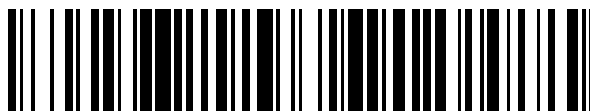


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 498 681**

51 Int. Cl.:

C07C 231/02 (2006.01)

C07C 233/31 (2006.01)

C07C 233/91 (2006.01)

C07D 295/185 (2006.01)

C07D 233/86 (2006.01)

A61K 31/165 (2006.01)

A61K 31/395 (2006.01)

A61P 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2009 E 09734632 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014 EP 2268605**

54 Título: **Derivados de ácidos grasos con alta palatabilidad para administración oral**

30 Prioridad:

21.04.2008 IT RM20080214

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

25.09.2014

73 Titular/es:

BERNI CANANI, ROBERTO (25.0%)

Via Posillipo 54

80123 Napoli Na, IT;

CALIGNANO, ANTONIO (25.0%);

MAZZONI, ORIETTA (EREDI) (25.0%) y

CORUZZO, ANNA (25.0%)

72 Inventor/es:

BERNI CANANI, ROBERTO;

CALIGNANO, ANTONIO;

MAZZONI, ORIETTA (EREDI) y

CORUZZO, ANNA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 498 681 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 ácidos grasos con alta palatabilidad para administración oral

Campo de la invención

La presente invención se refiere a derivados de ácidos grasos administrables por vía oral, en particular, derivados de ácido butírico. La invención se refiere también a formulaciones que los contienen y a su uso clínico. Más particularmente, la invención se refiere a nuevos compuestos derivados de ácido butírico, útiles para todas las aplicaciones clínicas conocidas de este último y que presentan características fisicoquímicas adecuadas para una administración oral fácil, en el sentido de que carecen de las propiedades organolépticas desagradables que caracterizan al butirato. Además, los nuevos compuestos son fáciles de sintetizar y presentan buena solubilidad y estabilidad de almacenamiento

Estado de la técnica

Es bien conocido que los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) son ácidos débiles que contienen de 2 a 5 átomos de carbono (pK 4,8) y que su producción endógena deriva de la fermentación bacteriana de oligo-polisacáridos y, en menor grado, de proteínas, péptidos y glicoproteínas por la flora saprófita intestinal normal. Desde un punto de vista cuantitativo, los AGCC principales derivados a partir de la fermentación de hidratos de carbono son, en orden y con referencia a los aniones correspondientes, butirato, acetato, propionato, formiato, valerato y caproato, mientras se forman isobutirato, 2-metil-isobutirato e isovalerato en menores cantidades a través del catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina, isoleucina). Desde un punto de vista cuantitativo, los AGCC son los aniones más importantes presentes en el lumen del colon, donde alcanzan una concentración total de más de 100 mM. Cada AGCC tiene características específicas y efectos fisiológicos distintivos. Cada día, a nivel intestinal, una persona produce aproximadamente 5 g de butirato, que está presente en el lumen del colon a una concentración de 10-30 mM y es la fuente principal de energía alternativa a la glucosa, para las células epiteliales del colon. En realidad, el 60-70% de la energía consumida por estas células deriva del butirato. Es conocido también que la dependencia de las células epiteliales del colon del butirato como una fuente de energía aumenta desde el colon proximal al distal. Potencialmente, los AGCCs son absorbidos por cada segmento digestivo intestinal, tal como se ha demostrado en modelos animales y en voluntarios humanos. Los enterocitos son capaces de captar butirato, propionato y acetato principalmente a través de la difusión no iónica y la absorción paracelular. La absorción de estos ácidos grasos tiene un impacto considerable sobre la absorción de NaCl y, en general, sobre el equilibrio hidroelectrolítico. En particular, el butirato es capaz de ejercer un potente estímulo pro-absorción a nivel intestinal sobre el transporte electroneutral de NaCl y un potente efecto inhibitor sobre la secreción de Cl^- . Este efecto regulador pro-absorción/antiselector sobre el transporte transepitelial de fluidos se produce a través de una serie de mecanismos diferentes, tales como:

- estimulación de la absorción de NaCl a través de la acción combinada de dos sistemas de transporte presentes en el borde en cepillo del enterocito, Cl^-/HCO_3^- y Na^+/H^+ y $Cl^-/butirato$ y Na^+/H^+ ;
- inhibición de la secreción de Cl^- a través de la inhibición de la actividad del co-transportador Na-K-2Cl (NKCC1) presente en el lado basolateral del enterocito.

Estudios *in vitro* han demostrado que el butirato tiene un efecto inhibitor sobre la secreción de Cl^- inducida por prostaglandina E_2 , fosfocolina y toxina del cólera. Este efecto es debido a la producción intracelular reducida de AMP cíclico secundaria a la regulación de la expresión y la actividad de la adenilato ciclasa. Estudios comparativos demuestran que el efecto pro-absorción del butirato en condiciones basales y su efecto inhibitor sobre agentes secretores potentes, son mucho mayores en términos tanto de potencia como de duración del efecto con respecto a otros AGCC.

Estudios *in vivo* en animales han demostrado que el butirato tiene un efecto preventivo sobre una posible inflamación a nivel intestinal debido a una dieta rica en salvado y fibras que puede ser irritante para la mucosa intestinal. Una confirmación de su eficacia la proporciona el hecho de que, al favorecer la absorción, permite a los cerdos conseguir un peso óptimo en períodos de tiempo más cortos (Mazzoni M et al, J Nutr. Agosto 2008; 138 (8):1426-1431; Biagi G et al, J Anim Sci. 2007 Mayo; 85 (5):1184- 91. Epub 12 de Febrero de 2007). En el ser humano, el butirato se usa como un suplemento dietético en rectocolitis ulcerosa debido a su capacidad para reducir el número de descargas diarreicas y mantener una buena función del intestino grueso.

Además de los efectos sobre el transporte transepitelial intestinal de fluidos, el butirato es un potente estimulante de trofismo de la mucosa intestinal a través de mecanismos vasculares, hormonales y neuronales. Una reducción en las concentraciones de butirato a nivel intestinal está asociada con aumento de la inflamación de la mucosa y alteraciones de la motilidad y de diversas funciones implicadas en los mecanismos de crecimiento, diferenciación y reparación de la mucosa, hasta el punto de aumentar el riesgo de cáncer. Al mismo tiempo, el butirato es capaz de regular negativamente el crecimiento de las células tumorales intestinales.

Con referencia específica al campo de la gastroenterología, los estudios clínicos realizados en niños con diarrea aguda

inducida por *V. cholerae* han demostrado una reducción en el volumen fecal y una recuperación más rápida en los pacientes que, además de recibir terapia de rehidratación, introdujeron precursores amida resistentes de AGCC en su dieta (Ramakrishna BS et al. New. Engl. J. Med. 2000; 324:308-31.316; Rabbani GH, et al, Dig Dis Sci 1999; 44:1547-1553). Estos resultados fueron confirmados también en otras formas de diarrea infecciosa en niños y en estudios en modelos animales (Rabbani BS et al, Gastroenterology 2001; 121: 554-56; Alam NH et al, Gastroenterology 1997; 112: A; Alam NH et al, Pediatr. Drugs 2003; 5:151-165). Los mecanismos de estos efectos terapéuticos son atribuibles a la acción de pro-absorción de los AGCCs y, particularmente, del butirato, sobre el transporte transepitelial de fluidos a nivel intestinal, capaz de contrarrestar las pérdidas fecales en el curso de la diarrea, reduciendo de esta manera la duración y la gravedad de la afección (Sellin JH et al, Gastroenterology 1998; 114:737-747; Mush MW et al Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol 2001; 280:687-693). Debido a su importante efecto regulador sobre la absorción de fluidos a nivel intestinal, el butirato ha sido usado con éxito en pacientes con cloridorea congénita, una enfermedad genética autosómica recesiva grave caracterizada por diarrea crónica severa con inicio neonatal (Berni Canani R et al., Gastroenterology 2004; 127:630-634). Este estudio demuestra que la administración oral de butirato, a la dosis de 100 mg/kg/día, es capaz de reducir considerablemente el número de evacuaciones/día y aumentar la consistencia de las heces, hasta una completa normalización de los movimientos intestinales. Este efecto terapéutico es el resultado tanto de la estimulación del co-transportador de Cl⁻/butirato como de la regulación de los mecanismos de síntesis y expresión, al nivel de la membrana plasmática de los enterocitos, de moléculas responsables del transporte transepitelial de fluidos en el intestino. Estas propiedades hacen que el uso terapéutico de butirato sea plausible, también en otras enfermedades del tracto gastrointestinal caracterizadas por un defecto en los mecanismos de transporte de fluidos y nutrientes.

