_2-$ ), 4,80 (t, 2H,  $J = 4,6$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{ONO}_2$ ), 6,83 (d, 2H, Ar-H), 7,49 (d, 2H, Ar-H) y 7,43 (s, 1H, -NH, intercambiable con  $\text{D}_2\text{O}$ )

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  24,32 ( $-\text{NHCOCH}_3$ ), 64,46 ( $-\text{CH}_2\text{ONO}_2$ ), 71,09 ( $-\text{OCH}_2-$ ), 115,00 ( $2 \times 2^\circ$  Ar-C), 122,02 ( $2 \times 2^\circ$  Ar-C), 132,03 ( $1 \times 3^\circ$  Ar-C), 154,74 ( $1 \times 3^\circ$  Ar-C) y 168,62 ( $-\text{NHCOCH}_3$ )

Calcd. a partir de  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$ : C, 50,00; H, 5,04; N, 11,66. Encontrado: C, 49,76; H, 4,60; N, 11,19.

## Ejemplo 2

### *N*-[4-(5-bromo-pentoxi)-fenil]-acetamida (11)

Una solución de *N*-(4-hidroxifenil)-acetamida (paracetamol) (1) (1,50g, 0,01 moles) y 1,5-dibromopentano (9) (10,0 ml) en etil metil cetona (25,0 ml) que contenía carbonato de potasio (5,0 g) se agitó durante 8 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró, el residuo se lavó con etil metil cetona y el solvente se evaporó bajo presión reducida para obtener el residuo. El residuo se disolvió en cloroformo (200,0 ml), se lavó con una solución de hidróxido sódico al 5% ( $3 \times 100$  ml) y agua ( $3 \times 50$  ml), se secó, filtró y cristalizó a partir de metanol para obtener el producto deseado *N*-[4-(5-bromo-pentoxi)-fenil]-acetamida (11) (2,15 g, 72,15 %),  $\text{pf } 110-111^\circ\text{C}$ .

Anal.

IR (KBr): 3.303, 3.031, 2.944, 1.660, 1.549, 1.410, 1.239, 1.045 y 735  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,62 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 1,81 (p, 2H,  $J = 7,4$  Hz,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ ), 1,92 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$ ), 2,11 (s, 3H,  $-\text{NHCOCH}_3$ ), 3,43 (t, 2H,  $J = 6,3$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{Br}$ ), 3,92 (t, 2H,  $J = 6,3$  Hz,  $-\text{OCH}_2-$ ), 6,81 (d, 2H, Ar-H), 7,37 (d, 2H, Ar-H) y 9,42 (s, 1H, -NH, intercambiable con  $\text{D}_2\text{O}$ )

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  24,20 ( $-\text{NHCOCH}_3$ ), 24,83 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 28,45 ( $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ ), 32,49 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$ ), 33,68 ( $-\text{CH}_2\text{Br}$ ), 67,87 ( $-\text{OCH}_2-$ ), 114,72 ( $2 \times 2^\circ$  Ar-C), 122,06 ( $2 \times 2^\circ$  Ar-C), 131,05 ( $1 \times 3^\circ$  Ar-C), 155,84 ( $1 \times 3^\circ$  Ar-C) y 168,70 ( $-\text{NHCOCH}_3$ )

Calcd. a partir de  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{BrNO}_2$ : C, 52,01; H, 6,04; N, 4,67. Encontrado: C, 52,67; H, 5,54; N, 4,74.

### *N*-[4-(5-nitrooxi-pentoxi)-fenil]-acetamida (13)

Una mezcla de *N*-[4-(5-bromo-pentoxi)-fenil]-acetamida (11) (1,50 g, 0,005 moles), nitrato de plata (5,0 g) y acetonitrilo recién destilado (50,0 ml) se calentó a reflujo durante 10 h, se enfrió, se vertió sobre hielo picado y extrajo con cloroformo ( $3 \times 100$  ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron, se filtraron y se eliminó el solvente bajo presión reducida para obtener un residuo que se cristalizó a partir de metanol para obtener *N*-[4-(5-nitrooxi-pentoxi)-fenil]-acetamida (13) (1,02 g, 72,34 %),  $\text{pf } 96-98^\circ\text{C}$ .

Anal.

IR (KBr): 3.322, 3.025, 2.951, 1.663, 1.547, 1.236, 1.048, 878 y 739  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,59 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 1,84 (m, 4H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 2,10 (s, 3H,  $-\text{NHCOCH}_3$ ), 3,93 (t, 2H,  $J = 6,6$  Hz,  $-\text{OCH}_2-$ ), 4,49 (t, 2H,  $J = 6,6$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{ONO}_2$ ), 6,80 (d, 2H, Ar-H), 7,45 (d, 2H, Ar-H), 9,10 (s, 1H, -NH, intercambiable con  $\text{D}_2\text{O}$ )

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  22,52 ( $-\text{NHCOCH}_3$ ), 24,36 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 26,64 ( $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ ), 28,83 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{ONO}_2$ ), 67,74 ( $-\text{CH}_2\text{ONO}_2$ ), 73,23 ( $-\text{OCH}_2-$ ), 114,80 ( $2 \times 2^\circ$  Ar-C), 122,01 ( $2 \times 2^\circ$  Ar-C), 131,11 ( $1 \times 3^\circ$  Ar-C), 155,83 ( $1 \times 3^\circ$  Ar-C) y 168,40 ( $-\text{NHCOCH}_3$ )

