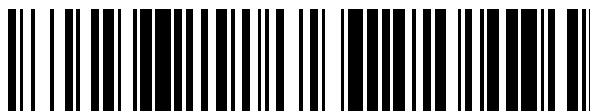


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 463 715**

51 Int. Cl.:

C07D 491/10 (2006.01)

A61K 31/4355 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2008** **E 08735211 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2014** **EP 2137192**

54 Título: **Derivados de galantamina como profármacos para el tratamiento de enfermedades del cerebro humano**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.05.2014

73 Titular/es:
NEURODYN LIFE SCIENCES INC. (100.0%)
Suite 508 NRC-INH 550 University Ave.,
Charlottesville, P.E.I., C1A 4P3, CA

72 Inventor/es:
MAELICKE, ALFRED

74 Agente/Representante:
VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 463 715 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

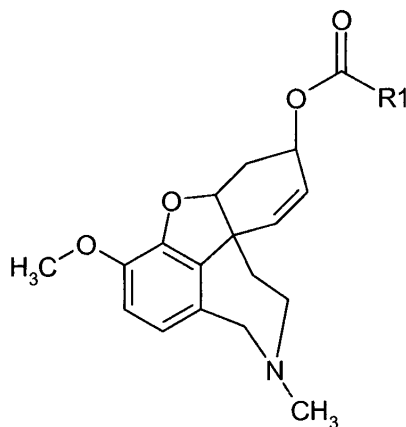
Derivados de galantamina como profármacos para el tratamiento de enfermedades del cerebro humano

- 5 La presente invención se relaciona con un derivado de galantamina seleccionado para uso como medicamento, que tiene, en comparación con la galantamina, una mayor eficacia y menores niveles de efectos colaterales adversos en el tratamiento de enfermedades del cerebro humano.
- 10 El alcaloide vegetal galantamina ha sido descrito como un inhibidor de la colinesterasa (ChE-I) y como un agente sensibilizador (APL, ligando alostéricamente potenciador) de los receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChR), y se ha propuesto la galantamina para el tratamiento de diversas enfermedades del cerebro humano, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (EA). Actualmente, la adherencia de los pacientes de Alzheimer al tratamiento con ChE-I y APL es bastante baja, del orden del 20 %, siendo una razón clave los efectos adversos náusea, diarrea, vómito, anorexia y calambres musculares. En el caso de la galantamina, la mayoría de estos efectos adversos se deben a las acciones del fármaco mientras pasa a través del tracto gastrointestinal y a su más bien limitada permeación a través de la barrera hematoencefálica (BHE) hacia el interior del cerebro. Para ayudar a los pacientes a hacer frente a los efectos adversos de la galantamina, la dosis diaria del fármaco recomendada por el fabricante se limita a 16-24 mg al día, y se alcanza lentamente esta dosis mediante un aumento de dosis por etapas, comenzando con 4 mg/día y a lo largo de un período de 2-3 meses.
- 15 20 Los niveles de acumulación de galantamina en el cerebro, más bien bajos, cuando se administra como el fármaco no modificado son un serio inconveniente con respecto al uso terapéutico del fármaco, es decir, para el tratamiento de trastornos cognitivos, tales como la EA. Como indica la razón cerebro a plasma de $\sim 1,3$, sólo una pequeña parte del fármaco administrado alcanza el cerebro, y los elevados niveles del fármaco en otros tejidos (periféricos) causan la mayor parte, si no todos, de los efectos adversos observados. La acción mayormente periférica de la galantamina está también indicada en su uso previo para el tratamiento de una serie de trastornos neuromusculares, incluyendo la miastenia gravis y la poliomielitis.
- 25 30 En WO2007/039138 y EP 1777222 se hace referencia a la baja hidrofobicidad y el limitado reparto relacionado en el cerebro humano de la galantamina, y se proponen varios procedimientos para resolver estos inconvenientes de una medicación que se supone que actúa sobre moléculas diana localizadas en el sistema nervioso central cerebral. En el mismo documento, se describen numerosos derivados de la galantamina que mejoran significativamente el transporte del respectivo compuesto a través de la barrera hematoencefálica (BHE), y se proponen como fármacos para el tratamiento de varias enfermedades asociadas a déficits cognitivos.
- 35 40 EP-A 648 771, EP-A 649 846 y EP-A 653 427 describen todos derivados de galantamina, un procedimiento para su preparación y su uso como medicamentos; sin embargo, ninguna de estas solicitudes considera formas y medios para aumentar la penetración a través de la barrera hematoencefálica y la razón cerebro a plasma de los compuestos base y de los derivados.
- 45 50 US 6.150.354 se refiere a varios análogos de galantamina para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, no se considera la modificación química selectiva con el fin de aumentar la penetración a través de la barrera hematoencefálica.
- 55 60 WO 01/74820, WO 00/32199 y WO 2005030333 se refieren a derivados y análogos de galantamina para el tratamiento de varias enfermedades del cerebro humano y otras y para el daño cerebral funcional agudo. Sin embargo, no se consideran modificaciones químicas selectivas u otros medios para mejorar la penetración a través de la barrera hematoencefálica y la razón de concentración cerebro a sangre.
- 65 70 WO 88/08708, WO 99/21561, WO 01/43697 y US 2003/0162770 se refieren a derivados y análogos de la galantamina para el tratamiento de diversos síntomas cognitivos. Sin embargo, no se consideran modificaciones químicas selectivas u otros medios para mejorar la razón de concentración cerebro a sangre.
- 75 80 WO 2005/030713 se refiere a un método para la síntesis de isómeros ópticos de la galantamina a partir de un derivado bromoamida de la narwedina. Sin embargo, no trata de otros derivados de la galantamina, o de su uso como medicamentos, o de modificaciones químicas destinadas a aumentar la razón de concentración cerebro a sangre de dichos compuestos.
- 85 90 WO 97/40049 describe varios derivados de benzazepinas y compuestos relacionados que pueden ser aplicados para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, no se facilita ningún concepto en esta solicitud para aumentar la penetración de los compuestos a través de la barrera hematoencefálica y obtener una elevada razón de concentración cerebro a sangre.
- 95 El objetivo de la presente invención es proporcionar compuestos utilizables como profármacos o como medicamento con elevados efectos farmacodinámicos en el sistema nervioso central cerebral y bajos efectos colaterales periféricos.

Se consigue este objetivo mediante el compuesto y la composición provistos en las reivindicaciones.

Los derivados propuestos fueron diseñados como profármacos, en el sentido de que son capaces de pasar de manera eficaz la barrera hematoencefálica (BHE) y, después de pasar la BHE, son sustratos de enzimas endógenas y, tras escisión enzimática, producen galantamina. Como resultado de la escisión enzimática a galantamina de dichas progalantaminas en el cerebro, se alcanza una concentración local de galantamina en el cerebro significativamente mayor que mediante la administración de la misma dosis de la galantamina original. La concentración de fármaco relativamente mayor en el cerebro alcanzada mediante la administración de progalantamina dará entonces como resultado una mayor eficacia a una dosis dada, y la mejor distribución cerebro a tejidos periféricos dará como resultado menos efectos colaterales del tratamiento o menos significativos. Estos efectos representan mejoras significativas de los presentes regímenes de tratamiento, ya que la eficacia como tratamiento para enfermedades cerebrales de la galantamina no modificada (y de todos los demás ChE-I actualmente aprobados para este fin) es más bien limitada, aunque estadísticamente significativa, posiblemente debido a la baja dosificación. Por lo tanto, normalmente se alcanza la eficacia sólo después de una cuidadosa titulación creciente (a lo largo de meses) de la dosis diaria, para mantener una suficiente adherencia de los pacientes a los efectos colaterales mayormente gastrointestinales asociados al tratamiento con ChE-I.

Los inventores vieron que una cuidadosa selección en cuanto al tipo de sustituyente y la posición de la sustitución usando galantamina como estructura base da lugar a compuestos altamente eficaces. Se obtienen tales compuestos muy eficaces que tienen buenas propiedades de paso a través de la barrera hematoencefálica y que son eficazmente escindidos por una esterasa tras su paso a través de la BHE con compuestos que tienen la fórmula general I



siendo R1 un sustituyente que tiene propiedades estéricas e hidrofóbicas particulares.

La presente invención, por lo tanto, se relaciona con un éster de galantamina que como tal tiene poca o ninguna actividad como ChE-I y APL en comparación con la galantamina. Por lo tanto, siempre que el compuesto permanezca sin escindir, éste no interacciona con las moléculas diana habituales de la galantamina y por ello es en gran parte inactivo en la producción de efectos terapéuticos y/o colaterales.

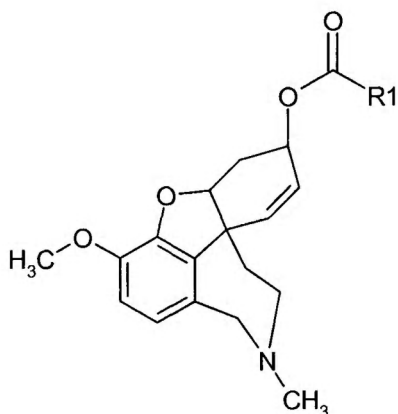
La reducida reactividad de las progalantaminas queda demostrada por los siguientes resultados:

1. Actividad significativamente reducida como ChE-I, en comparación con la galantamina.
2. Actividad reducida como APL nicotínico, en comparación con la galantamina.
3. Efectos colaterales gastrointestinales reducidos, en comparación con la galantamina.

Se investigaron todos estos enfoques y se explican en los ejemplos y se muestran en las figuras.

Según la invención, se ha descubierto que un éster particular de la galantamina exhibe razones de concentración cerebro a sangre inesperadamente elevadas ($R_{CB-proGal} > 6$, en comparación con $R_{CB-Gal} \sim 1,3$), y en el cerebro se escinde enzimáticamente con relativa lentitud a galantamina. Por lo tanto, como se discute a continuación con más detalle, la progalantamina es excepcionalmente idónea para el tratamiento de enfermedades humanas asociadas a déficits colinérgicos, tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esquizofrenia y otros varios trastornos psiquiátricos.

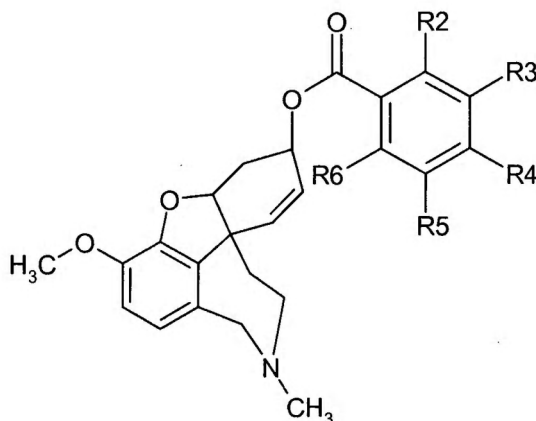
Los ésteres de galantamina a los que la presente invención se refiere tienen la siguiente estructura general:



Fórmula I

5 donde R1 es $\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}_3$, $\text{CH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$ o ciclopropano, o es un anillo de 5 ó 6 miembros aromático o heteroaromático eventualmente sustituido. Específicamente, dichos anillos aromáticos y heteroaromáticos incluyen benceno, naftaleno, tiofeno, pirrol, imidazol, pirazol, oxazol y tiazol, en caso de que se utilicen como medicamentos o profármacos para el tratamiento de la enfermedad neurodegenerativa o psiquiátrica o neurológica asociada a un déficit colinérgico.

10 Según la reivindicación 1, la invención se relaciona específicamente con un éster de galantamina con la siguiente estructura:



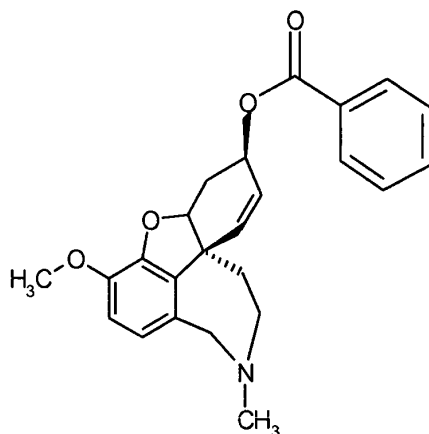
Fórmula II

15 donde R2-R6 comprenden cualquier sustituyente seleccionado entre H, halógeno, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_3$ o ciclopropilo eventualmente sustituido, OH, O-alquilo, SH, S-alquilo, NH_2 , NH-alquilo, N-dialquilo, arilo eventualmente sustituido o heteroarilo, mediante lo cual sustituyentes próximos pueden cooperar para formar un anillo adicional.

