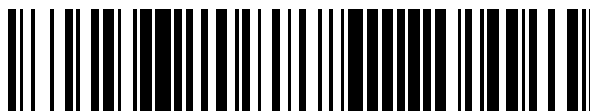


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 508 117**

51 Int. Cl.:

C07C 229/12 (2006.01)

A61K 31/14 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2010 E 10773886 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014 EP 2491005**

54 Título: **Uso del butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio]] en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular**

30 Prioridad:

22.10.2009 LV 090181

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

16.10.2014

73 Titular/es:

**GRINDEKS, A JOINT STOCK COMPANY (100.0%)
53 Krustpils Street
1057 Riga, LV**

72 Inventor/es:

**KALVINS, IVARS;
DAMBROVA, MAIJA;
LIEPINS, EDGARS;
PUGOVICS, OSVALDS;
VILSKERSTS, REINIS;
KUKA, JANIS;
GRINBERGA, SOLVEIGA y
LOZA, EINARS**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 508 117 T3

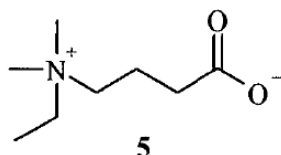
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

Uso del butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio] en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular

Campo técnico

La presente invención se refiere a un compuesto nuevo el butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio], y a un método de preparación del mismo (compuesto de fórmula 5)



5

La presente invención se refiere también al uso del butanoato de 4-[etil (dimetil) amonio] en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular.

10 Fundamento de la invención

Las enfermedades cardiovasculares (CVDs) son un grupo de trastornos del corazón o disfunciones cardíacas y de los vasos sanguíneos.

15 Unos 16,7 millones aproximadamente, o sea un 29,2% del número total de muertes, se atribuye a las diversas formas de enfermedad cardiovascular (CVD).

20 El infarto de miocardio (ataque cardíaco) es un resultado serio de la enfermedad coronaria. El infarto de miocardio (IM) es la necrosis irreversible del músculo cardíaco debida a una isquemia prolongada. Un ataque cardíaco o infarto de miocardio es una urgencia médica en la cual se interrumpe de repente el suministro de sangre al corazón o bien se reduce seriamente, lo que hace que el músculo se muera por falta de oxígeno. Más de 1,1 millón de personas sufre un ataque al corazón (infarto de miocardio) cada año y para muchos de ellos, el ataque al corazón es su primer síntoma de enfermedad coronaria. Un ataque al corazón puede ser suficientemente grave como para causar la muerte o puede ser silencioso. Una de cada cinco personas tiene únicamente síntomas leves o bien ningún síntoma y el ataque al corazón únicamente se descubre mediante una electrocardiografía rutinaria efectuado poco tiempo después.

30 Un ataque al corazón (infarto de miocardio) es causado generalmente por un coágulo sanguíneo que bloquea una arteria del corazón. Frecuentemente la arteria ya se ha estrechado debido a los depósitos de grasa en sus paredes. Estos depósitos pueden desgarrarse o bien abrirse, reduciendo el flujo de sangre y liberando sustancias que harán que las plaquetas de la sangre se vuelvan pegajosas y adherentes y exista una mayor probabilidad de la formación de coágulos. A veces se forma un coágulo dentro mismo del corazón, que luego se queda adherido a una arteria que alimenta el corazón. Un espasmo es una de estas arterias que hace que la sangre deje de circular.

35 La γ -butirotetaina, a partir de la cual el organismo mamario sintetiza la carnitina, se caracterizó inicialmente como una sustancia tóxica que acelera la respiración, causa salivación y secreción de lágrimas, dilatación de pupilas, vasoconstricción y para el corazón en la diástole (LINNEWEH, W. Gamma-butyrobetain, Crotonbetain und Carnitin im tierischen Stoffwechsel, Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie, 1929, vol. 181, p.42-53). Al mismo tiempo, en los últimos informes otros autores corroboraban que la γ -butirotetaina es extremadamente poco tóxica (LD50>7000 mg/kg, s.c) ROTZSCH. W. Über die Toxicität des Carnitins und einiger verwandter Stoffe. Acta biol. Med. Germ..1959, vol.3, p.28-36.