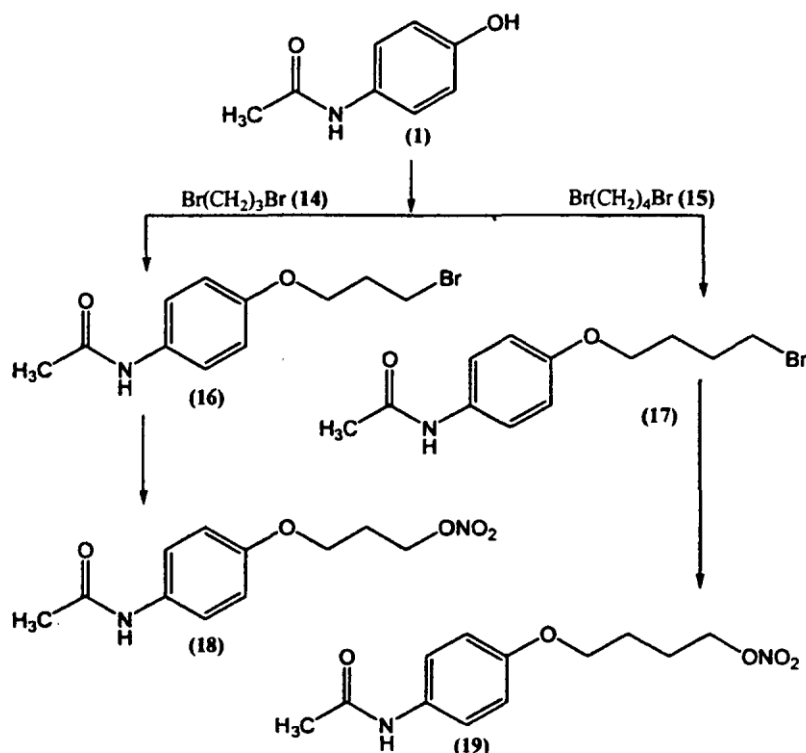
Calcd. a partir de  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5$ : C, 55,31; H, 6,43; N, 9,92. Encontrado: C, 54,89; H, 6,19; N, 9,47.

Los compuestos 10 y 11 son los compuestos intermedios y se sintetizan según las referencias bibliográficas:

(10): A Multi-Mode-Driven Molecular Shuttle: Photochemically and Thermally Reactive Azobenzene Rotaxanes. Murakami, Hiroto; Kawabuchi, Atsushi; Matsumoto, Rika; Ido, Takeshi; Nakashima, Naotoshi. Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Nagasaki University, Nagasaki, Japón. Journal of the American Chemical Society (2005), 127(45), 15891-15899.

(11): Antagonists of slow reacting substance of anaphylaxis. Synthesis of a series of chromone-2-carboxylic acids. Appleton, R. A.; Bantick, J. R.; Chamberlain, T. R.; Hardem, D. N.; Lee, T. B.; Pratt, A. D. Pharm. Div., Fisons Ltd., Loughborough/Leicestershire, Reino Unido. Journal of Medicinal Chemistry (1977), 20(3), 371-9.

A continuación se proporcionan ejemplos de compuestos con cadenas C3 y C4;

**Ejemplo 3:****5 N-[4-(3-bromo-propoxi)-fenil]-acetamida (16)**

Una solución de *N*-(4-hidroxifenil)-acetamida (paracetamol) (1) (1,50 g) y 1,3-dibromobutano (14) (10,0 ml) en etil metil cetona (25,0 ml) que contenía carbonato de potasio (5,0 g) se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró, el residuo se lavó con etil metil cetona y el solvente se evaporó bajo presión reducida para obtener el residuo. El residuo se disolvió en cloroformo (200,0 ml), se lavó con una solución de NaOH al 5% (3 x 100 ml) y agua (3 x 50 ml), se secó, filtró y cristalizó a partir de metanol para obtener el producto deseado *N*-[4-(3-bromo-propoxi)-fenil]-acetamida (16) (2,01g, 75,8%), pf 115-118°C.

Análisis:

IR (KBr): 3.284, 1.658, 1.559, 1.410, 1.239, 1.032, 832 y 521 cm<sup>-1</sup>.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 2,14 (s, 3H, -NHCOCH<sub>3</sub>), δ 2,30 (p, 2H, J=6,1, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Br-), δ 3,59 (t, 2H, J=6,4 Hz, -CH<sub>2</sub>Br), δ 4,07 (t, 2H, J=5,8 Hz, -OCH<sub>2</sub>-), δ 6,86 (d, 2H, J=3,0 Hz, Ar-H), δ 7,37 (d, 2H, J=3,0 Hz, Ar-H) y δ 7,27 (s, 1H, -NH, intercambiable con D<sub>2</sub>O)

RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 24,40 (-NHCOCH<sub>3</sub>), δ 30,14 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Br-), δ 32,36 (-CH<sub>2</sub>Br-), δ 65,58 (-OCH<sub>2</sub>-), δ 114,84 (2 x 2° Ar-C), δ 122 (2 x 2° Ar-C), δ 131,23 (1 x 3° Ar-C), δ 155,55 (1 x 3° Ar-C) y δ 168,43 (-NHCOCH<sub>3</sub>)

CHN: Calculado: C, 48,55; H, 5,19; N, 5,15. Encontrado: C, 48,76; H, 5,10; N, 4,36.

**N-[4-(3-nitrooxi-propoxi)-fenil]-acetamida (18)**

Una mezcla de *N*-[4-(3-bromo-propoxi)-fenil]-acetamida (16) (1,50 g), nitrato de plata (5,0 g) y acetonitrilo recién destilado (50,0 ml) se calentó a reflujo durante 10 h, se enfrió, se vertió sobre hielo picado y extrajo con cloroformo (3 x 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron, se filtraron y se eliminó el solvente bajo presión reducida para obtener un residuo que se cristalizó a partir de metanol para obtener *N*-[4-(3-nitrooxi-propoxi)-fenil]-acetamida (18) (1,09 g, 77,30 %), pf 89-92° C.

