(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 568 491**

(51) Int. CI.:

A61P 25/00 (2006.01)
A61P 27/12 (2006.01)
A61K 31/136 (2006.01)
C07C 215/76 (2006.01)
C07C 229/60 (2006.01)
C07C 229/64 (2006.01)
C07C 235/60 (2006.01)
C07C 309/49 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2003 E 03738707 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.01.2016 EP 1551793**

(54) Título: **Derivados de tetrafluorobencilo y composición farmacéutica para prevenir y tratar enfermedades neurodegenerativas agudas y crónicas en el sistema nervioso central que contiene dichos derivados**

(30) Prioridad:

19.06.2002 KR 2002034259

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.04.2016

(73) Titular/es:

GNT PHARMA CO., LTD. (100.0%)
Owesammiro 53
Osansi, Geonggido, KR

(72) Inventor/es:

GWAG, BYOUNG JOO;
YOON, SUNG HWA;
MOON, HO SANG;
PARK, EUN CHAN;
WON, SEOK JOON;
LEE, YOUNG AE y
LEE, HAE UN

(74) Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

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 tetrafluorobencilo y composición farmacéutica para prevenir y tratar enfermedades neurodegenerativas agudas y crónicas en el sistema nervioso central que contiene dichos derivados

Campo técnico

[0001] La presente invención se refiere a un derivado de tetrafluorobencilo según la fórmula de Markush de la reivindicación 1 y a una composición farmacéutica que comprende dicho derivado como ingrediente farmacéuticamente eficaz y, más en particular, a un derivado de tetrafluorobencilo para el tratamiento y la prevención de enfermedades neurológicas y enfermedades oculares.

Antecedentes en la técnica

[0002] Los recientes avances en medicina han prolongado la vida de los seres humanos y, como resultado, se ha incrementado el número de enfermedades neurológicas agudas y crónicas relacionadas con la edad, tales como la enfermedad de Alzheimer, el ictus, la enfermedad de Parkinson, etc. Estas enfermedades neurológicas se caracterizan por el progreso de la degeneración de neuronas específicas durante el desarrollo de las enfermedades. A medida que las neuronas maduras dejan de regenerarse una vez que mueren, la muerte neuronal en las enfermedades neurológicas anteriores puede dar lugar a una pérdida incurable de las funciones cerebrales esenciales incluyendo la cognición, la sensación y el movimiento, y por tanto dar lugar a una sobrecarga económica y social.

[0003] La excitotoxicidad, el estrés oxidativo y la apoptosis se han identificado como las principales vías de la muerte neuronal que se producen en varias enfermedades neurológicas y se propagan a través de vías de señalización distintivas para cada ruta.

[0004] El glutamato es el neurotransmisor excitatorio que interviene en la transmisión sináptica excitatoria lenta a través de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) y la transmisión sináptica excitatoria rápida a través de los receptores de kainato o receptores α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónicos (AMPA). En las neuronas en estado de reposo, los canales de los receptores de NMDA bloquean el Mg^{2+} de manera dependiente del voltaje. Con los estímulos que provocan la despolarización de membrana, el Mg^{2+} se libera de los canales de NMDA, haciendo que los canales sean permeables a Ca^{2+} y Na^{+}. La activación de los receptores de NMDA desempeña un papel importante en procesos fisiológicos, incluyendo el aprendizaje y la memoria [Siegel G. J. et al., Basic Neurochemistry, 6th edition, Lippincott Williams & Wilkins, 315-333 (1999)]. Además de las funciones fisiológicas, durante las últimas dos décadas se han estudiado ampliamente la activación breve y en exceso de los receptores de NMDA que puede causar la muerte neuronal de evolución rápida y los mecanismos subyacentes de neurotoxicidad mediada por el receptor de NMDA.

[0005] En 1969, Olney et al. informaron de que la administración oral de glutamato monosódico produjo la muerte de células neuronales en el cerebro de ratones o monos [Olney, J. W. y Sharpe, L. G., Science, 166:386-388 (1969); Olney, J. W. y Ho, O. L., Nature, 227(258): 609-611 (1970)], lo que sugiere que el glutamato, el neurotransmisor excitatorio, interviene en la excitabilidad y muerte neuronal en la epilepsia [Olney, J. W., Int. Rev. Neurobiol., 27: 337-62: 337-362 (1985)]. La administración de glutamato induce la muerte neuronal en cultivos de neuronas corticales, que se produce a través de la activación de los receptores de NDMA y depende de la entrada de Ca^{2+} [Choi, D. W., J. Neurosci., 7(2) 369-379 (1987)]. La neurotoxicidad (o excitotoxicidad) del glutamato se ha propuesto como una vía importante para la muerte neuronal en ictus, además de la epilepsia [Choi. D. W., Neuron, 1: 623-634 (1988)]. El suministro interrumpido de sangre al cerebro da como resultado la privación de oxígeno y glucosa, lo que provoca un fallo de energía (ATP), la disfunción de los canales iónicos dependientes de ATP, y la despolarización de la membrana que incrementa la liberación de glutamato. El fallo de energía también reduce la captación de glutamato en las células gliales. En consecuencia, el glutamato se acumula anormalmente en la hendidura sináptica [Choi, D.W. y Rothman, S. M., Annu. Rev. Neurosci., 13: 171-182 (1990); Benveniste, H. et al., J. Neurochem., 43(5): 1369-1374 (1984)]. La acumulación excesiva de glutamato provoca la muerte de las células neuronales principalmente a través de la activación de los receptores de NMDA. De hecho, se ha informado de la administración de antagonistas de los receptores de NMDA para reducir la muerte neuronal después de una lesión cerebral hipóxica-isquémica [Goldberg, M. P. et al., J. Pharmac. Exp. Ther., 243: 784-791 (1987); Simon et al., Science 226: 850-852 (1984); Sheardown, M. J. et al., Science 247: 571-574 (1990)].

[0006] Hay muchas pruebas que respaldan que la excitotoxicidad también contribuye a la muerte neuronal en

enfermedades neurodegenerativas. Las características patológicas principales de la enfermedad de Huntington (EH) incluyen la degeneración de las neuronas GABAérgicas y la preservación selectiva de las neuronas que contienen NADPH diaforasa en el área estriatal. Estas características patológicas de la EH se observan después de inyecciones intraestriatales de NMDA o ácido quinolínico, un agonista del receptor de NMDA [Ferrante, R. J et al., Science, 230 (4625): 561-563 (1985); Beal, M. F. et al., Nature, 321 (6066): 168-171 (1986); Koh, J.Y. et al., Science, 234(4772): 73-76 (1986)]. La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) va acompañada por degeneración de las neuronas motoras superiores e inferiores y marcada por atrofia neurogénica, debilidad y fasciculación. Si bien queda por resolver la patogénesis de la ELA, se espera que la excitotoxicidad participe en el proceso de la ELA. En particular, los pacientes con ELA muestran defectos en la síntesis y transporte de glutamato y un aumento en los niveles de glutamato extracelular [Rothstein, J. D., Clin. Neurosci., 3 (6): 348-359 (1995); Shaw, P. J. e Ince, P. G., J. Neurol., 244 Suppl 2: S3-14 (1997)].

[0007] Aunque la excitotoxicidad mediada por el receptor de NMDA desempeña un papel causante en los ictus y enfermedades neurodegenerativas, el potencial terapéutico de los antagonistas del receptor de NMDA se ha visto limitado por los inesperados efectos secundarios en el cerebro. En particular, la administración sistémica de antagonistas del receptor de NMDA deteriora la función normal del cerebro y puede causar daño neuronal generalizado en el cerebro de rata adulta [Olney et al., Science 244: 1360-1362 (1989)]. Los efectos secundarios neuropsicopatológicos son producidos por los antagonistas del receptor de NMDA de alta afinidad tales como la fenciclidina y antagonistas relacionados con el receptor de NMDA tales como MK-801 (maltato de dizocilpina), tiletamina y ketamina y se pueden superar con la administración de antagonistas del receptor de NMDA que bloquean los canales con baja afinidad y la respuesta cinética rápida [Rogawski, Amino Acids 19: 133-149 (2000)].

[0008] Los radicales libres intervienen en la muerte neuronal que se produce en las enfermedades neurológicas, así como en los daños en los tejidos que se producen en todo el cuerpo [Halliwell, B. y Gutteridge, J. M., Mol. Aspects. Med., 8 (2): 89-193 (1985); Siesjo, B. K. et al., Cerebrovasc. Brain Metab. Rev., 1(3): 165-211 (1989); Schapira, A. H., Curr. Opin. Neurol., 9(4)260-264 (1996)]. Los radicales libres son producidos en áreas del cerebro en degeneración después de lesiones hipóxico-isquémicas o traumáticas del cerebro y de médula espinal. Los antioxidantes o captadores de radicales libres atenúan los daños cerebrales por hipoxia-isquemia o lesiones traumáticas [Flamm, E. S. et al., Stroke, 9(5): 445-447 (1978); Kogure, K. et al., Prog. Brain Res., 63: 237-259 (1985); Chan, P. H. J. Neurotrauma., 9 Suppl 2: S417-423 (1992); Faden, Pharmacol. Toxicol. 78: 12-17 (1996)]. Numerosas evidencias respaldan que los radicales libres son producidos en áreas del cerebro sometidas a degeneración en enfermedades neurodegenerativas, posiblemente debido a mutaciones puntuales en la superóxido dismutasa Cu/Zn en ELA [Rosen et al., Nature 362: 59-62 (1993)], la disminución de glutatión reducida, glutatión peroxidasa, y catalasa, y el aumento de hierro en la sustancia negra en la enfermedad de Parkinson [Sofic, E. et al., J. Neural Transm., 74: 199-205 (1988); Fahn, S. y Cohen, G., Ann. Neurol., 32 (6): 804-812 (1992)], la oxidación de lípidos, nucleótidos, y proteínas, un aumento del hierro en tejidos neurales en degeneración, y la generación de radicales libres por beta amiloide en el cerebro con enfermedad de Alzheimer [Schubert, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92 (6): 1989-1993 (1995); Richardson, J. S. et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 777: 362-367 (1996)], y disfunción mitocondrial en la EH [Dexter, D. T. et al., Ann Neurol. 32 Suppl: S94-100 (1992)]. En consecuencia, los antioxidantes han sido neuroprotectores contra dichas enfermedades neurodegenerativas [Jenner, Pathol. Biol. (París) 44: 57-64 (1996); Beal, Ann. Neurol. 38: 357-366 (1995)].

[0009] El cinc (Zn^{2+}) es un metal de transición que está muy presente y desempeña un papel dinámico en el cerebro. Dentro de las células, el cinc está asociado a metaloproteínas para controlar la actividad enzimática y la estabilidad estructural de las proteínas. Además, el cinc regula la expresión génica mediante la unión a diversos factores de transcripción. En el SNC, el cinc se localiza en el terminal sináptico de las neuronas glutamatérgicas, se libera de manera dependiente de la actividad, y regula la actividad de diversos receptores de neurotransmisores y canales iónicos.

[0010] El Zn^{2+} interviene en un proceso neurodegenerativo observado en convulsiones, isquemia, traumatismo, y la enfermedad de Alzheimer (EA). La administración central de kainato, una excitotoxina que induce convulsiones, provoca la translocación de Zn^{2+} hacia neuronas postsinápticas en degeneración en varias áreas del prosencéfalo. También se observó la translocación de cinc en las neuronas adyacentes después de enfermedad cerebral isquémica y traumática, y el bloqueo de su transición inhibió la muerte celular neuronal [Frederickson, C. J. y Bush, A. I., Biometals. 14: 353-366 (2001); Weiss et al., Trend. Pharmacol. Sci. 21: 395-401 (2001)]. Se sabe que el cinc entra en las neuronas a través de los receptores de NMDA y AMPA/KA permeables al Ca^{2+}, el canal de voltaje dependiente de Ca^{2+}, o la proteína transportadora de cinc, y que induce la muerte neuronal por la activación de la NADPH oxidasa generando especies reactivas de oxígeno. El Zn^{2+} se observa en la placa extracelular y en neuronas en degeneración en la EA, que probablemente contribuye a la degeneración neuronal en la EA [Suh et al.,

Brain Res. 852: 274-278 (2000); Bush et al., Science 265: 1464-1467 (1994); Lee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 7705-7710 (2002)]. Por lo tanto, se ha sugerido la inhibición de la liberación y la toxicidad del cinc como nueva estrategia para la prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer [Fredrickson y Bush, Biometals; 14: 353-66 (2001)].

[0011] El documento WO 01/79153 desvela derivados del ácido 5-bencilamino salicílico para el tratamiento de ciertas enfermedades neurológicas.

[0012] Como se ha descrito anteriormente, la excitotoxicidad mediada por el receptor de NMDA, el estrés oxidativo, y el cinc pueden contribuir a la muerte neuronal en diversas enfermedades agudas y neurodegenerativas en el sistema nervioso. Por lo tanto, se deben desarrollar fármacos terapéuticos eficaces que impidan cada una de las vías de muerte neuronal para tratar este tipo de enfermedades neurológicas catastróficas.

[0013] Hemos investigado el desarrollo de fármacos neuroprotectores con múltiples efectos neuroprotectores contra la excitotoxicidad o el estrés oxidativo y hemos tenido éxito en la invención de derivados de tetrafluorobencilo que se pueden aplicar para tratar ictus, traumatismos, y algunas enfermedades neurodegenerativas.

Divulgación de la invención

[0014] El objeto que no esté englobado por el ámbito de las reivindicaciones no forma parte de la invención reivindicada actualmente.

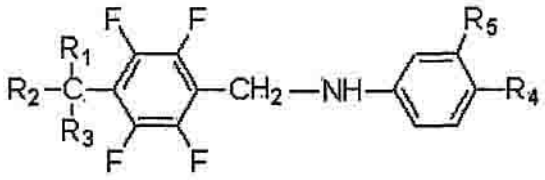
[0015] Conduciendo a la presente invención, la investigación intensiva y minuciosa sobre el tratamiento de trastornos en el sistema nervioso central, llevada a cabo por los presentes inventores, ha producido el hallazgo de que nuevos derivados de tetrafluorobencilo tienen una potente actividad neuroprotectora contra varios tipos de muerte neuronal inducida en cultivos de células y modelos animales de enfermedades neurológicas.

[0016] En consecuencia, un objeto de la presente invención es proporcionar un derivado novedoso de tetrafluorobencilo.

[0017] Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéuticamente eficaz para el tratamiento y la prevención de enfermedades neurológicas y enfermedades oculares.

[0018] En un aspecto de la presente invención, se proporciona un nuevo derivado de tetrafluorobencilo, representado por la siguiente fórmula química 1,

[Fórmula Química 1]

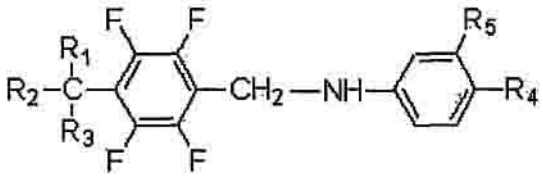


en la que,
R_1, R_2 y R_3 son hidrógeno o halógeno;
R_4 es hidroxi, alquilo, alcoxi, halógeno, alcoxi sustituido con halógeno, alcanoiloxi o nitro;
R_5 es ácido carboxílico, éster de ácido carboxílico sustituido con alquilo C_1-C_4, carboxiamida, ácido sulfónico, halógeno o nitro;

[0019] En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para la prevención y el tratamiento de enfermedades neurológicas y enfermedades oculares, que comprende el derivado de tetrafluorobencilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables como ingrediente eficaz.

[0020] La presente invención proporciona un nuevo derivado de tetrafluorobencilo representado por la siguiente fórmula química 1, o sus sales farmacéuticamente aceptables.

[Fórmula Química 1]



en la que,
R_1, R_2 y R_3 son hidrógeno o halógeno
R_4 es hidroxi, alquilo, alcoxi, halógeno, alcoxi sustituido con halógeno, alcanoiloxi o nitro;
R_5 es ácido carboxílico, éster de ácido carboxílico sustituido con alquilo C_1-C_4, carboxiamida, ácido sulfónico, halógeno o nitro;

[0021] En este caso, un grupo alquilo es alquilo C_1-C_4 y más preferentemente alquilo C_1-C_2. Los alquilos descritos anteriormente sin duda contienen metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, o *terc*-butilo.

[0022] El grupo alcoxi es C_1-C_4 y más preferentemente alcoxi C_1-C_2. El alcoxi descrito anteriormente sin duda contiene metoxi, etoxi, o propanoxi.

[0023] El halógeno puede estar sustituido con fluoruro, cloruro, bromuro o yoduro.

[0024] Alcanoiloxi es alcanoiloxi C_2-C_{10} y más preferentemente alcanoiloxi C_3-C_5. El alcanoiloxi descrito anteriormente sin duda contiene etanoiloxi, propanoiloxi, o ciclohexanocarboniloxi.

[0025] En el éster de ácido carboxílico, el carbono puede estar sustituido con metilo, etilo, isopropilo, o butilo.

[0026] Los compuestos específicos de interés dentro de la Fórmula I son los siguientes:

ácido 2-hidroxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometil-bencilamino) benzoico (en lo sucesivo, denominado “2-hidroxi-TTBA”),
ácido 2-nitro-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico,
ácido 2-cloro-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico,
ácido 2-bromo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico,
ácido 2-hidroxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-metilbencilamino) benzoico,
ácido 2-metil-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico,
ácido 2-metoxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico,
ácido 5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino)-2-trifluorometoxi benzoico.
2-nitro-4-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino)fenol,
2-cloro-4-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino)fenol (en lo sucesivo, denominado “2-cloro-TTP”),
2-hidroxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzamida (en lo sucesivo, denominado “2-hidroxi-TTA”),
ácido 2-hidroxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) bencenosulfónico (en lo sucesivo, denominado “2-hidroxi-TTS”),
2-hidroxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoato de metilo,
ácido 2-etanoiloxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico (en lo sucesivo, denominado “2-Etan-TTBA”),
ácido 2-propanoiloxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico (en lo sucesivo, denominado “2-Propan-TTBA”), o
ácido 2-ciclohexanocarboniloxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico (en lo sucesivo, denominado “2-ciclohexan-TTBA”).

[0027] Sin embargo, los compuestos descritos anteriormente son solo representativos de la presente invención, que podría incluir más compuestos.

[0028] La presente invención proporciona derivados de tetrafluorobencilo representados por la fórmula (I) y la composición farmacéutica para la prevención y el tratamiento de enfermedades neurológicas y oculares que contienen el componente efectivo en forma de sal farmacéuticamente aceptable.

[0029] Como fármacos para uso farmacéutico, la sal del compuesto de fórmula (I) no tiene toxicidad, y debe ser farmacéuticamente aceptable. Hay varios tipos de sales que se pueden usar para preparar sales farmacéuticamente aceptables, incluyendo los compuestos no tóxicos de la presente invención.

[0030] Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos en la presente invención incluyen metales alcalinos, tales como litio, sodio o potasio, y metales alcalinotérreos, tales como calcio o magnesio. Se pueden preparar sales de adición de ácido por reacción de la solución de sales no tóxicas farmacéuticamente aceptables, tales como ácido clorhídrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido carbónico, o ácido fosfórico con el compuesto de la invención.

