



Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. 05-128040
54. TÍTULO R-QUANTIONERO DE N-PROPARGIL-1-AMINODAN
SALTS, COMPOSICIONES Y USOS DE ESTOS.
51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C07C13/465, A61K31/135, A61P25/00, 25/16
TEVA PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD 25/28.
71. SOLICITANTE TECHNION RESEARCH AND DEVELOPMENT FOUNDATION, LTD
- DOMICILIO ISRAEL
74. APODERADO DIA RODRIGUEZ D'ALEMAN
22. BOGOTÁ, D. C., DICIEMBRE 20. 2005

**FORMULARIO ÚNICO DE REGISTRO DE SOLICITUD DE PATENTE
2000-3**

SOLICITUD DE:	
☒ PATENTE DE INVENCION	☐ PATENTE DE MODELO DE UTILIDAD

2) SOLICITANTE (71)	Nombre: 1. TEVA PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD. 2. TECHNION RESEARCH AND DEVELOPMENT FOUNDATION, LTD. Dirección: 1. 5 Basel Street P.O. Box 3190 Petach-Tikva 49131 Israel. 2. Senate House, Technion City, Park Gootwirt Halfa 32000/IL Israel Nacionalidad o Domicilio: 1. Israel. 2. Israel Lugar de constitución: 1. Israel. 2. Israel Teléfono: Fax: E. Mail:	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO _____
----------------------------	---	--

3) REPRESENTANTE APODERADO	Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN Dirección: Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6 Bogotá D.C. Teléfono: 6181088 Fax: 6350824 E. Mail: info@clarkemodet.com.co	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO: 41.854.882 TP: 20824 CSJ
-----------------------------------	--	---

4) INVENTOR (ES) (72)	Nombre: Folio 3 Dirección: Nacionalidad o Domicilio: Se anexa hoja de Inventores	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO _____
------------------------------	--	--

5) Título (54) R-ENANTIÓMERO DE N-PROPARGIL-1-AMINOIDÁN, SALES, COMPOSICIONES Y USOS DE ESTOS

6) Clasificación internacional (51) C07C013/465, A61K31/135, A61P25/16, 25/28, 25/00.

7) PRIORIDAD	33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☐ NO ☒			

8) Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los:
 6 Meses ☒ 12 Meses ☐ 18 Meses ☐ Otro ☐

9) Comprobante de pago N° 05.94.733 Fecha: Diciembre 13, 2005

P-778
2

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicacion : 85128840 00000000 Folios: 89
Fecha (AMB): 2005-12-20 16:21:14
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 94,733
FECHA : DICIEMBRE 13 DE 2005

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE ROBERT Y CO. COLOMBIA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	42212700	13/12/2005	7,127,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
		TOTAL :	\$ 443,000.

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Nombre:

1. Moussa B.H. Youdim.
2. John P.M. Finberg.
3. Ruth Levy.
4. Jeffery Sterling
5. David Lerner
6. Tirtsah Berger-Paskin.
7. Haim Yellin.
8. Alex Veinberg.

Dirección:

1. 18. Hankin Street 32763 Haifa. Israel.
2. 15 Ben Zvi Street 3600 Tivon Israel.
3. 7 Alterman Street 69415 Tel-Aviv. Israel
4. Ramot 156/1 Jerusalem 97275, Israel.
5. 27/4 Yigal Street, Jerusalem 97241, Israel
6. 16 Akiva Street Raana 43262, Israel.
7. 45 Hayarden Street Ramat-Gan 52333, Israel.
8. 5 Aharoni Street Rehovoth, Israel

Nacionalidad o Domicilio:

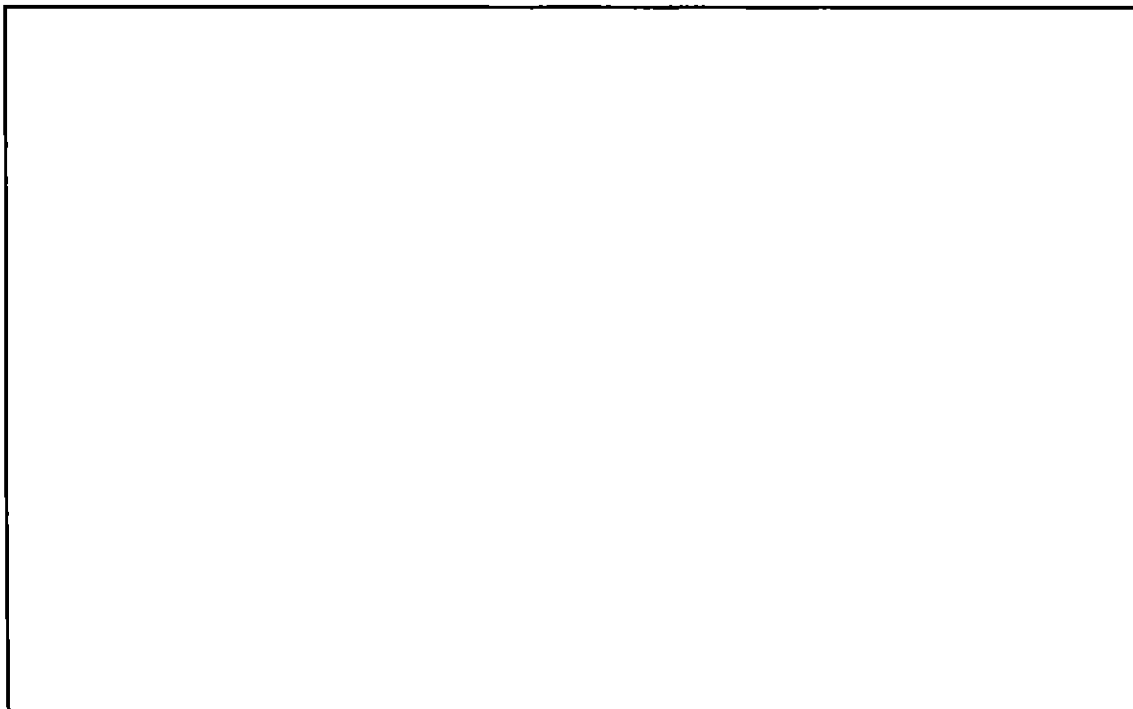
1. Israel.
2. Israel.
3. Israel.
4. Estados Unidos de América
5. Estados Unidos de América
6. Israel.
7. Israel.
8. Israel.

10)

ANEX S

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Certificado de existencia representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuera el caso
- ☐ Copia certificada de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☒ Descripción de la invención
- ☒ Una o más reivindicaciones
- ☐ Dibujos y/o planos
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12

11) FIGURA CARACTERÍSTICA:



12)

NOMBRE: DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA

C.C. 41.654.882 de Bogotá TP 20824 CSJ

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1.

La presente invención se refiere al campo de los inhibidores irreversibles selectivos de la enzima monoamina oxidasa (en lo sucesivo denominada MAO) y proporciona el enantiómero R(+) de N-propargil-1-aminoindano (también denominado en la presente memoria PAI) que es un inhibidor irreversible selectivo de la forma B de la enzima monoamina oxidasa (en lo sucesivo denominada MAO-B). La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que contienen [R](+) PAI que son particularmente útiles para el tratamiento de una lesión neurotóxica, isquemia cerebral, una lesión por traumatismo craneal, una lesión de la médula espinal, esclerosis múltiple y síntomas de abstinencia.

15 II.

La MAO existe en dos formas conocidas como MAO-A y MAO-B que son selectivas por diferentes sustratos e inhibidores. Por ejemplo, MAO-B metaboliza de forma más eficaz sustratos tales como 2-feniletilamina y es inhibida de forma selectiva e irreversible por (-)-deprenilo como se describe más adelante.

No obstante, se apreciará que los tratamientos que combinan L-DOPA con un inhibidor de MAO-A y MAO-B no son deseables, puesto que éstos conducen a efectos secundarios adversos relacionados con un mayor nivel de catecolaminas en toda la neuraxa. Por otro lado, la inhibición completa de MAO también es indeseable puesto que potencia la acción de aminas simpaticomiméticas tales como tiramina, conduciendo al denominado "efecto queso" (revisado por Youdim et al., Handbook of Experimental Pharmacology, publicado por Trendelenburg and Weiner, Springer-Verlag, 90, capítulo 3 (1988)). Puesto que se demostró que MAO-B era la forma predominante de MAO en el cerebro, los inhibidores selectivos de esta forma se consideran de este modo una posible herramienta para conseguir, por un lado, una disminución en la descomposición de dopamina, junto con una minimización de los efectos sistémicos de la inhibición total de MAO por otro.

35

Muchos inhibidores de MAO son moléculas quirales. Aunque un enantiómero muestra con frecuencia cierta estereoselectividad en la potencia relativa hacia

MAO-A y MAO-B, una configuración enantiomérica dada no siempre es más selectiva que su isómero imagen especular al discriminar entre MAO-A y MAO-B.

- 5 La Tabla I presenta la Cl_{50} (nmol/l) de parejas de enantiómeros de propargilaminas en preparaciones de MAO de cerebro de rata. Estos resultados muestran pequeñas diferencias en la potencia en la inhibición de MAO-B entre los enantiómeros R y S. (B. Hazelhoff, et al., Naunyn-Schneideberg's Arch. Pharmacol., 330, 50 (1985)). Ambos enantiómeros son
- 10 selectivos por MAO-B. En 1987, Magyar, et al. describieron que R-(-)-deprenilo es 500 veces más potente que el enantiómero S(+) en la inhibición de la desaminación oxidativa de tiramina por homogenizado de cerebro de rata. (K. Magyar, et al., Act. Physiol. Acad. Sci., Hung., 32, 377 (1987)).
- 15 En homogenizado de hígado de rata, R-deprenilo es solo 15 veces más potente que el enantiómero S. En otros ensayos de actividad farmacológica, tales como para la inhibición de la recaptación de tiramina, deprenilo muestra diferentes estereoselectividades. La forma S es en ciertos casos el epímero más potente. (J. Knoll and K. Magyar, Advances in Biochemical
- 20 Psychopharmacology, 5, 393 (1972)).

N-metil-N-propargil-2-aminotetralina (2-MPAT) es un análogo estructural similar de deprenilo. La estereoquímica absoluta de 2-MPAT no se ha asignado. Sin embargo, el isómero (+) es selectivo por MAO-B y el isómero (-) es selectivo

- 25 por MAO-A. La diferencia en la potencia entre los enantiómeros de 2-MPAT es menor que 5 veces. (B. Hazelhoff, et al., id.). Los enantiómeros de N-propargil-1-aminotetralina (1-PAT) también tienen actividad similar. La falta de datos en la Tabla I que muestra una clara relación estructura-actividad entre 2-MPAT (+) o (-) hace imposible predecir su estereoquímica absoluta.

- 30 Después de un modelado por ordenador extensivo, Polymeropoulos predijo recientemente que (R)-N-metil-N-propargil-1-aminoindano (R-1-MPAI) sería más potente que (S) como inhibidor de MAO-B. (E. Polymeropoulos, Inhibitors of Monoamine Oxidase B, I. Szelenyi, ed., Birkhauser Verlag, página 110
- 35 (1983)). No obstante, los experimentos descritos muestran que R-1-MPAI es un inhibidor ligeramente más potente de MAO-B que lo es S-1-MPAI, pero que es un inhibidor incluso más potente de MAO-A. Tanto la selectividad entre MAO-A

y B como la potencia relativa de los epímeros R y S son bajas. Así, al contrario de lo esperado en la técnica, 1-MPAI no es útil como agente farmacológico.

- 5 Los datos presentados más adelante demuestran que la alta selectividad por MAO de un enantiómero frente al otro no se puede predecir. La estructura del sitio activo de MAO no se entiende suficientemente bien para permitir la predicción de la potencia relativa o selectividad de cualquier compuesto dado o pareja de enantiómeros del mismo.

10 Tabla IA Datos de IC_{50} (mmol/l) para la inhibición de MAO de cerebro de rata por propargilaminas

Compuesto	Epímero	Inhibición			Potencia relativa	
		A	B	A/B	A	B
REF						
2-MPAI	+	140	16	8,8		
	a				3	0,2
	-	45	88	0,5		
DEPRENILO	S	3800	16	120		R/S
	a				80	2,8
	R	450	6	75		
1-MPAI	S	70	50	1,4		
	b				23	5
	R	3	10	0,3		
1-PAT	S	3800	50	76		
	c				4	0,5
	R	900	90	10		
a	B. Hazelhoff, et al., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 330, 50 (1985).					
b	Solicitud de patente europea 436.492 A2, publicada el 10 de julio de 1991.					
c	Autores de la presente invención.					

- 15 Un inhibidor de MAO-B selectivo, (-)-deprenilo, se ha estudiado de forma extensa y usado como inhibidor de MAO-B para aumentar el tratamiento con L-DOPA. Este tratamiento con (-)-deprenilo es por lo general favorable y no

causa el "efecto queso" en dosis que causan casi la inhibición completa de MAO-B (Elsworth, et al., *Psychopharmacology*, 57, 33 (1978)). Además, la adición de (-)-deprenilo a una combinación de L-DOPA y un inhibidor de descarboxilasa administrado a pacientes con Parkinson conduce a mejoras en la acinesia y capacidad funcional general, así como a la eliminación de fluctuaciones del tipo "conectado-desconectado" (revisado por Birkmayer & Riederer en "Parkinson's Disease," Springer-Verlag, páginas 138-149 (1983)). Así, (-)-deprenilo (a) mejora y prolonga el efecto de L-DOPA y, (b) no aumenta los efectos adversos del tratamiento con L-DOPA.

10

No obstante, (-)-deprenilo no está exento de sus propios efectos secundarios adversos, que incluyen activación de úlceras gástricas previamente existentes y episodios ocasionales de hipertensión. Por otro lado, (-)-deprenilo es un derivado de amfetamina y se metaboliza a amfetamina y metanfetaminas, sustancias que pueden conducir a efectos secundarios indeseados tales como aumento de la frecuencia cardíaca (Simpson, *Biochemical Pharmacology*, 27, 1951 (1978); Finberg, et al., en "Monoamine Oxidase Inhibitors - The State of the Art," Youdim and Paykel, eds., Wiley, páginas 31-43 (1981)).

20

Se han descrito otros compuestos que son inhibidores reversibles selectivos de MAO-B pero que están exentos de los efectos indeseables asociados con (-)-deprenilo. Uno de tales compuestos, a saber, N-propargil-1-aminoindano-HCl (PAI-HCl racémico), se describió en los documentos GB 1.003.686 y GB 1.037.014 y en la patente de Estados Unidos n° 3.513.244, expedida el 19 de mayo de 1970. PAI-HCl racémico es un inhibidor irreversible selectivo potente de MAO-B, no se metaboliza a amfetaminas y no da lugar a efectos simpaticomiméticos indeseados.

25

En ensayos animales comparativos, PAI racémico mostró que tenía ventajas considerables sobre (-)-deprenilo. Por ejemplo, PAI racémico no produce taquicardia significativa, no aumenta la tensión arterial (efectos producidos por dosis de 5 mg/kg de (-)-deprenilo) y no conduce a contracción de la membrana del párpado o a aumento en la frecuencia cardíaca en dosis de hasta 5 mg/kg (efectos causados por (-)-deprenilo en dosis mayores de 0,5 mg/kg). Además, PAI-HCl racémico no potencia los efectos cardiovasculares de tiramina (Finberg, et al., en "Enzymes and Neurotransmitters in Mental Disease," páginas 205-219 (1980), Uedin, et al., Eds., Wiley, New York; Finberg, et al.