Análisis

IR (KBr): 3.333, 1.664, 1.548, 1.411, 1.238, 1.057, 839 y 704 cm<sup>-1</sup>.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 2,14 (s, 3H, -NHCOCH<sub>3</sub>), δ 2,19 (p, 2H, J=6,1-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), δ 4,66 (t, 2H, J=6,3 Hz, -OCH<sub>2</sub>-), δ 4,03 (t, 2H, J=5,9 Hz, -CH<sub>2</sub>ONO<sub>2</sub>), δ 6,84 (d, 2H, J=3,1 Hz, Ar-H), δ 7,41 (d, 2H, J=3,8 Hz, Ar-H) y δ 7,26 (s, 1H, -NH, intercambiable con D<sub>2</sub>O)

RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 24,40 (-NHCOCH<sub>3</sub>), δ 27,0 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), δ 63,80 (-CH<sub>2</sub>ONO<sub>2</sub>-), δ 70,00 (-OCH<sub>2</sub>-), δ 77,11 (-OCH<sub>2</sub>-), δ 114,76 (2 x 2° Ar-C), δ 121,98 (2 x 2° Ar-C), δ 131,46 (1 x 3° Ar-C), δ 155,27 (1 x 3° Ar-C) y δ 168,46 (-NHCOCH<sub>3</sub>)

CHN: Calculado: C, 51,97; H, 5,55; N, 11,02. Encontrado: C, 48,63; H, 5,37; N, 10,79.

**Ejemplo 4****N-[4-(4-bromo-butoxi)-fenil]-acetamida (17)**

- 5 Una solución de *N*-(4-hidroxifenil)-acetamida (paracetamol) (1) (1,50 g) y 1,3-dibromobutano (15) (10,0 ml) en acetonitrilo (25,0 ml) que contenía carbonato de potasio (5,0g) se calentó a reflujo durante 8 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se vertió dentro de agua con hielo. El residuo se filtró y lavó con una solución de NaOH al 5% (3 x 100 ml) y con agua (3 x 50 ml), se secó, filtro y cristalizó a partir de metanol para obtener el producto deseado *N*-[4-(4-bromo-butoxi)-fenil]-acetamida (17) (2,15g, 77,06%), pf 119-124°C. Análisis:
- 10 IR (KBr): 3.289, 1.660, 1.552, 1.409, 1.236, 1.046, 825 y 520 cm<sup>-1</sup>.  
 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 2,04 (s, 3H, -NHCOCH<sub>3</sub>), δ 2,06 (p, 2H, *J*=2,13 Hz, (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Br), δ 1,94 (p, 2H, *J*=3,35 Hz, (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Br), δ 3,48 (t, 2H, *J*=6,6 Hz, CH<sub>2</sub>Br), δ 3,98 (t, 2H, *J*=6,0 Hz, -OCH<sub>2</sub>), δ 6,85 (d, 2H, *J*=3,0 Hz, Ar-H), δ 7,37 (d, 2H, *J*=3,0 Hz, Ar-H), δ 7,26 (s, 1H, -NH, intercambiable con D<sub>2</sub>O)  
 RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 24,38 (-NHCOCH<sub>3</sub>), δ 27,91(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Br), δ 29,48 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> Br), δ 33,60 (-CH<sub>2</sub>Br-), δ 67,10 (-OCH<sub>2</sub>-), δ 114,72 (2 × 2° Ar-C), δ 121,99 (2 × 2° Ar-C), δ 131,07 (1 × 3° Ar-C), δ 155,72 (1 × 3° Ar-C) y δ 168,46 (-NHCOCH<sub>3</sub>)  
 CHN: Calculado: C, 50,37; H, 5,64; N, 4,89. Encontrado: C, 49,96; H, 5,73; N, 4,68.

**N-[4-(4-nitrooxi-butoxi)-fenil]-acetamida (19)**

- 20 Una mezcla de *N*-[4-(4-bromo-butoxi)-fenil]-acetamida (17) (1,30 g), nitrato de plata (5,0 g) y acetonitrilo recién destilado (50,0 ml) se calentó a reflujo durante 10 h, se enfrió, se vertió sobre hielo picado y extrajo con cloroformo (3 x 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron, se filtraron y se eliminó el solvente bajo presión reducida para obtener un residuo que se cristalizó a partir de metanol para obtener *N*-[4-(4-nitrooxi-butoxi)-fenil]-acetamida (19) (1,10g, 0,78%), pf 92-98° C.
- 25 Análisis:  
 IR (KBr): 3.327, 1.658, 1.519, 1.408, 1.238, 1.040, 832 y 551 cm<sup>-1</sup>.  
 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 2,07 (s, 3H, -NHCOCH<sub>3</sub>), δ 1,88 (p, 2H, *J*=2,7 Hz, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>ONO<sub>2</sub>), δ 1,79 (p, 2H, *J*=2,9 Hz, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>ONO<sub>2</sub>), δ 3,91 (t, 2H, *J*=5,68 Hz, -CH<sub>2</sub>ONO<sub>2</sub>), δ 4,46 (t, 2H, *J*= 6,2 Hz, -OCH<sub>2</sub>-), δ 6,76 (d, 2H, *J*=3,09 Hz, Ar-H), δ 7,32 (d, 2H, *J*= 3,09 Hz, Ar-H) y δ 7,30 (s, 1H, -NH, intercambiable con D<sub>2</sub>O)  
 RMN <sup>13</sup>C (30 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 23,89 (-NHCOCH<sub>3</sub>), δ 25,60 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>ONO<sub>2</sub>), δ 24,43 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>ONO<sub>2</sub>), δ 67,22 (-CH<sub>2</sub>ONO<sub>2</sub>-), δ 73,02 (-OCH<sub>2</sub>-), δ 114,75 (2 × 2° Ar-C), δ 121,99 (2 × 2° Ar-C), δ 131,16(1 × 3° Ar-C), δ 155,61 (1 × 3° Ar-C) y δ 168,36 (-NHCOCH<sub>3</sub>)  
 CHN: Calculado: C, 53,73; H, 6,01; N, 10,44. Encontrado: C, 52,94; H, 6,01; N, 9,90.

**Actividad biológica:**

- Animales:** Se usaron ratas Wistar (machos de 150-200g) de ambos sexos y ratas Laca (machos de 25-35 g) obtenidas del Central Animal House, Universidad de Punjab, Chandigarh, India. Los animales se mantuvieron en condiciones de laboratorio convencionales y se alimentaron con pienso de rata. Se dejó que los animales accedieran libremente al alimento y al agua y se mantuvieron en ayunas 24 h antes de los estudios.

