

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 506**

51 Int. Cl.:

C07D 409/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2010 E 10732407 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2451806**

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

30 Prioridad:

08.07.2009 GB 0911991

09.07.2009 GB 0911925

15.07.2009 GB 0912271

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

08.06.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

MORGADES MANONELLES, Juan Antonio

ES 2 573 506 T3

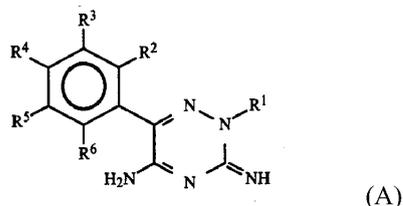
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Bloqueadores de los canales de sodio triazoicos cíclicos

- 5 La presente invención se refiere a compuestos de triazina con propiedades bloqueadoras de los canales de sodio y a usos de los compuestos para la preparación de medicamentos para el tratamiento de trastornos asociados.

La patente estadounidense núm. 4.649.139 describe compuestos de fórmula (A):



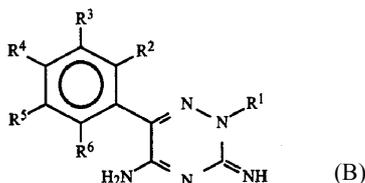
10

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

15

La solicitud de patente previa WO2008/007149 describe usos de un compuesto de fórmula (B):

20



25

30 en donde R¹ es hidrógeno (y =NH es NH₂), o carboxamido, alquilo C₁₋₁₀, alquenoilo C₂₋₁₀, alquilo C₁₋₃-arilo, alquilo C₁₋₃ heterocídilo, o cicloalquilo C₃₋₁₀, cualquiera de ellos opcionalmente sustituido con hidroxilo, carboxamido, halo-alquilo C₁₋₆, alquil C₁₋₆ o alcoxi C₁₋₆; y R² a R⁶ se seleccionan independientemente entre hidrógeno, halógeno, grupos alquilo C₁₋₆, alquenoilo, alquinilo o alcoxi (todos opcionalmente sustituidos con uno o más de halógeno, hidroxilo y arilo), amino, amino mono- o di-sustituidos, alquenoiloxi, acilo, aciloxi, ciano, nitro, arilo y alquilitio;

35

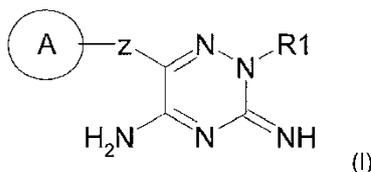
(a) como bloqueadores de los canales de sodio dependientes de voltaje para el tratamiento de trastornos en mamíferos y particularmente epilepsia, esclerosis múltiple, glaucoma y uveítis, traumatismos cerebrales e isquemias cerebrales, apoplejía, lesión en la cabeza, lesión medular, traumatismo quirúrgico,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

40

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

45

Según la presente invención se proporciona un compuesto de fórmula (I):



en donde z es un enlace sencillo y en donde A es 2,3-diclorofenil y R¹ es -CH₂CCl₃; o una de sus sales.

50

La presente invención también proporciona sales de los compuestos anteriormente mencionados. Las sales preferidas son sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables. Sales de adición de ácidos adecuadas

farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con ácidos orgánicos e inorgánicos, por ejemplo, de ácido hidrocórico, sulfúrico, cítrico, tartárico, fosfórico, láctico, pirúvico, acético, malónico, succínico, oxálico, fumárico, maleico, oxaloacético, metanosulfónico, p-toluenosulfónico, bencenosulfónico, glutámico, naftóico e isetiónico. También son adecuadas sales de etanosulfonato, malato, mandalato, benzoato y salicilato.

5 La presente invención también proporciona solvatos del compuesto de la fórmula (I) o sus sales. El compuesto o su sal puede obtenerse como solvato del solvente de reacción, solvente de cristalización o uno de sus componentes en la preparación del compuesto. Los solvatos farmacéuticamente aceptables incluyen hidratos.

10 La presente invención engloba formas tautoméricas y sus mezclas, y formas cristalinas polimórficas del compuesto de fórmula (I).

15 El compuesto de fórmula (I) y ciertos análogos pueden prepararse mediante los procedimientos descritos en la patente estadounidense 4.649.139, a la que debe hacerse referencia adicional. El compuesto de fórmula (I) y ciertos análogos también pueden prepararse según los métodos descritos en la patente europea EP 0 021 121 A, a la que debe hacerse referencia adicional.

20 La preparación del compuesto de fórmula (I) y ciertos análogos se ilustra más adelante en la presente memoria descriptiva. Pueden prepararse compuestos relacionados a partir de variaciones obvias o rutinarias de los procesos descritos, utilizando materiales de partida adecuados para introducir los sustituyentes y restos deseados de análogos del compuesto de fórmula (I).

25 Pueden obtenerse sales de los compuestos de fórmula (I) mediante la presencia de un ácido residual en el proceso preparativo. Alternativamente, pueden prepararse sales mezclando el compuesto de fórmula (I) como base libre con un ácido farmacéuticamente aceptable en un disolvente adecuado, eliminando el disolvente para recuperar la sal, o recristalizando la sal del disolvente.