El butirato desempeña también un papel central en el mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal. Experimentos *in vivo* en modelos animales demostraron que el butirato tiene un efecto trófico sobre el intestino, mediado por el aumento de gastrina y dependiente de la integridad de los sistemas nerviosos simpático y parasimpático (Reilly KJ et al. Gut 1995; 37: 81-86). Sus efectos sobre el transporte transepitelial de fluidos y sobre el trofismo de la mucosa intestinal hacen del butirato el instrumento terapéutico potencialmente ideal para la prevención y la cura de trastornos gastrointestinales en el curso de la terapia con antibióticos y, principalmente, para la diarrea asociada a antibióticos (DAA), que afecta al 15-40% de los sujetos que toman este tipo de medicamentos (Mortensen PB et al., Scand. J. Gastroenterol. Supl. 1996; 216: 132-148; Krishnan S et al. Scand. J. Gastroenterol. 1998; 33:242-246). Una vez más, los efectos sobre el transporte transepitelial de fluidos y sobre la motilidad intestinal apoyan el uso terapéutico de butirato en el tratamiento de trastornos funcionales gastrointestinales caracterizados por alteración de la motilidad, tales como el síndrome del intestino irritable (Scarpellini E. et al., Dig. Liver Dis. 2007; Suppl.1:19-22). La evidencia en la literatura sugiere un posible uso del butirato en el tratamiento de enfermedades intestinales inflamatorias crónicas. El butirato induce la curación clínica e histológica de la colitis experimental inducida en ratas por medio de ácido trinitrobencenosulfónico (Butzner JD et al, Gut 1996; 38: 568-573). En el curso de la rectocolitis ulcerosa (URC) hay un metabolismo alterado de los AGCCs en las células epiteliales del colon (Roediger WEW, Lancet 1980; 2:712-715), que causa bajas concentraciones intraluminales de estos ácidos grasos. Se ha postulado que las bajas concentraciones de AGCC encontradas en pacientes con URC severa pueden contribuir al daño de la mucosa (Chapman MAS et al, Gut 1994; 35:73-76). En diferentes estudios clínicos, el butirato administrado localmente (a través de enemas) en pacientes con URC proporcionó resultados positivos, acelerando el proceso clínico de curación endoscópico e histológico, cuando se administra en combinación con otros medicamentos anti-inflamatorios, tales como mesalazina (Scheppach et al., Dig. Dis. Sci. 1991; 36:185-187; Bruer RI et al, Gut 1997.; 40:485-491; Vernia P et al, Dig. Dis. Sc. 1995; 40:305-307). La eficacia de la combinación butirato/mesalazina se confirmó también en estudios que usaron formulaciones de administración oral (Vernia P et al, Dig. Dis. Sci. 2000; 45:976-981).

Hay indicios en la literatura de que las poblaciones con una baja incidencia de enfermedades del colon (incluyendo también cáncer de colon) tienen una dieta rica en hidratos de carbono, los principales precursores de los AGCCs. El efecto protector del butirato contra el desarrollo de cáncer de colon y poliposis está bien documentado en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*: de hecho, el butirato es capaz, de inhibir el crecimiento de las principales líneas de células de tumor de colon *in vitro*, reduciendo la proliferación y estimulando la diferenciación y la apoptosis. Hay evidencia de un efecto antineoplásico directo del butirato mediante la regulación de la transcripción de diversos genes implicados en el proceso de oncogénesis (L Boffa et al, J. Biol. Chem. 1981; 256: 9.612-9.621; Avivi-Green C et al., Oncol. Res. 2000; 12: 83-95). Sin embargo, este efecto protector del butirato está condicionado por el tiempo de exposición con respecto al proceso de tumorigénesis (Basson MD et al, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1998; 217: 476-483; Hague A et al, Int. J. Cancer 1993; 55: 498-505; Heerdts BG et al, Cancer Res. 1994; 54:3.288-3.294; Lupton JR., Am. Soc. Nutr. Sci. 2004; 134:479-482).

El 4-fenilbutirato de sodio (4PBA), un análogo de butirato administrado por vía oral, se considera como un potencial medicamento para el tratamiento de la fibrosis quística (en pacientes con una mutación $\Delta F 508$). En realidad, 4PBA y, más recientemente 2,2-dimetilbutirato (ST20) y el ácido alfa-metil-hidro-cinámico (ST7), son capaces de inducir una mayor expresión de CFTR en el nivel del epitelio respiratorio tanto *in vitro* como *in vivo* (Rubenstein RC et al, J. Clin. Invest. 1997; 100:2.457-2.465; Nguyen TD et al., Biochem. Bioph. Res. Com. 2006; 342:245-252).

En el campo de la hematología, el butirato es conocido como un inductor de la producción de hemoglobina fetal (HbF)

mediante la estimulación selectiva de la actividad de los genes que codifican para las cadenas gamma-globina (Ikuta T et al, Blood 1998; 92:2.924-2.933). Esta acción condujo a su uso en pacientes con β -talasemia intermedia, en los que un ligero aumento de HbF induce una reducción de la hematopoyesis extramedular con una reducción significativa de la morbilidad y una mejora en la calidad de vida (Olivieri NF et al., Lancet 1997; 350:491-492; Faller DV et al, Curr. Opin. Hematol. 1995; 2:109-117).

En los primeros ensayos realizados en pacientes con talasemia, el cumplimiento del tratamiento fue limitado debido a que se necesitaban infusiones intravenosas durante 4 días a intervalos de 3-4 semanas. Más tarde, se demostró que los compuestos de ácido butírico activos por vía oral (fenilacetato de sodio y de 4-fenilbutirato de sodio) eran capaces de aumentar la producción de HbF en pacientes con anemia de células falciformes. El tratamiento oral con isobutiramida, a la dosis de 350 mg/kg/día en pacientes que padecen β -talasemia prolongó el intervalo de transfusión y redujo la sobrecarga de hierro. En la actualidad, sin embargo, el uso de butirato y sus análogos fuera de los ensayos clínicos controlados no se ha generalizado debido a la falta de cumplimiento demostrada también con las formulaciones orales.

Con referencia a las enfermedades metabólicas genéticas, 4-fenilbutirato de sodio ha sido aprobado por la US Food and Drug Administration (FDA) para su uso en pacientes con un déficit de enzimas del ciclo de la urea, en la que actúa como un eliminador de amoniaco. De hecho, 4-fenilbutirato de sodio se oxida a fenilacetato, que se une a glutamina y causa su excreción urinaria. En pacientes con deficiencias de ornitina transcarbamilasa, el uso de 4-fenilbutirato de sodio proporciona un mejor control metabólico y una mayor captación de proteínas naturales con la dieta (Burlina AB et al, Molecular Genetics and Metabolism 2001; 72:351- 355). También se está investigando el posible uso de 4-fenilbutirato de sodio en el tratamiento de la adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X (ALD-X), un trastorno de peroxisomas caracterizado por un metabolismo alterado y acumulación de ácidos grasos de cadena muy larga. 4-fenilbutirato de sodio, independientemente de si se usa *in vitro* sobre fibroblastos de pacientes con ALD-X, o en *in vivo* en cobayas knockout para ALD-X, provoca un aumento en la oxidación beta de los ácidos grasos de cadena muy larga e induce la proliferación de peroxisomas (Kemp S et al, Nat Med 1998; 4:1261-1268).

Finalmente, se ha demostrado más recientemente que la administración oral de butirato es capaz de prevenir y tratar la resistencia a la insulina y el aumento de peso en un modelo animal de rata obesa. Estos efectos son atribuibles, al menos en parte, a la estimulación de gasto de energía y de una serie de funciones mitocondriales y abren nuevas perspectivas de uso interesantes en el campo de la prevención y el tratamiento de trastornos metabólicos asociados con la obesidad.

A partir de los datos científicos en la bibliografía y de la experiencia clínica de una serie de equipos de investigación, emerge un amplio espectro de posibilidades para el uso terapéutico de butirato mediante administración oral y una ausencia de efectos adversos importantes.

Algunos productos basados en butirato están disponibles comercialmente, pero su uso es todavía muy limitado y en gran medida insuficiente con relación al amplio espectro de posibles indicaciones, especialmente en enfermedades crónicas en las que se prevé un uso a largo plazo del compuesto. El principal problema es debido a las dificultades relativas a la disponibilidad de formulaciones de butirato que sean fáciles de administrar por vía oral, especialmente para sujetos pediátricos y, sobre todo, a la extremadamente pobre palatabilidad de los productos disponibles comercialmente en la actualidad. El sabor y olor extremadamente desagradables hacen que la administración oral de los productos basados en butirato disponibles en la actualidad sea extremadamente difícil, y estas dificultades son aún más marcadas en los sujetos pediátricos, en los que la administración de dichos productos ha demostrado ser muy difícil. Los problemas relacionados con posibles formulaciones farmacéuticas de butirato resultan del hecho de que el producto presenta características fisicoquímicas particulares. El ácido butírico o n-butanico ($C_4H_8O_2$), a temperatura ambiente, se presenta como un líquido denso caracterizado por un intenso olor a queso rancio, muy desagradable, y con el tiempo experimenta fenómenos de degradación que alteran su estabilidad. En esta forma, los fenómenos oxidativos son más evidentes, y las formas farmacéuticas normales (jarabes, cápsulas y comprimidos) no son aplicables, con la excepción, dentro de ciertos límites, de las cápsulas de gelatina blanda, cuyo uso, sin embargo, no es posible en lactantes ni en la primera infancia. Los derivados de ácido butírico más fáciles de obtener son las sales de metales alcalinos y alcalinotérreos, las cuales, a su vez, presentan inconvenientes que no son, de ninguna manera, insignificantes. Las sales de sodio se presentan como sólidos con un buen grado de higroscopicidad y un fuerte olor butírico. Las sales de calcio, a pesar de tener una forma sólida, tienen solubilidad muy pobre en agua y las sales de magnesio, también sólidas, son delicuescentes. De todos modos, las sales de calcio y magnesio mantienen también su fuerte olor característico. La literatura citada anteriormente proporciona abundante evidencia de las desventajas relacionadas con el sabor y olor extremadamente desagradables, y los trastornos epigástricos relacionados debidos a la ingesta oral de butirato o sus derivados, y de sus análogos de cadena lineal o ramificada con hasta 6 átomos de carbono. Esto sucede, por ejemplo, con la administración de fenilbutirato de sodio o isobutiramida en los estudios clínicos de pacientes con talasemia (Collins AF et al, Blood 1998; 85:43-49; Reich S et al, Blood 2000; 96:3.357-3.362). En base a las consideraciones anteriores, existe una necesidad evidente de disponer de una formulación de butirato (o una formulación de ácidos grasos de cadena lineal o ramificada con hasta 6 átomos de carbono) que mantenga su eficacia terapéutica, pero que al mismo tiempo permita una la administración oral fácil del producto, gracias también a una mejor palatabilidad, al tiempo que presente costes limitados. Dicho producto se prestaría de manera óptima a los tratamientos a largo plazo y sería útil también en el campo de la