- Condiciones experimentales:** Siempre que no se estableció otra cosa, se emplearán las siguientes condiciones en todos los experimentos. Los compuestos de ensayo se suspendieron en carboximetilcelulosa (CMC) al 0,5% y se administraron por vía oral (p.o.). A los animales control se les administró la cantidad correspondiente del vehículo (CMC al 0,5%).

- Actividad antiinflamatoria (tabla 1):** La actividad antiinflamatoria se determinó usando el modelo de edema en la pata de la rata inducido por carrageno. Las ratas se dividieron en grupos diferentes y se administraron los fármacos a cada grupo. El paracetamol (1) y los derivados que liberan NO sintetizados (12 y 13) se administraron p.o. a una dosis de 100 mg/kg, p.o., emulsionados en carboximetilcelulosa sódica al 0,5% (CMC sódica al 0,5%). La actividad antiinflamatoria se determinó usando el modelo de edema en la pata de la rata inducido por carrageno. Las ratas se dividieron en grupos diferentes y se administraron los fármacos/derivados a cada grupo. Se indujo edema agudo en la pata izquierda de las ratas inyectando la solución de carrageno recién preparada (Tipo IV, 0,1 ml, al 1%) en la región plantar de la pata izquierda. En la pata derecha se inyectó solución salina (1 ml, 0,9%), lo que sirvió como control para su comparación. El aumento del volumen de la pata se midió usando un pletismómetro (desplazamiento de agua, UGO BASILE, Varese, Italia) a las 2 h y 4 h tras la estimulación con carrageno. El cambio en el porcentaje (aumento) del volumen de la pata se calculó y expresó como la cantidad de inflamación.

- 60 **% de aumento del volumen de la pata en cualquier momento =  $(V_i - V_d) / V_d \times 100$**

Donde,  $V_i$  = volumen de la pata izquierda  
 $V_d$  = volumen de la pata derecha (control)

65

**Tabla 1: actividad antiinflamatoria del paracetamol (1) y los NO-AINES (12 y 13)**

Compuesto	Dosis (mg/kg, p.o.)	% de aumento en el volumen de la pata Media $\pm$ ETM	
		2h	4h
Control	CMC al 0,5%	41,96 $\pm$ 1,71	65,17 $\pm$ 1,55
1	100,0	38,37 $\pm$ 1,26	58,92 $\pm$ 1,56
12	100	32,68 $\pm$ 1,45	26,44 $\pm$ 0,10
13	100	31,15 $\pm$ 1,31	28,45 $\pm$ 1,28

Los resultados se expresan como media  $\pm$  error típico de la media (ETM).

\* indica  $p < 0,05$  en comparación con el control (CMC sódica al 0,5%) y

# indica  $p < 0,05$  en comparación con el paracetamol (100 mg/kg p.o.)

Los derivados de paracetamol (1) que liberan NO, 12 y 13 mostraron una mejor actividad antiinflamatorio en comparación con el fármaco original 1, a ambos intervalos de 2 y 4 h (mostrado por menor porcentaje de aumento en el volumen de la pata). A la 2 h, el porcentaje de aumento en el volumen de la pata para 12 y 13 era del 32,68  $\pm$  1,45 y el 31,15  $\pm$  1,31 respectivamente y a las 4 h el porcentaje de aumento en el volumen de la pata para 12 y 13 era del 26,44  $\pm$  0,10 y el 28,45  $\pm$  1,28, respectivamente. No se observó actividad significativa en el caso del paracetamol (1) ya que se encontró que el % de aumento en el volumen de la pata a las 2 h y a las 4 h era del 38,37  $\pm$  1,26 y el 58,92  $\pm$  1,56, respectivamente.

Actividad analgésica (tabla 2 y fig.1, hoja N.º 1 figura 3): La actividad analgésica se determinó usando una prueba de retorcimiento abdominal. Los ratones se dividieron en grupos diferentes que contenían 6 animales por grupo. La actividad analgésica se determinó frente a la prueba de retorcimiento abdominal inducida por ácido acético. El retorcimiento se inducía mediante inyección intraperitoneal (i.p.) de una solución de ácido acético recién preparada. A los ratones se les administró por vía oral (p.o.) paracetamol (1) y los derivados que liberan NO sintetizados (12 y 13) a dosis de 100 mg/kg, emulsionado en el vehículo carboximetilcelulosa sódica al 0,5% (CMC sódica), 30 min antes del ácido acético por vía i.p. (1% p/v en solución salina a pH 2,7, 10 ml/kg, i.p.). Los animales se transfirieron inmediatamente a cámaras de observación individuales y se controló el número de retorcimientos (constricciones abdominales, torsiones del tronco y extensión de las patas traseras) durante los siguientes 20 minutos, empezando 3 min después de la inyección de ácido acético. Al final del período de observación los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical y exsanguinación. El número medio de constricciones en cada grupo de ratones tratados con el fármaco se comparó con el del grupo control y el grado de analgesia se expresó como % de inhibición calculada a partir de la ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = (1 - N_t / N_c) \times 100$$

Donde  $N_c$  = número de retorcimientos en el control

$N_t$  = número de retorcimiento en los ratones tratados.

**Tabla 1: actividad analgésica del paracetamol (1) y los NO-AINES (12 y 13)**

COMPUESTO	% DE INHIBICIÓN DE LOS RETORCIMIENTOS
1	45,36 $\pm$ 1,34
10	13,52 $\pm$ 1,82 <sup>#</sup>
12	58,35 $\pm$ 1,50 <sup>#</sup>
11	17,24 $\pm$ 0,41 <sup>#</sup>
13	61,80 $\pm$ 1,69 <sup>#</sup>

Los resultados se expresan como media  $\pm$  error típico de la media (ETM).

