

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 578**

51 Int. Cl.:

C07D 307/88 (2006.01)

C07F 9/655 (2006.01)

A61K 31/365 (2006.01)

A61K 31/665 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 25/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2012 PCT/CN2012/081963**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013 WO13053287**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2012 E 12840015 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2767533**

54 Título: **Derivado de butilftalida y método de preparación y uso del mismo**

30 Prioridad:

13.10.2011 CN 201110309074

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

09.12.2016

73 Titular/es:

**SHIJIAZHUANG YILING PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
No. 238 Tianshan Street, Hi-Tech. Development District
Shijiazhuang, Hebei 050035, CN**

72 Inventor/es:

**WANG, WEI;
ZHOU, YAYAO y
LIU, YA'NAN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 593 578 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

Derivado de butilftalida y método de preparación y uso del mismo

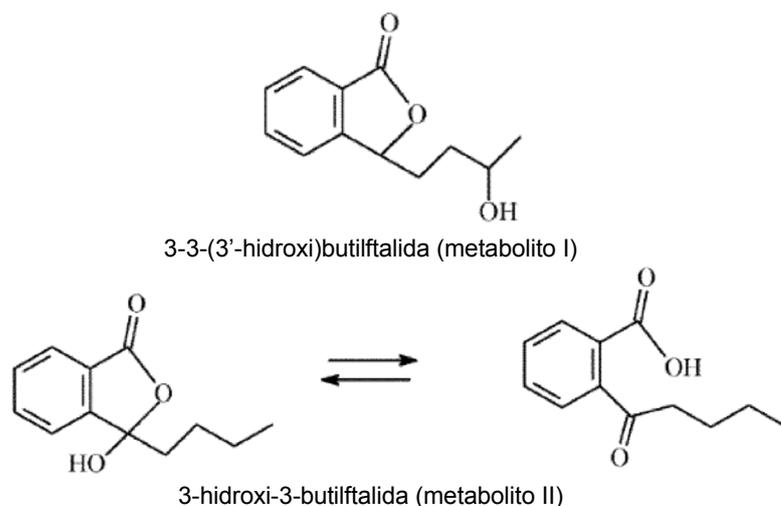
5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo médico de un compuesto, se refiere a (-)-(S)-3-(3'-hidroxi)-butilftalida y un éster formado de la misma con un ácido, y divulga el método de preparación y uso de la misma.

10 **Antecedentes de la invención**

La butilftalida tiene efectos mejoradores sobre la alteración de la función del sistema nervioso central en pacientes con ictus isquémico agudo, puede fomentar la recuperación de función en pacientes, y principalmente se convierte *in vivo* en dos metabolitos, 3-3-(3'-hidroxi)butilftalida y 3-hidroxi-3-butilftalida:

15



20

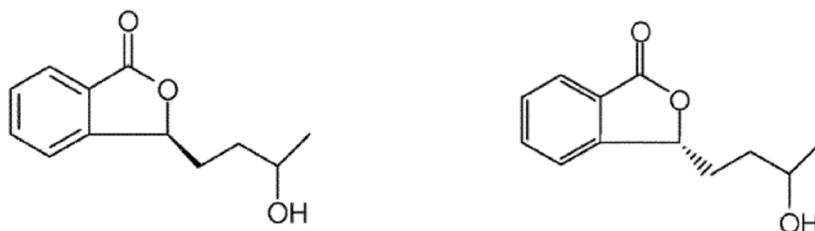
Guangdong Zhongke Drug Research & Development Co. Ltd. y Shandong Luye Natural Drug Research & Development Co. Ltd. sintetizaron un éster de ácido succínico, un éster de glicina y un éster de ácido fosfórico del metabolito I, e ilustraron el uso de los mismos para prevenir enfermedades isquémicas cerebrales en 2008. La solicitud de patente 200410036628.3 divulga un uso novedoso de los homólogos de butilftalida 3-(3'-hidroxi)butilftalida y 3-hidroxi-3-butilftalida. Se demuestra que ambos tienen los siguientes efectos:

25

- 1) mejorar significativamente los síntomas neurológicos en ratas causados por isquemia cerebral debida a traumatismo cerebral;
- 2) mejorar trastornos de memoria en ratas causados por isquemia cerebral;
- 30 3) aliviar el edema cerebral en ratas causado por isquemia cerebral;
- 4) reducir el ictus en ratas causado por isquemia cerebral;
- 5) mejorar el metabolismo de energía en ratas causado por isquemia cerebral;
- 6) aumentar el flujo sanguíneo cerebral en la región cerebral isquémica;
- 7) reducir el área de infarto cerebral en ratas con isquemia cerebral local y aliviar los síntomas de deficiencia neurológica;
- 35 8) anti-agregación de plaquetas y antitrombosis;
- 9) prevenir y tratar la demencia.

40

Investigadores en nuestra empresa descubren que el metabolito I tiene dos isómeros ópticos diferentes, y han preparado el compuesto 3-3-(3'-hidroxi)butilftalida (metabolito I) tanto en la configuración S como R como se muestra en las siguientes figuras, por un método de síntesis asimétrica:



Configuración S

Configuración R

Además, se encuentra mediante ensayos en animales que la configuración R no puede afectar el volumen de infarto cerebral en ratas con isquemia cerebral ni mejorar los síntomas de isquemia cerebral, mientras que la configuración S tiene los efectos de mejorar los síntomas de isquemia cerebral y disminuir el volumen de infarto cerebral en ratas con isquemia cerebral. También se descubre que la configuración S del metabolito I (el compuesto de la reivindicación 1) tiene el efecto de mejorar el sueño.

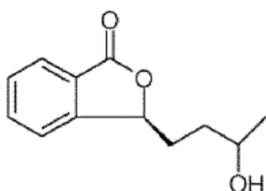
La configuración S del metabolito I (el compuesto de la reivindicación 1) es un líquido oleaginoso y es insoluble en agua. Por tanto, para prepararlo en una forma farmacéutica de solución inyectable, se han realizado estudios adicionales para permitir que se vuelva un compuesto soluble en agua formando un éster con un ácido y después formando una sal, para cumplir el requisito de la formulación.

Compendio de la invención

El fin de la presente invención es proporcionar un derivado de 3-(3'-hidroxi)butilftalida para ictus isquémico, y el método de preparación y uso del mismo.