45 En la literatura sobre la γ -butirotetaina no sustituida, los efectos cardiovasculares fallan. Esto queda plasmado por HOSEIN, E.A. Pharmacological actions of γ -butirotetaina. Nature 1959, vol. 183, p. 328-329, donde se indica que la γ -butirotetaina es una sustancia similar a la acetilcolina con una acción prolongada. Sin embargo, posteriormente los mismos autores informaban que debido a un error se había empleado el éster metílico de la γ -butirotetaina que de hecho posee unas propiedades colinérgicas. Contrariamente a lo indicado, la γ -butirotetaina se caracterizaba por ser una sustancia inerte desde el punto de vista farmacológico (HOSEIN, E.A.. Isolation and probable functions of betaine esters in brain metabolism Nature 1960, vol. 187, p.321-322)

50

Como compuestos afines desde el punto de vista estructural al butanoato de 4-[etil (dimetil) amonio] se han descrito los siguientes:

- En GB 1238868 A 14.07.1971, se habla de betaínas como el butanoato de 4-[trimetilamonio], utilizadas para polímeros. Sin embargo no se mencionan propiedades farmacológicas de estas betainas;
- En US 5973026 A (XEROX CORP) 26.10.1999, se informa sobre el butanoato de 4-[trimetilamonio] y el propionato de 3-[diel(metil)amonio] en su aplicación a las composiciones de tinta;
- 5 - En LLOYD ANDREW, et al. A comparison of glycine, sarcosine, N,N-dimethylglycine, glycinebetaine and N-modified betaines as liposome cryoprotectants, *Journal of pharmacy and pharmacology*, 1992, vol. 44, nº.6, p.507-511 se informa sobre el acetato de 2-[etil(dimetil)amonio] utilizado como crioprotector para los liposomas ;
- En DAVID B., THOMAS et al. Synthesis, Characterization and Aqueous Solution Behaviour of Electrolyte and pH-responsive carboxybetaine-containing cyclopolymers. *Macromolecules*. 2003, vol. 36, p.9710-9715, se informa sobre el butanoato de 4-[dialil(metil)amonio] y su síntesis a partir de N,N-dialil-N-metilamonio y 4-bromobutanoato de etilo. El ácido libre se obtiene a partir del éster en una segunda etapa usando la resina de intercambio iónico Amberlite. El producto se utiliza como producto intermedio para sintetizar polímeros;
- 10 - En Prelog V. 1930, vol.2, p.712-722 se informaba sobre la síntesis del butanoato de 4-trimetilamonio a partir del butanoato de 4-dimetilamonio y del yoduro de metilo;
- El butanoato de 4-trimetilamonio y su síntesis a partir de trimetilamina y de 4-bromobutanoato de etilo se ha descrito en JP 2009096766 (KONAN GAKUEN) 07.05.2009. El ácido libre se obtiene a partir del éster en una segunda etapa usando la resina de intercambio iónico Amberlite;
- 20 - En WO 2008/055843 A (KALVINSH IVARS; CHERNOBROVIJS ALEKSANDRS; VARACHEVA LARISA; PUGOVICHS OSVALDS) 15.05.2008 se ha descrito el butanoato de 4-trimetilamonio y su síntesis, que se iniciaba a partir del éster correspondiente y utilizando la solución de KOH.
- En CA 2508094 A (VIVIER CANADA INC) 20.11.2006 se informaba sobre las betainas como el butanoato de 4-trimetilamonio y su uso como medicamento para acelerar la síntesis del colágeno;
- 25 - La US 5965615 A (TAIHO PHARMACEUTICAL CO LTD; VALSTS ZINATNISKA IESTADE BEZP) 12.10.1999 informaba sobre el butanoato de 4-trimetilamonio y su uso como medicamento para el tratamiento del trastorno metabólico del miocardio y el mismo compuesto se ofrecía en la patente americana 2007191381 A (CONCERT PHARMACEUTICALS INC) 16.08.2007 para el tratamiento del infarto de miocardio.