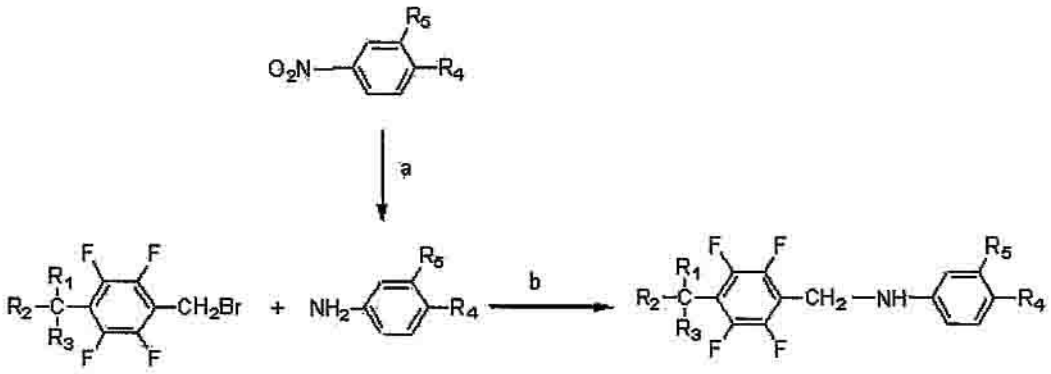
[0031] El compuesto de fórmula (I) en la presente invención se puede usar para curar enfermedades neurodegenerativas normales y patológicas entre enfermedades o síntomas en sistemas cerebrovasculares y neurológicos. En concreto, el compuesto anterior representado por la fórmula (I) se usa para la prevención o el tratamiento de tromboembolia, ictus isquémico, ictus hemorrágico, convulsión cerebrovascular, envejecimiento cerebral, lesión cerebral traumática, lesión traumática de la médula espinal, paro cardiaco, hipotensión arterial, hipoglucemia, anoxia e hipoxia. Además, el compuesto de fórmula (I) en la presente invención se puede usar de manera beneficiosa para la disminución de las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, demencia senil, enfermedad de Pick, síndrome de Korsakov, degeneración olivopontocerebelar, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Parkinson, síndrome de Down, acidemia glutárica, epilepsia, demencia multi-infarto, e inflamación del cerebro. Tienen aplicación para el tratamiento de enfermedades oculares tales como glaucoma, degeneración macular, retinopatía diabética, y uveítis. Además, tienen aplicación para la prevención y el tratamiento de la adicción a las drogas, depresión y dolor.

[0032] La composición de la presente invención se puede tratar mediante la administración por vía oral, inyección intravenosa o administración no oral, y se puede tratar por varias formas tales como comprimidos, cápsulas, polvo, gránulos, solución esterilizada, suspensión o supositorio para su administración por vía rectal. Los principales elementos eficaces de la composición se pueden preparar como comprimido sólido usando vehículos farmacéuticos, por ejemplo, un elemento habitual de los comprimidos tal como dextrina de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato de dicalcio o gomas, y una solución farmacéutica diluida adicional. Los comprimidos o gránulos de la composición farmacéutica en la presente invención se pueden fabricar para una forma de dosificación de liberación sostenida como formas fáciles para su administración usando un método de revestimiento muy conocido, etc., en la industria apropiada. Por ejemplo, los comprimidos o gránulos pueden estar compuestos con elementos de administración internos y externos. Los elementos de administración internos de comprimidos o gránulos se pueden fabricar como envueltas con elementos de administración externos. Las formas líquidas de la composición de la presente invención fabricadas para la administración por vía oral o inyección incluyen solución, jarabe adecuadamente aromatizado, suspensión soluble en agua, suspensión insoluble en agua, emulsión preparada de aceites comestibles tal como aceite de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco, o aceite de cacahuete, elixir, y vehículos farmacéuticos similares. También se puede usar goma de tragacanto, goma arábiga, sal sódica del ácido algínico, dextrano, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, o gomas sintéticas o naturales tales como gelatina, etc., como adyuvante apropiado para la dispersión o suspensión en la preparación de una suspensión soluble en agua.

[0033] La cantidad de la medicación se puede determinar mediante varios factores relacionados, tales como enfermedades, edad, sexo, peso, y grado de enfermedad de los pacientes, etc., para el tratamiento de la neurodegeneración.

[0034] Los derivados de tetrafluorobencilo relacionados con la presente invención se pueden sintetizar a partir de los siguientes esquemas de reacción. Sin embargo, los compuestos descritos en los esquemas son solo representativos de la presente invención, que podría incluir más compuestos.

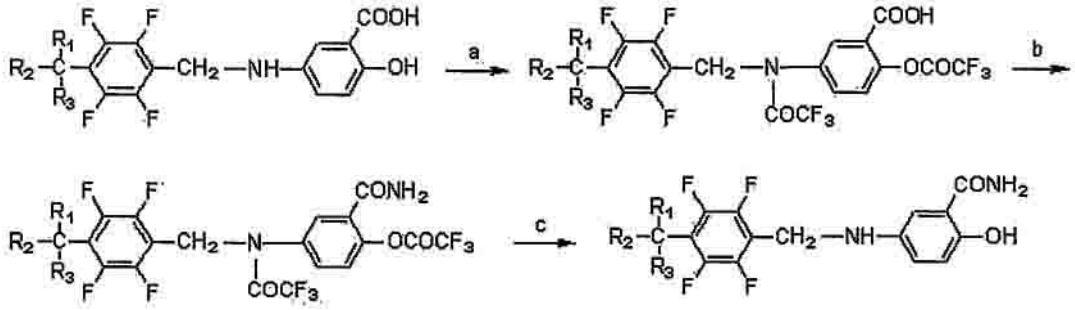
<Esquema de reacción 1>



[0035] Los derivados de tetrafluorobencilo se sintetizaron a partir de la siguiente reacción. En primer lugar, los compuestos de nitrobenceno, en los que los hidrógenos en las posiciones 3 y 4 fueron sustituidos con R_5 y R_4 respectivamente, se hidrogenaron durante 12 horas a una presión de 3 atm (303 kPa) (condiciones de reacción a). Los compuestos de anilina resultantes se hicieron reaccionar con bromuro de 2,3,5,6-tetrafluoro-4-metilbencilo en DMF en presencia de trietilamina durante 12 horas para dar los derivados de tetrafluorobencilo deseados (condiciones de reacción b).

[0036] En el esquema anterior, R_1, R_2 y R_3 representan hidrógeno o halógeno; R_4 representa hidroxi, alquilo, alcoxi, halógeno, alcoxi sustituido con halógeno, alcanoiloxi, nitro; R_5 representa ácido carboxílico, ésteres de ácido carboxílico, carboxiamida, ácido sulfónico, halógeno, y un grupo nitro.

<Esquema de reacción 2>



[0037] Para la síntesis del compuesto en el que R_4 es un grupo hidroxi y R_5 es un grupo carboxiamida, el grupo hidroxi y el grupo amino en el ácido 5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorobencilamino) benzoico se protegieron primero con un grupo trifluoro haciéndolo reaccionar con anhídrido trifluorometilacético en una cantidad catalítica de c-H_2SO_4 (condiciones de reacción a). El compuesto de éster de 2-carboxi-5-[2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometil-bencil]-(2,2,2-trifluoroacetil)amino]fenilo resultante a continuación se hizo reaccionar con $SOCl_2$ seguido de carbonato de amonio para dar el compuesto de éster de 2-carbamoil-4-[2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometil-bencil-(2,2,2-trifluoroacetil)amino]fenilo (condiciones de reacción b), que a continuación se hidroliza con una solución de HCl para dar el compuesto de carboxiamida deseado (condiciones de reacción c). En este esquema, R_1, R_2, R_3 y R_4 son los mismos grupos que se han definido previamente, mientras que R_5 son grupos alquilo sustituidos C_{1-4}.

<Ejemplo de síntesis 1>

Preparación de ácido 2-hidroxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico (2-hidroxi-TTBA)

[0038] A una solución de ácido 5-aminosalicílico (1,02 g, 6,66 mmol, adquirido de Aldrich Chemical Company,

EE.UU., A7, 980-9) y trietilamina (1 ml) en DMF seca (80 ml) se le añadió bromuro de 2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifloromethilbencilo (1,23 g, 7,18 mmol) (Aldrich, 40, 640-6) a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente y a continuación el disolvente se retiró al vacío. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y a continuación se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, y a continuación se secó sobre $MgSO_4$ anhidro. Después de la evaporación del disolvente, el residuo se recristalizó en éter/hexano (1:10) para dar 1,60 g (rendimiento del 64 %) de ácido 2-hidroxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino)benzoico en forma de sólido blanco.
Punto de fusión: 179 ºC,
RMN ^{1}H: 8,0 (s, 1H), 7,3 (d, 1H), 6,7 (t, 1H), 5,5 (s, 2H),
IR (cápsula de KBr): 3386, 1741, 1500 cm^{-1}

Análisis elemental para $C_{15}H_8F_7NO_3$

	% C	% H	% N	% F	% O
Calculado	47,01	2,10	3,66	34,70	12,53
Encontrado	47,00	2,03	3,69		

<Ejemplo de síntesis 2>

Preparación de ácido 2-nitro-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico

[0039] De acuerdo con un procedimiento similar al Ejemplo de síntesis 1, usando ácido 5-amino-2-nitrobenzoico (1,03 g, 5,65 mmol) y bromuro de 2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifloromethilbencilo (1,01 g, 6,04 mmol) (ACROS, 33074-0010), se obtuvo 1,50 g (rendimiento del 76,3 %) de ácido 2-nitro-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico en forma de sólido amarillo pálido.
Punto de fusión: 121 ºC,
RMN ^{1}H: 8,0 (d, 1H), 7,3 (s, 1H), 6,7 (d, 1H), 5,5 (s, 2H),
IR (cápsula de KBr): 3417, 1703, 1504 cm^{-1}

Análisis elemental para $C_{15}H_7F_7N_2O_4$

	% C	% H	% N	% F	% O
Calculado	43,71	1,71	6,80	32,36	15,53
Encontrado	43,37	1,68	6,50		

<Ejemplo de síntesis 3>

Preparación de ácido 2-cloro-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico

[0040] De acuerdo con un procedimiento similar al Ejemplo de síntesis 1, usando ácido 5-amino-2-clorobenzoico (1,02 g, 5,94 mmol) (ACROS, 32525-5000), DMF (50 ml) y bromuro de 2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifloromethilbencilo (1,16 g, 6,99 mmol), se obtuvo 2,04 g (rendimiento del 85,5 %) de ácido 2-cloro-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico en forma de sólido marrón pálido.
Punto de fusión: 58 ºC,
RMN ^{1}H: 7,26 (d, 1H), 7,24 (s, 1H), 6,7 (d, 1H), 4,12 (s, 2H),
IR (cápsula de KBr): 3402, 1720, 1494, 1434, 929 cm^{-1}
HPLC (0,01 % de TFA-acetato de etilo: 0,1 TFA-agua = 80:20, Rt = 4,2 minutos): 97 % de pureza

Análisis elemental para $C_{15}H_7ClF_7NO_4$

	% C	% H	% N	% F	% O
Calculado	44,85	1,76	3,49	33,11	7,97
Encontrado	44,83	2,31	3,43		

<Ejemplo de síntesis 4>

Preparación de ácido 2-bromo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico
(4-1) Preparación de ácido 5-amino-2-bromobenzoico

[0041] Una mezcla de ácido 2-bromo-5-nitrobenzoico (1,10 g, 4,06 mmol) (Aldrich, 38, 184-5), Pd-C activado (43,62 mg, 0,41 mmol) (Aldrich, 20, 569-9) en metanol (30 ml) se hidrogenó durante 4 h a 30 psi (207 kPa) de presión de hidrógeno. Después de que la mezcla se hubo filtrado, el filtrado se concentró para dar 0,80 g (rendimiento del 91,2 %) de ácido 5-amino-2-bromobenzoico en forma de sólido amarillo pálido. IR (cápsula de KBr): 3111, 2558, 2499, 1716, 1676 cm^{-1}

(4-2) Preparación de ácido 2-bromo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico

[0042] De acuerdo con un procedimiento similar al Ejemplo de síntesis 1, usando ácido 5-amino-2-bromobenzoico (1,05 g, 6,12 mmol) que se preparó a partir del Ejemplo de síntesis (4-1), DMF (50 ml) y bromuro de 2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifloromet ilbencilo (1,16 g, 6,99 mmol), se obtuvo 2,02 g (rendimiento del 76,9 %) de ácido 2-bromo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico en forma de sólido amarillo pálido.
Punto de fusión: 70 ºC,
RMN ^1H: 7,42 (d, 1H), 7,3 (s, 1H), 6,9 (d, 1H), 5,5 (s, 2H),
IR (cápsula de KBr): 3438, 1695, 1491, 1425, 939 cm^{-1}
HPLC (0,1 % de TFA-acetato de etilo: 0,1 % de TFA-agua = 80:20, Rt = 4,5 minutos) 99 % de pureza

Análisis elemental para $C_{15}H_7BrF_7NO_2$

	% C	% H	% N	% de Br	% F	% O
Calculado	40,38	1,58	3,14	17,91	29,81	7,17
Encontrado	44,62	1,57	3,79			

<Ejemplo de síntesis 5>

Preparación de ácido 2-hidroxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-metilbencilamino) benzoico

[0043] De acuerdo con un procedimiento similar al Ejemplo de síntesis 1, usando bromuro de 4-metil-2,3,5,6-tetrafluoro-bencilo (1,23 g, 7,18 mmol) (Aldrich, 40, 646-6) en lugar de bromuro de 2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilo, se obtuvo 1,60 g (rendimiento del 64,0 %) de ácido 2-hidroxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-metilbencilamino) benzoico en forma de sólido blanco:
Punto de fusión: 212 ºC,
RMN ^1H: 8,0 (s, 1H), 7,3 (d, 1H), 6,7 (t, 1H), 5,5 (s, 2H), 2,2-2,3 (s, 3H),
IR (cápsula de KBr): 3386, 1741, 1500 cm^{-1}

Análisis elemental para $C_{15}H_{11}F_4NO_3$

	% C	% H	% N	% F	% O
Calculado	54,72	3,37	4,25	23,08	14,58
Encontrado	54,90	3,60	4,06		

<Ejemplo de síntesis 6>

Preparación de ácido 2-metil-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico
(6-1) Preparación de ácido 2-metil-5-nitrobenzoico

[0044] A una solución de ácido 2-metilbenzoico (3,05 g, 22,3 mmol) (ACROS, 13904-0010) en c-HNO_3 (20 ml) se le añadió cuidadosamente H_2SO_4 conc. (15 ml) a 0 ºC. La solución resultante se calentó a reflujo a 100-120 ºC durante 5 horas. Después de que la mezcla de reacción se hubo enfriado a temperatura ambiente, se añadieron 50 ml de pastillas de hielo. El precipitado resultante se filtró, se lavó con agua y se secó para dar 3,90 g (rendimiento del 97,5 %) de ácido 2-metil-5-nitrobenzoico en forma de sólido blanco.
IR (cápsula de KBr): 1531,1350 cm^{-1}

(6-2) Preparación de ácido 5-amino-2-metilbenzoico

[0045] De acuerdo con un procedimiento similar al Ejemplo de síntesis (4-1), usando ácido_2-metil-5-nitrobenzoico (4,10 g, 22,6 mmol) que se preparó a partir del Ejemplo de síntesis (6-1), se obtuvo 2,01 g (rendimiento del 60,0 %) de ácido 5-amino-2-metilbenzoico en forma de sólido blanco.
IR (cápsula de KBr): 3437, 3336, 1633, 1400 cm^{-1}

(6-3) Preparación de ácido 2-metil-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico

[0046] De acuerdo con un procedimiento similar al Ejemplo de síntesis 1, usando ácido 5-amino-2-metilbenzoico (2,06 g, 15,0 mmol), DMF (60 ml), TEA (4 ml), y bromuro de 2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilo (5,52 ml, 17,7 mmol), se obtuvo 1,50 g (27,0 % de rendimiento) de ácido 2-metil-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico en forma de sólido de color amarillo.
Punto de fusión: 84 ºC,
RMN ^1H: 7,32 (s, 1H), 7,3 (d, 1H), 6,9 (d, 1H), 5,5 (s, 2H), 2,2 (s, 3H), IR (cápsula de KBr): 3417, 1716, 1496 cm^{-1}

Análisis elemental para $C_{16}H_{10}F_7NO_2$

	% C	% H	% N	% F	% O
Calculado	50,41	2,64	3,53	33,48	12,08
Encontrado	50,40	2,60	3,39		

<Ejemplo de síntesis 7>

Preparación de ácido 2-metoxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico
(7-1) Preparación de ácido 2-metoxi-5-nitrobenzoico

[0047] De acuerdo con un procedimiento similar al Ejemplo de síntesis (6-1), usando ácido 2-metoxibenzoico (2,10 g, 13,79 mmol) (ACROS, 17375-2000), se obtuvo 2,50 g (rendimiento del 97,0 %) de ácido 2-metoxi-5-nitrobenzoico en forma de sólido blanco. IR (cápsula de KBr): 3099, 2986, 2965, 1736, 1547 cm^{-1}

(7-2) Preparación de ácido 5-amino-2-metoxi-benzoico

[0048] De acuerdo con un procedimiento similar al Ejemplo de síntesis (4-1), usando ácido 2-metoxi-5-nitrobenzoico (4,10 g, 22,6 mmol) que se preparó a partir del Ejemplo de síntesis (7-1), se obtuvo 1,90 g (rendimiento del 98,0 %) de ácido 5-amino-2-metoxibenzoico en forma de sólido marrón.
IR (cápsula de KBr): 1394, 1220 cm^{-1}

(7-3) Preparación de ácido 2-metoxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico

[0049] De acuerdo con un procedimiento similar al Ejemplo de síntesis 1, usando ácido 5-amino-2-metoxi-benzoico (2,10 g, 12,7 mmol), DMF (50 ml), TEA (6 ml), y bromuro de 2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilo (2,00 ml, 14,0 mmol), se obtuvo 1,50 g (31,5 % de rendimiento) de ácido 2-metoxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico en forma de sólido de color amarillo:
Punto de fusión: 94 ºC,
RMN ^1H 7,42 (s, 1H), 6,4 (d, 1H), 6,2 (d, 1H), 5,5 (s, 2H), 3,73 (s, 3H),
IR (cápsula de KBr): 3429, 1730, 1496 cm^{-1}

Análisis elemental para $C_{16}H_{10}F_7NO_3$

	% C	% H	% N	% F	% O
Calculado	48,38	2,54	3,53	33,48	12,08
Encontrado	47,50	2,20	3,39		

<Ejemplo de síntesis 8>

Preparación de ácido 5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometil-bencilamino)-2-trifluorometoxibenzoico
(8-1) Preparación de ácido 5-nitro-2-trifluorometoxibenzoico

[0050] De acuerdo con un procedimiento similar del ejemplo de síntesis (6-1) (Lancaster, 15687), usando ácido 2-trifluorometoxibenzoico (2,10 g, 9,81 mmol), se obtuvo 1,40 g (55,0 % de rendimiento) de ácido 5-nitro-2-trifluorometoxibenzoico en forma de sólido blanco.
IR (cápsula de KBr): 1488, 1354 cm^{-1}

(8-2) Preparación de ácido 5-amino-2-trifluorometoxibenzoico

[0051] De acuerdo con un procedimiento similar al Ejemplo de síntesis (4-1), usando ácido 5-nitro-2-trifluorometoxibenzoico (1,40 g, 5,34 mmol) que se preparó a partir del Ejemplo de síntesis (8-1), se obtuvo 1,02 g (rendimiento del 90,0 %) de ácido 5-amino-2-trifluorometoxibenzoico en forma de sólido de color amarillo pálido. IR (cápsula de KBr): 1627, 1369 cm^{-1}

(8-3) Preparación de ácido 5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino)-2-trifluorometoxibenzoico