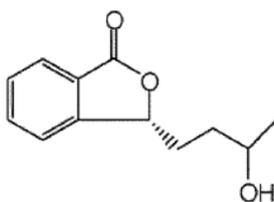
Para alcanzar el fin mencionado anteriormente, la presente invención emplea las siguientes soluciones técnicas.

Preparar el compuesto de fórmula I como se muestra en la siguiente figura,



fórmula I (configuración S),

y preparar el compuesto en la configuración R como se muestra en la siguiente figura,



configuración R,

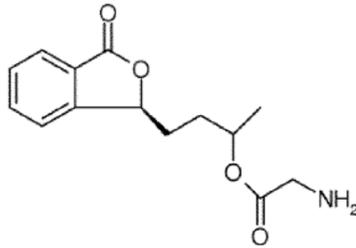
por síntesis asimétrica.

Se demuestra mediante ensayos en animales que el compuesto en la configuración R no tiene el efecto de reducir el volumen de infarto cerebral de isquemia cerebral en ratas, no puede mejorar los síntomas de isquemia cerebral, y no tiene el efecto de mejorar el sueño, mientras que la configuración S tiene muy buenos efectos de mejorar los síntomas de isquemia cerebral, y puede mejorar el estado de sueño en animales.

El compuesto de fórmula I es una sustancia aceitosa insoluble en agua. Por tanto, se le permite formar un éster con un ácido, en donde el ácido se refiere a un ácido inorgánico u orgánico farmacéuticamente aceptable. El ácido inorgánico se refiere a ácido nítrico, ácido sulfúrico o ácido fosforoso. El ácido orgánico contiene además un tipo de grupo, y al menos un grupo seleccionado de grupo amino, hidroxilo o carboxilo además del radical ácido. La sal de un éster es soluble en agua y se puede preparar en la forma farmacéutica de una solución inyectable o inyección de polvo liofilizado.

El ácido orgánico puede ser aminoácidos, específicamente se refiere a glicina, alanina, lisina, arginina, serina, fenilalanina, prolina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutámico, histidina, leucina, metionina, treonina, ácido piroglutámico, triptófano o valina.

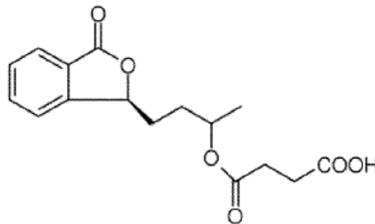
En donde un éster formado con glicina es preferido, que es como se muestra en la siguiente figura:



El ácido orgánico también puede ser un ácido dicarboxílico, específicamente ácido canfórico, ácido málico, ácido cítrico, ácido maleico, ácido succínico, ácido oxálico, ácido glutárico, ácido etanodioico o ácido malónico.

5

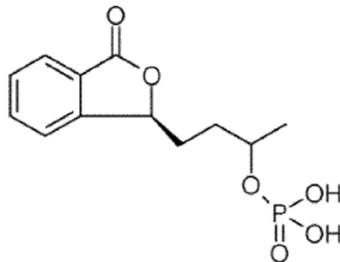
En donde un éster formado con ácido succínico es preferido, que es como se muestra en la siguiente figura:



10 El ácido orgánico también se puede referir a ácido pamoico, ácido hidroxinaftoico, ácido gentísico, ácido salicílico, ácido hidroxiacético, ácido mandélico, ácido láctico, ácido 4-acetamidobenzoico o ácido nicotínico.

El compuesto de fórmula I forma un éster con un ácido inorgánico, preferiblemente ácido fosfórico, que es como se muestra en la siguiente figura:

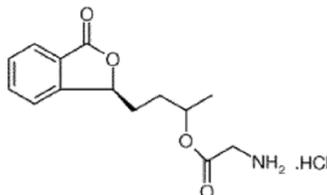
15



El éster anterior forma además una sal, de modo que se prepara en un compuesto soluble en agua para resolver el problema de la solubilidad en agua, y por tanto se puede usar para preparar una forma farmacéutica inyectable.

20

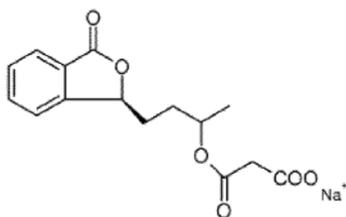
Un éster formado por el compuesto de fórmula I con glicina preferiblemente forma un clorhidrato, que es como se muestra en la siguiente figura:



25

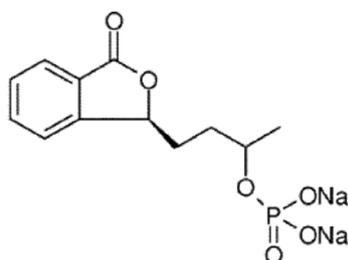
La presente invención además proporciona una sal de los ésteres de ácido dibásico del compuesto de fórmula I, que se refiere a una sal formada con potasio, sodio, magnesio o amina orgánica. El radical de amina orgánica puede ser trometamina, dietanolamina, trietanolamina, glicina, lisina o arginina.

30 En donde, la sal de sodio es preferida, que es como se muestra en la siguiente figura:



5 Para resolver el problema de la solubilidad en agua, el éster formado por el compuesto de fórmula I con ácido fosfórico puede formar además una sal con una base fisiológicamente aceptable, que se refiere a sal de sodio, sal de potasio, sal de magnesio o sal de amina orgánica. La amina orgánica incluye lisina, glicina, arginina, trometamina, dietanolamina o trietanolamina.

10 El éster formado por el compuesto de fórmula I con ácido fosfórico preferiblemente forma una sal disódica, que tiene la siguiente fórmula estructural:



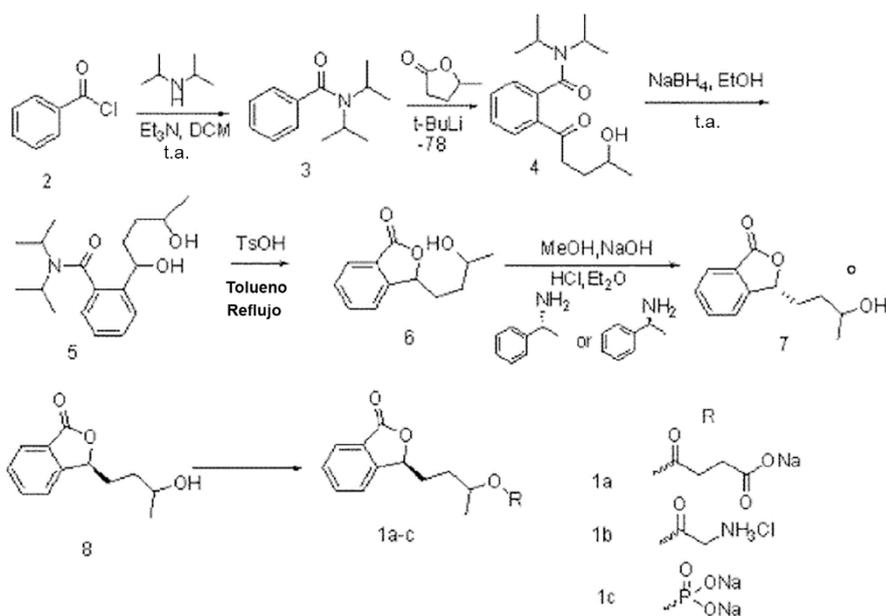
15 La presente invención proporciona además una composición farmacéutica para tratar ictus isquémico, caracterizada en que la composición comprende una cantidad terapéutica eficaz del compuesto de fórmula general (I) o una sal del mismo y un soporte farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede ser una formulación oral o una formulación inyectable.

20 Experimentos para irritaciones muscular y vascular indican que, se administra por inyección después de que el éster formado por el compuesto de fórmula I con un ácido forma además una sal. No se observaron irritaciones musculares o vasculares, de modo que se puede usar como una formulación inyectable.

Formas de realización detalladas

25 Ejemplo 1: Preparación de varios compuestos.

30 Los compuestos en el presente documento tienen una continuidad muy fuerte. Por tanto, para describir el método de preparación de varios compuestos de una manera detallada, precisa y conveniente, el método se ilustra por medio de un ejemplo. En la siguiente ruta sintética, cada compuesto se indica por un número de serie. Para una ilustración más concisa, en el método de preparación a continuación, los compuestos se sustituyen por los números de serie.



Cuando la R en el esquema anterior es diferentes grupos, se obtienen diferentes compuestos 1a, 1b y 1c.

5 (1) Síntesis del compuesto 3:

Se colocó diisopropilamina (1,3 mol) en un matraz de fondo redondo de 2000 ml, y se añadieron 1000 ml de diclorometano anhidro. Después de disolver, se añadió trietilamina (2,0 mol) y se añadió gota a gota el compuesto 2 (1,0 mol) en un baño de hielo. Después de completar la adición gota a gota, la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente, y se agitó durante la noche. Se añadieron 500 ml de diclorometano para diluir, y la mezcla de reacción se lavó respectivamente con ácido clorhídrico diluido al 5% (500 ml×1), agua (500 ml×1) y salmuera (500 ml×1), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró, para obtener 202,4 g del compuesto 3. El rendimiento crudo fue del 99%, MS (m/z): 206,1.

15 (2) Síntesis del compuesto 4:

Se disolvió el compuesto 3 (0,8 mol) en 500 ml de tetrahidrofurano seco, y se añadió gradualmente tert-butillitio (1,0 mol) gota a gota a -78°C. Después de completar la adición gota a gota, se añadió tetrametilendiamina (1,2 mol), y se agitó a -78°C durante 30 min. Se añadió gota a gota lactona (1,0 mol) en la mezcla anterior, se calentó gradualmente a temperatura ambiente, y se siguió para reaccionar durante 5 horas. La reacción se extinguió añadiendo solución de cloruro de amonio saturada, y el solvente orgánico se eliminó por destilación a presión reducida. El residuo se extrajo por acetato de etilo, se concentró a presión reducida, y se recrystalizó, para obtener 222,4 g de compuesto 4. El rendimiento fue del 91%.

25 HRMN (400Hz, CDCl₃): 8,08-8,06 (m, 1H), 8,04-8,02 (m, 1H), 7,63-7,61 (m, 1H), 7,60-7,58 (m, 1H), 3,95-3,93 (m, 2H), 3,40-3,38 (m, 1H), 2,55 (t, J=1,2 Hz, 2H), 1,64-1,62 (m, 2H), 1,25 (d, J=1,5 Hz, 12H), 1,21 (d, J=1,6 Hz, 3H); MS (m/z): 306,2.

30 (3) Síntesis del compuesto 5:

Se disolvieron 220 g del compuesto 4 (0,7 mol) en 500 ml de metanol, se añadió borohidruro de sodio (1,40 mol) en pequeños lotes en un baño de hielo, y se agitó durante la noche a temperatura ambiente con la protección de gas nitrógeno. Después de la terminación de la reacción, se añadieron gota a gota aproximadamente 20 ml de ácido clorhídrico concentrado para descomponer el exceso de borohidruro de sodio. Se eliminó el metanol por destilación a presión reducida. El residuo se extrajo por diclorometano, se lavó con agua, se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y se recrystalizó, para obtener 204,8 g del compuesto 5. El rendimiento fue del 95%. MS (m/z): 308,2.

40 (4) Síntesis del compuesto 6:

Se disolvió el compuesto 5 (0,60 mol) en 500 ml de tolueno, se añadió una cantidad catalítica de ácido p-toluenosulfónico (aproximadamente el 1%), y se hirvió ligeramente y se sometió a reflujo con la protección de gas nitrógeno durante 8 días. Se eliminó el tolueno por destilación a presión reducida, se añadió diclorometano para

diluir, y el residuo se lavó con agua, se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, y se pasó a través de una columna, para obtener 106,4 g de compuesto 6. El rendimiento fue del 86%. MS (m/z): 207,2.

(5) Síntesis del compuesto 7:

5 Se disolvió el compuesto 6 (0,2 mol) en 200 ml de metanol, se añadió solución acuosa de hidróxido de sodio (16 g/40 ml) con agitación, y se completó en 15 minutos. El sistema se calentó hasta volverse una solución homogénea, y se siguió para reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. La reacción se extinguió, y se eliminó el metanol por destilación a presión reducida. Se añadió una cantidad apropiada de agua destilada en la solución residual para diluir. El sistema se enfrió a -5°C o por debajo, y se ajustó a pH=3~4 con solución de ácido clorhídrico al 5%, y se extrajo con éter dietílico (100×3). Los extractos de éter dietílico se juntaron, y la solución se enfrió a -5°C o por debajo. Se añadieron lentamente 0,2 moles de (+)-(R)- α -feniletilamina gota a gota. El sistema se mantuvo a una temperatura de -5°C o por debajo, y se dejó reposar durante 3 horas. Precipitaron muchos cristales, y el sistema se filtró para recoger los cristales. Los cristales se recrystalizaron dos veces con acetona o acetato de etilo para obtener 20,3 g de cristales, y la concentración de los cristales fue 15 g de cristales/100 ml de solvente. Los cristales se disolvieron en 10 volúmenes de agua destilada, y se añadió hidróxido de sodio para ajustar la solución a pH=13. Se recuperó la (+)-(R)- α -feniletilamina por extracción con éter dietílico, y la fase acuosa se ajustó a pH=2 con ácido clorhídrico, se extrajo con éter dietílico, se secó y se concentró, para obtener un producto crudo de (+)-(R)-3-(3'-hidroxi)butilftalida. El producto crudo se recrystalizó con etanol para obtener 8,7 g del compuesto 7. El rendimiento fue del 21%. $[\alpha]_D = +66,80$ (c=1,02, CH₃OH).

