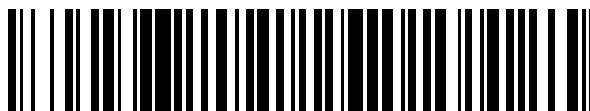


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 019**

51 Int. Cl.:

C07D 279/12 (2006.01)
A61K 31/54 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.08.2012** **PCT/CN2012/080539**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.02.2014** **WO14029102**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2012** **E 12883262 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017** **EP 2889293**

54 Título: **Derivado de tiazinamida y composición farmacéutica y uso de los mismos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.08.2017

73 Titular/es:

**INSTITUTE OF PHARMACOLOGY AND
TOXICOLOGY ACADEMY OF MILITARY MEDICAL
SCIENCES P.L.A. CHINA (100.0%)
No. 27, Taiping Road Haidian District
Beijing 100-850, CN**

72 Inventor/es:

**LI, SONG;
XIAO, JUNHAI;
HAN, DAN;
ZHONG, WU;
WANG, LILI;
ZHENG, ZHIBING;
XIE, YUNDE;
ZHOU, XINBO;
LI, XINGZHOU;
WANG, XIAOKUI;
JIANG, DAN;
CHEN, WEI y
LIU, HONGYING**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 629 019 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 tiazinamida y composición farmacéutica y uso de los mismos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un derivado de tiazinamida, a una composición farmacéutica que contiene el compuesto y a un método o uso de los mismos para la prevención o el tratamiento de enfermedad neurodegenerativa.

Antecedentes de la invención

La enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad provocada por lesiones progresivas del sistema nervioso, incluyendo enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), accidente cerebrovascular isquémico o hemorrágico, etc. Dado que la causa de la enfermedad es compleja y el mecanismo patógeno no está muy claro, en la actualidad no hay ningún producto terapéutico eficaz.

FKBP, que se denomina así debido a su unión al inmunosupresor FK506, es un mediador importante que permite que FK506 ejerza su función inmunosupresora, sin embargo, aún no se ha explicado completamente su función fisiológica. En 1992, Steiner J.P. *et al.* encontraron que la concentración de FKBP (familia de FKBP) en el cerebro y el sistema nervioso periférico era mucho mayor que en los tejidos inmunitarios, lo cual conduce a la especulación de que hay una cierta relación entre FKBP y el sistema nervioso. Los resultados de investigación de Dawson, *et al.* mostraron que FK506 podía bloquear la excitotoxicidad nerviosa provocada por la activación del receptor de NMDA por glutamato. Se especula que FK506 podría aumentar la fosforilación de óxido nítrico sintasa (NOS) tras la inhibición de calcineurina, e inhibir la actividad catalítica de NOS, impidiendo por tanto que las neuronas se vean dañadas por NO. Además, las investigaciones han mostrado que GAP43, que estaba estrechamente relacionado con las neuronas, también era un sustrato de calcineurina. La regeneración de nervio facial y nervio ciático lesionados siempre va acompañada por un aumento evidente del nivel de ARNm de GAP43, mientras tanto, el nivel de ARNm de FKBP aumenta correspondientemente. Los resultados de investigación indicaron que FKBP podría tener una cierta relación con el crecimiento de nervios, y finalmente inspiraron a la gente a buscar compuestos de moléculas pequeñas orgánicas, que pudieran fomentar el crecimiento de nervios, a partir de ligandos de FKBP, y por tanto los FKBP también se denominaron neuroinmunofilinas.

Animados por la opinión antes mencionada, en 1994, el estudio de Lyons, *et al.* mostró que el inmunosupresor FK506 tenía una actividad *in vitro* significativa de fomentar el crecimiento de nervios, e iniciaron la investigación de promotor de crecimiento de nervios de moléculas pequeñas orgánicas. Aunque el mecanismo de fomentar el crecimiento y la protección de nervios mediante los ligandos de la familia de FKBP no se ha entendido completamente, cada vez más investigaciones mostraron que FKBP participaban y mediaban en el proceso. Las evaluaciones biológicas, incluyendo pruebas *in vitro* (crecimiento de ganglio de la raíz dorsal embrionaria del pollo, diferenciación de células PC12, lesiones oxidativas de cepas de células nerviosas, etc.) y una variedad de modelos de animales (un modelo de lesión del nervio ciático periférico en rata, un modelo de degeneración de nervios periféricos en rata diabética, un modelo de animal de enfermedad de Parkinson, un modelo de animal de enfermedad de Alzheimer y similares), mostraron que algunos compuestos diseñados y sintetizados basándose en la estructura de FKBP tenían efectos significativos de fomentar el crecimiento y la protección de nervios. El compuesto típico es GPI1485 de Guilford Pharmaceuticals Inc., según la empresa, se han completado las investigaciones clínicas de fase II de GPI1485 como producto terapéutico para la prevención o el tratamiento de enfermedad de Parkinson y accidente cerebrovascular, y las investigaciones clínicas de fase III están en curso. Simultáneamente, siguen surgiendo un gran número de compuestos con alta actividad, permitiendo por tanto que los FKBP pasen a ser dianas importantes de los productos farmacéuticos para la prevención o el tratamiento de enfermedad neurodegenerativa.

La solicitud de patente china n.º 01142744.2 (Substituted heza azacyclo compounds and their use as neuroregulator (compuestos de hexa-azaciclo sustituidos y su uso como neuroregulador)) y la solicitud de patente estadounidense relacionada n.º 2005/0130958 dan a conocer ligandos de FKBP con una estructura totalmente nueva y que pueden fomentar la regeneración de nervios, de los que el compuesto 4 es un compuesto óptimo. Sin embargo, las investigaciones mostraron que el compuesto tenía una escasa permeabilidad de la barrera hematoencefálica, y debido al bajo punto de fusión y a estar en estado oleoso a temperatura normal, el compuesto no era adecuado para la preparación de productos farmacéuticos para la prevención o el tratamiento de enfermedad neurodegenerativa. Dicho compuesto 4 también se da a conocer en Nie *et al.* (Science in China Series B: Chemistry, vol. 50, n.º 3, 2007, 405-417).

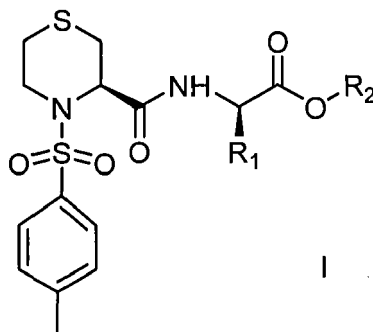
Por tanto, existe una necesidad de hallar y desarrollar un compuesto novedoso con permeabilidad potenciada de la barrera hematoencefálica y útil en la prevención o el tratamiento de enfermedad neurodegenerativa.

Sumario de la invención

La presente invención tiene el objetivo de proporcionar un nuevo derivado de tiazinamida, una composición farmacéutica que contiene el compuesto y un método o uso de los mismos para la prevención o el tratamiento de

enfermedad neurodegenerativa.

El primer aspecto de la presente invención proporciona un derivado de tiazinamida que tiene una estructura de fórmula I,



5 o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que,

R₁ es un alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-6 átomos de carbono; y

R₂ es alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-4 átomos de carbono o alquilo lineal o ramificado que tiene 1-4 átomos de carbono sustituido con fenilo.