30

35

(1981), en "Monoamine Oxidase Inhibitors - The State of the Art," *ibid.* Finberg and Youdim, *British Journal Pharmacol.*, **85**, 451 (1985)).

Un objeto subyacente de esta invención fue separar los compuestos PAI
5 racémicos y obtener un enantiómero con actividad inhibitoria de MAO-B que
estuviera exento de efectos secundarios indeseables asociados con el otro
enantiómero.

Puesto que deprenilo tiene una estructura similar a PAI y se conoce que el
10 enantiómero (-) de deprenilo, es decir, (-)-deprenilo es considerablemente más
activo farmacéuticamente que el enantiómero (+), sería de esperar que el
enantiómero (-) de PAI fuera el inhibidor de MAO-B más activo.

No obstante, al contrario de lo esperado, tras la resolución de los
15 enantiómeros, se encontró que el enantiómero (-)-PAI es de hecho el inhibidor
de MAO-B activo mientras que el enantiómero (-) muestra una actividad
inhibidora de MAO-B extremadamente baja. Por otro lado, el enantiómero (+)-
PAI también tiene un grado de selectividad por la inhibición de MAO-B
20 sorprendentemente mayor que la de la forma racémica correspondiente, y por
ello tiene menos efectos secundarios indeseables en el tratamiento de
enfermedades indicadas que los que tendría la mezcla racémica. Estos
hallazgos se basan en experimentos *in vivo* e *in vitro* como se describe con
más detalle a continuación.

25 Se demostró por consiguiente que (+)-PAI tiene la configuración absoluta R.
Este hallazgo también fue sorprendente en base a la similitud estructural
esperada de analogía de (+)-PAI con deprenilo y las anfetaminas.

El alto grado de estereoselectividad de actividad farmacológica entre [R](+)-PAI
30 y el enantiómero S(-) como se describe más adelante es considerable. El
compuesto [R](+)-PAI es casi cuatro órdenes de magnitud más activo que el
enantiómero S(-) en la inhibición de MAO-B. Esta relación es significativamente
mayor que la observada entre los dos enantiómeros de deprenilo (Knoll and
Magyar, *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **5**, 393 (1972); Magyar, *et al.*, *Acta*
35 *Physiol. Acad. Sci. Hung.*, **32**, 377 (1967)). Además, en algunos ensayos
fisiológicos, se describió que (+)-deprenilo tiene actividad igual, o incluso mayor
que la del enantiómero (-) (Tokes, *et al.*, *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, **40**, 653

(1988)).

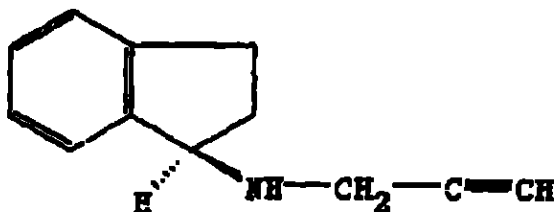
MPAI es un inhibidor más potente de la actividad de MAO, pero con menor selectividad por MAO-B sobre A (Tipton, et al., Biochem. Pharmacol., 31, 1250 (1982)). Como se observó sorprendentemente un pequeño grado de diferencia en las actividades relativas de los dos enantiómeros resueltos con MPAI, el comportamiento notable de [R](+)-PAI se pone de manifiesto aun más (véase la Tabla 1B).

- 10 La solicitud de patente europea nº 0 436 492 B1 describe el uso de R-PAI y sus sales hidrocianuro y L-tartrato para el tratamiento de enfermedad de Parkinson, trastornos de la memoria, demencia del tipo Alzheimer, depresión y síndrome del niño hiperactivo.
- 15 La presente invención también proporciona el uso del enantiómero de PAI solo farmacéuticamente activo (sin L-DOPA) para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una lesión neurotóxica, lesión por isquemia cerebral, un traumatismo craneal, una lesión de la médula espinal, esclerosis múltiple o síntomas de abstinencia (véase la revisión por
- 20 Youdim, et al., en Handbook of Experimental Pharmacology, Trendelenberg and Wiener, eds., 90/1, capítulo. 3 (1988)).

Finalmente, la presente invención proporciona sales muy estables de [R](+)-PAI con propiedades farmacéuticas superiores. La sal mesíto es especialmente estable, presenta una selectividad inesperadamente superior y presenta efectos secundarios inesperadamente menores que las sales racémicas correspondientes.

Sumario de la invención

- 30 La presente invención proporciona el uso según la reivindicación 1 de R(+)-N-propargil-1-aminoindano que tiene la estructura:



La presente invención proporciona además una sal farmacéuticamente aceptable de R(+)-N-propargil-1-aminoindano según la reivindicación 3.

5 La presente invención proporciona además una composición farmacéutica según la reivindicación 7 que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una sal farmacéuticamente aceptable de R(+)-N-propargil-1-aminoindano y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 La presente invención proporciona además el uso de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para la preparación de una composición farmacéutica para tratar un paciente que padece una lesión neurotóxica.

15 La presente invención proporciona además el uso de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para la preparación de una composición farmacéutica para tratar un paciente que padece isquemia cerebral.

20 La presente invención proporciona además el uso de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para la preparación de una composición farmacéutica para tratar un paciente que padece lesión por traumatismo craneal.

25 La presente invención proporciona además el uso de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para la preparación de una composición farmacéutica para tratar un paciente que padece lesión de la médula espinal por traumatismo.

30 La presente invención proporciona además el uso de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para la preparación de una composición farmacéutica para tratar un paciente que padece esclerosis múltiple.

35 La presente invención proporciona además el uso de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para la preparación de una composición farmacéutica para prevenir lesiones nerviosas en un sujeto.

La presente invención proporciona además el uso de R(+)-N-propargil-1-aminolindano o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para la preparación de una composición farmacéutica para tratar un paciente que
5 padece síntomas de abstinencia de una sustancia adictiva.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una representación gráfica de los resultados según el Ejemplo 22 que muestra la actividad inhibidora de MAO-A *in vitro*.

10

La Figura 2 es una representación gráfica de los resultados según el Ejemplo 22 que muestra la actividad inhibidora de MAO-B *in vitro*.

La Figura 3A es una representación gráfica de los resultados según el Ejemplo
15 22 que muestra la actividad de MAO en tejido cortical humano. El sustrato es feniletilamina (PEA) marcada con ^{14}C .

La Figura 3B es una representación gráfica de los resultados según el Ejemplo 22 que muestra la actividad de MAO en tejido cortical humano. El sustrato es 5-
20 hidroxitriptamina (5-HT) marcada con ^{14}C .

La Figura 4 es una representación gráfica de los resultados según el Ejemplo 23 que muestra la inhibición aguda (i.p.) de MAO-A en el cerebro.

25 La Figura 5 es una representación gráfica de los resultados según el Ejemplo 23 que muestra la inhibición aguda (i.p.) de MAO-B en el cerebro.

La Figura 6 es una representación gráfica de los resultados según el Ejemplo 23 que muestra la inhibición aguda (i.p.) de MAO-A en el hígado.

30

La Figura 7 es una representación gráfica de los resultados según el Ejemplo 23 que muestra la inhibición aguda (i.p.) de MAO-B en el hígado.

La Figura 8 es una representación gráfica de los resultados según el Ejemplo
35 23 que muestra la inhibición aguda (oral) de MAO-A en el cerebro.

La Figura 9 es una representación gráfica de los resultados según el Ejemplo

23 que muestra la inhibición aguda (oral) de MAO-B en el cerebro.

La Figura 10 es una representación gráfica de los resultados según el Ejemplo 23 que muestra la inhibición aguda (oral) de MAO-A en el hígado.

5

La Figura 11 es una representación gráfica de los resultados según el Ejemplo 23 que muestra la inhibición aguda (oral) de MAO-B en el hígado.

La Figura 12 es una representación gráfica de los resultados según el Ejemplo

10 24 que muestra la inhibición crónica de MAO-A en el cerebro.

La Figura 13 es una representación gráfica de los resultados según el Ejemplo 24 que muestra la inhibición crónica de MAO-B en el cerebro.

15 La Figura 14 es una representación gráfica de los resultados según el Ejemplo 24 que muestra la inhibición crónica de MAO-A en el hígado.

La Figura 15 es una representación gráfica de los resultados según el Ejemplo 24 que muestra la inhibición crónica de MAO-B en el hígado.

20

La Figura 16 es una representación gráfica de los resultados según el Ejemplo 25 que muestra la actividad de MAO-B en cerebro de rata en función del tiempo después de administración i.p. de [R](+)-PAI.

25 La Figura 17 es una representación gráfica de los resultados según el Ejemplo 32 que muestra la restauración de la normocinesia en ratones que han recibido haloperidol 6 mg/kg s.c.. Los ratones recibieron cada uno de los fármacos de ensayo i.p. en la dosis indicada. 2 horas después recibieron haloperidol. Se determinaron las puntuaciones cinéticas 3 horas después del haloperidol. Estas
30 puntuaciones consistían en la capacidad de desplazarse horizontalmente a lo largo de una barra, la capacidad para descender una barra vertical y la reducción de la catalepsia. En ausencia de haloperidol, la puntuación máxima fue 12, con haloperidol solo, $6,6 \pm 0,03$. La significación estadística se calculó por la prueba *t* de Student: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ con respecto a
35 haloperidol solo. Las puntuaciones de [R](+)-PAI son significativamente distintas de las de PAI racémico en 5 mg/kg ($p \leq 0,05$), en 10 mg/kg ($p \leq 0,01$) y en 15 mg/kg ($p \leq 0,05$), ($n=5,6$). La dosis mostrada es para la base libre de PAI y no

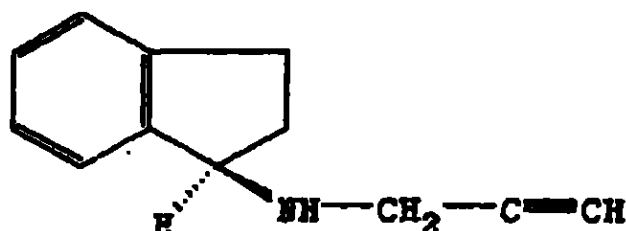
para la sal mesíto).

La Figura 18 es una representación gráfica de los resultados según el Ejemplo 32 que muestran la restauración de la actividad motora en ratas tratadas con α -metil-p-tirosina en dosis de 100 mg/kg i.p. Las ratas recibieron el fármaco de ensayo i.p. en las dosis indicadas. Después de dos horas recibieron α -Mpt y se colocaron inmediatamente en jaulas de actividad. Se registro la actividad motora total durante 10 horas. Ratas control, tratadas con solución salina, solo registraron 15.862 ± 1424 . Con α -Mpt sola, alcanzaron 8.108 ± 810 . Significación estadística por la prueba "t" de Student: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ con respecto a α -Mpt sola. Las puntuaciones de [R](+)-PAI son significativamente distintas de PAI racémico en 2 mg/kg ($p \leq 0,01$), (n=6). La dosis mostrada es para la base libre de PAI y no para la sal mesíto.

La Figura 19 es un gráfico que muestra la respuesta de NADH a 2 minutos de anoxia medida 30 minutos después de la lesión y a intervalos de media hora después de la misma.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona el uso según la reivindicación 1 de R(+)-N-propargil-1-aminoindano que tiene la estructura:



Como se demuestra en los Ejemplos experimentales más adelante, [R](+)-PAI es casi 7.000 veces más activo como inhibidor de MAO-B que [S](-)-PAI. A la vista de los inhibidores de MAO-B conocidos en la técnica que poseen baja selectividad entre MAO-A y MAO-B, y que no muestran tendencia predecible en la potencia como función de la configuración R o S, la selectividad y potencia de [R](+)-PAI son inesperadas.

[R](+)-PAI se puede obtener por resolución óptica de mezclas racémicas de los enantiómeros R y S de PAI. Dicha resolución se puede llevar a cabo por

cualquier procedimiento convencional de resolución bien conocido por un experto en la técnica, tal como los descritos en J. Jacques, A. Collet and S. Wilen, "Enantiomers, Racemates and Resolutions," Wiley, New York (1981). Por ejemplo, la resolución se puede llevar a cabo por cromatografía preparativa en una columna quiral. Otro ejemplo de un procedimiento de resolución adecuado es la formación de sales diastereoisoméricas con un ácido quiral tal como ácido tartárico, málico, mandólico o derivados N-acetil de aminoácidos, tales como N-acetil leucina, seguido por recristalización para aislar la sal diastereoisomérica del enantiómero R deseado.

10

La mezcla racémica de los enantiómeros R y S de PAI se puede preparar, por ejemplo, como se describe en los documentos GB 1.003.676 y GB 1.037.014. La mezcla racémica de PAI también se puede preparar haciendo reaccionar 1-cloroindano con propargilamina. De forma alternativa, este racemato se puede preparar haciendo reaccionar propargilamina con 1-indanona para formar la imina correspondiente, seguido por reducción del doble enlace carbono-nitrógeno de la imina con un agente adecuado, tal como borohidruro sódico.

15

Conforme a esta invención, el enantiómero R de PAI también se puede preparar directamente a partir del enantiómero R ópticamente activo de 1-aminoindano por reacción con bromuro de propargilo o cloruro de propargilo o bencenosulfonato de propargilo en presencia de una base orgánica o inorgánica y, opcionalmente, en presencia de un disolvente adecuado.

20

Bases orgánicas o inorgánicas adecuadas para usar en la reacción anterior incluyen, a modo de ejemplo, trietilamina, piridina, carbonatos y bicarbonatos de metales alcalinos. Si la reacción se lleva a cabo en presencia de un disolvente, el disolvente se puede elegir de, por ejemplo, tolueno, cloruro de metileno y acetonitrilo. Un procedimiento para preparar [R](+)PAI es hacer reaccionar R-1-aminoindano con cloruro de propargilo usando bicarbonato potásico como base y acetonitrilo como disolvente.

30

La reacción descrita antes de 1-aminoindano da como resultado por lo general una mezcla de amina primaria sin reaccionar, la amina secundaria deseada y la amina terciaria N,N-bispropargilamino producto. La amina secundaria deseada, es decir, N-propargil-1-aminoindano, se puede separar de esta mezcla por un procedimiento convencional de separación que incluye, a modo de ejemplo,

35

cromatografía, destilación y extracción selectiva.

El material de partida R-1-aminoindano se puede preparar por procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, a modo de ejemplo, el procedimiento de
5 Lawson and Rao, *Biochemistry*, **19**, 2133 (1980), procedimientos en las referencias citadas en el mismo y el procedimiento de la patente europea nº 235.590.