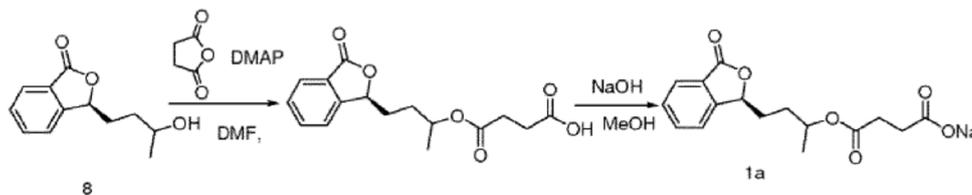
HRMN (400Hz, CDCl₃): 7,91-7,89 (m, 1H), 7,41-7,39 (m, 1H), 7,33-7,31 (m, 1H), 7,30-7,28 (m, 1H), 5,24 (t, J=1,2 Hz, 1H), 3,40-3,38 (m, 1H), 2,55 (t, J=1,2 Hz, 2H), 2,05-2,03 (m, 2H), 1,45-1,43 (m, 2H), 1,21 (d, J=1,6 Hz, 3H); MS (m/z): 207,2.

(6) Síntesis del compuesto 8:

30 Se disolvió el compuesto 6 (0,2 mol) en 200 ml de metanol, se añadió solución acuosa de hidróxido de sodio (16 g/40 ml) con agitación, y se completó en 15 minutos. El sistema se calentó hasta volverse una solución homogénea, y se siguió para reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. La reacción se extinguió, y se eliminó el metanol por destilación a presión reducida. Se añadió una cantidad apropiada de agua destilada en la solución residual para diluir. El sistema se enfrió a -5°C o por debajo, y se ajustó a pH=3~4 con solución de ácido clorhídrico al 5%, y se extrajo con éter dietílico (100×3). Los extractos de éter dietílico se juntaron, y la solución se enfrió a -5°C o por debajo. Se añadieron lentamente 0,2 moles de (S)- α -feniletilamina gota a gota. El sistema se mantuvo a una temperatura de -5°C o por debajo, y se dejó reposar durante 3 horas. Precipitaron muchos cristales, y el sistema se filtró para recoger los cristales. Los cristales se recrystalizaron dos veces con acetona o acetato de etilo para obtener 20,3 g de cristales, y la concentración de los cristales fue 15 g de cristales/100 ml de solvente. Los cristales se disolvieron en 10 volúmenes de agua destilada, y se añadió hidróxido de sodio para ajustar la solución a pH=13. Se recuperó la (S)- α -feniletilamina por extracción con éter dietílico, y la fase acuosa se ajustó a pH=2 con ácido clorhídrico, se extrajo con éter dietílico, se secó y se concentró, para obtener un producto crudo de (S)-3-(3'-hidroxi)butilftalida. El producto crudo se recrystalizó para obtener 8,7 g del compuesto 7. El rendimiento fue del 21%. $[\alpha]_D = -66,80$ (c=1,02, CH₃OH).

45 HRMN (400Hz, CDCl₃): 7,91-7,89 (m, 1H), 7,41-7,39 (m, 1H), 7,33-7,31 (m, 1H), 7,30-7,28 (m, 1H), 5,24 (t, J=1,2 Hz, 1H), 3,40-3,38 (m, 1H), 2,55 (t, J=1,2 Hz, 2H), 2,05-2,03 (m, 2H), 1,45-1,43 (m, 2H), 1,21 (d, J=1,6 Hz, 3H); MS (m/z): 207,2.

(7) Síntesis del compuesto 1a:



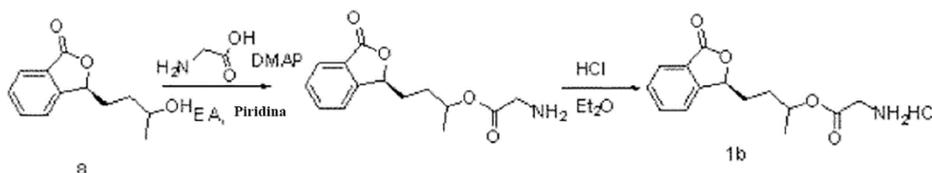
50 Se disolvieron 10,0 mmoles de compuesto 8, 10,0 mmoles de anhídrido butanodioico, y 10 mmoles de DMAP en 50 ml de DMF, se calentó a 85°C, y se hizo reaccionar durante 6 horas. La reacción se extinguió, y el 00 se echó sobre 200 ml de agua helada, se ajustó a pH=2~3 con ácido clorhídrico 0,1 N, y se extrajo con acetato de etilo (100 ml×3).
55 La fase orgánica se juntó, se lavó con salmuera tres veces, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se destiló a presión reducida para obtener (S)-3-(3'-éster succinato)butilftalida, que se recrystalizó para obtener 2,8 g de polvos sólidos. El rendimiento fue del 91%.

HRMN (400Hz, CDCl₃): 7,8-7,78 (m, 1H), 7,65-7,63 (m, 1H), 7,49-7,47 (m, 1H), 7,44-7,42 (m, 1H), 5,50-5,46 (m, 1H), 3,82-3,74 (m, 1H), 2,72-2,66 (m, 2H), 2,62-2,56 (m, 2H), 2,05-2,03 (m, 2H), 1,45-1,43 (m, 2H), 1,21 (d, J=1,6 Hz, 3H); MS (m/z): 307,3.

- 5 El anterior (S)-3-(3'-éster succinato)butilftalida se disolvió en 50 ml de metanol y 4 ml de solución de hidróxido de sodio al 10%, se calentó a reflujo durante 2 horas, y se concentró para obtener una sal de sodio de (S)-3-(3'-éster succinato)butilftalida (compuesto 1a), MS (m/z): 305,3.