10 En una realización, la presente invención proporciona un derivado de tiazinamida que tiene una estructura de fórmula I o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que,

R₁ es alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-4 átomos de carbono; y

R₂ es alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-4 átomos de carbono o alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-4 átomos de carbono sustituido con fenilo.

15 En otra realización, la presente invención proporciona un derivado de tiazinamida que tiene una estructura de fórmula I o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que,

R₁ es alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-4 átomos de carbono; y

R₂ es alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-4 átomos de carbono.

En otra realización, la presente invención proporciona un derivado de tiazinamida que tiene una estructura de fórmula I o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que,

20 R₁ es alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-4 átomos de carbono; y

R₂ es alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-4 átomos de carbono sustituido con fenilo.

En otra realización, la presente invención proporciona un derivado de tiazinamida que tiene una estructura de fórmula I o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que,

R₁ es isobutilo; y

25 R₂ es alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-4 átomos de carbono o alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-4 átomos de carbono sustituido con fenilo.

En otra realización, la presente invención proporciona un derivado de tiazinamida que tiene una estructura de fórmula I o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el compuesto se selecciona de los siguientes compuestos:

30 ácido (2R)-4-metil-2-[[[(3R)-4-(tolueno-4-sulfonyl)-tiomorfolin-3-carbonil]-amino]-pentanoico,

éster etílico del ácido (2R)-4-metil-2-[[[(3R)-4-(tolueno-4-sulfonyl)-tiomorfolin-3-carbonil]-amino]-pentanoico,

éster propílico del ácido (2R)-4-metil-2-[[[(3R)-4-(tolueno-4-sulfonyl)-tiomorfolin-3-carbonil]-amino]-pentanoico,

éster isopropílico del ácido (2R)-4-metil-2-[[[(3R)-4-(tolueno-4-sulfonyl)-tiomorfolin-3-carbonil]-amino]-pentanoico,

éster bencílico del ácido (2R)-4-metil-2-[[[(3R)-4-(tolueno-4-sulfonyl)-tiomorfolin-3-carbonil]-amino]-pentanoico,

35 o la sal, el solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

El segundo aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica, que comprende el compuesto mencionado en cualquier realización de dicho primer aspecto y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

5 En una realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica, en la que, además del compuesto según cualquier realización de dicho primer aspecto, la composición también comprende otros principios activos farmacéuticos apropiados, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

El tercer aspecto de la presente invención proporciona un uso del compuesto según cualquier realización de dicho primer aspecto en la preparación de un medicamento, en el que el medicamento se usa para la prevención o el tratamiento de enfermedad neurodegenerativa provocada por lesión fisiológica o física o lesiones progresivas.

10 En una realización, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, neuropatía relacionada con inmunodeficiencia adquirida, esclerosis múltiple cerebroespinal, accidente cerebrovascular o lesión cerebral relacionada con estimulación física y diversas enfermedades neurodegenerativas que afectan al sistema nervioso central o periférico.

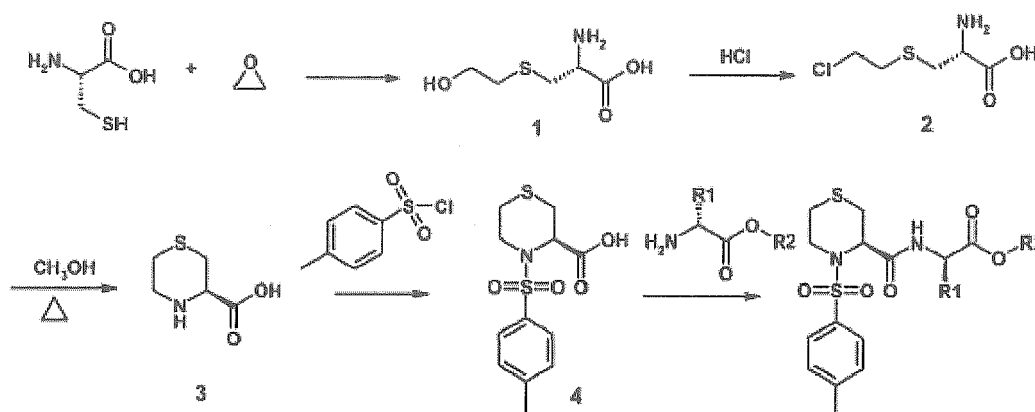
15 El cuarto aspecto de la presente invención proporciona el compuesto según cualquier realización del primer aspecto, en el que el compuesto se usa para la prevención o el tratamiento de enfermedad neurodegenerativa provocada por lesión fisiológica o física o lesiones progresivas.

20 En una realización, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, neuropatía relacionada con inmunodeficiencia adquirida, esclerosis múltiple cerebroespinal, accidente cerebrovascular o lesión cerebral relacionada con estimulación física y diversas enfermedades neurodegenerativas que afectan al sistema nervioso central o periférico.

El quinto aspecto de la presente invención proporciona un método para la prevención o el tratamiento de enfermedad neurodegenerativa provocada por lesión fisiológica o física o lesiones progresivas en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del compuesto según cualquier realización del primer aspecto o la composición farmacéutica del segundo aspecto.

25 En una realización, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, neuropatía relacionada con inmunodeficiencia adquirida, esclerosis múltiple cerebroespinal, accidente cerebrovascular o lesión cerebral relacionada con estimulación física y diversas lesiones neurodegenerativas que afectan al sistema nervioso central o periférico.

30 El compuesto de la presente invención puede prepararse mediante el método tal como se muestra en la siguiente ruta de reacción:



35 Cuando se describe el compuesto de la presente invención, la composición farmacéutica que contiene el compuesto, y el método para prevenir o tratar la enfermedad neurodegenerativa provocada por lesión fisiológica o física o lesiones progresivas del sujeto usando el compuesto, los siguientes términos tal como se usan en el presente documento tienen los siguientes significados. Si los términos tal como se usan no se definen específicamente, los términos tienen los significados tal como los entienden generalmente los expertos en la técnica.

El término "alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-6 átomos de carbono" se refiere al alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 átomos de carbono, los grupos a modo de ejemplo incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, etc.

40 De manera similar, el término "alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-4 átomos de carbono" se refiere al alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1, 2, 3 ó 4 átomos de carbono, los grupos a modo de ejemplo incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, terc-butilo, etc.

El término “sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a la sal del compuesto de la presente invención que es farmacéuticamente aceptable y tiene la actividad farmacológica del compuesto original. La sal dada a conocer en el presente documento incluye aquellas derivadas de ácidos inorgánicos y orgánicos. Los ejemplos de ácidos inorgánicos incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, etc.; los ejemplos de ácidos orgánicos incluyen ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentilpropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido naftalenosulfónico, ácido canforsulfónico, ácido glucoheptónico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico, etc. La sal también incluye aquellas formadas mediante sustitución de protones ácidos en el compuesto original por iones de metales, tales como iones de metales alcalinos o iones de metales alcalinotérreos; y compuestos de coordinación formados por el compuesto original con bases orgánicas, los ejemplos de las bases orgánicas incluyen etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, N-metilglucamina, etc.

El término “solvato”, a menos que se especifique de otro modo, se refiere a una sustancia formada por complejación del compuesto de la presente invención mediante un disolvente farmacéuticamente aceptable. El disolvente farmacéuticamente aceptable comprende agua, etanol, ácido acético, etc. El solvato comprende aquellos solvatos estequiométricos y no estequiométricos, preferiblemente hidrato. El compuesto de la presente invención puede cristalizarse o recrystalizarse en agua o diversos disolventes orgánicos. En este caso, pueden formarse diversos solvatos.