30 El dihidrato del propionato del 3-(2,2,2-trimetilhidrazinio) se conoce como un compuesto con propiedades cardioprotectoras (esta sustancia se conoce por el nombre internacional patentado de Meldonium). El propionato del 3-(2,2,2-trimetilhidrazinio) se ha descrito en la patente US 4481218 (INST ORGANICHESKOGO SINTEZA) así como en la US 4451485 A (INSTITU ORCH SINTEZA AKADEMII) 29.05.1984

35 Es bien sabido que el dihidrato del propionato de 3-(2,2,2-trimetilhidrazinio) se utiliza ampliamente para controlar el cociente de concentración de carnitina y gama-butirotetaina y como consecuencia de ello la velocidad de beta-oxidación de los ácidos grasos en el cuerpo (DAMBROVA M., LIEPINSH E., KALVINSH I.I. Mildronate: cardioprotective action through carnitine-lowering effect. *Trends in Cardiovascular Medicine.*, 2002, vol. 12, nº 6, p.275-279.

40 Debido a estas propiedades, el Meldonium se utiliza ampliamente en medicina como un fármaco anti-ischémico, protector del estrés y cardioprotector en el tratamiento de diversas enfermedades cardiovasculares y otras patologías que incluyen la isquemia tisular (KARPOV R.S., KOSHELSKAYA O.A., VRUBLEVSKY A.V., SOKOLOV A.A., TEPLYAKOV A.T., SKARDA I., DZERVE V., KLINTSARE D., VITOLS A., KALNINS U., KALVINSH I., MATVEYA L., URBANE D. Clinical Efficacy and Safety of Mildronate in Patients with ischemic heart disease and chronic heart failure, *Kardiologiya*, 2000, no.6, p.69-74). En el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares el mecanismo de acción del propionato del 3-(2,2,2-trimetilhidrazinio) se basa en la limitación de la velocidad de biosíntesis de la carnitina y en la limitación del transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de las membranas mitocondriales (SIMKHOVICH B.Z., SHUTENKO Z.V., MEIRENA D.V., KHAGI K.B., MEZHAPUKE R.J., MOLODCHINA T.N. KALVINS I.J., LUKEVICS E.

50 El propionato de 3-(2,2,2-trimetilhidrazinio) (THP) – un inhibidor nuevo de gama-butirotetaina hidrolasa con propiedades cardioprotectoras. *Biochemical Pharmacology*. 1988, vol. 37, p.195-202., KIRIMOTO T., ASAKA N., NAKANO M., TAJIMA K., MIYAKE H., MATSUURA N. Beneficial effects of MET-88, a γ -butirotetaina hydroxylase inhibitor in rats with heart failure following myocardial infarction. *European Journal of Pharmacology*, 2000, vol. 395, no.3. p.217-224.

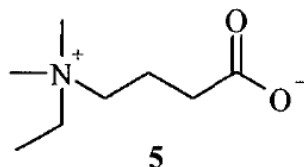
60 Resumen de la invención

Es bien sabido que el dihidrato de Meldonium tiene un efecto cardioprotector; sin embargo, no existen datos que indiquen que la γ -butirotetaina tiene un pronunciado efecto cardioprotector. En la patente EP 0845986 B (KALVINSH IVARS, VEVERIS MARIS) 02.04.2003 se informa sobre la composición farmacéutica del dihidrato de Meldonium y de la γ -butirotetaina para su uso en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares.

65

Un objetivo de la presente invención consiste en disponer de un compuesto que tenga un efecto cardioprotector pronunciado.