(8) Síntesis del compuesto 1 b:

10



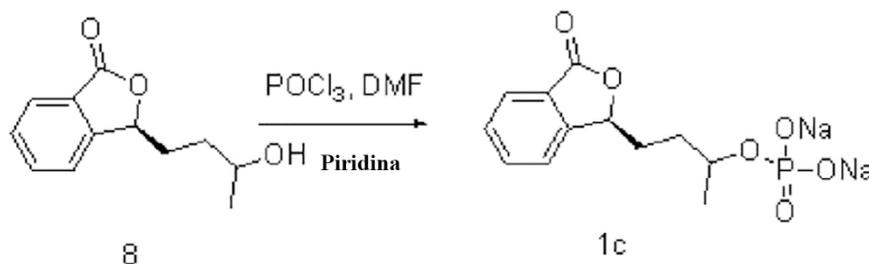
15 Se disolvieron 10,0 mmoles del compuesto 8 en 50 ml de acetato de etilo, y se añadieron 1,0 ml de piridina y 10 mmoles de DMAP. La mezcla se enfrió a 0~5°C, y se añadieron 10,0 mmoles de glicina con agitación, y se hizo reaccionar durante 6 horas a una temperatura mantenida a 0~5°C. La reacción se extinguió, y la solución de reacción se echó sobre 100 ml de agua helada, se ajustó a pH=7,0 con ácido clorhídrico 0,1 N, y se dejó reposar para separar la fase orgánica. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (50 ml×3). La fase orgánica se juntó, se lavó con salmuera 3 veces, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se destiló a presión reducida para obtener (S)-3-(3'-éster glicinato)butilftalida, que se recristalizó de etanol para obtener 2,3 g de polvo sólido. El rendimiento fue del 87%.

20

HRMN (400Hz, CDCl₃): 7,8-7,78 (m, 1H), 7,65-7,63 (m, 1H), 7,49-7,47 (m, 1H), 7,44-7,42 (m, 1H), 5,50-5,46 (m, 1H), 3,82-3,74 (m, 1H), 3,62 (s, 2H), 2,05-2,03 (m, 2H), 1,45-1,43 (m, 2H), 1,21 (d, J=1,6 Hz, 3H); MS (m/z): 264,3.

- 25 El anterior (S)-3-(3'-éster glicinato)butilftalida se disolvió en 50 ml de acetona y 10 ml de éter dietílico, y se añadió gota a gota una solución de en éter dietílico de clorhidrato para ajustar a pH=2. Precipitó mucho sólido blanco, se filtró, se secó para obtener 2,4 g de clorhidrato de (S)-3-(3'-éster glicinato)butilftalida (compuesto 1b). El rendimiento fue del 80%. MS (m/z): 264,3.

30 (9) Síntesis del compuesto 1c:



35 Se añadieron 20,0 ml de piridina a 100 ml de DMF, se enfrió a -10°C, y se añadieron 25,0 ml de oxicluro de fósforo con agitación. La mezcla se agitó durante 30 minutos, y se después se añadieron 10,0 mmoles del compuesto 8 en lotes. Después de agitar durante 3 horas, la reacción se extinguió. La solución de reacción se echó en 100 ml de agua helada, se ajustó a pH=2 con ácido clorhídrico 0,1 N, se extrajo con acetato de etilo (50 ml×3). La fase orgánica se juntó, se lavó con salmuera 3 veces, se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El solvente se eliminó por destilación a presión reducida para obtener (S)-3-(3'-éster fosfato)butilftalida. Después se disolvió en 20 ml de etanol, y se añadieron 10,6 de carbonato de sodio para reaccionar durante 2 horas a una temperatura de 30°C. La reacción se extinguió, y se añadieron 100 ml de acetona. La mezcla se dejó reposar y precipitar a 5°C, se filtró, se secó al vacío para obtener 2,8 g de sal disódica de (S)-3-(3'-éster fosfato)butilftalida (compuesto 1c). El rendimiento fue del 88%.

40

- 45 HRMN (400Hz, CDCl₃): 7,91-7,89 (m, 1H), 7,41-7,39 (m, 1H), 7,33-7,31 (m, 1H), 7,30-7,28 (m, 1H), 5,24 (t, J=1,2 Hz, 1H), 3,40-3,38 (m, 1H), 2,05-2,03 (m, 2H), 1,65-1,63 (m, 2H), 1,21 (d, J=1,6 Hz, 3H); MS (m/z): 331,2.

Ejemplo 2: Preparación de polvo liofilizado de (-)-(S)-3-(3'-éster fosfato disódico)butilftalida (compuesto 1c en el ejemplo 1) inyectable

50

5 Se tomaron 10 g de la sal sódica de (S)-3-(3'-éster fosfato)butilftalida (compuesto 1c) preparada, y se añadieron 1000 ml de agua para inyección para disolver, y se añadieron además 60 g de manitol. Después de disolver por completo, se añadió adicionalmente agua para inyección hasta 1200 ml. Después de la descarburación por carbón activo, la mezcla se filtró a través de una membrana microporosa, se hicieron alícuotas en botellas de penicilina de 7 ml con 3 ml para cada botella, se cerraron con tapón, liofilizaron y se empaquetaron, para obtener el polvo inyectable liofilizado. especificación: 20 mg/botella.

Ejemplo 3: Preparación de cápsulas de (S)-3-(3'-éster fosfato disódico)butilftalida (compuesto 1c)

10	Fórmula: sal sódica de (S)-3-(3'-éster fosfato)butilftalida	60 g
	lactosa	105 g
		1000 cápsulas

15 Se pesó de forma precisa la sal sódica de (S)-3-(3'-éster fosfato)butilftalida según la cantidad en la fórmula, se cribó a través de un cedazo de malla 100, y se añadió la lactosa según la cantidad de la fórmula, que se secó a 80°C y se cribó a través de un cedazo de malla 80, se mezcló homogéneamente. La mezcla se detectó para los contenidos, y se cargó en cubiertas de cápsulas 1# si eran aptas, para obtener las cápsulas.