El término “sujeto” comprende mamíferos o ser humano, preferiblemente ser humano.

El término “una cantidad eficaz” se refiere a una dosis del compuesto que es suficiente para prevenir o tratar la enfermedad cuando se administra al sujeto que lo necesita. La “cantidad eficaz” puede ajustarse según el compuesto, la enfermedad y la gravedad de la misma, así como la edad, el peso corporal del sujeto tratado, etc.

El término “tratamiento” se refiere a mejorar o eliminar uno o más síntomas de una enfermedad de un sujeto.

El término “prevención” se refiere a reducir el riesgo de que un sujeto padezca una enfermedad, concretamente puede prevenirse al menos uno de los síntomas clínicos de una enfermedad para un sujeto que puede estar en contacto con o ser propenso a la enfermedad y no padece o muestra los síntomas de la enfermedad.

El término “excipientes farmacéuticamente aceptables” se refiere a cualquier excipiente que se use convencionalmente en el campo de las preparaciones farmacéuticas. La selección de excipientes específicos dependerá de los métodos de administración para tratar al paciente o los tipos de enfermedad y estados patológicos particulares. Por ejemplo, los excipientes farmacéuticamente aceptables comprenden diluyentes, transportadores, cargas, aglutinantes, humectantes, agentes disgregantes, potenciadores de la absorción, tensioactivos, transportadores de adsorción, lubricantes y similares convencionales en el campo farmacéutico. Si es necesario, pueden añadirse agentes saborizantes, conservantes, edulcorantes y similares en la composición farmacéutica. El método de preparación de una composición farmacéutica apropiada para un modo de administración específico está dentro del alcance del conocimiento de los expertos en el campo farmacéutico.

La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse de cualquier manera y en cualquier forma comúnmente usada en la técnica. Por ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse de una manera seleccionada de las siguientes: administración oral, inhalación de pulverización, administración rectal, administración nasal, administración vaginal, administración tópica, administración parenteral, tal como inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intraesternal o intracraneal, preferiblemente administración oral, inyección intramuscular e inyección intraperitoneal o intravenosa.

La composición farmacéutica de la presente invención puede producirse en forma de una dosis unitaria para administración. Las formas de dosificación pueden ser formas de dosificación líquidas o formas de dosificación sólidas. Las formas de dosificación líquidas pueden ser del tipo de disolución, tipo coloidal, tipo de emulsión o tipo de suspensión y similares. Las formas de dosificación sólidas pueden ser comprimidos, polvo, supositorios, gránulos o cápsulas y similares. Otras formas de dosificación comprenden aerosoles, implantes, parches o linimentos y similares.

En términos generales, se ha demostrado que es ventajoso que la dosificación del compuesto de la presente invención sea de aproximadamente 1-1000 mg cada 24 h, preferiblemente 5-500 mg ya sea para uso en seres humanos o veterinario. Si resulta apropiado, la dosificación diaria puede administrarse en varias veces usando múltiples unidades de dosificación para lograr los efectos deseados. El contenido del compuesto de la presente invención en la unidad de dosificación puede ser de 1-200 mg, preferiblemente 1-100 mg. Sin embargo, la dosificación de administración específica depende del tipo y el peso corporal del sujeto que va a tratarse, la naturaleza y la gravedad de la enfermedad, el tipo de la preparación, el modo de administración del producto farmacéutico, el periodo de administración o los intervalos de tiempo y similares.

Según la presente invención, el compuesto de fórmula I puede penetrar a través de la barrera hematoencefálica, y es mejor que el compuesto 4 en la solicitud de patente china n.º 01142744.2, dando por tanto como resultado una

mayor biodisponibilidad. Además, en comparación con el compuesto 4 en la solicitud de patente china n.º 01142744.2, el compuesto de fórmula I es un cristal blanco, por tanto puede procesarse fácilmente. El compuesto es un producto cristalino estable con alto punto de fusión, cuyo producto sólido está suelto y tiene buena fluidez. Por tanto, el compuesto de fórmula I es adecuado para la preparación y el procesamiento industriales a gran escala, en particular para el procesamiento farmacéutico que requiere calor o produce calor, tal como trituración, secado por calentamiento, secado en lecho fluidizado, esterilización a alta temperatura y alta presión y similares. Además, el compuesto de la presente invención tiene un efecto significativamente mejor en comparación con el compuesto 4 en la solicitud de patente de invención china n.º 01142744.2 en la evaluación de la eficacia frente a isquemia cerebral incompleta de ratón.

- 10 Basándose en los experimentos completados por los inventores y los resultados de los mismos, se espera que el compuesto de la presente invención pueda fomentar el crecimiento y la regeneración de nervios en diversos estados de neuropatía, incluyendo enfermedad neurológica que está relacionada con neurodegeneración, y neuropatías provocadas por diversas lesiones físicas (tales como lesión o choque mecánicos) o enfermedades (tales como diabetes o enfermedad de deficiencia autoinmunitaria adquirida), por tanto puede usarse para la prevención o el
- 15 tratamiento de enfermedad neurodegenerativa, tal como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica o accidente cerebrovascular.

Descripción detallada de las realizaciones

Las siguientes realizaciones son realizaciones a modo de ejemplo usadas para ilustración adicional y no deben interpretarse como limitación de la presente invención.

- 20 El punto de fusión de un compuesto se midió mediante un aparato de punto de fusión RY-1, y el termómetro no se calibró. Se midió la ^1H -RMN mediante un instrumento de RMN ARX-400. Se midieron espectros de masas mediante un instrumento de EM VG-ZabSpec. A menos que se indique de otro modo, todos los disolventes usados para reacciones se sometieron a un tratamiento previo convencional.

Ejemplo 1: 2-hidroxietil-cisteína

- 25 Se añadieron 109 g (0,9 mol) de L-cisteína a un matraz de fondo redondo de 2000 ml, se disolvieron con 1000 ml de agua destilada, se enfriaron hasta 10°C en un baño de hielo, y se neutralizaron hasta pH~7 con 24 ml de disolución de NaOH 1 M. Se llevaron 100 ml de óxido de etileno, que se había enfriado previamente, a 10°C y se añadieron a la mezcla anterior, se hizo reaccionar la mezcla durante 1 h mientras se mantenía la temperatura a 10°C, después se aumentó la temperatura hasta temperatura ambiente y se continuó la reacción durante otras 1,5 h.
- 30 Se extrajo la mezcla con 400 ml X 4 de etil éter para retirar el óxido de etileno sin reaccionar. Se eliminó la fase acuosa mediante destilación por debajo de 60°C, se obtuvo un sólido amarillo, se recrystalizó en agua y etanol en una razón de 85 ml: 350 ml, se filtró, se lavó abundantemente con etanol al 95% para proporcionar el compuesto objetivo como sólido en copos blanco, en el que el p.f. (punto de fusión) fue de 195-196°C, el peso fue de aproximadamente 100 g y el rendimiento es del 67,5%.
- 35 ^1H -RMN (400 MHz, D_2O) δ : 3,96131 (dd, 1H, $J_1=4,272$ Hz, $J_2=7,816$ Hz), 3,80680-3,77293 (m, 2H), 3,17887 (dd, 1H, $J_1=4,268$ Hz, $J_2=14,814$ Hz), 3,08224 (dd, 1H, $J_1=7,480$ Hz, $J_2=14,814$ Hz), 2,80103 (t, 2H, $J=6,036$ Hz).