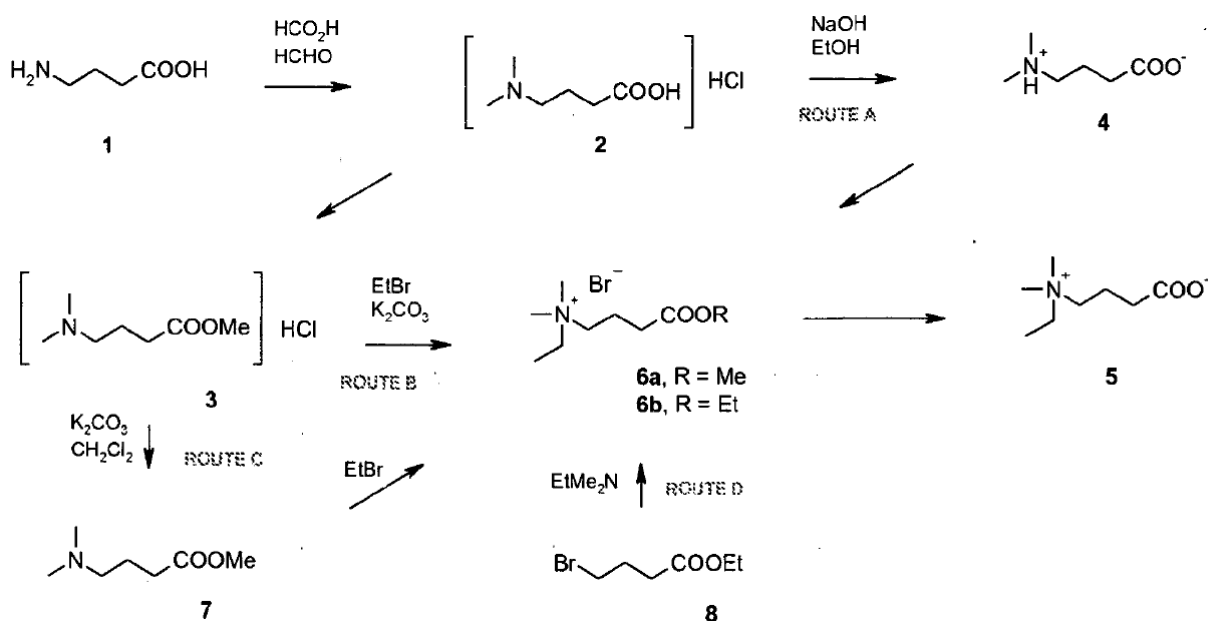
El objetivo mencionado se logra disponiendo de un compuesto nuevo el butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio] (compuesto de fórmula 5), que tiene una estructura similar al Meldonium o a la γ -butirotetaina.



Para nuestra sorpresa el butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio] posee un efecto cardioprotector pronunciado y es más efectivo que el dihidrato de Meldonium en los modelos de infarto de miocardio in vivo. Debido a esta propiedad el butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio] se puede utilizar en medicina. El butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio] se puede utilizar como una solución inyectable y en forma de comprimidos.

El siguiente objeto de la presente invención es un método de preparación de dicho compuesto de fórmula 5.

Se han desarrollado cuatro procesos que se pueden utilizar con el objetivo de preparar el butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio] de fórmula 5. Ver el esquema siguiente.



El primer proceso (ROUTE A) implica las siguientes etapas:

- a) Añadir bromuro de etilo al butanoato de 4-(dimetilamino) para producir bromuro de N-etil-4-metoxi-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio ;
- b) Tratar el bromuro de N-etil-4-metoxi-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio con hidróxido de potasio para obtener el compuesto deseado, el butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio].

Segundo proceso (ROUTE B) implica las siguientes etapas del proceso:

- a) Añadir carbonato potásico y bromoetano al cloruro de 4-metoxi-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio para producir bromuro de N-etil-4-metoxi-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio;
- b) Pasar el bromuro de N-etil-4-metoxi-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio a través de una columna de resina de intercambio iónico para obtener el el butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio].

Tercer proceso (ROUTE C) implica las siguientes etapas del proceso:

- a) Añadir carbonato potásico y diclorometano al cloruro de 4-metoxi-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio para producir butanoato de metil-4-(dimetilamino);
- b) Agitar el butanoato de metil-4-(dimetilamino) con bromoetano en diclorometano para obtener bromuro de N-etil-4-metoxi-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio;

- c) Tratar el bromuro de N-etil-4-metoxi-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio con hidróxido potásico para obtener el compuesto deseado de butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio].

Cuarto proceso (ROUTE D) implica las siguientes etapas del proceso:

- 5 a) Añadir N,N-dimetiletilamina al 4-bromobutanoato de etilo en diclorometano para obtener bromuro de 4-etoxi-N-etil-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio;
 b) Pasar el bromuro de 4-etoxi-N-etil-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio por una columna de resina de intercambio iónico para obtener el butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio].