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

35 El compuesto de fórmula (I) está presente en las composiciones de la presente invención en forma de dosificación unitaria efectiva, es decir, una cantidad suficiente para ser efectiva contra dichos trastornos *in vivo*.

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

45 Dichas composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía oral o parenteral, por ejemplo, como un supositorio, pomada, crema, polvo o parche transdérmico. No obstante, se prefiere la administración oral o la inyección intravenosa de las composiciones.

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

55 Para ser inyectados, los compuestos pueden presentarse en soluciones de inyección acuosas estériles que pueden contener antioxidantes o tampones.

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

Alternativamente, el compuesto activo se presenta en una forma pura en una dosificación unitaria efectiva, por ejemplo, comprimido como comprimido u otra forma similar.

65 Otros compuestos que pueden incluirse son, por ejemplo, ingredientes médicamente inertes, por ejemplo, diluyentes sólidos y líquidos tales como lactosa, almidón o fosfato de calcio para comprimidos o cápsulas; aceite de

5 oliva u oleato de etilo para cápsulas blandas; y agua o aceite vegetal para suspensiones o emulsiones; agentes lubricantes tales como talco o estearato de magnesio; agentes gelificantes tales como arcillas coloidales; agentes espesantes tales como goma tragacanto o alginato de sodio; y otros ingredientes accesorios terapéuticamente aceptables tales como humectantes, conservantes, tampones y antioxidantes que resultan útiles como portadores en dichas formulaciones.

10 Los comprimidos u otras formas de presentación proporcionados en unidades distintas pueden contener convenientemente una cantidad del compuesto de fórmula I que sea efectiva en dicha dosificación o como un múltiplo de la misma, por ejemplo, unidades que contienen de 5 mg a 500 mg, normalmente alrededor de 10 mg a 250 mg.

15 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden prepararse mezclando el compuesto de fórmula (I) con un portador farmacéuticamente aceptable. Pueden añadirse a la mezcla excipientes farmacéuticos convencionales según sea necesario. Ejemplos de formulaciones adecuadas se describen en la patente estadounidense núm. 4.649.139 anteriormente mencionada.

20 La presente invención puede usarse para el tratamiento mediante la administración de una cantidad efectiva y no tóxica del compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición tal y como se ha definido anteriormente. El método resulta especialmente adecuado para el tratamiento de trastornos en mamíferos susceptibles a los bloqueadores de los canales de sodio y antifolatos, y en particular trastornos tales como epilepsia, esclerosis múltiple, glaucoma y uveítis, traumatismos cerebrales e isquemias cerebrales, apoplejías, lesión en la cabeza, lesión medular, traumatismo quirúrgico, trastornos neurodegenerativos, trastorno de la neurona motora, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, dolor crónico inflamatorio, dolor neuropático, migraña, trastorno bipolar, trastornos del estado de ánimo, ansiedad y cognitivo, esquizofrenia y cefaleas trigémino autonómicas; para el tratamiento de cánceres en mamíferos; y para el tratamiento de la malaria.

30 La presente invención también proporciona un compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición tal y como se ha definido anteriormente, o para la preparación de un medicamento. El medicamento resulta especialmente adecuado para el tratamiento de trastornos en mamíferos susceptibles a los bloqueadores de los canales de sodio y antifolatos, y en particular trastornos tales como epilepsia, esclerosis múltiple, glaucoma y uveítis, traumatismos cerebrales e isquemias cerebrales, apoplejías, lesión en la cabeza, lesión medular, traumatismo quirúrgico, trastornos neurodegenerativos, trastorno de la neurona motora, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, dolor crónico inflamatorio, dolor neuropático, migraña, trastorno bipolar, trastornos del estado de ánimo, ansiedad y cognitivo, esquizofrenia y cefaleas trigémino autonómicas; para el tratamiento de cánceres en mamíferos; y para el tratamiento de la malaria.

35 Tal y como se ha indicado anteriormente, el compuesto de fórmula (I) es generalmente útil en el tratamiento de dichos trastornos mediante administración oral o inyección intravenosa.

40 El compuesto de fórmula (I) se administra normalmente en una dosis de 0,01 mg/kg a 20 mg/kg al día, preferiblemente 0,1 a 5,0 mg/kg al día.

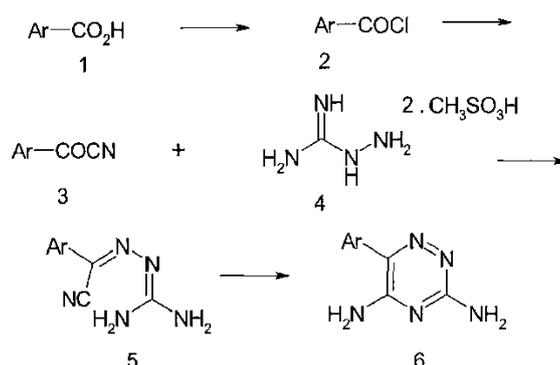
45 A la luz del uso conocido en humanos de compuestos estructuralmente similares tales como lamotrigina y otros compuestos conocidos similares a la fórmula (I) no se anticipan graves problemas de toxicidad en el uso del compuesto de fórmula (I). Sin embargo, deben realizarse procedimientos de ensayo adecuados antes de proceder con su uso clínico.