R-1-aminoindano también se puede preparar por resolución de una mezcla
10 racémica de los enantiómeros R y S, que implica, por ejemplo, la formación de sales diastereoisoméricas con ácidos quirales, o cualquier otro procedimiento tal como el descrito en J. Jacques, *et al.*, *Ibid.* Como alternativa, se puede preparar R-1-aminoindano haciendo reaccionar 1-indanona con una amina
15 ópticamente activa, seguido por reducción del doble enlace carbono-nitrógeno de la imina resultante por hidrogenación sobre un catalizador adecuado, tal como paladio sobre carbón, óxido de platino o níquel Raney. Aminas ópticamente activas adecuadas incluyen, por ejemplo, una de las antípodas de fenetilamina o un éster de un aminoácido, tal como valina o fenilalanina. El
20 enlace N-C bencílico se puede romper posteriormente por hidrogenación en condiciones no vigorosas.

Un procedimiento adicional para preparar R-1-aminoindano es la hidrogenación de éteres de oxima Indan-1-ona como se ha descrito antes, en los que la
25 porción alquilo del éter contiene un centro quiral ópticamente puro. Como alternativa, se puede reducir un derivado no quiral de Indan-1-ona que contenga un doble enlace carbono-nitrógeno, tal como una imina u oxima, con un agente reductor quiral, por ejemplo, un complejo de hidruro de litio y aluminio y efedrina.

30 La presente invención proporciona además una sal farmacéuticamente aceptable de R(+)-N-propargil-1-aminoindano según la reivindicación 3.

Salas farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque sin quedar limitadas a las mismas, las sales mesilato, maleato, fumarato, tartrato, hidrocloruro,
35 hidrobromuro, esilato, p-toluenosulfonato, benzoato, acetato, fosfato y sulfato.

En una realización, la sal se selecciona del grupo formado por sal mesilato de

R(+)-N-propargil-1-aminoindano, sal mesilato de R(+)-N-propargil-1-aminoindano y la sal sulfato de R(+)-N-propargil-1-aminoindano.

5 Como se demuestra más adelante en los Ejemplos experimentales, la sal mesilato es muy estable a la degradación térmica y presenta una selectividad inesperadamente superior por MAO-B con respecto a la sal racémica.

10 Para la preparación de sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables del compuesto de [R](+)-PAI, se puede hacer reaccionar la base libre con los ácidos deseados en presencia de un disolvente adecuado por procedimientos convencionales. De igual modo, se puede convertir una sal de adición de ácidos en la forma base libre de una manera conocida.

Un modo preferido de preparar la sal mesilato de [R](+)-PAI comprende (a) 15 añadir una solución acuosa de hidróxido sódico al 15% a una solución de bencenosulfonato (o tosilato o mesilato) de propargilo en tolueno; (b) agitar durante 5 horas; (c) añadir más tolueno y agua; (d) separar y lavar la fase orgánica con hidróxido sódico al 10% y luego diluir con agua; (e) ajustar el pH de la mezcla a 3,2 añadiendo ácido sulfúrico acuoso al 10%; (f) separar la fase 20 acuosa y ajustar el pH a 7,3 con hidróxido sódico al 10%; (g) extraer tres veces con tolueno mientras se mantiene constante el pH; (h) concentrar las fases orgánicas reunidas a vacío dando un aceite amarillo; (i) disolver el aceite y ácido L-tartárico en isopropanol; (j) calentar hasta reflujo durante 1 hora; (k) enfriar hasta temperatura ambiente y recoger el precipitado por filtración; (l) 25 recristalizar el tartrato de di-propargilaminoindano bruto en metanol/isopropanol (1:1) dando tartrato de di(R(+)-N-propargil-1-aminoindano); (m) disolver la sal tartrato y ácido metanosulfónico en isopropanol, y calentar hasta reflujo durante 30 minutos; y (n) enfriar hasta temperatura ambiente y recoger el R(+)-N-propargil-1-aminoindano precipitado.

30

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica según la reivindicación 7 que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una sal farmacéuticamente aceptable de R(+)-N-propargil-1-aminoindano y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La "cantidad terapéuticamente 35 eficaz" de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o de su sal farmacéuticamente aceptable se puede determinar conforme a procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Sales posibles útiles para dichas composiciones incluyen las sales mesilato, estato y sulfato.

- 5 Estas composiciones se pueden preparar como medicamentos para su administración por vía oral, parenteral, rectal o transdérmica.

En una realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un sólido y la composición farmacéutica es un comprimido. La cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una cantidad de 0,1 mg a 100 mg. La cantidad terapéuticamente eficaz también puede ser una cantidad de 1 mg a 10 mg.

- 10 Formas adecuadas para administración oral incluyen comprimidos, pastillas comprimidas o revestidas, grageas, sobresillos, cápsulas de gelatina dura o blanda, comprimidos sublinguales, jarabes y suspensiones.

- En una realización alternativa, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un líquido y la composición farmacéutica es una solución inyectable. La cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una cantidad de 0,1 mg/ml a 100 mg/ml. La cantidad terapéuticamente eficaz puede ser también una cantidad de 1 mg/ml a 10 mg/ml. En una realización, la dosis administrada es una cantidad que varía de 0,1 ml a 1,0 ml.

- En otra realización alternativa, el vehículo es un gel y la composición farmacéutica es un supositorio.

- Para administración parenteral, la invención proporciona ampollas o viales que incluyen una solución o emulsión acuosa o no acuosa. Para administración rectal, se proporcionan supositorios con vehículos hidrófilos o hidrófobos. Para aplicación tópica como pomadas y liberación transdérmica se proporcionan sistemas de liberación adecuados conocidos en la técnica.

En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es una sal mesilato.

35

Estas composiciones se pueden usar solas para tratar los trastornos anteriormente citados o, de forma alternativa, como en el caso de enfermedad

de Parkinson, por ejemplo, se pueden usar como adyuvante a los tratamientos convencionales con L-DOPA.

Las dosificaciones preferidas del ingrediente activo, es decir, [R](+)-PAI, en las composiciones anteriores están dentro de los siguientes intervalos. Para formulaciones orales o en supositorio, se pueden tomar al día de 0,1 a 100 mg por dosis unitaria, y preferiblemente se toman al día de 1 a 10 mg por dosis unitaria. Para formulaciones inyectables, se pueden tomar al día de 0,1 a 100 mg/ml por dosis unitaria y, preferiblemente, se toman al día de 1 a 10 mg/ml por dosis unitaria.

En una realización, la composición farmacéutica comprende además una cantidad terapéuticamente eficaz de Levodopa. En otra realización, la composición farmacéutica comprende además una cantidad eficaz de un inhibidor de descarboxilasa.

La cantidad de inhibidor de descarboxilasa administrada en combinación con [R](+)-PAI o una de sus sales farmacéuticamente aceptables es una cantidad eficaz para garantizar la recaptación de L-DOPA en el sujeto.

El inhibidor de descarboxilasa puede ser L-Carbidopa. En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de R(+)-N-propargil-1-aminoindano varía de 0,1 mg a 100 mg, la cantidad terapéuticamente eficaz de Levodopa varía de 50 a 250 mg y la cantidad eficaz de L-Carbidopa varía de 10 mg a 25 mg.

El inhibidor de descarboxilasa puede ser benserazida. En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de R(+)-N-propargil-1-aminoindano varía de 0,1 mg a 100 mg, la cantidad terapéuticamente eficaz de Levodopa varía de 50 a 200 mg y la cantidad eficaz de benserazida varía de 12,5 mg a 50 mg.

La presente invención proporciona además un procedimiento para tratar un sujeto que padece enfermedad de Parkinson que comprende administrar al sujeto una cantidad de la sal mesilato o esilato o sulfato de R(+)-N-propargil-1-aminoindano de la presente invención eficaz para tratar enfermedad de Parkinson en el sujeto.

Procedimientos de tratamiento de la enfermedad de Parkinson que combinan el

uso de las sales de [R](+)PAI anteriormente citadas con otros fármacos, tales como agonistas de la dopamina, bromcriptina, pergolida, lisurida, así como inhibidores de la catecolamina oxidasa metil transferasa están dentro del alcance de la presente invención.

5

En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es una sal mesilato.

La administración puede comprender administración por vía oral,
10 administración por vía rectal, administración por vía transdérmica o administración por vía parenteral.

El procedimiento puede comprender además administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de Levodopa. El procedimiento comprende además
15 administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de descarboxilasa.

El inhibidor de descarboxilasa puede ser L-Carbidopa. Como alternativa, el inhibidor de descarboxilasa puede ser benserazida.

20 La presente invención proporciona además un procedimiento para tratar un sujeto que padece un trastorno de la memoria que comprende administrar al sujeto una cantidad de la sal mesilato o esilato o sulfato de R(+)-N-propargil-1-aminoindano de la presente invención eficaz para tratar el trastorno de la memoria en el sujeto.

25

La presente invención proporciona además un procedimiento para tratar un sujeto que padece demencia que comprende administrar al sujeto una cantidad de la sal mesilato o esilato o sulfato de R(+)-N-propargil-1-aminoindano de la presente invención eficaz para tratar demencia en el sujeto. En una realización,
30 la demencia es demencia del tipo Alzheimer (DAT).

La presente invención proporciona además un procedimiento para tratar un sujeto que padece depresión que comprende administrar al sujeto una cantidad de la sal mesilato o esilato o sulfato de R(+)-N-propargil-1-aminoindano de la presente invención eficaz para tratar depresión en el sujeto.
35

La presente invención proporciona además un procedimiento para tratar un

sujeto que padece síndrome de hiperactividad que comprende administrar al sujeto una cantidad de la sal mesilato o esilato o sulfato de R(+)-N-propargil-1-aminoindano de la presente invención eficaz para tratar síndrome de hiperactividad en el sujeto.

5

La administración puede comprender administración por vía oral, administración por vía rectal o administración por vía parenteral.

10 La presente invención proporciona además un procedimiento para tratar un sujeto que padece una enfermedad afectiva que comprende administrar al sujeto una cantidad de la sal mesilato o esilato o sulfato de R(+)-N-propargil-1-aminoindano de la presente invención eficaz para tratar la enfermedad afectiva en el sujeto.

15 La presente invención proporciona además un procedimiento para tratar un sujeto que padece una enfermedad neurodegenerativa que comprende administrar al sujeto una cantidad de la sal mesilato o esilato o sulfato de R(+)-N-propargil-1-aminoindano de la presente invención eficaz para tratar la enfermedad neurodegenerativa en el sujeto.

20

La presente invención proporciona además un procedimiento para tratar un sujeto que padece una lesión neurotóxica que comprende administrar al sujeto una cantidad de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o de sus sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención eficaz para tratar la
25 lesión neurotóxica en el sujeto.

La presente invención proporciona además un procedimiento para tratar un sujeto que padece isquemia cerebral que comprende administrar al sujeto una cantidad de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o de sus sales farmacéuticamente
30 aceptables de la presente invención eficaz para tratar isquemia cerebral en el sujeto.

La presente invención proporciona además un procedimiento para tratar un sujeto que padece una lesión por traumatismo craneal que comprende
35 administrar al sujeto una cantidad de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o de sus sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención eficaz para tratar la lesión por traumatismo craneal en el sujeto.

La presente invención proporciona además un procedimiento para tratar un sujeto que padece una lesión de la médula espinal que comprende administrar al sujeto una cantidad de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o de sus sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención eficaz para tratar la lesión de la médula espinal en el sujeto.

La presente invención proporciona además un procedimiento para tratar un sujeto que padece esquizofrenia que comprende administrar al sujeto una cantidad de la sal mesilato o esilato o sulfato de R(+)-N-propargil-1-aminoindano de la presente invención eficaz para tratar esquizofrenia en el sujeto.

La presente invención proporciona además un procedimiento para tratar un sujeto que padece un trastorno por déficit de atención que comprende administrar al sujeto una cantidad de la sal mesilato o esilato o sulfato de R(+)-N-propargil-1-aminoindano de la presente invención eficaz para tratar el trastorno por déficit de atención en el sujeto.

La presente invención proporciona además un procedimiento para tratar un sujeto que padece esclerosis múltiple que comprende administrar al sujeto una cantidad de la sal mesilato o esilato o sulfato de R(+)-N-propargil-1-aminoindano de la presente invención eficaz para tratar esclerosis múltiple en el sujeto.

La presente invención proporciona además un procedimiento para prevenir una lesión nerviosa en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad de la sal mesilato o esilato o sulfato de R(+)-N-propargil-1-aminoindano de la presente invención eficaz para prevenir una lesión nerviosa en el sujeto.

En una realización, la lesión nerviosa es lesión nerviosa estructural. En otra realización, la lesión nerviosa estructural es lesión en el nervio óptico.

La presente invención proporciona además un procedimiento para tratar un sujeto que padece síntomas de abstinencia de una sustancia adictiva que comprende administrar al sujeto una cantidad de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o de sus sales farmacéuticamente aceptables de la presente

invención eficaz para tratar los síntomas de abstinencia en el sujeto.

Tal y como se usa en la presente memoria, el la expresión "síntomas de abstinencia" se refiere a los síntomas físicos y/o psicológicos, incluyendo deseo
5 irreprimible de drogas, depresión, irritabilidad, anergia, desmotivación, cambio en el apetito, náuseas, agitación e irregularidad en el sueño.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "sustancia adictiva" incluye, a modo de ejemplo, (a) opiáceos adictivos tales como opio, heroína y
10 morfina, (b) psicoestimulantes tales como cocaína, anfetaminas y metanfetaminas, (c) alcohol, (d) nicotina, (e) barbitúricos y (f) narcóticos tales como fentanilo, codeína, difenoxilato y tebaina.

En una realización, la sustancia adictiva es cocaína. En otra realización, la
15 sustancia adictiva es alcohol.

Se puede preparar R(+)-N-propargil-1-aminoindano poniendo en contacto, en presencia de una base orgánica o inorgánica, R(-)-aminoindano con bromuro de propargilo o cloruro de propargilo o bencenosulfonato de propargilo, para así
20 formar R(+)-N-propargil-1-aminoindano y aislar el R(+)-N-propargil-1-aminoindano así formado.

Se puede preparar N-propargil-1-aminoindano racémico poniendo en contacto, en presencia de una base orgánica o inorgánica, 1-aminoindano racémico con
25 bromuro de propargilo o cloruro de propargilo para así formar N-propargil-1-aminoindano racémico y aislar el N-propargil-1-aminoindano racémico así formado.

Se puede preparar una sal de R(+)-N-propargil-1-aminoindano poniendo en
30 contacto N-propargil-1-aminoindano racémico con un ácido ópticamente activo para así formar dos sales diastereoisoméricas de N-propargil-1-aminoindano y aislar la sal R(+)-N-propargil-1-aminoindano de la sal N-propargil-1-aminoindano diastereoisomérica así formada.

35 En una realización, el aislamiento comprende aislamiento por cristalización fraccionada.

Los siguientes detalles experimentales se presentan para ayudar a comprender la invención y no se pretende, y no se considerará, limitar en modo alguno la invención descrita en las reivindicaciones que siguen más adelante.

5 **Detalles experimentales**

EJEMPLO 1

Hidrocloruro de N-propargil-1-aminoindano racémico

Se añadieron 10,0 g de 1-aminoindano racémico y 10,4 g de carbonato potásico a 75 ml de acetonitrilo. La suspensión resultante se calentó hasta
10 60°C y se añadieron 4,5 g de cloruro de propargilo gota a gota.