20 En el presente documento, el término "profármaco" se refiere a un derivado de galantamina (compuesto base) donde el/los grupo(s) añadido(s) o reemplazado(s) en dicho compuesto base se escinde(n) o devuelve(n) al grupo hidroxilo originalmente contenido en el compuesto base cuando el derivado ha alcanzado el área o sitio de acción. Así, en el caso de un "profármaco", se administra un agente efectivo como un derivado (que es dicho profármaco); sin embargo, el compuesto principal o exclusivamente efectivo en el sitio diana dentro del cerebro es el propio agente, no el compuesto derivatizado o los metabolitos diferentes del compuesto base de los mismos.

25 El término "derivado" se refiere a cualquier cambio de un compuesto base definido en la presente solicitud. El término "derivado" es utilizado para describir un compuesto que, o bien puede ser un profármaco, o bien puede ser un agente efectivo por sí mismo/por derecho propio o en la forma derivatizada.

30 El término "progalantamina" es utilizado para cualquier derivado de la galantamina descrito en el presente documento que pueda ser escindido por una enzima (esterasa) para dar lugar a galantamina,



para uso como medicamento o profármaco para el tratamiento de la enfermedad neurodegenerativa o psiquiátrica o neurológica asociada a un déficit colinérgico, donde la enfermedad es seleccionada entre la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson, otros tipos de demencia, esquizofrenia, epilepsia, neuritis, diversos tipos de envenenamiento, anestesia, particularmente la anestesia neuroléptica, autismo, trastornos de la médula espinal, inflamación, particularmente trastornos inflamatorios centrales, delirio posoperatorio y/o delirio posoperatorio subsindrómico, dolor neuropático, consecuencias del abuso de alcohol y de fármacos, deseo intenso adictivo de alcohol y de nicotina y consecuencias de la radioterapia.

El compuesto antes mencionado no ha sido aún descrito para el tratamiento de dichas enfermedades.

Además, los compuestos de fórmula I que tienen un anillo de 5 ó 6 miembros aromático o heteroaromático, seleccionado entre benceno sustituido, con la condición de que no sea 2-fluorobenceno o 3-nitro-4-fluorobenceno, naftaleno eventualmente sustituido, tiofeno, pirrol, imidazol, pirazol, oxazol, tiazol o $\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}_3$, $\text{CH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$ o ciclopropano, no han sido aún descritos, por lo que sabe el inventor.

Los compuestos desvelados en la presente solicitud son seleccionados entre

Los términos "agente sensibilizante" y "ligando alostéricamente potenciador, APL" se refieren a efectores que potencian la neurotransmisión colinérgica por interacción con un sitio alostérico en los receptores colinérgicos.

Los términos "potenciador colinérgico" y "agente colinérgico" se refieren a compuestos que potencian/modulan la neurotransmisión colinérgica por inhibición de las colinesterasas, por sensibilización alostérica y/o activación directa de los receptores colinérgicos y/o por activación/modulación de las rutas intracelulares relevantes por medio de cascadas de segundos mensajeros.

Un derivado o profármaco tiene una "permeabilidad aumentada de la barrera hematoencefálica" según la presente invención o una "penetración aumentada por la barrera hematoencefálica" si, tras la administración de un profármaco o derivado del mismo a un organismo vivo, penetra una mayor cantidad de dicho compuesto a través de la BHE de ese organismo.

Un compuesto de la presente invención proporciona una mayor "razón de concentración cerebro a sangre" o "razón de concentración cerebro a tejidos", que da como resultado un mayor nivel de agente efectivo en el cerebro, en comparación con la administración del compuesto base sin derivatización. Se describen métodos para la determinación de una permeabilidad aumentada de la BHE en WO 2007/039138.

El "compuesto base", así como el "agente efectivo" según la presente invención es la galantamina. El agente efectivo es obtenido por escisión enzimática (local) del derivado.

"logP" se define como el logaritmo decimal del coeficiente de reparto P, que es la razón de la concentración de un compuesto en fase acuosa con respecto a la concentración de un compuesto en un solvente inmiscible, como la molécula neutra.

El término "alquilo" significará un grupo alquilo lineal, ramificado o cíclico. Como "alquilo", son preferidos los grupos alquilo C_1 a C_{10} , son más preferidos los grupos C_2 a C_9 y son los más preferidos los grupos C_2 a C_6 . C_1 a C_{10} significa grupos alquilo del número indicado de átomos de carbono. Como ejemplos, se incluyen, aunque sin limitación, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, t-butilo y pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo y decilo, etc. de cadena lineal y ramificada, o los alquilos cíclicos correspondientes.

El término "halo" significará cloro, fluoro, bromo y yodo.

El término "arilo" significará fenilo que tiene 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituyentes independientemente seleccionados entre el grupo de alquilo, alcoxi, alquilcarbonilo o halo- o trihalometilo.

5 El término "cicloalquilo" significará un grupo cicloalquilo de 3 a 10 átomos de carbono e incluye múltiples alquilos de anillo, tales como, por ejemplo, adamantilo, alcanforilo y 3-noradamantilo.

10 En cualquier caso, cuando se describe un rango entre dos límites, se quiere decir que se desvela cualquier valor o número entero en este rango. Por ejemplo, "C₁-C₁₀" significa C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉ o C₁₀; o "entre 0,1 y 1" significa 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 ó 1.

La estereoquímica de los derivados descritos es la misma que la de la galantamina.

15 Se describieron previamente ésteres de benzoílo de la galantamina en WO 9921561 A1, Davis, Bonnie M., para un método de tratamiento de trastornos de la atención con galantamina, licoramina y compuestos relacionados, pero no se proporcionaron síntesis o datos analíticos o de otro tipo para estos compuestos.

20 Se describieron previamente ésteres de benzoílo sustituidos en "Synthesis and biological activity of galanthamine derivatives as acetylcholinesterase (AChE) inhibitors", de Han, So Yeop; Mayer, Scott C.; Schweiger, Edwin J.; Davis, Bonnie M.; Joullie, Madeleine M., Dep. Chem., Univ. Pennsylvania, Philadelphia, PA, EE.UU. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (1991), 1(11), 579-80. CODEN: BMCLE8 ISSN: 0960-894X. Revista escrita en inglés. CAN 116: 83569 AN 1992:83569 CAPLUS. En este documento, se describe la síntesis de varios derivados éster y carbamato de la galantamina, y se sugiere también que estos compuestos sean agentes terapéuticos potenciales en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, basados en sus propiedades como inhibidores AChE.

30 Contrariamente a las enseñanzas de estos documentos, el éster de galantamina de la presente invención tiene poca actividad, si es que tiene alguna, como inhibidor de la acetilcolinesterasa, siendo más bien el sustrato de dicha enzima (véase lo anterior).

35 Como se demuestra representativamente para el derivado benzoílo en la Figura 1, el éster de la presente invención tiene poca actividad inhibitoria, si es que tiene alguna, de la colinesterasa, hidrolizándose más bien por las colinesterasas para formar galantamina, y en consecuencia actúa como profármaco de la galantamina. Tan pronto como se genera galantamina a partir del compuesto, ésta actúa como ChE-I y APL, como se ha descrito previamente. Se pueden ver las estructuras del derivado estudiado en la tabla A. Como derivado comparativo, se estudia también un éter de galantamina no escindible. Dicho derivado da como resultado valores de inhibición negativos. En el derivado Gln 1063, R1 en la fórmula I es -O-Si(CH₃)₂-C(CH₃)₂-C(CH₃)₂H.

40 Más que inhibir las colinesterasas, la progalantamina a la que se hace referencia en el presente documento es un sustrato de la enzima, como se demuestra ilustrativamente en la Figura 2.

45 Los datos de las figuras 1 y 2 demuestran que la progalantamina de la presente invención no actúa como inhibidor eficaz de la colinesterasa, como se describió en los documentos anteriores antes discutidos. En lugar de ello, es un sustrato de estas enzimas. De forma similar, tampoco interacciona en la misma medida que la galantamina con los receptores nicotínicos neuronales de acetilcolina (figura 3).

50 La progalantamina de la presente invención, por lo tanto, o bien no interacciona, o bien lo hace sólo en un grado muy limitado, con las moléculas diana establecidas de galantamina, en particular las colinesterasas y los receptores nicotínicos neuronales de acetilcolina. Como profármaco, tiene, por lo tanto, una eficacia bastante limitada, si es que tiene alguna, como potenciador de la cognición, y también produce sólo efectos colaterales periféricos y centrales limitados, en comparación con la galantamina (véase más a continuación).

55 Como se ejemplifica y demuestra por la farmacocinética en ratones (figuras 4a y 4b, tabla 1), la R1-benzoilgalantamina exhibe una razón de concentración cerebro a sangre inesperadamente alta (R_{BB} -proGal > 19) y una gran concentración inicial en el cerebro, y se escinde sólo lentamente a galantamina, como se ve en la aparición retardada de un pico de galantamina en cerebro y sangre. El valor de R_{BB} es significativamente mayor de lo esperado a partir del valor de logP, lo que probablemente se debe a la lenta escisión del profármaco en el cerebro y a un efecto de depósito así producido.

60 En la tabla 1, se enumeran los datos farmacocinéticos clave de la benzoilgalantamina, de otras cuantas R1-progalantaminas y de la galantamina (como comparación).

Tabla 1: Datos farmacocinéticos de varias R1-progalantaminas en el ratón

Número de Gln (para referencia, véase la tabla A)	logP	Co (Cerebro)	R-Pro	R-Gal
1062	3,0	4812	19,3	2,2
1067	2,8	4665	7,5	1,7
0979	2,5	3166	6,2	2,4
0993	3,7	2150	6,4	0,6
0978	2,2	1985	6,9	2,3
1076	2,4	1245	1,1	1,0
Gal	1,7	1741		1,2

Co es la concentración más alta de progalantamina (ng/ml) alcanzada en cerebro de ratón tras inyección i.v. de 3 mg/kg de progalantamina. R-Pro es la razón de concentración cerebro a sangre de la progalantamina y R-Gal la de la galantamina en estas condiciones experimentales. Como comparación, también se facilitan Co y R-Gal para la inyección i.v. de la misma cantidad de galantamina.

Estos datos establecen que sólo una selección particular de sustituciones R1 es capaz de producir las siguientes propiedades ventajosas de las progalantaminas: alta concentración inicial en el cerebro, gran R_{BB} y lenta conversión enzimática en galantamina. Además (no mostrado en la tabla), los R1-profármacos preferidos exhiben pocos efectos colaterales, de haberlos, ya que se convierten sólo muy lentamente en galantamina, lo que los protege en gran medida de actuar como galantamina mientras son transportados desde el sitio de administración hasta los sitios de acción en el cerebro.

Estas propiedades pueden tener un impacto significativo para el uso de estos compuestos como fármacos en la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades cerebrales. Como se muestra representativamente en la figura 5, las R1-progalantaminas de la presente invención exhiben en hurones muchos menos efectos colaterales gastrointestinales que la galantamina. Se usaron hurones en estos estudios, ya que se sabe que son particularmente sensibles a los efectos colaterales gastrointestinales. Además de las respuestas eméticas clásicas a la galantamina y otros inhibidores de la ChE, registramos la salivación (SA), los temblores (TE), los problemas respiratorios (PR) y la diarrea (DI) a los niveles "ninguno: 0", "moderado: 0,5" (comportamiento observado a baja frecuencia y/o a baja intensidad) e "intenso: 1,0" (comportamiento observado frecuente y/o continuamente y/o con gran intensidad), y sumamos las puntuaciones para cada uno de los cuatro animales usados por dosis de fármaco en estos estudios.

Los datos representados en la figura 5 para las dos progalantaminas demuestran que su perfil de efectos colaterales en hurones es mucho menos severo (5-6 veces menos) que el de la misma dosis de galantamina. El perfil ventajoso de efectos colaterales se debe probablemente a la reducida afinidad de interacción de estas R1-progalantaminas con las colinesterasas y los receptores nicotínicos neuronales de acetilcolina (figuras 1, 3).