50 A continuación, se ilustrarán aspectos de la presente invención en mayor detalle en relación con los ejemplos que acompañan a la presente memoria. Todos los compuestos de los ejemplos no cubiertos por las reivindicaciones deberán entenderse como ejemplos de referencia y no forman parte de la invención.

55 Más adelante se describe la metodología para la preparación del compuesto de fórmula (I) y otros compuestos usados en los ensayos. Esta podrá adaptarse para preparar compuestos análogos con sustituyentes adicionales o alternativos o fracciones.

En los siguientes procedimientos todos los puntos de fusión están en °C.

Compuestos de 3,5-diamino-6-aryl-1,2,4-triazina



Cianuro de 3,4-dimetoxibenzoilo (3; Ar = 3,4-dimetoxifenilo)

- 5 Una mezcla bien agitada [agitador de paletas] de cloruro de 3,4 - dimetoxibenzoilo [AcrosOrganics] (14,05 g; 0,070 mol), tolueno seco (32 cm³), acetonitrilo seco (8,0 cm³), cianuro de cobre I (8,5; 0,095 mol) y Celite (5 g) se calentó a reflujo hasta que no quedó doruro ácido (~1,5 h). La mezcla de reacción oscura se enfrió a ~70° y se diluyó con tolueno (150 cm³). Tras agitarla durante ~30 minutos más, la suspensión resultante se filtró a través de un lecho de gel de sílice para cromatografía (~2,5 cm) y el filtrado amarillo pálido evaporado al vacío en un peso constante para dar el compuesto del título como sólido amarillo limón. Rendimiento = 11,41 g (85,3%), Mpt = 143-145°C. El producto se usó directamente en la siguiente etapa.

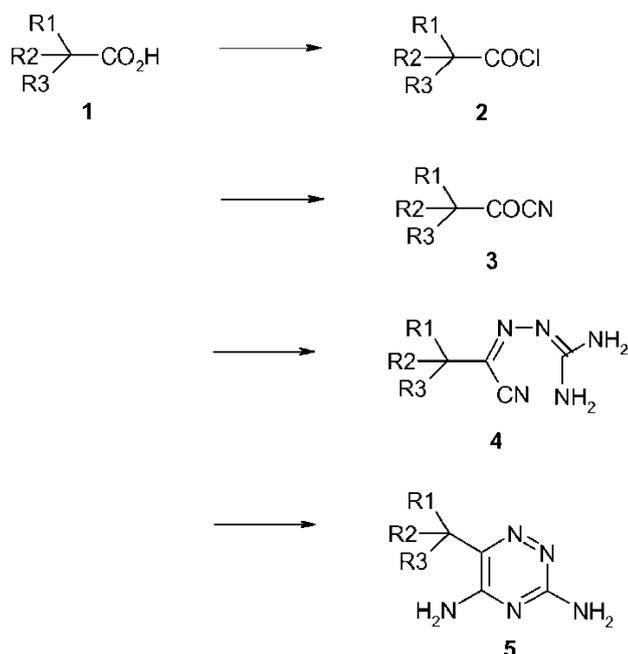
Bismesilato de aminoguanidina 4

- 15 A una solución agitada de ácido metanosulfónico [Aldrich] al 99,5% (422 g; 4,40 mol) en metanol (720 cm³) a 40° se añadió en porciones durante 30 minutos bicarbonato de aminoguanidina [Aldrich] (272,0 g; 2,00 mol). Una vez completada la adición, se agitó la solución hasta que la temperatura cayó hasta ~ 40° y a continuación se trató lentamente con éter frío (500 cm³). Durante la adición, comenzaron a depositarse agujas incoloras. La suspensión resultante se mantuvo a 0° durante 4 h, se filtró y el producto se lavó con éter frío y se secó durante la noche al vacío a 50°. Rendimiento = 528 g (99,25 %), Mpt = 149 - 150° (Bibliografía: WO/2004/026845; 147,5°)

Base de Schiff, cianohidrazona (5, Ar = 3,4-dimetoxifenilo)

- 25 A una solución agitada de bismesilato de aminoguanidina (14,0 g; 0,053 mol) en ácido metanosulfónico (22 g) al 99,5% a 65 - 70° se añadió gota a gota una solución caliente de cianuro de 3,4 - dimetoxibenzoilo (5,7 g; 0,030 mol) en acetonitrilo (30 cm³) durante ~25 minutos. La mezcla se agitó a continuación a 68° hasta que la muestra dio una solución clara en agua (~2,5 h) y a continuación se vertió sobre agua/hielo picado (125 g) dando un precipitado amarillo pálido. La mezcla agitada se neutralizó (pH 8-9) con hidróxido de sodio (19,0 cm³) al 48% dando un precipitado amarillo brillante. El producto se filtró, se lavó con agua fría y se secó al vacío a 45°. Rendimiento = 6,21 g (83,8%), Mpt = 98-100°C, TLC [placa de SiO₂, metanol al 10% en clorofomo], R_f = 0,52. El producto se utilizó directamente en la siguiente etapa.

