

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 052**

51 Int. Cl.:

C07D 409/06 (2006.01)

C07D 253/07 (2006.01)

A61K 31/53 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 33/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2010 E 10732408 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015 EP 2451807**

54 Título: **Bloqueadores de los canales sódicos triazoicos cíclicos**

30 Prioridad:

08.07.2009 GB 0911993

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

04.11.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF GREENWICH (100.0%)
Greenwich Research Enterprise, Old Royal Naval
College, Park Row, Greenwich
London SE10 9LS, GB**

72 Inventor/es:

**LEACH, MICHAEL;
FRANZMANN, KARL;
RIDDALL, DIETER y
HARBIGE, LAURENCE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 550 052 T3

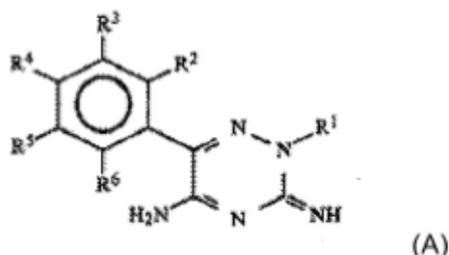
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar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

Bloqueadores de los canales sódicos triazólicos cíclicos

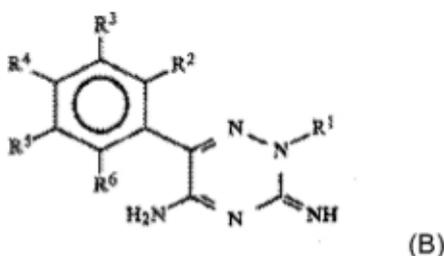
La presente invención se refiere a compuestos de triazina que tienen propiedades bloqueadoras de los canales de sodio, y al uso de los compuestos para la preparación de medicamentos para el tratamiento de trastornos asociados.

5 La Patente de Estados Unidos N° 4.649.139 desvela compuestos de fórmula (A):



10 en la que R¹ es alquilo C₁₋₁₀, alqueno C₂₋₁₀, alquino C₂₋₁₀ o cicloalquilo C₃₋₁₀, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido, y R² a R⁶ se seleccionan independientemente entre hidrógeno, halógeno, grupos alquilo C₁₋₆, alqueno, alquino o alcoxi (todos opcionalmente sustituidos con uno o más de halógeno, hidroxilo y arilo), amino, amino mono- o di-sustituido, alquenoilo, acilo, aciloxi, ciano, nitro, arilo y alquiltio o cualquiera de dos adyacentes de R² a R⁶ se unen para formar un grupo (-CH=CH-CH=CH-). Se desvela que estos compuestos son activos en el tratamiento de trastornos cardíacos, y son particularmente útiles en el tratamiento de arritmias.

La Solicitud de Patente previa WO2008/007149 desvela usos de un compuesto de fórmula (B):



15 en la que R¹ es hidrógeno (y =NH es NH₂), o carboxamido, alquilo C₁₋₁₀, alqueno C₂₋₁₀, alquilo C₁₋₃-arilo, alquilo C₁₋₃-heterocíclico o cicloalquilo C₃₋₁₀, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con hidroxilo, halógeno, carboxamido, halo-alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆ o alcoxi C₁₋₆; y R² a R⁶ se seleccionan independientemente entre hidrógeno, halógeno, grupos alquilo C₁₋₆, alqueno, alquino o alcoxi (todos opcionalmente sustituidos con uno o más de halógeno, hidroxilo y arilo), amino, amino mono- o di-sustituido, alquenoilo, acilo, aciloxi, ciano, nitro, arilo y alquiltio;

20 (a) como bloqueadores de los canales de sodio dependientes de voltaje para el tratamiento de trastornos en mamíferos, y particularmente epilepsia, esclerosis, glaucoma y uveítis, traumatismos cerebrales e isquemias cerebrales, apoplejía, lesión en la cabeza, lesión de la médula espinal, traumatismo quirúrgico, trastornos neurodegenerativos, trastorno de la neurona motora, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, dolor crónico inflamatorio, dolor neuropático, migraña, trastorno bipolar, trastornos del estado de ánimo, ansiedad y cognitivo, esquizofrenia y cefaleas trigémino autonómicas, especialmente en humanos;

25 (a) como antifolatos para el tratamiento de trastornos en mamíferos, y particularmente para el tratamiento de cánceres en mamíferos y como antimaláricos contra la malaria por *plasmodium vivax* y *plasmodium falciparum*, especialmente en humanos.

30 La presente invención proporciona compuestos de la reivindicación 1.

La presente invención también proporciona solvatos de cualquiera de los compuestos de la reivindicación 1 o sus sales. El compuesto o su sal puede obtenerse como un solvato del disolvente de reacción o disolvente de cristalización o su componente en la preparación del compuesto. Los solvatos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen hidratos.

35 Los compuestos de la reivindicación 1 pueden tener centros quirales y pueden presentarse como racematos, mezclas racémicas y como enantiómeros o diastereómeros individuales. Todas estas formas isoméricas se incluyen

en la presente invención. También se incluyen en el alcance de la invención todos los isómeros geométricos del compuesto de la reivindicación 1 ya sea como isómeros individuales o sus mezclas. De este modo, los compuestos de la reivindicación 1 en la configuración *trans*- y *cis*- se abarcan por la presente invención; como son formas tautoméricas y sus mezclas, y formas cristalinas polimórficas.

- 5 Ciertos compuestos de la reivindicación 1 pueden prepararse mediante procedimientos desvelados en la Patente de Estados Unidos N° 4.649.139 anteriormente mencionada, a la que debe hacerse referencia adicional. Ciertos compuestos de la reivindicación 1 también pueden prepararse mediante procedimientos desvelados en el documento EP 0 021 121 A, al que debe hacerse referencia adicional.

- 10 La preparación de compuestos específicos anteriormente mencionados se ilustra más adelante en la presente memoria descriptiva. Los compuestos relacionados en el alcance de la invención pueden prepararse mediante variaciones obvias o rutinarias de los procedimientos desvelados, utilizando materiales de partida apropiados para introducir los sustituyentes deseados y restos de compuestos en el alcance de la reivindicación 1.