Las ventajas del aumento en el transporte de R1-profármacos seleccionados a través de la barrera hematoencefálica hacia el cerebro, la conversión enzimática en galantamina en la proximidad de los sitios diana en el sistema nervioso central y la interacción con dichos sitios producen un aumento en la reversión de la amnesia inducida por fármacos en ratones, como se muestra en la figura 6 para tres progalantaminas (y para la galantamina en comparación).

Los datos de la figura sugieren que Gln-1062 es aproximadamente 4 veces más eficaz que la galantamina en la reversión de la amnesia inducida por escopolamina en ratones. Se puede esperar poder conseguir un aumento similar o mayor en la eficacia del fármaco en el hombre cuando se administra la R1-progalantamina particular en lugar de galantamina. También se mostraron las propiedades ventajosas como fármaco de las R1-progalantaminas (mayor eficacia, menores efectos colaterales o menos intensos) en otros modelos animales.

En resumen, el compuesto de esta invención es particularmente útil como medicamento para el tratamiento de enfermedades del cerebro humano asociadas a un déficit colinérgico, incluyendo las enfermedades neurodegenerativas de Alzheimer y de Parkinson y las enfermedades neurológicas/psiquiátricas de demencia vascular, esquizofrenia y epilepsia. Basándose en estudios preclínicos utilizando diversos modelos animales, el compuesto reivindicado ha reducido dramáticamente los efectos colaterales en comparación con la galantamina, incluyendo muchas menos incidencias, de haberlas, de respuestas eméticas, diarrea y vómito. Además, cuando se escinde enzimáticamente, la galantamina resultante exhibe un perfil farmacocinético ventajoso en el cerebro y, debido a su mayor nivel de concentración en el cerebro, exhibe también una mayor eficacia en la interacción con las moléculas diana localizadas en el cerebro. Tomadas conjuntamente, estas propiedades hacen de la administración de galantamina como R1-profármaco una medicación preferida en las enfermedades mencionadas anteriormente.

Figuras

Figura 1: Inhibición de las esterasas cerebrales por galantamina y varias progalantaminas.

Se usó un homogenado de cerebro de ratón al 20 %, suplementado con 200 μM de acetilcolina como sustrato, y se midieron las cinéticas de las reacciones iniciales según Riddles PW, Blakeley RL, Zerner B., "Reassessment of Ellman's reagent", Methods Enzymol. 1983, 91: 49-60. Como se muestra en la figura, incluso 50 μM de las respectivas progalantaminas eran incapaces de alcanzar un nivel de inhibición de la colinesterasa cerebral comparable en tamaño al de 1 μM de galantamina. Un derivado no escindible de galantamina (Gln 1063) conduce a valores negativos. En el derivado Gln 1063, R1 en la fórmula I es $-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{H}$.

Figura 2: Escisión enzimática de progalantamina a galantamina.

Se usó butirilcolinesterasa, 25 unidades/ml. La temperatura de reacción era 37 °C. Se determinó la aparición del producto de reacción fluorescente galantamina por detección de fluorescencia.

Figura 3: Interacción de galantamina y progalantamina con el receptor nicotínico neuronal de acetilcolina $\alpha 4\beta 2$ ectópicamente expresado en células HEK-293.

Se determinó el aumento en la respuesta a acetilcolina en presencia de galantamina y de Gln-1062, respectivamente, por registro de pinzamiento zonal de células enteras. La galantamina alcanzó un aumento máximo de respuesta de ~ 40 %, mientras que la progalantamina alcanzó un aumento máximo de sólo ~ 17 %.

Figura 4: Farmacocinética de la progalantamina Gln-1062 (3 mg/kg) en el ratón.

La Figura 4a muestra la concentración medible de la progalantamina aplicada y la concentración resultante de galantamina por escisión de la progalantamina en el cerebro y en el cerebro. La curva que comienza con la concentración más alta se refiere al derivado GLN-1062, que es benzoilgalantamina, en el cerebro. La Figura 4b es una excerpta ("zoom") de la Figura 4a, que muestra el rango de concentración entre 0,00 y 1,00 $\mu\text{g/g}$ (substancia/peso corporal) con más detalle. En la Figura 4b, la curva superior se refiere a la concentración de la galantamina resultante en cerebro, la curva de en medio muestra la concentración de galantamina en sangre y la curva que comienza con una concentración de aproximadamente 0,3 $\mu\text{g/g}$ y que disminuye se refiere a la concentración de GLN-1062 en sangre.

Figura 5: Índice de comportamiento para los efectos colaterales gastrointestinales en hurones tras la aplicación de galantamina y varias R1-progalantaminas, respectivamente.

Figura 6: Reversión de la amnesia inducida por escopolamina en ratones, en presencia de galantamina y varias R1-progalantaminas, respectivamente.

La escopolamina induce un déficit de memoria que puede ser medido por una mayor alternancia en una prueba de laberinto T. Se inyectaron los fármacos potenciadores de la cognición i.p. a varias dosis diferentes junto con escopolamina 20 min. antes de una prueba de laberinto T. Se midió la recuperación en función de la dosis y se determinó la CE_{50} para cada fármaco.

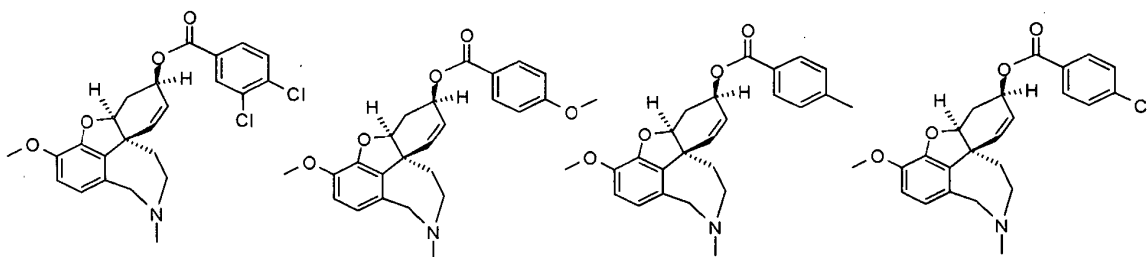
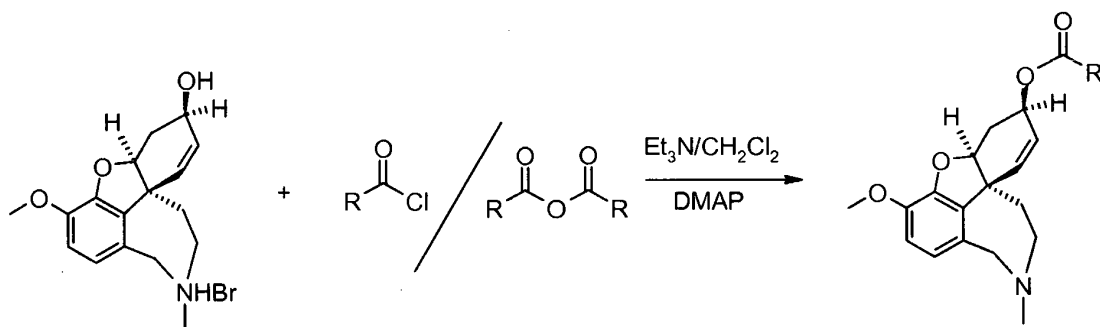
Ejemplos

Ejemplos de síntesis química y propiedades químicas de los derivados:

Abreviaturas: DCM: diclorometano; DMAP: 4-dimetilaminopiridina; DCC: dicitclohexilcarbodiimida; DCHU: dicitclohexilurea

Procedimiento general 1

A la solución de bromhidrato de (-)-galantamina (1,0 mol) y trietilamina (4,0 mol) en DCM (30 ml), se le añadió DMAP (0,5 moles), seguido de cloruro de ácido o anhídrido de ácido respectivamente (1,2 moles). Se agitó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente bajo argón. Se lavó la mezcla de reacción con NaHCO_3 al 10 % y solución salina acuosa saturada, se secó (Na_2SO_4) y se concentró. Se purificó el compuesto bruto obtenido por cromatografía en columna o recristalización, para obtener el producto puro.



Usando este procedimiento, se obtuvieron los siguientes compuestos:

- 5 **Ejemplo 1:** O-Benzoilgalantamina (=benzoato de (4aS,6R,8aS)-4a,5,9,10,11,12-hexahidro-3-metoxi-11-metil-6H-benzofuro[3a,3,2-ef][2]benzazepin-6-ol (éster)); rendimiento: 78 %

Ejemplo 2: O-3,4-Diclorobenzoilgalantamina (=3,4-diclorobenzoato de (4aS,6R,8aS)-4a,5,9,10,11,12-hexahidro-3-metoxi-11-metil-6H-benzofuro[3a,3,2-ef][2]benzazepin-6-ol (éster)); sólido blanco hueso; p.f. 69-70 °C.

10 ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 8,02 (d, $J = 1,88$ Hz, 1H), 7,81 (dd, $J = 1,88$ Hz, $J = 8,38$ Hz, 1H), 7,38 (d, $J = 8,32$ Hz, 1H), 6,62 (d, $J = 8,18$ Hz, 1H), 6,52 (d, $J = 8,18$ Hz, 1H), 6,32 (d, $J = 10,34$ Hz, 1H), 5,89-5,97 (m, 1H), 5,51 (t, $J = 4,43$ Hz, 1H), 4,58 (s, 1H), 4,07 (d, $J = 15,16$ Hz, 1H), 3,18 (s, 3H), 3,61 (d, $J = 15,16$ Hz, 1H), 3,21-3,45 (m, 1H), 2,96-3,05 (m, 1H), 2,66-2,76 (m, 1H), 2,34 (s, 3H), 2,0-2,19 (m, 2H), 1,51-1,59 (m, 1H).

15 **Ejemplo 3:** O-4-Metoxibenzoilgalantamina (=4-metoxibenzoato de (4aS,6R,8aS)-4a,5,9,10,11,12-hexahidro-3-metoxi-11-metil-6H-benzofuro[3a,3,2-ef][2]benzazepin-6-ol (éster)); sólido blanco hueso; p.f. 183-184 °C.

20 ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 8,01 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H), 8,56 (d, $J = 8,86$ Hz, 2H), 6,69 (d, $J = 8,18$ Hz, 1H), 6,58 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 6,35 (d, $J = 10,2$ Hz, 1H), 6,0-6,07 (m, 1H), 5,56 (t, $J = 4,49$ Hz, 1H), 4,66 (s, 1H), 4,15 (d, $J = 15,18$ Hz, 1H), 3,89 (s, 3H), 3,84 (s, 3H), 3,68 (d, $J = 15,18$ Hz, 1H), 3,29-3,53 (m, 1H), 3,04-3,12 (m, 1H), 2,73-2,81 (m, 1H), 2,41 (s, 3H), 2,08-2,26 (m, 2H), 1,58-1,66 (m, 1H).

25 **Ejemplo 4:** O-4-Metilbenzoilgalantamina (=4-metilbenzoato de (4aS,6R,8aS)-4a,5,9,10,11,12-hexahidro-3-metoxi-11-metil-6H-benzofuro[3a,3,2-ef][2]benzazepin-6-ol (éster)); sólido blanco hueso; p.f. 71-72 °C.

30 ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7,94 (d, $J = 8,18$ Hz, 2H), 7,17 (d, $J = 8,06$ Hz, 2H), 6,69 (d, $J = 8,18$ Hz, 1H), 6,58 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 6,35 (d, $J = 9,52$ Hz, 1H), 6,0-6,08 (m, 1H), 5,57 (t, $J = 4,43$ Hz, 1H), 4,66 (s, 1H), 4,17 (d, $J = 15,18$ Hz, 1H), 3,89 (s, 3H), 3,70 (d, $J = 15,18$ Hz, 1H), 3,31-3,43 (m, 1H), 3,06-3,13 (m, 1H), 2,74-2,83 (m, 1H), 2,42 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 2,08-2,26 (m, 2H), 1,59-1,67 (m, 1H).

Ejemplo 5: O-4-Clorobenzoilgalantamina (=4-clorobenzoato de (4aS,6R,8aS)-4a,5,9,10,11,12-hexahidro-3-metoxi-11-metil-6H-benzofuro[3a,3,2-ef][2]benzazepin-6-ol (éster)); sólido blanco hueso; p.f. 72-74 °C.