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



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

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

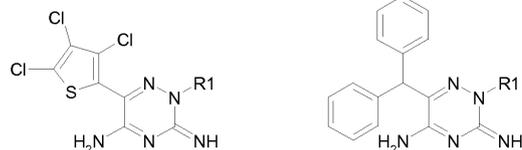
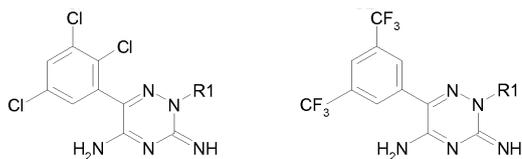
15 Cianuro de trifenilacetilo [4; R₁=R₂=R₃ = Ph]

Una mezcla bien agitada [agitador de paletas] de cloruro de trifenilacetilo (23,24 g; 0,075 mol), tolueno seco (40 cm³), acetonitrilo seco (10 cm³), cianuro de cobre I (9,20 g; 0,103 mol), Celite (3,5 g) y yoduro de potasio dividido finamente en polvo (2 g) se calentó a reflujo hasta que no quedó cloruro de ácido (~ 18 horas). La mezcla de reacción oscura se enfrió a ~75 °C y se diluyó con tolueno (150 cm³). Tras someterla a agitación durante -30 minutos adicionales, la suspensión resultante se filtró a través de un lecho de gel de sílice para cromatografía (~ 2,5 cm) y el filtrado incoloro se evaporó al vacío en un peso constante para dar el compuesto del título como un sólido incoloro. Rendimiento = 21,97 g (94,7%), Mpt = 67-69 °C. El producto se utilizó directamente en la siguiente etapa.

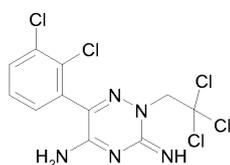
25 Base de Schiff, cianohidrazona, (4; R₁=R₂=R₃ = Ph)

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

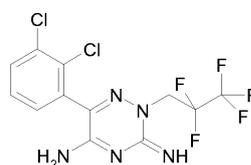
35 Compuestos de triazina



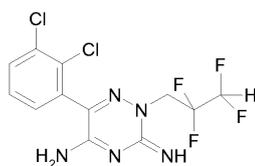
R₁ = -CH₂CCl₃
 R₁ = -CH₂CHCl₂
 R₁ = -CH₂CBr₃



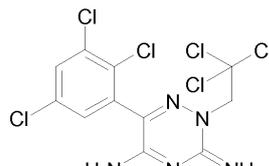
CEN-216



CEN-217

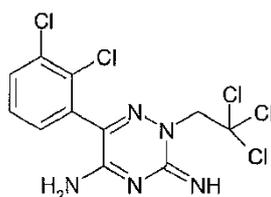


CEN-218



CEN-248

- 5 Trifluorometanosulfonato de 5(3)-amino-6-(2,3-diclorofenil)-2,3(2,5)-dihidro-3(5)-imino-2-(2,2,2-tricloroetil)-1,2,4-triazina [CEN-216]: [compuesto de la invención]



Triflato

- 10 Se agitó 3,5-diamino-6-(2,3-diclorofenil) -1,2,4-triazina (Lamotrigina) (0,9 g; 3,50 mmol), triflato de 2,2,2-tricloroetilo (1,0 g; 3,55 mmol), butan-2-ona (10 cm³) y dimetilformamida (5 gotas) a reflujo durante 25 h bajo nitrógeno. La solución se evaporó hasta quedar seca y el residuo moreno se cristalizó desde acetona para dar un polvo microcristalino. Rendimiento = 510 mg. Mpt - 236-238, tlc (metanol-dorofomo al 10%), Fr= 0,38.

- 15 Triflato de 2,2,2-tricloroetilo

Una mezcla de 2,2,2-tricloroetanol (7,5 g; 0,05 mol) y anhídrido triflico (14,1 g; 0,05 mol) se calentó a 80°C durante 60 minutos.

- 20 Tras enfriarla a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó en éter (100 cm³) y se extrajo con una solución de bicarbonato de sodio (3 x 50 cm³) al 5% helada, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó hasta quedar seco en vacío por debajo de 20 °C. Resultó un aceite incoloro. Este aceite se solidificó en reposo en prismas incoloros a 4 °C. Rendimiento = 10,91 g (77,8%) Punto de fusión 28-30°C. El producto se utilizó directamente sin más purificación.