Ejemplo 2: clorhidrato de 2-cloroetil-cisteína

- Se añadieron 44 g de 2-hidroxietil-cisteína a un matraz de fondo redondo de 1000 ml, se disolvieron en 600 ml de ácido clorhídrico concentrado, se calentaron hasta que la temperatura exterior fue de 90-95°C, se agitaron y se hicieron reaccionar durante 7 h. Tras la reacción, se refrigeró el sistema y se dejó reposar durante la noche, y se precipitó una gran cantidad de sólido de tipo agujas del sistema. Se eliminó el disolvente mediante filtración con succión, se secó el sólido obtenido de manera natural para dar un sólido de color blanco grisáceo en el que el p.f. es de 185-186°C, el peso es de aproximadamente 40 g y el rendimiento es de más del 70%. ^1H -RMN (400 MHz, D_2O) δ : 4,30477-4,26952 (m, 1H), 3,81913-3,78409 (m, 2H), 3,25903 (dd, 1H, $J_1=4,444$ Hz, $J_2=14,984$ Hz), 3,18877 (dd, 1H, $J_1=7,352$ Hz, $J_2=15,072$ Hz), 3,04410-3,00625 (m, 2H).
- 45

Ejemplo 3: clorhidrato de ácido (3R)-tiomorfolin-3-carboxílico

- Se disolvieron 20 g de clorhidrato de 2-cloroetil-cisteína en agua, se añadió gota a gota una disolución acuosa de NaHCO_3 que contenía 7,2 g de NaHCO_3 en un baño de hielo, tras la adición, se agitó completamente la mezcla para la neutralización, se extrajo con acetato de etilo tres veces, se combinaron las fases orgánicas y se secaron con Na_2SO_4 .
- 50

- Se eliminó el disolvente a presión reducida, se añadieron 400 ml de metanol absoluto y se agitó el sistema a temperatura ambiente durante 5 días. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se recrystalizó el residuo en metanol y etil éter para dar aproximadamente 6 g de un sólido casi blanco, en el que el p.f. es de 160-161°C. ^1H -RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10,0898 (s.a., 2H), 4,4214 (dd, 1H, $J_1=3,52$ Hz, $J_2=8,56$ Hz), 3,7833 (s, 3H), 3,4986-3,4766 (m, 1H), 3,2246-3,0606 (m, 3H), 2,9897-2,9593 (m, 1H), 2,8763-2,8622 (m, 1H); EM (FAB) m/z : 162,0 (M-
- 55

35,5), 102,0, 74,0.

Ejemplo 4: ácido (3R)-4-(tolueno-4-sulfonyl)-tiomorfolin-3-carboxílico

Se suspendieron 13,0 g de clorhidrato de ácido (3R)-tiomorfolin-3-carboxílico en 120 ml de diclorometano, se enfriaron hasta 0°C, se añadieron lentamente por goteo 30 ml de trietilamina, se agitó la mezcla durante 1 h, después se añadieron lentamente por goteo 120 ml de disolución de 13,5 g de cloruro de p-toluenosulfonyl disueltos en diclorometano, se hizo reaccionar la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 24 h, se filtró para retirar un precipitado blanco, se lavó sucesivamente el filtrado con disolución saturada de bicarbonato de sodio y agua, se secó con sulfato de sodio anhidro, se retiró el agente de secado, se eliminó el diclorometano mediante destilación para obtener un sólido blanco, se recrystalizó en acetato de etilo y ciclohexano para obtener 19,4 g de cristales blancos, en los que el rendimiento fue del 93,5%, el p.f. fue de 87-88°C y la rotación específica $[\alpha]_D^{24,5} = -78,1^\circ$ (c 2,00, CH₂Cl₂). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,66938 (d, 2H, J=7,352 Hz), 7,29941 (d, 2H, J=8,036 Hz), 5,06654 (t, 1H, J=3,436 Hz), 4,04908-3,99999 (m, 1H), 3,63087 (s, 3H), 3,45333-3,38197 (m, 1H), 3,06102-3,02157 (m, 1H), 3,00305-2,95904 (m, 1H), 2,82287-2,74967 (m, 1H), 2,42975 (s, 3H), 2,40451-2,36514 (1H).

Ejemplo 5: éster etílico del ácido (2S)-4-metil-2-[(3R)-4-(tolueno-4-sulfonyl)-tiomorfolin-3-carbonil]-amino}-pentanoico

Se añadieron 6 ml (0,042 mol) de TEA a una mezcla de 4,2 g (0,14 mol) de ácido (3R)-4-(tolueno-4-sulfonyl)-tiomorfolin-3-carboxílico, 3,0 g (0,017 mol) de clorhidrato de éster etílico de L-leucina, 3,2 g (0,014 mol) de DCC y 1,7 g (0,014 mol) de DMAP en 200 ml de CH₂Cl₂, y se hizo reaccionar la mezcla a temperatura ambiente durante 24 h. Tras la reacción, se retiró el sólido mediante filtración con succión, se eliminó el disolvente mediante evaporación, se disolvió el residuo con una cantidad apropiada de acetato de etilo, se filtró para retirar la materia insoluble, se diluyó con acetato de etilo, se lavó sucesivamente con disolución al 10% de NaHCO₃ y disolución saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄. Se retiró el agente de secado, se eliminó el acetato de etilo mediante evaporación, se separó el residuo mediante columna de cromatografía ultrarrápida (eluyente: CH₂Cl₂:CH₃Cl = 1:1), para obtener 4,0 g de material oleoso.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,77337-7,75377 (d, 2H, J=8,4 Hz), 7,37582-7,264111 (d, 2H, J=8,4 Hz), 6,79090 (d, 1H, J=8,644 Hz), 4,79698-4,58466 (m, 2H), 4,31444-4,08398 (m, 3H), 3,31989-3,11674 (m, 2H), 2,53154-2,45847 (m, 5H), 2,24620-2,21545 (m, 1H), 1,69352-1,65150 (m, 7H), 0,97759-0,94891 (m, 10H); EM (EI) m/z: 443,4, 397,2, 369,2, 263,1, 256,1, 155,0, 139,2, 101,1.

Ejemplo 6: éster etílico del ácido (2R)-4-metil-2-[(3R)-4-(tolueno-4-sulfonyl)-tiomorfolin-3-carbonil]-amino}-pentanoico

Según el ejemplo 5, se obtuvo éster etílico del ácido (2R)-4-metil-2-[(3R)-4-(tolueno-4-sulfonyl)-tiomorfolin-3-carbonil]-amino}-pentanoico como un cristal blanco a partir de clorhidrato de éster etílico de D-leucina, en el que el rendimiento fue del 83,5%, el p.f. fue de 93-95°C y la rotación específica $[\alpha]_D^{24,5} = -35,4^\circ$. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,77337-7,75377 (d, 2H, J=8,4 Hz), 7,37582-7,264111 (d, 2H, J=8,4 Hz), 6,79090 (d, 1H, J=8,644 Hz), 4,79698-4,58466 (m, 2H), 4,31444-4,08398 (m, 3H), 3,31989-3,11674 (m, 2H), 2,53154-2,45847 (m, 5H), 2,24620-2,21545 (m, 1H), 1,69352-1,65150 (m, 7H), 0,97759-0,94891 (m, 10H); EM (EI) m/z: 443,4, 397,2, 369,2, 263,1, 256,1, 155,0, 139,2, 101,1.