[0052] De acuerdo con un procedimiento similar al Ejemplo de síntesis 1, usando ácido 5-amino-2-trifluorometoxibenzoico (1,35 g, 6,23 mmol), DMF (50 ml), TEA (6 ml), y bromuro de 2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilo (1,10 ml, 6,73 mmol), se obtuvo 2,25 g (81,0 % de rendimiento) de ácido 5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino)-2-trifluorometoxibenzoico en forma de sólido de color amarillo.
Punto de fusión: 38 ºC,
RMN ^{1}H 7,3 (s, 1H), 7,12 (d, 1H), 6,8 (d, 1H), 5,5 (s, 2H),
IR (cápsula de KBr): 3383, 1712, 1504, 1446, 929 cm^{-1}

Análisis elemental para $C_{16}H_7F_{10}NO_3$

	% C	% H	% N	% F	% O
Calculado	42,59	1,56	3,0	42,10	10,64
Encontrado	41,24	2,20	3,39		

<Ejemplo de síntesis 9>

Preparación de ácido 2-nitro-4-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorormetilbencilamino)fenol

[0053] De acuerdo con un procedimiento similar al Ejemplo de síntesis 1, usando 4-amino-2-nitrofenol (1,00 g, 6,49 mmol), DMF (30 ml), TEA (0,5 ml), y bromuro de 2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilo (1,30 g, 7,78 mmol), se obtuvo 1,00 g (40,0 % de rendimiento) de 2-nitro-4-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino)fenol en forma de sólido rojizo.
Punto de fusión: 126-128 ºC,
RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ 4,23 (d, 2H), 6,93 (m, 2H), 7,12 (s, 1H),
RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ 36,36, 105,48, 120,63, 122,64, 123,32, 136,17, 140,86, 142,34, 144,06, 144,83, 146,44, 151,23,
IR (neto): 3391, 3255, 1545, 1339 cm^{-1}

Análisis elemental para $C_{14}H_7F_7N_2O_3$

	% C	% H	% N	% F	% O
Calculado	43,65	2,09	7,27	28,46	13,69
Encontrado	43,68	2,05	7,26		

<Ejemplo de síntesis 10>

Preparación de 2-cloro-4-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino)fenol

[0054] De acuerdo con un procedimiento similar al Ejemplo de síntesis 1, usando 4-amino-2-clorofenol (3,00 g, 19,6 mmol), DMF (80 ml), TEA (0,5 ml), y bromuro de 2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilo (1,40 g, 8,36 mmol), se obtuvo 2,00 g (rendimiento del 76,0 %) de 2-cloro-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-metilbencilamino)fenol en forma de sólido de color amarillo.
Punto de fusión: 52 ºC,
RMN ^{1}H ($CDCl_3$) 6,9 (d, 1H), 6,7 (s, 1H), 6,5 (d, 1H), 4,4 (s, 2H), IR (cápsula de KBr) 3382, 1687, 1617, 1586 cm^{-1}

Análisis elemental para $C_{14}H_7F_7N_2O_3$

	% C	% H	% N	% Cl	% F	% O
Calculado	42,00	1,89	3,75	9,49	35,59	4,28
Encontrado	45,23	1,49	3,74			

<Ejemplo de síntesis 11>

Preparación de 2-hidroxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzamida

(11-1) Preparación de trifluoroacetato de 2-carboxi-4-[2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometil-bencil]-(2,2,2-trifluoroacetil)amino]fenilo

[0055] A una solución de ácido 2-hidroxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico (2,00 g, 5,12 mmol) y anhídrido trifluoroacético (15 ml) se le añadió c-H_2SO_4 (0,50 ml) a 10 ºC en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó durante 20 min a temperatura ambiente y a continuación se inactivó con hielo (10 g). Después de que el disolvente se hubo extraído al vacío, el residuo se disolvió en acetato de etilo (50 ml). La capa orgánica se lavó con agua (20 ml x 2), 10 % de $NaHCO_3$ (20 ml x 3), HCl 0,5 N (20 ml x 2) y agua (20 ml). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. Después de la evaporación del disolvente, el residuo se recristalizó en acetato de etilo/hexano (1:10) para dar 1,40 g (rendimiento del 47 %) de trifluoroacetato de 2-carboxi-4-[2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencil]-(2,2,2-trifluoroacetil)amino]fenilo en forma de sólido amarillo.
Punto de fusión: 174-180 ºC,
RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ 5,16 (d, 2H), 6,94 (d, 1H), 7,44 (d, 1H), 7,81 (s, 1H),
RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ 43,03, 113,2, 114,3, 117,2, 117,8, 118,9, 128,7, 130,2, 135,5, 141,8, 143,8, 144,3, 146,2, 146,3, 155,2, 155,5, 161,6, 170,5,
IR (neto): 1711, 1673, 1498, 1331, 724 cm^{-1}

(11-2) Preparación de trifluoroacetato de 2-carbamoil-4-[2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencil-(2,2,2-trifluororacetil)amino]fenilo

[0056] A una solución de trifluoroacetato de 2-carboxi-4-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencil-(2,2,2 trifluoroacetil)amino)fenilo (600 mg, 1,05 mmol) en cloruro de metileno anhidro (15 ml) se le añadió $SOCl_2$ (1,18 ml, 21,0 mmol) a 40 ºC en atmósfera de nitrógeno. Después de que la mezcla de reacción se hubo agitado durante 1 h, el disolvente se extrajo al vacío. El residuo resultante se disolvió en cloruro de metileno anhidro (60 ml) y se añadió carbonato de amonio (ensayo de > 30 %, 2,00 g). Después de que la mezcla de reacción se hubo agitado durante 1 h, se filtró para eliminar el carbonato de amonio restante. La capa orgánica se lavó con agua (40 ml x 3) y a continuación se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. Después de la evaporación del disolvente, el residuo se recristalizó en cloruro de metileno/hexano (1:10) para dar 370 mg (rendimiento del 61 %) de trifluoroacetato de 2-carbamoil-4-[2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencil-(2,2,2-trifluororacetil)amino]fenilo en forma de sólido blanco.
Punto de fusión: 179 -180 ºC,
RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ 5,05 (d, 2H), 6,91 (d, 1H), 7,20 (d, 1H), 7,62 (s, 1H),
RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ 42,31, 114,05, 114,39, 117,25, 118,28, 118,60, 127,47, 128,43, 134,14, 141,66, 143,72, 144,20, 146,26, 155,48, 161,19, 170,32,
IR (neto) 3415, 3202, 1692, 1673, 1498, 1331 cm^{-1}

(11-3) Preparación de 2-hidroxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzamida

[0057] A una solución de trifluoroacetato de 2-carbamoil-4-[2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencil-(2,2,2-trifluororacetil)amino]fenilo (300 mg, 0,52 mmol) en metanol (8 ml) y agua (3 ml) se le añadió c-HCl (2,0 ml) a 40 ºC en atmósfera de nitrógeno. Después de que la mezcla de reacción se hubo agitado durante 24 h, el disolvente orgánico se extrajo al vacío. El residuo se extrajo con acetato de etilo (20 ml x 3). La capa orgánica se lavó con agua y a continuación se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. Después de la evaporación del disolvente, el residuo se recristalizó

en cloruro de metileno/hexano (1:10) para dar 120 mg (60 % de rendimiento) de 2-hidroxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzamida en forma de sólido blanco.
Punto de fusión: 143 -145 ºC,
RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ 4,37 (s, 2H), 6,63 (d, 1H), 6,76 (d, 1H), 7,14 (s, 1H),
RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ 36,25, 111,20, 112,36, 117,44, 121,71, 123,29, 123,46, 139,87, 141,61, 143,55, 145,86, 146,07, 153,12, 171,56,
IR (neto) 3453, 3415, 3202, 1692, 1673, 735 cm^{-1}

<Ejemplo de síntesis 12>

Preparación de ácido 2-hidroxi -5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benceno sulfónico

[0058] De acuerdo con un procedimiento similar al Ejemplo de síntesis 1, usando ácido 4-amino-2-hidroxibenceno sulfónico (1,00 g, 5,30 mmol), DMF (10 ml), TEA (1,0 ml), y bromuro de 2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilo (0,88 g, 5,30 mmol), se obtuvo 0,61 g (rendimiento del 28,0 %) de ácido 2-hidroxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benceno sulfónico en forma de sólido de color amarillo.
Punto de fusión: por encima de 300 ºC,
RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ 4,28 (s, 2H), 5,58 (m, 2H), 6,82 (s, 1H),
RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ 32,08, 106,41, 111,39, 112,10, 119,15, 119,33, 119,51, 126,11, 135,09, 137,17, 139,17, 139,70, 139,89, 140,40, 140,59, 141,61,
IR (neto) 3427, 3227, 1492, 1331, 1196, 1135, 628 cm^{-1}

<Ejemplo de síntesis 13>

Preparación de 2-hidroxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoato de metilo
(13-1) Preparación de 5-amino-2-hidroxibenzoato de metilo

[0059] A una solución de ácido 5-aminosalicílico (3,00 g, 19,6 mmol) en metanol (80 ml) se le añadió c-H_2SO_4 (8 ml) a 0 ºC. Después de que la mezcla de reacción se hubo calentado a reflujo durante 6 h, el disolvente se extrajo al vacío. El residuo resultante se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica se lavó con agua (40 ml x 3) y a continuación se secó sobre $MgSO_4$ anhidro. Después de la evaporación del disolvente, el residuo se recristalizó en acetato de etilo/hexano para dar 2,50 g (76 % de rendimiento) de 5-amino-2-hidroxibenzoato de metilo en forma de sólido amarillo.
RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ 7,2 (s, 1H), 6,7 (d, 1H), 6,6 (d, 1H),
IR (cápsula de KBr) 3406, 3327, 2950, 1672, 1616, 1492, 1440, 788 cm^{-1}

(13-2) Preparación de 2-hidroxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoato de metilo

[0060] De acuerdo con un procedimiento similar al Ejemplo de síntesis 1, usando 5-amino-2-hidroxibenzoato de metilo (2,00 g, 11,9 mmol), DMF (60 ml), TEA (0,5 ml), y bromuro de 2,3,5,6-tetrafluoro-4-metilbencilo (2,60 g, 14,3 mmol), se obtuvo 3,20 g (85,0 % de rendimiento) de 2-hidroxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoato de metilo en forma de sólido amarillo pálido:
Punto de fusión: 127 ºC,
RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ 7,15 (s, 1H), 6,9 (d, 1H), 6,7 (d, 1H), 4,5 (s, 2H), 3,9 (s, 3H),
IR (cápsula de KBr) 3382, 1687, 1617, 1586 cm^{-1}

Análisis elemental para $C_{16}H_{10}F_7NO_3$

	% C	% H	% N	% F	% O
Calculado	48,38	2,54	3,53	33,48	12,08
Encontrado	48,12	2,54	3,43		

<Ejemplo de síntesis 14>

Preparación de ácido 2-etanoiloxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometil-bencilamino) benzoico
(14-1) Preparación de ácido 5-*terc*-butoxicarbonilamino-2-hidroxibenzoico

[0061] La mezcla de ácido 5-aminosalicílico (1,01 g, 6,59 mmol), Di-BOC (2,87 g, 13,1 mmol), y TEA (1,0 ml)

en DMF (20,0 ml) se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de que la mezcla de reacción se hubo concentrado, el residuo se disolvió en acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con agua y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. Después de la evaporación del disolvente, el residuo se recristalizó en acetato de etilo/hexano para dar 1,42 g (rendimiento del 84 %) de ácido 5-*terc*-butoxi-2-hidroxibenzoico en forma de sólido blanco.
Punto de fusión: 282 ºC,
RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ 7,9~8,0 (s, 1H), 7,4~7,5 (d, 1H), 6,8-6,9 (d, 1H), 1,4-1,6 (s, 9H), RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ 171,93, 156,50, 152,97, 131,06, 126,36, 119,39, 117,03, 113,13, 79,05, 28,42

(14-2) Preparación de ácido 2-etanoiloxi-5-*terc*-butoxicarbonilaminobenzoico

[0062] A una solución de ácido 5-*terc*-butoxicarbonilamino-2-hidroxibenzoico (1,02 g, 4,02 mmol) en DMF (20,0 ml) se le añadió cloruro de acetilo (39 mg, 4,83 mmol) y carbonato de potasio (555 mg, 4,02 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. Después de que la mezcla de reacción se hubo concentrado, el residuo se disolvió en acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. Después de la evaporación del disolvente, el residuo se recristalizó en acetato de etilo/hexano para dar 0,62 g (rendimiento del 52 %) de ácido 2-etanoiloxi-5-*terc*-butoxicarbonilaminobenzoico en forma de sólido blanco.
Punto de fusión: 76-78 ºC,
RMN ^{1}H (DMSO-d_6)) δ 7,9-8,0 (s, 1H), 7,4-7,5 (d, 1H), 6,8-6,9 (d, 1H), 2,0-2,1 (s, 3H), 1,4-1,6 (s, 9H),
RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ 171,88, 165,59, 156,49, 144,71, 131,27, 124,06, 79,64, 28,441, 21,13.

(14-3) Preparación de ácido 2-etanoiloxi 5-aminobenzoico

[0063] La mezcla de ácido 2-etanoiloxi-5-*terc*-butoxicarbonilaminobenzoico (1,01 g, 3,42 mmol) en TFA/CH_2Cl_2 (20,0 ml 1: 1 v/v) se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. Después de que la mezcla de reacción se hubo concentrado, el residuo se disolvió en éter. El residuo resultante se recristalizó en acetato de etilo/hexano para dar 0,65 g (rendimiento del 97 %) de ácido 2-etanoiloxi-5-aminobenzoico en forma de sólido blanco.
Punto de fusión: 133-136 ºC,
RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ 7,5-7,6 (s, 1H), 7,2-7,3 (d, 1H), 7,0-7,1 (d, 1H), 2,1-2,2 (s, 3H), RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ 170,83, 165,57, 143,40, 124,41, 123,45, 121,09, 118,64, 113,98, 30,98.

(14-4) Preparación de ácido 2-etanoiloxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico

[0064] De acuerdo con un procedimiento similar al Ejemplo de síntesis 1, usando ácido 2-etanoiloxi-5-aminobenzoico (0,81 g, 4,10 mmol) que se preparó a partir del Ejemplo de síntesis (14-3), DMF (15 ml), TEA (0,1 ml), yoduro de tetrabutilamonio (5 mg) y bromuro de 2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilo (1,02 ml, 6,15 mmol), se obtuvo 0,92 g (53,0 % de rendimiento) de ácido 2-etanoiloxi-5-(2, 3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico en forma de sólido blanco.
Punto de fusión: 185-187 ºC,
RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ 2,16 (s, 3H), 4,46 (s, 2H), 6,82 (d, 1H), 6,88 (d, 1H), 7,17 (s, 1H),
RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ 21,64, 36,37, 114,36, 116,97, 123,94, 127,78, 124,81, 141,40, 142,44, 144,44, 145,04, 145,84, 146,85, 166,35, 170,18,
IR (cápsula de KBr) 3410, 1747, 1705, 1489 cm^{-1}

Análisis elemental para $C_{17}H_{10}F_7NO_4$

	% C	% H	% N	% F	% O
Calculado	48,01	2,37	3,29	31,27	15,05
Encontrado	48,05	2,39	3,29		

<Ejemplo de síntesis 15>

Preparación de ácido 2-propanoiloxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico
(15-1) Preparación de ácido 5-*terc*-butoxicarbonilamino-2-propanoiloxibenzoico

[0065] De acuerdo con un procedimiento similar al Ejemplo de síntesis (14-2), usando cloruro de propanoílo (446 mg, 4,82 mmol), se obtuvo 0,71 g (57,0 % de rendimiento) de ácido 5-*terc*-butoxicarbonilamino-2-

propanoiloxibenzoico en forma de sólido blanco.
Punto de fusión: 137-142 ºC,
RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ 7,9~8,0 (s, 1H), 7,4-7,5 (d, 1H), 6,8-6,9 (d, 1H), 2,5-2,6 (t, 2H) 1,4-1,6 (s, 9H), 1,0~1,2 (q, 3H),
RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ 172,689, 165,598, 152,804, 144,674, 137,287, 124,045, 79,618, 28,358, 27,259, 9,080

(15-2) Preparación de ácido 5-amino-2-propanoiloxibenzoico

[0066] De acuerdo con un procedimiento similar al Ejemplo de síntesis (14-3), usando ácido 5-*terc*-butoxicarbonilamino-2-propanoiloxibenzoico (1,01 mg, 3,26 mmol), se obtuvo 0,67 g (97,0 % de rendimiento) de ácido 5-amino-2-propanoiloxibenzoico en forma de sólido blanco.
Punto de fusión: 213-220 ºC,
RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ 7,5-7,6 (s, 1H), 7,2-7,3 (d, 1H), 7,0-7,1 (d, 1H), 2,4~2,6 (t, 2H), 1,0~1,2 (q, 3H),
RMN ^{13}C (DMSO-d_6) δ 172,78, 165,35, 145,54, 137,100, 124,90, 124,76, 124,23, 121,72, 27,32, 9,10.

(15-3) Preparación de ácido 2-propanoiloxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico

[0067] De acuerdo con un procedimiento similar al Ejemplo de síntesis 14-4, usando ácido 5-amino-2-propanoiloxibenzoico (0,32 g, 1,53 mmol) que se preparó a partir del Ejemplo de síntesis (15-2), DMF (10 ml), TEA (0,05 ml), yoduro de tetrabutilamonio (3 mg) y bromuro de 2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilo (0,38 ml, 2,30 mmol), se obtuvo 0,34 g (51,0 % de rendimiento) de ácido 2-propanoiloxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico en forma de sólido blanco. Punto de fusión: 188-191 ºC,
RMN ^{1}H (acetona-d_6) δ 1,17 (t, 3H), 2,06 (q, 2H), 4,67 (s, 2H), 6,94 (m, 2H), 7,37 (s, 1H), RMN ^{13}C (acetona-d_6) δ 8,65, 27,41, 36,34, 114,76, 117,27, 123,57, 124,16, 124,59, 141,56, 142,44, 145,29,145,31, 165,29, 172,77,
IR (cápsula de KBr) 3414, 1745, 1702, 1491 cm^{-1}

Análisis elemental para $C_{18}H_{18}F_7NO_4$

	% C	% H	% N	% F	% O
Calculado	49,22	2,75	3,19	30,27	14,57
Encontrado	49,20	2,76	3,20		

<Ejemplo de síntesis 16>

Preparación de ácido 2-ciclohexanocarboniloxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico
(16-1) Preparación de ácido 5-*terc*-butoxicarbonilamino-2-ciclohexanocarboniloxi benzoico

[0068] De acuerdo con un procedimiento similar al Ejemplo de síntesis (14-2), usando cloruro de ciclohexilcarbonilo (707 mg, 4,82 mmol), se obtuvo 0,72 g (49,0 % de rendimiento) de ácido 5-*terc*-butoxicarbonilamino-2-ciclohexanocarboniloxibenzoico en forma de sólido blanco.
Punto de fusión: 68-74 ºC,
RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ 7,9~8,0 (s, 1H), 7,4~7,5 (d, 1H), 6,8~6,9 (d, 1H), 2,4~2,6 (t, 1H), 1,0~2,0 (m, 19H)

(16-2) Preparación de ácido 5-amino-2-ciclohexanocarboniloxibenzoico

[0069] De acuerdo con un procedimiento similar al Ejemplo de síntesis 14-3, usando ácido 5-*terc*-butoxicarbonilamino-2-ciclohexanocarboniloxibenzoico (1,01 mg, 2,78 mmol), se obtuvo 0,70 g (96,0 % de rendimiento) de ácido 5-amino-2-ciclohexanocarboniloxibenzoico en forma de sólido blanco.
Punto de fusión: 116-121 ºC,
RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ 7,5~7,6 (s, 1H), 7,4~7,5 (d, 1H), 6,9~7,0 (d, 1H), 2,4~2,6 (t, 1H), 1,0~2,0 (m, 10H),
RMN ^{13}C (DMSO-d_6) 173,87, 170,74, 165,60, 160,09, 158,61, 158,27, 143,14, 140,71, 130,03, 124,66, 123,44, 121,70, 119,12, 118,61, 113,81, 42,42, 31,25, 28,94, 25,65, 22,38, 14,29.