- 25 Triflato de 2,2,-dicloroetilo

Una mezcla de 2,2-dicloroetanol (5,75 g; 0,05 mol) y anhídrido tríflico (14,1 g; 0,05 mol) se calentó a 80°C durante 60 minutos.

5 Tras enfriar la mezcla a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó en éter (100 cm³) y se extrajo con una solución de bicarbonato de sodio (3 x 50 cm³) al 5% helada, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó hasta quedar seco en vacío por debajo de 20 °C. Resultó un aceite incoloro. El producto se utiliza directamente sin más purificación.

10 Triflato de 2,2,2-bromoroetilo

Una mezcla de 2,2,2-tricloroetanol (14,15 g; 0,05 mol) y anhídrido tríflico (14,1 g; 0,05 mol) se calentó a 80 °C durante 120 minutos.

15 Tras enfriar la mezcla a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó en éter (100 cm³) y se extrajo con una solución de bicarbonato de sodio (3 x 50 cm³) al 5% helada, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó hasta quedar seco en vacío por debajo de 20 °C. Resultó un sólido incoloro. Punto de fusión 41-43 °C. El producto se utiliza directamente sin más purificación.

20 Ensayo biológico

Se testó el compuesto de Fórmula (I), y varios análogos, para analizar diversas actividades de la siguiente manera:

Estrategia de exploración

25 La estrategia de exploración está diseñada para seleccionar compuestos con actividad bloqueadora de los canales de sodio apropiada y bajo riesgo de efectos secundarios. Con este fin todos los compuestos se procesan a través de la prueba de los canales de sodio primarios (captación de [¹⁴C]guanidina provocada por veratrina en sinaptosomas de cerebro anterior de rata) y los valores de CI₅₀ se calcularon a partir de las curvas de concentración-efecto generadas. Para complementar estos datos, se miden también las CI₅₀ de compuestos seleccionados para inhibir la unión de [³H]BTX-B.

35 Estudios previos han demostrado que las triazinas sustituidas son inhibidores potenciales de la actividad de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (McCullough y Bertino 1971, Cashmore *et al.*, 1975, Booth *et al.*, 1987) y Sapse *et al.*, 1994). Los inhibidores de la DHFR (tales como Metotrexato) se han utilizado para el tratamiento de varios tipos de cáncer (Suster *et al.*, 1978 y Niculescu-Duvaz *et al.*, 1982) ya que la inhibición de esta enzima interfiere en el crecimiento celular pero debido a este efecto (en el crecimiento celular) los inhibidores de la DHFR también pueden ser teratogénicos (Skalko y Gold, 1974, Feldcamp y Carey, 1993 y Buckley *et al.*, 1997). Si se descubrieran compuestos que son potentes inhibidores de la DHFR entonces dichos compuestos pueden, ellos mismos, tener potencial como agentes anticancerígenos. Se dispone de diversos procedimientos para medir la inhibición de la actividad de la DHFR y para este estudio los investigadores han examinado los efectos de los compuestos para inhibir la unión de [³H] metotrexato (Myers *et al.*, 1975 y Rothenberg *et al.*, 1977).

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

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

55 Los bloqueadores de los canales de sodio, tales como Sipatrigina, que reduce tanto el déficit neurológico como el volumen de infarto después de la oclusión de la arteria cerebral media en ratas (Smith *et al.*, 1997) y la fenitoína, 20 (que protege a las células ganglionares retinianas de la muerte en un modelo experimental de glaucoma (Hains y Waxman, 2005) muestran eficacia neuroprotectora en una serie de modelos de degeneración del nervio. Puesto que la insuficiencia del suministro de oxígeno compromete tanto la glicosis como la fosforilación oxidativa, el daño isquémico conduce finalmente a la insuficiencia eléctrica (señales nerviosas) e insuficiencia de la bomba (restauración de los potenciales de la membrana celular). Estas insuficiencias (de actividad de la bomba eléctrica y de iones) se asocian con menores concentraciones locales de ATP (Astrup *et al.* 1981). De este modo, se utilizó el efecto de los compuestos para mantener las concentraciones de ATP en cortes de 0,4 mm del hipocampo de rata después de un ataque metabólico severo.

Procedimientos experimentales

Preparación de sinaptosomas del cerebro anterior de rata y homogeneizados

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

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

20 Se prepararon los homogeneizados mediante la transferencia del peso conocido del cerebro anterior a un tubo enfriado que contiene 9 volúmenes de 50 mM de tampón HEPES helado, pH 7,4. La mezcla se homogeneizó a 4 °C mediante ráfagas de 3 x 5 seg de un homogeneizador Ultra-Turrax™ ajustado a la velocidad máxima. El homogeneizado resultante se centrifugó a 40.000 x g (promedio) a 4 °C durante 15 min y se descartó el sobrenadante. El pellet resultante se volvió a suspender en 9 volúmenes de tampón a pH 7,4 helado (como anteriormente), se repitió la etapa de centrifugación y el pellet resultante se volvió a suspender en el tampón de unión [³H]BTX-B en una concentración de 20-25 mg de peso húmedo por ml de tampón de ensayo.