La mezcla se agitó a 60°C durante 16 horas, después de lo cual se eliminaron la mayor parte de los volátiles por destilación a vacío. El residuo se repartió entre hidróxido sódico acuoso al 10% y cloruro de metileno.

15

La fase orgánica se secó y el disolvente se eliminó por destilación. El residuo se sometió a cromatografía ultrarápida sobre gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo al 40%/hexano al 60%. Las fracciones que contenían el compuesto del epígrafe en forma de base libre se reunieron y se reemplazó el
20 disolvente por éter. La solución de éter se trató con HCl gaseoso, se aisló el precipitado formado por filtración con succión y se recristalizó en isopropanol, dando 7,3 g del compuesto del epígrafe, p.f. 182-4°C.

Los datos cromatográficos y espectroscópicos fueron conformes con la patente
25 de Estados Unidos nº 3.513.244, expedida el 19 de mayo de 1970, y una muestra auténtica y fueron como sigue: RMN δ (CDCl₃): 2,45 (2H, m), 2,60 (1H, t), 2,90 (1H, m), 3,45 (1H, m), 3,70 (2H, d), 4,95 (1H, t), 7,5 (4H, m) ppm.

EJEMPLO 2

30 **Hidrocloruro de S-(-)-N-propargil-1-aminoindano**

Se aisló el compuesto del epígrafe en forma de base libre resolviendo la mezcla racémica de la base libre del Ejemplo 11 en una columna de HPLC preparativa Chiracel® OJ (tris [p-metilbenzoato] de celulosa) eluyendo con isopropanol al 10%/hexano al 90% y recogiendo el primer pico principal eluido.

35 El aceite resuelto se convirtió en el compuesto del epígrafe (hidrocloruro) por tratamiento de una solución en éter dietílico al 10% del aceite con HCl gaseoso y el precipitado resultante se recogió por filtración con succión. [α]_D -29,2°

(etanol al 1%), p.f. 182-184°C. El resto de propiedades cromatográficas y espectroscópicas fueron idénticas a las de la sal hidrocioruro del Ejemplo 1.

EJEMPLO 3

5 Hidrocioruro de R-(+)-N-propargil-1-aminolindano

El compuesto del epígrafe se preparó como en el Ejemplo 2 anterior, salvo porque se recogió el segundo pico principal eluido. $[\alpha]_D +29,1^\circ$ (etanol al 0,8%), p.f. 179-181°C. El resto de propiedades cromatográficas y espectroscópicas fueron idénticas a las de la sal hidrocioruro del Ejemplo 1.

10

EJEMPLO 4

Hidrocioruro de R-(-)-N-propargil-1-aminolindano

Se añadieron 12,4 g de R-(-)-1-aminolindano y 12,9 g de carbonato potásico a 96 ml de acetonitrilo. La suspensión resultante se calentó hasta 60°C y se
15 añadieron 5,6 g de cloruro de propargilo gota a gota. La mezcla se agitó a 60°C durante 16 horas, después de lo cual se extrajeron la mayor parte de los volátiles por destilación a vacío. El residuo se repartió entre hidróxido sódico acuoso al 10% y cloruro de metileno.

20 La fase orgánica se secó y el disolvente se eliminó a vacío. El residuo se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice eluyendo con acetato de etilo al 40%/hexano al 60%. Las fracciones que contenían la base libre del compuesto del epígrafe se reunieron y el disolvente se reemplazó por éter. La solución de éter se aisló por filtración con succión y se recristalizó en
25 isopropanol dando 6,8 g del compuesto del epígrafe, p.f. 183-185°C, $[\alpha]_D +30,90$ (etanol al 2%). Las propiedades espectrales fueron idénticas a las descritas para el compuesto del Ejemplo 1.

EJEMPLO 5

30 Hidrocioruro de S-(-)-N-propargil-1-aminolindano

El compuesto del epígrafe se preparó por el procedimiento del Ejemplo 4, salvo porque se usó como material de partida S-(-)-1-aminolindano. El producto presentó un $[\alpha]_D -30,3$ (etanol al 2%), p.f. 183-5°C. Las propiedades espectrales fueron idénticas a las descritas para el compuesto del Ejemplo 1.

35

EJEMPLO 6A

L-tartrato de d(R-(+)-N-propargil-1-aminolindano)

Se añadió una solución de R-(+)-N-propargil-1-aminoindano base libre (5,0 g) en metanol (48 ml) a una solución de ácido tartárico (4,4 g) en 48 ml de metanol a ebullición. La solución se calentó hasta reflujo y se añadieron durante 20 minutos 284 ml de éter t-butílmético. La mezcla se calentó durante
 5 otros 30 minutos, se enfrió y se aisló el precipitado resultante por filtración con succión dando 6,7 g del compuesto del epígrafe: p.f. 175°-177°C; $[\alpha]_D^{25}$ (1,5, H₂O) = +34,3; Análisis calculado para C₂₃H₂₂O₆N₂; C, 68,26, H, 6,58, N, 5,69. Encontrado: C, 68,78; H, 6,57; N, 5,61.

10 **EJEMPLO 6B**

Mezclato de R-(+)-N-propargil-1-aminoindano

a) Se añadió gota a gota una solución acuosa de hidróxido sódico al 15% (108 ml) a una solución de bencenosulfonato de propargilo (78,4 g) y aminoindano racémico (63,2 g) en tolueno (240 ml) a 20°C. Después de agitar 5 horas, se
 15 añadieron con agitación más tolueno (80 ml) y agua (200 ml). La fase orgánica se separó y se lavó con hidróxido sódico acuoso al 10% y luego se diluyó con agua. El pH de la mezcla se ajustó a 3,2 mediante la adición de ácido sulfúrico acuoso al 10%. La fase acuosa se separó y su pH se ajustó a 7,3 con hidróxido sódico al 10% y se extrajo tres veces con tolueno mientras se mantenía el pH
 20 constante. Las fases orgánicas reunidas se concentraron a vacío hasta 40,7 g de un aceite amarillo.

b) Se disolvieron en isopropanol (1 l) y se calentaron a reflujo durante 1 hora el propargilaminoindano racémico anterior y ácido L-tartárico (10 g). La reacción
 25 se dejó enfriar hasta temperatura ambiente con agitación y el precipitado se recogió por filtración. El tartrato de di-propargilaminoindano bruto se recristalizó en 1 l de metanol/isopropanol 1:1 dando L-tartrato de di(R-(+)-N-propargil-1-aminoindano) con propiedades físicas y espectrales idénticas a las del compuesto del Ejemplo 6A.

30

c) Se calentó hasta reflujo durante 30 minutos una solución de tartrato de di(R-(+)-N-propargil-1-aminoindano) (15 g) y ácido metanosulfónico (6 g) en isopropanol (150 ml). La reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y el precipitado resultante se aisló por filtración con succión dando el compuesto
 35 del epígrafe (11,1 g) con p.f. 157°C y $[\alpha]_D^{25}$ = 22°C.

EJEMPLO 7

Hidrocioruro de R-(+)-N-metil-N-propargil-1-aminoindano

Se añadieron a 15 ml de acetona la forma base libre de R-(+)-N-propargil-1-aminoindano del Ejemplo 4 (1,2 gramos), carbonato potásico (0,97 gramos) y yoduro de metilo (1 gramo) y la suspensión resultante se calentó hasta reflujo en atmósfera de nitrógeno durante 8 horas. A continuación se eliminaron los volátiles a presión reducida y el residuo se repartió entre hidróxido sódico acuoso al 10% (30 ml) y cloruro de metileno (30 ml). La fase orgánica se secó y el disolvente se eliminó a vacío. El residuo se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice eluyendo con acetato de etilo al 40%/hexano al 60%. Las fracciones que contenían compuesto del epígrafe como base libre se reunieron y el disolvente se reemplazó por éter dietílico. La solución de éter se trató con HCl gaseoso. Los volátiles se eliminaron a vacío y el residuo se recristalizó en isopropanol dando 400 mg del compuesto del epígrafe como un sólido blanco cristalino, p.f. 134-136°C, $[\alpha]_D^{25} +31,40$ (etanol). RMN δ (CDCl₃): 2,55 (2H, m); 2,7 (1H, s ancho); 2,8 (3H, s); 3,0 (1H, m); 3,4 (1 H, m); 3,9 (2H, s ancho); 5,05 (1H, m); 7,7 (4H, m) ppm.

EJEMPLO 8

Hidrocioruro de S-(-)-N-metil-N-propargil-1-aminoindano

Se preparó el compuesto del epígrafe como en el Ejemplo 7 anterior, salvo que se usó como material de partida S-(-)-N-propargil-1-aminoindano (base libre) del Ejemplo 5. Todas las propiedades físicas y espectrales del compuesto del epígrafe fueron idénticas a las del Ejemplo 7 salvo para $[\alpha]_D^{25} -34,9^\circ$ C (etanol).

EJEMPLO 9

Composición de comprimido

Hidrocioruro de N-propargil-1(R)-aminoindano	7,81 mg*
Almidón pregelatinizado, FN**	47,0 mg
Lactosa hidratada, FN	66,0 mg
Celulosa microcristalina, FN	20,0 mg
Almidón glicolato sódico, FN	2,99 mg
Talco, Farmacopea EEUU	1,5 mg
Estearato de magnesio, FN	0,7 mg

*Equivalente a 5,0 mg de N-propargil aminoindano base

** FN = Formulario Nacional

EJEMPLO 10

Composición de comprimido

Hidrocioruro de N-propargil-1(R)-aminoindano	1,56 mg*
Lactosa hidratada	50,0 mg
Almidón pregelatinizado	36,0 mg
Celulosa microcristalina	14,0 mg
Almidón glicolato sódico	2,14 mg
Talco, Farmacopea EEUU	1,0 mg
Estearato de magnesio, FN	0,5 mg

5

*Equivalente a 1,0 mg de N-propargil aminoindano base

EJEMPLO 11

Composición de cápsula

10

Hidrocioruro de N-propargil-1(R)-aminoindano	5,0 mg
Almidón pregelatinizado	10,0 mg
Almidón	44,0 mg
Celulosa microcristalina	25,0 mg
Etil celulosa	1,0 mg
Talco	1,5 mg

Se añade agua purificada según se requiera para la granulación.

EJEMPLO 12

15 **Composición de inyección**

Hidrocioruro de N-propargil-1(R)-aminoindano	5,0 mg
Dextrosa anhidra	44,0 mg
Se añade HCl hasta pH 5	

Se añade agua purificada según se requiera hasta 1 ml.

20 **EJEMPLO 13**

Composición de Inyección

Hidrocloreuro de N-propargil-1(R)-aminoindano	1,0 mg
Cloruro sódico	8,9 mg
Se añade HCl hasta pH 5	

Se añade agua purificada según se requiera hasta 1 ml.

5

EJEMPLO 14

Composición de Inyección

Hidrocloreuro de N-propargil-1(R)-aminoindano	2,0 mg
Cloruro sódico	8,9 mg
Se añade HCl hasta pH 5	

10 Se añade agua purificada según se requiera hasta 1 ml.

EJEMPLO 15

Composición de Jarabe

Hidrocloreuro de N-propargil-1(R)-aminoindano	5,0 mg
Sacarosa	2250,0 mg
Sacarina sódica	5,0 mg
Metilparabeno	8,0 mg
Propilparabeno	1,0 mg
Aroma	20,0 mg
Glicerina, farmacopea EEUU	500 mg
Alcohol al 95%, farmacopea EEUU	200 mg

15

Se añade agua purificada según se requiera hasta 5,0 ml.

EJEMPLO 16

Comprimidos sublinguales

20

Hidrocloreuro de N-propargil-1(R)-aminoindano	2,5 mg
Celulosa microcristalina	20,0 mg
Lactosa hidratada	5,0 mg

Almidón pregelatinizado	3,0 mg
Povidona	0,3 mg
Agente colorante	c.s.
Aroma	c.s.
Edulcorante	c.s.
Talco	0,3 mg

Se mezclan los excipientes y el componente activo y se granulan con una solución en etanol de Povidona. Después de secar y pesar se mezcla con el talco y se comprime.

5

EJEMPLO 17
Comprimidos sublinguales de PAI

Hidrocioruro de N-propargil-1(R)-aminoindano	5,0 mg
Celulosa microcristalina	15,0 mg
Almidón pregelatinizado	12,0 mg
Etil celulosa	0,3 mg
Talco	0,3 mg

10 Se añade agua purificada según se requiera para la granulación.

EJEMPLO 18
Composición de comprimido

Hidrocioruro de N-propargil-1(R)-aminoindano	5,0 mg
Levodopa	100,0 mg
Carbidopa	25,0 mg
Almidón pregelatinizado	24,0 mg
Almidón	40,0 mg
Celulosa microcristalina	49,5 mg
Colorante D & C Amarillo nº 10	0,5 mg
Colorante D & C Amarillo nº 6	0,02 mg

15

Se añade alcohol de la farmacopea de EEUU según se requiera para la granulación.

EJEMPLO 19

Composición de comprimido

Mesilato de N-propargil-1(R)-aminoindano	7,81 mg*
Almidón pregelatinizado, FN	47,0 mg
Lactosa hidratada, FN	66,0 mg
Celulosa microcristalina, FN	20,0 mg
Almidón glicolato sódico, FN	2,99 mg
Talco, Farmacopea EEUU	1,5 mg
Estearato de magnesio, FN	0,7 mg

5 *Equivalente a 5,0 mg de N-propargil aminoindano base

EJEMPLO 20

Composición de comprimido

Mesilato de N-propargil-1(R)-aminoindano	1,56 mg*
Lactosa hidratada	50,0 mg
Almidón pregelatinizado	36,0 mg
Celulosa microcristalina	14,0 mg
Almidón glicolato sódico	2,14 mg
Talco, Farmacopea EEUU	1,0 mg
Estearato de magnesio, FN	0,5 mg

10

*Equivalente a 1,0 mg de N-propargil aminoindano base

EJEMPLO 21

Composición de cápsula

15

Mesilato de N-propargil-1(R)-aminoindano	5,0 mg
Almidón pregelatinizado	10,0 mg
Almidón	44,0 mg
Celulosa microcristalina	25,0 mg
Etil celulosa	1,0 mg
Talco	1,5 mg

Se añade agua purificada según se requiera para la granulación.

EJEMPLO 22

Inhibición de la actividad de MAO *in vitro*

Protocolo experimental

La fuente de enzima MAO fue un homogenizado de cerebro de rata en sacarosa 0,3M, que se centrifugó a 600 g durante 15 minutos. El sobrenadante se diluyó de forma apropiada en tampón fosfato 0,05M y se preincubó con diluciones en serie de compuestos: [R](+)-PAI, [S](-)-PAI y PAI racémico durante 20 minutos a 37°C. Se añadieron sustratos marcados con ¹⁴C (2-feniletilamina, en lo sucesivo PEA); 5-hidroxitriptamina, en lo sucesivo (5-HT) y la incubación se prolongó durante otros 20 minutos (PEA), o 30-45 minutos (5-HT). Las concentraciones de sustrato usadas fueron 50 µM (PEA) y 1 mM (5-HT). En el caso de PEA; la concentración de enzima se eligió de modo que no se metabolizará más del 10% de sustrato durante el curso de la reacción. La reacción se interrumpió entonces mediante la adición de tranilcipromina (a una concentración final de 1 mM) y se filtró el incubado en una columna pequeña de Amberlite® CG-50 tamponada hasta pH 6,3. La columna se lavó con 1,5 ml de agua, se agruparon los elutos y se determinó el contenido radiactivo por espectrometría de centelleo líquido. Puesto que los sustratos de amina se retienen totalmente en la columna, la radiactividad en el eluto indica la producción de metabolitos neutros y ácidos formados como resultado de actividad de MAO. La actividad de MAO en la muestra se expresó como porcentaje de la actividad control en ausencia de inhibidores después de restar los valores de los blancos apropiados. Se hace referencia a la actividad determinada usando PEA como MAO-B y la determinada usando 5-HT como MAO-A.