medicina. Teniendo en cuenta las posibles modificaciones químicas de ácido butírico para obtener un derivado que presente características de buena estabilidad y solubilidad, ausencia de olor y sabor y una palatabilidad aceptable, y que sea no higroscópico en estado sólido y sea fácil de sintetizar y purificar, cabe señalar que los cloruros de ácidos grasos reaccionan rápidamente en un medio anhidro tanto con alcohol como con grupos amina, obteniéndose como productos de reacción, ésteres y una serie de moléculas farmacológicamente activas. Los ésteres presentan la ventaja de tener un olor agradable, en la medida en que los ésteres metílicos y etílicos de butirato se usan como agentes saborizantes y aromatizantes en el campo de la alimentación, pero se presentan generalmente como aceites o sólidos delicuescentes de bajo punto de fusión, y esto no resuelve las dificultades debidas al estado líquido, ni los de su estabilidad en el aire. Además, la forma esterificada es poco estable en un medio ácido, y al pH gástrico, la hidrólisis provoca la formación del ácido y el alcohol a partir de los cuales se derivan estos ésteres, con la consiguiente liberación de ácido butírico, que presenta de nuevo, aunque en menor medida, los problemas de palatabilidad indicados anteriormente. Los derivados de éster de butirato se describen, por ejemplo, en la patente US 5763488, que, para uso clínico en enfermedades relacionadas con β -hemoglobina, propone la administración oral de profármacos que consisten en ésteres de butirato con treitol. Dichos derivados se proponen con el objetivo de mejorar la biodisponibilidad de butirato, pero el documento no tiene en cuenta los aspectos relacionados con la palatabilidad de los medicamentos orales basados en este ingrediente activo.

Con referencia específica a las enfermedades gastrointestinales, la solicitud de patente internacional N° WO 98/40064 propone el uso, mediante administración oral, de profármacos de butirato con ácido láctico. El objetivo es superar las desventajas debidas a las malas propiedades farmacocinéticas del butirato y obtener fármacos orales que ofrezcan una buena biodisponibilidad y una vida media satisfactoria, permitiendo la liberación efectiva del butirato en el plasma. En este caso, el documento tampoco tiene en cuenta el aspecto de la palatabilidad de un medicamento oral basado en butirato. Ahora, se ha encontrado que algunos derivados de amida de AGCCs y, en particular de ácido butírico, resuelven los problemas indicados anteriormente.

Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1-5 muestran las variaciones en la corriente de cortocircuito (Isc) como una función del tiempo (minutos). El efecto era dependiente de la dosis. En particular:

La Figura 1 muestra los efectos de la adición de butirato de Na sobre la Isc en células Caco-2 montadas en una cámara de Ussing. La disminución en Isc causada por la adición de butirato de Na en el lado de la mucosa indica la absorción de iones. Los datos se expresan como promedios de tres experimentos. La sustancia se añadió en el tiempo cero;

La Figura 2 muestra los efectos de la adición del compuesto 1 (Ejemplo 1) sobre la Isc en células Caco-2 montadas en una cámara de Ussing. La disminución en la Isc causada por la adición del compuesto 1 en el lado de la mucosa indica la absorción de iones. Los datos se expresan como promedio $\pm$ de tres experimentos. La sustancia se añadió en el tiempo cero;

La Figura 3 muestra los efectos de la adición del compuesto 2 (Ejemplo 1) sobre la Isc en células Caco-2 montadas en una cámara de Ussing. La disminución en la Isc causada por la adición del compuesto 2 en el lado de la mucosa indica la absorción de iones. Los datos se expresan como promedio $\pm$ de tres experimentos. La sustancia se añadió en el tiempo cero;

La Figura 4 muestra los efectos de la adición del compuesto 3 (Ejemplo 1) sobre la Isc en células Caco-2 montadas en una cámara de Ussing. La disminución en la Isc causada por la adición del compuesto 3 en el lado de la mucosa indica la absorción de iones. Los datos se expresan como promedio $\pm$ de tres experimentos. La sustancia se añadió en el tiempo cero;

La Figura 5 muestra los efectos de la adición de la mezcla de compuestos 1, 2 y 3 (Ejemplo 1) sobre la Isc en células Caco-2 montadas en una cámara de Ussing. La disminución en la Isc causada por la adición de la mezcla de compuestos 1, 2 y 3 en el lado de la mucosa indica la absorción de iones. Los datos se expresan como promedio $\pm$ de tres experimentos. La sustancia se añadió en el tiempo cero.

Descripción detallada de la invención

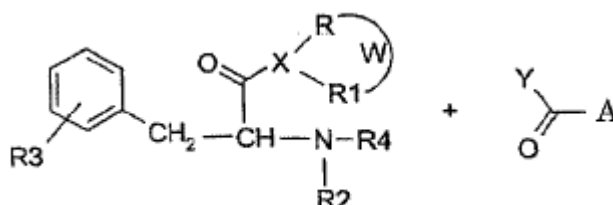
En el contexto de los estudios que han conducido a la presente invención, se consideró que los derivados de amida de AGCCs, particularmente de ácido butírico, se presentan generalmente en forma sólida, sin olor y sin sabor, son más estables que los ésteres a pH gástrico y son capaces de liberar el ácido correspondiente mediante hidrólisis alcalina a nivel del intestino delgado y grueso. Esta característica farmacocinética hace que estos derivados sean potenciales profármacos con propiedades particulares en términos de liberación prolongada en el intestino, lo que constituye una diana terapéutica muy importante, respondiendo de una manera particularmente eficaz a la necesidad de dianas precisas para los fármacos.

Según la invención, se ha encontrado que la síntesis de amidas de AGCCs de cadena lineal y ramificada, usando moléculas altamente biocompatibles desprovistas de toxicidad, tales como aminoácidos de origen natural, y entre estos últimos particularmente fenilalanina, proporciona derivados con todas las características organolépticas y fisicoquímicas necesarias para un uso óptimo del producto final como un fármaco oral indicado en el campo de la medicina, también para la terapia o el tratamiento a largo plazo de enfermedades crónicas. Entre los diversos aminoácidos naturales disponibles más abundantemente, la fenilalanina ofrece el mejor derivado de amida por sus características organolépticas y fisicoquímicas, produciendo productos cristalinos sólidos inodoros e incoloros y permite una purificación particularmente económica en términos de relación coste:rendimiento. Particularmente preferida, según la invención, es una amida de butirato estable en medio ácido con el aminoácido fenilalanina, fenilalanina-butiramida (FBA), que se presenta como una forma sólida, poco higroscópica, fácil de pesar, estable a ácidos y álcalis y capaz de liberar ácido butírico a nivel de intestino grueso y delgado de una manera constante en el tiempo. Este producto, para el que los estudios de toxicidad descritos más adelante en la presente memoria han demostrado un perfil toxicológico comparable al del butirato, presenta características fisicoquímicas claramente más adecuadas para un amplio uso clínico que este último. Un aspecto particular de FBA es que no tiene el olor desagradable del butirato y prácticamente no tiene sabor, lo que permite superar la principal limitación para el uso del butirato en el campo terapéutico, concretamente, su mala palatabilidad. Además, la solubilidad de FBA en agua es satisfactoria ya que produce soluciones transparentes hasta la concentración de 0,1 M y suspensiones a concentraciones más altas.

El derivado de amida de ácido butírico con fenilalanina, o los derivados adecuados de este último, se preparan haciendo reaccionar el derivado de fenilalanina apropiado con cloruro de butiroilo, o un derivado equivalente de ácido butírico (véase Y en la reivindicación 1) en un disolvente inerte polar aprótico orgánico, a temperatura ambiente. Después de esta reacción se forma el derivado de monobutiroilo, que es el componente principal en términos cuantitativos, acompañado también, según la estructura de los productos de partida, por el derivado de dibutiroilo del compuesto de fenilalanina inicial y otros derivados que son el resultado, por ejemplo, de la ciclación del producto principal durante la reacción.

Aunque es posible aislar y purificar los compuestos obtenidos por medio de técnicas conocidas, también se ha observado, según la invención, que la mezcla de reacción puede ser aplicada ventajosamente sin separación previa en los componentes constituyentes individuales y que, también en este estado, muestra las propiedades fisicoquímicas, organolépticas y farmacocinéticas apropiadas.

Por lo tanto, un objeto específico de la presente invención es proporcionar una mezcla de derivados amida de ácido butírico obtenible haciendo reaccionar un derivado de dicho ácido graso con un derivado de fenilalanina según la fórmula general siguiente:



en la que:

Y representa un átomo halógeno;

A representa $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$;

X representa nitrógeno;

R y R_1 representan independientemente hidrógeno o un grupo alquilo (C_{1-6}) o un grupo acilo (C_{1-6}) y W es nulo; o

W representa una cadena 1,2-alquileo con 2 a 6 átomos de carbono y R y R_1 son grupos metileno;

R_2 y R_4 representan independientemente, hidrógeno o un grupo alquilo (C_{1-6}) o un grupo acilo (C_{1-6});

R_3 es seleccionado de entre el grupo que consiste en H, alquilo (C_{1-6}), alcoxilo (C_{1-6}), halógeno, oxidrilo, ciano, nitro, amino, mono- o di- alquilamino (C_{1-6}), acilamino (C_{2-6}), formilo, hidroxiiminometilo, alcoxiiminometilo (C_{1-6}) y carbamoilo;

con las condiciones siguientes: considerando que se ha comprendido lo descrito anteriormente, los derivados según la presente invención incluyen sus sales con bases o ácidos farmacéuticamente aceptables y sus posibles formas diastereoisoméricas y enantioméricas.