Ejemplo 4: Preparación de solución inyectable de (S)-3-(3'-éster fosfato disódico)butilftalida (compuesto 1c)

20	Fórmula: sal sódica de (S)-3-(3'-éster fosfato)butilftalida	50 g
	agua para inyección	4000 ml
		1000 ampollas

25 Se pesó de forma precisa la sal sódica de (S)-3-(3'-éster fosfato)butilftalida (compuesto 1c) según la cantidad en la fórmula, y se añadió una cantidad apropiada de agua para inyección. El pH se ajustó a 6,5-7,2, y se añadió agua para inyección hasta 4000 ml. Se añadieron 2 g de carbón activado para inyección, se hirvió durante 15 min, se descarburó a través de filtración por succión. La solución final se filtró a través de membrana microporosa de 0,22 µm, se cargó y selló en ampollas de vidrio, y se autoclavó a 115°C durante 30 min, para obtener la solución inyectable.

Ejemplo 5: Efectos sobre volúmenes de infarto cerebral en ratas con infarto cerebral local

35 (1) Materiales experimentales y método

Se criaron por separado ratas Wistar, peso corporal 250~280 g, antes y después de la operación quirúrgica, y se mantuvieron a temperatura ambiente de 23~25°C. A todas las ratas se les dejó acceso libre a alimento y agua. Se prepararon modelos de tMCAO según el método de llonga, *et al.* Se anestesiaron ratas con hidrato de cloral al 10% (350 mg/kg, i.p.), y la temperatura del cuerpo se mantuvo a 37±0,5°C. La rata se fijó en posición supina en una mesa de operaciones. La piel se cortó a lo largo de la línea media del cuello, y la arteria carótida común (ACC), arteria carótida externa (ACE) y arteria carótida interna (ACI) en el lado derecho se aislaron cuidadosamente. La ACE se ligó y cortó, y se enderezó en línea con la ACI. Se cortó una pequeña incisión en la ACE, y se insertó un hilo de nailon salicificado de cabeza redonda de 4,0 cm de longitud a través de esta incisión en la ACI durante aproximadamente 1,85~2,0 cm, hasta el sitio de inicio de la arteria cerebral anterior de la rata, para bloquear el suministro de sangre de la arteria cerebral media. Después de 2 horas de isquemia, el hilo de nailon se retiró cuidadosamente, la incisión en la ACE se ligó, y la incisión quirúrgica se suturó. El animal se devolvió a la jaula durante 24 horas de reperfusión.

50 (2) Grupos experimentales y administración

Las ratas se dividieron al azar en 12 grupos: grupo control modelo, agua para inyección (100 mg/kg), el grupo de administración del compuesto 7 en el ejemplo 1 (25, 50, 100 mg/kg), el grupo de administración del compuesto 8 en el ejemplo 1 (25, 50, 100 mg/kg), el grupo de administración de DL-3-(3'-hidroxi)-butilftalida (DL para abreviar) (25, 50, 100 mg/kg). Se les administró por vía oral 10 min después de la isquemia causada por bloqueo de la ACM.

55 (3) Determinación del volumen de infarto cerebral

60 Después de la reperfusión de la lesión en la rata durante 24 horas, la rata se decapitó y el cerebro se sacó inmediatamente. El aparato olfativo, el cerebelo y el tallo encefálico inferior se retiraron. El cerebro se cortó coronalmente en 6 secciones (de la primera sección a la quinta sección era 2 mm/sección, y la sexta sección era 4 mm), y se colocaron rápidamente en 5 ml de solución que contenía 1,5 ml de TTC al 4% y K₂HPO₄ 1 M para teñir (37°C, protegido de la luz) durante 20~30 min, en donde se dieron la vuelta una vez cada 5 min. Después de la tinción con TTC, el tejido normal estaba teñido oscuro y aparecía rojo, y el tejido infartado aparecía blanco. Cada grupo de secciones de cerebro se organizaron esmeradamente y se tomaron fotos para conservación. El área

infartada en cada sección se calculó, y por último se convirtió al volumen de infarto por superposición. El volumen de infarto se expresó en porcentaje en un hemisferio cerebral, para eliminar los efectos de edema cerebral.

5 Volumen de infarto cerebral (%) = (volumen del hemisferio contralateral al lado operado – volumen de la parte no infartada del hemisferio operado) / volumen del hemisferio contralateral al lado operado * 100%

(4) Resultados experimentales

10 Después de 2 horas de isquemia y 24 horas de reperfusión, el volumen de infarto cerebral del grupo control solvente fue del 33,8%. El grupo quirúrgico de referencia no tuvo ningún infarto cerebral. Los resultados del volumen de infarto cerebral en otros grupos son como se muestra en la tabla 1:

Tabla 1: Efectos de la administración nasofaríngea en el volumen de infarto cerebral en ratas con isquemia local

Muestra	Volumen de infarto cerebral (grupo de 25 mg/kg)	Volumen de infarto cerebral (grupo de 50 mg/kg)	Volumen de infarto cerebral (grupo de 100 mg/kg)
Compuesto 7	19,8%	18,9%	18,7%
Compuesto 8	14,6%	13,8%	11,8%
DL	17,2%	16,4%	14,5%
Grupo control			20,1%

15 En comparación con el grupo control de solvente, la administración oral en grupos de compuesto 8 y DL-3-(3'-hidroxi)-butilftalida puede reducir significativamente el volumen de infarto cerebral, y los grupos de compuesto 7 no redujeron eficazmente el volumen de infarto cerebral. Los grupos de (-)-3-(3'-hidroxi)-butilftalida (es decir, el compuesto 8) son superiores a DL-3-(3'-hidroxi)-butilftalida, lo que indica que el compuesto 8 en la configuración S era el principio activo eficaz, mientras que no se encontró que el compuesto 7 en la configuración R tuviera el efecto de reducir el volumen de infarto cerebral causado por isquemia cerebral.

Ejemplo 12: Efectos de administración por inyección de 1a, 1b, 1c en el volumen de infarto cerebral.

25 (1) Grupos experimentales y administración

30 Se tomaron ratas del modelo de bloqueo de isquemia en el ejemplo 11, y se dividieron aleatoriamente en 12 grupos: grupo quirúrgico de referencia, grupo control modelo, (agua para inyección, 10 mg/kg), grupo 1a (2,5 mg/kg, 5,0 mg/kg, 10 mg/kg), grupo 1b (2,5 mg/kg, 5,0 mg/kg, 10 mg/kg), y grupo 1c (2,5 mg/kg, 5,0 mg/kg, 10 mg/kg). 10 min después de la isquemia causada por bloqueo de la ACM, se les administró por vía intravenosa.