35 ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7,91 (d, $J = 8,74$ Hz, 2H), 7,27 (d, $J = 8,72$ Hz, 2H), 6,62 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 6,52 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 6,30 (d, $J = 10,34$ Hz, 1H), 5,92-6,0 (m, 1H), 5,5 (t, $J = 4,36$ Hz, 1H), 4,59 (s, 1H), 4,09 (d, $J = 15,18$ Hz, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,63 (d, $J = 15,18$ Hz, 1H), 3,23-3,46 (m, 1H), 2,99-3,06 (m, 1H), 2,66-2,76 (m, 1H), 2,35 (s, 3H), 2,0-2,2 (m, 2H), 1,52-1,6 (m, 1H).

40

Ejemplo 6: O-2-Tenoilgalantamina (=tiofeno-2-carboxilato de (4aS,6R,8aS)-4a,5,9,10,11,12-hexahidro-3-metoxi-11-metil-6H-benzofuro[3a,3,2-ef][2]benzazepin-6-ol (éster)); sólido blanco hueso; p.f. 115-116 °C.

5 ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7,78 (dd, $J = 1,2$ Hz, $J = 3,8$ Hz, 1H), 7,51 (dd, $J = 1,34$ Hz, $J = 4,96$ Hz, 1H), 7,04 (dd, $J = 3,76$ Hz, $J = 4,98$ Hz, 1H), 6,69 (d, $J = 8,18$ Hz, 1H), 6,59 (d, $J = 8,04$ Hz, 1H), 6,35 (d, $J = 10,2$ Hz, 1H), 6,02 (dd, $J = 4,7$ Hz, $J = 10,2$ Hz, 1H), 5,54 (t, $J = 4,49$ Hz, 1H), 4,63 (s, 1H), 4,18 (d, $J = 15,02$ Hz, 1H), 3,87 (s, 3H), 3,71 (d, $J = 15,18$ Hz, 1H), 3,31-3,5 (m, 1H), 3,07-3,14 (m, 1H), 2,73-2,83 (m, 1H), 2,42 (s, 3H), 2,04-2,26 (m, 2H), 1,6-1,68 (m, 1H).

10 **Ejemplo 7:** O-5-Cloro-2-tenoigalantamina (=5-clorotiofeno-2-carboxilato de (4aS,6R,8aS)-4a,5,9,10,11,12-hexahidro-3-metoxi-11-metil-6H-benzofuro[3a,3,2-ef][2]benzazepin-6-ol (éster)); sólido blanco hueso; p.f. 58-59 °C.

15 ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7,5 (d, $J = 4,04$ Hz, 1H), 7,80 (d, $J = 4,02$ Hz, 1H), 6,62 (d, $J = 8,04$ Hz, 1H), 6,52 (d, $J = 8,06$ Hz, 1H), 6,31 (d, $J = 10,2$ Hz, 1H), 5,92 (dd, $J = 4,57$ Hz, $J = 10,2$ Hz, 1H), 5,45 (t, $J = 4,36$ Hz, 1H), 4,56 (s, 1H), 4,08 (d, $J = 15,16$ Hz, 1H), 3,81 (s, 3H), 3,61 (d, $J = 15,18$ Hz, 1H), 3,21-3,34 (m, 1H), 2,97-3,04 (m, 1H), 2,64-2,74 (m, 1H), 2,34 (s, 3H), 1,97-2,19 (m, 2H), 1,5-1,57 (m, 1H).

Procedimiento general 2

20 A la solución del ácido correspondiente (13,87 g, 135,8 mmol) en DCM (250 ml), se le añadió DCC (33,62 g, 162,9 mmol), seguido de DMAP (3,32 g, 27,15 mmol), y se agitó la mezcla de reacción durante 30 minutos más a temperatura ambiente. A ésta se le añadieron bromhidrato de (-)-galantamina (10,0 g, 27,15 mmol) y trietilamina (4,6 ml, 32,59 mmol) y se agitó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente bajo argón. Se eliminó la DCHU precipitada por filtración y se evaporó el filtrado. Se eliminó la DCHU adicional por posterior trituración con acetato de etilo frío y filtración. Se rotoevaporó la solución de acetato de etilo y se purificó el producto bruto obtenido por
25 cromatografía en columna, para obtener el producto deseado.

Ejemplo 8:

30 Se obtuvo 2-metilbutanoilgalantamina (=2-metilbutanoato de (4aS,6R,8aS)-4a,5,9,10,11,12-hexahidro-3-metoxi-11-metil-6H-benzofuro[3a,3,2-ef][2]benzazepin-6-ol (éster)) con un rendimiento del 53 % como un sólido usando el procedimiento general 2.

35 También se obtuvo el mismo producto, idéntico en todos los sentidos (HPLC, p.f., ^1H -RMN), con un rendimiento del 58 % usando el procedimiento general 1.

Ejemplo 9:

40 Se obtuvo 2-metilpropanoilgalantamina (=2-metilpropanoato de (4aS,6R,8aS)-4a,5,9,10,11,12-hexahidro-3-metoxi-11-metil-6H-benzofuro[3a,3,2-ef][2]benzazepin-6-ol (éster)) con un rendimiento del 63 % como un sólido usando el procedimiento general 1.

Ejemplo 10:

45 Sal clorhidrato de 2-metilpropanoilgalantamina

A la solución de 2-metilpropanoilgalantamina (150 mg, 0,43 mmol) en acetato de etilo (5 ml), se le añadió lentamente acetato de etilo saturado con HCl (5 ml) con agitación a 0 °C. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 h. Se evaporó el solvente y se lavó el residuo obtenido con éter seco y se secó a alto vacío, para obtener
50 164 mg (97 %) del producto deseado como un sólido blanco hueso.

Análisis calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{NO}_4$ (1,5 HCl): C, 61,2; H, 6,97; N, 3,40. Encontrado: C, 61,62; H, 6,95; N, 3,91.

Ejemplo 11:

55 Sal de ácido cítrico de 2-metilpropanoilgalantamina

A la solución de 2-metilpropanoilgalantamina (150 mg, 0,43 mmol) en metanol (5 ml), se le añadió lentamente una solución de ácido cítrico en metanol (5 ml) con agitación a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 h. Se evaporó el solvente y se precipitó el residuo obtenido con metanol-éter dietílico y se secó a alto vacío, para obtener 187 mg (81 %) del producto deseado como un sólido blanco hueso.
60 Análisis calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{NO}_{11}$ (1,0 H_2O): C, 57,14; H, 6,57; N, 2,47. Encontrado: C, 57,43; H, 6,48; N, 2,53.

Procedimiento general 3

A una solución agitada de bromhidrato de (-)-galantamina (1,10 mmol) en piridina (6 ml) a 0 °C bajo nitrógeno, se le añadió el correspondiente cloruro de ácido (2,2 mmol) y se agitó la mezcla hasta que una TLC mostró que la reacción se hubo completado. Se añadieron entonces CH₂Cl₂ (10 ml) y agua (10 ml) y se continuó agitando durante 30 min. Se separó la capa orgánica, se lavó con agua (2×10 ml), se secó sobre MgSO₄ anhidro y se eliminó el solvente. Se purificó el residuo por cromatografía instantánea y se obtuvo el producto, idéntico en todos los sentidos al producto del ejemplo 1.

Ejemplo 12:

Síntesis de R1-piridinoilgalantamina

Además de los ejemplos facilitados anteriormente, se prepararon los siguientes compuestos mediante los procedimientos generales descritos:

Tabla 2:

	FM	PM	Substituyente R1
	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	355,43	ciclopropanocarboxilato
	C ₂₄ H ₂₃ Cl ₂ NO ₄	460,3	3,4-diclorobenzoato
	C ₂₈ H ₃₃ NO ₄	447,57	4-terc-butilbenzoato
	C ₂₅ H ₂₃ ClF ₃ NO ₄	493,91	4-cloro-3-(trifluorometil)benzoato
	C ₂₅ H ₂₃ F ₃ N ₂ O ₆	504,46	4-nitro-3-(trifluorometil)benzoato
	C ₂₅ H ₂₄ F ₃ NO ₄	459,47	4-(trifluorometil)benzoato
	C ₂₄ H ₂₃ Cl ₂ NO ₄	460,36	2,4-diclorobenzoato
	C ₂₄ H ₂₄ N ₂ O ₆	436,47	4-nitrobenzoato
	C ₂₄ H ₂₄ CINO ₄	425,92	3-clorobenzoato
	C ₂₅ H ₂₄ F ₃ NO ₄	459,47	3-(trifluorometil)benzoato
	C ₂₄ H ₂₄ N ₂ O ₆	436,47	3-nitrobenzoato
	C ₂₄ H ₂₃ Cl ₂ NO ₄	460,36	3,5-diclorobenzoato
	C ₂₆ H ₃₀ N ₂ O ₄	434,54	3-(dimetilamino)benzoato
	C ₂₅ H ₂₇ NO ₄	405,50	3-metilbenzoato
	C ₂₄ H ₂₄ CINO ₄	425,92	2-clorobenzoato
	C ₂₄ H ₂₃ F ₂ NO ₄	427,45	2,4-difluorobenzoato
	C ₂₄ H ₂₃ Cl ₂ NO ₄	460,36	2,5-diclorobenzoato
	C ₂₄ H ₂₄ FNO ₄	409,46	4-fluorobenzoato
	C ₂₆ H ₃₀ N ₂ O ₄	434,54	4-(dimetilamino)benzoato
	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₄	406,49	4-aminobenzoato
	C ₂₇ H ₃₂ N ₂ O ₄	448,57	4-(dimetilamino)-3-metilbenzoato
	C ₂₅ H ₂₅ NO ₆	435,48	2H-1,3-benzodioxolo-5-carboxilato
	C ₂₆ H ₂₇ NO ₅	433,51	4-acetilbenzoato
	C ₂₂ H ₂₃ NO ₄ S	397,50	tiofeno-3-carboxilato
	C ₂₁ H ₂₃ N ₃ O ₄	381,44	1H-imidazolo-5-carboxilato
	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₅	382,42	1,3-oxazolo-5-carboxilato
	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₄ S	398,48	1,3-tiazolo-5-carboxilato
	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₄ S	398,48	1,3-tiazolo-2-carboxilato
	C ₂₆ H ₂₇ NO ₆	449,51	2-(acetiloxi)benzoato

Ejemplo 13

Preparación de homogenado de cerebro de ratón

Se extrae el cerebro del animal (ratón), se congela instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacena a menos 80 °C hasta su uso. Antes de preparar el extracto, se descongela el cerebro congelado sobre hielo y se determina el peso. Se añade tampón helado (NaCl 130 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2,5 mM, MgCl₂ 1 mM, glucosa 5 mM, HEPES 5 mM, pH 7,4) al cerebro de ratón descongelado (1:4, peso a volumen, lo que da como resultado un homogenado de cerebro al 20 %). Se homogeneiza entonces el tejido en un homogeneizador Potter sobre hielo, moviendo el émbolo arriba y abajo 11 veces a 240 rpm. Se divide el homogenado de cerebro de ratón recién preparado en alícuotas.

Ejemplo 14

Procedimiento para medir la inhibición de la esterasa cerebral. Resultados mostrados como figura 1

Se usa una prueba de esterasa de Ellmann modificada. Resumiendo, el método se basa en la escisión de la acetiltiocolina sustrato a acetato y tiocolina. Esta última reacciona con DTNB (5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico)) para dar un compuesto amarillo, que puede ser cuantificado espectrométricamente. El tampón de incubación

contiene 51 mmol/l de tampón fosfato de sodio y un 0,05 % de Tween 20, a pH 7,2 y está suplementado con 100 mg/l de DTNB y un 0,2 % de homogenado de cerebro de ratón (preparado como se describe en el Ejemplo 13). Se añade el compuesto que se ha de investigar a la concentración deseada. Se lleva la mezcla a 37 °C y se inicia la reacción mediante adición de acetilcolina 200 μM. Se mide la A_{405} a intervalos de 1 s en un lector de microplacas durante 40 s. Las partes lineales de las curvas de absorción-tiempo representan la velocidad inicial de la reacción enzimática y se usan para el cálculo de la velocidad de reacción. La pendiente de la curva corresponde a la velocidad de reacción. Se expresa la inhibición como porcentaje de la reacción no inhibida según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 * (1 - (\text{Pendiente}_{\text{inhibida}} / \text{Pendiente}_{\text{no inhibida}})).$$

Ejemplo 15

Procedimiento para la determinación de la escisión del profármaco en homogenado de cerebro de ratón

Se añaden a alícuotas de homogenado de cerebro de ratón preparado según el Ejemplo 13 derivados de progalantamina y se ajustan a una concentración final de 10 μM del profármaco. Al final del tiempo de incubación, se añaden 12 μl de NaOH 0,1 M y 100 μl de KCl saturado al 0,1 ml de mezcla de reacción y se mezcla concienzudamente. Se extraen el resto de profármaco y la galantamina liberada con 200 μl de tolueno. Se repite dos veces la etapa de extracción con tolueno usando 150 μl de tolueno y se juntan los extractos obtenidos, se secan, se disuelven en metanol al 50 % y se usan para posterior análisis por HPLC.