Los grupos alquilo C₁-C₆ definidos para los propósitos de la presente invención pueden ser lineales o ramificados, y son esencialmente metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isopentilo, n-hexilo y sus análogos, mientras que los grupos alcoxilo C₁-C₆ son seleccionados preferiblemente de entre el grupo que consiste en metoxilo, etoxilo, propoxilo, isopropoxilo, butoxilo, 2-metilpropoxilo y tert-butoxilo.

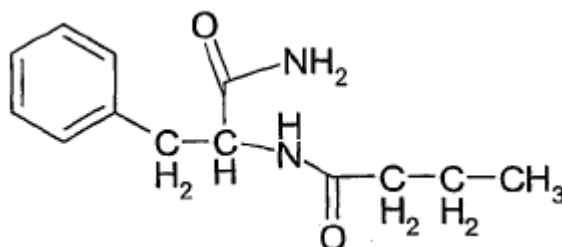
También para los propósitos de la presente invención, una cadena alquilenos puede ser lineal o ramificada, tal como, por ejemplo, etileno, 1,3-propileno, 2-metiletileno, 1,4-butileno, 2-metil-1, 3-propileno, 2-etiletileno, 1,5-pentileno, 2-etil-1,3-propileno, 2-metil-1,4-butileno y similares, mientras que halógeno se refiere esencialmente a flúor, cloro, bromo y yodo. En la forma de, y según la nomenclatura química actual, un grupo acilo C₂-C₆ identifica esencialmente acetilo, propionilo, butiroilo, pentanoilo, pivaloilo, hexanoilo y similares. Los términos alcoxilo, alquilamino, acilamino, alcoximinometilo y carbamoilo tienen también los significados según la nomenclatura en la técnica.

Los compuestos o mezclas de compuestos según la invención se preparan haciendo reaccionar los dos compuestos indicados anteriormente, preferiblemente en cantidades sustancialmente equimoleculares, en un disolvente orgánico inerte polar aprótico tal como, por ejemplo, benceno, tolueno o cloroformo, a temperatura ambiente, de la mezcla de reacción, preferiblemente durante un período de tiempo de cuatro a veinticuatro horas, seguido de una o más etapas de separación y purificación del producto obtenido, preferiblemente mediante recristalización. En caso de que el derivado de fenilalanina se hace reaccionar con el derivado de butiroilo, se obtendrá una mezcla de derivados de butirilo, donde el producto principal consistirá en el monoderivado con otros productos de reacción tales como derivado de dibutirilo y el derivado cíclico indicado más adelante, en la presente memoria.

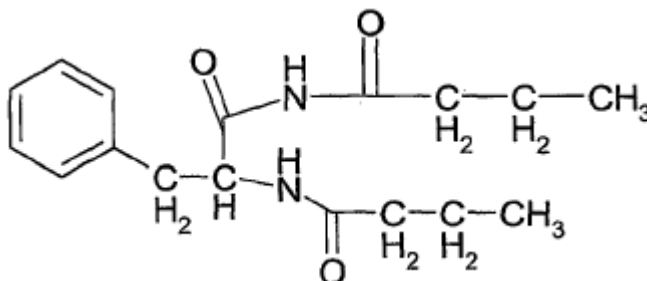
Según algunas realizaciones específicas, un objeto de la invención es derivado amida de un ácido graso de cadena corta según se describe en la reivindicación 1.

Según otra forma de realización específica, el objeto de la presente invención es una mezcla de derivados amida de ácido butírico obtenible haciendo reaccionar un haluro de butiroilo con un derivado de fenilalanina según el esquema definido anteriormente, y sus sales con bases o ácidos farmacéuticamente aceptables, así como sus posibles diastereoisómeros y enantiómeros. Particularmente ventajosa para los propósitos de la invención es una mezcla obtenida llevando a cabo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 y que comprende sustancialmente los tres compuestos siguientes:

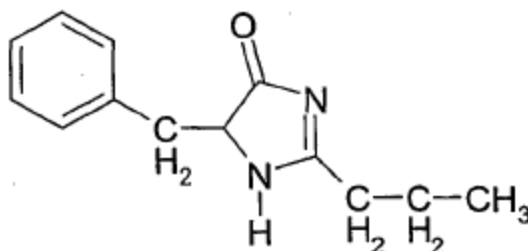
N-(1-carbamoil-2-fenil-etil)butiramida (Compuesto 1), de fórmula:



N-(1-butyroil-carbamoil-2-fenil-etil)butiramida (Compuesto 2), de fórmula:



5-bencil-2-propil-1H-imidazol-4(5H)-ona (Compuesto 3), de fórmula:



Los compuestos obtenidos de esta manera pueden ser usados en mezclas de los mismos o pueden ser aislados y purificados según técnicas conocidas. Pueden ser aislados como formas libres y como las sales de bases o ácidos farmacéuticamente aceptables correspondientes, añadiendo una cantidad adecuada de la base o ácido elegido a las formas libres o al medio de reacción. Los ejemplos de dichas sales son sales de sodio y potasio, sales de amonio, etilendiamina y bases nitrogenadas alifáticas o aromáticas, clorhidratos, sulfatos, ácidos alifáticos o aromáticos farmacéuticamente aceptables. Los compuestos de la invención y los compuestos de las mezclas según la presente invención, teniendo en cuenta la naturaleza de los sustituyentes A, X, R, R₁, R₂ y R₃, así como el grupo fenilo, muestran al menos un centro quiral; por lo tanto, pueden existir como formas racémicas o como posibles formas diastereoisoméricas que pueden obtenerse con los procedimientos familiares para el químico experto. Por ejemplo, uno de estos procedimientos implica cromatografía preparativa en placas con un soporte quiral, usando un sistema eluyente apropiado. Tal como se ha indicado anteriormente, los posibles diastereoisómeros de los compuestos reivindicados constituyen un objeto adicional de la presente invención. Es importante señalar que los compuestos identificados, así como sus sales con bases o ácidos farmacéuticamente aceptables, mantienen los efectos a nivel intestinal descritos anteriormente con relación al butirato. Los datos experimentales para esta comprobación se obtuvieron en modelos *in vitro* de epitelio intestinal humano. En otro aspecto, un objeto de la invención es el uso de uno o más derivados amida de ácidos grasos de cadena corta, particularmente derivados de ácido butírico que pueden obtenerse mediante la reacción descrita anteriormente, o de sus mezclas tal como se define en la reivindicación 9, para la fabricación de una preparación farmacéutica y, más particularmente, una preparación útil para el tratamiento y la prevención de las enfermedades en seres humanos o animales.

Los posibles usos terapéuticos de los compuestos o mezclas según la invención se resumen en la tabla siguiente.

Tabla - Indicaciones terapéuticas para ácidos grasos de cadena corta

Enfermedades gastrointestinales	Tumores gastrointestinales; gastroenteritis aguda; diarrea crónica inespecífica; diarrea del viajero; diarrea asociada a los antibióticos; síndrome del intestino irritable; cólera; cloridorea congénita; diarrea por sodio congénita; diarrea secretora crónica; fibrosis quística; enfermedad inflamatoria intestinal crónica (CIBD); enteropatía inducida por malnutrición; atrofia de la mucosa inducida por la nutrición parenteral total; enteropatía inducida por radioterapia o quimioterapia; síndrome del intestino corto e insuficiencia intestinal; prevención y tratamiento de adenocarcinoma de colon; poliposis intestinal; reservitis; enterocolitis alérgica
Enfermedades hematológicas	β-talasemia intermedia; anemia de células falciformes
Enfermedades metabólicas genéticas	Deficiencia de ornitina transcarbamilasa; adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X (ALD-X)
Obesidad	Resistencia a la insulina; síndrome metabólico

Finalmente, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden, como ingrediente activo, al menos un compuesto de la fórmula general (I) y sus derivados corresponden, preferiblemente al menos a uno de los derivados amida de ácido butírico definidos anteriormente o, más preferiblemente, la mezcla de tres compuestos 1, 2 y 3, junto con uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacológicamente aceptables. Tal como se ha descrito en la introducción, el tipo de composición de la invención que resulta ser más ventajoso para los propósitos terapéuticos indicados es una composición formulada para la administración oral, que hace posible mejorar el cumplimiento del paciente, especialmente en terapias crónicas y en uso pediátrico o veterinario. Las preparaciones farmacéuticas adecuadas para la administración oral pueden estar, por ejemplo, en forma de comprimidos, cápsulas, jarabes, soluciones y suspensiones bebibles, gotas, granulados, preparaciones para administración sublingual o en formulaciones tópicas, cutáneas o gastrointestinales, o preparaciones administrables parenteralmente, también en combinación con otros ingredientes activos incluyendo

medicamentos, suplementos dietéticos, alimentos funcionales, nutracéuticos y dispositivos médicos.

Las características específicas de la invención, así como las ventajas de la misma y el modo de síntesis química correspondiente, serán más evidentes con referencia a la descripción detallada presentada meramente como una serie de ejemplos a continuación, junto con los resultados de los experimentos llevados a cabo sobre la misma y los datos que la comparan con la técnica anterior.