Ejemplo 7: éster propílico del ácido (2R)-4-metil-2-[(3R)-4-(tolueno-4-sulfonyl)-tiomorfolin-3-carbonil]-amino}-pentanoico

Según el ejemplo 5, se obtuvo éster propílico del ácido (2R)-4-metil-2-[(3R)-4-(tolueno-4-sulfonyl)-tiomorfolin-3-carbonil]-amino}-pentanoico como un cristal blanco a partir de clorhidrato de éster propílico de D-leucina, en el que el rendimiento fue del 87,5%, el p.f. fue de 96-98°C y la rotación específica $[\alpha]_D^{24,5} = -38,1^\circ$. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,76337-7,74277 (d, 2H, J=8,4 Hz), 7,37782-7,35712 (d, 2H, J=8,4 Hz), 6,76390-6,74745 (d, 1H, J=8,644 Hz), 4,79598-4,70066 (m, 2H), 4,28444-4,08098 (m, 3H), 3,54489-3,53274 (t, 1H, J=2,6 Hz), 3,14892 (d, 1H, J=13,676), 2,56954-2,42247 (m, 5H), 2,23720-2,19945 (m, 1H), 1,70552-1,62350 (m, 5H), 0,95459-0,93291 (m, 9H); EM (EI) m/z: 457,3, 397,2, 369,3, 256,2, 174,0, 118,1, 101,1.

Ejemplo 8: éster isopropílico del ácido (2R)-4-metil-2-[(3R)-4-(tolueno-4-sulfonyl)-tiomorfolin-3-carbonil]-amino}-pentanoico

Según el ejemplo 5, se obtuvo éster isopropílico del ácido (2R)-4-metil-2-[(3R)-4-(tolueno-4-sulfonyl)-tiomorfolin-3-carbonil]-amino}-pentanoico como un cristal blanco a partir de clorhidrato de éster isopropílico de D-leucina, en el que el rendimiento fue del 91,5%, el p.f. fue de 89-91°C y la rotación específica $[\alpha]_D^{24,5} = -43,9^\circ$. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,76237-7,74077 (d, 2H, J=8,208 Hz), 7,37382-7,26511 (d, 2H, J=8,208 Hz), 6,75090 (d, 1H, J=8,944 Hz), 5,40112 (m, 1H), 4,79298-4,25166 (m, 3H), 3,54989-3,53674 (t, 1H, J=12,31110), 3,15292-3,11800 (d, 1H, J=13,676 Hz), 2,56054-2,46247 (m, 4H), 2,23220-2,20345 (m, 1H), 1,62552-1,43450 (m, 4H), 1,26202-1,24745 (m, 6H), 0,94659-0,93191 (m, 6H); EM (EI) m/z: 457,3, 397,2, 369,2, 256,2, 154,7, 101,1.

Ejemplo 9: éster bencílico del ácido (2R)-4-metil-2-[(3R)-4-(tolueno-4-sulfonyl)-tiomorfolin-3-carbonil]-amino}-pentanoico

Según el ejemplo 5, se obtuvo éster bencílico del ácido (2R)-4-metil-2-[(3R)-4-(tolueno-4-sulfonyl)-tiomorfolin-3-carbonil]-amino}-pentanoico como un cristal blanco a partir de clorhidrato de éster bencílico de D-leucina, en el que el rendimiento fue del 83,5%, el p.f. fue de 91-93°C y la rotación específica $[\alpha]_D^{24,5} = -33,1^\circ$. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7,75237-7,71377 (d, 2H, $J=1,2$ Hz), 7,36382-7,26322 (m, 7H), 6,73090 (m, 1H), 5,18600-5,11600 (2H, m), 4,78698-4,75466 (m, 2H), 4,24244-4,10298 (m, 1H), 3,37689-3,09274 (m, 2H), 2,52054-2,44547 (m, 5H), 2,06820-2,04745 (m, 1H), 1,66552-1,25450 (m, 3H), 0,92259-0,90691 (m, 6H); EM (EI) m/z : 505,6, 475,1, 457,6, 434,7, 399,0, 370,8, 336,7, 308,3, 272,4, 232,6, 148,8, 106,5.

Ejemplo 10: ácido (2R)-4-metil-2-[(3R)-4-(tolueno-4-sulfonyl)-tiomorfolin-3-carbonil]-amino}-pentanoico

Según el ejemplo 5, se obtuvo ácido (2R)-4-metil-2-[(3R)-4-(tolueno-4-sulfonyl)-tiomorfolin-3-carbonil]-amino}-pentanoico como un cristal blanco a partir de D-leucina, en el que el rendimiento fue del 77,5%, el p.f. fue de 87-89°C y la rotación específica $[\alpha]_D^{24,5} = -86,7^\circ$. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7,75237-7,71377 (d, 2H, $J=1,2$ Hz), 7,36382-7,26322 (m, 7H), 6,73090 (m, 1H), 5,18600-5,11600 (2H, m), 4,78698-4,75466 (m, 2H), 4,24244-4,10298 (m, 1H), 3,37689-3,09274 (m, 2H), 2,52054-2,44547 (m, 5H), 2,06820-2,04745 (m, 1H), 1,66552-1,25450 (m, 3H), 0,92259-0,90691 (m, 6H); EM (EI) m/z : 505,6, 475,1, 457,6, 434,7, 399,0, 370,8, 336,7, 308,3, 272,4, 232,6, 148,8, 106,5.

Ejemplo 11: evaluación de la actividad neurotrófica del compuesto

La actividad neurotrófica del compuesto de la presente invención puede reflejarse en una variedad de modelos biológicos *in vitro*, tales como un modelo de cultivo libre de suero *in vitro* de ganglios de la raíz dorsal embrionaria de pollo. Se usaron embriones de pollo incubados durante 8 d, y se expusieron médula espinal y ganglios a los dos lados a un microscopio de disección en entorno estéril. Se cogieron los ganglios de la raíz dorsal uno a uno con pinzas, se inocularon en frascos de cultivo en los que se había dispuesto colágeno de cola de rata según 5-6 ganglios de la raíz dorsal por frasco, se prepararon dos frascos por dosis, y se cultivaron a 37°C, el 5% de CO_2 , durante 1 h en una incubadora para determinar la adherencia, después se les añadió medio de cultivo libre de suero, DMEM, que contenía NGF (0,15 ng/ml) y el compuesto de la presente invención, mientras que al grupo de control sólo se le añadió el medio de cultivo y la misma dosis de NGF. Tras cultivarse en la incubadora durante 48 h, se observó el crecimiento de la neurita alrededor de ganglios de la raíz dorsal con un microscopio de contraste de fase invertido y se puntuó según la longitud y densidad de la neurita, en el que 0 puntos representa ausencia de neurita; 1 punto representa que la neurita era escasa; 2 puntos representan que la neurita era relativamente larga o densa; y 3 puntos representan que la neurita era larga y densa. En la tabla 1 se muestra la puntuación del crecimiento de neurita de ganglio de la raíz dorsal embrionaria de pollo con el fomento del compuesto de la presente invención con diferentes dosificaciones, en la que cada puntuación es un promedio de cinco ganglios de la raíz dorsal.