Ejemplo 16

Investigación del efecto de modulación alostérica de los candidatos a fármaco sobre los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) expresados en células HEK-293 por electrofisiología. Resultados mostrados como figura 3

Se plaquearon células HEK-293 individuales que expresaban nAChR $\alpha 4\beta 2$ humano, $\alpha 3\beta 4$ humano o $\alpha 7$ de pollo quimérico (con 5HT₃ de ratón) sobre cubreobjetos revestidos de fibronectina durante 3 días antes de la medición. Se pusieron las células que contenían nAChR seleccionadas en el baño de registro y se llenó con tampón extracelular (NaCl 145 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2 mM, D-glucosa 10 mM, HEPES 10 mM, pH 7,3, aproximadamente 300 mOsm). El sistema de pinzamiento zonal consistía en un microscopio invertido (Zeiss, Alemania), un amplificador de pinzamiento zonal controlado por ordenador con programa PatchMaster (HEKA, Alemania), un sistema de perfusión de tuberías (ALA, EE.UU.) junto con un aplicador de tubo en U (IMM, Alemania) y dobles micromanipuladores. Se obtuvieron las pipetas zonales estirando capilares de vidrio de borosilicato individuales de 100 mm de longitud y 1,5 mm de anchura pulidos al fuego (WPI, Alemania). Se usó un estirador programable (Sutter, EE.UU.) para preparar un par idéntico de pipetas listas para su uso. Se usó cada pipeta zonal (resistencia 4-8 MΩ) sólo una vez. Se llenaron las pipetas con un tampón interno (CsCl 140 mM, EGTA 11 mM, HEPES 10 mM, MgCl₂ 2 mM, pH 7,3, aproximadamente 300 mOsm) y se conectaron al electrodo operativo. Los electrodos operativos y de referencia para los experimentos estaban hechos de alambre de plata recién clorado renovado diariamente (40 mm x 0,4 mm) y estaban conectados a un circuito seguidor de voltaje del amplificador de pinzamiento zonal. Se hizo el parcheo usando pulsos de ensayo rectangulares con una amplitud de -1 mV y una duración de 20 ms. Inmediatamente después de la formación del gigasello, se aplicó el potencial de mantenimiento de -70 mV al electrodo zonal y se establecieron registros de células enteras usando pulsos de presión negativa. Todas las compensaciones necesarias para la capacitancia de membrana rápida y lenta y los transitorios de resistencia seriados fueron automáticamente establecidas en el programa PatchMaster. Se evocaron corrientes de células enteras por aplicación de nicotina a la CE₅₀ para cada subtipo de nAChR apropiado ($\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 3\beta 4$ CE₅₀ = 30 μM, $\alpha 7$ quimérico CE₅₀ = 3 μM). Para evaluar un efecto de ligando potenciador alostérico (APL) de los compuestos seleccionados sobre cada subtipo de nAChR, se les añadió a soluciones de nicotina estimulantes a las siguientes concentraciones: 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1.000, 5.000 y 10.000 nM, y se aplicaron las soluciones a la superficie celular durante pulsos de 500 ms a través del tubo en U, y se registraron entonces las corrientes correspondientes, digitalizadas a 10 kHz, durante 10 s. Se realizaron estimulaciones de corriente consecutivas con un intervalo de 2 min. para evitar la desensibilización de los nAChR y asegurar un intercambio total de soluciones estimulantes. Se compararon las amplitudes de pico promediadas de las corrientes, medidas en presencia de concentraciones de compuestos seleccionadas, con las determinadas en ausencia de compuestos (controles) y se calcularon como % del control. Se repitieron las mediciones del efecto APL de un compuesto particular en un mínimo de cinco células para obtener los valores medios +/- SD. Se trataron los valores medios del efecto APL observado que no pasaban del 15 % como insignificantes. Para presentar un efecto APL dependiente de concentración de un compuesto particular, se representaron los correspondientes % de los valores control +/- SD frente a las concentraciones usadas.

Ejemplo 17

Farmacocinética de la progalantamina Gln-1062 (3 mg/kg) en el ratón, resultados mostrados como figura 4

ES 2 463 715 T3

OBJETIVO DEL ESTUDIO

5 Determinación de los perfiles farmacocinéticos de Gln-1062 y su producto de escisión galantamina en sangre y cerebro. Determinar las razones de concentración cerebro a sangre de Gln-1062 y su producto de escisión galantamina y valorar las capacidades de penetración a través de la barrera hematoencefálica.

PLAN DEL ESTUDIO

Bioanálisis

10 Se evaluó el método analítico para la estimación de Gln-1062 en cuanto a su linealidad, precisión y exactitud y recuperación en sangre y homogenado de cerebro SAM usando LC/MS/MS.

Parámetros de LC/MS/MS

15 Los parámetros de las condiciones cromatográficas y las condiciones de extracción para el análisis de la Gln-1062 y la Galantamina eran

Parámetros cromatográficos:

20

Columna	: Phenomenex Synergi, Polar-RP 80 A, C18, 75 x 2,0 mm, 4 μ
Fase móvil	
Tampón de fase móvil	: Formiato de amonio 40 mM, pH 3,5
Reservorio acuoso (A)	: 10 % Tampón, 90 % Agua
25 Reservorio orgánico (B)	: 10 % Tampón, 90 % Acetonitrilo
Velocidad de flujo	: 0,450 ml/min.

Programa de gradiente:

Tiempo (min.)	Curva de gradiente	% A	% B
0	1	100	0
1,2	1	60	40
3	1	0	100
3,1	1	100	0
5	1	100	0

30

Horario de válvulas de desvío:

Tiempo (min.)	Válvula de desvío	
	Desecho	MS
0	x	
1,2		x
4,5	x	

35

Tiempo de ejecución	: 5,0 min.
Temperatura de horno de la columna	: Ambiente
Temperatura del muestreador automático	: Ambiente
Lavado del muestreador automático	: Agua:acetonitrilo:isopropanol con un 0,2 % de ácido fórmico, 1:1:1 (v/v/v)

40

Tiempo de retención	: Gln-1062 : 3,33 \pm 0,05 min.
	: Galantamina : 2,44 \pm 0,05 min.
	: Metoprolol : 2,80 \pm 0,05 min.

Parámetros de masa (API 3200):

45

Modo	: MRM
Polaridad	: Positiva
Fuente de iones	: Turbopulverización
Analito	: Gln-1062 (Masa Q1 392,4; Masa Q3 213,2)
	: Galantamina (Masa Q1 288,3; Masa Q3 213,1)
50	: Metoprolol (Masa Q1 268,4; Masa Q3 116,2)

Fuente/Parámetros gaseosos:

	Gas cortina (COR)	10
5	Gas de colisión (disociación asociada a colisión) DAC	5
	Voltaje de pulverización de iones (PI)	5.500 V
	Temperatura (TEM)	575 °C
	GS1	55
	GS2	45
10	Calentador de interfase	ON

Parámetros de los compuestos:

Parámetro	Galantamina	Metoprolol	Gln-1062
Potencial de desagrupamiento (V)	45	35	50
Potencial de entrada (V)	10	10	10
Potencial de entrada en la célula por colisión (V)	20	20	20,00
Energía de colisión (eV)	32	26	32
Potencial de salida de la célula por colisión (V)	4,5	2	5
Tiempo de reposo (milisegundos)	200	200	200

15 Procedimiento de extracción:

A. Preparación de PATRÓN, CC y muestras de Estudio

A 50 µl de muestra de estudio/contaminada de sangre/homogenado de cerebro, se les añadieron 150 µl de acetonitrilo frío que contenía Metoprolol (100,03 ng/ml)

20 ↓
Se agitó en vórtice durante 30 segundos.

↓
Se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min. a 4 °C

25 ↓
Se diluyeron 100 µl de sobrenadante con 100 µl de agua milli-Q

↓
Se agitó en vórtice y se transfirió a viales de muestreador automático premarcados.

B. Preparación de patrones de curva de calibración para recuperación

30 A 50 µl de sangre/homogenado de cerebro blanco, se les añadieron 150 µl de acetonitrilo frío que contenía Metoprolol (100,03 ng/ml)

35 ↓
Se agitó en vórtice durante 30 segundos.

↓
Se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min. a 4 °C

↓
Se separó el sobrenadante

40 ↓
Se añadieron 2 µl de solución de contaminación-II a 198 µl del sobrenadante anterior y se agitó en vórtice

↓
Se diluyeron 100 µl de la anterior mezcla con 100 µl de agua milli-Q

45 ↓
Se agitó en vórtice y se transfirió a viales de muestreador automático premarcados

Evaluación del método

Se evaluó este método en cuanto a linealidad, precisión y exactitud y recuperación de Gln-1062 en sangre y homogenado de cerebro SAM.

50 A. Linealidad, precisión y exactitud

Se extrajeron y analizaron una sola curva patrón y seis réplicas de cada uno de tres niveles de control de calidad (CC) (18 CC totales). Se determinó la linealidad de la curva de calibración por un análisis de regresión de mínimos cuadrados ponderado.

55

Criterios de aceptación

- 5 i. Al menos seis de nueve patrones deben tener una exactitud de $\pm 15\%$ con respecto a lo nominal, excepto al límite inferior de cuantificación (LIDC), donde es aceptable $\pm 20\%$.
 - ii. Dos tercios de los CC de lotes y al menos la mitad de los CC en cada nivel deben tener una exactitud calculada de $\pm 15\%$ con respecto a lo nominal.
 - iii. Precisión y exactitud de la media intraensayo
- 10 1. Cuatro de seis CC deben estar disponibles para determinar la exactitud y la precisión.
 - 2. El coeficiente de variación (%CV) intraensayo de cada nivel de CC no debe pasar del 15 % y la exactitud del valor medio para cada validación que se ha de aceptar.

15 En las Tablas 1 y 2, respectivamente, se muestran la linealidad, la precisión y la exactitud de Gln-1062 en matrices de sangre y de homogenado de cerebro.

B. Recuperación

También se evaluó la recuperación de Gln-1062 de las matrices de sangre y de homogenado de cerebro.

20 Se determinó la recuperación cuantificando la concentración de los analitos en muestras de CC matriz extraídas con una curva patrón preparada en matriz de muestra postextracto (extractos blanco) como se describe en 5.3 B.

25 En las Tablas 3 y 4, respectivamente, se muestra la recuperación de Gln-1062 en matrices de sangre y de homogenado de cerebro.

Estudio en animales

Diseño del estudio

Animal	Artículo de ensayo	Dosis (mg/kg)	Conc. dosis (mg/ml)	Volumen de dosis (ml/kg)	Vía de la dosis	Nº de animales por cada punto de tiempo	Puntos de tiempo de muestra (h)
Macho SAM 25-33 g	Gln-1062	3	0,2	15	bolo i.v. (vena de la cola)	3	Predosis, 0,05, 0,10, 0,17, 0,33, 0,50, 0,83, 1,33, 2,0 y 4,0

30 Recogida de muestras

Recogida de sangre:

35 Se recogieron muestras de sangre del plexo retroorbitario. Se recogieron 0,5 ml de sangre en un tubo de microcentrífuga de polipropileno premarcado que contenía citrato de sodio como anticoagulante y se mantuvieron sobre hielo.

40 Se mezcló la sangre suavemente con anticoagulante y se precipitó inmediatamente una alícuota de 50 μ l de muestra de sangre como se describe en la sección 5.3A. Se congeló el volumen restante de la muestra de sangre en cada punto de tiempo sobre hielo seco.

45 Se transfirieron todas las muestras de sangre al departamento analítico y se congelaron a -80 ± 10 °C hasta su análisis.

Recogida de cerebro:

50 Inmediatamente después de extraer la sangre, se perfundió el cerebro con solución salina tamponada con fosfatos (pH 7,4), se extrajo y se congeló sobre hielo seco.