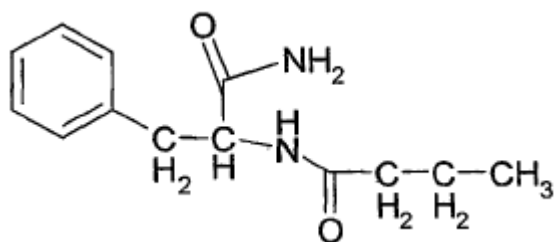
Ejemplo 1

Procedimiento de síntesis

Se disolvieron 0,01 mol de carboxamida fenilalanina y 0,01 mol de cloruro de butiroilo en 50 ml de cloroformo y la mezcla resultante se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante veinticuatro horas.

La mezcla, evaporada en vacío, proporcionó un residuo sólido de color blanco que se lavó con una solución de bicarbonato sódico al 1%. La solución acuosa de bicarbonato se extrajo dos veces con un volumen igual de acetato de etilo para recuperar una fracción adicional de la mezcla de derivados. Para aislar los componentes individuales, la mezcla tratada de esta manera se procesó mediante cromatografía en una columna de gel de sílice, usando diclorometano como eluyente, obteniendo los tres compuestos caracterizados a continuación. Los tres compuestos se recrystalizaron con una mezcla de cloroformo/n-hexano 1:1 v:v, obteniendo un rendimiento final igual o mayor que el 50% de compuesto 1, y porcentajes similares de los compuestos 2 y 3.

Compuesto 1: N-(1-carbamoyl-2-fenil-etil)butiramida

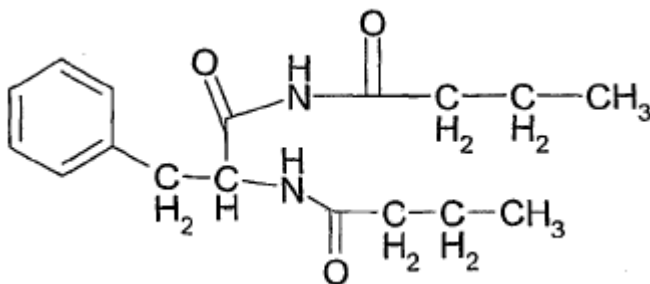


^1H -RMN: 7,34-7,22 (5H, m); 6,23 (1H, bd); 5,99 (1H, NH₂); 5,54 (1H, NH₂); 4,71 (1H, dd); 3,06 (2H, dd); 2,11 (2H, t); 1,59 (2H, t); 0,87 (3H, q).

P. f.: 186-9°C. PMC (Peso Molecular Calculado) 234.

Rendimiento: $\geq 50\%$ en peso sobre el total de los tres compuestos.

Compuesto 2: N-(1-butyroil-carbamoyl-2-fenil-etil)butiramida

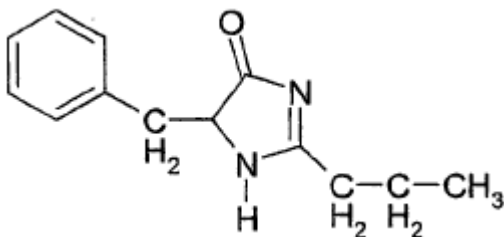


^1H -NMR: 9,25 (1H, bs); 7,25-7,18 (5H, m); 6,38 (1H, bd); 4,97 (1H, m); 2,18 (1H, dd); 2,89 (1H, dd); 2,58 (2H, t); 2,15 (2H, t); 1,59 (4H, m); 0,92 (3H, t); 0,82 (3H, t).

P.f.: 198-9°C PMC 304

Rendimiento: $\sim 20\text{-}30\%$ en peso sobre el total de los tres compuestos.

Compuesto 3: 5-bencil-2-propil-1H-imidazol-4(5H)-ona



5

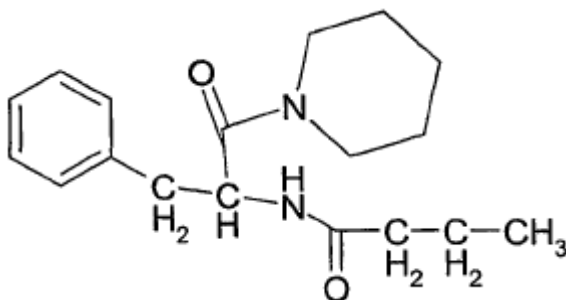
¹H-RMN: 7,34-7,22 (5H, m); 5,88 (1H, bd); 5,20 (1H, m); 3,08 (2H, dd); 2,18 (2H, t); 2,11 (2H, t); 1,61 (2H, m); 0,87 (3H, t).

P.f.: 151-2°C. PMC 216.

10 Rendimiento: ~ 20-30% en peso sobre el total de los tres compuestos.

Ejemplo 5

Compuesto 7: N-(1-oxo-3-fenil-1-piperidin-1-il)propan-2-il)butiramida

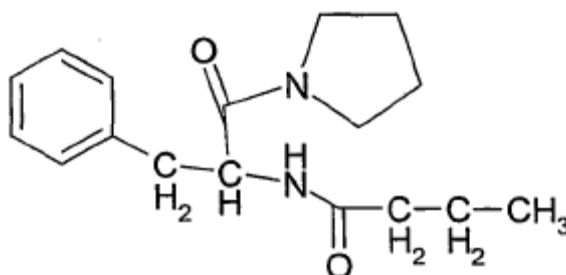


15

20 El compuesto 7 se preparó de la misma manera que el compuesto 4 en el Ejemplo 2, usando 0,01 moles de 2-amino-3-fenil-1-(piperidin-1-il)propan-1-ona y recristalizando con una mezcla de cloroformo/n-hexano 2:1 v:v. Se obtiene un rendimiento final del 90%

Ejemplos 6-14

Compuesto 8: N-(1-oxo-3-fenil-1-pirrolidin-1-il)propan-2-il)butiramida

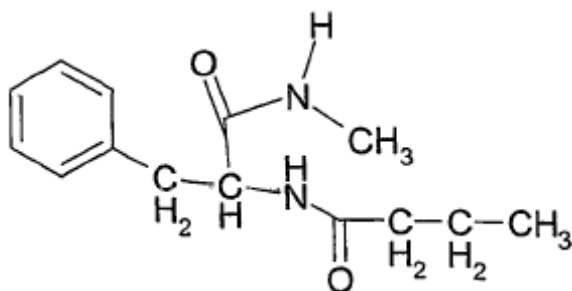


25

30

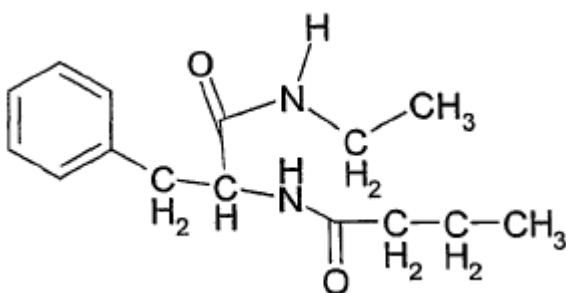
Compuesto 9: N-(1-(metilcarbamoil)-2-feniletil)butiramida

5



Compuesto 10: N-(1-(etilcarbamoil)-2-feniletil)butiramida

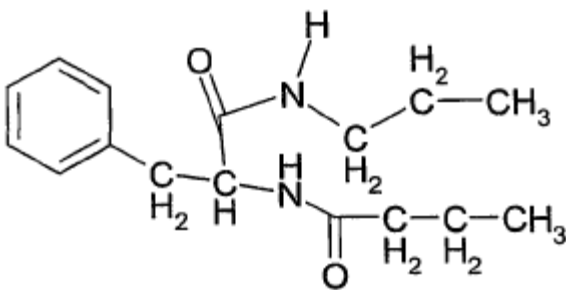
10



15

Compuesto 11: N-(1-(propilcarbamoil)-2-feniletil)butiramida

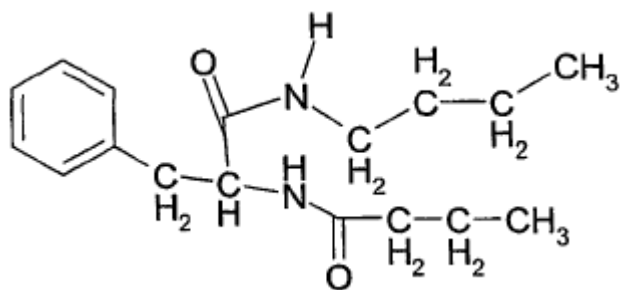
20



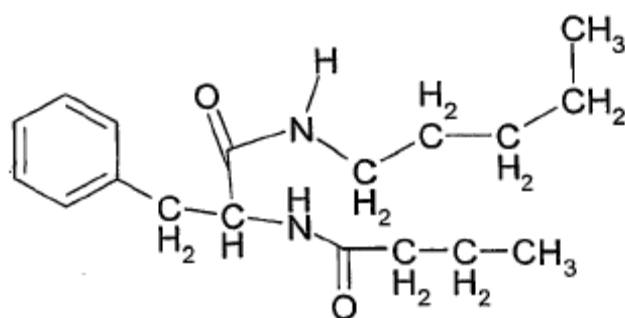
25

Compuesto 12: N-(1-(butilcarbamoil)-2-feniletil)butiramida

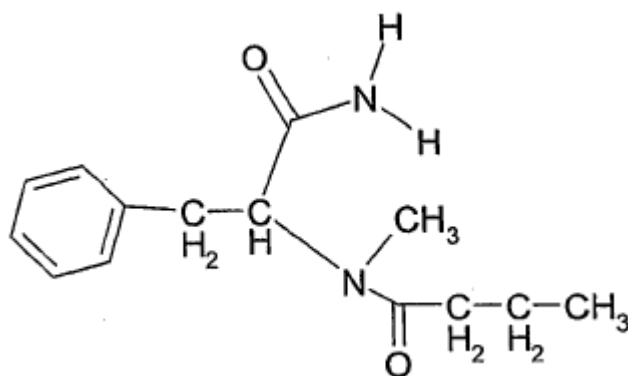
30



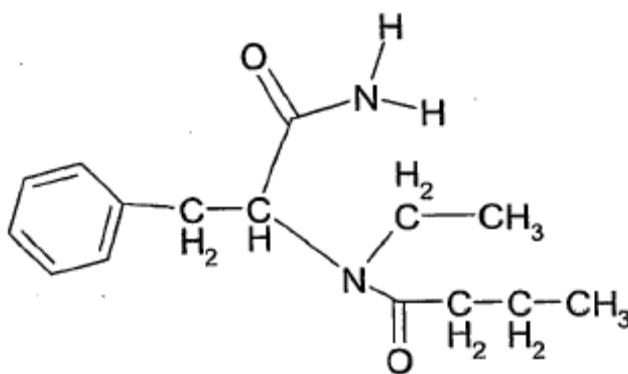
Compuesto 13: N-(1-(pentilcarbamoil)-2-feniletil)butiramida