(16-3) Preparación de ácido 2-ciclohexanocarboniloxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico

[0070] De acuerdo con un procedimiento similar al Ejemplo de síntesis (14-4), usando ácido 5-amino-2-ciclohexanocarboniloxibenzoico (1,03 g, 3,95 mmol) que se preparó a partir del Ejemplo de síntesis (16-2), DMF (15 ml), TEA (0,10 ml), yoduro de tetrabutilamonio (10 mg) y bromuro de 2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilo (1,01 ml, 5,92 mmol), se obtuvo 0,95 g (49,0 % de rendimiento) de ácido 2-ciclohexanocarboniloxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-

trifluorometilbencilamino) benzoico en forma de sólido blanco.
Punto de fusión: 190-193 ºC,
RMN ^{1}H (acetona-d_6) δ 1,20~1,57 (m, 6H), 1,64~1,81 (m, 4H) 2,53 (m, 1H), 4,67 (s, 2H), 6,90 (d, 1H), 6,96 (d, 1H), 7,36 (S, 1H),
RMN ^{13}C (acetona-d_6) δ 25,57, 26,07, 36,23, 43,13, 114,67, 117,21, 122,21, 122,36, 124,45, 124,56, 142,32, 142,74, 144,21, 145,24, 146,82, 165,29, 173,96,
IR (cápsula de KBr) 3402, 1724, 1707, 1491 cm^{-1}

Análisis elemental para $C_{22}H_{18}F_7NO_4$

	% C	% H	% N	% F	% O
Calculado	53,56	3,68	2,84	26,96	12,97
Encontrado	53,58	3,65	2,85		

Breve descripción de los dibujos

[0071] Los objetos anteriores y otros objetos, características y otras ventajas de la presente invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada junto con los dibujos adjuntos, en los que:

Fig. 1a. Efecto del 2-hidroxi-TTBA sobre la excitotoxicidad inducida por NMDA. Cultivos de células corticales de ratón (DIV 12-14) se expusieron a NMDA 300 µM durante 10 min, solo o con la inclusión del 2-hidroxi-TTBA 3-300 µM. La muerte neuronal se analizó 24 horas más tarde midiendo los niveles de LDH liberada en el medio de baño, media ± SEM (n = 9-12 pocillos de cultivo por condición), se escaló hasta el valor de flujo de salida medio de LDH 24 h después del lavado simulado (=0) y exposición continua a NMDA 500 µM (=100) que provoca la muerte neuronal casi completa. *, Diferencia significativa del vehículo de control, *p* <0,05 usando ANOVA y la prueba de Student-Neuman-Keuls.

Fig. 1b. Efecto del 2-hidroxi-TTS, 2-hidroxi-TTA, 2-Etan-TTBA, 2-Propan-TTBA, o 2-ciclohexan-TTBA sobre la excitotoxicidad inducida por NMDA.
Cultivos de células corticales de ratón (DIV 12-14) se expusieron a NMDA 300 µM durante 10 min, solo (○) o con la inclusión de 2-hidroxi-TTS (•), 2-hidroxi-TTA (○), 2-Etan-TTBA (▼), 2-propanol-TTBA (▽), o 2-ciclohexano-TTBA (■) 3-300 µM. La muerte neuronal se analizó 24 horas más tarde midiendo los niveles de LDH liberada en el medio de baño, media ± SEM (n = 9-12 pocillos de cultivo por condición), se escaló hasta el valor de flujo de salida medio de LDH 24 h después del lavado simulado (=0) y exposición continua a NMDA 500 µM (=100). *, Diferencia significativa del vehículo de control, *p* <0,05 usando ANOVA y la prueba de Student-Neuman-Keuls.

Fig. 2a. Bloqueo de las corrientes de NMDA mediante 2-hidroxi-TTBA.
Se provocaron corrientes de entrada típicas inducidas por NMDA (corrientes de NMDA) aplicando NMDA 300 µM en las neuronas corticales que se mantuvieron a -60 mV. La aplicación sucesiva de varias concentraciones del 2-hidroxi-TTBA redujo la respuesta provocada por NMDA 300 µM de manera dependiente de la concentración (*n = 8*). El gráfico muestra una relación de dosis respuesta del 2-hidroxi-TTBA a las corrientes de NMDA; su valor CI_{50} estaba próximo a 35 µM y con un coeficiente de Hill de 0,91.

Fig. 2b. El tratamiento previo con 2-hidroxi-TTBA no influyó en las corrientes de NMDA.
Se trataron neuronas corticales con 2-hidroxi-TTBA 100 µM, se lavaron a fondo, y a continuación se aplican con NMDA 300 µM. El tratamiento previo con 2-hidroxi-TTBA no influyó en las corrientes de entrada inducidas por NMDA, lo que sugiere que el 2-hidroxi-TTBA ejerce su acción de bloqueo solamente cuando el receptor ha sido activado por un agonista (*n = 6*).

Fig. 3a. Efecto del 2-hidroxi-TTBA sobre el estrés oxidativo inducido por $FeCl_2$.
Cultivos de células corticales de ratón (DIV 14 -2) se expusieron de forma continua a Fe^{2+} 50 µM, solo o con la inclusión del 2-hidroxi-TTBA (●) o Trolox (○) 0,1-100 µM, una forma permeable a membrana de la vitamina E). La muerte neuronal se analizó 24 horas más tarde midiendo los niveles de LDH liberada en el medio de baño, media ± SEM (n = 9-12 pocillos de cultivo por condición), se escaló hasta el valor de flujo de salida medio de LDH 24 h después del lavado simulado (=0) y exposición continua a NMDA 500 µM (=100). *, Diferencia significativa del vehículo de control, *p* <0,05 usando ANOVA y la prueba de Student-Neuman-Keuls.

Fig. 3b. Efecto del 2-hidroxi-TTS, 2-hidroxi-TTA, 2-cloro-TTP, 2-Etan-TTBA, 2-Propan-TTBA, o 2-ciclohexan-TTBA sobre el estrés oxidativo inducido por $FeCl_2$.
Cultivos de células corticales de ratón (DIV 12-14) se expusieron de forma continua a Fe^{2+} 50 µM, solo (◆) o con la inclusión de 2-hidroxi-TTS (●), 2-hidroxi-TTA (○), 2-cloro-TTP (▼), 2-Etan-TTBA (▽), 2-Propan-TTBA (■), o 2-ciclohexan-TTBA (□) 1-30 µM. La muerte neuronal se analizó 24 horas más tarde midiendo los niveles de LDH liberada en el medio de baño, media ± SEM (n = 9-12 pocillos de cultivo por condición), se escaló hasta el valor de flujo de salida medio de LDH 24 h después del lavado simulado (=0) y exposición continua a NMDA 500 µM (=100). *, Diferencia significativa del vehículo de control, p <0,05 usando ANOVA y la prueba de Student-Neuman-Keuls.

Fig. 4. Efecto del 2-hidroxi-TTBA sobre el estrés oxidativo inducido por SNP.
Cultivos de células corticales de ratón (DIV 12-14) se expusieron de forma continua a nitroprusiato de sodio 5 µM (SNP), solo (●) o con la inclusión de aspirina 0,1-10 mM (○), Trolox 1-100 µM (▼), o 2-hidroxi-TTBA 0,1-10 µM (▽). La muerte neuronal se analizó 24 horas más tarde midiendo los niveles de LDH liberada en el medio de baño, media ± SEM (n = 9-12 pocillos de cultivo por condición), se escaló hasta el valor de flujo de salida medio de LDH 24 h después del lavado simulado (=0) y exposición continua a NMDA 500 µM (=100). *, Diferencia significativa del vehículo de control, p <0,05 usando ANOVA y la prueba de Student-Neuman-Keuls.

Fig. 5. Efecto del 2-hidroxi-TTBA sobre la toxicidad del cinc.
Cultivos de células corticales de ratón (DIV 12-14) se expusieron a Zn^{2+} 300 µM durante 30 min, solo o con la inclusión del 2-hidroxi-TTBA 3-300 µM. La muerte neuronal se analizó 24 horas más tarde midiendo los niveles de LDH liberada en el medio de baño, media ± SEM (n = 9-12 pocillos de cultivo por condición), se escaló hasta el valor de flujo de salida medio de LDH 24 h después del lavado simulado (=0) y exposición continua a NMDA 500 µM (=100).

Fig. 6a. Actividad de captación de radicales libres del 2-hidroxi-TTBA.
El 2-hidroxi-TTBA (●) o Trolox (○) se hizo reaccionar con 1,1-difenil-2-picrilhidracilo 100 µM (DPPH, un radical libre estable) disuelto en etanol durante 10 min. La actividad de captación de radicales se determinó midiendo la disminución en los niveles de DPPH a 517 nm. *, Diferencia significativa del vehículo de control, p <0,05 usando ANOVA y la prueba de Student-Neuman-Keuls.

Fig. 6b. Ensayo de DPPH de 2-hidroxi-TTS, 2-hidroxi-TTA, o 2-cloro-TTP.
2-hidroxi-TTS (•), 2-hidroxi-TTA (O), 2-cloro-TTP (▼) o control (▽) se hizo reaccionar con DPPH 100 µM disuelto en etanol. La actividad de captación de radicales se determinó midiendo la disminución en los niveles de DPPH a 517 nm. *, Diferencia significativa del vehículo de control, p <0,05 usando ANOVA y la prueba de Student-Neuman-Keuls.

Fig. 7a. El 2-hidroxi-TTBA reduce la muerte neuronal en la médula espinal en un modelo animal de ELA.
Microfotografías de campo claro de las secciones de la médula espinal teñidas con eosina de ratones con esclerosis lateral amiotrófica (ELA) que sobreexpresan SOD1-G93A mutante que recibieron vehículo (A) o 2-hidroxi-TTBA (B, 10 mg/kg/día a través del agua potable) durante 8 semanas desde los 2 meses de edad.

Fig. 7b. El 2-hidroxi-TTBA reduce la muerte neuronal en la médula espinal en un modelo animal de ELA.
Se analizaron neuronas en degeneración de la Fig. 7a contando las neuronas viables después de teñir con eosina en el asta dorsal y ventral de la médula espinal de ratones con ELA tratados con un vehículo (control) o 2-hidroxi-TTBA, media ± SEM (n = 5 animales para cada condición). *, Diferencia significativa del vehículo de control, p <0,05 usando la prueba t independiente.

Fig. 8a. La administración intraperitoneal del 2-hidroxi-TTBA reduce la lesión isquémica en el cerebro.
Ratas adultas se sometieron a isquemia cerebral transitoria mediante la oclusión de la arteria cerebral media derecha y las dos arterias carótidas comunes durante 60 min con inyecciones intraperitoneales de vehículo o 50 mg/kg del 2-hidroxi-TTBA a los 5 min, 30 min, o 1 h después de la reperfusión. El volumen del infarto se analizó 24 horas más tarde después de teñir cortes de cerebro con el 2 % de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC), media ± SEM (n = 8-11 ratas por cada condición). *, Diferencia significativa del vehículo de control, p <0,05 usando ANOVA y la prueba de Student-Neuman-Keuls.

Fig. 8b. La administración intraperitoneal del 2-hidroxi-TTBA reduce la lesión isquémica en el cerebro.
Ratas adultas se sometieron a isquemia cerebral transitoria mediante la oclusión de la arteria cerebral media derecha y las dos arterias carótidas comunes durante 60 min con inyecciones intraperitoneales de vehículo (control)

o 50 o 100 mg/kg del 2-hidroxi-TTBA a los 5 min después de la reperfusión. El volumen del infarto se analizó 24 horas más tarde después de teñir cortes de cerebro con el 2 % de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC), media ± SEM (*n* = 7-8 ratas por cada condición). *, Diferencia significativa del vehículo de control, *p* <0,05 usando ANOVA y la prueba de Student-Neuman-Keuls.

Fig. 8c. Las inyecciones intravenosas del 2-hidroxi-TTBA reducen la lesión isquémica en el cerebro.
Ratas adultas se sometieron a isquemia cerebral transitoria mediante la oclusión de la arteria cerebral media derecha y ambas arterias carótidas comunes durante 60 min, con inyecciones intravenosas de vehículo (control) o 5 mg/kg del 2-hidroxi-TTBA a los 30 min después de la oclusión o 5 min, 30 min, 1 hora, 2 horas o 4 horas después de la reperfusión. El volumen del infarto se analizó 24 horas más tarde, media ± SEM (*n* = 8-11 ratas por cada condición). *, Diferencia significativa del vehículo de control, *p* <0,05 usando ANOVA y la prueba de Student-Neuman-Keuls.

Fig. 8d. Las inyecciones intravenosas del 2-hidroxi-TTBA reducen la lesión isquémica en el cerebro.
Ratas adultas se sometieron a isquemia cerebral transitoria mediante la oclusión de la arteria cerebral media derecha y ambas arterias carótidas comunes durante 60 min, con inyecciones intravenosas de vehículo (control) o 1, 2,5, 5, 10 o 20 mg/kg del 2-hidroxi-TTBA a los 5 min después de la reperfusión. El volumen del infarto se analizó 24 horas más tarde, media ± SEM (n = 8-10 ratas por cada condición). *, Diferencia significativa del vehículo de control, *p* <0,05 usando ANOVA y la prueba de Student-Neuman-Keuls.

Fig. 8e. La administración oral del 2-hidroxi-TTBA reduce la lesión isquémica en el cerebro.
Ratas adultas se sometieron a isquemia cerebral transitoria mediante la oclusión de la arteria cerebral media derecha y las dos arterias carótidas comunes durante 60 min, con administraciones orales de vehículo (control) o 10 o 20 mg/kg del 2-hidroxi-TTBA a los 5 min después de la reperfusión. El volumen del infarto se analizó 24 horas más tarde, media ± SEM (n = 8-10 ratas por cada condición). *, Diferencia significativa del vehículo de control, *p* <0,05 usando ANOVA y la prueba de Student-Neuman-Keuls.

Fig. 9a. Efectos del 2-hidroxi-TTBA sobre la generación de ROS mitocondriales en 72 h de recirculación después de la isquemia global.
Se inyectó Mitotracker CM-H_2X ROS en el ventrículo lateral del cerebro de la rata a las 24 horas antes de la cirugía isquémica, y a continuación los animales se sometieron a isquemia transitoria en el prosencéfalo durante 10 minutos, con inyecciones intraperitoneales de vehículo (control) o 2-hidroxi-TTBA (50 mg/kg) a los 5 min después de la reperfusión. Los niveles de ROS mitocondriales se analizaron 2 horas más tarde, media ± SEM (n = 50-70 neuronas seleccionadas al azar en el sector CA1 de la formación del hipocampo para cada condición). *, Diferencia significativa del vehículo de control, *p* <0,05 usando la prueba t independiente.

Fig. 9b. El 2-hidroxi-TTBA previene la muerte neuronal en el sector CA1 en 72 h de recirculación después de la isquemia global.
Ratas adultas se sometieron a isquemia global transitoria durante 10 min, con inyecciones intraperitoneales de vehículo (control) o 2-hidroxi-TTBA (50 mg/kg) a los 5 min después de la reperfusión. Se analizó el número de neuronas en degeneración en el CA1 3 días más adelante contando las neuronas viables después de teñir con violeta de cresilo, media ± SEM *, Diferencia significativa del vehículo de control, *p* <0,05 usando la prueba t independiente.

Fig. 10a. El 2-hidroxi-TTBA reduce la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra 3 días después de la inyección de MPTP.
Microfotografías de campo claro que muestran neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra inmunoteñidas con anticuerpos dirigidos contra tirosina hidroxilasa (TH) 3 días después de control simulado (A) o la única inyección diaria de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP, 40 mg/kg, SC) en ratones C57/BL6, solo (B) o con inyecciones intraperitoneales (2 veces al día) del 2-hidroxi-TTBA (C, 25 mg/kg; D, 50 mg/kg) antes de la administración de MPTP.

Fig. 10b. El 2-hidroxi-TTBA reduce la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra 3 días después de la inyección de MPTP.
Cuantificación de las neuronas dopaminérgicas TH-positivas en las secciones de la sustancia negra 3 días después de la inyección única diaria de (MPTP, 40 mg/kg, SC), solo o con tratamiento previo con 2-hidroxi-TTBA como se ha descrito anteriormente. *, Diferencia significativa respecto del control, *p* <0,05 usando ANOVA y la prueba de Student-Neuman-Keuls.

Fig. 10c. El 2-hidroxi-TTBA reduce la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra 7 días después de la inyección de MPTP.
Microfotografías de campo claro que muestran las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra inmunoteñidas con anticuerpos dirigidos contra tirosina hidroxilasa (TH) 7 días después del control simulado (A) o la inyección diaria única de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP, 40 mg/kg, SC) en ratones C57/BL6, solo (B) o con inyecciones intraperitoneales (2 veces al día) del 2-hidroxi-TTBA (C, 25 mg/kg; D, 50 mg/kg) antes de la administración de MPTP.

Fig. 11. El 2-hidroxi-TTBA evita la generación de ROS mitocondriales en las neuronas del asta dorsal de la médula espinal después de una lesión traumática.
Ratas adultas recibieron una lesión por compresión a nivel de la T8 de la médula espinal, solo (control) o con inyecciones de 2-hidroxi-TTBA (50 mg/kg, ip) y Mitotracker CM-H_2X ROS inmediatamente después de la lesión. Los animales se sacrificaron 2 días más tarde, secciones de la columna vertebral se sometieron a inmunotinción con un anticuerpo dirigido contra NeuN (una proteína marcadora neuronal), y se analizaron los niveles de ROS mitocondriales en las neuronas del asta dorsal (DHN) midiendo la intensidad de fluorescencia de Mitotracker CM-H_2X oxidado, media ± SEM [n = 12 ratas para cada condición (5 secciones de la médula espinal para cada rata)]. *, Diferencia significativa del vehículo de control, p <0,05 usando la prueba t independiente.

[0072] La presente invención se describe particularmente en los ejemplos experimentales usando 2-hidroxi-TTBA, 2-hidroxi-TTS, 2-hidroxi-TTA, 2-cloro-TTP, 2-Etan-TTBA, 2-Propan-2-TTBA y Ciclohexan-TTBA preparados en el ejemplo de síntesis de la siguiente manera.

[0073] Sin embargo, los ejemplos descritos a continuación son solo representativos de la presente invención, que puede incluir más ejemplos.

<Ejemplo 1>

Cultivos de células corticales mixtas de neuronas y glía

[0074] Para el cultivo mixto de neurona-glía, se extrajeron las cortezas cerebrales de los cerebros de ratones fetales de 14-16 días de edad (E14-16), se trituró con cuidado y se sembraron en placas de 24 pocillos ($2x10^5$ células/placa) previamente recubiertas con 100 µg/ml de poli-D-lisina y 4 µg/ml de laminina. Los cultivos se mantuvieron a 37 ºC en una atmósfera humidificada al 5 % de CO_2. El medio de siembra consiste en medio esencial mínimo de Eagle (MEM, sales de Earles, suministrado sin glutamina) suplementado con el 5 % de suero de caballo, suero fetal bovino al 5 %, bicarbonato 26,5 mM, glutamina 2 mM y glucosa 21 mM.