- 15 Las sales de los compuestos de la reivindicación 1 pueden obtenerse mediante la presencia de un ácido residual en el procedimiento preparativo. Alternativamente, las sales pueden prepararse mezclando el compuesto de la reivindicación 1 con la base libre con un ácido farmacéuticamente aceptable en un disolvente adecuado, y eliminando el disolvente para recuperar la sal, o cristalizando la sal a partir del disolvente.

- 20 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o su solvato, mezclado con un portador farmacéuticamente aceptable. Los compuestos son adecuados para el tratamiento de trastornos tales como epilepsia, esclerosis múltiple, glaucoma y uveítis, traumatismos cerebrales e isquemias cerebrales, apoplejía, lesión en la cabeza, lesión en la médula espinal, traumatismo quirúrgico, trastornos neurodegenerativos, trastorno de la neurona motora, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, dolor crónico inflamatorio, dolor neuropático, migraña, trastorno bipolar, trastornos del estado de ánimo, ansiedad y cognitivo, esquizofrenia y cefaleas trigémino autonómicas.

- 25 Los compuestos de la reivindicación 1 se presentan en las composiciones de la presente invención en forma de dosificación unitaria efectiva, es decir, una cantidad suficiente para ser efectiva contra los trastornos *in vivo*.

Los portadores farmacéuticamente aceptables presentes en las composiciones de la presente invención pueden ser materiales utilizados habitualmente para el fin de administrar el medicamento. Estos pueden ser materiales líquidos o sólidos, que son de otro modo inertes o médicamente aceptables y son compatibles con los principios activos.

- 30 Estas composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vías oral o parenteral, por ejemplo como un supositorio, pomada, crema, polvo o parche transdérmico. Sin embargo, se prefieren la administración oral y la inyección intravenosa de las composiciones.

- 35 Para la administración oral, los polvos finos o gránulos contendrán agentes diluyentes, dispersantes y/o tensioactivos, y pueden presentarse en bebida, en agua o en un jarabe, en cápsulas o sobres en el estado seco o en una suspensión no acuosa en la que se pueden incluir agentes de suspensión, o en una suspensión en agua o jarabe. Cuando se desee o sea necesario, pueden incluirse agentes aromatizantes, conservantes, de suspensión, o espesantes. Los polvos secos o gránulos pueden comprimirse para formar un comprimido o contenerse en una cápsula.

- 40 Para la inyección, los compuestos pueden presentarse en soluciones de inyección acuosas estériles que pueden contener antioxidantes o tampones.

La base libre o una sal o su solvato pueden administrarse en su forma pura sin asociarse con otros aditivos en cuyo caso una cápsula o sobre es el portador preferente.

Alternativamente, el compuesto activo se presenta en una forma pura en una dosificación unitaria efectiva, por ejemplo comprimido como un comprimido o similares.

- 45 Otros compuestos que pueden incluirse son, por ejemplo, ingredientes médicamente inertes, por ejemplo, diluyentes sólidos y líquidos tales como lactosa, almidón, o fosfato de calcio para comprimidos o cápsulas; aceite de oliva u oleato de etilo para cápsulas blandas; y agua o aceite vegetal para suspensiones o emulsiones; agentes lubricantes tales como talco o estereato de magnesio; agentes gelificantes tales como arcillas coloidales; agentes espesantes tales como goma tragacanto o alginato de sodio; y otros ingredientes accesorios terapéuticamente aceptables tales como humectantes, conservantes, tampones, y antioxidantes que son útiles como portadores en tales formulaciones.

- 50 Los comprimidos u otras formas de presentación proporcionadas en unidades distintas pueden contener de manera conveniente una cantidad del compuesto de la reivindicación 1 que es efectiva en dicha dosificación o como un múltiplo de la misma, por ejemplo unidades que contienen de 5 mg a 500 mg, usualmente aproximadamente de 10 mg a 250 mg.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden prepararse mezclando un compuesto de la reivindicación 1 con un portador farmacéuticamente aceptable. Los excipientes farmacéuticos habituales pueden mezclarse según sea necesario. Se proporciona ejemplos de formulaciones adecuadas en la Patente de Estados Unidos N° 4.649.139 anteriormente mencionada.

5 La presente invención también proporciona un compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o su solvato, o una composición como se ha definido previamente, o para la preparación de un medicamento. El medicamento es adecuado particularmente para el tratamiento de trastornos en mamíferos que son susceptibles a los bloqueadores de los canales de sodio y antifolatos, y en particular trastornos tales como epilepsia, esclerosis, glaucoma y uveítis, traumatismos cerebrales e isquemias cerebrales, apoplejía, lesión en la cabeza, lesión de la médula espinal, traumatismo quirúrgico, trastornos neurodegenerativos, trastorno de la neurona motora, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, dolor crónico inflamatorio, dolor neuropático, migraña, trastorno bipolar, trastornos del estado de ánimo, ansiedad y cognitivo, esquizofrenia y cefaleas trigémino autonómicas.

10 Como se ha indicado anteriormente, los compuestos de la reivindicación 1 son generalmente útiles en el tratamiento de tales trastornos mediante la administración oral o inyección intravenosa,

Los compuestos de la reivindicación 1 se administran normalmente en una dosis de 0,01 mg/kg a 20 mg/kg por día, preferentemente 0,1 a 5,0 mg/kg por día.

15 En vista del uso conocido en humanos de los compuestos estructuralmente similares tales como lamotrigina, y otros compuestos conocidos en el alcance de fórmula A y fórmula B, no se prevén grandes problemas de toxicidad en el uso de los compuestos de la reivindicación 1. Sin embargo, los procedimientos de ensayo deben llevarse a cabo antes de su uso clínico.