Descripción de las configuraciones

10 La presente invención se describirá con más detalle al referirnos a los siguientes ejemplos no limitativos.

SÍNTESIS DEL BUTANOATO DE 4-[ETIL(DIMETIL)AMONIO] (5)

Preparación del cloruro de 4-metoxi-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio (3)

15 A una solución de cloruro de 3-carboxi-N,N-dimetil-1-propanaminio (2) (45.93 g, 0,27 mol) en metanol anhidro (300 ml) a -10-0°C se añadía lentamente cloruro de tionilo (55 ml, 0,76 moles) y la mezcla de reacción se agitaba durante una hora a temperatura ambiente. Después la mezcla de reacción se agitaba a 40-50°C durante 3 horas y se evaporaba. El residuo se disolvía en acetona (110 ml) y se precipitaba añadiendo éter (400 ml). El sólido se filtraba, lavaba con éter, y se disolvía en acetona (110 ml) a lo que seguía la precipitación con éter (400 ml). El precipitado se filtraba, lavaba con éter, y se secaba para dar 38,4 g (77%) de cloruro de 4-metoxi-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio.

20 ¹H NMR (DMSO-d₆, HMDSO) δ:1,91 (qui, J=7,7 Hz, 2H); 2,43 (t, J=7,74 Hz, 2H); 2,71 (d, J=4,9 Hz, 6H); 2,98-3,06 (m,2H), 3,61 (s, 3H); 10,76 (b s, 1H).

25 Route A

Preparación del butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio] (5)

30 Una mezcla de butanoato de 4-(dimetilamonio) (4) (7,87 g, 0,06 mol) y bromuro de etilo (13,08 g, 0,12 mol) en acetona anhidra (20 ml) se refluía hasta que el material de partida el butanoato de 4-(dimetilamonio) desaparecía (control de TLC, metanol-hidróxido de amonio acuoso, 3:1). A la mezcla de reacción se añadía isopropanol (100 ml) y la solución se evaporaba a sequedad. Una solución de la solución de KOH (7,28 g, 0,13 mol) en etanol del 96% (70 ml) se añadía al residuo a 0°C y la mezcla de reacción se agitaba durante 4 horas. El precipitado se filtraba y el filtrado se trataba con HCl 2N en metanol hasta que el pH del medio era de 7-8. La mezcla de reacción se mantenía a -18°C durante 12 horas y se filtraba. El filtrado se evaporaba a sequedad y el residuo se secaba formando un azeótropo con isopropanol (3x100 ml). El sólido aceitoso obtenido (13,4 g) se disolvía en isopropanol (100 ml) y se mantenía a -18°C durante 12 horas. El precipitado se filtraba y el filtrado se evaporaba a sequedad y se cristalizaba a partir de acetona (30 ml) a -18°C para obtener 4,14 g (43%) de butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio].

35 ¹H NMR (DMSO-d₆, HMDSO) δ:1,24 (t, j=7,3 Hz, 3H); 1,68-1,78(m,2H); 1,87 (t, J=6,5 Hz, 2H); 2,96 (s,6H); 3,16-3,23 (m,2H); 3,29(q, J=7.3 Hz, 2H). LC ESI-MS (m/z): 160 [M+H]⁺
 40 Calculado analíticamente para C₈H₁₇NO₂ · 1,3 H₂O; C 52,61, H 10,82, N 7,67
 Hallado: C 52,64, H 11.00, N 7.58

45 Route B

Preparación del bromuro de N-etil-4-metoxi-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio (6a)

50 Una mezcla de cloruro de 4-metoxi-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio (3) (7,27 g, 0,04 mol), K₂CO₃ (5,52 g, 0,04 mol) y bromoetano (4,48 ml, 0,06 mol) en acetona (40 ml) se agitaba vigorosamente a temperatura ambiente durante 2. El precipitado se filtraba, lavaba con acetona, suspendía en isopropanol (100 ml), y se agitaba vigorosamente a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se filtraba, el filtrado se evaporaba a sequedad y el residuo se secaba formando un azeótropo con isopropanol. El residuo se cristalizaba en acetona (10 ml) añadiendo acetato de etilo (35 ml) y se secaba sobre P₂O₅ al vacío para obtener 6,51 g (64%) de bromuro de N-etil-4-metoxi-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio.

55 ¹H NMR (CDCl₃, HMDSO) δ:1,44 (t, j=7,2 Hz, 3H); 2,01-2,12(m,2H); 2,55 (t, J=6,6 Hz, 2H); 3,40 (s, 6H); 3,66-3,73 (m,4H), 3,69 (s, 3H).