Resultados

La actividad inhibidora de [R](+)-PAI, [S](-)-PAI y PAI racémico se examinó por separado *in vitro* y los resultados de los experimentos típicos se muestran en las Figuras 1 y 2. Todo el experimento se repitió tres veces. Las concentraciones de inhibidor que producen una inhibición del 50% del metabolismo del sustrato (CI₅₀) se calcularon a partir de las curvas de inhibición, y se muestran en la Tabla 1A. De estos datos se puede apreciar que:

(a) [R](+)-PAI es dos veces más activo que el racemato para inhibir MAO-B;

- (b) [R](+)PAI es 29 veces más activo para inhibir MAO-B que MAO-A;
- (c) [S](-) PAI es solo 1/8,800 tan activo como [R](+)PAI para inhibir MAO-B, y muestra poca o nula selectividad entre MAO-B y MAO-A.

5

TABLA 1A

VALORES DE CI_{50} (nM) PARA LA INHIBICIÓN DE MAO-A Y MAO-B POR PAI RACÉMICO Y LOS ENANTIÓMEROS R(+) Y S(-) DEL MISMO EN HOMOGENEIZADO DE CEREBRO DE RATA *in vitro*

10

MAO-A			MAO-B		
[S] (-)PAI	[R] (+)PAI	Rac	[S] (-)PAI	[R](+)PAI	Rac
26000	73	140	17000	2,5	5

15

Los resultados de los mismos experimentos usando R(+) y S(-) MPAI (N-metil-N-propargil-1-aminoindano) se presentan en la Tabla 1B. Cada uno de los enantiómeros de MPAI es menos selectivo en la inhibición de MAO-A y MAO-B que [R](+)PAI. Además, [R](+)MPAI es solo cinco veces más activo que [S](-)MPAI en la inhibición de MAO-B, al contrario que [R](+)PAI que es aproximadamente 7000 veces más activo que [S](-)PAI en este ensayo.

20

TABLA 1B

VALORES DE CI_{50} (nM) PARA LA INHIBICIÓN DE MAO-A Y MAO-B POR LOS ENANTIÓMEROS R(+) Y S(-) DE MPAI EN HOMOGENEIZADO DE CEREBRO DE RATA *in vitro*

Compuesto:	<u>CI_{50} (nM)</u>			
	MAO-A		MAO-B	
	[S] (-)MPAI	[R] (+)MPAI	[S] (-)MPAI	[R] (+)MPAI
	70	3	50	10

30

Algunos experimentos también se llevaron a cabo con tejidos corticales de cerebro humano obtenidos 6 horas después de la muerte y se trataron como se ha descrito antes. Los resultados de dicho experimento se muestran en las Figuras 3A y 3B en las que [R](+)PAI, [S](-)PAI y PAI racémico son como se

35

definen en la presente memoria.

EJEMPLO 23

Inhibición de la actividad de MAO *in vivo*; tratamiento agudo

5 Protocolo experimental

Se trataron ratas (macho derivadas de Sprague-Dawley) con un peso de 250 ±20 g con uno de los enantiómeros o la forma racémica de PAI por inyección intraperitoneal (ip) o sonda nasogástrica (po) y se decapitaron 1 hora o 2 horas después, respectivamente. Se usaron grupos de tres ratas para cada nivel de dosis de inhibidor y se determinó la actividad de MAO en cerebro e hígado usando la técnica general descrita antes. La cantidad de proteína en cada incubación se determinó usando el procedimiento de Folin-Lowry, y la actividad de la enzima se calculó como nmol de sustrato metabolizado por hora de incubación para cada mg de proteína. La actividad de MAO en tejidos de animales tratados con inhibidores se expresó como porcentaje de la actividad de la enzima en un grupo de animales control a los que se administró vehículo (agua para administración oral, solución salina al 0,9% para inyección ip) y se sacrificaron como antes.

20 Resultados

Ninguno de los niveles de dosis usados con los fármacos inhibidores produjeron alteración alguna evidente en el comportamiento. Los resultados se representan en las Figuras 4 a 11. Después de la administración ip, el compuesto [R](+)-PAI produjo una inhibición del 90% de la actividad de MAO-B cerebral en una dosis de 0,5 mg/kg. La misma dosis produjo solo una inhibición del 20% de la actividad de MAO-A. Mediante administración oral, la misma dosis de [R](+)-PAI produjo una inhibición del 80% de MAO-B sin inhibición detectable de MAO-A. Se apreciaron resultados prácticamente similares para la MAO cerebral que para la inhibición de MAO hepática. Las dosis que produjeron una inhibición del 50% de MAO-A y MAO-B (CI₅₀) se calcularon a partir de curvas de inhibición y se muestran en la Tabla 2. Estos datos muestran: (a) que la actividad inhibidora de MAO de [R](+)-PAI se mantiene *in vivo* en la rata; (b) que la selectividad por la inhibición de MAO-B, en contraposición a MAO-A, por [R](+)-PAI se mantiene *in vivo*; (c) que la actividad mucho mayor del enantiómero (+), en contraposición al enantiómero (-), se mantiene *in vivo*; (d) que los compuestos se absorben de forma eficaz después de la administración oral; y (e) que los compuestos pasan de forma eficaz la

barrera hemoencefálica e inhiben de forma eficaz MAO cerebral. El hecho de que [R](+)-PAI fue aproximadamente dos veces más activa que el compuesto racémico para la inhibición de MAO-B es un reflejo de la actividad extremadamente baja de [S](-)-PAI por la inhibición de MAO-B.

5

TABLA 2

VALORES DE Cl_{50} (MG/KG) PARA LA INHIBICIÓN DE MAO-A Y MAO-B POR [R] (+)-PAI, [S](-)-PAI O PAI RACÉMICO EN LA RATA, DESPUÉS DE ADMINISTRACIÓN POR INYECCIÓN INTRAPERITONEAL (IP) U ORAL (PO)

Cl_{50} (mg/kg)						
MAO-A				MAO-B		
Compuesto	[S](-) PAI	[R](-) PAI	Racémico	[S](-) PAI	[R](-) PAI	Racémico
I.P. Cerebro	> 10	1,2	2,5	> 10	0,07	0,22
I.P. Hígado	> 10	5	5	> 10	0,08	0,11
P.O. Cerebro	> 10	> 5	> 5	> 10	0,17	0,29
P.O. Hígado	> 10	> 5	> 5	> 10	0,05	0,09

10 Racémico = PAI racémico

EJEMPLO 24

Inhibición de la actividad de MAO *in vivo*: Tratamiento crónico

Protocolo experimental

- 15 Se trataron ratas (especificaciones como en el Ejemplo 23, 4 animales para cada nivel de dosis) con [R](+)-PAI o la mezcla racémica en tres niveles de dosis (0,05, 0,1 y 0,5 mg/kg) mediante administración oral, una dosis al día durante 21 días y se decapitaron 2 horas después de la última dosis. Se determinaron las actividades de los tipos A y B de MAO en el cerebro y en el
- 20 hígado como se describe en el Ejemplo 23.

Resultados

- Una dosis diaria de 0,1 mg/ del compuesto [R](+)-PAI produjo un buen grado de inhibición selectiva, con más del 80% de inhibición de MAO-B cerebral y 20% o
- 25 menos de inhibición de MAO-A cerebral. A la dosis mayor de 0,5 mg/kg por día, MAO-A todavía era inhibida en menos del 50% (Figuras 12 y 13). MAO hepática mostró un grado de inhibición selectiva similar (Figuras 14 y 15). El compuesto [R](+)-PAI fue de nuevo más potente que la mezcla racémica en un factor de aproximadamente el doble. En el caso de MAO cerebral [R](+)-PAI
- 30 tuvo un mejor grado de selectividad por la inhibición de MAO-B que la mezcla

racémica.

Estos resultados muestran que la selectividad de la inhibición de MAO-B se puede mantener siguiendo el tratamiento crónico con los compuestos. Como con otros inhibidores irreversibles, el grado de inhibición enzimática es mayor con tratamientos crónicos que después de una única dosis de fármaco. El compuesto [R](+)-PAI muestra un mejor grado de selectividad por la inhibición de MAO-B cerebral que la mezcla racémica.

10 **EJEMPLO 25**

Naturaleza irreversible de la inhibición de MAO

Protocolo experimental

Se administró una única dosis de [R](+)-PAI (1 mg/kg) por inyección i.p. a grupos de 4 ratas y los animales se sacrificaron 2, 6, 18, 24, 48 y 72 horas después. La actividad de MAO-B se determinó en tejidos cerebrales completos como se ha descrito antes en la presente memoria.

Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 16. Se obtuvo la máxima inhibición de MAO-B a las 6 horas después de la inyección. La actividad de MAO solo volvió al 30% de la actividad control a las 72 horas después de la inyección. Este experimento demuestra la naturaleza irreversible de la inhibición de MAO por [R](+)-PAI.

25 **EJEMPLO 26**

Potenciación del efecto preor de piramina en ratas conscientes

Protocolo experimental

Se anestesiaron ratas con una mezcla de pentobarbital (30 mg/kg) e hidrato de cloral (120 mg/kg) por inyección intraperitoneal. La arteria carótida izquierda y la vena yugular se canularon con un fino tubo flexible de polietileno (arteria) o de caucho de silicona fino conectado a un tubo flexible de polietileno (vena), cuyo extremo distal se colocó bajo la piel en un punto de fijación por debajo del cuello. El tubo flexible se llenó con solución salina heparinizada y se taponó con un fino vástago de acero. Los animales se trataron con 20 mg de cloranfenicol por inyección intramuscular y se dejó que se recuperaran de la operación durante la noche. El día siguiente, se colocaron las ratas en un recipiente de paredes altas que les permitía movimiento libre. El catéter arterial

se conectó a un transductor de presión a través de un fino tubo de polietileno
acanalado relleno de solución salina de 100 cm y el catéter venoso se conectó
a una jeringa de 1 ml mediante una longitud similar de tubo flexible, que, junto
con la jeringa, contenía una solución de hidrocloruro de tiramina en solución
5 salina (1 mg/ml). Después de un período de equilibrio de 30 a 40 minutos, se
administraron inyecciones de tiramina (50 ó 100 µg) y se registraron las
respuestas de la tensión arterial. Se mantuvo entre inyecciones un intervalo de
al menos 15 minutos después de que la tensión arterial volviera a los valores
control. Se establecieron as respuestas presoras control, y a continuación se
10 inyectó uno de los fármacos por vía intraperitoneal y se repitieron las
respuestas a tiramina durante las cuatro horas siguientes. Se estimó el área
bajo la curva de respuesta de la tensión arterial y se determinó la relación de
este área después del tratamiento con respecto a antes del tratamiento y con
respecto a 1 a 3 horas después de la inyección de los compuestos usando el
15 promedio de 3 a 4 valores obtenidos en el período de control.

Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla 3. El compuesto [R](+)PAI en una dosis
de 1 mg/kg (que causa la inhibición completa de MAO-B en el cerebro e
20 hígado, y una inhibición del 40 a 50% de MAO-A en estos tejidos) no causó
potenciación significativa de la respuesta presora de tiramina. A la dosis mayor
de [R](+)PAI de 5 mg/kg (que causó una inhibición más extensa de MAO-A en
el cerebro y periferia), se produjo una potenciación significativa de la respuesta
presora de tiramina, que tuvo un grado similar a la producida por la misma
25 dosis de deprenilo y menor que la producida por clorgilina (en una dosis que
inhibe la actividad de MAO-A hepática en más de un 85%).

TABLA 3
POTENCIACIÓN DEL EFECTOR PRESOR DE TIRAMINA EN RATAS CONSCIENTES POR
INHIBIDORES DE MAO

Inhibidor	Dosis (mg/kg)	Nº de ratas (n)	Relación del área bajo la curva de respuesta presora: Después/Antes	DTM*
Solución salina		12	1,25	0,28
Clorgilina	2	8	10,39	2,13
(-)Deprenilo	1	2	1,16	
(+)Deprenilo	5	3	2,30	0,16
[R](+)PAI	1	3	1,38	0,7
[R](-)PAI	5	3	3,49	0,98

30 *DTM = Desviación Típica de la Media

A partir de este experimento se puede llegar a la conclusión de que el compuesto [R](+)-PAI no produce potenciación del efecto presor de tiramina en una dosis que inhibe de forma eficaz MAO-B.

5

EJEMPLO 27

Supresión por [R](+)-PAI de la toxicidad dopaminérgica inducida por MPTP

1-Metil-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) es una neurotoxina que daña las neuronas dopaminérgicas nigroestriales en varias especies de mamíferos, incluyendo ratones y produce síndrome Parkinsoniano en humanos y primates. Una etapa clave en el mecanismo de su neurotoxicidad implica la conversión de MPTP en su metabolito tóxico ion 1-metil-4-fenil piridinio (MPP⁺). Esta reacción está catalizada por la enzima MAO-B y tiene lugar probablemente fuera de las neuronas dopaminérgicas, principalmente en la glía. Se sabe que MPTP es un sustrato y a la vez inhibidor irreversible de MAO-B. El tratamiento previo de animales de experimentación con inhibidores de MAO-B tales como deprenilo o pergolina protege y previene contra el daño inducido por MPTP a las neuronas nigroestriales debido que a la conversión oxidativa de MPTP a MPP⁺ queda bloqueada. La degeneración nigroestriatal progresiva en Parkinson puede ser debida a la exposición a neurotoxinas como MPTP exógenas provenientes del entorno. En tales casos, existe una fuerte indicación adicional de inicio de tratamiento sostenido con un inhibidor de MAO-B desde las primeras etapas de la enfermedad de Parkinson con la esperanza de que neutralice los efectos dañinos de dichas toxinas MPTP todavía potenciales y, de este modo, detener o ralentizar la progresión de la enfermedad. Un fármaco inhibidor de MAO-B eficaz se está valorando en la actualidad por su capacidad para bloquear la lesión inducida por MPTP en neuronas dopaminérgicas nigroestriales *in vivo*. Los enantiómeros (-) y (+) de PAI se ensayaron por tanto para determinar su capacidad para prevenir o atenuar el agotamiento de dopamina del cuerpo estriado inducido por MPTP en ratones.