(2) Resultados y discusión

35 Después de 2 horas de isquemia y 24 horas de reperfusión, el volumen de infarto cerebral del grupo control solvente era del 33,6%. El grupo quirúrgico de referencia no tuvo ningún infarto cerebral. En comparación con el grupo control solvente, cada uno de los grupos puede reducir significativamente el volumen de infarto cerebral. En comparación con el grupo control solvente, todos los grupos de muestras pueden reducir significativamente el volumen de infarto cerebral, como se muestra en la tabla 2.

40 Tabla 2: Efectos de la administración intravenosa de la sal del éster de MI en el volumen de infarto cerebral en ratas con isquemia local

Muestra	Volumen de infarto cerebral (grupo de 2,5 mg/kg)	Volumen de infarto cerebral (grupo de 5,0 mg/kg)	Volumen de infarto cerebral (grupo de 10,0 mg/kg)
1a	21%	15,4%	11,8%
1b	21,3%	16,0%	12,0%
1c	20,6%	15,8%	11,7%
Grupo control			33,6%

45 Ejemplo 13: Experimentos para irritación vascular de 1a, 1b, y 1c

1) Diseño de experimentos

50 Se tomaron 1a, 1b, y 1c y se disolvieron en agua para inyección, y se prepararon respectivamente en dos grupos de concentraciones. El grupo de alta concentración: 4,2 mg/ml, y el grupo de baja concentración: 1,4 mg/ml. Se administraron por vía intravenosa a través de venas auriculares de conejo, y la dosis fue 5 ml.

2) Método de administración

Se seleccionaron 8 conejos New Zealand sanos, y el fármaco de prueba en alta concentración y baja concentración se inyectó respectivamente en la vena auricular de la oreja izquierda de los conejos, mientras que un volumen igual de una solución inyectable de cloruro de sodio se inyectó en la vena auricular de la oreja derecha de los conejos. A los 8 conejos se les administró sucesivamente el fármaco de prueba en alta concentración y baja concentración, y después se les administró respectivamente solución inyectable al 0,9% de cloruro de sodio. Esto se realiza una vez cada día durante 3 días consecutivos. Los conejos se pesaron respectivamente antes de la administración, y 48 horas y 14 días después de la administración.

3) Observaciones generales y muestreo en animales

Las reacciones de los animales y el sitio de inyección del vaso sanguíneo se observaron y registraron antes de la administración cada día. 48 horas después de la última administración, 2 conejos New Zealand administrados respectivamente con alta concentración y baja concentración se ejecutaron por sangría. Las reacciones de los tejidos del vaso sanguíneo se observaron visualmente y se registraron, después ambas orejas de los conejos se cortaron desde las raíces de la oreja (primero la oreja izquierda, después la oreja derecha, y se marcaron). A continuación, una sección de muestra de la oreja del conejo se cortó respectivamente, y se fijó en solución al 10% de formaldehído neutro (la muestra tenía 8 cm de longitud y 1 cm de ancho; la incisión en el extremo distal hacia el corazón estaba aproximadamente a 0,5 cm del primer pinchazo, y la incisión en el extremo proximal hacia el corazón estaba aproximadamente a 2 cm del tercer pinchazo, y el extremo proximal hacia el corazón era el extremo para colgar). Se dejaron 2 animales administrados respectivamente con el fármaco de prueba en alta concentración y baja concentración para observación adicional hasta el día 14 después de la última administración, y se realizaron exámenes patológicos.

Desde el límite del primer pinchazo, se cortó una sección en el extremo distal; y desde el límite del tercer pinchazo, se cortaron dos secciones en el extremo proximal; el vaso sanguíneo se cortó transversalmente al preparar las secciones. La preparación de secciones se realizó con parafina convencional, y el espesor de la sección fue 4~5 µm. La tinción con H-E se realizó antes de realizar el examen histopatológico.

5) Juicio del resultado

Se realizó un juicio exhaustivo según la observación visual y examen patológico. Las reacciones del sitio de inyección del vaso sanguíneo del animal se observaron visualmente y registraron antes de la administración cada día. Durante la administración, se observó visualmente que el lado interno y el lado externo de la epidermis vascular en el sitio de inyección de la oreja del conejo en el lado de la administración y el lado control en algunos de los animales administrados con el fármaco de prueba a alta concentración y baja concentración aparecía rojo, con un área desde 0,1 cm × 0,2 cm hasta 0,2 cm × 1,0 cm. 48 horas después de la última administración, el perfil vascular del vaso sanguíneo de la oreja del conejo en ambos lados de 4 conejos administrados con el fármaco de prueba a alta concentración y baja concentración era claro, y el espesor de la oreja del conejo era uniforme, y no se observó cambio significativo. 14 días después de la última administración, se realizó la necropsia en 4 conejos administrados con el fármaco de prueba a alta concentración y baja concentración. El perfil vascular de la oreja del conejo en ambos lados era relativamente claro, y el espesor de la oreja del conejo era uniforme, y no se observó cambio significativo.

Se realizó la necropsia en 4 conejos administrados con el fármaco de prueba a alta concentración y baja concentración 40 horas después de la última administración, y la necropsia de los otros 4 conejos administrados con el fármaco de prueba a alta concentración y baja concentración se realizó al final de las 2 semanas de periodo de recuperación. No se observó reacción de irritación significativa tal como degeneración y necrosis en tejidos vasculares en ninguno de los exámenes histopatológicos.

Ejemplo 13: Efectos del compuesto 7, compuesto 8 y DL-3-(3'-hidroxi)-butilftalida en el sueño de ratas

Experimentos para mejorar el sueño

Propiedades de las muestras: los contenidos en la formulación en cápsula del compuesto 7 y el compuesto 8 de la presente invención son partículas marrones.

Fuente de animales: ratones Kunming, 18~22 g, machos, eran animales de grado limpio proporcionados por Guandong Medical Lab Animal Center. En la sala de cría de los animales experimentales, la temperatura era 22±2°C, la humedad relativa era del 55~70%, y el pienso animal estaba suministrado por Guandong Medical Lab Animal Center.

Se asignaron 3 grupos de compuesto 7, compuesto 8 y DL-3-(3'-hidroxi)-butilftalida (DL para abreviar) en los experimentos, 25 mg/kg, respectivamente. Y se asignó además un grupo control de agua destilada.

Procesamiento de muestras: Se tomaron 25 mg de la muestra respectiva, y se añadió agua destilada hasta 20 ml, para formar una suspensión uniforme, para uso en la prueba.