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

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

35 Flujo de [¹⁴C]guanidina:

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

40

Referencia:

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

45

Unión of [³H]BTX-B

La unión de [³H]BTX-B se realizó utilizando el procedimiento descrito por Catterall *et al.* (1981), excepto que tanto la albúmina de suero bovino como TTX se omitieron del medio de incubación.

50

Referencia:

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

55

Unión de [³H]Metotrexato

Se llevaron a cabo todos los pasos a 4° (o en hielo). El hígado de rata recién diseccionado se diseccionó en sacarosa 0,25 M helada y posteriormente se homogeneizó (U-Turrax) en 50 mM de tampón fosfato, pH 6,0 (10 ml/g de tejido) que contiene 15 mM de ditiotreitol. El homogeneizado resultante se centrifugó a 47.500 x g durante 20 min y el sobrenadante (filtrado a través de algodón hidrófilo para eliminar masas de grasa) se almacenó a -80 °C antes de su uso (Rothenberg *et al.*).

60

La inhibición de la unión de [³H]metotrexato a las fracciones de sobrenadante del homogeneizado de hígado de rata se realizó esencialmente como describen Arons *et al.*, 1975. Se calcularon los resultados, ya sea como valores de CI₅₀ (véase a continuación) obtenidos a partir de curvas de concentración-efecto o como valores de porcentaje de

65

inhibición determinados por comparación con el control y los valores de unión de metotrexato frío (concentración 25 final de 10 μM).

Referencia:

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

Cálculo de los valores de CI_{50}

Los datos se presentan como promedio \pm sem de número de experimentos indicados entre paréntesis. Los valores de IC_{50} se obtuvieron a partir del desplazamiento de radioligandos o curvas de inhibición del flujo de guanidina mediante la representación gráfica de la concentración \log_{10} frente al ligando unido/captación de guanidina según la ecuación:-

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

en donde

y = unión (dpm)

x = concentración \log_{10} del compuesto

R_{\min} = asíntota inferior (es decir, inhibición del 100%)

R_{sp} = asíntota superior - R_{\min} (es decir, unión específica)

n = pendiente (\log_e)

y

C = CI_{50} (es decir, concentración necesaria para inhibir el 50% de la unión específica)

Ensayo de cortes del hipocampo

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

Referencias:

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

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

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

Medición de ATP y proteína

Se interrumpieron los cortes individuales por ultrasonidos y los homogeneizados resultantes se centrifugaron a 10.000 x g durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante se decantó en un tubo nuevo y el sobrenadante restante se eliminó mediante aspiración al vacío. Se volvió a suspender el pellet en 0,5 ml de KOH 0,1 M por ultrasonidos y las suspensiones resultantes se calentaron con agitación suave a 37 °C durante 30 minutos.

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

La concentración de proteína se midió utilizando el ensayo de proteína BCATM (Pierce) con albúmina de suero bovino como patrón de referencia.

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

hERG:

Los compuestos se enviaron a MDS Pharma para medir su inhibición en concentración de 10 μM de la unión de [³H]astemizol a las células HEK-293 que expresan hERG recombinante humano. Suponiendo que las pendientes de unión son 1,0, se podrían calcular los valores CI_{50} (véase anteriormente) para los compuestos que presentan una inhibición de unión entre 5% y 95%.

Canales de calcio tipo L

5 Se enviaron los compuestos a MDS Pharma para medir su inhibición en concentración de 10 µM de la unión de [³H]nitrendipina a las membranas de corteza cerebral de rata. Suponiendo que las pendientes de unión son 1,0, se podrían calcular los valores de Cl₅₀ (véase anteriormente) para los compuestos que presentan una inhibición de unión entre 5% y 95%.

10 Estabilidad en microsomas de rata

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

15 Metodología MES (electroshock máximo)

Se utilizaron ratas macho Wistar proporcionadas por BioLasco Taiwán (bajo licencia tecnológica de los laboratorios Charles River). El espacio asignado para 5 animales fue 45 x 23 x 21 cm. Los animales se alojaron en jaulas y se mantuvieron a una temperatura (21 – 23 °C) y entorno de humedad (50% - 70%) controlados con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad durante al menos tres días en MDS Pharma Services – laboratorio de Taiwán antes de su utilización. A los animales se les permitió acceso libre a voluntad a alimentación de laboratorio estándar para ratas [MF-18 (Oriental Yeast Co., Ltd., Japón)] y a agua de osmosis inversa (OI). Todos los aspectos de esta etapa, incluido el alojamiento, experimentación y eliminación de los animales, se realizó de acuerdo con la Guía de cuidados y uso de animales de laboratorio (National Academy Press, Washington, D. C., 1996).