Protocolo experimental

Se inyectó a ratones negros C57 macho (20 a 25 g) (a) MPTP-HCl (30 mg/kg disuelto en agua destilada, s.c.) o vehículo solo, o una hora después del tratamiento previo los isómeros (-) o (+) de PAI (2,5 mg/kg, i.p.), o deprenilo (5 mg/kg, i.p.), y (b) se decapitaron 5 días después. Los cerebros se extirparon y se diseccionaron los cuerpos estriados en una placa de vidrio enfriada con

helo y se congelaron en hielo seco. Los tejidos estriados se homogeneizaron en ácido perclórico 0,1 M y se ensayaron alícuotas desproteinizadas que contenían dihidroxi-bencilamina como patrón interno para determinar la dopamina y su metabolito mayoritario ácido 3,4-dihidroxi-fenilacético (DOPAC) usando HPLC con detección electroquímica.

Resultados

La Tabla 4 muestra los resultados de este experimento. El tratamiento con MPTP solo produjo considerables agotamientos de dopamina del cuerpo estriado (DA) y DOPAC. El tratamiento con los enantiómeros (-) y (+) de PAI o con (-) deprenilo no afectó a las concentraciones de DA del cuerpo estriado. El tratamiento previo con el isómero (-) de PAI no afectó los niveles de DA y DOPAC inducidos por MPTP en el cuerpo estriado. El isómero (+) de PAI administrado antes de MPTP anuló totalmente la reducción en los niveles de DA y DOPAC producidos por la toxina. A una dosis de 2,5 mg/kg, [R](+)PAI fue igual de potente que (-) deprenilo (5 mg/kg) en su efecto protector.

TABLA 4

EFFECTO DEL TRATAMIENTO PREVIO CON LOS ENANTIÓMEROS (-) Y (+) DEL INHIBIDOR DE MAO-B PAI SOBRE LOS AGOTAMIENTOS DE DA Y DOPAC DEL CUERPO ESTRIADO INDUCIDOS POR MPTP EN RATONES *IN VIVO*.

	DA	DOPAC
	(ng/mg proteína)	
Control	162,8 ± 7,2	8,4 ± 0,5
25 MPTP	53,1 ± 6,2	3,2 ± 0,3
[S] (-)PAI	174,0 ± 4,8	7,5 ± 0,2
[S] (-)PAI + MPTP	53,4 ± 6,9	7,0 ± 0,6
[R] (+)PAI	185,0 ± 6,9	3,3 ± 0,3
[R] (+)PAI + MPTP	177,8 ± 14,4	6,0 ± 0,3
30 (-)Deprenilo	170,6 ± 7,1	5,6 ± 0,3
(-)Deprenilo + MPTP	197,0 ± 8,0	6,4 ± 0,5

Los valores anteriores de DA y DOPAC se expresan como media ± DTM y número de ratas. n =7-11 en cada grupo.

Estos resultados indican que [R](+)PAI es un excelente inhibidor de MAO-B *in vivo* y tiene un potencial especialmente grande para el tratamiento de

enfermedad de Parkinson.

Aunque la invención se ha descrito con referencia a los Ejemplos anteriormente citados y Tablas y Figuras adjuntas, no queda limitada a los mismos. Por ejemplo, se puede combinar [R](+)-PAI de una forma sinérgica con α -tocoferol (derivado de vitamina E) para el tratamiento de enfermedad de Parkinson.

EJEMPLO 28

Efecto de enantiómeros de PAI sobre la conducta estereotipada inducida por anfetaminas en ratas senescentes.

La anfetamina es conocida por inducir una conducta estereotipada (Sulzer, F., and Sanders-Bush, E., Ann. Rev. Pharmacol., 11, 209-230 (1971)) por la movilización de dopamina endógena. La anfetamina no se metaboliza por MAO-B. La inhibición de MAO-B por un inhibidor eficaz y la administración de anfetamina provoca la liberación de dopamina que no sufrirá degradación por la MAO-B inhibida. Así, tras la administración de anfetamina cabe esperar un aumento de la dopamina sináptica y un inhibidor eficaz de MAO-B que conduce a un aumento en la potenciación de la conducta estereotipada del efecto de la anfetamina. El grado de este comportamiento se valora conforme a una serie de movimientos laterales de la cabeza durante un período de 1 minuto.

Protocolo experimental

El compuesto de ensayo se administró en una dosis de 0,5 mg/kg/día en el agua de bebida, 24 horas antes de provocar una hipoxia (nitrógeno al 92% + oxígeno al 8% durante 6 horas). Después de esto, se inyectó anfetamina s.c. en una dosis de 0,5 mg/kg. 45 minutos después, se realizó el recuento de los movimientos laterales de cabeza.

Resultados

Los resultados de estos experimentos se muestran en la Tabla 5.

TABLA 5

EFFECTO DE ISÓMEROS DE PAI SOBRE LA CONDUCTA ESTEREOTIPADA INDUCIDA POR ANFETAMINA EN RATAS SENESCENTES (CONTROL Y LESIONADAS POR HIPOXIA)

Grupo	Valoración de la conducta estereotipada por el	
	tratamiento	
Control (6)	-	87 ± 10
Control (5)	(+) PAI	126 ± 16*
Control (4)	(-) PAI	94 ± 18
Lesionados por hipoxia (5)	-	93 ± 12
Lesionados por hipoxia (6)	(+) PAI	143 ± 6*

- 5 Los números entre paréntesis son los números de animales ensayados.
*P < 0,001 con respecto al grupo de hipoxia sin tratar o el grupo control sin tratar, según corresponda.

- Los resultados de la Tabla 5 indican que [R](+)PAI causó una potenciación significativa de la conducta estereotipada inducida por amfetamina en ratas lesionadas por hipoxia y control. En este sentido, [S](-)PAI fue totalmente inactivo en este aspecto. Estos resultados *in vivo* en el comportamiento corroboran hallazgos bioquímicos previos de que [R](+)PAI es un inhibidor activo de MAO-B en el cerebro mientras que [S](-)PAI es inactivo en este aspecto.

Ejemplo 29

Efecto de [R](+)PAI sobre la mejora o restauración de la memoria

- cachorros de rata recién nacida sometidas a un breve episodio de anoxia y que luego se dejaron volver a su desarrollo de una forma normal desarrollaron un deterioro en la memoria a largo plazo (Spelzer, et al., Behav. Brain Res., 30, 89-94 (1988)). Este deterioro de la memoria se expresa como un comportamiento inferior en el ensayo de evitación pasiva.

- 25 El efecto de [R](+)PAI y [S](-)PAI sobre la mejora o restauración de la memoria se investigó en el ensayo de evitación pasiva. Si el fármaco es eficaz, éste aumenta la latencia de la respuesta al entrar en un compartimento o cámara oscura en la que se ha experimentado un electrochoque con anterioridad por la rata que se está ensayando. La latencia de la respuesta máxima es de 300 segundos.

Protocolo experimental

Se sometieron ratas jóvenes a ansiedad postnatal como se describe en el Ejemplo 28. Se administraron [R](+)-PAI o [S](-)-PAI según uno de los siguientes protocolos.

Protocolo A - Se administra a madres de cría una dosis de isómero de 1 a 1,5 mg/kg/día en el agua de bebida hasta el destete a los 21 días. Después de esto, la estirpe destetada se trata directamente con la misma dosis durante 20 días. El tratamiento finaliza a los 40 días y se lleva a cabo el ensayo a los 60 días, es decir, 20 días después de la última dosis de fármaco.

Protocolo B - La dosis se redujo a 0,5 mg/kg/día administrada a las madres de cría hasta el destete a los 21 días, luego directamente a las ratas jóvenes hasta 60 días, momento en el cual se lleva a cabo el ensayo.

Ensayo de evitación pasiva - El aparato comprende una cámara iluminada adyacente a una cámara oscura y una puerta corredera que separa las dos. En el entrenamiento, se colocó una rata en la cámara iluminada durante 30 segundos y luego se abrió la puerta. La rata se desplazó hacia la cámara oscura con una latencia que se registró. Al entrar la rata en el compartimento oscuro, se cerró la puerta y se administró un choque en las patas de 0,3 mA durante 3 segundos.

La retención (memoria) después de 48 horas se determinó repitiendo el ensayo y registrando la latencia para pasar de la luz a la oscuridad hasta un máximo arbitrario de 300 segundos.

Resultados

Los resultados de estos experimentos se muestran en la Tabla 6.

-39-
TABLA 6

EFFECTO DE LOS ISÓMEROS DE PAI SOBRE LA RESPUESTA DE EVITACIÓN PASIVA EN
RATAS JÓVENES (DE 60 DÍAS)

Protocolo A			
Grupo	Tratamiento	Antes de electrochoque	Después del electrochoque
Control	-	49 ± 13	201 ± 111
Control	(+) PAI	49 ± 19	220 ± 100 (+9%)*
Control	(-) PAI	49 ± 13	192 ± 116
Lesionada por anoxia	-	45 ± 11	183 ± 109
Lesionada por anoxia	(+) PAI	49 ± 10	239 ± 99 (19%)*
Lesionada por anoxia	(-) PAI	85 ± 27	179 ± 123
Protocolo B			
Grupo	Tratamiento	Antes de electrochoque	Después del electrochoque
Control	-	53 ± 20	104 ± 101
Control	(+) PAI	48 ± 11	128 ± 119 (+23%)*
Lesionada por anoxia	-	46 ± 8	119 ± 105
Lesionada por anoxia	(+) PAI	52 ± 12	137 ± 126 (15%)*
Lesionada por anoxia	(-) PAI	46 ± 19	112 ± 112

- 5 Los datos representan la latencia en segundos para entrar en un compartimento oscuro en el que se ha experimentado con anterioridad un electrochoque por la rata ensayada.
- * Los aumentos de porcentaje indicados son con respecto a los grupos de anoxia y control correspondientes.

- 10 Los resultados experimentales indicaron que (R)(+)PAI pero no (S)(-)PAI es eficaz para mejorar la memoria de ratas lesionadas por anoxia y control. Los fármacos activos en este ensayo se considera que son potencialmente útiles para el tratamiento de diversos trastornos de deterioro de la memoria,
- 15 demencia y en especial demencia senil del tipo Alzheimer.

EJEMPLO 30

Efecto de (R)(+) PAI sobre el síndrome de hiperactividad inducido por anoxia en ratas jóvenes

- 20 Ratas que se habían expuesto a anoxia postnatal y luego se dejaron crecer en condiciones normales mostraron una mayor actividad motora en campo abierto a la edad de 10 a 42 días (Hertshkowitz, et al., Dev. Brain Res., 7, 145-155

(1983)).

Se investigó el efecto de [R](+)-PAI y [S](-)-PAI sobre el síndrome de hiperactividad.

5

Protocolo experimental

Se realizó una anoxia en cachorros de rata el primer día después de nacer. Se colocaron en una cámara de cristal y se expusieron a nitrógeno al 100% durante 25 minutos. Se resucitaron por masaje intermitente aplicado suavemente en el tórax y luego se devolvieron a sus madres respectivas. Las ratas control recibieron el mismo tratamiento pero con aire en lugar de con nitrógeno.

10

Se administró [R](+)-PAI o [S](-)-PAI (0,5 mg/kg/día) a las madres de cría en el agua de bebida, transfiriéndose de este modo a los lactantes a través de la leche.

15

Se midió la locomoción en 6 jaulas totalmente computerizadas (28 x 28 cm) registrando el número de cruces en un periodo dado de tiempo. Cruzar los haces infrarrojos de la rejilla a intervalos de 4 cm inició impulsos eléctricos que alimentaron el contador. Los registros de la actividad motora se realizaron a las edades de 15 y 20 días, durante un periodo de 15 minutos.

20

Resultados

Los resultados experimentales se presentan en la Tabla 7.

25

TABLA 7
EFECTO DE CADA UNO DE LOS DOS ENANTIÓMEROS SOBRE EL SÍNDROME DE HIPERACTIVIDAD INDUCIDO POR ANOXIA

Grupo	Tratamiento	Ratas de 15 días	Ratas de 20 días
Control	-	414 ± 192 (11)	606 ± 212 (12)
Control	(+) PAI	254 ± 149 (11) c	719 ± 110 (13)
Lesionada por anoxia	-	482 ± 119 (7)	836 ± 98 (8)
Lesionada por anoxia	(+) PAI	276 ± 186 (15) a	737 ± 150 (16) c
Lesionada por anoxia	(-) PAI	334 ± 198 (5)	778 ± 232 (6)

30

Los números entre paréntesis son los números de animales ensayados
- Los datos son los números de cruces de la rejilla con haz infrarrojo en la jaula de actividad durante un periodo de 15 minutos

- a P < 0,001 comparado con el grupo sin tratar por anoda.
b P < 0,05 comparado con el grupo sin tratar por anoda.
c P < 0,05 comparado con el grupo control.

5 Estos resultados indican que el tratamiento oral crónico con [R](+)PAI en una dosis de 0,5 mg/kg administrado a la madre de cría y que llega a la descendencia a través de la leche alivia de forma significativa el síndrome de hiperactividad. Por consiguiente, [R](+)PAI es un fármaco potencialmente útil para el tratamiento del síndrome de hiperactividad en niños.

10

EJEMPLO 31

Diferencias de estabilidad entre las sales de PAI

La estabilidad es un factor importante en la selección de una sal óptima como fármaco terapéutico. Las diferentes sales pueden alterar las características físicoquímicas y biológicas de un fármaco y pueden tener una influencia
15 drástica sobre sus propiedades generales. (Berge, S. M., et al., J. Pharm. Sci. 66, 1 (1977); Gould, P. L., Int. J. Pharmaceutics, 33, 201 (1986)).

Parte Experimental

Síntesis de sales de PAI

Se añadió una solución de un ácido apropiado (1 equivalente molar) en 2-propanol a una solución de PAI (1 equivalente molar) mientras se agitaba en 2-propanol (Ar, BHT). La sal formada se filtró, se lavó con 2-propanol y éter y se secó a baja presión. Los rendimientos variaron entre 70 y 90%. Una excepción
25 en la preparación de acetato de PAI implica usar éter como disolvente.

Procedimientos analíticos

Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo usando una columna Lichrosphere® 60 RP select B 5µ 125 x 4 mm (Merck), un equipo HPLC (Jasco
30 BIP-1) equipado con un detector L-4200 UV-Vis (Merck-Hitachi) ajustado en 210 nm y un cromatointegrador D-2500 (Merck-Hitachi). El eluyente y diluyente estaban compuestos por agua destilada al 80%/acetonitrilo al 20% (calidad HPLC) y ácido perclórico 0,07 M ajustado a pH 2,5 con amoníaco acuoso. El caudal usado fue de 1 ml/minuto, la concentración apropiada de la solución de
35 sal de PAI fue 250 µg/ml y se inyectaron 20 µl de la solución en el sistema cromatográfico.

Se midió el intervalo de fusión con un aparato automático (Mettler FP 80) y se realizó un análisis termogravimétrico en un sistema Mettler TA 3000 a una velocidad de 10°C /minuto en el intervalo aplicable. La solubilidad se determinó mediante una dilución apropiada del sobrenadante de una solución acuosa saturada de la sal de PAI y se midió en un espectrofotómetro UV-visible UVIKON® 941 (Kontron). La forma de sal (mono o disal) se obtuvo por análisis elemental usando un equipo convencional para la determinación de C, H, N y S. El pH se midió en una solución acuosa al 1% de las sales de PAI.