# indica  $p < 0,05$  en comparación con el paracetamol (100 mg/kg p.o.)

Los derivados O-alquilados de paracetamol (1) que liberan NO 12 y 13 muestran mejor respuesta que el fármaco original indicada por un % de inhibición mayor de los retorcimientos. Se encontró que el porcentaje de inhibición en el caso de los compuestos 12 y 13 (58,35  $\pm$  1,50, 61,80  $\pm$  1,69, respectivamente) era mejor que el del paracetamol (1) que era del 45,36  $\pm$  1,34. Los compuestos intermedios 10 y 11, que presentaban un Br terminal (el cual se convertía a continuación en un resto -ONO<sub>2</sub> tras el tratamiento con AgNO<sub>3</sub>) mostraron un porcentaje de inhibición insignificante en los retorcimientos lo que indicaba que la liberación de NO es responsable de la mejor actividad analgésica de los compuestos 12 y 13 (que tienen restos -ONO<sub>2</sub> que liberan NO).

**Ensayos bioquímicos** (tabla 3 y fig. 2, hoja N.º 1 para SGPT(ALT) y tabla 4 y fig. 3, hoja N.º 2 para FA): El paracetamol se administró a una dosis de 1.000 mg/kg y se administro una dosis equivalente de 1.000 mg/kg de LOS derivados 12 y 13 p.o. Antes de la administración se tomaron muestras de sangre de cada animal y después de

6 horas los animales fueron sacrificados para obtener muestras de sangre de las que se separó el suero. Las medidas de los marcadores plasmáticos glutamato oxalacetato transaminasa (SGOT), **piruvato transaminasa (SGPT)** y fosfata alcalina (FA) séricas se realizaron espectrofotométricamente usando kit disponibles en el mercado.

Los animales se dividieron en grupos diferentes que contenían 6-8 animales por grupo. Los animales se anestesiaron ligeramente con éter dietílico y se recogieron muestra de sangre que sirvieron como lectura inicial de la enzima que se iba a analizar. Estos grupos de ratas se trataron a continuación con paracetamol (1.000 mg/kg, i.p.) y dosis equivalentes de los compuestos del ensayo. El grupo control se trató con un volumen igual de vehículo (solución salina al 0,9% p/v que contenía Tween-80 al 20% v/v). Los animales se anestesiaron ligeramente con éter etílico y se recogieron muestras de sangre que se dejaron coagular a temperatura ambiente durante 1 h, a continuación, se separaron mediante centrifugación (5.000 rpm durante 10 min) a 4°C y se conservaron a -40,0°C hasta su estimación. Los marcadores plasmáticos de lesión hepática se determinaron espectrofotométricamente usando los siguientes kit disponibles en el mercado según técnicas de laboratorio convencionales.

Tabla 3: porcentaje de aumento en el nivel de SGPT/ALT

COMPUESTO	% AUMENTO EN EL NIVEL DE SGPT/ALT
CONTROL	2,92 ± 0,3*
Paracetamol (1)	83,11 ± 3,3 <sup>#</sup>
12	27,94 ± 2,7* <sup>#</sup>
13	11,12 ± 1,4* <sup>#</sup>

Los resultados se expresan como media ± error típico de la media (ETM).

\* indica  $p < 0,05$  en comparación con el control (CMC sódica al 0,5%) y

# indica  $p < 0,05$  en comparación con el paracetamol (1.000 mg/kg i.p.)

Tabla 4: porcentaje de aumento en el nivel de FA

COMPUESTO	% AUMENTO EN EL NIVEL DE FA
CONTROL	1,05 ± 0,49*
Paracetamol (1)	15,75 ± 1,07 <sup>#</sup>
12	4,17 ± 0,62*
13	2,85 ± 0,83*

Los resultados se expresan como media ± error típico de la media (ETM).

\* indica  $p < 0,05$  en comparación con el control (CMC sódica al 0,5%) y

# indica  $p < 0,05$  en comparación con el paracetamol (1.000 mg/kg i.p.)

La sobreproducción de este metabolito tóxico 2 induce la depleción de las reservas de glutatión en el hígado y la acumulación adicional del metabolito tóxico causa lesiones en el tejido y muerte celular. Enzimas como la fosfatasa alcalina (FA), EC 3.1.3.1), la transaminasa glutamato piruvato sérica (SGPT) o alanina aminotransferasa (ALT) (EC 2.6.1.2) y las proteínas totales se consideran marcadores plasmáticos de la lesión hepática. Se evaluó el efecto de los derivados de paracetamol que liberan óxido nítrico 12 y 13 sobre los marcadores de lesión hepática, como las enzimas FA y SGPT/ALT. Se encontró que los niveles en plasma de estas enzimas aumentaban en el caso de hepatotoxicidad. La gráfica indica que la elevación (en comparación con el valor inicial) en el caso de 1 es mucho mayor que en el caso de los derivados que liberan NO 12 y 13, lo que demuestra que estos causan una menor hepatotoxicidad que el fármaco original paracetamol 1.

**Histopatología** (fig. 5, hoja N.º 3) Para realizar la histopatología hepática, se extirparon los hígados y se fijaron cortes en formalina tamponada al 10% (pH 7,4). A continuación, éstas se procesaron mediante técnicas histopatológicas convencionales, se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y se realizó una evaluación morfológica de las lesiones hepáticas<sup>21</sup>.

El análisis mediante microscopía óptica de las muestras hepáticas obtenidas a partir de ratones tratados con el control (cloruro sódico al 0,9% p/v que contenía Tween-80 al 20% v/v), paracetamol (1), 12 y 13, a dosis de 1.000 mg/kg i.p. se muestra en las secciones (A), (B), (C) y (D), respectivamente. A continuación se resume la interpretación de los resultados obtenidos a partir de estudios histopatológicos:

(i) El control no causaba ningún daño hepático. Solo se observó una leve inflamación de la triada portal.

(ii) El paracetamol (1), agente hepatotóxico comprobado, produjo balonización, descongestión sinusoidal, inflamación de la triada portal y necrosis focal en la zona I.

(iii) Sólo se observó una leve balonización en el caso del compuesto 12.

(iv) El compuesto 13 tampoco produjo ningún daño significativo en el hígado.

Estos resultados apoyaban en resumen que la liberación de NO contrarresta los efectos secundarios de hepatotoxicidad del paracetamol (1).