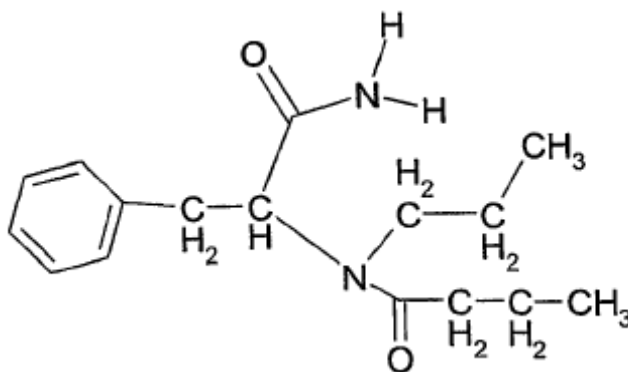
Compuesto 14: N-(1-carbamoil-2-feniletil)-N-metil-butiramida



Compuesto 15: N-(1-carbamoil-2-feniletil)-N etilbutiramida



Compuesto 16: N-(1-carbamoil-2-feniletil)-N-propilbutiramida



Los compuestos 8-16 se prepararon de la misma manera que el compuesto 7 en el Ejemplo 5, usando 0,01 moles de:

2-amino-3-fenil-1-(pirrolidin-1-il) propan-1-ona para el compuesto 8;

2-amino-N-metil-3-fenil-propanamida para el compuesto 9;

5 2-amino-N-etil-3-fenil-propanamida para el compuesto 10;

2-amino-3-fenil-N-propil-propanamida para el compuesto 11;

2-amino-N-butil-3-fenil-propanamida para el compuesto 12;

2-amino-N-pentil-3-fenil-propanamida para el compuesto 13;

2-(metilamino)-3-fenil-propanamida para el compuesto 14;

10 2-(etilamino)-3-fenil-propanamida para el compuesto 15;

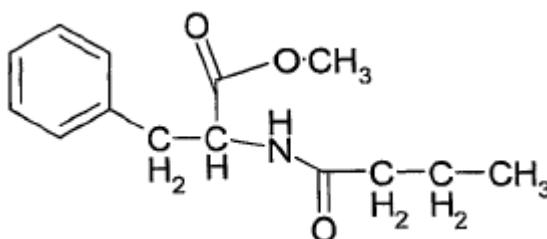
3-fenil-2-(propilamino)propanamida para el compuesto 16;

y obteniendo un rendimiento final del 90% para cada compuesto preparado.

De manera similar a la preparación de los productos descritos en los Ejemplos 1 y 5-14, se prepararon amidas, sustituyendo isobutiroilo, valeroilo, isovaleroilo, fenilbutiroilo y cloruro de fenivaleroilo para el cloruro de butiroilo.

15 **Ejemplo 15 (comparativo)**

Éster metílico de ácido 2-butirilamino-3-fenilpropiónico



Se disolvieron 0,01 mol de éster metílico de fenilalanina y 0,01 mol de cloruro de butiroilo en 50 ml de diclorometano anhidro y la mezcla resultante se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante cuatro horas.

25 La mezcla, evaporada en vacío, proporcionó un residuo oleoso que se lavó con una solución de bicarbonato sódico al 1%. El compuesto obtenido de esta manera se purificó mediante cromatografía usando cloroformo como eluyente. Rendimiento: 85% del producto titulado. Aceite.

¹H-NMR: 7,25 (3H, t+t); 7,07 (2H, d); 6,09 (1H, bd); 4,82 (1H, dd); 3,69 (3H, s); 3,08 (2H, dd); 2,12 (2H, t); 1,59 (2H, t); 0,87 (3H, q).

30 Estudio de toxicidad de los compuestos en el Ejemplo 1

Los compuestos de la mezcla de reacción obtenidos según el Ejemplo 1 se sometieron a estudio toxicológico individualmente o en combinación, después de la separación de la mezcla y la purificación. Los datos de toxicidad obtenidos se compararon con los de ácido butírico no derivado.

35 El valor LD50 de ácido butírico, medido en ratones Swiss de ambos sexos con un peso de 30 g, fue de 8,8 g/kg después de la administración oral.

La mezcla de reacción del Ejemplo 1 mostró la composición porcentual siguiente:

Compuesto 1: 50%

Compuesto 2: 25%

Compuesto 3: 25%.

El valor LD50 de la mezcla fue de 19,93 g/kg después de la administración oral, equivalente a 8,8 g de ácido butírico.

Los compuestos ensayados como compuestos individuales proporcionaron los resultados siguientes:

Compuesto 1 LD50 23,78 g/kg equivalente a 8,8 g de ácido butírico

5 Compuesto 2 LD50 16,29 g/kg equivalentes a 8,8 g de ácido butírico

Compuesto 3 LD50 21,62 g/kg equivalente a 8,8 g de ácido butírico.

En conclusión, tanto la mezcla de compuestos como los compuestos individuales muestran un valor LD50 equivalente al del ácido butírico, tal como se informa en Merck Index, 12ª Edición.

Efectos de butirato de sodio y de los compuestos 1, 2 y 3 sobre el transporte trans-epitelial de agua y electrolitos

10 Cultivos celulares

Los experimentos se llevaron a cabo usando una línea celular intestinal humana denominada Caco-2, obtenida a partir de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Rockville, EE.UU.). Estas células, 15 días después de la confluencia, forman una monocapa de enterocitos con características morfológicas y funcionales idénticas a las de los enterocitos ileales en el ápice de la vellosidad (Berni Canani R, et al Gastroenterology 2003; 124:368-76). Las células se cultivaron en un medio de cultivo que consistía en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía glucosa (4,5 g/l), 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de L-glutamina, 1% de piruvato de sodio, estreptomicina (50 mg/ml), penicilina (50 mU/ml), y se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de O₂. El medio de cultivo se reemplazó cada día.

Experimentos con la cámara de Ussing

20 Para todos los experimentos se usaron células en el pase 30-ésimo – 40-ésimo, 2x10⁶ células por cada filtro, cultivadas sobre soportes de policarbonato (tamaño de poro 0,4 µm, diámetro 24,5 mm) durante 15 días después de la confluencia. Cada soporte que contenía las células se montó en una cámara de Ussing (World Precision Instruments, Sarasota, Florida) como una monocapa celular entre los compartimentos luminal y serosal (Berni Canani R, et al. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 28: 315-320, 1999). El sistema de cámara de Ussing permite, mediante la medición de parámetros eléctricos definidos, el estudio del transporte transepitelial de agua y electrolitos. Estos parámetros consisten en: 1) la diferencia de potencial (PD) transepitelial y la corriente de cortocircuito (Isc), una expresión del paso transepitelial de iones; 2) resistencia (RT) y conductancia iónica (G), una medida de la integridad del tejido. Un estímulo de tipo absorbente en el transporte transepitelial induce una disminución de la Isc, mientras que un estímulo de tipo secretor induce un aumento de la Isc. La Isc se expresa en microamperios por centímetro cuadrado (µA/cm²), la conductancia en milisiemens por centímetro cuadrado (mS/ cm²) y la diferencia de potencial transepitelial en milivoltios (mV). La medición de estos parámetros eléctricos se hace posible gracias a la presencia de electrodos de plata, colocados de manera proximal a ambos lados (serosal y luminal) de la monocapa celular y conectados con un sistema de voltaje automático equipado con un software para la adquisición y procesamiento de datos (DVC 1000, World Precision Instruments, Sarasota, Florida, EE.UU.). Cada compartimento contenía 10 ml de solución de Ringer con la composición siguiente (en mmol/l): NaCl, 114; KCl, 5; NaH₂PO₄, 0,3; Na₂HPO₄, 1,65; CaCl₂, 1,25; MgCl₂, 1,1; NaHCO₃, 25; glucosa, 10. El líquido de incubación se hizo circular a través de la cámara por medio del flujo de una mezcla gaseosa compuesta de 95% de O₂ y 5% de CO₂ y se mantuvo a una temperatura de 37°C por medio de un termostato (Berni Canani R. et al. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 28: 315-320, 1999). El estudio de los cambios en los parámetros eléctricos que reflejan cambios en el transporte transepitelial de agua y electrolitos se llevó a cabo en condiciones basales y después de la administración de los compuestos en el lado luminal de la monocapa de células Caco-2.