10 **Resultados**

La caracterización de las diversas sales se resume en la Tabla 8.

TABLA 8
PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE SALES DE PAI

Sal de PAI PM	pH	Solubilidad (mg/ml)	Intervalo de fusión (°C)	Pérdida de peso (%)	Forma de la sal
Tartrato 492	5,5	33	176,2 - 177,3	LT 0,1	di
Mesitato 267	4,3	635	158,8 - 157,6	0,1	mono
Maleato 287	4,0	NLT 1000	87,2 - 87,8	0,1	mono
Sulfato 440	3,8	485	169,4 - 161,1	3,2	di
Cloruro 207	4,2	238	177,0 - 180,0	LT 0,5	mono
Toxato 343	4,4	60-70	129,3 - 129,9	LT 0,1	mono
Fumarato 287	3,5	95	125,4 - 125,2	0,2	mono
Fosfato n.d.	7,0	NLT 720	109,5 - 110,4	n.d.	n.d.
Estato 279	2,4	NLT 300	n.d.	n.d.	mono
Acetato 231	6,1	NLT 720	69,2 - 69,7	0,4	mono

15 n.d. - no disponible

Los estudios de estabilidad comparativa se llevaron a cabo en grupos de varias condiciones de aceleración: I) calentando a 80°C durante 72, 96 ó 144 horas; y II) reflujo en isopropanol durante 30 horas. Los productos de degradación

desarrollados se midieron por HPLC y se confirmaron por TLC. Los resultados se presentan en la Tabla 9 con el tiempo de retención relativo (relativo al pico de PAI; RRT) como un área porcentual relativa al área total del pico integrada.

5 TABLA 9
PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DESARROLLADOS EN SALES DE PAI EN CONDICIONES DE CORTA DURACIÓN

Sal	80°C/72 h		80°C/144°C		Reflujo en iPrOH/30 h	
	RRT ^a	% ^b	RRT	%	RRT	%
Sulfato	SID ^c	SID	SID	SID	0,47	0,22
					0,60	0,72
Fosfato	0,60	0,22	0,60	0,57	0,60	2,62
					0,74	0,21
					1,84	0,20
					1,98	0,73
Cloruro	SID	SID	SID	SID	2,23	0,71
Mesilato	SID	SID	SID	SID	0,60	0,08
Maleato	0,60	0,41	N. D.		0,60	2,17
	1,27	0,50			0,65	1,36
	1,48	0,33			1,29	0,59
	1,81	0,10			1,42	1,30
	3,07	1,44			1,50	1,06
	4,16	0,10			1,83	1,18
	4,84	7,76			1,98	0,23
					4,08	0,65
Acetato	0,44	0,10	N. D.		0,60	6,74
	0,60	2,56			0,74	0,35
	0,73	0,13			1,76	0,33
	1,29	0,71			1,84	0,16
	1,55	1,06			1,99	4,17
	1,76	21,86			3,60	0,27
	1,98	3,33				
	2,15	0,08				
	2,32	0,15				
	2,83	0,15				
	3,54	1,82				
Eclato ^d	SID	SID	0,65	0,26	SID	SID
			1,98	0,31		

límite de cuantificación = 0,06%

n.d. = no disponible

10 ^aTiempo de retención relativo (relativo al pico de PAI)
^bÁrea porcentual relativa con respecto al área total integrada del pico
^cSin impurezas Detectadas
^dSal sulfato de etilo

Las sales se sometieron a inspección visual de color y forma. Los hallazgos se presentan en la Tabla 10.

5

TABLA 10

APARIENCIA DE LAS SALES DE PAI EN CONDICIONES DESTRUCTIVAS

Sal	80°C /72 h	80°C /96 h	80°C /144 h	reflujo en iPrOH/30 h
Sulfato	polvo blanquecino	n.d.	polvo blanquecino	polvo marrón
Fosfato	polvo perdusco	n.d.	polvo marrón	polvo marrón
Cloruro	polvo blanco	n.d.	polvo blanco	polvo blanquecino
Mesilato	polvo blanco	n.d.	polvo blanco	polvo blanco
Maleato	fundido marrón	marrón	n.d.	fundido marrón
Esilato	fundido perdusco	n.d.	fundido marrón oscuro	fundido marrón oscuro

n.d. = no disponible

Estos estudios muestran que sulfato, esilato y mesilato posean ventajas significativas con respecto a las otras sales debido a la buena solubilidad y estabilidad química. De estas tres sales, se prefiere mesilato debido a su excelente estabilidad incluso en condiciones destructivas.

10

EJEMPLO 32
Reversión de la catalepsia inducida por haloperidol en ratones

Se trataron previamente ratones macho de 25 a 30 g con uno de los siguientes fármacos: solución salina, mesilato de [R](+)-PAI o mesilato de PAI racémico. Todos los fármacos se administraron i.p. en un volumen de 0,2 ml. Dos horas después, se inyectó haloperidol s.c. en una dosis de 8 mg/kg en un volumen de 0,1 a 0,2 ml. Se realizaron los ensayos de coordinación motora a las 3 horas después de la administración de haloperidol, es decir, 5 horas después de administrar los fármacos supuestamente protectores.

15

20

Los ensayos de coordinación motora y de rigidez se cuantificaron conforme a tres parámetros diferentes: (a) capacidad para caminar la longitud de una barra

horizontal de 80 cm de longitud; (b) capacidad para bajar boca abajo por una barra vertical de 80 cm de longitud; (c) duración de la inmovilidad en una postura sentada natural en la que el abdomen del ratón está presionado contra una "pared". Al comportamiento completo como en ratones no tratados con haloperidol se le da una puntuación de 4 en cada ensayo, o un total de 12 en los tres ensayos. A un mal comportamiento se le da una puntuación de 1 a 3. En la Tabla 11 se presenta una clave para la valoración. Los efectos de los diversos agentes para antagonizar la catalepsia inducida por haloperidol se dan en la Tabla 11. A las tres horas después del haloperidol, el mesilato de [R](+)-PAI confirió protección contra haloperidol en dosis de 5 a 15 mg/kg, alcanzando un máximo después del efecto a 7,5-10 mg/kg (puntuación de la actividad aproximadamente el 94% del control con solución salina). Mesilato de PAI racémico confirió una protección parcial en el intervalo de 7,5-15 mg/kg, y no fue activo a 5 mg/kg. De la Figura 17 se puede apreciar que el perfil dosis-efecto de mesilato de [R](+)-PAI o PAI racémico es tal que un incremento en la dosis por encima de 10 mg/kg implica una disminución en el efecto, pero que la mezcla racémica es menos potente. Esto significa que el mesilato de PAI racémico al doble de la dosis de mesilato de [R](+)-PAI siempre será menos activo que el enantiómero (R).

20

Reversión de la hipocinesia inducida por α -MPT en ratas

Se supone que el fármaco α MPT inhibe la formación de L-DOPA a partir de tirosina y, por consiguiente, la formación de la propia dopamina. La falta de dopamina del SNC se expresa como hipoactividad. Se trataron previamente ratas Wistar macho de seis meses (de Harlan Olkack, Reino Unido) con solución salina, mesilato de [R](+)-PAI o mesilato de PAI racémico, en las dosis indicadas. Dos horas después, éstas recibieron i.p. α MPT en una dosis de 100 mg/kg en 0,3-0,5 ml. Los controles recibieron solución salina. A continuación, se registró la actividad motora en una jaula de actividades computerizada durante 10 horas. Los resultados se dan en la Tabla 12 y en la Figura 18. A 2 mg/kg, el mesilato de [R](+)-PAI restauró el nivel de actividad hasta aproximadamente el 90% de las ratas tratadas con solución salina, pero el mesilato de PAI racémico no fue activo. En cualquier caso, el perfil de la curva dosis-efecto fue acampanado, sugiriendo una disminución en el efecto con un aumento de la dosis por encima de un máximo de 2-5 mg/kg. A 5 mg/kg el mesilato de PAI racémico no pudo obtener un nivel de actividad comparable al del mesilato de [R](+)-PAI a 2 mg/kg.

35

A partir de estas medidas, el mesilato de [R](+)PAI y el mesilato de PAI racémico no comparten el mismo patrón de actividad para restaurar la normocinesia en ratones tratados con haloperidol y ratas tratadas con α -MPT. En todas las dosis estudiadas, el mesilato de [R](+)PAI siempre es más potente que el mesilato de PAI racémico a la dosis correspondiente. Además, la actividad máxima del mesilato de PAI racémico siempre es menor que la actividad máxima del mesilato de [R](+)PAI. Así, el mesilato de PAI racémico en una dosis dada es siempre menos eficaz que el mesilato de [R](+)PAI a la mitad de la misma dosis. Doblar la dosis de mesilato de PAI racémico con respecto a mesilato de [R](+)PAI no produce un efecto equivalente al de mesilato de [R](+)PAI.

Desde el punto de vista farmacológico, el mesilato de PAI racémico no se puede considerar que comprende el 50% de ingrediente activo que es mesilato de [R](+)PAI y el 50% de material inerte como diluyente. La presencia de [S](-) PAI en mesilato de PAI racémico tiene un efecto adverso sobre la actividad de [R](+)PAI, dando lugar a una reducción en la potencia farmacológica de más del doble. La disminución puede deberse a un efecto adverso directo de [S](-) PAI sobre los parámetros de comportamiento.

20

TABLA 11

REVERSIÓN DE LA CATALEPSIA INDUCIDA POR HALOPERIDOL EN RATONES CON MESILATO DE [R] (+)PAI Y MESILATO RACÉMICO

Cada uno de los ratones recibió los fármacos de ensayo i.p. en las dosis indicadas. Dos horas después, recibieron haloperidol como se describe en el texto. Las dosis mostradas son para la base libre.

Dosis (mg/kg)	Mesilato de [R] (+) PAI			Mesilato de PAI racémico		
	Puntuación+DT	n	% del control	Puntuación+DT	n	% del control
1,8	7,2 ± 1	8	60	7,0 ± 0,6	8	59
3,0	8,4 ± 0,5	8	60	5,8 ± 0,7	8	49
5,0	8,7 ± 0,6*	8	73	6,4 ± 0,4	8	53
7,5	11,0 ± 0,4***	5	92	8,4 ± 0,8**	8	78
10	11,3 ± 0,3***	6	94	9,2 ± 0,6***	8	77
15	10,8 ± 0,5***	5	90	8,8 ± 0,8*	8	73
Solución salina	12 ± 0	12	100			
control						
Haloperidol solo	8,6 ± 0,3	16	59			

Significación estadística con respecto a haloperidol solo: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ por la prueba t de Student. Las puntuaciones para [R] (+) PAI son significativamente diferentes de las de PAI racémico a 5 mg/kg, $p \leq 0,05$; a 10 mg/kg, $p \leq 0,01$; y a 15 mg/kg, $p \leq 0,05$.

5

TABLA 11A
CLAVE PARA VALORAR LA PUNTUACIÓN DE LA CATALEPSIA INDUCIDA
POR HALOPERIDOL EN RATONES Y SU REVERSIÓN POR DIVERSOS
AGENTES

Barra vertical:

Incapaz de agarrarse a la barra con los miembros	1
Capaz de agarrarse pero se resbala	2
Capaz de agarrarse, se resbala parcialmente, la baja parcialmente	3
Capaz de agarrarse, baja usando todos los miembros	4

Barra horizontal:

Incapaz de agarrarse, se cae de la barra	1
Capaz de agarrarse, incapaz de caminar sobre la barra más de dos pasos	2
Capaz de agarrarse, camina la mitad de la longitud de la barra	3
Capaz de agarrarse, camina toda la longitud de la barra	4

Inmovilidad sentado contra la pared:

Inmovilidad más de 5 minutos	1
Inmovilidad de 3 a 5 minutos	2
Inmovilidad de 1 a 3 minutos	3
Inmovilidad de 0 a 1 minuto	4

10

Las puntuaciones fraccionarias se asignan, tales como 2,5, cuando el comportamiento está entre dos categorías, como entre 2 y 3.

15

TABLA 12

RESTAURACIÓN DE LA ACTIVIDAD MOTORA EN RATAS TRATADAS CON α -METIL-P-TIROSINA (α -MPT) A 100 MG/KG I.P.

Dosis (mg/kg)	Mesilato de [R] (+) PAI			Mesilato de PAI racémico		
	Puntuación+DT	n	% del control	Puntuación+DT	n	% del control
2	14132** $\pm$ 1487	7	88	9038 $\pm$ 828	8	57
5	12883* $\pm$ 1889	7	81	10028* $\pm$ 820	8	69
7.5	9879 $\pm$ 414	4	42	9898 $\pm$ 557	4	61
Solución salina control	15882 $\pm$ 1424	5	100			
α -MPT sola	8108*** $\pm$ 810	5	51			

- 5 Significación estadística por la "t" de Student, *p $\leq$ 0,01; ***p $\leq$ 0,001 para fármacos de ensayo + α -MPT sola frente a α -MPT sola
 α -MPT sola frente a solución salina control
Las puntuaciones de [R] (+)PAI frente a PAI racémico son significativamente distintas a 2 mg/kg, p $\leq$ 0,01.

10

EJEMPLO 33

Los efectos de mesilato de [R](+)PAI después de lesión craneal cerrada en ratas

15 **Procedimientos**

1. **Inducción del traumatismo**

Se indujo traumatismo craneal en ratas macho bajo anestesia con éter por un dispositivo de caída de una pesa bien calibrado que cae sobre el cráneo expuesto que cubre el hemisferio cerebral izquierdo, 1-2 mm lateral a la línea media, en el plano mediocoronal.

20

2. **Evaluación de la función motora**

Una hora después de la inducción del traumatismo, se ensayaron las ratas por un grupo de criterios que evaluaba su respuesta neurológica (los criterios descritos por Shohami, *et al.*, J. Neurotrauma, 10, 113 (1993)). Estos criterios, referidos como Valoración de la Gravedad Neurológica (NSS, del Inglés Neurological Severity Score)), consisten en una serie de funciones motoras y reflejas. Los puntos se dan en base a las deficiencias en estos criterios. A las

25

24 horas, las ratas se volvieron a evaluar.

3. Evaluación del edema cerebral

Los cerebros se extirparon después de la segunda evaluación de la función motora (24 horas). Se pesó un fragmento de tejido (aproximadamente 20 mg) para dar un peso húmedo (PH). Después de secar en un horno desecador durante 24 horas a 95°C, se volvió a pesar para calcular el peso seco (PS). Se calculó el porcentaje de agua en el tejido $(PH - PS) \times 100 / PH$.

10 4. Tratamiento farmacológico

Se disolvió mesilato de [R](+)-PAI en agua. Se inyectó a las ratas una dosis de 0,1 mg/kg, 0, 4, 8 y 12 h después del traumatismo craneal. Las ratas control se trataron con agua en los mismos tiempos.

15 Resultados

El NSS, que mide el estado "clínico" de las ratas, fue casi idéntico en los grupos tratados y no tratados 1 hora después de la lesión craneal, pero significativamente menor a las 24 horas en las ratas tratadas con mesilato de [R](+)-PAI (Tabla 13). Estos resultados indican que el mesilato de PAI es eficaz para mejorar la recuperación de la función motora después de una lesión craneal cerrada en ratas.