Se transfirieron todas las muestras de cerebro al departamento analítico y se congelaron a -80 °C hasta su análisis.

Preparación del homogenado de cerebro:

Se descongelaron las muestras de cerebro sobre hielo y se pesaron. Se añadió un volumen apropiado de medio de homogeneización helado (metanol:agua 20:80, v/v). Sobre hielo, se homogeneizó la muestra de cerebro con el homogeneizador Polytron y se completó el volumen con medio de homogeneización para obtener 1 g de cerebro por 4 ml de homogenado. Después de homogeneizar, se congelaron inmediatamente las muestras de homogenado de cerebro a -80 °C hasta su análisis.

Ejemplo 18

Índice de comportamiento para los efectos colaterales gastrointestinales en hurones tras la aplicación de galantamina y varias R1-progalantaminas, respectivamente. Se muestran los resultados en la figura 5.

Sistema de ensayo

Se usaron 14 hurones machos adultos *Putoris furo* (Marshall BioResources (North Rose, EE.UU.)), con un peso de 750-1.000 gramos el día de la experimentación, en el presente estudio. De acuerdo con el patrocinador, se incluyeron cuatro de los catorce animales en dos grupos experimentales (Tablas 3 y 4, hurones # 1, 2, 3 y 4).

Alojamiento de los animales

La aclimatación de los animales duró al menos 5 días. En el momento de la recepción, los animales fueron albergados de manera colectiva en jaulas en las dependencias de Syncrosome. Tuvieron libre acceso al alimento y al agua de bebida *ad libitum*.

Artículo de ensayo y compuesto de referencia

Durante este estudio, se estudiaron un compuesto de referencia (Galantamina) y un compuesto candidato de Galantos (GLN979) a dos dosis cada uno. Ambos compuestos fueron administrados I.P. a dosis y concentraciones que se detallan en la tabla 1.

En la tabla 2 se presentan los detalles de los diferentes envíos de compuestos.

Compuesto	Recepción	11 de Noviembre de 2007	21 de Noviembre de 2007	29 de Noviembre de 2007
Galantamina		48,0 mg	256,0 mg (un vial)	-
GLN979		48,0 mg	-	262,6 mg
2-Hidroxipropil-β-ciclodextrina		U.I.: (Un vial)	7,3 g + 7,3 g (Dos viales)	≈ 4,7 g + ≈ 5,0 g
NaCl		U.I.: (Un vial)	3,0 g (Un vial)	-

Tal como pidió el patrocinador, se usó el mismo vehículo (15 % de 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina/NaCl 96 mM) tanto para la preparación de Galantamina como para la de GLN979. Galantos envió por correo un protocolo de solubilización detallado a Syncrosome y se recibió el 5 de Noviembre de 2007.

Compuesto de ensayo (GLN979)

Naturaleza	GLN979.
Masa molar	U.I.
Dosis de administración	20 y 40 mg/kg de peso corporal.
Vía de administración	I.P.
Vehículo	2-hidroxipropil-β-ciclodextrina al 15 %/NaCl 96 mM.

Compuesto de referencia (Galantamina)

Naturaleza	Galantamina
Masa molar	U.I.
Dosis de administración	3 y 20 mg/kg de peso corporal.
Vía de administración	I.P.
Vehículo	2-hidroxipropil-β-ciclodextrina al 15 %/NaCl 96 mM.

Administraciones I.P.

Para los 4 grupos experimentales, las administraciones fueron realizados en animales no anestesiados por vía I.P. a To (figura 1). En la tabla 1 se detallan los volúmenes de administración para cada grupo.

Prueba de emesis

Tras administración I.P. de la solución del compuesto, los animales fueron continuamente observados por un técnico cualificado durante cuatro horas. Durante ese período, se registró el número de episodios de vómito (sucesión de arcadas que dan lugar a la expulsión de parte del contenido gastrointestinal).

Observación del comportamiento

Durante el período de observación de 4 horas, se observaron también varios efectos colaterales (salivación, temblores, problemas respiratorios y diarrea). Para cada uno de estos comportamientos, se determinó un método de puntuación con el patrocinador. Dependiendo de su gravedad, se cuantificó cada parámetro como:

- "Ninguno" (Ninguno): Comportamiento no observado.
- "Moderado" (Mod.): Comportamiento observado con baja frecuencia y/o baja intensidad.
- "Intenso" (Int.): Comportamiento observado frecuente y/o continuamente y/o con gran intensidad.

Criterios de inclusión

Todos los animales que recibieron administración I.P. del compuesto de referencia o del compuesto de ensayo fueron incluidos en el estudio independientemente tanto del patrón de sus respuestas eméticas como del de sus comportamientos.

Ejemplo 19

Reversión de la amnesia inducida por escopolamina en ratones, resultados mostrados como figura 6

Preparación del fármaco

Se disolvieron Gln 1062, Gln 0979 y galantamina en -hidroxipropil- β -ciclodextrina al 15 % en NaCl 96 mM (isotónico) suministrado por el patrocinador. Se usaron Gln 1062 y Gln 0979 a concentraciones de 0,01, 0,03, 0,1 y 0,2 mg/ml, las cuales, cuando se dan en un volumen de 10 ml/kg, dan lugar a dosis de 0,1, 0,3, 1 y 2 mg/kg i.p., respectivamente. Se usó galantamina a concentraciones de 0,03, 0,1, 0,2 y 0,5 mg/ml, las cuales, cuando se dan en un volumen de 10 ml/kg, dan lugar a dosis de 0,3, 1, 2 y 5 mg/kg i.p., respectivamente. Los animales control recibieron una inyección de -hidroxipropil- β -ciclodextrina al 15 % en NaCl 96 mM como vehículo.

Se disolvieron nicotina (sal hidrógeno tartrato de (-)-nicotina, Sigma, Francia) y escopolamina (clorhidrato de (-)-escopolamina, Sigma, Francia) en suero salino (NaCl al 0,9 %, Aguettant, Francia) a una concentración de 0,04 y 0,1 mg/ml, respectivamente. Se administraron en un volumen de dosificación de 10 ml/kg para alcanzar dosis de 0,4 y 1 mg/kg, respectivamente.

Animales de ensayo

Se usaron ratones CD-1 machos de cuatro a cinco semanas de edad (Janvier; Le Genest St Isle - Francia) para el estudio.

Se les albergó en grupos (10 ratones por jaula) y se les mantuvo en una habitación con temperatura controlada (21-22 °C) y un ciclo de luz-obscuridad invertido (12 h/12 h; luces encendidas: 17:30 - 05:30; luces apagadas: 05:30 - 17:30) con alimento y agua disponibles *ad libitum*.

Diseño experimental

Se evaluó la propiedad de aumento cognitivo potencial de Gln 1062, Gln 0979 y galantamina en ratones tratados con escopolamina en el modelo de alternancia del laberinto T en las mismas condiciones experimentales. Se estudiaron tanto Gln 1062 como Gln 0979 a dosis de 0,1, 0,3, 1 y 2 mg/kg i.p. Se estudió la galantamina a dosis de 0,1, 0,3, 1, 2 y 5 mg/kg i.p. Se estudió la nicotina a una dosis de 0,4 mg/kg i.p. Todos estos compuestos fueron administrados inmediatamente después de la inyección de 1 mg/kg i.p. de escopolamina (20 min. antes de la prueba del laberinto T), usada para inducir déficit de memoria.

Se valoró el rendimiento de memoria mediante el porcentaje de alternancia espontánea en el laberinto T. Se usó el número de alternancia en ratones a los que se había inyectado suero salino como nivel base de rendimiento de memoria inalterado.

Se albergó a los ratones a razón de 10 por jaula. Se asignó aleatoriamente a cada ratón de una jaula un número único (de 1 a 10) escrito en la cola con tinta permanente.

Se estudiaron Gln 1062, Gln 0979 y galantamina por separado en tres grupos de experimentos con diferentes animales. Se dividió cada grupo de experimentos en series de experimentos diarios que siempre incluían al menos uno representativo de cada uno de los grupos de suero salino/vehículo, escopolamina/vehículo y escopolamina/nicotina (0,4 mg/kg).

5 Medición

10 El aparato del laberinto T estaba hecho de Plexiglás gris con un tronco principal (55 cm de largo × 10 cm de ancho × 20 cm de alto) y dos brazos (30 cm de largo × 10 cm de ancho × 20 cm de alto) situados en un ángulo de 90 grados con respecto a la izquierda y a la derecha del tronco principal. Una caja de inicio (15 cm de largo × 10 cm de ancho) estaba separada del tronco principal por una puerta de guillotina. Estaban presentes puertas horizontales para cerrar brazos específicos durante la tarea de alternancia de elección forzada.

15 El protocolo experimental consiste en una sola sesión, que comienza con 1 prueba de "elección forzada", seguida de 14 pruebas de "libre elección". En la primera prueba de "elección forzada", se confina al animal durante 5 s en el brazo de partida y se le libera luego mientras el brazo objetivo izquierdo o derecho está bloqueado por una puerta horizontal. Después de liberar al ratón, éste recorrerá el laberinto y entrará eventualmente en el brazo objetivo abierto, y regresará a la posición de partida. Inmediatamente después del regreso del animal a la posición de partida, se abre la puerta objetivo cerrada y el animal es ahora libre de elegir entre el brazo objetivo izquierdo y derecho ("pruebas de libre elección"). Se considera que el animal ha entrado cuando pone sus cuatro patas en el brazo. Una sesión finaliza y se retira al animal del laberinto tan pronto como se han realizado 14 pruebas de libre elección o han transcurrido 10 min., lo que quiera que ocurra primero. La duración media de una prueba es de 6 min.

25 Se limpia el aparato entre cada animal usando alcohol (70°). Se retiran la orina y las heces del laberinto.

Durante las pruebas, se minimizan tanto como sea posible la manipulación de los animales y la visibilidad del operador.

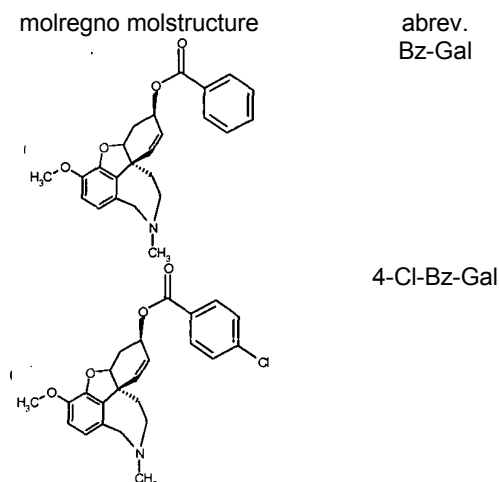
30 Se determinó el porcentaje de alternancia a lo largo de las 14 pruebas de libre elección para cada ratón y se usó como índice de rendimiento de memoria operativo. Se definió este porcentaje como entrada en un brazo diferente del laberinto T a lo largo de pruebas sucesivas (es decir, izquierdo-derecho-izquierdo-derecho, etc.).

Análisis estadístico

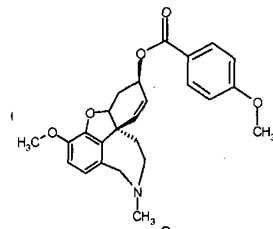
35 Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) sobre los datos de los resultados. Se usó la Diferencia Mínima Significativa Protegida de Fisher para las comparaciones por parejas. Valores de $p \leq 0,05$ fueron considerados significativos. Se calculó la reversión inducida por el fármaco del déficit de memoria inducido por escopolamina estableciendo la respectiva respuesta del grupo de suero salino/vehículo como el 100 % y del grupo de escopolamina/vehículo como el 0 % de reversión.

40 Con objeto de determinar la DE_{50} para cada fármaco, se representó el rendimiento de recuperación siguiendo un modelo de dosis-respuesta sigmoideo (programa graphpad). Se leyó la DE_{50} a partir de la tabla de ajuste de curva y representa la dosis eficaz asociada al 50 % de respuesta.