60 LC ESI-MS (m/z): 174 [M+H]⁺
 Calculado analíticamente para C₉H₂₀BrNO₂ · 0,09 H₂O; C 42.26, H 7.95, N 5.48
 Hallado: C 42.26, H 8.28, N 5.35

Preparación del butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio] (5)

65 Una solución de bromuro de N-etil-4-metoxi-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio (6a) (6,51 g, 0,025 mol) en etanol (20 ml) se eluía lentamente por una columna de resina de intercambio iónico (OH) Amberlite® IRA-410 (190 ml) con etanol (100 ml). El eluato se evaporaba a sequedad y el residuo se secaba varias veces formando un azeótropo con

isopropanol, luego se disolvía en isopropanol (50 ml) y se mantenía a 0°C durante 12 horas. La mezcla se filtraba y el filtrado se evaporaba. El residuo (7,35 g) se mezclaba con acetato de etilo frío y se mantenía a 0°C durante 12 horas. La mezcla se filtraba y el precipitado se secaba sobre P₂O₅ al vacío para obtener 3,54 g (86%) de butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio]. La pureza del material se incrementaba haciendo pasar una solución acuosa de butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio] a través de una resina de intercambio iónico DOWEX® 50WX8. La solución se evaporaba a sequedad; el residuo se secaba con isopropanol formando un azeótropo y a ello seguía un secado al vacío sobre P₂O₅ al vacío para obtener 1,27 g (31%) de butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio].

Route C

Preparación del 4-(dimetilamino) butanoato de metilo (7)

Una suspensión de cloruro de 4-metoxi-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio (3) (5,44 g, 0,03 mol) y K₂CO₃ (5,52 g, 0,04 mol) en diclorometano (70 ml) se agitaba vigorosamente a temperatura ambiente durante 24 horas. El precipitado se filtraba, lavaba con diclorometano y el filtrado se evaporaba. El residuo se destilaba a 32-35°C/3-4 mm Hg para dar 2,88 g (66%) de butanoato de 4-(dimetilamino).

¹H NMR (DMSO-d₆, HMDSO) δ: 1,64 (qui, J=7,2 Hz, 2H); 2,09 (s, 6H); 2,17(t, J=7,1 Hz, 2H); 2,30 (t, J=7,4 Hz, 2H); 3,57 (s, 3H).

Preparación del bromuro de N-etil-4-metoxi-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio (6a)

Una mezcla de 4-(dimetilamino) butanoato de metilo (7) (1,45 g, 10 mmol) y bromoetano (1,2 ml, 16 mmol) en diclorometano (15 ml) se agitaba a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se evaporaba a sequedad, el sólido blanco (2,348 g) se trituraba con acetona, se filtraba y secaba al vacío sobre P₂O₅ para obtener 2,397 g (94%) de bromuro de N-etil-4-metoxi-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio.

Route D

Preparación del bromuro de 4-etoxi-N-etil-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio (6b)

A una solución de 4-bromobutanoato de etilo (8) (19,5 g, 0,1mol) en diclorometano a una temperatura del baño de hielo se añadía N,N-dimetiletilamina (10,8 ml, 0,1 moles) y se agitaba a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se evaporaba a sequedad, el residuo se trituraba con acetona (50 ml) y se guardaba a 0°C durante 0,5 horas. El precipitado se filtraba y secaba al vacío sobre P₂O₅ para obtener 22,274 g (94%) de bromuro de 4-etoxi-N-etil-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio.

¹H NMR (CDCl₃, HMDSO) δ: 1,26 (t, J=7,2 Hz, 3H); 1,44 (t, J=7,4 Hz, 3H) 2,00-2,11(m,2H); 2,52(t, J=6,6 Hz, 2H); 3,40 (s, 6H); 3,64-3,73 (m,2H), 3,69 (q, J=7,4 Hz, 2H); 4,14 (q, J=7,2 Hz, 2H).

Preparación del butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio](5)

Una solución de bromuro de N-etil-4-metoxi-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio (6a) (12,00 g, 44,7mmol) en agua (10 ml) se eluía lentamente (aprox. 10 gotas/min) por una columna de resina de intercambio iónico (OH) Amberlite® IRA-410 (250 ml) con etanol (control por CCF). El eluato se evaporaba y el residuo (12g) se disolvía en agua (50 ml). A esta solución se añadía una resina de intercambio iónico DOWEX® 50WX8 y se agitaba a temperatura ambiente durante 0,5 horas. La mezcla de reacción se filtraba a través de celite (1 cm) y el eluato se evaporaba a sequedad.