[0075] Después de 7-8 días *in vitro* (DIV 7-8), se incluyó arabinofuranósido de citosina 10 µM (Ara-C) para detener la proliferación de células gliales. El tratamiento con fármacos se realizó sobre el cultivo celular cortical DIV 12-15. La lesión celular neuronal global se evaluó midiendo la cantidad de lactato deshidrogenasa (LDH) liberada en el medio de baño 24 h después de insultos neurotóxicos como se ha descrito previamente [Koh y Choi, J Neurosci Methods 20: 83-90, 1987].

<Ejemplo 2>

Efectos inhibidores de la excitotoxicidad mediante 2-hidroxi-TTBA, 2-hidroxi-TTA, 2-hidroxi-TTS, 2-Etan-TTBA, 2-Prppan-TTBA o 2-ciclohexan-TTBA

[0076] En DIV 13-15 en cultivo mixto de neurona-glía, como se muestra en el Ejemplo 1, los cultivos de células corticales se expusieron a NMDA 300 µM durante 10 min, solo o con 2-hidroxi-TTBA 3-300 µM, 2-hidroxi-TTS 10-300 µM, 2-hidroxi-TTA 10-300 µM, 2-Etan-TTBA 10-300 µM, 2-Propan-TTBA 10-300 µM, o 2-ciclohexan-TTBA 10-300 µM. La muerte neuronal se evaluó 24 horas más tarde midiendo la cantidad de LDH liberada en el medio de baño. *, Diferencia significativa del vehículo de control, p <0,05 usando ANOVA y la prueba de Student-Neuman-Keuls.

[0077] Cultivos de células corticales expuestas a NMDA 300 µM durante 10 min se sometieron a muerte neuronal generalizada (aproximadamente el 75-80 % de las neuronas murieron) durante las siguientes 24 horas. La muerte neuronal inducida por NMDA se bloqueó por co-tratamiento con 2-hidroxi-TTBA de manera dependiente de la dosis a dosis de 10-300 µM (Fig. 1a).

[0078] La administración concomitante de 2-hidroxi-TTS, 2-hidroxi-TTA, 2-Etan-TTBA, 2-Propan-TTBA, o 2-ciclohexan-TTBA también impidió la muerte neuronal inducida por NMDA a dosis de 30-300 µM. (Fig. 1b).

<Ejemplo 3>

Efecto de bloqueo del 2-hidroxi-TTBA sobre corrientes de entrada inducidas por NMDA

[0079] Se realizaron registros de células enteras sobre cultivos de células corticales a temperatura ambiente como se ha descrito [Seo et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 299: 377-384 (2001)]. Se provocaron corrientes de entrada inducidas por NMDA (corrientes de NMDA) típicas inmediatamente después de la aplicación de NMDA 300 µM en las neuronas corticales cultivadas que se mantuvieron a -70 mV. La aplicación del baño del 2-hidroxi-TTBA redujo inmediatamente las corrientes provocadas por NMDA de una forma dependiente de la dosis (*n = 7-15 neuronas/estado,* valor de CI_{50} = 30,55 ± 2,96 M) (Fig 2a). La aplicación del 2-hidroxi-TTBA 100 µM solo no tuvo ningún efecto sobre el mantenimiento de las corrientes y tuvo poco efecto sobre la respuesta de la célula a un tratamiento posterior con NMDA 300 µM (Fig. 2b), lo que sugiere que el 2-hidroxi-TTBA ejerce un efecto antagónico solo cuando se activa el receptor de NMDA (*n = 6*).

<Ejemplo 4>

Bloqueo de la muerte neuronal oxidativa mediante 2-hidroxi-TTBA, 2-hidroxi-TTA, 2-hidroxi-TTS, 2-cloro-TTP, 2-Etan-TTBA, 2-Propan-2-TTBA o ciclohexan-TTBA

(4-1) Inhibición de toxicidad de radicales libres inducida por $FeCl_2$

[0080] Cultivos de células corticales mixtas (DIV 13-15) se expusieron continuamente a $FeCl_2$ 50 µM, que produce el radical hidroxilo mediante una reacción de Fenton, solo o con la inclusión del 2-hidroxi-TTBA, 2-hidroxi-TTA, 2-hidroxi-TTS, 2-cloro-TTP, 2-Etan-TTBA, 2-Propan-TTBA, 2-ciclohexan-TTBA o Trolox (un análogo de la vitamina E) a las dosis indicadas. La muerte celular neuronal se analizó 24 horas más tarde por ensayo de la LDH como se ha descrito anteriormente. *, Diferencia significativa del vehículo de control ($FeCl_2$), p <0,05 usando ANOVA y la prueba de Student-Neuman-Keuls.

[0081] Cultivos de células corticales expuestas a $FeCl_2$ se sometieron a muerte neuronal generalizada durante las siguientes 24 horas. El 2-hidroxi-TTBA y Trolox previenen la neurotoxicidad de radicales libres inducida por $FeCl_2$ de manera dependiente de la dosis. Sin embargo, el 2-hidroxi-TTBA era 30 veces más potente que Trolox en la prevención de la neurotoxicidad de los radicales libres (Fig. 3a). Además, los derivados sintéticos del 2-hidroxi-TTBA (2-hidroxi-TTS, 2-hidroxi-TTA, 2-cloro-TTP, 2-Etan-TTBA, 2-Propan-TTBA, o 2-ciclohexan-TTBA) mostraron efectos neuroprotectores mucho más potentes que Trolox en la prevención de la neurotoxicidad de los radicales libres inducida por $FeCl_2$ (Fig. 3b).

(4-2) Inhibición de la citotoxicidad del SNP (nitroprusiato de sodio)

[0082] Cultivos de células corticales mixtas se expusieron continuamente a 5 SNP µM, un donador de óxido nítrico (NO), solo o con la inclusión del 2-hidroxi-TTBA 0,1-10 µM, Trolox 1-10 µM o aspirina 100-10000 µM. La muerte celular neuronal se analizó 24 horas más tarde mediante el ensayo de la LDH. *, Diferencia significativa del vehículo de control (SNP), p <0,05 usando ANOVA y la prueba de Student-Neuman-Keuls.

[0083] La administración de SNP produjo la muerte celular neuronal completa y algo de muerte celular glial. La toxicidad del SNP se bloqueó completamente en presencia del 2-hidroxi-TTBA y Trolox. El primero era 100 veces más potente que el último en la prevención de la toxicidad del NO. La aspirina, un componente estructural del 2-hidroxi-TTBA, no redujo la citotoxicidad del SNP (Fig. 4).

(4-3) Inhibición de la neurotoxicidad del cinc

[0084] Para inducir la neurotoxicidad del cinc (Zn^{2+}), cultivos de células corticales mixtas se expusieron a $ZnCl_2$ 100 µM durante 30 minutos en una solución salina de control tamponada con HEPES (HCSS): (en mM) NaCl 120, KCl 5, $MgCl_2$ 1,6, $CaCl_2$ 2,3, glucosa 15, HEPES 20 y NaOH 10, solo o con 2-hidroxi-TTBA 3-300 µM. Después de la exposición, los cultivos se lavaron 3 veces y se intercambiaron con MEM ajustado a glucosa 25 mM y bicarbonato sódico 26,2 mM. La muerte celular neuronal se analizó 24 horas más tarde mediante el ensayo de la LDH. *, Diferencia significativa del vehículo de control (SNP), p <0,05 usando ANOVA y la prueba de Student-Neuman-Keuls.

[0085] El tratamiento concomitante con 2-hidroxi-TTBA previno la muerte neuronal inducida por el cinc en una forma dependiente de la dosis a dosis de 10-300 µM (Fig. 5).

(4-4) Ensayo de DPPH del 2-hidroxi-TTBA, 2-hidroxi-TTA, 2-hidroxi-TTS o 2-cloro-TTP

[0086] Para examinar los efectos de captación de radicales libres, se hizo reaccionar 2-hidroxi-TTBA, 2-hidroxi-TTA, 2-hidroxi-TTS, 2-cloro-TTP o Trolox 1-100 µM con DPPH 100 µM (radical de 2,2-difenil-1-picril-hidracilo), un radical libre estable, disuelto en etanol. Después de incubar durante 30 min, se midió la disminución relativa en la absorción de DPPH a 517 nm mediante un espectrofotómetro, media ± SEM (n = 3 tubos de ensayo por condición).*, Diferencia significativa del vehículo de control (DPPH solo), p <0,05 usando ANOVA y la prueba de Student-Neuman-Keuls.

[0087] En comparación con el anti-oxidante Trolox, el 2-hidroxi-TTBA reduce los niveles de DPPH a dosis más bajas, lo que sugiere que el 2-hidroxi-TTBA es un anti-oxidante directo más potente que Trolox (Fig. 6a). Otros derivados sintéticos también redujeron los niveles de DPPH (Fig. 6b).

<Ejemplo 5>

Prevención de la muerte celular neuronal en la médula espinal de ratón con ELA mediante 2-hidroxi-TTBA

[0088] Se obtuvieron ratones transgénicos con la mutación SOD1 humana G93A (B6SJL-TgN (SOD1-G93A)1Gur), modelos animales de ELA (ratones con ELA), de los Laboratorios Jackson (ME, EE.UU.). El 2-hidroxi-TTBA se administró al tipo silvestre de 2 meses de edad y a ratones transgénicos con ELA a través de una botella de agua potable (10 mg/kg por día) durante 8 semanas. Los animales fueron sacrificados y la médula espinal se procesó por examen histológico tiñendo con hematoxilina y eosina. Las neuronas motoras espinales de ratones con ELA sin tratar con 2-hidroxi-TTBA (control) sufrieron degeneración como resulta evidente por la tinción eosinofílica, que se redujo en ratones con ELA tratados con 2-hidroxi-TTBA (Fig. 7a).

[0089] El número de neuronas en degeneración se analizó contando las neuronas eosinofílicas en el asta ventral (VH) y el asta dorsal (DH). La administración del 2-hidroxi-TTBA impidió significativamente la degeneración de las neuronas del asta dorsal y del asta ventral en la médula espinal de ratones con ELA (Fig. 7b). *, Diferencia significativa respecto del control, p <0,05 mediante la prueba t independiente.

<Ejemplo 6>

Prevención de lesión cerebral hipóxico-isquémica mediante 2-hidroxi-TTBA
(6-1) Inducción de isquemia cerebral focal transitoria en ratas

[0090] Ratas Sprague-Dawley se anestesiaron con hidrato de cloral, y se sometieron a isquemia cerebral focal por oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) como se ha descrito anteriormente [Tamura et al., J. Cerebr. Blood Flow Metab. 1: 53-60 (1981)]. Ambas arterias carótidas comunes (ACC) se expusieron y la arteria cerebral media derecha (ACMd) se expuso bajo el microscopio quirúrgico mediante una craneotomía rostral de 3 mm de diámetro del foramen oval. Las ACC y ACMd se ocluyeron con microclips. Los clips se liberaron 60 minutos más tarde y se observó la restauración del flujo sanguíneo en la ACMd bajo el microscopio.

(6-2) El 2-hidroxi-TTBA reduce el volumen de infarto después de MCAO durante 60 min

[0091] Los animales se sometieron a MCAO durante 60 min, solo o con la administración del 2-hidroxi-TTBA (50 mg/kg, ip) en los puntos indicados después de la reperfusión. Se inyectó solución salina como control. Los animales se sacrificaron 24 horas más tarde y se extrajeron los cerebros y se seccionaron coronalmente en siete cortes de 2 mm en una matriz cerebral. Los cortes de cerebro se pusieron en una solución de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio al 2 %, seguido de formalina al 10 % durante toda la noche. Se midió el área del infarto, representada en blanco (sistema de análisis de imágenes TINA) y se calcula el volumen del infarto sumando el volumen del infarto que presenta blanco de la sección secuencial de 2 mm de espesor, con una media ± SEM (n = 8-12 ratas/condición) (Fig. 8a). Cabe señalar que la administración retardada (ip) del 2-hidroxi-TTBA hasta 1 h después de la reperfusión redujo significativamente el volumen del infarto. Dosis más altas del 2-hidroxi-TTBA (100 mg/kg, ip) también mostraron una protección similar frente a MCAO durante 60 min (Fig. 8b).

[0092] Se llevaron a cabo experimentos adicionales para examinar los efectos de las inyecciones intravenosas del 2-hidroxi-TTBA (5 mg/kg) frente a MCAO durante 60 min. Se administró 2-hidroxi-TTBA en los puntos indicados después de la reperfusión. Las inyecciones retardadas del 2-hidroxi-TTBA hasta 4 horas después de la reperfusión atenuaron significativamente el volumen del infarto que evoluciona 24 h después de la MCAO durante 60 min, media ± SEM (n = 8-12 ratas/condición) (Fig. 8c).

[0093] Los experimentos de dosis-respuesta de las inyecciones intravenosas del 2-hidroxi-TTBA mostraron que el 2-hidroxi-TTBA atenúa el volumen del infarto a dosis tan bajas como 1 mg/kg. Se observaron los efectos protectores del 2-hidroxi-TTBA con dosis superiores a 2,5 mg/kg, con una media ± SEM (n = 8-12 ratas/condición) (Fig. 8d).

[0094] Los efectos protectores del 2-hidroxi-TTBA también se verificaron mediante administración oral. En particular, la administración del 2-hidroxi-TTBA (10 o 20 mg/kg, po) a los 5 min después de la reperfusión redujo el volumen del infarto 24 horas después de la MCAO durante 60 min, media ± SEM (n = 8-12 ratas/condición) (Fig. 8e).

<Ejemplo 7>

Prevención de la muerte de células neuronales CA1 después de isquemia transitoria del prosencéfalo mediante 2-hidroxi-TTBA

(7-1) Inducción de isquemia global en ratas

[0095] Ratas macho adultas de Sprague-Dawley (250-300 g) se anestesiaron con hidrato de cloral y se sometieron a un modelo de oclusión de cuatro vasos (oclusión de ambas arterias carótidas comunes y las arterias vertebrales) como se ha descrito anteriormente [Pulsinelli y Brierley, Stroke 10: 267-272 (1979)].

(7-2) Inhibición de la generación de ROS mitocondriales después de isquemia global mediante 2-hidroxi-TTBA

[0096] Las ratas recibieron inyecciones intracerebroventricular de Mitotracker CM-H_2X ROS 0,4 nmol. Después de 24 horas, las ratas se sometieron a una oclusión de cuatro vasos durante 10 minutos. Inmediatamente después de la reperfusión, las ratas recibieron las inyecciones intraperitoneales de solución salina (control) o 2-hidroxi-TTBA (50 mg/kg). Los niveles de ROS mitocondriales se analizaron 2 horas más tarde midiendo la intensidad de la fluorescencia del Mitotracker CM-H_2X ROS oxidado en las mitocondrias. La administración del 2-hidroxi-TTBA redujo la producción de ROS mitocondriales 2 h después de isquemia global transitoria (Fig. 9a).

(7-3) Inhibición de la muerte celular neuronal en el campo CA1 tras isquemia transitoria del prosencéfalo mediante 2-hidroxi-TTBA

[0097] Las ratas se sometieron a oclusión de cuatro vasos durante 10 min seguido de la administración de solución salina (control) o 2-hidroxi-TTBA (50 mg/kg, ip). Los animales se sacrificaron 3 días después y se procesaron para el análisis de la muerte neuronal en el campo CA1 tras la tinción con hematoxilina y eosina (media ± SEM, n = 12 ratas/condición). La administración del 2-hidroxi-TTBA previno la muerte celular neuronal retardada en las áreas CA1 que evolucionan después de la isquemia global transitoria (Fig. 9b). *, Diferencia significativa respecto del control, p <0,05 mediante la prueba t independiente.

<Ejemplo 8>

Prevención de la muerte celular neuronal dopaminérgica en la sustancia negra después de la inyección de MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina) mediante 2-hidroxi-TTBA

(8-1) Inhibición de las neuronas dopaminérgicas mediante 2-hidroxi-TTBA

[0098] Ratones C57/BL6 (machos, 8 semanas) recibieron inyecciones de 40 mg/kg de MPTP (sc), solo o con 25 o 50 mg/kg del 2-hidroxi-TTBA (ip) cada 12 horas por día comenzando 30 min antes de la inyección de MPTP. Después de 3 o 7 días, todos los animales se anestesiaron con hidrato de cloral y se perfundieron transcardialmente con PBS seguido por el 4 % de paraformaldehído. Los cerebros se extrajeron de inmediato y se sumergieron en fijador durante 8-10 h. El fijador se reemplazó con el 30 % de sacarosa, se incubaron a 4 ºC durante 2 días, y se almacenó a -70 ºC. Los cerebros se seccionaron a un espesor de 30 µm en un micrótomo de deslizamiento (TPI, Inc., MO). A continuación las secciones se almacenaron en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4, 30 % (v/v) de glicerol, 30 % de etilenglicol) a 4 ºC hasta su uso. Las secciones se inmunotiñeron con anticuerpo dirigido contra TH (tirosina hidroxilasa), coloreado por DAB (diaminobenzidina), y a continuación se observaron bajo el microscopio óptico para

analizar la degeneración de las neuronas dopaminérgicas.

[0099] Los ratones tratados con MPTP mostraban una degeneración notable de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra los 3 días siguientes. Las inyecciones intraperitoneales del 2-hidroxi-TTBA atenúan significativamente la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (Fig. 10a y 10b). Los efectos protectores del 2-hidroxi-TTBA también se observan 7 días después de la administración de MPTP (Fig. 10c y 10d).

<Ejemplo 9>

Inhibición de la producción de ROS mitocondriales en la médula espinal después de una lesión traumática de la médula espinal

[0100] Ratas Sprague-Dawley (250-300 g, hembra) recibieron lesión medular traumática por compresión de la médula espinal dorsal. El segmento T8 de la médula espinal se expuso por el lado dorsal, se comprimió con 20 g durante 10 min, y a continuación se inyectó CM-H_2X ROS mitocondrial inmediatamente en la médula espinal. Se inyectó 2-hidroxi-TTBA (50 mg/kg, ip) o un vehículo de control (control) con CM-H_2X ROS mitocondrial. Los niveles de ROS mitocondriales en las neuronas del asta dorsal se analizaron 48 h más tarde como se ha descrito anteriormente después de inmunomarcaje con el anticuerpo dirigido contra NeuN, un marcador específico de neuronas. La administración del 2-hidroxi-TTBA redujo significativamente la producción de ROS mitocondriales en las neuronas de la médula espinal después de lesión traumática de la médula espinal (Fig. 11) (Media ± SEM, n = 12 ratas/condición). *, Diferencia significativa respecto del control, p <0,05 mediante la prueba t independiente.

[0101] Como se ha descrito anteriormente, los derivados de tetrafluorobencilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables en la presente invención se pueden usar como antagonistas de los receptores de NMDA, antioxidantes, e inhibidores de la neurotoxicidad del cinc.

[0102] A continuación se describen enfermedades concretas aplicables con derivados de tetrafluorobencilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

[0103] Los ejemplos de aplicación descritos a continuación son parte de ejemplos de esta invención. Esta invención no se limita a los ejemplos de aplicación.