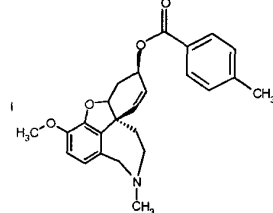
45 **Tabla A**



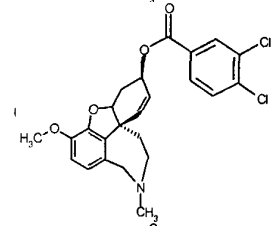
ES 2 463 715 T3



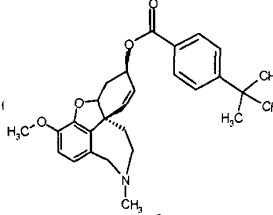
4-MeO-Bz-Gal



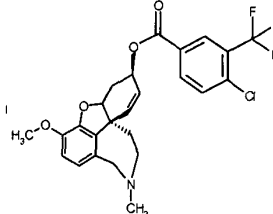
4-Me-Bz-Gal



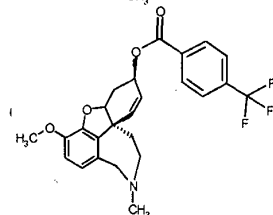
3,4-Cl₂-Bz-Gal



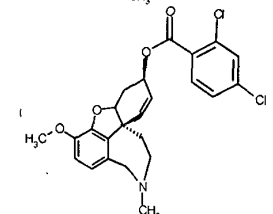
4-tBu-Bz-Gal



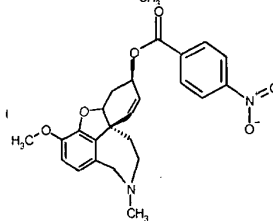
3-CF₃-4-Cl-Bz-Gal



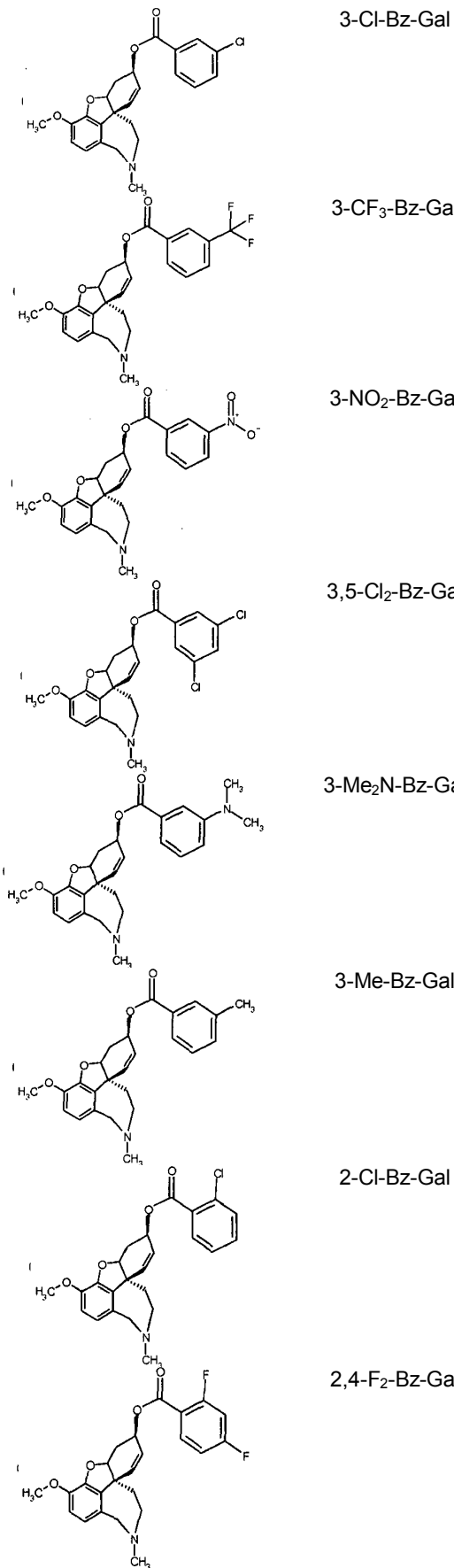
4-CF₃-Bz-Gal

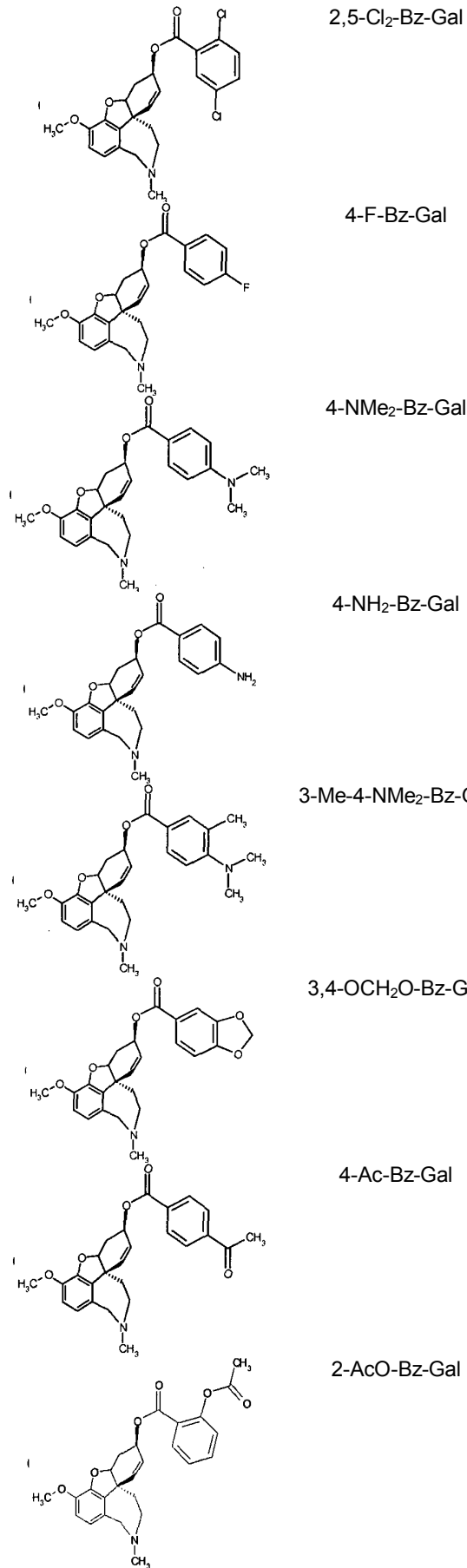


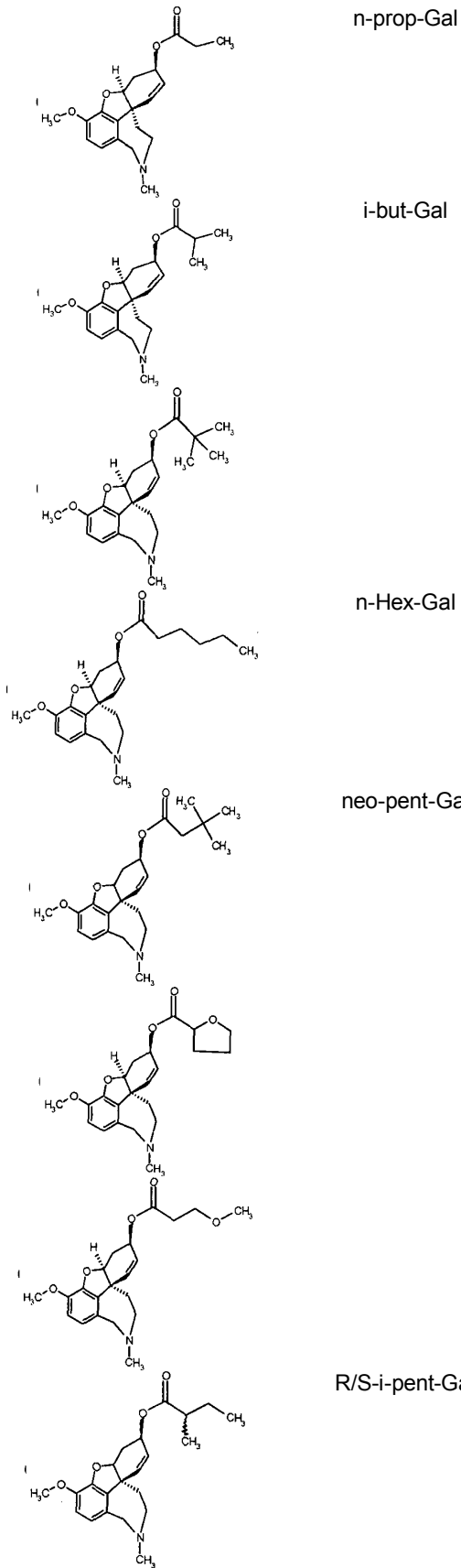
2,4-Cl₂-Bz-Gal

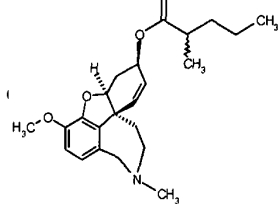
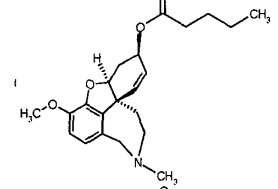
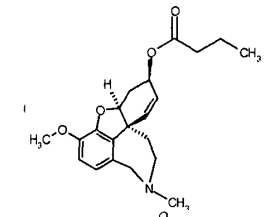


4-NO₂-Bz-Gal

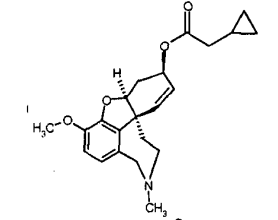
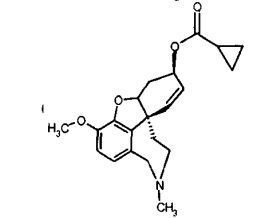




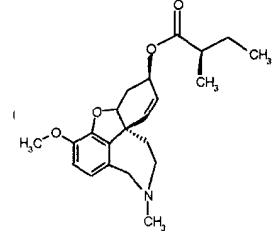




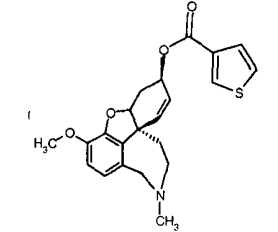
CyBu-Gal



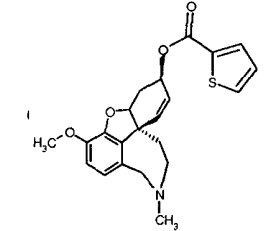
R/S-i-pent-Gal

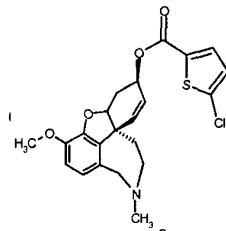


3-Th-Bz-Gal

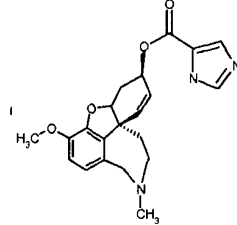


2-Th-Bz-Gal

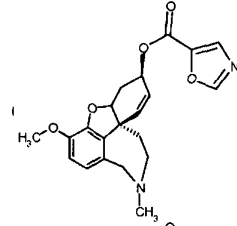




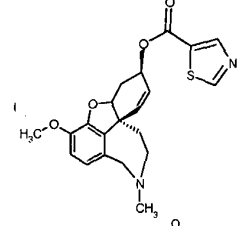
5-Cl-2-Th-Bz-Gal



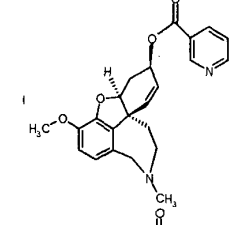
5-Im-Bz-Gal



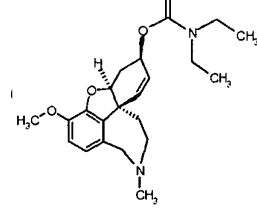
5-OA-Bz-Gal



5-Th-Bz-Gal

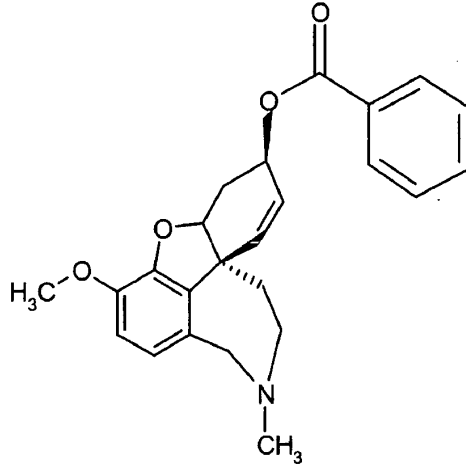


Nic-Gal



REIVINDICACIONES

1. Profármaco de galantamina según la siguiente fórmula



[GLN 1062]

5

para uso como medicamento en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa o psiquiátrica o neurológica asociada a un déficit colinérgico, donde la enfermedad es seleccionada entre la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson, otros tipos de demencia, esquizofrenia, epilepsia, deficiencias de oxígeno y nutrientes en el cerebro tras hipoxia, anoxia, asfixia y parada cardíaca, diversos tipos de envenenamiento, anestesia, particularmente anestesia neuroléptica, autismo, delirio posoperatorio y/o delirio posoperatorio subsindrómico, consecuencias del abuso de alcohol y de fármacos, deseo intenso adictivo de alcohol y de nicotina y consecuencias de la radioterapia.