Tabla 1: Resultados de evaluación de actividad de compuestos en fomentar raíz dorsal embrionaria de pollo

Grupo	Puntuación media
Medio de cultivo + NGF (0,15 ng/ml) (grupo de control)	0,33
Ejemplo 5 (1 pM) + NGF (0,15 ng/ml)	0,65
Ejemplo 5 (100 pM) + NGF (0,15 ng/ml)	1,55
Ejemplo 6 (1 pM) + NGF (0,15 ng/ml)	1,23
Ejemplo 6 (100 pM) + NGF (0,15 ng/ml)	1,88
Ejemplo 7 (1 pM) + NGF (0,15 ng/ml)	1,46
Ejemplo 7 (100 pM) + NGF (0,15 ng/ml)	1,95
Ejemplo 8 (1 pM) + NGF (0,15 ng/ml)	1,68
Ejemplo 8 (100 pM) + NGF (0,15 ng/ml)	2,25

Ejemplo 12: evaluación de la farmacodinamia *in vivo* de compuestos para accidente cerebrovascular

1. Esquema experimental

El ejemplo, que tomó ratones Kunming como sujetos de experimentación, investigó la protección de la administración preventiva del compuesto de la presente invención frente a isquemia cerebral incompleta de ratones, mediante administración intravenosa e intragástrica, en el modelo de oclusión bilateral de arteria carótida de ratón con baja tensión arterial (BCAO-LBP), midiendo la puntuación de función neurológica y el contenido de MDA en el cerebro.

2 Métodos experimentales

2.1 Preparación de fármacos

2.1.1 Preparación de CMC-Na al 0,7%: el día antes del uso, se pesaron 0,7 g (700 mg) de polvo seco de CMC-Na, se añadieron a 100 ml de agua destilada, se calentó la mezcla y se agitó moderadamente, y se dejó reposar durante la noche para mezclarse de manera completa y uniforme tras disolverse completamente, se conservó mediante sellado.

2.1.2 Preparación de fármaco para administración intragástrica: se preparó el compuesto de la presente invención como 30 mg/kg usando CMC-Na al 0,7%, se mezcló de manera completa y uniforme con sonicación para proporcionar una disolución de 1,5 mg/ml. Se realizó la administración intragástrica (i.g.) según 0,2 ml/10 g.

5 2.1.3 Preparación de DMSO al 10%: Se transfirieron 1000 µl de DMSO (analíticamente puro) a 9 ml de N.S. con una micropipeta y se mezclaron de manera uniforme. Se preparó cuando era necesario.

10 2.1.4 Preparación de fármaco para administración intravenosa: en primer lugar se disolvió el compuesto de la presente invención con una pequeña cantidad de DMSO, se añadió N.S. para alcanzar el volumen requerido tras varios minutos y se mezcló de manera completa y uniforme para dar la disolución de 1 mg/ml (la concentración final del DMSO era del 10%), se preparó cuando era necesario. Se inyectó la disolución en la vena caudal según 0,1 ml/10 g, en la que la dosificación en ratones era de 10 mg/kg.

2.2 Grupo y administración

2.2.1 Observación del efecto contra la isquemia cerebral de compuestos de la presente invención mediante administración intragástrica

15 Se dividieron 28 ratones que se habían adaptado al entorno de laboratorio durante una semana, en grupos equilibrados según el peso corporal, se les administró por vía i.g. respectivamente CMC-Na al 0,7% o el compuesto de la presente invención, una vez al día durante 3 d en continuo. Los grupos específicos fueron los siguientes:

grupo de operación simulada: 4 ratones, con disolución de CMC-Na al 0,7% por vía i.g.

grupo de modelo de isquemia cerebral: 12 ratones, con disolución de CMC-Na al 0,7% por vía i.g.

20 grupo de fármaco: 12 ratones, con disolución de compuestos de la presente invención por vía i.g. por separado, en el que la dosificación era de 30 mg/kg.

2.2.2 Observación del efecto contra la isquemia cerebral de compuestos de la presente invención mediante administración intravenosa

25 Se dividieron 28 ratones que se habían adaptado al entorno de laboratorio durante una semana, en grupos equilibrados según el peso corporal, se les administró por vía i.v. DMSO al 10% o el compuesto de la presente invención, respectivamente, una vez al día durante 3 d en continuo. Los grupos específicos fueron los siguientes:

grupo de operación simulada: 4 ratones, con disolución de DMSO al 10% por vía i.v.

grupo de modelo: 12 ratones, con disolución de DMSO al 10% por vía i.v.

grupo de fármaco: 12 ratones, con disolución de compuestos de la presente invención por vía i.v. por separado, en el que la dosificación era de 10 mg/kg.

30 2.3 Determinación de isquemia cerebral global incompleta y contenido de MDA en el cerebro de los ratones

35 2.3.1 Ligamiento de arteria carótida bilateral de ratón: se sometió el ratón a sangría orbital (aproximadamente el 30% del volumen de sangre total del ratón) para reducir la tensión arterial 1 h tras la última administración, después se fijó el ratón a una placa para cirugía en una posición supina, y se realizó una incisión en el centro del cuello. Se expuso la arteria carótida común con separación roma, y se prepararon 2 suturas debajo de cada extremo de la arteria expuesta, y se ligaron ambos extremos de la arteria, respectivamente. Cuando se completó el ligamiento para la tercera sutura, se inició el cronómetro, después se cortó la arteria carótida común entre los dos ligamientos, y se cosió la incisión con sutura. En el grupo de operación simulada, se separó la arteria carótida común sin ligamiento. Se liberó el ratón rápidamente tras la operación, se observó y se registró el comportamiento en 6 h y la hora de la muerte del ratón (se puntuó mediante un método ciego según la siguiente tabla). Se extrajo el cerebro rápidamente tras la muerte, se extirpó el cerebelo, y se determinó el contenido de MDA en el cerebro completo mediante un método de TBA. El ratón que no murió tras 6 h, se sacrificó y se extrajo el cerebro.

2.3.2 Puntuación de función neural: la norma de puntuación se muestra en la tabla 2.

Tabla 2: Tabla de evaluación del comportamiento neurológico

(1) Colocar el ratón en el suelo	4 puntos
(Si se producen simultáneamente varios de los siguientes comportamientos, registrar el comportamiento más grave; si el ratón no se mueve, empujarle suavemente en el trasero para estimular al ratón a que se mueva)	
Actividades normales	0 puntos
Trayectoria de deambular curva, pero sin dar vueltas (sin aparición del fenómeno de parte trasera)	1 punto
Dar vueltas, con aparición del fenómeno de parte trasera (registrar el sentido de rotación, sentido de las agujas del reloj o contrario a las agujas del reloj)	
Dar vueltas 1-2 veces	1 punto

Dar vueltas 3-5 veces	2 puntos
Dar vueltas más de 5 veces	3 puntos
Rodar (registrar el sentido de rodamiento, izquierda o derecha)	
Rodar 1-2 veces	1 punto
Rodar 3-5 veces	2 puntos
Rodar más de 5 veces	3 puntos
Hemiplejía (registrar el sentido de hemiplejía, izquierda o derecha)	4 puntos
(2) Actividades anómalas	8 puntos
Distonía (movimientos de torsión involuntarios, que dan como resultado posturas que son persistentes y con frecuencia raras), crisis epilépticas (pérdida de conciencia repentina, caerse al suelo, hipsocinesis de cabeza y rigidez de extremidades) y mioclonía (convulsiones)	1 punto
Excitación (saltar)	
Saltar 1-2 veces	1 punto
Saltar 3-5 veces	2 puntos
Saltar más de 5 veces	3 puntos
Estacionario o respiración sibilante ocasional (si se produce hemiplejía, registrar la hemiplejía)	2 puntos
4 puntos: muerte inmediatamente tras una operación (en el plazo de 10 min)	
(3) Pérdida de reflejos	1 punto
Reflejos auriculares (el ratón agita la cabeza cuando se toca el canal auditivo del ratón)	1 punto
	Total 13 puntos