El residuo se secaba formando un azeótropo con isopropanol, acetonitrilo y acetona. El sólido obtenido se trituraba con acetona (10 ml) y la mezcla se guardaba a 0°C durante 2 horas. El precipitado se filtraba y secaba al vacío sobre P₂O₅ para obtener 4,65 g (65%) de butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio].

¹H NMR (DMSO-d₆, HMDSO) δ: 1,24 (t, j=7,3 Hz, 3H); 1,66-1,76(m,2H); 1,81 (t, J=6,4 Hz, 2H); 2,95 (s,6H); 3,16-3,23 (m,2H); 3,29(q, J=7.3 Hz, 2H). LC ESI-MS (m/z): 160 [M+H]⁺

Calculado analíticamente para C₈H₁₇NO₂ · 1,55H₂O; C 51,34, H 10,82, N 7,48

Hallado: C 51,36, H 11,40, N 7,34

Actividad cardioprotectora

Cincuenta ratas macho Wistar, de 10 semanas de edad con un peso de 200-250 g se guardaban en condiciones estándar (21-23°C, ciclo de 12 horas de luz-oscuridad) con acceso ilimitado a comida (dieta R3, Lactamin AB, Sweden) y agua.

Las ratas se adaptaban a las condiciones locales durante dos semanas previas al inicio del tratamiento. Se les administraba dihidrato de Meldonium en una dosis de 5 mg/kg o de 100 mg/kg, gama-butirotetaina en una dosis de 5 mg/kg y EG en dosis de 20 mg/kg, por vía oral, diariamente durante 8 semanas. Las ratas de control recibían agua.

Estudio del infarto de miocardio en ratas aisladas

El experimento en un corazón de rata aislada se realizaba básicamente tal como se ha descrito antes (Liepinsh et al., J. Cardiovasc.Pharmacol.2006; 48(6):314-9). Veinticuatro horas después de la última administración de fármaco se cortaban los corazones. Se efectuaba una perfusión retrógrada a través de la aorta a una presión constante con tampón oxigenado Krebs-Henseleit a 37°C. El ritmo cardíaco, la presión diastólica final del ventrículo izquierdo y la presión desarrollada en el ventrículo izquierdo se registraban de forma continuada. El flujo coronario se medía usando un detector de flujo de ultrasonidos (HSE) y el sistema Power Lab 8/30 de ADInstruments. Los corazones se sometían a perfusión durante 20 minutos para estabilizar las funciones hemodinámicas y luego se realizaba la oclusión durante 60 minutos mediante la contracción de las roscas a través de un tubo de plástico. La oclusión definitiva se confirmaba con una reducción del flujo coronario del orden del 40%. La reperfusión se lograba liberando las roscas. Al final del periodo de reperfusión de 150 minutos, la zona de riesgo se delineaba con un 0,1% de azul de metileno. Luego los corazones se seccionaban transversalmente desde el vértice hasta la base en cinco cortes de 2 mm de grosor y se incubaban en un 1% de cloruro de trifeniltetrazolio en tampón fosfato (pH 7,4, 37°C) durante 10 min para colorear de rojo el tejido viable y de blanco el tejido necrótico. El análisis planimétrico computarizado de las fotografías de Sony A900 se efectuaba usando software Image-Pro Plus 6.3 para determinar el área en riesgo y el área de necrosis expresadas en un % del ventrículo izquierdo. Los valores obtenidos se utilizaban luego para calcular el tamaño del infarto (IS) como un porcentaje del área de riesgo conforme a la fórmula:

$$\text{TAMAÑO DEL INFARTO} = \frac{\text{ÁREA DE NECROSIS}}{\text{ÁREA DE RIESGO}} \times 100\%$$

Efectos en el modelo de infarto cardíaco en ratas aisladas

El efecto anti infarto de las sustancias examinadas se investigaba en un modelo de infarto cardíaco en rata aislada. Durante la oclusión de la arteria coronaria izquierda, el flujo coronario en todos los grupos experimentales disminuía un 40% (desde 11 ml/min a 7 ml/min). Además se observaba una caída de la presión del ventrículo izquierdo del 50%. El ritmo cardíaco durante el periodo de oclusión no variaba de forma significativa. En la fase de reperfusión, el flujo coronario desarrollaba una presión en el ventrículo izquierdo y los valores $\pm dp/dt$ se recuperaban hasta aproximadamente un 80% del nivel de control. No existían diferencias significativas entre los grupos de tratamiento y los de control.