Ruta para administración: alimentación nasogástrica.

Método experimental:

5

Prueba de hipnosis de pentobarbital sódico en dosis por encima del umbral:

10

Se seleccionaron 40 ratones macho con un peso corporal de 18~22 g y se dividieron aleatoriamente en 4 grupos, 10 ratones en cada grupo. Se les administró consecutivamente con muestras durante 30 días, y 15 min después de la administración de las muestras por alimentación nasogástrica el día 30, cada grupo de animales se inyectaron i.p. con 50 mg/kg de peso corporal de pentobarbital sódico, y la cantidad de inyección fue 0,2 ml/20 g de peso corporal. El criterio para juzgar quedarse dormido era que el reflejo de enderezamiento en un ratón desaparecía durante 1 min o más. El tiempo para quedarse dormido y el tiempo de sueño de cada grupo de animales en 60 min se observó después de la administración de pentobarbital sódico.

15

Resultados:

Efectos de las muestras en el peso corporal de los animales

Grupo	Número de animales	Peso corporal (g)		
		Inicio de la prueba	Intermedio de la prueba	Final de la prueba
Grupo control	20	20±1,4	27±1,6	35±2,0
Grupo de compuesto 7	20	20±1,5	27±1,3	35±1,6
Grupo de compuesto 8	20	20±1,3	27±1,6	35±2,3
Grupo de DL	20	20±1,2	27±1,2	35±2,4

20

Como se muestra en la tabla anterior, en comparación con el grupo control, los pesos corporales de los animales en cada grupo de dosis no tenían diferencia significativa.

Efectos sobre el tiempo de sueño en ratones inducidos por pentobarbital sódico en dosis por encima del umbral

Grupo de dosis	Número de animales	Tiempo para quedarse dormido (min)	Tiempo de sueño (min)
Grupo control	10	5,79±2,05	40,96±8,16
Grupo de compuesto 7	10	5,78±1,88	41,16±7,80
Grupo de compuesto 8	10	3,91±0,99*	53,28±11,12*
Grupo de DL	10	4,68±1,35	45,48±11,13

*P<0,05, comparado con el grupo control (por ANOVA)

25

Como se muestra en la tabla anterior, en comparación con el grupo control, el tiempo para quedarse dormido y el tiempo de sueño de los animales inducidos por pentobarbital sódico en dosis por encima del umbral en el grupo del compuesto 8 ((-)-S)-3-(3'-hidroxi)-butilftalida) tienen diferencia significativa.

30

Prueba de hipnosis de pentobarbital sódico en dosis por debajo del umbral:

35

Se seleccionaron 40 ratones macho con un peso corporal de 18~22 g y se dividieron aleatoriamente en 4 grupos, 10 ratones en cada grupo. Se les administró consecutivamente con muestras durante 28 días, y 15 min después de la administración de las muestras por alimentación nasogástrica el día 30, cada grupo de animales se inyectaron i.p. con 30 mg/kg de peso corporal de pentobarbital sódico, y la cantidad de inyección fue 0,2 ml/20 g de peso corporal. El criterio para juzgar quedarse dormido era que el reflejo de enderezamiento en un ratón desaparecía durante 1 min o más. El tiempo para la aparición del sueño de cada grupo de animales en 25 min se observó después de la administración de pentobarbital sódico.

40

Resultados:

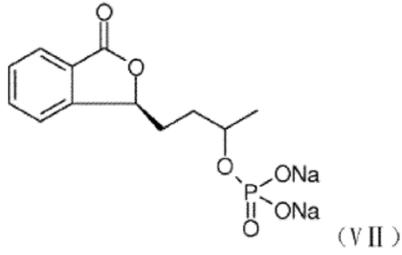
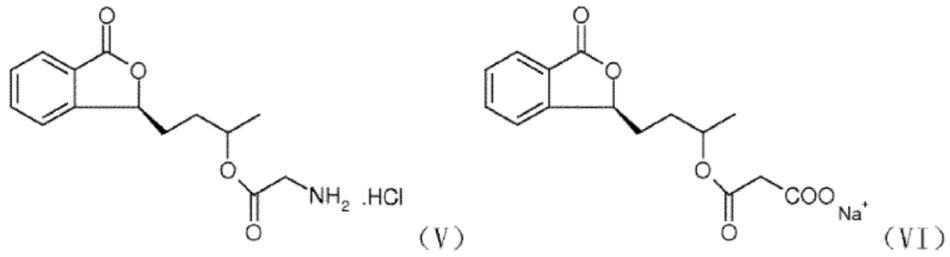
Efectos en la incidencia de sueño en ratones inducidos por pentobarbital sódico en dosis por debajo del umbral

Grupo de dosis	Número de animales	Número de animales que se quedan dormidos	Incidencia de sueño (%)
Grupo control	10	2	20
Grupo de compuesto 7	10	3	30
Grupo de compuesto 8	10	8*	80*
Grupo de DL	10	5	50

*P<0,05, comparado con el grupo control (por la prueba de la chi cuadrado)

Como se muestra en la tabla anterior, en comparación con el grupo control, el número de animales que se quedan dormidos y la incidencia del sueño en animales inducidos por pentobarbital sódico en dosis por debajo del umbral en los grupo del compuesto 8 ((-)-S)-3-(3'-hidroxi)-butilftalida) y DL tienen diferencia significativa.

- 5 Resumen: después de la administración oral a ratones con muestras durante 30 días, los grupos del compuesto 8 ((-)-S)-3-(3'-hidroxi)-butilftalida) y DL tienen efectos de mejorar el sueño. El efecto de la configuración S es mayor que el de la configuración racémica DL, y el de la configuración DL es mayor que el de la configuración R.



- 5
7. Uso del compuesto según la reivindicación 1 en la fabricación de un medicamento para tratar enfermedades isquémicas cerebrales.
8. Uso del compuesto según la reivindicación 1 en la fabricación de un medicamento para mejorar el sueño.
- 10
9. Uso del compuesto según las reivindicaciones 2-6 en la fabricación de un medicamento para tratar enfermedades isquémicas cerebrales y mejorar el sueño.
10. Uso del compuesto según las reivindicaciones 4-6 en la fabricación de un medicamento para tratar enfermedades isquémicas cerebrales y mejorar el sueño.
- 15
11. Una composición farmacéutica, que comprende una cantidad eficaz del compuesto según la reivindicación 1 o el éster según cualquiera de las reivindicaciones 2-6, y un soporte farmacéuticamente aceptable.