<Ejemplo de aplicación 1> Ictus

[0104] El suministro interrumpido de sangre al cerebro o un ictus inducen la muerte neuronal principalmente a través de la sobre-activación del receptor de glutamato permeable a Ca^{2+} inducida por la acumulación de glutamato, un neurotransmisor excitador, en la hendidura sináptica. Ha sido bien documentado que los antagonistas del receptor de NMDA disminuyen la muerte de células neuronales al suponer el ictus isquémico el 80 % del ictus [Simon et al., Science, 226: 850-852 (1984); Park et al., Ann Neurol., 24: 543-551 (1988); Wieloch, Science, 230: 681-683 (1985); Kass et al., Exp. Neurol., 103: 116-122 (1989); Weiss et al., Brain Res., 380: 186-190 (1986)]. También se ha informado de que las ROS y el cinc son el mecanismo principal de la muerte neuronal tras ictus. Los antioxidantes o inhibidores de la toxicidad de cinc protegen la lesión isquémica en modelos animales de ictus [Flamm, E. S. et al., Stroke, 9 (5): 445-447 (1978); Kogure, K. et al., Prog. Brain Res., 63: 237-259 (1985); Chan, P. H., J. Neurotrauma., 9 suppl2: S417-423 (1992)]. Por lo tanto, se pueden usar compuestos de la presente invención que muestran múltiples efectos protectores contra la excitotoxicidad, el estrés oxidativo, y la toxicidad del cinc como fármacos terapéuticos para los ictus.

<Ejemplo de aplicación 2> Traumatismo

[0105] Las excitotoxinas están estrechamente relacionadas con la degeneración de las células neuronales después de una lesión cerebral traumática (LCT) y lesión medular traumática (LMT). El ácido quinolínico, un agonista del receptor de NMDA presente en el cuerpo humano, se incrementa de 50 a 500 veces en pacientes con LCT [Sinz et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 18: 610-615 (1988)]. Se ha informado de que los antagonistas del receptor de NMDA disminuyen la muerte neuronal después de LCT y LMT [Faden et al., J Neurotrauma, 5: 33-45 (1988); Okiyama et al., J Neurotrauma, 14: 211-222 (1997)]. Los antioxidantes también inhiben el daño tisular después de una LCT o LMT [Faden y Salzman, Trends Pharmacol. Sci., 13: 29-35 (1992)]. Por lo tanto, se pueden usar compuestos en la presente invención que muestren múltiples efectos protectores contra la excitotoxicidad y el estrés oxidativo como fármacos terapéuticos para LCT y LMT.

<Ejemplo de aplicación 3> Epilepsia

[0106] La administración de kainato, un agonista del AMPA y los receptores de glutamato del kainato, induce convulsiones y muerte celular neuronal en varias áreas del cerebro, incluyendo la formación del hipocampo. Se ha demostrado que los antagonistas de los receptores de NMDA inhiben las convulsiones y ataques en varios modelos animales epileptógenos [Anderson et al., J. Neurophysiol, 57: 1-21 (1987); Wong et al., Neurosci Lett., 85: 261-266 (1988); Mc Namara et al., Neuropharmacology, 27: 563-568 (1988)]. Los antioxidantes inhiben convulsiones y muerte neuronal inducida por convulsiones [He et al., Free Radic. Biol. Med. 22: 917-922 (1997); Kabuto et al., Epilepsia, 39: 237-243 (1998)]. Por lo tanto, se pueden usar compuestos en la presente invención que muestren múltiples efectos protectores contra la excitotoxicidad y el estrés oxidativo como fármacos terapéuticos para la epilepsia y muerte neuronal inducida por convulsiones.

<Ejemplo de aplicación 4> Esclerosis lateral amiotrófica

[0107] Los pacientes con ELA muestran mayores niveles de glutamato extracelular y defectos en el transporte de glutamato en astrocitos. La administración de agonistas del receptor de glutamato en la médula espinal mimetizaba cambios patológicos en la médula espinal de pacientes con ELA [Rothstein et al., Clin Neurosci., 3: 348-359 (1995); Ikonomidou et al., J Neuropathol Exp Neurol, 55: 211-224 (1996)]. Además de la excitotoxicidad, se acumulan pruebas de que el estrés oxidativo está implicado en la muerte neuronal en ELA [Cookson y Shaw, Brain Pathol., 9: 165-186 (1999)]. De hecho, la principal acción farmacológica del riluzol, el nuevo fármaco para pacientes con ELA que ha recibido la aprobación de la FDA, implica la prevención de la excitotoxicidad y el estrés oxidativo [Obrenovitch, Trends. Pharmacol. Sci. 19: 9-11 (1998); Noh et al., Neurobiol. Dis., 7: 375-383 (2000)]. Por lo tanto, se pueden usar compuestos en la presente invención que muestren múltiples efectos protectores contra la excitotoxicidad y el estrés oxidativo como fármacos terapéuticos para la ELA.

<Ejemplo de aplicación 5> Enfermedad de Parkinson (EP)

[0108] La EP es una enfermedad neurodegenerativa que presenta el trastorno de la función motora por muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra. Varios antagonistas de los receptores de NMDA protegen las neuronas dopaminérgicas de la neurotoxina dopaminérgica MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) [Lange et al., Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 348: 586-592 (1993); Brouillet y Beal. Neuroreport. 4: 387-390 (1993)]. Los antagonistas del receptor de NMDA también mejoran la discinesia inducida por levodopa y por lo tanto pueden mejorar los efectos terapéuticos de la levodopa [Papa y Chase, Ann. Neurol. 39: 574-578 (1996); Marin et al., Brain Res. 736: 202-205 (1996)]. El estrés oxidativo, así como la excitotoxicidad se ha mostrado como un mecanismo principal de la muerte celular neuronal en pacientes con EP [Schapira et al., Biochem. Soc. Trans, 21: 367-370 (1993)]. Por lo tanto, se pueden usar compuestos en la presente invención que muestren múltiples efectos protectores contra la excitotoxicidad y el estrés oxidativo como fármaco terapéutico para la enfermedad de Parkinson.

<Ejemplo de aplicación 6> Enfermedad de Huntington (EH)

[0109] La EH es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que afecta predominantemente a las interneuronas pequeñas y medianas en los cuerpos estriados. Estas características patológicas de la EH se observan en vivo e *in vitro* tras la administración de agonistas de los receptores de NMDA, incrementando la posibilidad de que la neurotoxicidad mediada por el receptor de NMDA contribuya a la muerte neuronal selectiva en la EH [Koh et al., Science 234: 73-76 (1986); Beal et al., Nature 321: 168-171 (1986); Beal et al., J. Neurosci. 11: 1649-1659 (1991)]. Puesto que se están acumulando evidencias de que el estrés oxidativo, tal como la disfunción mitocondrial y la generación de ROS, causa la muerte neuronal observada en la EP, es posible que se usen fármacos inhibidores de ROS para el tratamiento de la EH [Jenner, Pathol. Biol. 44: 57-64 (1996); Albers y Beal, J. Neural. Transm. Suppl., 59: 133-154 (2000)]. Por lo tanto, se pueden usar compuestos en la presente invención que muestren múltiples efectos protectores contra la excitotoxicidad y el estrés oxidativo como fármacos terapéuticos para la EH.

<Ejemplo de aplicación 7> Enfermedad de Alzheimer (EA)

[0110] La degeneración de las neuronas glutamatérgicas en la corteza cerebral y la formación del hipocampo y de las neuronas colinérgicas en el prosencéfalo basal, el depósito extracelular de la placa amiloide y los ovillos neurofibrilares intracelulares son características patológicas de la EA. En la EA, se ha informado de la producción de peroxidación lipídica, 8-hidroxi desoxiguanosina, carbonilos de proteínas, nitración, o reticulación oxidativa de

proteínas por exceso de generación de radicales libres, lo que sugiere que el estrés oxidativo juega un papel causal en la muerte neuronal en la EA [Vitek et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91: 4766-4770 (1994); Smith et al., Trends. Neurosci., 18: 172-176 (1995), Mol. Chem. Neuropathol., 28: 41-48 (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 94: 9866-9868 (1997); Montine et al., J. Neuropathol. Exp. Neurol., 55: 202-210 (1996)]. De hecho, se han investigado ampliamente los efectos terapéuticos de antioxidantes en pacientes con EA. El Zn^{2+} se acumula en el cerebro (amígdala, hipocampo, lóbulo parietal inferior, circunvoluciones temporales superior y media) de pacientes con EA, principalmente en el centro y el borde de la placa amiloide e induce la agregación de beta-amiloide [Bush et al., Science 265: 1464-1467 (1994); Lovell et al., J. Neurol. Sci., 158: 47-52 (1998)]. Por lo tanto, se pueden usar compuestos de la presente invención que muestran el efecto protector contra el estrés oxidativo y la toxicidad de Zn^{2+} como fármacos terapéuticos para la EA.

<Ejemplo de aplicación 8> Enfermedades oculares y cataratas

[0111] En el glaucoma, el aumento de la presión intraocular bloquea el flujo de sangre hacia la retina, causa isquemia de la retina, e induce la liberación excesiva de glutamato en la hendidura sináptica. Una vez liberado, el glutamato induce excitotoxicidad mediada por el receptor de NMDA mediante la apertura de los canales de calcio y el aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} en las neuronas postsinápticas. La degeneración de las células de la retina también puede ocurrir por el aumento de la generación de especies reactivas de oxígeno durante la reperfusión [Osborne N. N. et al., Surv. Opththalmol., 43 suppl., 1: S102-28 (1999); Hartwick A. T., Optom. Vis. Sci., 78: 85-94 (2001)]. La administración de antagonistas de los receptores de NMDA o antioxidantes inhibe la degeneración de la retina en un modelo animal de glaucoma [Gu. Z. et al., Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 104: 11-6 (2000); Vorwerk C. K. et al., Surv Ophthalmol., 43 suppl., 1: S142-50 (1999); Schwartz M. et al., Eur. J. Ophthalmol., 9 Suppl., 1: S9-11 (1999)].

[0112] En casos de retinopatía y degeneración macular, la degeneración neuronal se puede bloquear por la inhibición de la excitotoxicidad y del estrés oxidativo, las principales causas de estas enfermedades [Lieth E. et al., Clin. Experiment Ophthalmol., 28(1): 3-8 (2000); Moor P. et al., Exp. Eye Res., 73: 45-57 (2001); Winkler B. S. et al., Mol. Vis., 5: 32 (1999); Simonelli F. et al., Clin. Chim. Acta., 320: 111-5 (2002)].

[0113] Las cataratas son una enfermedad senil que acompaña a la opacidad lenticular. El estrés oxidativo ha sido considerado un mediador primario de las cataratas. De hecho, se han aplicado antioxidantes para el tratamiento de las cataratas [Varma et al., Curr. Eye Res. 3: 35-57 (1984); Anderson et al., Adv. Exp. Med. Biol., 366: 73-86 (1994)].

[0114] Por lo tanto, se pueden usar compuestos en la presente invención que muestren múltiples efectos protectores contra la excitotoxicidad y el estrés oxidativo como fármacos terapéuticos para las enfermedades oculares.

<Ejemplo de aplicación 9> Adicción a las drogas

[0115] La activación de las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas en el área tagmental ventral que se proyectan hacia el núcleo accumbens es esencial para el proceso de la adición a las drogas que requiere la excitabilidad neuronal [Self D. W. y Nestler E. J., Annu. Rev. Neurosci., 18: 463-95 (1995)]. Varias elementos de prueba respaldan que para reducir la capacidad de adaptación neuronal al abuso de drogas se puedan aplicar los antagonistas del receptor de NMDA y se han sugerido como nuevos agentes terapéuticos para la adicción a las drogas [Boening et al., Alcohol Clin. Exp. Res., 25: 1275-1315 (2001); Vorel et al., Science, 292: 1175-8 (2001)].

<Ejemplo de aplicación 10> Depresión

[0116] Los antidepresivos tricíclicos y los antidepresivos inhibidores de la MAO (monoaminooxidasa) aumentan la neurotransmisión de noradrenalina y serotonina. Los fármacos terapéuticos existentes inducen una gran cantidad de efectos secundarios a través de la interacción con otro sistema nervioso y no tienen efecto terapéutico en el 30 % de los pacientes con depresión [Pacher et al., Curr. Med. Chem., Feb. 8 (2): 89-100 (2001)]. Recientemente, se demostró que los antagonistas del receptor de NMDA son aplicables como nuevos fármacos terapéuticos para la depresión [Le D. A. y Lipton S. A., Drugs Aging, 18: 717-724 (2001); Petrie et al., Pharmacol. Ther., 87: 11-25 (2000)].

<Ejemplo de aplicación 11> Dolor

[0117] El dolor neuropático es el resultado del aumento de la neurotransmisión después de una lesión periférica y de daños en los tejidos neuronales en relación con cirugía, pacientes de cáncer, y traumatismo, etc. [Hempenstall K. y Rice A. S., Curr. Opin. Investig. Drugs, Mar; 3 (3): 441-8 (2002); McDonnell et al., Curr. Oncol. Rep., 2: 351-7 (2000)]. Dado que la activación del receptor de NMDA es necesaria para el tratamiento del dolor neuropático, se ha informado de que se pueden usar antagonistas del receptor de NMDA como fármacos terapéuticos para tratar el dolor neuropático [Parson C. G., Eur. J. Pharmacol., 429: 71-8 (2001); Hewitt, Clin. J. Pain., 16: S73-9 (2000)].

<Ejemplo de aplicación 12> Esclerosis múltiple, meningitis, encefalitis o hidrocefalia

[0118] El estrés oxidativo desempeña un papel en la patogénesis de la esclerosis múltiple, meningitis, encefalitis, e hidrocefalia. Los niveles de anti-oxidantes tales como retinal, a-tocoferol, b-caroteno y ácido ascórbico se reducen en el cuerpo de pacientes con esclerosis múltiple [Calabrese, V et al., Int. J. Clin. Pharmacol. Res., 14 (4): 119-123 (1994); Besler HT et al., Nutr. Neurosci. 5 (3): 215-220 (2002); Nutr. Neurosci. 6 (3): 189-196 (2002)]. Se observa el aumento de la generación de ROS y la muerte de las células neuronales en pacientes con meningitis y su modelo animal [Maurizi C. P., Med. Hypotheses, 52 (1): 85-87 (1999); Christen S. et al., Free Radic. Biol. Med, 31 (6): 754-762 (2001); Kastenbauer S. et al., Neurology, 58 (2)186-191 (2002)], modelo de infección por el virus de la encefalitis [Fujii, S. et al., Virology, 256(2): 203-212 (1999); Raung S. L. et al., Neurosci. Lett., 315 (1-2): 9-12 (2001)], y pacientes con hidrocefalia [Nuss J. I. et al., Am. J. Vet Res., 28 (127): 1909-1913 (1967); Vannucci R. C. et al., Dev. Med. Child. Neurol., 22 (3): 308-316 (1980); Radwanska-Wala B. et al., Pathol. Res. Pract., 198 (6): 421-423 (2002)]. Por lo tanto, se pueden usar compuestos de la presente invención que muestren un efecto protector contra el estrés oxidativo como fármacos terapéuticos para la muerte neuronal inducida por esclerosis múltiple, meningitis, encefalitis o hidrocefalia.

[0119] La presente invención se ha descrito de manera ilustrativa, y ha de entenderse que la terminología usada pretende ser de naturaleza más descriptiva que limitante. A la luz de las enseñanzas anteriores son posibles muchas modificaciones y variaciones de la presente invención. Por lo tanto, ha de entenderse que dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas, la invención se puede poner en práctica de otra manera distinta a la descrita específicamente.

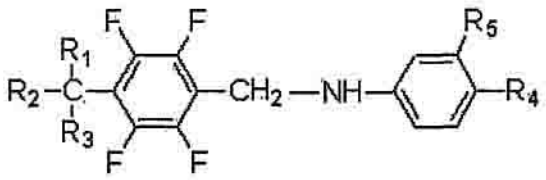
Aplicabilidad Industrial

[0120] Como se ha descrito anteriormente en esta memoria, los derivados de tetrafluorobencilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y la composición farmacéutica que contiene dichos derivados como componente eficaz puede prevenir y tratar enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington o enfermedad de Alzheimer, enfermedades neuronales convulsivas tales como epilepsia, etc., y lesión cerebral por ictus, traumatismo, o hidrocefalia, enfermedades oculares por glaucoma y retinopatía, enfermedades mentales por adicción a las drogas y depresión, dolor neuropático, enfermedades inflamatorias por meningitis y encefalitis como se ha descrito anteriormente.

REIVINDICACIONES

1. Un derivado de tetrafluorobencilo representado por la siguiente fórmula química 1:

[Fórmula Química 1]



en la que,
R_1, R_2 y R_3 son hidrógeno o halógeno;
R_4 es hidroxi, alquilo, alcoxi, halógeno, alcoxi sustituido con halógeno, alcanoiloxi o nitro;
R_5 es ácido carboxílico, éster de ácido carboxílico sustituido con alquilo C_1-C_4, carboxiamida, ácido sulfónico, halógeno o nitro;
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

2. El derivado de tetrafluorobencilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R_1, R_2 y R_3 son halógeno.

3. El derivado de tetrafluorobencilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que R_1, R_2 y R_3 son F.

4. El derivado de tetrafluorobencilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R_4 es hidroxi, alquilo, alcoxi o halógeno.

5. El derivado de tetrafluorobencilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R_4 es hidroxi o alcanoiloxi.

6. El derivado de tetrafluorobencilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R_4 es hidroxi.

7. El derivado de tetrafluorobencilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R_5 es carboxilo, carboxiamida, ácido sulfónico o halógeno.

8. El derivado de tetrafluorobencilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R_5 es carboxilo.

9. El derivado de tetrafluorobencilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el derivado de tetrafluorobencilo es

ácido 2-hidroxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometil-bencilamino) benzoico,
ácido 2-nitro-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico,
ácido 2-cloro-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico,
ácido 2-bromo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico,
ácido 2-hidroxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-metilbencilamino) benzoico,
ácido 2-metil-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico,
ácido 2-metoxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico,
ácido 5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino)-2-trifluorometoxi benzoico.
2-nitro-4-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino)fenol,
2-cloro-4-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino)fenol,
2-hidroxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzamida,
ácido 2-hidroxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) bencenosulfónico,
2-hidroxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoato de metilo,
ácido 2-etanoiloxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico,

ácido 2-propanoiloxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico, o
ácido 2-ciclohexanocarboniloxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometilbencilamino) benzoico.

10. El derivado de tetrafluorobencilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el derivado de tetrafluorobencilo es ácido 2-hidroxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometil-bencilamino) benzoico.

11. El derivado de tetrafluorobencilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el derivado de tetrafluorobencilo es ácido 2-hidroxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometil-bencilamino) benceno sulfónico.

12. El derivado de tetrafluorobencilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el derivado de tetrafluorobencilo es 2-hidroxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometil-bencilamino)-benzoamida.

13. El derivado de tetrafluorobencilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el derivado de tetrafluorobencilo es 2-cloro-4-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluorometil-bencilamino)fenol.

14. Una composición farmacéutica que comprende un derivado de tetrafluorobencilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 como ingrediente eficaz.

15. Un derivado de tetrafluorobencilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 como ingrediente eficaz para su uso en el tratamiento y la prevención de la epilepsia.

16. Un derivado de tetrafluorobencilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 como ingrediente eficaz para su uso en el tratamiento y la prevención de ictus.

17. Un derivado de tetrafluorobencilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 como ingrediente eficaz para su uso en el tratamiento y la prevención de lesión cerebral traumática, lesión traumática de la médula espinal o hidrocefalia.

18. Un derivado de tetrafluorobencilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 como ingrediente eficaz para su uso en el tratamiento y la prevención de glaucoma, retinopatía o degeneración macular.

19. Un derivado de tetrafluorobencilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 como ingrediente eficaz para su uso en el tratamiento y la prevención de la adicción a las drogas.

20. Un derivado de tetrafluorobencilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 como ingrediente eficaz para su uso en el tratamiento y la prevención de la depresión.

21. Un derivado de tetrafluorobencilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 como ingrediente eficaz para su uso en el tratamiento y la prevención del dolor.

22. Un derivado de tetrafluorobencilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 como ingrediente eficaz para su uso en el tratamiento y la prevención de la encefalitis, meningitis, y/o esclerosis múltiple.