2.3.3 Determinación del contenido de MDA en el cerebro de ratones

Se extrajo el cerebro de un ratón, se pesó, se preparó en homogeneizado de cerebro al 15% con N.S., se extrajeron 1,2 ml del homogeneizado y se pusieron en un baño de agua a 37°C durante 1 h (con agitación una vez cada 10 min), después se extrajo del agua, se le añadieron 0,6 ml de ácido tricloroacético al 20%, se mezcló uniformemente y se dejó reposar durante 10 min, se centrifugó a 2000 r durante 10 min, a 1,2 ml de fluido sobrenadante se le añadieron 0,6 ml de TBA al 0,67%, y se pusieron en un baño de agua en ebullición durante 10 min, después se enfrió y se determinó el valor de DO a 532 nm.

3. Análisis estadístico

Se representaron los datos experimentales mediante $\bar{x} \pm EEM$, se aplicó el software estadístico SPSS13.0, se evaluó la homogeneidad de varianza mediante análisis de la varianza de un solo factor. Se sometió a prueba la homogeneidad de varianza mediante MDS, se sometió a prueba la no homogeneidad de varianza mediante la prueba T3 de Dunnett, se compararon las diferencias significativas entre los grupos y $P < 0,05$ representó una significación estadística. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Resultados de la evaluación del contenido de MDA y la puntuación de comportamiento neurológico de compuestos en ratones BCAA-LBP ($\bar{x} \pm EEM$)

Tratamiento (i.g.)	n	Contenido de MDA (nmol/g)	Puntuación de déficit neural
Control	4	33,15 $\pm$ 2,75	0,00 $\pm$ 0,00
Medio	11	40,94 $\pm$ 1,754*	3,92 $\pm$ 0,25**
Ejemplo 5 (30 mg/kg)	12	36,09 $\pm$ 1,85	3,62 $\pm$ 0,31
Ejemplo 6 (30 mg/kg)	12	30,87 $\pm$ 0,95###	3,08 $\pm$ 0,40
Ejemplo 7 (30 mg/kg)	11	34,90 $\pm$ 1,65##	2,91 $\pm$ 0,28
Ejemplo 8 (30 mg/kg)	12	33,27 $\pm$ 1,91##	2,67 $\pm$ 0,31#

* $p < 0,05$, en comparación con el grupo de control; ** $p < 0,01$, en comparación con el grupo de control; # $p < 0,05$, en comparación con el grupo de medio; ### $p < 0,01$, en comparación con el grupo de medio; #### $p < 0,001$, en comparación con el grupo de medio; analizado con ANOVA seguido por MDS con SPSS 13.0 que se usa para el análisis.

Ejemplo 12: Evaluación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica e investigaciones sobre la permeabilidad de membrana de células MDCK-MDR1 de los compuestos

1. Esquema experimental

Las células MDCK-MDR1 son células en monocapa con alta expresión de un transportador de P-gp tras transfectar genes de MDR1 en MDCK (células epiteliales de riñón caninas Madin-Darby). Debido a la compacidad de las células en monocapa y la alta expresión de una proteína de eflujo farmacéutica, las células tienen una similitud con la estructura de la barrera hematoencefálica (BHE), y pueden usarse como uno de los modelos para evaluar la permeabilidad de la BHE. Dado que los compuestos de la presente invención se dirigían al sistema nervioso central y necesitaban penetrar la BHE, se aplicaron las células MDCK-MDR1 para investigar la permeabilidad de la membrana, y se evaluó de manera preliminar la permeabilidad de la BHE.

2 Métodos experimentales

2.1 Preparación de disoluciones

Preparación de una disolución de cultivo: cuando se usa, a DMEM se le añadieron FBS al 10%, glutamina al 1%, 100 U·ml⁻¹ de disolución de antibióticos dobles de penicilina y estreptomicina, aminoácidos no esenciales al 1% y 1,2 mg·L⁻¹ de G418.

Preparación de una disolución de digestión: se pesaron 1 g de tripsina y 80 mg de EDTA, se les añadieron 400 ml de disolución tampón de fosfato, se filtraron con una membrana de filtro de 0,22 µm para eliminar bacterias, y se almacenaron a -20°C para su uso posterior.

Preparación de una disolución madre de glutamina: a 2,92 g de glutamina se les añadieron 100 ml de disolución tampón de PBS, se filtraron con una membrana de filtro de 0,22 µm para eliminar bacterias, se envasaron en subdivisiones de 1 ml y se almacenaron a -20°C para su uso posterior.

Preparación de una disolución madre de penicilina y estreptomicina: a 0,8 millones de U de penicilina se les añadieron 20 ml de solución salina; a 1 millón de U de estreptomicina se les añadieron 25 ml de solución salina; se mezclaron uniformemente las dos disoluciones en una razón de 1:1, se filtraron con una membrana de filtro de 0,22 µm para eliminar bacterias, se envasaron en subdivisiones de 1 ml, y se almacenaron a -20°C para su uso posterior.

Preparación de una disolución HBSS: se añadieron 8,0 g de NaCl, 0,4 g de KCl, 0,0475 g de Na₂HPO₄·H₂O, 0,06 g de KH₂PO₄ y 6 g de Hapes a agua ultrapura para su disolución, se ajustó el valor de pH a 7,2-7,4, se añadió agua hasta 1 l, se filtró con membrana de filtro de 0,22 µm para eliminar bacterias, y se almacenó a -20°C para su uso posterior.

2.2 Cultivo celular

Se descongelaron rápidamente células MDCK-MDR1 crioconservadas, en un baño de agua a 37°C. Se añadieron las células tras la descongelación a un medio de cultivo DMEM que contenía FBS al 10%, se cultivaron en una incubadora a 37°C, el 5% de CO₂, con una humedad relativa del 90%, y se sustituyó el medio de cultivo cada dos días. Tras un crecimiento de 1-2 días para la fusión celular, se digirieron las células a 37°C, con la disolución de digestión mixta de tripsina al 0,25%-EDTA (0,2%), y se subcultivaron según una determinada razón, en la que las células usadas para el experimento son células de la generación 40~60.

Cuando se fusionaron el 80% de las células, se suspendieron las células con un medio de cultivo completo y se inocularon en una placa Millicell según 1X10⁶·ml⁻¹. Se cambió la disolución de cultivo una vez cada dos días, después una vez cada día tras 1 semana. Tras cultivarse durante 5 días, las células estaban listas para el experimento de transporte cuando la resistencia alcanza una meseta (> 200 Ω·cm²).