A continuación, para estudiar los efectos de los compuestos sobre el transporte transepitelial de agua y electrolitos en condiciones de secreción activa inducida por un agente secretagogo, se llevaron a cabo experimentos en los que los enterocitos se co-incubaron simultáneamente con los compuestos y con la toxina del cólera (CT) como un agonista de la ruta principal de la transducción de la señal responsable de la secreción de fluidos a nivel intestinal (Berni Canani R, et al. J. Infect. Dis 2005; 191:1072- 1077). Por último, se evaluó la viabilidad celular mediante la medición de la respuesta eléctrica a la adición de teofilina (5 mM) en el lado serosal al final de cada experimento (Berni Canani R, et al WJG 2006;12:4.710- 4.715).

Resultados

50 La adición de butirato de sodio en el lado luminal de los enterocitos humanos indujo una disminución de la corriente de cortocircuito ($\Delta I_{sc} = -0,8 \pm 0,2 \mu A/cm^2$) y en la diferencia de potencial, pero no alteró la conductancia del tejido. La máxima disminución en Isc se observó aproximadamente 35 minutos después de la adición de la sustancia. Esta

variación en la I_{sc} fue considerablemente diferente de la observada en las células de control ($p < 0,001$). El efecto era dependiente de la dosis, con un efecto máximo a la concentración final de 10 mM (Figura 1).

Se realizaron experimentos similares usando los otros compuestos (compuestos 1, 2 y 3). El compuesto 1 indujo una disminución de la respuesta a dosis en I_{sc} con un efecto máximo a la concentración final de 10 mM ($\Delta I_{sc} = -0,9 \pm 0,3$ A/cm²). La disminución máxima en I_{sc} se observó aproximadamente 40 minutos después de la adición al lado de la mucosa de los enterocitos, sin interferir con la estabilidad de la conductancia del tejido. Esta variación en la I_{sc} era considerablemente diferente de la observada en las células de control ($p < 0,001$) (Figura 2).

La adición del compuesto 2 en el lado luminal de los enterocitos indujo una disminución dependiente de la dosis en I_{sc} con un efecto máximo a una concentración de 10 mM igual a $-0,4 \pm 0,1$ μ A/cm². La disminución máxima en I_{sc} se observó aproximadamente 40-45 minutos después de la adición al lado de la mucosa de los enterocitos, sin interferir con la estabilidad de la conductancia del tejido. Esta variación en la I_{sc} era considerablemente diferente a la observada en las células de control ($p < 0,001$). (Figura 3).

La adición del compuesto 3 al lado luminal de los enterocitos indujo una disminución dependiente de la dosis en I_{sc} con un efecto máximo a la concentración final de 10 mM igual a $-1,1 \pm 0,1$ μ A/cm² en ausencia de cualquier cambio significativo en la conductancia de los tejidos. El efecto de pico máximo se observó después de un tiempo considerablemente más largo con respecto a los otros dos compuestos (40 min vs 50 min, $p < 0,001$). Esta disminución en la I_{sc} era considerablemente mayor que la observada en las células de control ($p < 0,001$). (Figura 4).

La adición al lado luminal de los enterocitos humanos en un cultivo de una mezcla 60/20/20% de los compuestos 1, 2 y 3 equivalente a 10 mM de butirato de sodio indujo una disminución considerablemente más marcada ($p < 0,001$) en comparación con la observada con el butirato de sodio 10 mM solo o con los compuestos 1, 2 y 3 con un efecto máximo en la concentración final de 10 mM igual a $-1,6 \pm 0,2$ μ A/cm², sin ningún efecto sobre la conductancia del tejido (Figura 5).

Para investigar si los efectos eléctricos observados eran debidos a una absorción neta de cloruro (Cl^-), se llevaron a cabo experimentos en ausencia de Cl^- en el tampón. En esta condición experimental, las concentraciones equimolares de SO_4^{2-} se sustituyeron por Cl^- . En estas condiciones, la adición de los compuestos solos o en mezclas no indujo ningún cambio en los parámetros eléctricos, mostrando que la disminución de la I_{sc} se debía exclusivamente al transporte activo de Cl^- . La administración de CT (6×10^{-8} M) al lado luminal de la monocapa celular, montada en una cámara de Ussing, indujo un aumento en la I_{sc} . Este efecto secretor se redujo considerablemente por la preincubación de las células con la mezcla de compuestos administrados al lado luminal a una concentración final de 10 mM ($+4,1 \pm 0,5$ vs $+1,1 \pm 0,2$ μ A/cm², $p < 0,001$). Los datos *in vitro* disponibles actualmente muestran que:

- los compuestos 1, 2 y 3 ensayados individualmente, mediante interacción directa con los enterocitos humanos en cultivo, inducen un efecto pro-absorción neto sobre el transporte de fluidos a nivel intestinal a la dosis de 10 mM. El efecto se hizo máximo después de aproximadamente 25 a 55 minutos, sin ninguna interferencia con la integridad de los tejidos. Estos efectos son similares a los obtenidos con butirato de sodio. La mezcla de compuestos 1, 2 y 3 en la proporción usada en la mezcla de reacción (60/20/20%), equivalente a 10 mM de butirato de sodio, a través de una interacción directa con los enterocitos humanos en cultivo, indujo un efecto pro-absorción neto sobre el transporte de líquidos a nivel intestinal. El efecto se hizo máximo en los 45 minutos posteriores a la adición y se mantuvo estable hasta el final del experimento sin ninguna interferencia con la integridad del tejido. Este efecto es cinéticamente similar al obtenido con los compuestos individuales, pero es considerablemente más intenso y prolongado en el tiempo en comparación al obtenido con los componentes individuales. También se demostró un potente efecto antiselector sobre la toxina del cólera, el prototipo de un agente secretor a nivel intestinal.

La presente invención se ha descrito con referencia a un número de sus realizaciones específicas, pero debería entenderse que los expertos en la materia pueden realizar variaciones o modificaciones sin apartarse, por ello, de su ámbito de protección.

REIVINDICACIONES

1. Derivado seleccionado de entre el grupo de compuestos que tienen la fórmula siguiente:

N-(1-carbamoil-2-fenil-etil)butiramida;

N-(1-butirol-carbamoil-2-fenil-etil)butiramida;

5 5-bencil-2-propil-1H-imidazol-4(5H)-ona;

N-(1-oxo-3-fenil-1-(piperidin-1-il)propan-2-il)butiramida;

N-(1-oxo-3-fenil-1-(pirrolidin-1-il)propan-2-il)butiramida;

N-(1-(metilcarbamoil)-2-feniletil)butiramida;

N-(1-(etilcarbamoil)-2-feniletil)butiramida;

10 N-(1-(propilcarbamoil)-2-feniletil)butiramida;

N-(1-(butilcarbamoil)-2-feniletil)butiramida;

N-(1-(pentilcarbamoil)-2-feniletil)butiramida;

N-(1-carbamoil-2-feniletil)-N-metilbutiramida;

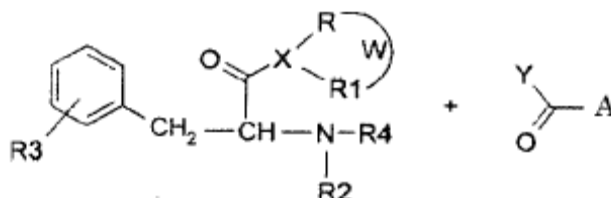
N-(1-carbamoil-2-feniletil)-N-etilbutiramida;

15 N-(1-carbamoil-2-feniletil)-N-propilbutiramida;

mezclas correspondientes y sales correspondientes de las bases o ácidos farmacéuticamente aceptables, formas diastereoisoméricas y formas enantioméricas puras o sus mezclas.

2. Mezcla de derivados amida de ácido butírico que pueden obtenerse haciendo reaccionar haluro de butirolilo con un derivado de fenilalanina según el esquema general siguiente:

20



25 en el que

Y representa un átomo halógeno;

A representa $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$;

X representa nitrógeno;

R y R_1 representan independientemente hidrógeno o un grupo alquilo (C_{1-6}) o un grupo acilo (C_{1-6}) y W es nulo; o

30 W representa una cadena 1,2-alquileo con 2 a 6 átomos de carbono y R y R_1 son grupos metileno;

R_2 y R_4 representan independientemente, hidrógeno o un grupo alquilo (C_{1-6}) o un grupo acilo (C_{1-6});

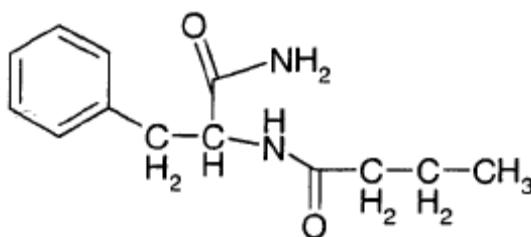
R_3 es seleccionado de entre el grupo que consiste en H, alquilo (C_{1-6}), alcoxilo (C_{1-6}), halógeno, oxidrilo, ciano, nitro, amino, mono- o di- alquilamino (C_{1-6}), acilamino (C_{2-6}), formilo, hidroxiiminometilo, alcoxiiminometilo (C_{1-6}) y carbamoilo;

35 y las sales correspondientes con bases o ácidos farmacéuticamente aceptables de los mismos, así como sus posibles formas diastereoisoméricas y enantioméricas

3. Mezcla de derivados amida de ácido butírico según la reivindicación 2, que consiste esencialmente en los tres compuestos siguientes:

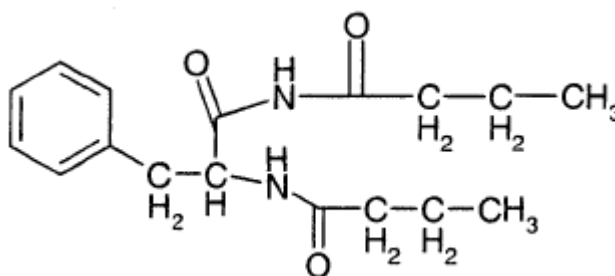
N-(1-carbamoyl-2-phenylethyl)butanamide, with formula:

5



N-(1-butyl-2-phenylethyl)butanamide, with formula:

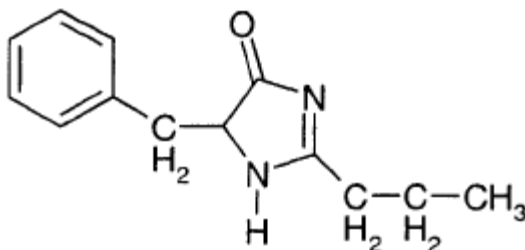
10



15

5-benzyl-2-propyl-1H-imidazol-4(5H)-one, with formula:

20



4. Derivative or mixture of derivatives according to claims 1-3, for use in the medical or veterinary field.

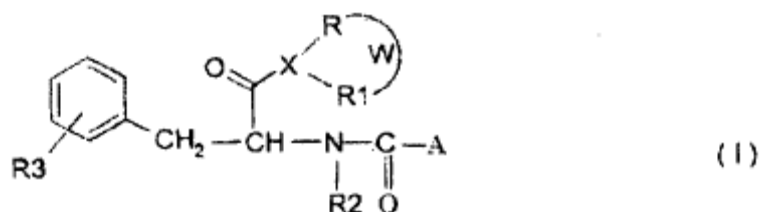
25 5. Method of preparation of the mixture according to claim 3, which comprises the steps of making react the derivative of phenylalanine and the derivative of butyrol, in substantially equimolar quantities, in an inert polar aprotic organic solvent, preferably benzene, toluene or chloroform, at ambient temperature, preferably during a period of time comprised between four and twenty-four hours; separate and purify, preferably by recrystallization, the product obtained.

30 6. Pharmaceutical composition which comprises as active ingredient at least one of the amide derivatives or mixtures of amide derivatives according to claims 1-3, alone or in mixtures of the same, together with one or more adjuvants and/or vehicles pharmaceutically acceptable.

7. Pharmaceutical composition according to claim 6, which comprises in addition active ingredients, including medicines, dietary supplements, functional foods, nutraceuticals.

35 8. Pharmaceutical composition according to claims 6-7, formulated for oral, topical or parenteral administration.

9. Use of compounds which have the following general formula:



5

en la que

A representa una cadena alquilo $C_{(1-5)}$ lineal o ramificada, posiblemente sustituida con fenilo;

X representa nitrógeno;

10 R y R_1 representan independientemente hidrógeno o un grupo alquilo (C_{1-6}) o un grupo acilo (C_{1-6}) y W es nulo; o

W representa una cadena 1,2-alquileo con 2 a 6 átomos de carbono y R y R_1 son grupos metileno;

R_2 y R_4 representan independientemente, hidrógeno o un grupo alquilo (C_{1-6}) o un grupo acilo (C_{1-6});

15 R_3 es seleccionado de entre el grupo que consiste en H, alquilo (C_{1-6}), alcoxilo (C_{1-6}), halógeno, oxidrilo, ciano, nitro, amino, mono- o di- alquilamino (C_{1-6}), acilamino (C_{2-6}), formilo, hidroxiiminometilo, alcoxiiminometilo (C_{1-6}) y carbamoilo; las sales correspondientes con bases o ácidos farmacéuticamente aceptables de los mismos, formas diastereoisoméricas y enantioméricas puras o sus mezclas;

para la preparación de preparaciones farmacéuticas con buena palatabilidad.

10. Uso según la reivindicación 9, en el que las preparaciones son para uso humano, pediátrico o veterinario y formuladas para su administración oral en forma de comprimidos, cápsulas, jarabes, soluciones y suspensiones bebibles, gotas, granulados, preparaciones para administración sublingual o tópica, formulaciones cutáneas o gastrointestinales, o para preparaciones administrables parenteralmente, también en combinación con otros ingredientes activos incluyendo medicamentos, suplementos dietéticos, alimentos funcionales, nutracéuticos.

11. Uso según las reivindicaciones 9-10, en el que el compuesto es seleccionado de entre los derivados según las reivindicaciones 1-3, solos o en mezclas de los mismos.

25 12. Uso según las reivindicaciones 9-11, en el que dicha preparación farmacéutica es una preparación útil para la terapia o prevención de enfermedades humanas o animales.

13. Uso según la reivindicación 12, en el que las enfermedades son seleccionadas de entre: trastornos gastrointestinales; enfermedades hematológicas; enfermedades metabólicas genéticas; obesidad.

14. Uso según las reivindicaciones 12-13, en el que las enfermedades son seleccionadas de entre:

- 30
- tumores gastrointestinales; gastroenteritis aguda; diarrea crónica inespecífica; diarrea del viajero; diarrea asociada a antibióticos; síndrome del intestino irritable; cólera; cloridorea congénita; diarrea por sodio congénita; diarrea secretora crónica; fibrosis quística;
 - enfermedad inflamatoria intestinal crónica (CIBD); enteropatía inducida por malnutrición; atrofia de la mucosa inducida por nutrición parenteral total; enteropatía inducida por radioterapia o quimioterapia; síndrome del
 - 35 intestino corto e insuficiencia intestinal; adenocarcinoma de colon; poliposis intestinal; reservoritis; enterocolitis alérgica;
 - β -talasemia intermedia; anemia de células falciformes;
 - deficiencia de ornitina transcarbamilasa; adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X (ALD-X);
 - resistencia a la insulina; síndrome metabólico.

40

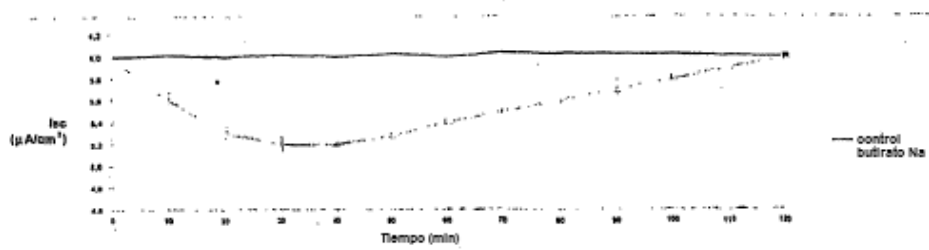


Fig 1.

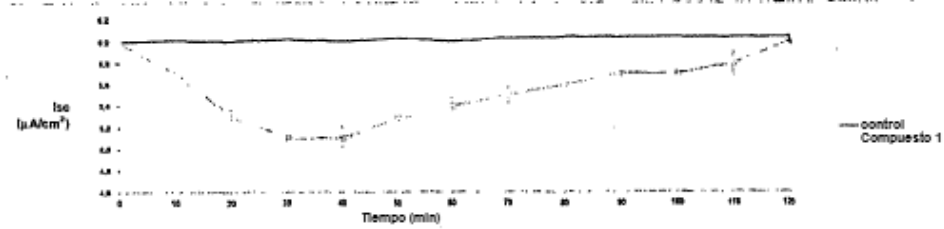


Fig 2

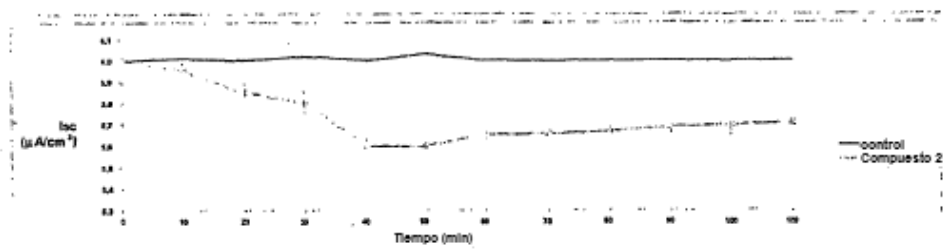


Fig 3.

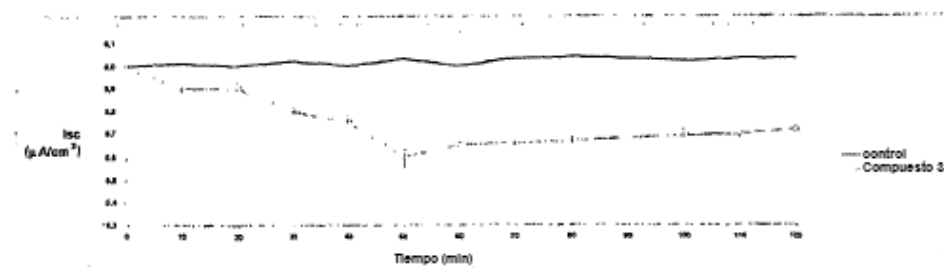


Fig 4.

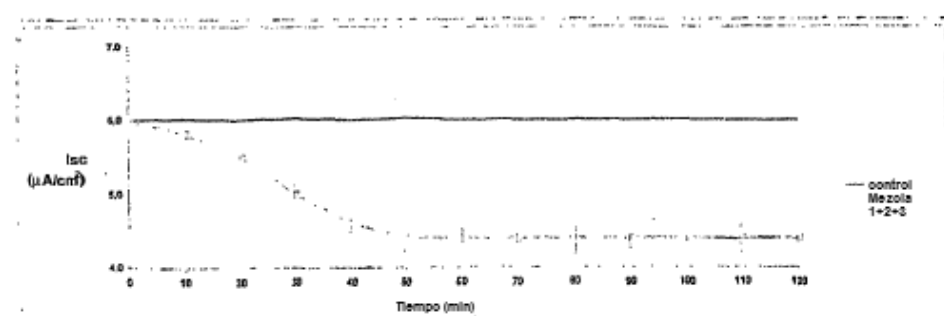


Fig 5.