25 Los compuestos de ensayo se suspendieron/disolvieron en Tween 80 al 2% y se administraron oralmente a un volumen de dosis de 10 ml/Kg a grupos de 5 ratas macho Wistar con un peso de 180 +/-20 g, una hora antes de aplicar electroshock máximo (MES, onda sinusoidal de 60 Hz, 150 mA, 200 msec de duración) a través de electrodos corneales. Se determinó la aparición de convulsiones tónicas inducidas por electroshock máximo (MES) para cada animal. Una inhibición del 50 por ciento o más (50%) de las convulsiones tónicas producida por la sustancia de ensayo indica una actividad anticonvulsiva significativa.

Equipos/sustancias químicas:

35 Jaula para animales (Allentown, EE.UU.), generador electrónico de descargas (propio, R. O. C.), aguja para administración oral (Natsume, Japón) y báscula para ratas (500 g, Yamato, Japón). Sal de difenilhidantoína sódica (Sigma, EE.UU.) y Tween 80 (Sigma, EE.UU.).

40 Se administraron oralmente las sustancias de ensayo (CEN-216, CEN-145, CEN-148, CEN-152 y CEN-154) a razón de 14, 42 o 100 mg/kg a grupos de 5 ratas macho Wistar con un peso de 180 ±20 g.

Resultados

En la siguiente Tabla se muestran los datos de los diferentes procedimientos de ensayo:

	Flujo de [¹⁴ C]guanidina	Unión [³ H]mtx	hERG	hERG	Ca ²⁺ de tipo L	Ca ²⁺ de tipo L	Estabilidad de microsomas (humanos)
Núm, CEN	Promedio Cl ₅₀ (µM)	Cl ₅₀ (µM) % inhibición a 125 µM	% inhibición a 10 µM	Cl ₅₀ (µM) (extrapolado de inh. en 10 µM)	% inhibición a 10 µM	Cl ₅₀ (µM) (extrapolado de inh. en 10 µM)	% metabolizado (40 min incubación 37°)
1 (Ltg) 216 217 218	219,2	631(17 ± 2(4)) 11** 68*(***)	1 12 28 20	989 73,3 25,7 40,0	17 27	48,8 27,0	20 0

* 99 µM

** 198 µM

*** utiliza lote fresco de sobrenadante

Inhibición de la unión de [3H]batracotoxina a cerebro de rata (Wistar)

Los datos se presentan como % de inhibición a 10 μM y CI_{50} extrapolada (suponiendo una pendiente = 1),
 Compuestos con < 5% inhibición se atribuyen a CI_{50} de > 200 μM
 Compuestos con > 95% inhibición se atribuyen a CI_{50} de < 0,5 μM

Inhibición de la unión de [3H]BTX-B

Compuesto	% inhibición (a 10 μM)	CI_{50} extrapolada (μM)
CEN-1	-28	>200
CEN-216	42	13,8
CEN-217	105	<0,5
CEN-218	108	<0,5
CEN-248	27	27

5

Resumen del método de unión [3H]batrachotoxina – Canal de sodio 279510, Sitio 2

Fuente: Cerebro de rata Wistar
 Ligando: Batrachotoxina 5 nM [H]
 Vehículo: DMSO al 1%
 Tiempo de incubación/Temp: 60 minutos a 37 °C
 Tampón de incubación: HEPES 50 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, colina 130 mM
 Cloruro KCl 5,4 mM, MgCl 0,8 mM, glucosa 5,5 mM, LqTx 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$
 K_D : 0,052 μM^*
 Ligando no específico: veratridina 100 μM
 Bmax : proteína 0,7 pmol/mg *
 Unión específica: 77%
 Método de cuantificación: Unión de radioligandos
 Criterio de significación: \geq 50% de estimulación o inhibición máx.

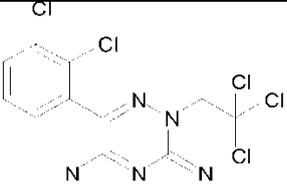
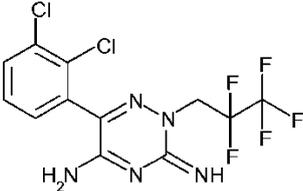
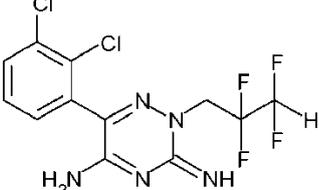
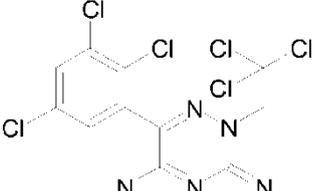
Datos de cortes de hipocampos

Compuesto estándar	Conc. (μM)	% de protección (v 1 μM TTX) (promedio \pm sem)
TTX	1	100
Lamotrigina [CEN-001]	30	41 \pm 5 (3)
DPH	30	48

10

Resultados MES de triazinas sustituidas con N-alkilo

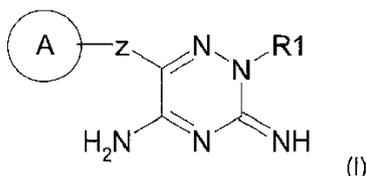
Compuesto	Dosis (mg/kg po)	Resultados (% de protección)
CEN-001 (Lamotrigina)	25	100
	10	100
	3	60
CEN-216	100	100
	30	100
	10	80
	3	0
	1	0
CEN-217	100	60
CEN-218	100	40
CEN-248	30	100
Difenilhidantoína (n = 5 ratas)	100	80