2.3 Control de calidad de células en monocapa MDCK-MDR1:

2.3.1 Medición de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER)

Cuando se midió la resistencia eléctrica transepitelial, en primer lugar se sumergió el electrodo en disolución de cultivo de DMEM y se equilibró durante 24 h, después se extrajo el electrodo y se sumergió en alcohol al 70% y se esterilizó durante 15 min, después se puso a temperatura ambiente, se secó de manera natural, y se puso adicionalmente en la disolución de cultivo de DMEM estéril y se equilibró durante 15 min. Durante el experimento, se insertaron secuencialmente los dos extremos del electrodo en los baños superior e inferior de cada pocillo de una placa de cultivo Millicell de 24 pocillos para detectar la resistencia, se midió cualquier punto en cada pocillo tres veces, se registró la resistencia, se midió simultáneamente la resistencia de un pocillo de blanco y se calculó la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) según la siguiente fórmula:

$$TEER = (R_t - R_0) \times S$$

donde, R_t es la resistencia medida; R₀ es la resistencia del pocillo de blanco; y S es el área de membrana efectiva.

2.3.2 Control de calidad de compuesto positivo:

Se tomó Rho-123 (rodamina 123) como compuesto de control de calidad positivo, se diluyó hasta 5 µmol·l⁻¹ con HBSS, en primer lugar se extrajo el medio de cultivo en los pocillos mediante succión antes del experimento, se lavaron los pocillos con disolución HBSS a 37°C dos veces, después se incubaron en una incubadora a 37°C, se añadió Rho-123 a los baños superiores, se añadió disolución HBSS a los baños inferiores, y se incubaron los pocillos en un agitador a temperatura constante. Se recogió la disolución en los baños inferiores a los 0, 30, 90 y 120 min y se almacenó a -20°C para su medición posterior. Se detectó la cantidad de penetración de Rho-123 en los baños inferiores mediante un espectrofotómetro de fluorescencia, en el que se fijó la longitud de onda de transmisión a 430 nm y se fijó la longitud de onda de excitación a 530 nm. El valor de Papp de Rho-123 en el experimento

concuera con informes de la bibliografía.

2.4 Experimento de transporte farmacéutico

Se empapó la placa Millicell inoculada con células con disolución HBSS a 37°C durante un tiempo apropiado antes de la prueba, y se lavó ligeramente para eliminar el material adherido a las superficies de las células. Permeabilidad desde la superficie de la cavidad hasta la superficie basal: se añadieron 0,35 ml de disolución HBSS que contenía fármaco desde el lado apical (AP), mientras que se añadieron 1,2 ml de disolución HBSS de blanco desde el lado basolateral (BL), se pusieron a 37°C, se agitaron a 50 r·min⁻¹, se tomaron muestras de 50 µl de la fase inferior a los 0, 30, 90 y 120 min por separado, y se complementó con el mismo volumen de disolución HBSS de blanco. Se repitió cada concentración en tres pocillos, a la muestra se le añadieron con precisión 50 µl de disolución de patrón interno y 350 µl de acetato de etilo, se agitó y se mezcló uniformemente, se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min, se extrajeron 300 µl de sobrenadante, se volatilizó hasta sequedad, se redisolvió con 50 µl de acetonitrilo y se extrajeron 10 µl para toma de muestras y determinación. Permeabilidad desde la superficie basal hasta la superficie de la cavidad: se añadió fármaco desde el lado basolateral (BL), mientras que se añadió la disolución HBSS de blanco desde el lado apical (AP), y las etapas siguientes fueron las mismas que aquellas en la prueba de permeabilidad desde la superficie de la cavidad hasta la superficie basal.

El coeficiente de permeabilidad aparente (Papp) del fármaco reflejó la capacidad de penetrar a través de las células en monocapa del fármaco y la velocidad y grado de absorción del fármaco, que pueden calcularse mediante la siguiente fórmula:

$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{\Delta t \cdot A \cdot C_0}$$

donde, ΔQ era la cantidad de penetración del fármaco en un periodo de tiempo Δt, A era el área de superficie de las células, concretamente el área (0,6 cm²) de una membrana de soporte en el modelo, y C₀ era la concentración inicial. La unidad de la Papp se representaba comúnmente mediante cm·h⁻¹ o cm·s⁻¹.

2.5 Detección de muestras

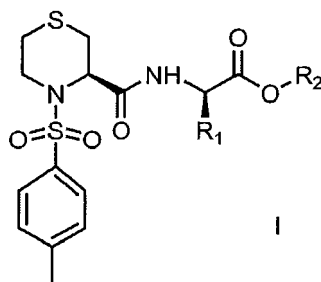
Se detectó la muestra mediante CL/EM. Se cuantificó la concentración de cada muestra con una curva patrón (50 nM-10000 nM).

3. Resultados experimentales

Fármacos	Papp (x10 ⁻⁶)
Rodamina 123	4,89
Ejemplo 6	19,2
Ejemplo 7	49,8
Ejemplo 8	39,5
Ejemplo 9	12,4
Ejemplo 10	34,1
Ejemplo 5	8,38

REIVINDICACIONES

1. Derivado de tiazinamida que tiene una estructura de fórmula I,



o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que,

- 5 R_1 es un alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-6 átomos de carbono; y

R_2 es un alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-4 átomos de carbono o alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-4 átomos de carbono y está sustituido con fenilo.

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que,

R_1 es un alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-4 átomos de carbono; y

- 10 R_2 es un alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-4 átomos de carbono o alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-4 átomos de carbono y está sustituido con fenilo,

o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Compuesto según la reivindicación 1, en el que,

R_1 es un alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-4 átomos de carbono; y

- 15 R_2 es un alquilo de cadena lineal o ramificada con 1-4 átomos de carbono,

o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Compuesto según la reivindicación 1, en el que,

R_1 es un alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-4 átomos de carbono; y

R_2 es alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-4 átomos de carbono y está sustituido con fenilo,

- 20 o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. Compuesto según la reivindicación 1, en el que,

R_1 es isobutilo; y

R_2 es un alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-4 átomos de carbono o alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-4 átomos de carbono y está sustituido con fenilo,

- 25 o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto se selecciona de los siguientes compuestos:

ácido (2R)-4-metil-2-[[[(3R)-4-(tolueno-4-sulfonil)-tiomorfolin-3-carbonil]-amino]-pentanoico,

éster etílico del ácido (2R)-4-metil-2-[[[(3R)-4-(tolueno-4-sulfonil)-tiomorfolin-3-carbonil]-amino]-pentanoico,

- 30 éster propílico del ácido (2R)-4-metil-2-[[[(3R)-4-(tolueno-4-sulfonil)-tiomorfolin-3-carbonil]-amino]-pentanoico,

éster isopropílico del ácido (2R)-4-metil-2-[[[(3R)-4-(tolueno-4-sulfonil)-tiomorfolin-3-carbonil]-amino]-pentanoico,

éster bencílico del ácido (2R)-4-metil-2-[[[(3R)-4-(tolueno-4-sulfonil)-tiomorfolin-3-carbonil]-amino]-pentanoico,

o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. Composición farmacéutica que comprende el compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 5 8. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso como medicamento.
9. Compuesto o sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según la reivindicación 8, en el que el medicamento se usa para la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa provocada por lesión fisiológica o física o lesiones progresivas.
- 10 10. Compuesto o sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según la reivindicación 9, en el que la enfermedad neurodegenerativa se selecciona de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, neuropatía relacionada con inmunodeficiencia adquirida, esclerosis múltiple cerebroespinal, accidente cerebrovascular o lesión cerebral relacionada con estimulación física y diversas enfermedades neurodegenerativas que afectan al
- 15 sistema nervioso central o periférico.