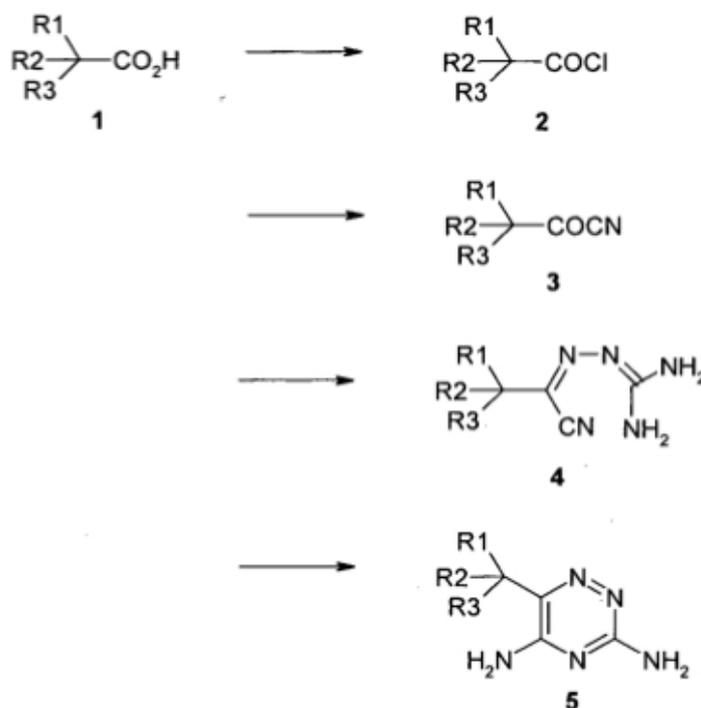
Los anteriores y otros aspectos de la presente invención se ilustrarán actualmente en detalle con referencia a los ejemplos adjuntos.

20 La metodología para la preparación de compuestos ilustrativos de la reivindicación 1 y otros compuestos utilizados en el ensayo, se informan a continuación. Esto puede adaptarse para preparar compuestos análogos con sustituyentes adicionales o alternativos o restos mencionados en el presente documento.

En los procedimientos siguientes todas las temperaturas están en °C.

Procedimiento general

Compuestos de 6-alkil/aralkil-3,5-diamino-1,2,4-triazina



Cloruro de trifenilacetilo [3; R₁=R₂=R₃ = Ph]

Se agitó una mezcla de ácido trifenilacético (21,7g; 0,075 mol) y dimetilformamida seca (2 gotas) en diclorometano seco (100cm³) con cloruro de oxalilo (14g; 0,11mol) que se añadió en 4 partes aproximadamente iguales durante ~ 25 minutos. La mezcla se agitó a 35 °C hasta que cesó la evolución de cloruro de hidrógeno (~ 4 horas). La solución incolora resultante se evaporó al vacío a 40 °C en un peso constante para dar el compuesto del título como un sólido cristalino incoloro. Rendimiento = 23,24g (100,0%). El producto se utilizó directamente en la siguiente etapa.

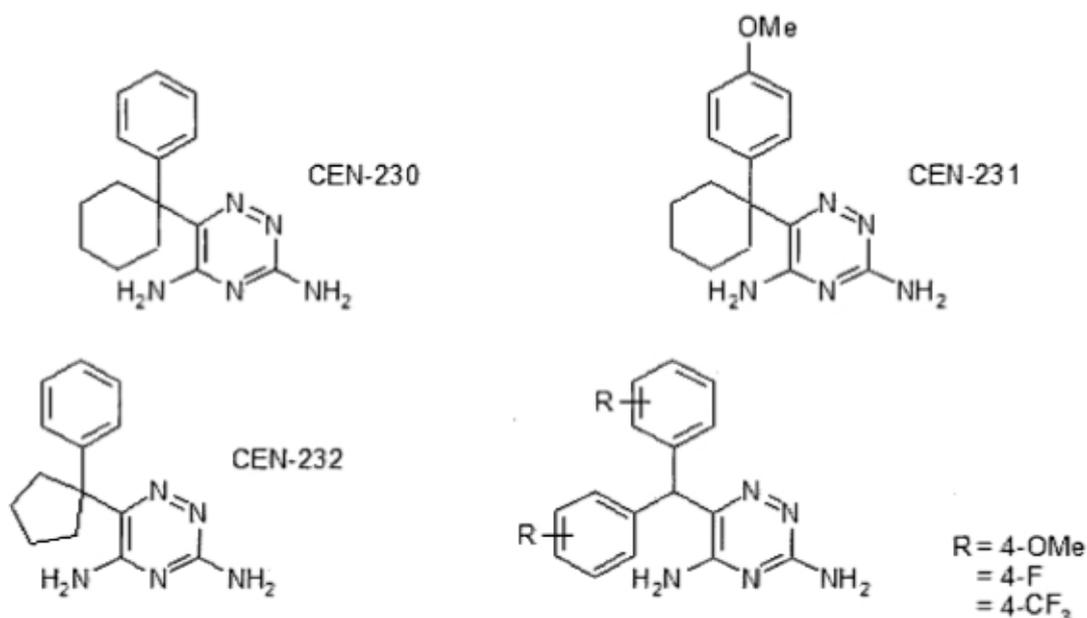
Se prepararon de manera similar:

Cianuro de trifenilacetilo [4; R₁=R₂=R₃ = Ph]

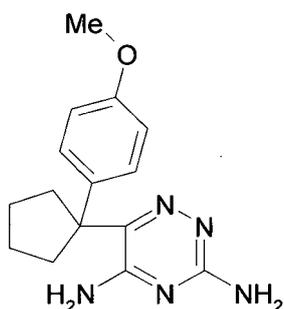
Una mezcla bien agitada [agitador de paletas] de cloruro de trifenilacetilo (23,24g; 0,075mol), tolueno seco (40 cm³), acetonitrilo seco (10 cm³), cianuro de cobre I (9,20g; 0,103mol), Celite (3,5g) y yoduro de potasio dividido finamente en polvo (2 g) se calentó a reflujo hasta que no quedó cloruro de ácido (~ 18 horas). La mezcla de reacción negra se enfrió a ~ 75 °C y se diluyó con tolueno (150 cm³). Tras la agitación durante 30 minutos adicionales, la suspensión resultante se filtró a través de un lecho de gel de sílice para cromatografía (~ 2,5 cm) y el filtrado incoloro se evaporó al vacío en un peso constante para dar el compuesto del título como un sólido incoloro. Rendimiento = 21,97g (98,7%), Mpt = 67-69 °C. El producto se utilizó directamente en la siguiente etapa.