Compuesto núm.	Estructura	([3H]BTX-B) (Cl ₅₀ μ M extrapolada)	hERG ([3H]astemizol) (Cl ₅₀ μ M extrapolada)	MES rata (anticonvulsante <i>in vivo</i>) (% de protección por mg/Kg (base libre) PO)	DHFR (% de inhibición a 125 μ M)
CEN-216		20*	50*	80 a 10 (ED50 = 9 mg/Kg PO) (protección del 100% a 72 mg/Kg (base libre) PO a 1 h, 6 h y 24 h antes de MES a ratón). (es decir, larga duración de acción tras dosis PO en ratón)	27
CEN-217		< 0,5	26	60 a 100	ND
CEN-218		< 0,5	40	40 a 100	ND
CEN-248		27	ND	protección del 100% a 30	87
CEN-216 Cl ₅₀ extrapolada en ensayo de unión a calcio de tipo L (sitio de fenilalquilamina) = 27 μ M (CEN-001) Resultados de lamotrigina usando el mismo prep. de enzimas a 125 μ M dio una inhibición del 26%					

- 5 En un modelo de rata de epilepsia (MES – Electroshock Máximo), en donde los compuestos se dosificaron oralmente una hora antes del electroshock, el ED50 (dosis efectiva para proteger al 50% de las ratas contra extensión de las extremidades, etc.) de CEN-216 es aprox. 9 mg/kg de base libre.
- A 100 mg/kg de base libre en el ensayo MES anterior, CEN-217 y 218 dieron una protección del 60% y del 40% respectivamente, es decir ED50 para compuestos de (muy aprox.) 80 y 120 mg/kg de base libre respectivamente.
- 10 En un modelo de ratón de epilepsia (MES), los compuestos CEN-079 y CEN-216 se dosificaron oralmente (100 y 72 mg/kg de base libre, respectivamente) a 1 h, 6 h y 24 h antes del electroshock). Ambos compuestos mostraron una protección significativa en todos los puntos de tiempo y se observó una protección del 100 % en todos los puntos de tiempo, salvo en que a 24 h el efecto protector de CEN-079 se había reducido a un 40% de protección.
- 15 Los datos de exploración obtenidos en relación con los compuestos representativos de la invención, señalan la idoneidad de los compuestos de la fórmula general (I) para el tratamiento de trastornos en mamíferos que son susceptibles a los bloqueadores de los canales de sodio y a los antifolatos, y especialmente trastornos tales como epilepsia, esclerosis múltiple, glaucoma y uveítis, traumatismos cerebrales e isquemias cerebrales, apoplejía, lesión en la cabeza, lesión medular, traumatismo quirúrgico, trastornos neurodegenerativos, enfermedad de la neurona motora, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, dolor inflamatorio crónico, dolor neuropático, migraña, trastorno bipolar, trastornos del estado de ánimo, ansiedad y cognitivo, esquizofrenia y cefaleas trigémino autonómicas; para el tratamiento de cáncer en mamíferos; y para el tratamiento de la malaria.
- 20

REVINDICACIONES

5 1. El compuesto de fórmula I:



10 en donde z es un enlace sencillo y en donde

A es 2,3-diclorofenil y R₁ es -CH₂CCl₃;

o una de sus sales.

15 2. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o su solvato, mezclado con un portador farmacéuticamente aceptable.

20 3. Una composición farmacéutica según la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de la epilepsia, esclerosis múltiple, glaucoma y uveítis, traumatismos cerebrales e isquemias cerebrales, apoplejía, lesión en la cabeza, lesión en la médula espinal, traumatismo quirúrgico, trastornos neurodegenerativos, trastorno de la neurona motora, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, dolor crónico inflamatorio, dolor neuropático, migraña, trastorno bipolar, trastornos del estado de ánimo, ansiedad y cognitivo, esquizofrenia y cefaleas trigémino autonómicas; para su uso en el tratamiento de cánceres de mamíferos; o para su uso en el tratamiento de la malaria.

25 4. El compuesto según la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o su solvato para su uso en el tratamiento de la epilepsia, esclerosis múltiple, glaucoma y uveítis, traumatismos cerebrales e isquemias cerebrales, apoplejía, lesión en la cabeza, lesión en la médula espinal, traumatismo quirúrgico, trastornos neurodegenerativos, trastorno de la neurona motora, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, dolor crónico inflamatorio, dolor neuropático, migraña, trastorno bipolar, trastornos del estado de ánimo, ansiedad y cognitivo, esquizofrenia y cefaleas trigémino autonómicas; de cánceres en mamíferos; o de la malaria.

30 5. El compuesto según la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable o su solvato, o una composición según la reivindicación 2 o 3 para su uso en el tratamiento de la epilepsia, la esclerosis múltiple, el trastorno de la neurona motora o del dolor neuropático.

35