#### **Liberación de óxido nítrico** {tabla 5 y fig. 4 hoja N.º 2, **fig. 5**}:

Se administraron 100 mg/kg de los derivados **12** y **13** p.o. A las 6 horas, los animales se sacrificaron para obtener muestras de sangre y se separó el suero para determinar los niveles de NO. La concentración en plasma de nitratos/nitritos se midió mediante el kit Cayman disponible en el mercado.

**Tabla 4: porcentaje de aumento del nivel de FA**

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN DE NITRATO ( $\mu$ mol/l)
CONTROL	182,1 $\pm$ 0,68
12	354,2 $\pm$ 2,17 <sup>#</sup>
13	265,4 $\pm$ 2,47 <sup>#</sup>

Los resultados se expresan como media  $\pm$  error típico de la media (ETM).

\* indica  $p < 0,05$  en comparación con el control (CMC sódica al 0,5%).

Tras un periodo de 6h, los derivados que liberan NO 12 y 13 mostraron un aumento en el porcentaje del nivel sérico de NO con respecto al control. La liberación de NO de estos compuestos podría ser la fuera motora que hay detrás de sus mejores actividades analgésica y antiinflamatoria con respecto a las del fármaco original

**Ensayo inhibitorio de COX-2 (ovina) *in vitro*:** El producto prostaglandina se cuantifica mediante un inmunoensayo enzimático (EIA) usando un anticuerpo con amplia especificidad que se une a todos los principales compuestos prostaglandinas. El kit de ensayo se obtuvo de Cayman Chemical Company, EE. UU.

Celecoxib: 79,0% (control positivo)

PCM: 24.0%

12: 21,0%

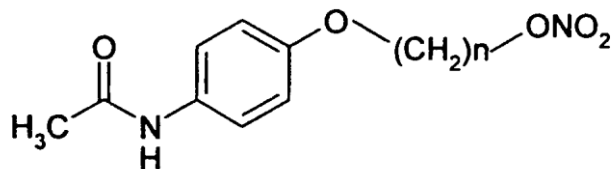
13: 32,5%

El compuesto 13 de la invención ha mostrado tener una mejor actividad de inhibición de COX-2 (*in vitro*) que el fármaco original paracetamol. Los datos de actividad analgésica y antiinflamatoria esto complementan y apoyan exactamente esto. Se ha encontrado que la liberación de NO tiene una mejor actividad analgésica periférica y una actividad antiinflamatoria significativa en comparación con el fármaco original. Se encontró que los derivados liberan NO *in vivo* y carecen de hepatotoxicidad como indica el menor aumento en suero de los niveles de GTP(ALT) y FA séricas y los estudios histopatológicos. Además, el compuesto 13 mostraba una mejor actividad de unión a COX-2 (ovina) que el fármaco original. En general, se han sintetizado derivados de 1 más eficaces y menos tóxicos.

La ventaja de la presente investigación es que estos compuestos que liberan NO han mostrado una mejor actividad analgésica y antiinflamatoria que el fármaco original y menos hepatotoxicidad en estudios bioquímicos e histopatológicos.

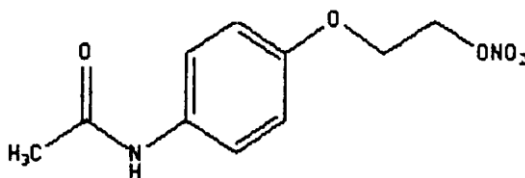
## REIVINDICACIONES

1. Derivados de éster de nitrato del paracetamol de formula general A, en los que el valor de n se selecciona entre 2 y 5.

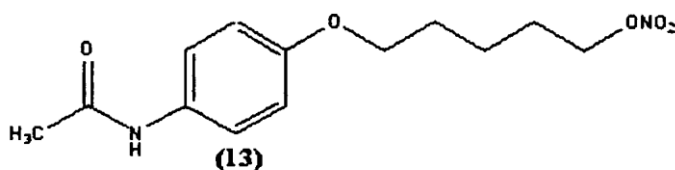


Fórmula A

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la fórmula estructural comprende:



(12)



(13)

3. Un compuesto según la reivindicación 1 en el que los compuestos representativos de la fórmula general comprenden:

- (i) *N*-[4-(2-nitrooxi-etoxi)-fenil]-acetamida (12)
- (ii) *N*-[4-(5-nitrooxi-pentoxi)-fenil]-acetamida (13)
- (iii) *N*-[4-(3-nitrooxi-propoxi)-fenil]-acetamida (18)
- (iv) *N*-[4-(4-nitrooxi-butoxi)-fenil]-acetamida (19).

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el compuesto de fórmula A tiene mejor actividad analgésica periférica y una actividad antiinflamatoria significativa en comparación con el paracetamol.

5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en el que los compuestos poseen mejor actividad analgésica y antiinflamatoria y carecen de toxicidad en comparación con el fármaco original paracetamol (1).

6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en el que los compuestos 12 y 13 mostraron un aumento del  $32,68 \pm 1,45\%$  y  $31,15 \pm 1,31\%$  a las 2 h y del  $26,44 \pm 0,10\%$  y  $28,45 \pm 1,28\%$  a las 4 h, respectivamente en el volumen de la pata en comparación con el  $38,37 \pm 1,26\%$  y  $58,92 \pm 1,56\%$  (a las 2 h y 4 h, respectivamente) en el caso del paracetamol a dosis de 100 mg/kg de peso corporal.

7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en el que los compuestos 12 y 13 mostraban un aumento en el nivel de NO sérico del  $354,2 \pm 2,17$  y  $265,4 \pm 2,47$ , respectivamente con respecto al control ( $182,1 \pm 0,68$ ) a dosis de 100 mg/kg de peso corporal.

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el compuesto 13 mostró una actividad inhibidora de Cox-2 (ovina) *in vitro* del 32,5% en comparación con el 24,0% del control.