Base de Schiff, cianohidrazona, (4; R₁=R₂=R₃ = Ph]

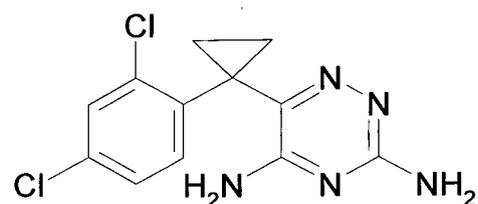
A una solución agitada de bismesilato de aminoguanidina (15,00g; 0,0564mol) en ácido metanosulfónico al 99,5% (22,5g) a 65-70 °C se añadió gota a gota una solución de cianuro de trifenilacetilo (8,91g; 0,030mol) en acetonitrilo (25 cm³) durante 25 minutos. La mezcla se agitó a continuación a 68 °C hasta que una muestra dio una solución clara en agua (~ 28 horas) y se vertió después sobre hielo/agua picado (150 g) dando un precipitado incoloro semisólido. La mezcla se neutralizó (pH 8-9) con hidróxido de sodio al 48% (17,5 cm³) para dar el compuesto del título como un sólido granular crema. El producto se filtró, se lavó con agua y se secó al vacío a 45 °C. Rendimiento = 8,47g (80,0%), Mpt = 112-114 °C, TLC [placa de SiO₂, metanol al 10% en cloroformo], F_r = 0,68. El producto se utilizó directamente en la siguiente etapa.

25 Compuestos de triazina

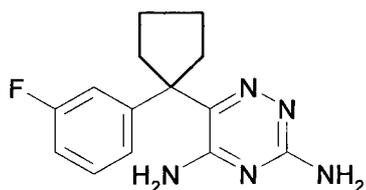
CEN234



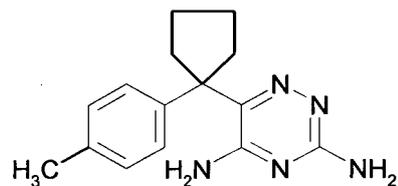
CEN235



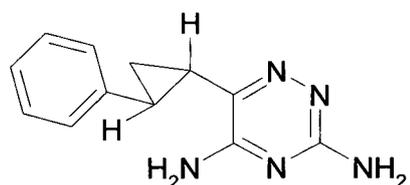
CEN236



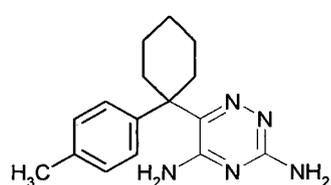
CEN237



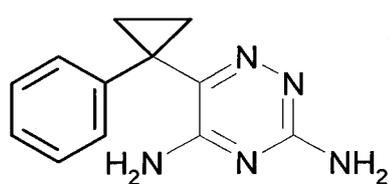
CEN238



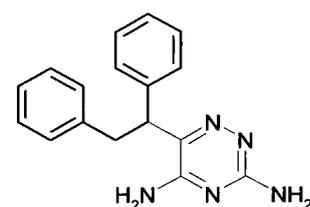
CEN239



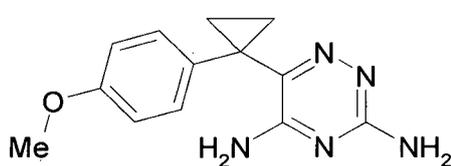
CEN240



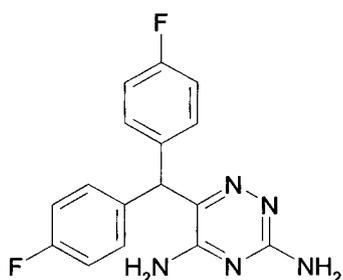
CEN241



CEN244



CEN247



Ensayo biológico

Se testaron ciertos componentes para diversas actividades de la siguiente manera:

Estrategia de exploración

- 5 La estrategia de exploración se diseña para seleccionar compuestos con actividad bloqueadora de los canales de sodio apropiada y bajo riesgo de efectos secundarios. Con este fin todos los compuestos se procesan a través de la prueba de los canales de sodio primarios (captación de [^{14}C]guanidina provocada por veratrina en sinaptosomas de cerebro anterior de rata) y los valores de Cl_{50} se calcularon a partir de las curvas de concentración-efecto generadas. Para complementar estos datos, se miden también las Cl_{50} de compuestos seleccionados para inhibir la
- 10 unión de [^3H]BTX-B.

Los estudios previos han demostrado que las triazinas sustituidas son inhibidores potenciales de la actividad de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (McCullough y Bertino 1971, Cashmore y col, 1975, Booth y col, 1987) y Sapse y col, 1994). Los inhibidores de la DHFR (tales como Metotrexato) se han utilizado para el tratamiento de varios tipos de

cáncer (Suster y col, 1978 y Niculescu-Duvaz y col, 1982) ya que la inhibición de esta enzima interfiere con el crecimiento celular pero debido a este efecto (en el crecimiento celular) los inhibidores de la DHFR también pueden ser teratogénicos (Skalko y Gold, 1974, Feldcamp y Carey, 1993 y Buckley y col, 1997). Si se descubrieran compuestos que son potentes inhibidores de la DHFR entonces estos compuestos pueden, ellos mismos, tener potencial como agentes anticancerígenos. Se disponen diversos procedimientos para medir la inhibición de la actividad de la DHFR y para este estudio los investigadores han examinado los efectos de los compuestos para inhibir la unión de [³H] metotrexato (Myers y col, 1975 y Rothenberg y col, 1977).