En la tabla 1 se presentan los efectos del dihidrato de Meldonium (5 mg/kg y 100 mg/kg), de la gama-butirobetaina (5 mg/kg) y del butanoato de 4-[etil(dimetil)amino] (EG)(5 mg/kg) después de 2 semanas de tratamiento, en el tamaño del infarto en el experimento sobre el infarto cardíaco en ratas aisladas.

Tabla 1

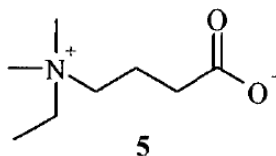
Efectos del dihidrato de Meldonium, de la gama-butirobetaina y del EG en el tamaño del infarto	
	Tamaño del infarto, % de control
Control	100.0±5
Dihidrato de Meldonium 5 mg/kg	95±9
Dihidrato de Meldonium 100 mg/kg	76±10*
Gama-butirobetaina 5 mg/kg	90±5
EG 5 mg/kg	59±6*

Cada valor representa la media \pm s.e.m de 9-10 animales. * Significativamente distintos del grupo de control (test t P<0,05)

Tal como se presenta en la tabla 1, el tratamiento con dihidrato de Meldonium en una dosis de 5 mg/kg reducía el tamaño del infarto en un 5%, la actividad terapéutica del dihidrato de Meldonium se observaba únicamente con una dosis de 100 mg/kg cuando el tamaño del infarto disminuía en un 24%. La gama-butirobetaina en una dosis de 5 mg/kg no tenía ningún efecto terapéutico. El butanoato de 4-[etil(dimetil)amoni] en una dosis de 5 mg/kg mostraba el mejor efecto terapéutico reduciendo el tamaño del infarto en un 41%.

REIVINDICACIONES

1. El butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio]



- 5
2. Un proceso para preparar el butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio] consiste en:
- 10 a) Añadir bromuro de etilo a butanoato de 4-(dimetilamonio) en acetona para fabricar el bromuro de N-etil-4-metoxi-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio;
- b) Tratar el bromuro de N-etil-4-metoxi-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio con una solución de hidróxido de potasio en etanol para obtener el compuesto deseado de butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio].
- 15 3. Un proceso para preparar butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio] que consiste en:
- a) Añadir carbonato potásico y bromoetano a cloruro de 4-metoxi-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio en acetona para fabricar bromuro de N-etil-4-metoxi-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio;
- b) Pasar bromuro de N-etil-4-metoxi-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio en presencia de etanol por una columna de resina de intercambio iónico para obtener butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio].
- 20 4. Un proceso para preparar butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio] que consiste en:
- a) Añadir carbonato potásico y diclorometano a cloruro de 4-metoxi-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio para fabricar butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio];
- b) Agitar butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio] con bromoetano en diclorometano para obtener bromuro de N-etil-4-metoxi-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio;
- 25 c) Tratar bromuro de N-etil-4-metoxi-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio con solución de hidróxido potásico en etanol para obtener el compuesto deseado de butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio].
5. Un proceso para preparar butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio] que consiste en:
- 30 a) Añadir N,N-dimetiletilamina a 4-bromobutanoato de etilo en diclorometano para obtener bromuro de 4-etoxi-N-etil-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio;
- b) Pasar bromuro de N-etoxi-N-etil-N,N-dimetil-4-oxo-1-butanaminio disuelto en agua a través de una columna de resina de intercambio iónico para obtener butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio].
- 35 6. Utilizar butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio] como un medicamento
7. Utilizar butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio] en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares.
8. Utilizar butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio] para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares.
- 40 9. Utilizar butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio] conforme a la reivindicación 8 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de las cardiopatías isquémicas.
- 45 10. Utilizar butanoato de 4-[etil(dimetil)amonio] conforme a la reivindicación 9 para el tratamiento del infarto de miocardio.