9. Un proceso para la preparación de un derivado de éster de nitrato del paracetamol que comprende los pasos de:

- 5 a) hacer reaccionar el paracetamol con alcano de dibromo en un solvente orgánico en presencia de carbonato alcalino durante un periodo de hasta 12 horas,  
b) filtrar la mezcla de reacción seguido de evaporación del solvente para obtener un residuo sólido,  
c) disolver el residuo en un solvente no miscible con agua y lavar con una solución de hidróxido sódico seguido de un lavado con agua y evaporación del solvente hasta obtener el derivado O-bromo alquilado de paracetamol.
- 10 d) hacer reaccionar el derivado O-bromoalquilado de paracetamol con nitrato de plata a reflujo en un solvente aprótico hasta 12 horas, filtración adicional y evaporación del filtrado para obtener los ésteres de nitrato derivados de paracetamol de fórmula general A en los que el valor de n se selecciona entre 2-5.
10. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el dihalo alcano se selecciona entre el grupo compuesto por 1,2-dibromoetano, 1,3-dibromopropano, 1,4-dibromobutano y 1,5-dibromopentano.
- 15 11. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el solvente orgánico utilizado se selecciona entre el grupo compuesto por etil metil cetona, acetona, acetonitrilo y mezcla de los mismos.
- 12 Un proceso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el solvente aprótico utilizado se selecciona entre el grupo compuesto por acetonitrilo, benceno, hexano y mezcla de los mismos.
- 20 13. Una composición farmacéutica que comprende los compuestos de fórmula general A y excipientes farmacéuticamente aceptables.