Otro marcador de efectos secundarios común es la inhibición de la actividad del canal de potasio (rectificador de entrada, I_{Kr}) del gen humano relacionado con éter-a-go-go (hERG) que puede ser fatal debido a la insuficiencia cardíaca provocada por el desarrollo del síndrome QT largo. Se evalúa una exploración preliminar útil para evaluar el potencial que afecta a este canal mediante la medición de la inhibición de la unión de [³H]astemizol a las membranas celulares que expresan hERG. Los compuestos seleccionados se testan para esta actividad midiendo la inhibición a 10 μM. Suponiendo que los valores de inhibición se sitúan entre 10% y 90% es posible calcular una CI₅₀ extrapolada para cada compuesto.

La cascada de exploración anterior identifica compuestos con actividades bloqueadoras de los canales de sodio que tienen una tendencia baja (menor) para los riesgos de efectos secundarios ya mencionados. Con el fin de desarrollar estos compuestos aún más, se requiere un cierto conocimiento de sus propiedades farmacodinámicas.

Los bloqueadores de los canales de sodio, tales como Sipatrigina, que reduce tanto el déficit neurológico como el volumen de infarto después de la oclusión de la arteria cerebral media en ratas (Smith y col, 1997) y la fenitoína, (que protege la muerte de las células ganglionares retinianas en un modelo experimental de glaucoma (Hains y Waxman, 2005) muestran eficacia neuroprotectora en una serie de modelos de degeneración del nervio. Puesto que la insuficiencia del suministro de oxígeno compromete tanto la glicosis como la fosforilación oxidativa, el daño isquémico conduce finalmente a la insuficiencia eléctrica (señales nerviosas) e insuficiencia de la bomba (restauración de los potenciales de la membrana celular). Estas insuficiencias (de actividad de la bomba eléctrica y de iones) se asocian con menores concentraciones locales de ATP (Astrup y col 1981). De este modo, se utilizó el efecto de los compuestos para mantener las concentraciones de ATP en cortes de 0,4 mm del hipocampo de rata después de un ataque metabólico severo.

Procedimientos experimentales

Preparación de sinaptosomas del cerebro anterior de rata y homogeneizados

Los experimentos se realizaron utilizando cerebro anterior (el cerebro completo menos cerebelo/médula) de ratas Wistar macho con un peso de 175-250 g. Se hicieron todos los esfuerzos para reducir el número de animales utilizados y se llevaron a cabo todos los experimentos según la ley de animales (Procedimientos Científicos) del Reino Unido, 1986 y la Directiva del Consejo de la Comunidad Europea del 24 de noviembre de 1986 (86/609/EEC). Tras la muerte de los animales por aturdimiento y decapitación, se disecó y se transfirió rápidamente el cerebro anterior (cerebro completo menos cerebelo/médula) a un tubo pesado que contiene sacarosa 0,25 M enfriada con hielo.

Los sinaptosomas (fracción mitocondrial pesada y ligera que contiene sinaptosomas) se prepararon mediante la transferencia del cerebro anterior (de peso húmedo conocido) a un recipiente de vidrio Potter al que se habían añadido 9 volúmenes de sacarosa 0,25 M enfriada con hielo y se homogeneizó, utilizando una mano de mortero de teflón, mediante "8 golpes arriba y abajo" de un homogeneizador accionado por motor de Braun Potter S ajustado a 900 rpm. El homogeneizado resultante se centrifugó a 1036 x g a 4 °C durante 10 min y se recogió el sobrenadante. El pellet restante se volvió a suspender, como anteriormente, en sacarosa 0,25 M enfriada con hielo y se repitió la etapa de centrifugación. Las fracciones del sobrenadante se agruparon y se centrifugaron a 40000 x g (promedio) a 4 °C durante 15 min y el pellet resultante se volvió a suspender en el tampón de ensayo apropiado a una concentración de peso húmedo de 20-25 mg por ml de tampón de ensayo apropiado.

Los homogeneizados se prepararon mediante la transferencia del peso conocido del cerebro anterior a un tubo enfriado que contiene 9 volúmenes de 50 mM de tampón HEPES enfriado con hielo, pH 7,4. La mezcla se homogeneizó a 4 °C mediante ráfagas de 3 x 5 seg de un homogeneizador Ultra-Turrax™ ajustado a la velocidad máxima. El homogeneizado resultante se centrifugó a 40000 x g (promedio) a 4 °C durante 15 min y se descartó el sobrenadante. El pellet resultante se volvió a suspender en 9 volúmenes de tampón a pH 7,4 enfriado con hielo (como anteriormente), se repitió la etapa de centrifugación y el pellet resultante se volvió a suspender en el tampón de unión [³H] BTX-B en una concentración de 20-25 mg de peso húmedo por ml de tampón de ensayo.

Flujo de [¹⁴C]guanidina y unión de [³H]BTX-B

Ambos ensayos se llevaron a cabo utilizando tubos de ensayo de polipropileno de 14 ml a los que se añadieron un intervalo de concentraciones de los compuestos sometidos a prueba. Los compuestos de ensayo se disolvieron en DMSO y se añadieron a los ensayos de modo que la concentración máxima de DMSO no exceda el 2% v/v.

Flujo de [¹⁴C]guanidina:

El ensayo de flujo de [¹⁴C]guanidina se midió utilizando el procedimiento de Pauwels PJ y col (1986), pero se realizó a 30 °C durante 2 ½ min.

Referencia:

- 5 Pauwels PJ, Leysen JE, Laduron PM. [³H]Batrachotoxinin A 20- α -benzoate binding to sodium channels in rat brain: characterization and pharmacological significance. Eur J Pharmacol. 1986 May 27;124(3):291-8.

Unión de [³H]BTX-B

La unión de [³H]BTX-B se realizó utilizando el procedimiento descrito de Catterall y col (1981), excepto que tanto la albúmina de suero bovino como TTX se omitieron del medio de incubación. Los compuestos de ensayo se disolvieron en DMSO y se añadieron a ensayos de modo que la concentración máxima de DMSO no exceda el 2% v/v.

Referencia:

Catterall WA, Morrow CS, Daly JW, Brown GB. Binding of batrachotoxinin A 20- α -benzoate to a receptor site associated with sodium channels in synaptic nerve ending particles. J Bio. Chem. 1981 Sep. 10; 256(17): 8922-7.