23. Un derivado de tetrafluorobencilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 como ingrediente eficaz para su uso en el tratamiento y la prevención de enfermedades neurodegenerativas seleccionadas del grupo que consiste en esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, y sus combinaciones.

24. Un derivado de tetrafluorobencilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 como ingrediente eficaz para su uso en el tratamiento y la prevención de la tromboembolia.

25. Un derivado de tetrafluorobencilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 como ingrediente eficaz para su uso en el tratamiento y la prevención de la parada cardiaca.

FIG. 1a

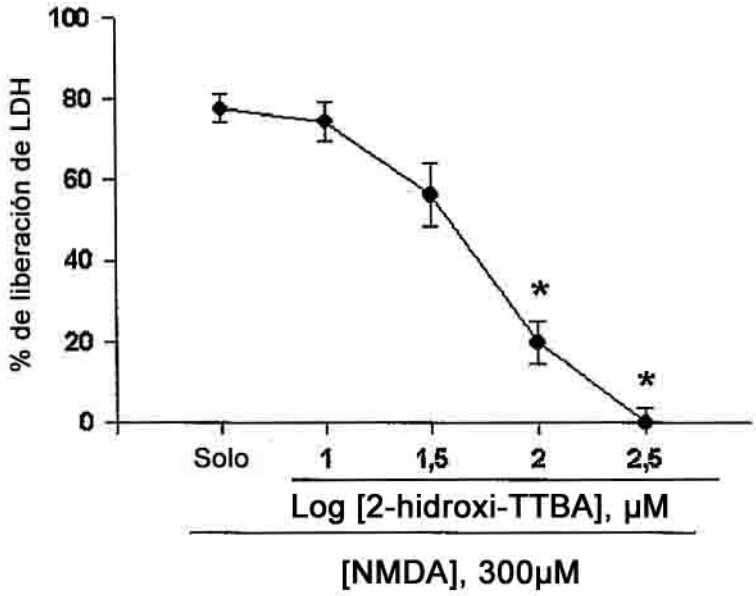

100
80
60
40
20
0
% de liberación de LDH
Solo
1
1,5
2
2,5
Log [2-hidroxi-TTBA], µM
[NMDA], 300µM

FIG. 1b

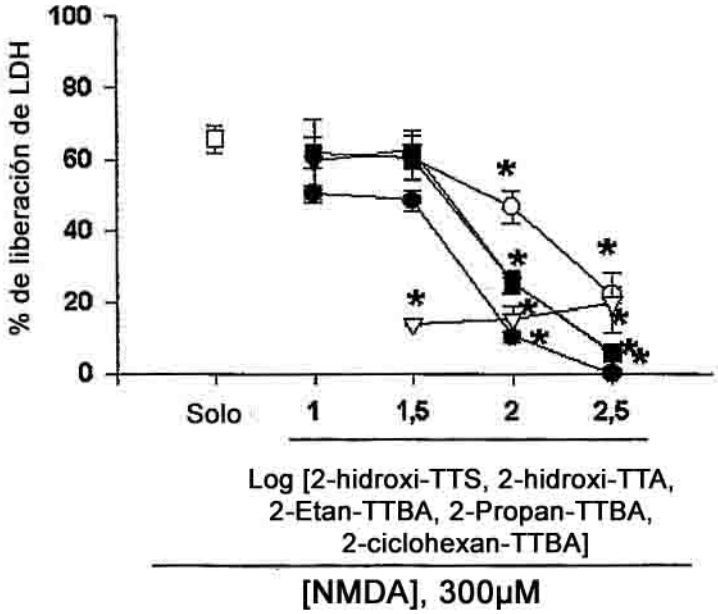

100
80
60
40
20
0
% de liberación de LDH
Solo
1
1,5
2
2,5
Log [2-hidroxi-TTS, 2-hidroxi-TTA,
2-Etan-TTBA, 2-Propan-TTBA,
2-ciclohexan-TTBA]
[NMDA], 300µM

FIG. 2a

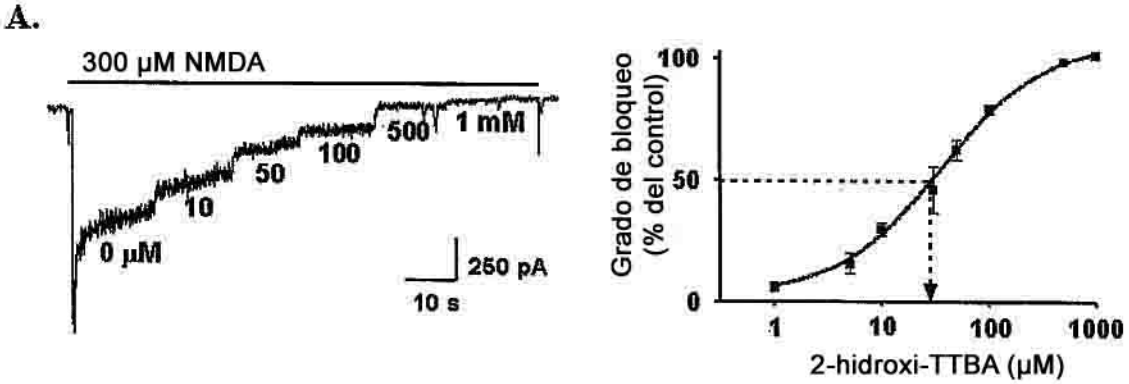

A.
300 µM NMDA
0 µM
10
50
100
500
1 mM
250 pA
10 s
Grado de bloqueo (% del control)
100
50
0
1
10
100
1000
2-hidroxi-TTBA (µM)

FIG. 2b

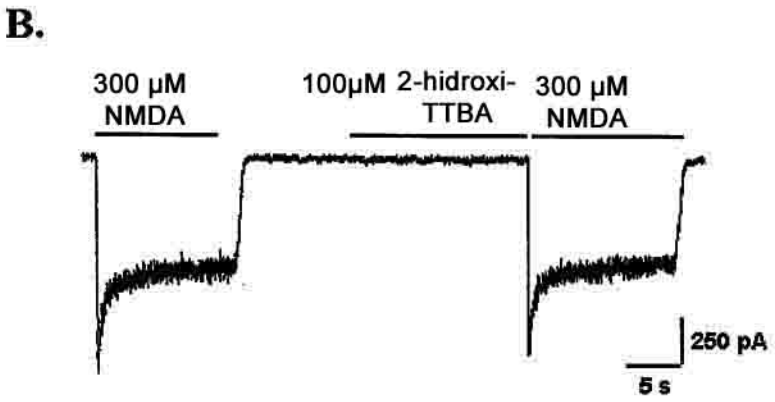

B.
300 µM NMDA
100µM 2-hidroxi-TTBA
300 µM NMDA
250 pA
5 s

FIG. 3a

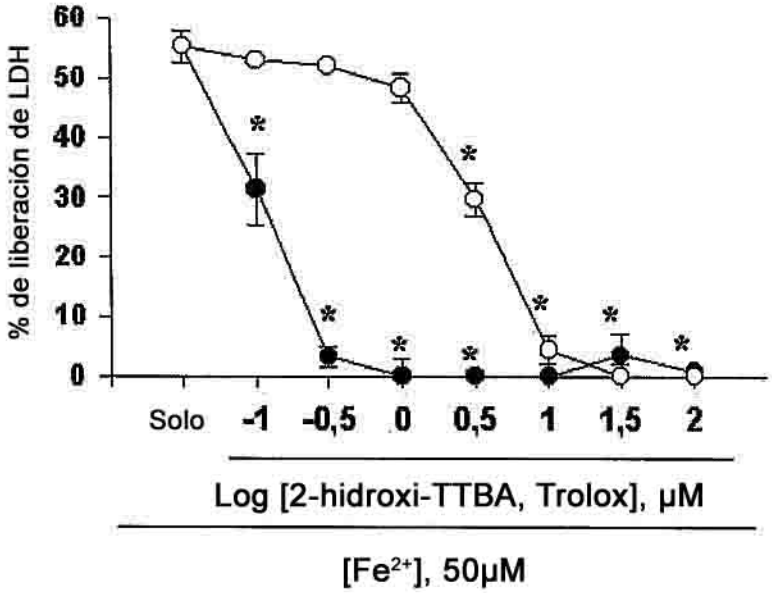

% de liberación de LDH
60
50
40
30
20
10
0
Solo
-1
-0,5
0
0,5
1
1,5
2
Log [2-hidroxi-TTBA, Trolox], µM
[Fe2+], 50µM

FIG. 3b

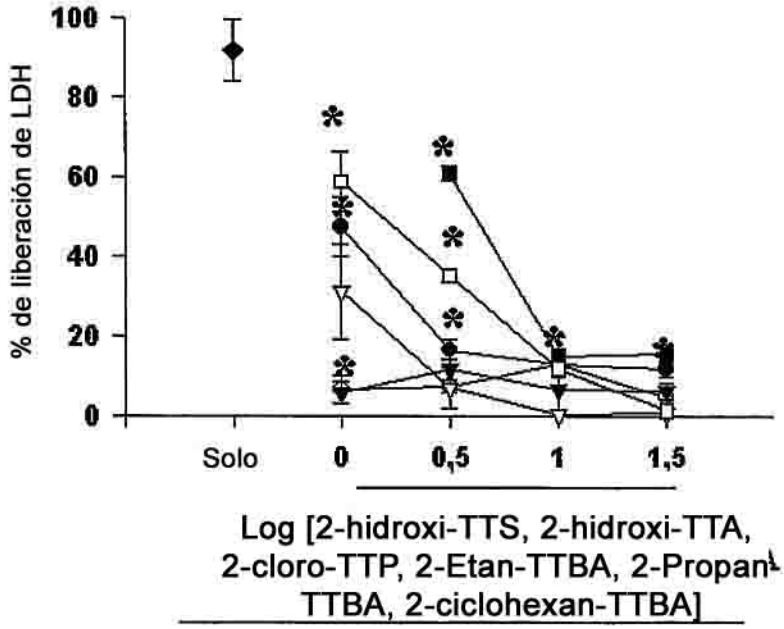

% de liberación de LDH
100
80
60
40
20
0
Solo
0
0,5
1
1,5
Log [2-hidroxi-TTS, 2-hidroxi-TTA,
2-cloro-TTP, 2-Etan-TTBA, 2-Propan-TTBA, 2-ciclohexan-TTBA]
[Fe2+], 50µM

FIG. 4

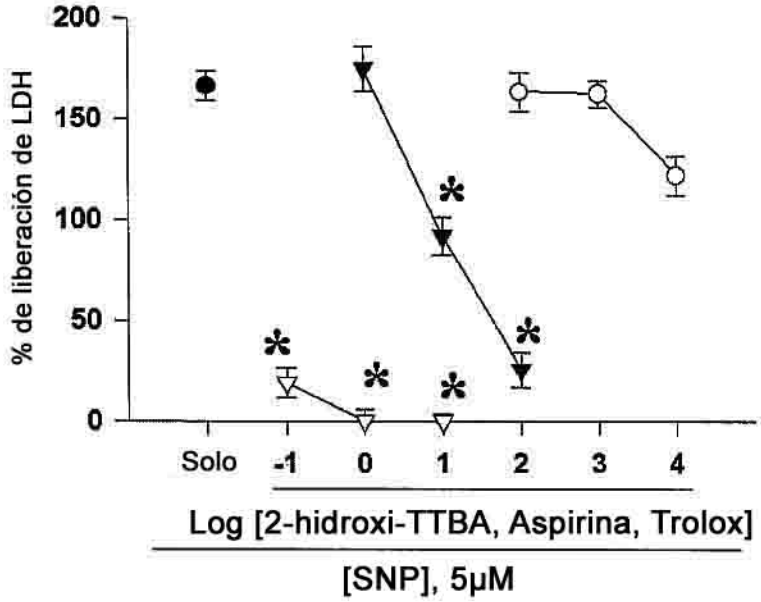

200
150
100
50
0
% de liberación de LDH
Solo
-1
0
1
2
3
4
Log [2-hidroxi-TTBA, Aspirina, Trolox]
[SNP], 5μM

FIG. 5

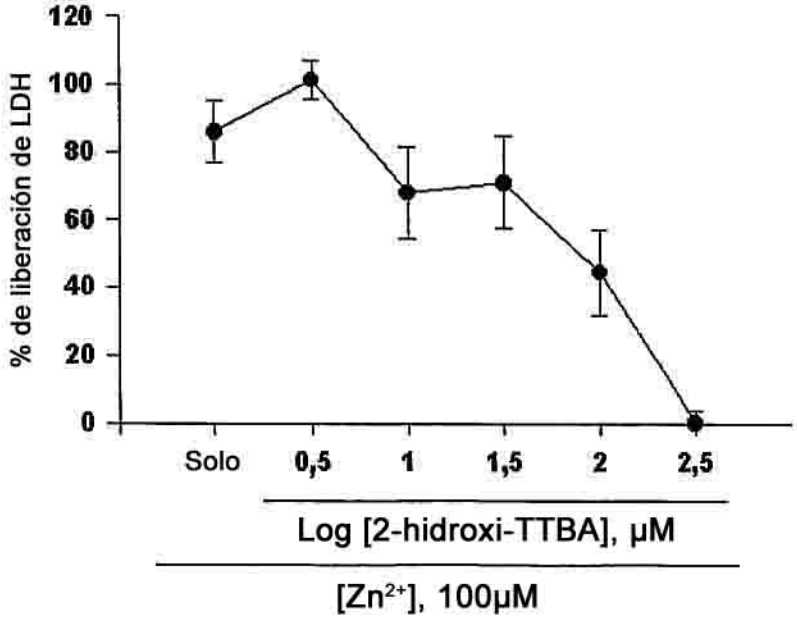

120
100
80
60
40
20
0
% de liberación de LDH
Solo
0,5
1
1,5
2
2,5
Log [2-hidroxi-TTBA], μM
[Zn2+], 100μM

FIG. 6a

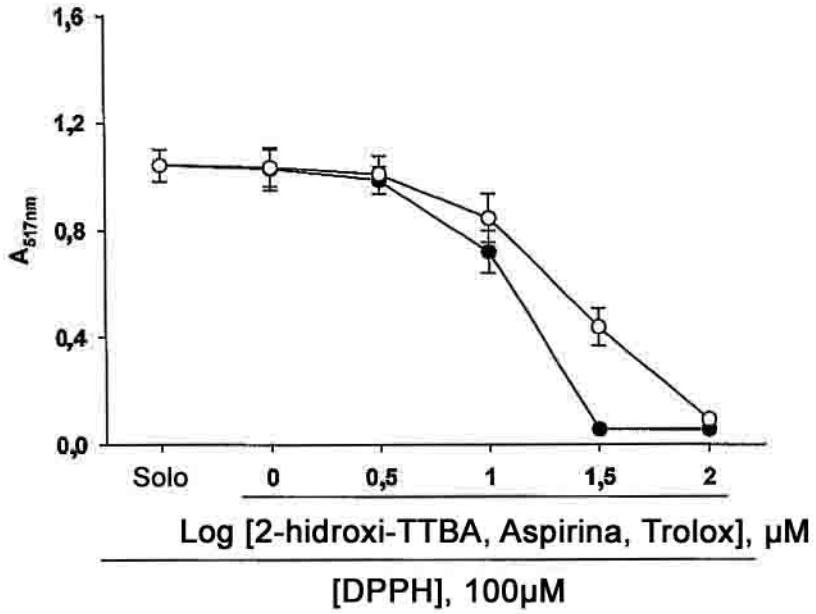

1,6
1,2
0,8
0,4
0,0
A517nm
Solo
0
0,5
1
1,5
2
Log [2-hidroxi-TTBA, Aspirina, Trolox], µM
[DPPH], 100µM

FIG. 6b

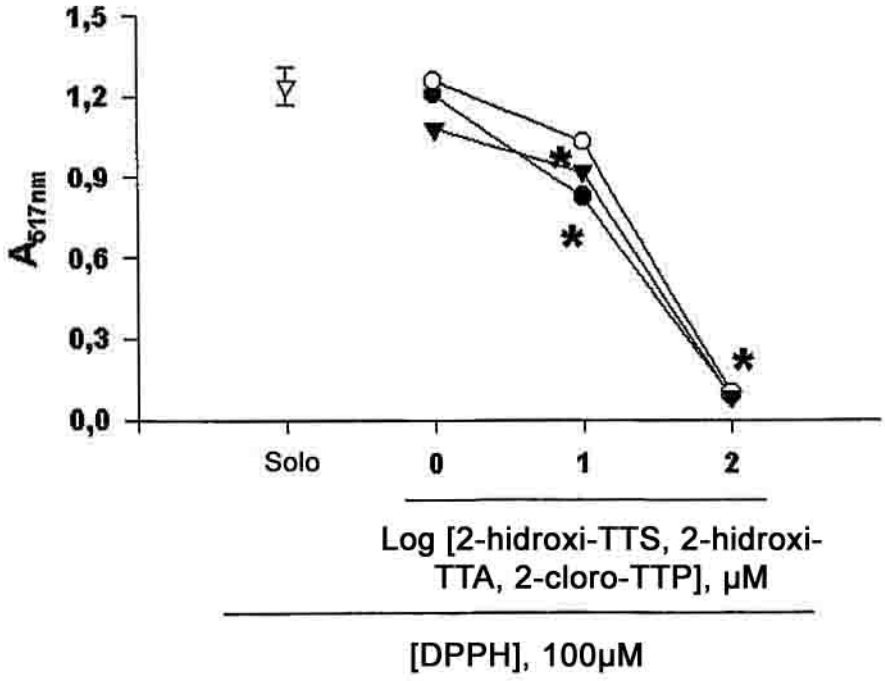

1,5
1,2
0,9
0,6
0,3
0,0
A517nm
Solo
0
1
2
Log [2-hidroxi-TTS, 2-hidroxi-TTA, 2-cloro-TTP], µM
[DPPH], 100µM

FIG. 7a

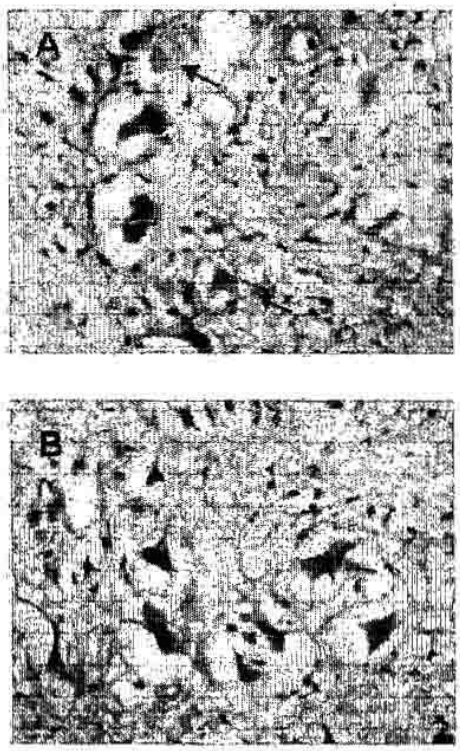

A
B

FIG. 7b

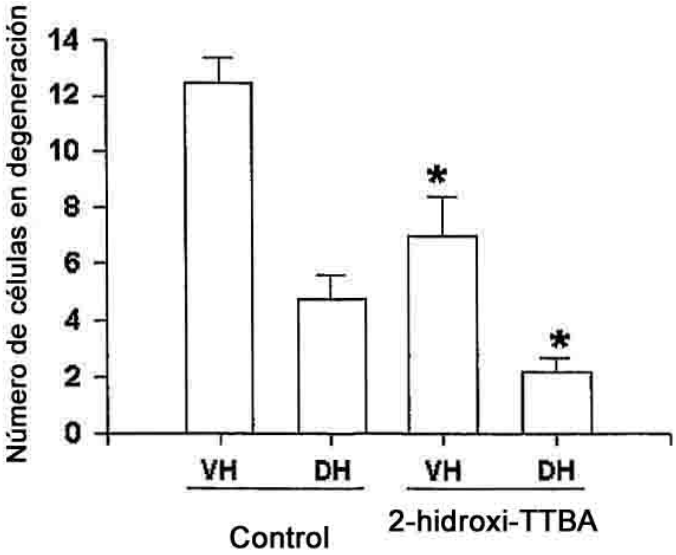

Número de células en degeneración
0
2
4
6
8
10
12
14
*
*
VH
DH
VH
DH
Control
2-hidroxi-TTBA