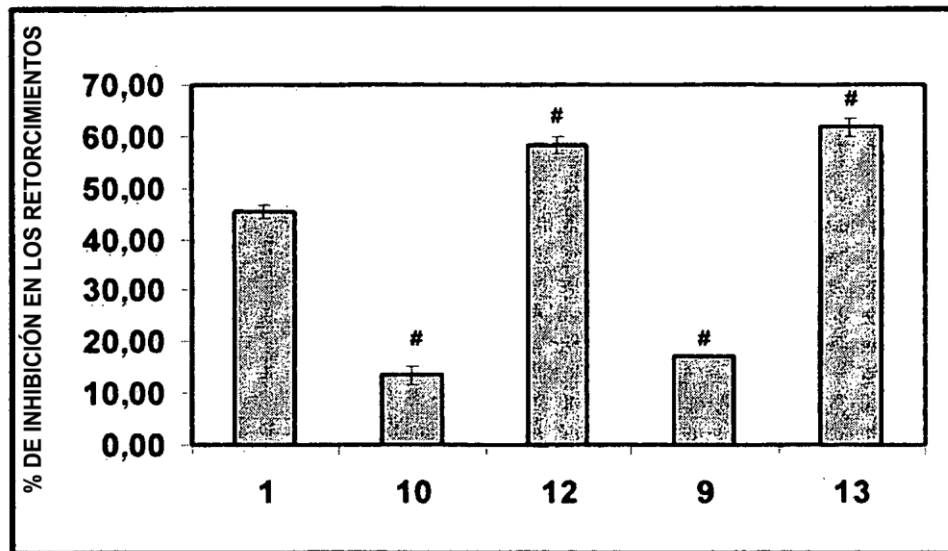


FIG. 1

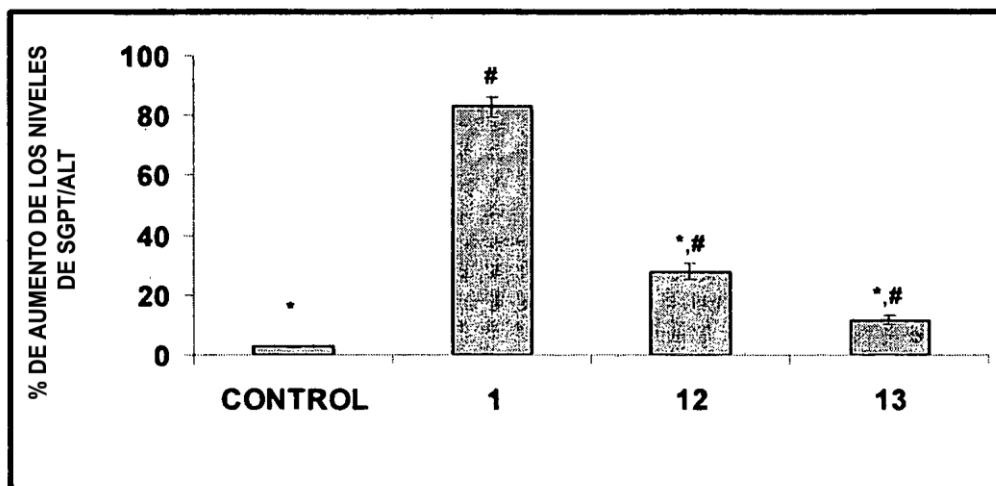


FIG. 2

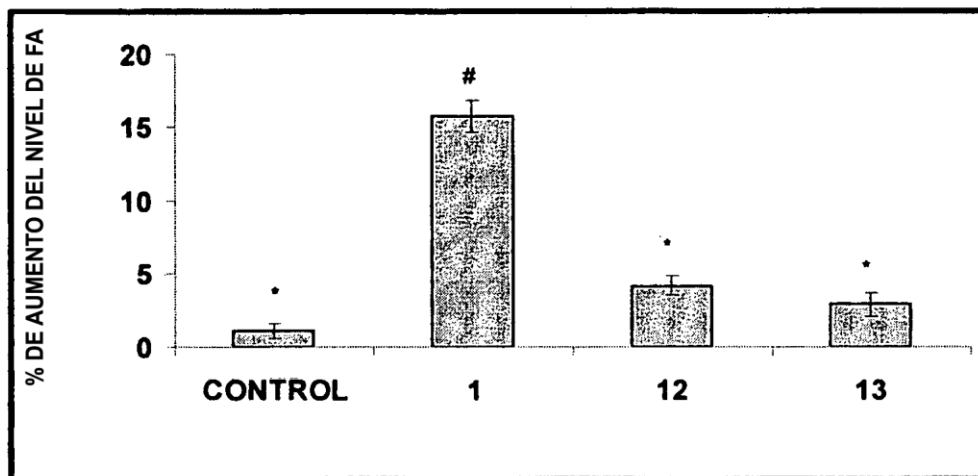


FIG. 3

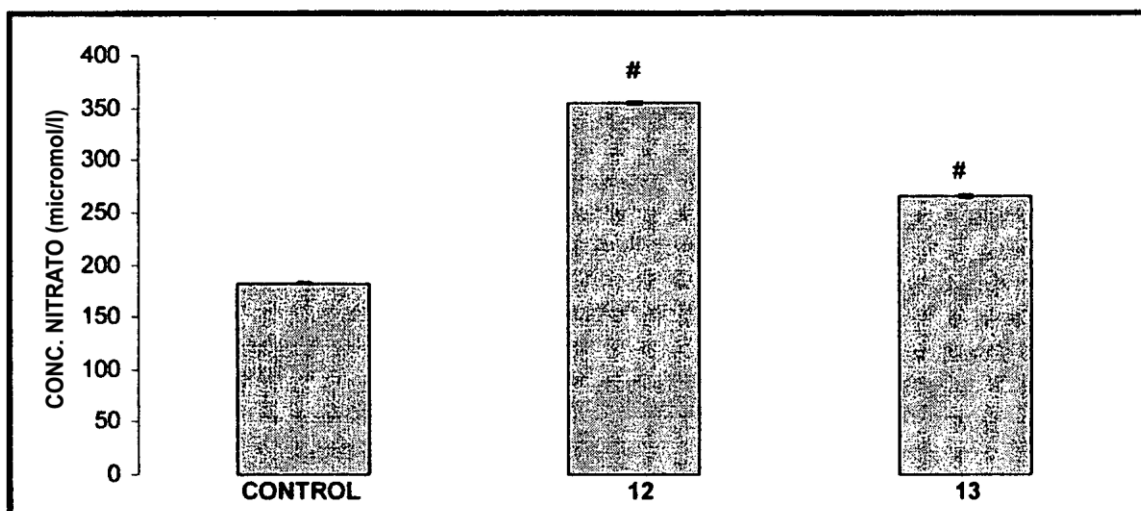
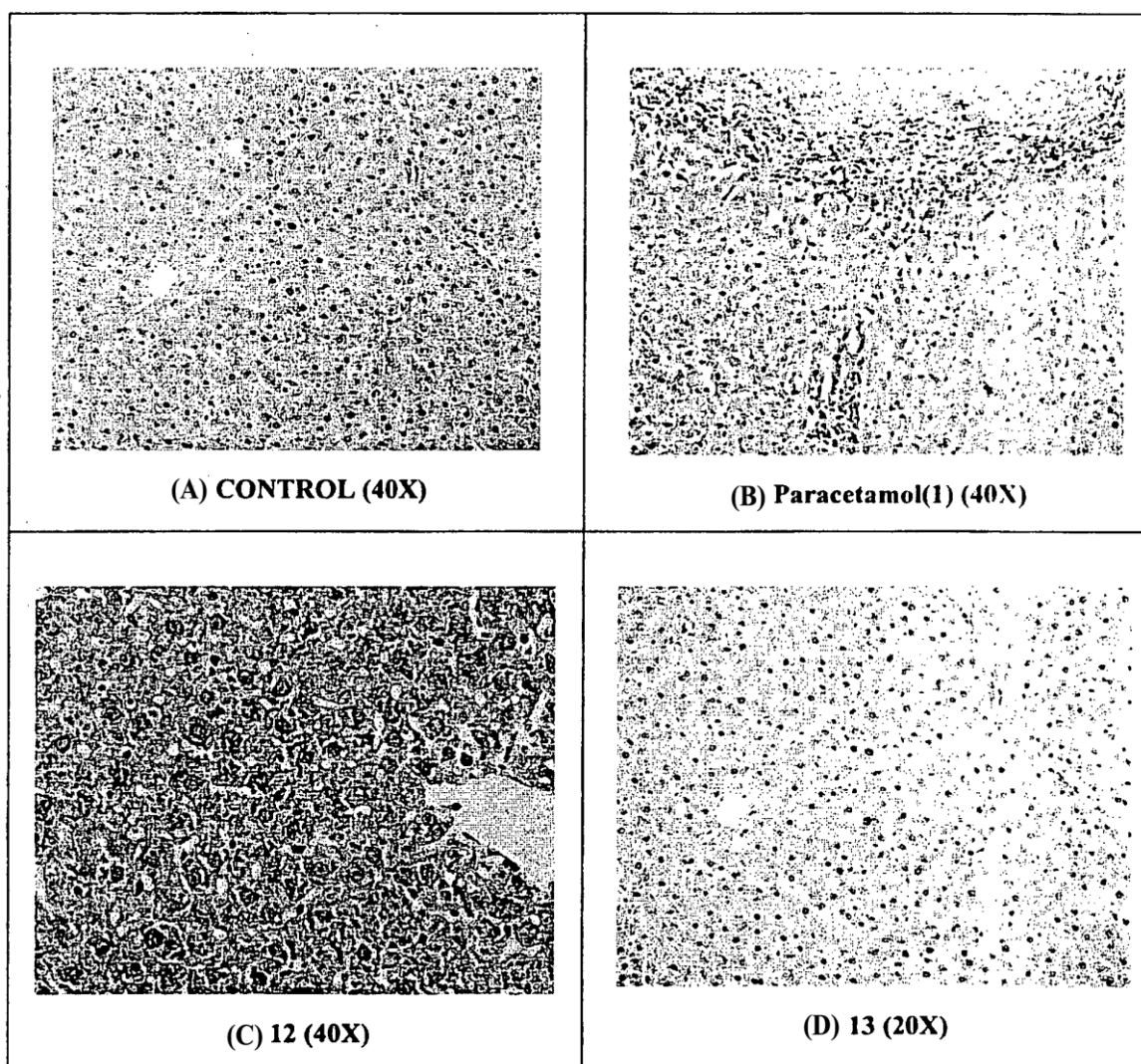


FIG. 4



**FIG.5**