Unión de [³H]Metotrexato

Todas las etapas se llevaron a cabo a 4 °C (o en hielo). El hígado de rata recién diseccionado se disecó en sacarosa 0,25 M enfriada con hielo y posteriormente se homogeneizó (U-Turrax) en 50 mM de tampón fosfato, pH 6,0 (10 ml/g de tejido) que contiene 15 mM de Ditiotreitól. El homogeneizado resultante se centrifugó a 47500 x g durante 20 min y el sobrenadante (filtrado a través de algodón hidrófilo para eliminar masas de grasa) se almacenó a -80 °C antes de su uso (Rothenberg y col).

La inhibición de la unión de [³H] metotrexato a las fracciones de sobrenadante del homogeneizado de hígado de rata se realizó esencialmente como describen Arons y col, 1975. Se calcularon los resultados, ya sea como valores de CI₅₀ (véase a continuación) obtenidos a partir de curvas de concentración-efecto o como valores de porcentaje de inhibición determinados por comparación con el control y los valores de unión de Metotrexato frío (concentración final de 10 μ M).

Referencia:

Elliot Arons, Sheldon P. Rothenberg, Maria da Costa, Craig Fischer y M. Perwaiz Iqbal; *Cancer Research* 35, August 1, 1975, 2033-2038,

Cálculo de los valores de CI₅₀

Los valores de CI₅₀ se obtuvieron a partir del desplazamiento de radioligando o curvas de inhibición del flujo de guanidina mediante la representación gráfica de la concentración log₁₀ frente al ligando unido/captación de guanidina según la ecuación:-

$$y = R_{min} + R_{sp} / \{1 + \exp [-n (x - C)]\}$$

en la que

- 35 y = unido (dpm)
 x = concentración log₁₀ del compuesto
 R_{min} = asíntota inferior (es decir, inhibición del 100%)
 R_{sp} = asíntota superior - R_{min} (es decir, unión específica)
 n = pendiente (log_e)
 40 y
 C = CI₅₀ (es decir, concentración necesaria para inhibir el 50% de la unión específica)

Ensayo de cortes del hipocampo

La eficacia neuroprotectora se midió en cortes de 0,4 mm de hipocampo de rata utilizando el procedimiento descrito en Fowler y Li (1998) ¹, excepto que Iodoacetato (400 μ M) ² se utilizó como el ataque metabólico. Los compuestos (usualmente 30 μ M) siempre se compararon directamente con tetrodotoxina (1 μ M) ³ por su capacidad para mantener las concentraciones de cortes de ATP después de la inhibición de la glicólisis.

Referencias:

1. Fowler J C, Li Y. Contributions of Na⁺ flux and the anoxic depolarization to adenosine 5'-triphosphate levels in hypoxic/hypoglycemic rat hippocampal slices. *Neuroscience* 1998, 83, 717-722.

2. Reiner PB, Laycock AG, Doll CJ. *A pharmacological model of ischemia in the hippocampal slice*. Neurosci Lett 1990; 119:175-8

3. Boening JA, Kass IS, Cottrell JE, Chambers G. *The effect of blocking sodium influx on anoxic damage in the rat hippocampal slice*. Neuroscience. 1989. vol 33 (2), 263-268.

5 Medición de ATP y proteína

Los cortes individuales se interrumpieron por ultrasonidos y los homogeneizados resultantes se centrifugaron a 10000 x g durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante se decantó en un tubo nuevo y el sobrenadante restante se eliminó mediante aspiración al vacío. El pellet se volvió a suspender en 0,5 ml de KOH 0,1 M por ultrasonidos y las suspensiones resultantes se calentaron con agitación suave a 37 °C durante 30 minutos.

10 Las concentraciones de ATP se midieron en 6 µl de sobrenadante mezclando con reactivo de luciferasa (ATPLite de Perkin Elmer) y midiendo posteriormente la luminiscencia en un contador de placa de 96 pocillos.

La concentración de proteína se midió utilizando el ensayo de proteína BCA™ (Pierce) con albúmina de suero bovina como patrón de referencia.

15 Las concentraciones de ATP se expresaron como nmoles/mg de proteína y los índices neuroprotectores (% de protección) se calcularon por comparación directa con el efecto de TTX de 1 µM.

hERG:

20 Los compuestos se enviaron a MDS Pharma para medir su inhibición en concentración de 10 µM de la unión de [³H] astemizol a las células HEK-293 que expresan hERG recombinante humano. Haciendo la suposición de que las pendientes de unión son 1,0, se podrían calcular los valores CI₅₀ (véase anteriormente) para los compuestos que presentan una inhibición de unión entre 5% y 95%.

Canales de calcio tipo L

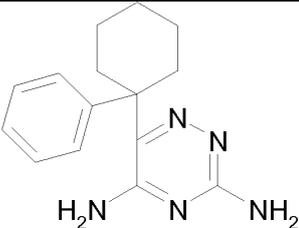
25 Los compuestos se enviaron a MDS Pharma para medir su inhibición en concentración de 10 µM de la unión de [³H] nitrendipino a las membranas de corteza cerebral de rata. Haciendo la suposición de que las pendientes de unión son 1,0, se podrían calcular los valores de CI₅₀ (véase anteriormente) para los compuestos que presentan una inhibición de unión entre 5% y 95%.