10

2. Composición farmacéutica que comprende un profármaco de galantamina según GLN 1062 para uso como medicamento en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa o psiquiátrica o neurológica asociada a un déficit colinérgico según la reivindicación 1.

15

Figura 1

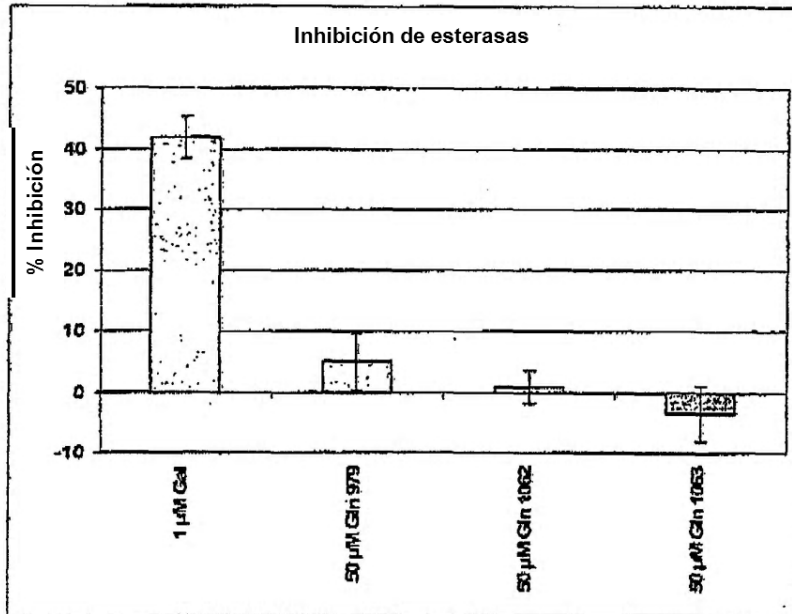


Figura 2

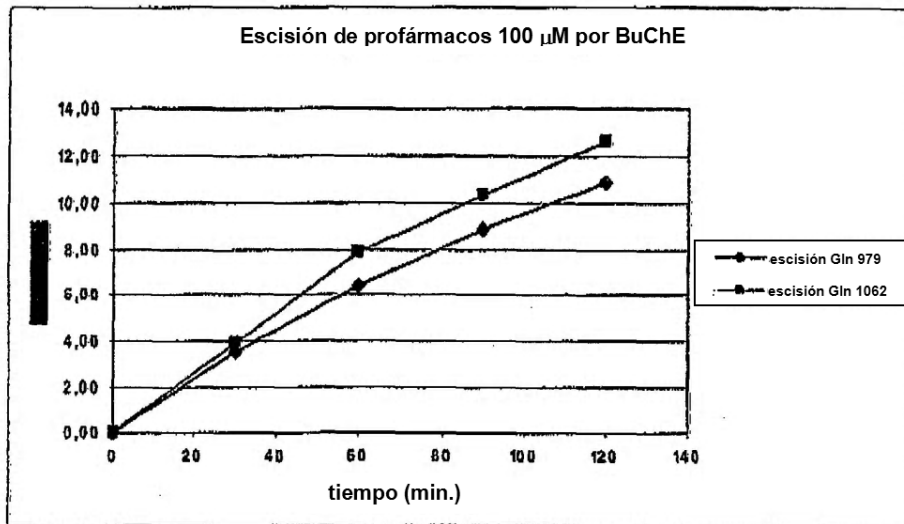


Figura 3

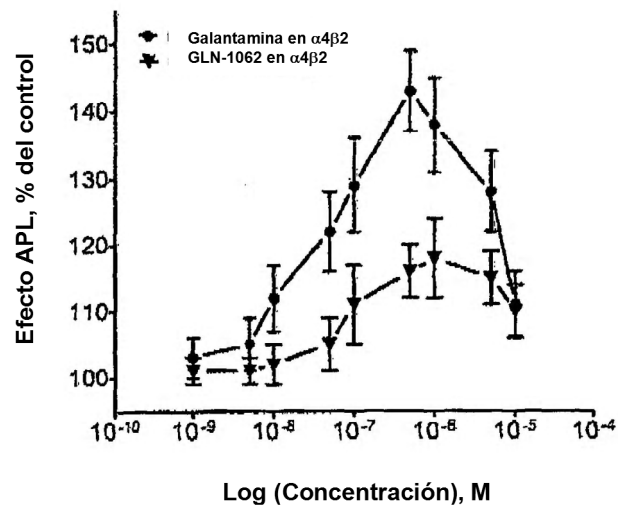


Figura 4a

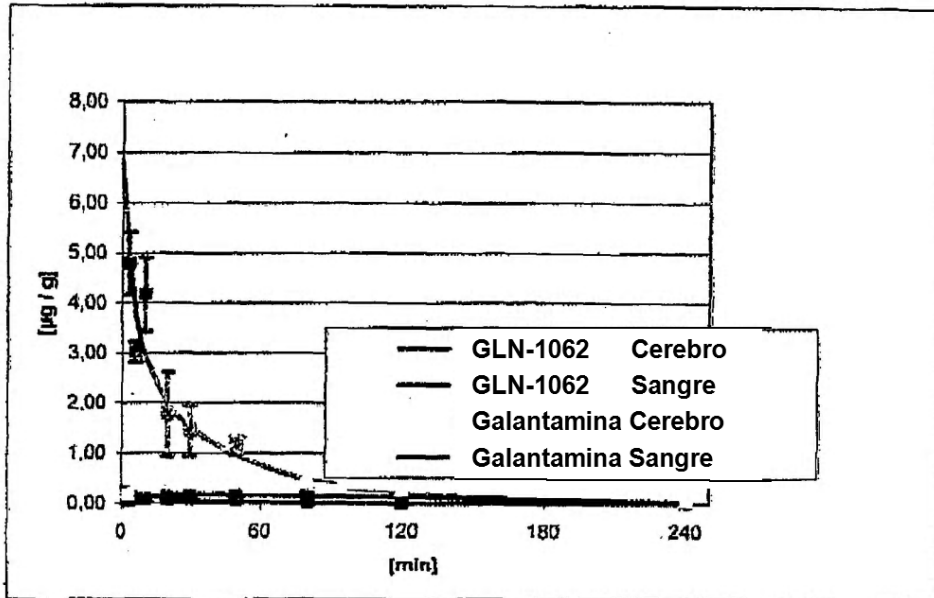


Figura 4b

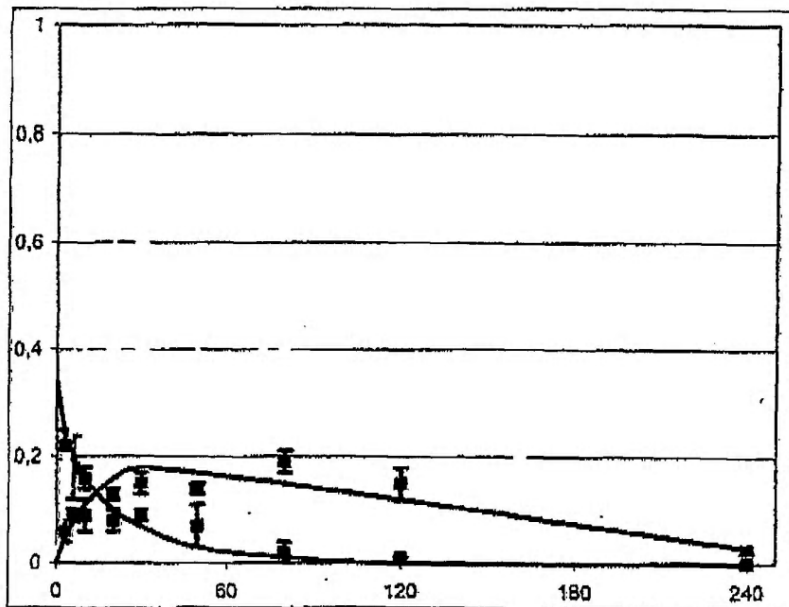


Figura 5

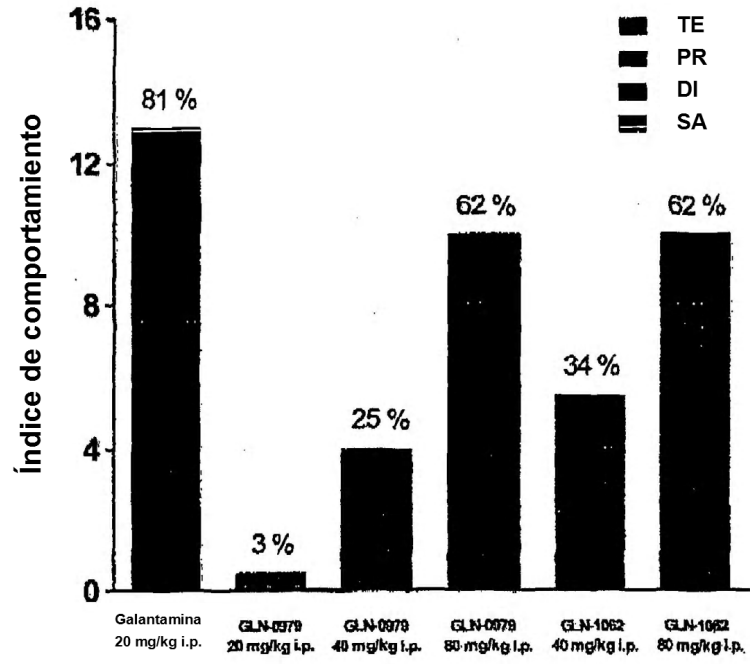
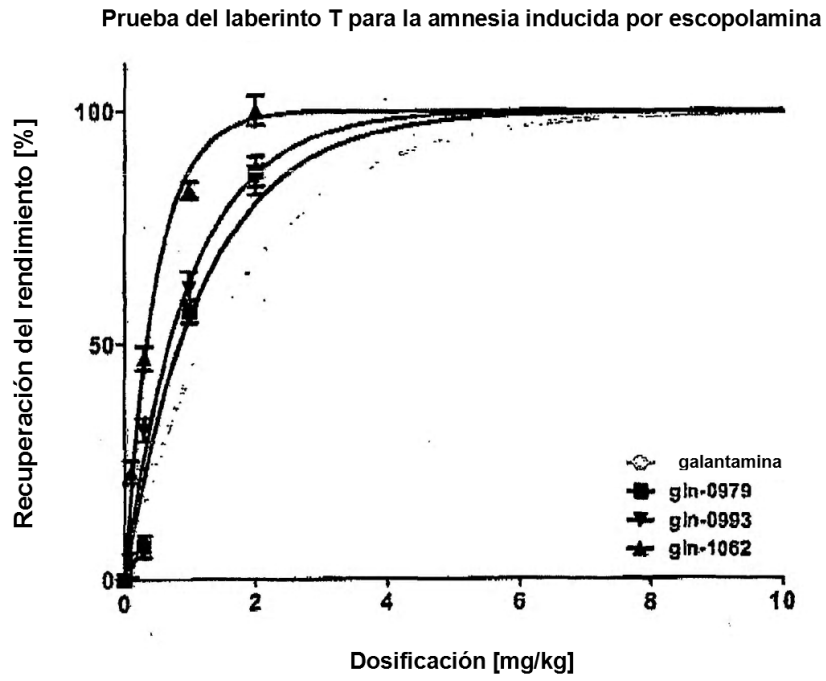


Figura 6



	Galantamina	GLN-0979	GLN-0993	GLN-1062
CE_{50}	1,2 mg/kg	0,9 mg/kg	0,7 mg/kg	0,3 mg/kg