FIG. 8a

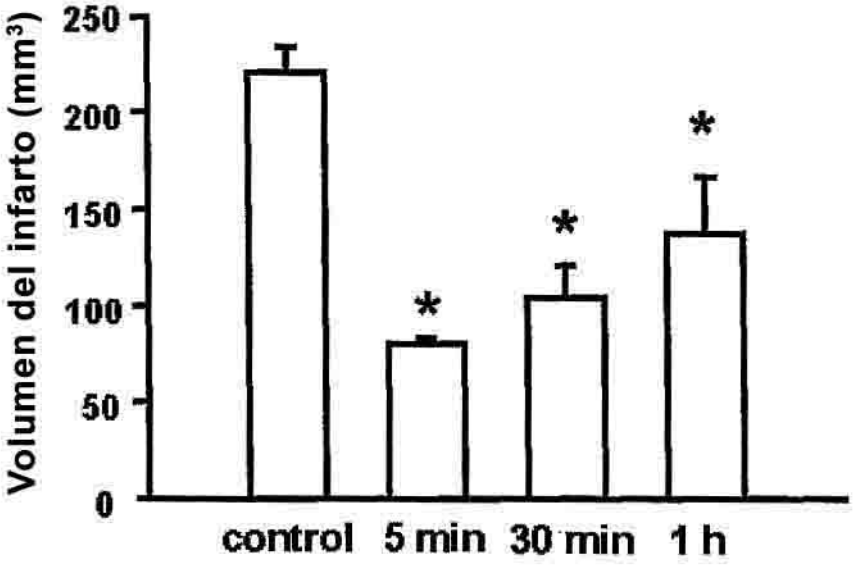

Volumen del infarto (mm³)
250
200
150
100
50
0
*
*
*
control
5 min
30 min
1 h

FIG. 8b

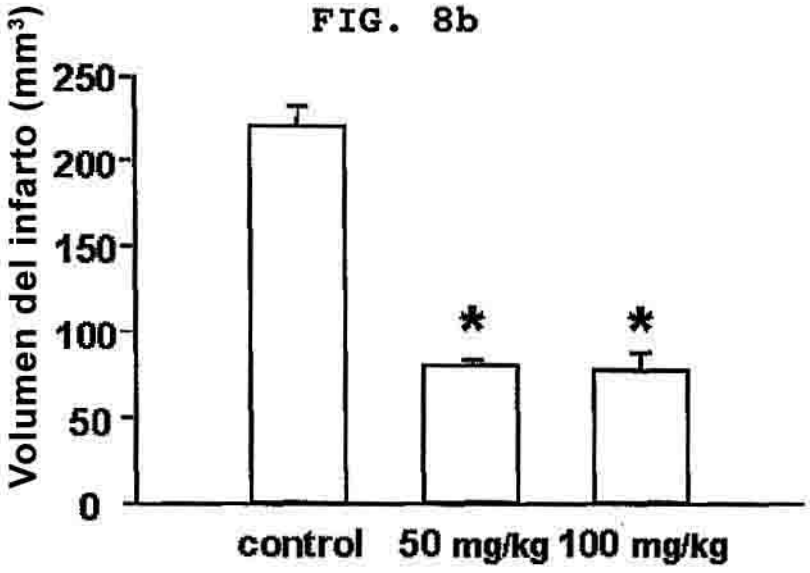

Volumen del infarto (mm³)
250
200
150
100
50
0
*
*
control
50 mg/kg
100 mg/kg

FIG. 8c

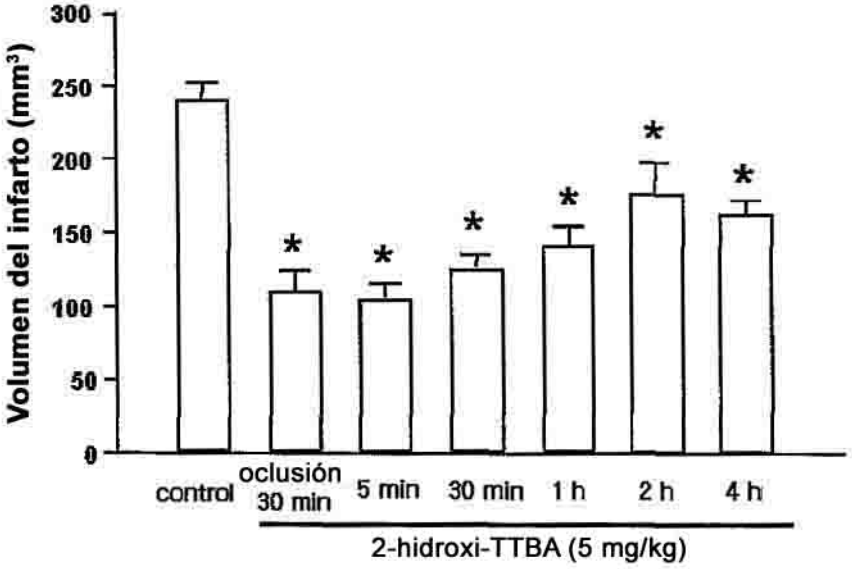

Volumen del infarto (mm³)
300
250
200
150
100
50
0
control
oclusión 30 min
5 min
30 min
1 h
2 h
4 h
2-hidroxi-TTBA (5 mg/kg)

FIG. 8d

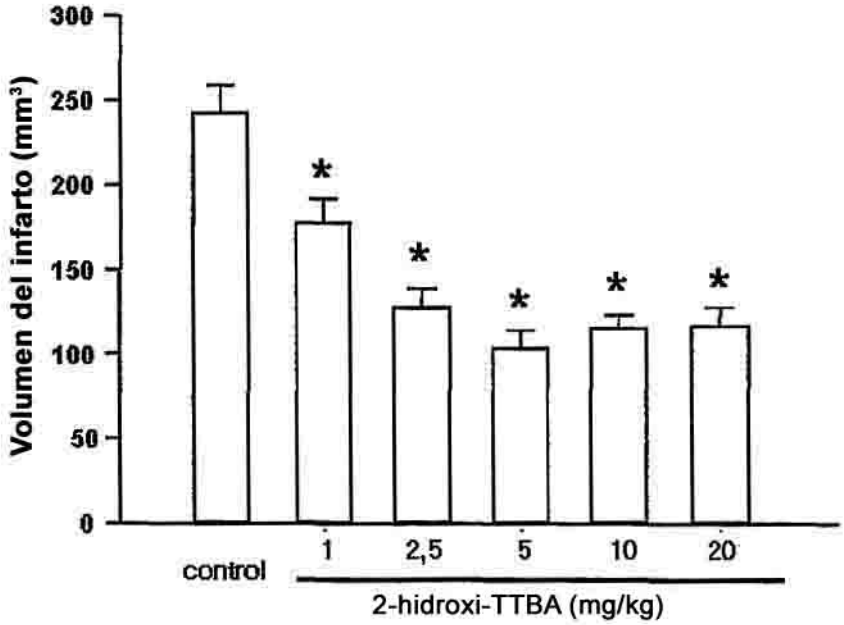

Volumen del infarto (mm³)
300
250
200
150
100
50
0
control
1
2,5
5
10
20
2-hidroxi-TTBA (mg/kg)

FIG. 8e

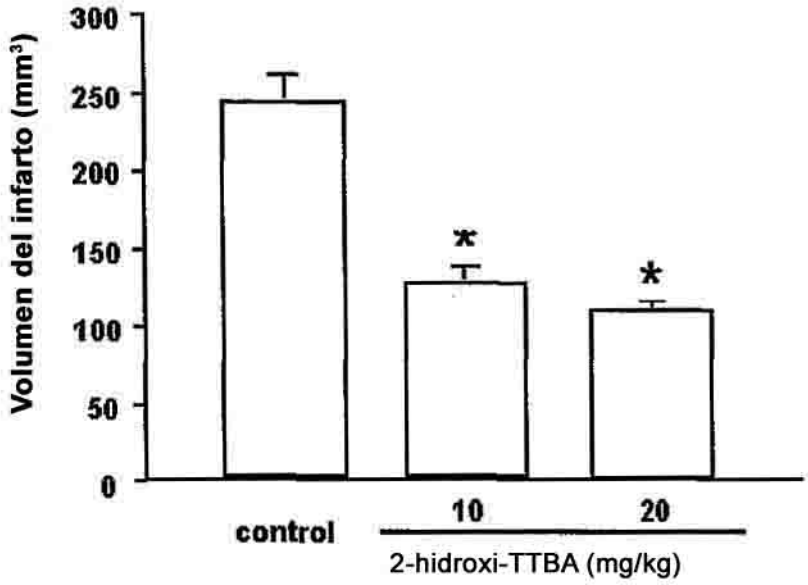

Volumen del infarto (mm³)
300
250
200
150
100
50
0
*
*
control
10
20
2-hidroxi-TTBA (mg/kg)

FIG. 9a

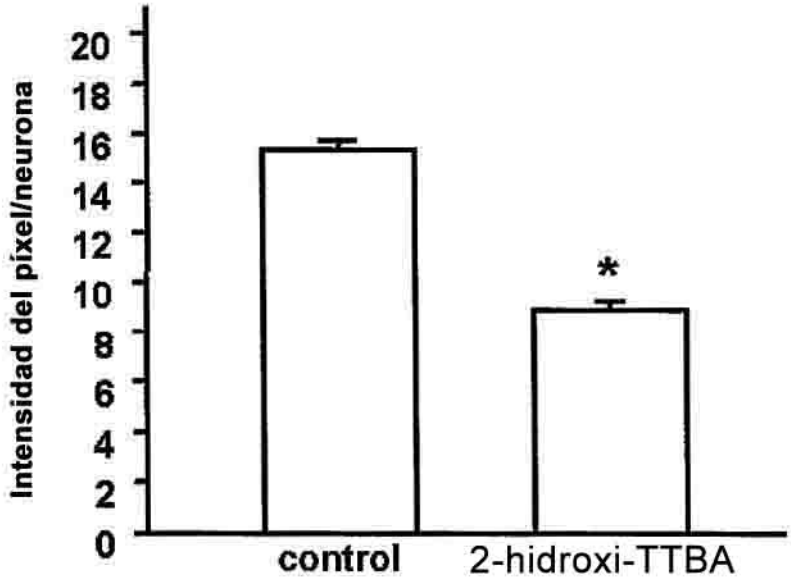

Intensidad del píxel/neurona
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
*
control
2-hidroxi-TTBA

FIG. 9b

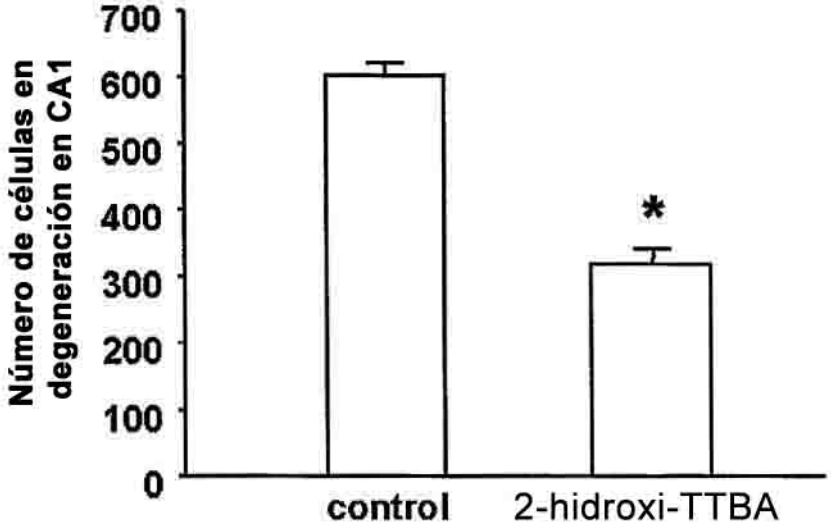

Número de células en degeneración en CA1
700
600
500
400
300
200
100
0
*
control
2-hidroxi-TTBA

FIG. 10a

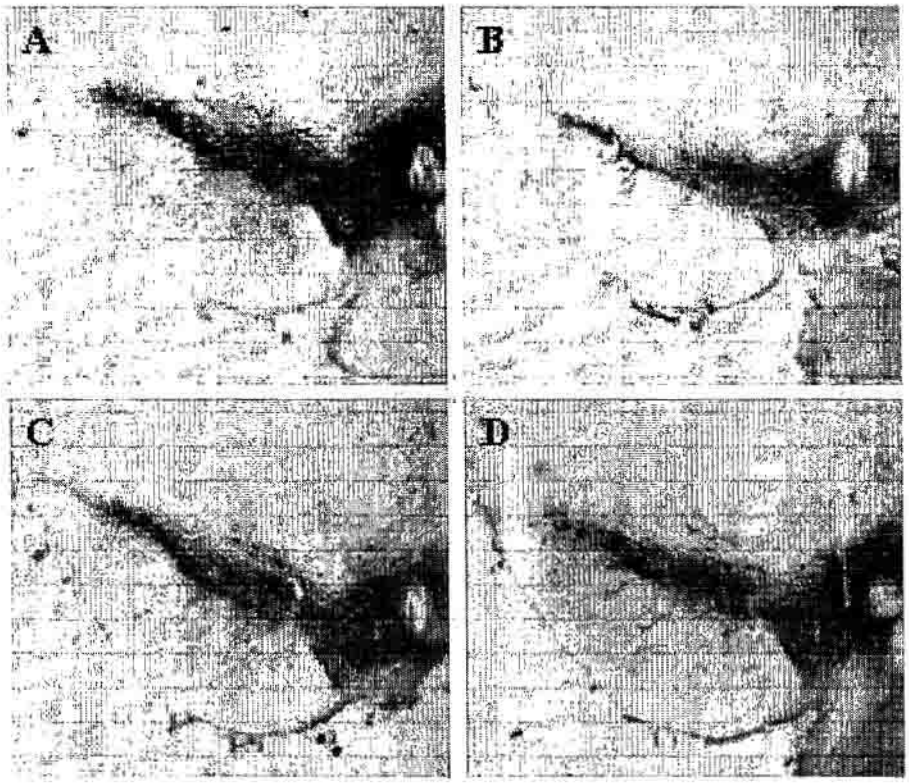


FIG. 10b

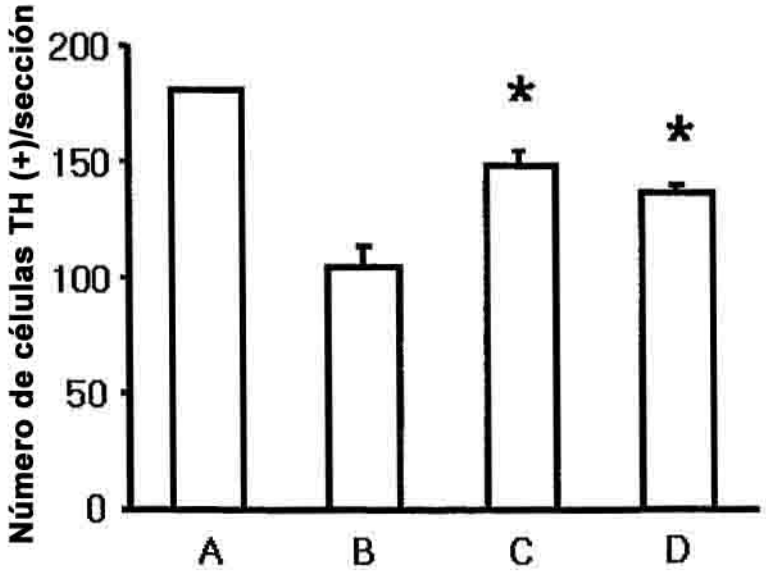


FIG. 10c

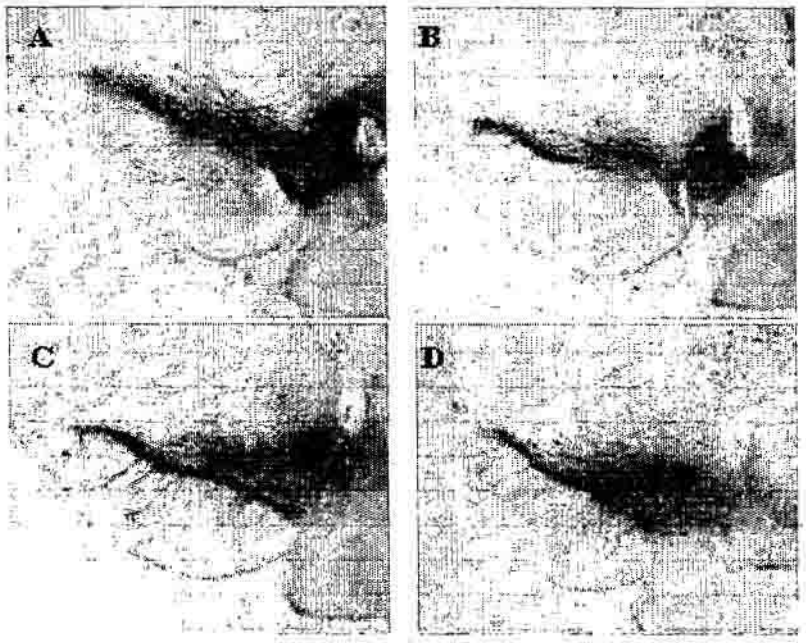
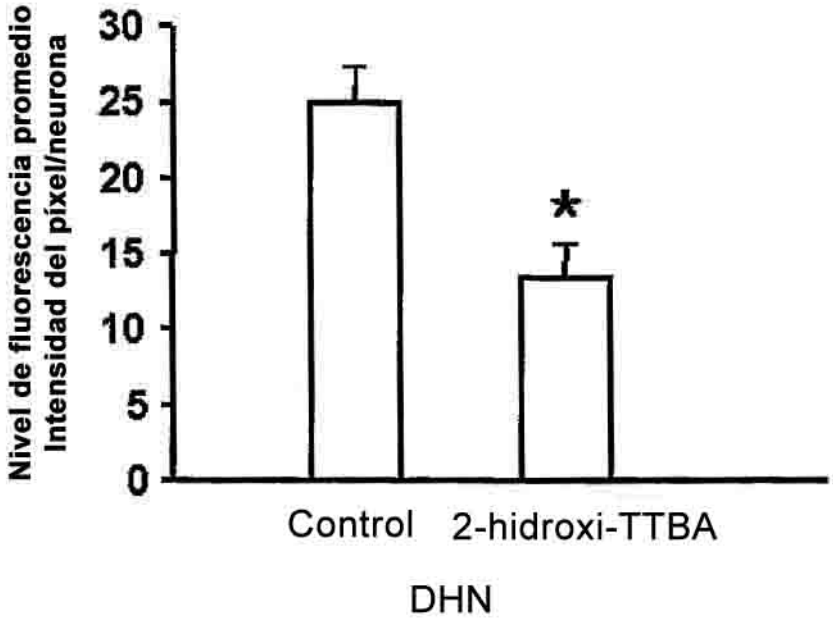



FIG. 11