Estabilidad en microsomas de rata

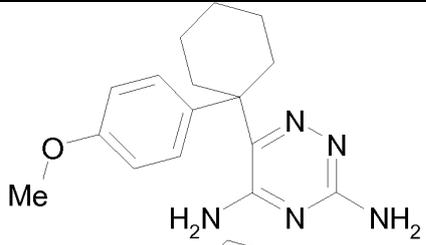
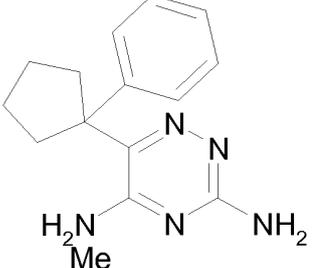
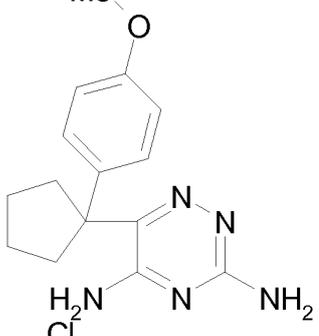
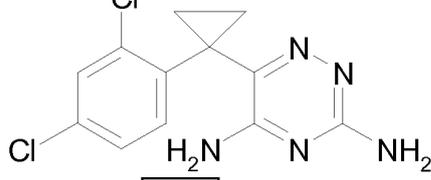
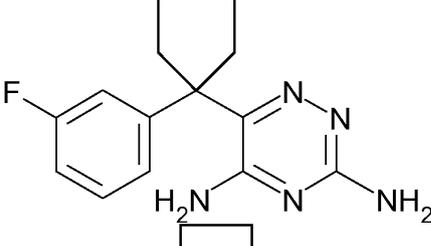
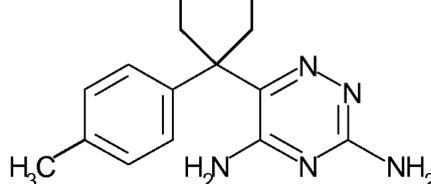
Los compuestos se enviaron a BioFocus para medir su estabilidad en concentración de 1 µM después de la incubación con microsomas de hígado de rata durante 40 minutos a 37 °C.

30 Los datos de la exploración se obtuvieron con respecto a los compuestos representativos de los puntos de la invención a la idoneidad de los compuestos de la reivindicación 1 para el tratamiento de trastornos en mamíferos que son susceptibles a los bloqueadores de los canales del sodio y antifolatos, y en particular trastornos tales como epilepsia, esclerosis múltiple, glaucoma y uveítis, traumatismos cerebrales e isquemias cerebrales, apoplejía, lesión en la cabeza, lesión en la médula espinal, traumatismo quirúrgico, trastornos neurodegenerativos, trastorno de la neurona motora, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, dolor crónico inflamatorio, dolor neuropático, migraña, trastorno bipolar, trastornos del estado de ánimo, ansiedad y cognitivo, esquizofrenia y cefaleas trigémino autonómicas.

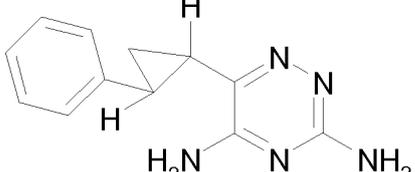
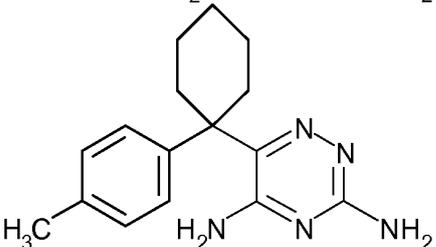
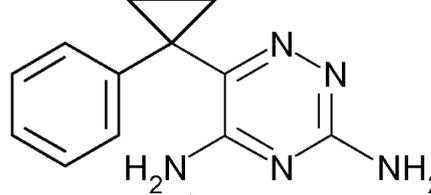
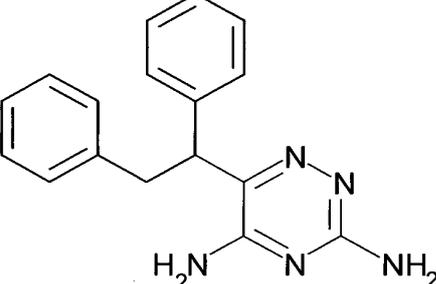
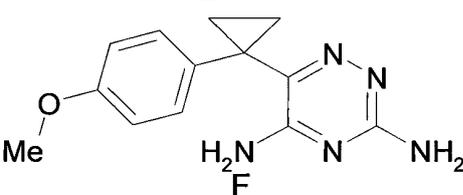
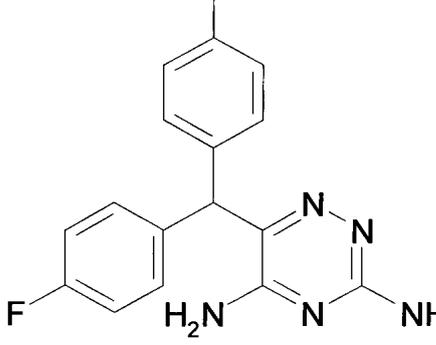
Los datos de los procedimientos se exponen en la siguiente tabla:

Estructura del compuesto N°	Nach ([³ H]BTX-B) (µM CI ₅₀ extrapolada)	DHFR (% de inhibición en 125 µM)
CEN-230 	23	0

(continuación)

Estructura del compuesto N°	Nach ([3H]BTX-B) (μM Cl_{50} extrapolada)	DHFR (% de inhibición en 125 μM)
CEN-231 	1	ND
CEN-232 	5	100
CEN-234 	3	22
CEN-235 	8	63
CEN-236 	4	14
CEN-237 	< 0,5	70

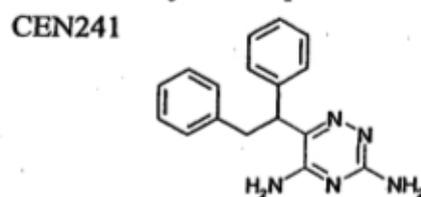
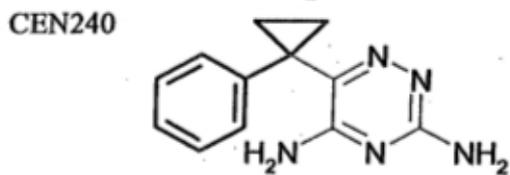
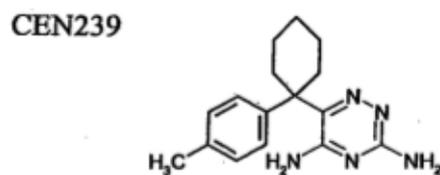
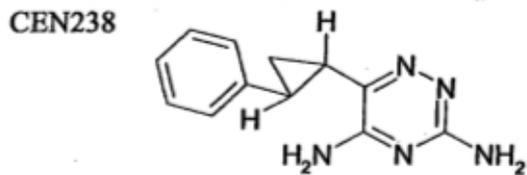
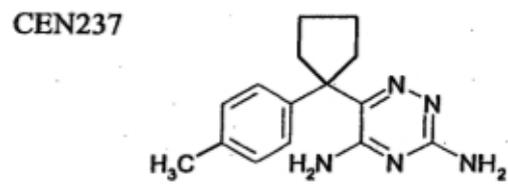
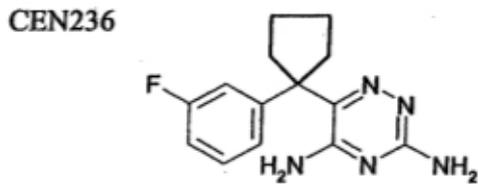
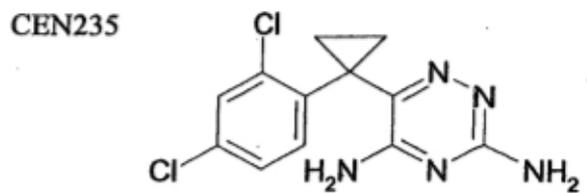
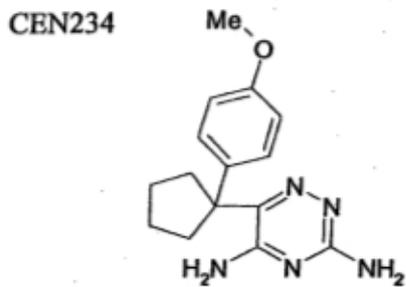
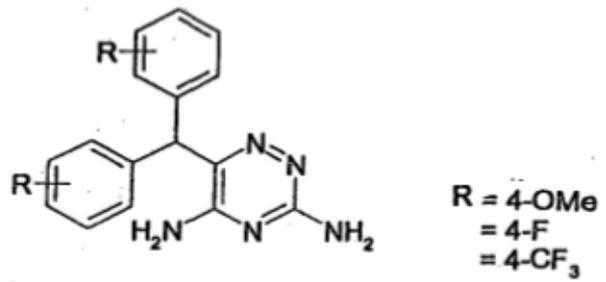
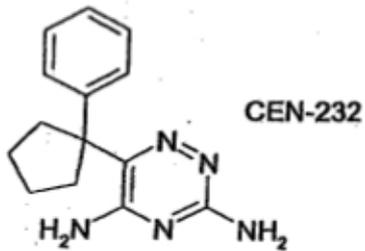
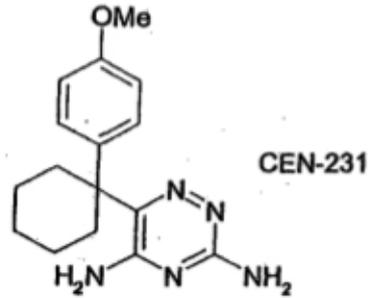
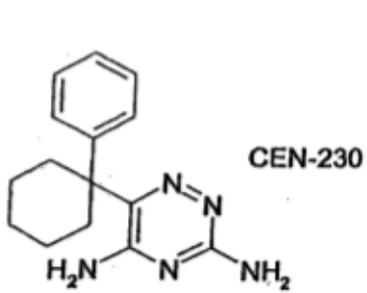
(continuación)

Estructura del compuesto N°	Nach ([3H]BTX-B) (μM Cl_{50} extrapolada)	DHFR (% de inhibición en 125 μM)
<p>CEN-238</p> 	<p>>190</p>	<p>ND</p>
<p>CEN-239</p> 	<p>< 0,5</p>	<p>73</p>
<p>CEN-240</p> 	<p>> 190 y 31,7</p>	<p>8</p>
<p>CEN-241</p> 	<p>< 0,5 y 1,5</p>	<p>90</p>
<p>CEN-244</p> 	<p>115</p>	<p>0</p>
<p>CEN-247</p> 	<p>9</p>	<p>0</p>

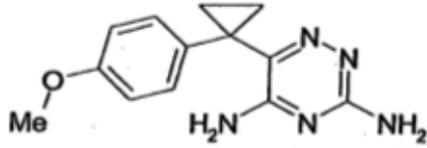
(CEN-001) Resultado de lamotrigina utilizando la prep de enzima en 125 micromolar dio una inhibición del 26%

REIVINDICACIONES

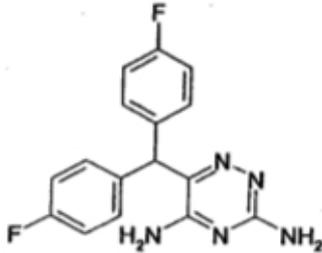
1. Un compuesto seleccionado entre:



CEN244



CEN247



2. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o su solvato, mezclado con un portador farmacéuticamente aceptable.
- 5 3. Una composición farmacéutica según la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de la epilepsia, esclerosis múltiple, glaucoma y uveítis, traumatismos cerebrales e isquemias cerebrales, apoplejía, lesión en la cabeza, lesión en la médula espinal, traumatismo quirúrgico, trastornos neurodegenerativos, trastorno de la neurona motora, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, dolor crónico inflamatorio, dolor neuropático, migraña, trastorno bipolar, trastornos del estado de ánimo, ansiedad y cognitivo, esquizofrenia y cefaleas trigémico autonómicas..
- 10 4. Un compuesto según la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o su solvato para su uso en el tratamiento de la epilepsia, esclerosis múltiple, glaucoma y uveítis, traumatismos cerebrales e isquemias cerebrales, apoplejía, lesión en la cabeza, lesión en la médula espinal, traumatismo quirúrgico, trastornos neurodegenerativos, trastorno de la neurona motora, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, dolor crónico inflamatorio, dolor neuropático, migraña, trastorno bipolar, trastornos del estado de ánimo, ansiedad y cognitivo, esquizofrenia y
- 15 cefaleas trigémico autonómicas.