25 A las 24 horas después del traumatismo, se encontró un edema mayor en el hemisferio (85,4% de agua en el cerebro de las ratas control frente al 78,5% en el tejido de cerebro no lesionado). El mesilato de PAI fue eficaz para reducir el edema como se verifica por su efecto sobre el porcentaje de agua.

30 En conclusión, los resultados presentados en este documento demuestran que el mesilato de [R](+)-PAI tiene propiedades neuroprotectoras en un modelo destinado a emular la lesión en nervios humanos e inducir traumatismo en un cráneo cerrado.

-50-
TABLA 13

	NSS		Δ NSS (1 h - 24 h)	% H ₂ O en el cerebro
	1 h	24 h		
control (n = 6)	15,6	12,3	4,3 $\pm$ 0,5	85,4 $\pm$ 0,4
Mesíto de [R] (+) PAI (n = 6)	16,7	10,2	6,5 $\pm$ 0,7*	82,1 $\pm$ 0,6**

*P < 0,05 (Prueba U de Mann Whitney)
**P < 0,005 (Prueba t)

- 5 **EJEMPLO 34**
Efectos del mesíto de PAI sobre la prevención de la muerte celular
Inducida por NMDA de cultivos de células de cerebela
Resultados de ensayos *in vitro*
Procedimientos: Cultivos de cerebela de rata recién nacida disociado
- 10 **mecánicamente.**
Se disecan asépticamente los cerebelos de cachorros de rata de 6 ó 7 días y se colocan en un tubo cónico de plástico estéril de 15 ml que contenía 3 ml de medio enriquecido (el medio está constituido por medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con alta concentración de glucosa (1 g/l), L-glutamina 2 mM
- 15 (v/v), mezcla de antibióticos antimicrobianos y enriquecido con suero bovino fetal inactivado con calor al 15% (v/v). Los cerebelos se disocian entonces después de 20 a 25 pases a través de una aguja de acero inoxidable de 10 cm de longitud estéril de calibre 13 unida a una jeringa de 5 ml con un tamiz de nylon de tamaño de poro 45 μ m insertado. Las células disociadas se centrifugan a
- 20 200 g durante 5 minutos, se descarta el líquido sobrenadante y se resuspenden las células en medio enriquecido. La viabilidad de las células se determina por el ensayo de exclusión con azul de tripano. Las células se siembran a continuación a una densidad de 200/mm² en superficies revestidas de poli-L-lisina (se preparan cubremuestras de vidrio revestidos de poli-L-lisina al menos
- 25 una hora antes de la siembra, sumergiendo en una solución de agua destilada estéril que contenía 15 μ g/ml de poli-L-lisina y justo antes de usar se lavan con agua estéril y se seca), se cubren con medio enriquecido y se incuban a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% en aire y humedad del 100%. Después de 4 días de cultivo, se reemplazan los medios con medios que contienen los

compuestos de ensayo deseados. Los experimentos se realizan por duplicado y se repiten 2 ó 3 veces. Después de determinar la dosis tóxica del compuesto-respuesta, se comparan cuatro grupos: (I) control (enriquecido con medio solo), (II) compuesto de ensayo (un subgrupo para cada concentración (se ensayan 2 5 concentraciones), (III) N-metil-D-aspartato (NMDA, expuesto a una concentración de 1 mM durante 3 horas) como estimulación provocada citotóxica, (IV) compuesto de ensayo más NMDA (un subgrupo para cada una de dos concentraciones de compuesto de ensayo), (V) grupo control para ensayar el efecto del disolvente (en el que se disuelve el compuesto de 10 ensayo), y (VI) un grupo "positivo control" adicional de espermina (0,01 μ M disuelta en medio de cultivo) más NMDA. Se evalúa la supervivencia de las células nerviosas por microscopía de contraste de fase y tinción con azul de tripano después de 24 horas.

15 Resultados

Está bien establecido que el ácido glutámico (Glu) posee propiedades neurotóxicas que se expresan en varios trastornos neurológicos que incluyen epilepsia e ictus, y lo más probablemente, también en enfermedades neurodegenerativas cerebrales tales como enfermedad de Parkinson, 20 enfermedad de Alzheimer y lesión por traumatismo craneal. Los efectos neurotóxicos de Glu están mediados por los receptores de Glu unidos a la membrana, tales como los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA).

Los resultados, como se muestra en la Tabla 14, demuestran que 10 μ M de 25 mesitato de [R](+)-PAI aumentan la supervivencia de las células de cerebelo en un 27% después de una exposición a NMDA 1 μ M. Estos resultados *in vitro* apoyan los efectos *in vivo* de mesitato de [R] (+)-PAI presentados en los Ejemplos 33 y 35, indicando que este fármaco tiene propiedades neuroprotectoras contra concentraciones neurotóxicas de NMDA.

TABLA 14

EFFECTO NEUROPROTECTOR DE MESILATO DE [R] (+)PAI SOBRE LA PREVENCIÓN DE MUERTE CELULAR INDUCIDA POR NMDA DE CÉLULAS DE CEREBELO

Grupo experimental	Células supervivientes	Protección (%)
Cultivos de cerebelo		
(Toxicidad TD ₂₅ = 30 µM; TD ₅₀ = 85 µM; TD ₁₀₀ = 320 µM)		
Control	100	
Disolvente	97	
NMDA	10	
Disolvente + NMDA	10	0
Compuesto + NMDA		
1) 0,01 µM + NMDA	12	2
2) 1,00 µM + NMDA	22	12
3) 10,00 µM + NMDA	37	27
Espermina + NMDA	75	65

5 Los valores, expresados como porcentaje de los controles sin tratamiento, representan el promedio de 2 experimentos llevados a cabo por duplicado para los experimentos en cultivo, y la media ± DEM de 4 animales para la isquemia. El valor de protección porcentual es el efecto del compuesto de ensayo después de restar el efecto del disolvente.

10

EJEMPLO 35

Efectos de mesilato de [R] (+)PAI después de aplastamiento controlado de nervio óptico de rata

Se determinaron los efectos neuroprotectores de mesilato de [R](+)PAI para aplicación inmediatamente después de una lesión por aplastamiento del nervio óptico en una rata adulta. Se midieron los efectos a corto plazo metabólicamente y los efectos a largo plazo electrofisiológicamente.

15

PROCEDIMIENTOS

20 1. **Medidas metabólicas**

a) **General.** El procedimiento se describe por Yoles, et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science, 32, 3586-91 (1992). A corto plazo, las medidas metabólicas se controlaron en términos de relación NADH/NAD mitocondrial, que depende de la actividad del sistema de transporte de electrones y así indica los niveles de producción de energía. Los cambios en la

25

capacidad del nervio para producir energía como consecuencia de una lesión se determinaron comparando los niveles de NADH como respuesta a una agresión anódica transitoria artificial antes y después de la lesión.

5 b) Fluorometría - reflectometría de superficie. El control del estado REDOX de NADH intramitocondrial se basa en el hecho de que el NADH, a diferencia de la forma NAD⁺ oxidada, emite fluorescencia cuando se la ilumina a 450 nm. Se usó un haz en forma de Y flexible de fibras ópticas (guía de luz) para transmitir la luz a y desde el nervio óptico. La luz emitida desde el nervio se midió en dos
10 longitudes de onda: 366 nm (luz reflejada) y 450 (nm) luz fluorescente). Los cambios en la luz reflejada se relacionaron con los cambios en la absorción por tejidos causada por efectos hemodinámicos y con movimientos del nervio óptico secundarios a alteraciones en la tensión arterial y volumen de nervios. Se encontró que las medidas de fluorescencia se relacionaban de forma
15 adecuada para medidas del estado redox de NADH restando la luz reflejada (366 nm) de la luz fluorescente (relación 1:1) para obtener la señal fluorescente corregida.

c) Preparación de los animales. El uso de animales se realizó conforme a la
20 resolución ARVO sobre el uso de animales en investigación. Se anestasiaron ratas macho Sprague-Dawley (SPD) con un peso de 300 a 400 g con pentobarbitona sódica (50 mg/kg intraperitonealmente). Con la cabeza del animal sujeta en una posición por un soporte craneal, se realizó una cantotomía lateral al microscopio binocular y se realizó una incisión en la
25 conjuntiva lateral a la cornea. Después de separar los músculos retractores del globo, se identificó el nervio óptico y se expuso una longitud de 3 a 3,5 mm cerca del globo ocular por disección roma. La dura se dejó intacta y se tuvo cuidado de no lesionar el nervio. Se implantó un soporte guía de luz especial alrededor del nervio óptico de un modo tal que la guía de luz quedara
30 localizada sobre la superficie del nervio óptico 1 mm distal al lugar de la lesión. Los animales, aunque todavía anestesiados, se dejaron recuperarse durante 30 minutos desde los procedimientos quirúrgicos y se expusieron a continuación a condiciones de anoxia. Se consiguió un estado anódico poniendo la rata para que respirara en una atmósfera de nitrógeno al 100% durante 2 minutos,
35 después de lo cual, se retornó a aire. Con el fin de evaluar la actividad metabólica del nervio óptico, se midieron antes y después de la lesión por aplastamiento los cambios relativos en las intensidades de luz reflejada y

fluorescente como respuesta a la anoxia.

d) Protocolo experimental para las medidas de lesión por aplastamiento y metabólicas Con ayuda de un fórceps de sección transversal calibrada, se causó una lesión por aplastamiento moderada sobre el nervio entre el ojo y el soporte guía de luz a una presión que corresponde a 120 g durante 30 segundos. Inmediatamente después de la lesión, los animales recibieron inyecciones intraperitoneales de agua con y sin mesitato de [R](+)-PAI (2 mg/kg). Para valorar la actividad del sistema de producción de energía, se midió la respuesta de NADH a 2 minutos de anoxia en todos los animales antes de la lesión, 30 minutos después de la lesión y, a continuación, a intervalos de una hora hasta 4 horas (véase la Figura 19).

2. Medidas electrofisiológicas. Este procedimiento se describe por Assia, et al., Brain Res., 476, 205-212 (1989). La preparación de los animales y lesión del nervio óptico fueron como en los estudios metabólicos. Inmediatamente después de la lesión, los animales recibieron una única inyección de agua con o sin mesitato de [R](+)-PAI (0,5 mg/kg). Catorce días después de la lesión y tratamiento, se extirparon los nervios ópticos y se midieron electrofisiológicamente. Antes de la extracción de los nervios ópticos para las medidas electrofisiológicas, se anestesiaron profundamente las ratas con 70 mg/kg de pentobarbitalona. Se separó la piel del cráneo y se desprendieron los nervios ópticos de los globos oculares. Se realizó una decapitación subtotal y se abrió el cráneo con unas pinzas gubias. El cerebro se desplazó lateralmente exponiendo la porción intracraneal del nervio óptico. La disección fue a nivel del nervio óptico, que se transfirió a viales que contenían solución salina reciente compuesta por NaCl (126 mM), KCl (3 mM), NaH_2PO_4 (1,25 mM), NaHCO_3 (26 mM), MgSO_4 (2 mM), CaCl_2 (2 mM) y D-glucosa (10 mM), y se aireó con O_2 al 95% y CO_2 al 5% a temperatura ambiente. Los nervios se mantuvieron en esta solución, en la que la actividad eléctrica permaneció estable durante al menos 3-4 horas. Después de 0,5 horas de recuperación a temperatura ambiente, se obtuvieron los registros electrofisiológicos del nervio distal a la lesión por aplastamiento. Los extremos nerviosos se conectaron a dos electrodos de Ag-AgCl de succión sumergidos en una solución baño a 37°C. Se aplicó un impulso estimulador a través del electrodo en el extremo proximal y se registró el potencial de acción por el electrodo distal. Para la estimulación eléctrica supramáxima (0,5 pps) se usó un estimulador Grass SD9. La señal medida se

transmitió a un preamplificador Medelec PA36 y luego a un electromiografo (Medelec MS7, amplificador AAT7). La solución, el estimulador y el amplificador tenían una conexión común a tierra. Se registró la amplitud máxima de ocho potenciales de acción de compuesto promediados (CAP) y se fotografió con una cámara Polaroid. Los valores de CAP medidos en los nervios no lesionados contralaterales sirvieron como referencia.

Resultados

Los resultados demuestran que mesilato de [R](+)-PAI aplicado inmediatamente después de una lesión al nervio óptico bloqueó la reducción en la producción de energía inducida por la lesión. Mesilato de [R](+)-PAI también tiene un efecto a largo plazo medido mediante control electrofisiológico.

La amplitud de los CAP (potenciales de acción del compuesto) está directamente relacionada con el número de fibras conductoras en el segmento ensayado del nervio.

Mesilato de [R](+)-PAI atenuó de forma significativa la pérdida de actividad inducida por la lesión en el segmento distal del nervio lesionado, indicando que mesilato de [R](+)-PAI es un agente neuroprotector o, al menos reduce la degeneración.

TABLA 15
MEDIDAS ELECTROFISIOLÓGICAS

Grupo	Amplitud del CAP (µV) (media ± error típico)
Vehículo N = 3	441 ± 95
Mesilato de [R] (+) PAI N = 7	2104 ± 313*

EJEMPLO 36

Comparación de las propiedades anticonvulsionantes de sales de [R](+)-PAI y [S](-)-PAI

Ambas sales HCl de [R](+)-PAI y [S](-)-PAI tienen actividades anticonvulsionantes significativas. En ratones (administración i.p.) en el ensayo de electrochoque máximo (ensayo MES), [S](-)-PAI-HCl tiene mayor actividad

anticonvulsante ($ED_{50} = 57 \text{ mg/kg}$) que $[R](+)$ PAI-HCl ($ED_{50} = 79 \text{ mg/kg}$). Se observaron análogos resultados en ratas (administración oral). Cuatro de cuatro ratas estuvieron protegidas de convulsiones en el ensayo MES cuando se administraron 50 mg/kg de $[S](-)$ PAI-HCl, mientras que estuvieron protegidos tres de cuatro ratones después de la misma dosis de $[R](+)$ PAI-HCl. Con respecto a la eficacia para enfermedad de Parkinson, la mayor actividad anticonvulsante es un efecto secundario perjudicial. Se produce la misma tendencia con sales mesilato. Mesilato de $[S](-)$ PAI tiene una mayor actividad anticonvulsante que mesilato de $[R](+)$ PAI en el ensayo MES. En dosis de 100 mg/kg , mesilato de $[S](-)$ PAI protegió a tres de tres ratones, mientras que solo uno de tres ratones estuvo protegido con mesilato de $[R](+)$ PAI.

El ensayo MES es un modelo clásico para indicar la eficacia para convulsiones parciales y generalizadas en seres humanos. El mecanismo de acción de los agentes discurre a través de su capacidad para prevenir la propagación de convulsiones. No obstante, algunos agentes que previenen la propagación de convulsiones tienen el efecto secundario de reducir el umbral de convulsión. Estos agentes tienen por tanto efectos secundarios proconvulsión y anticonvulsión.

Los presentes resultados muestran que el mesilato de $[S](-)$ PAI tiene actividad proconvulsante. En el ensayo de infusión intravenosa programada de metrazol, 141 mg/kg de mesilato de $[S](-)$ PAI reducen el tiempo y, por tanto, la cantidad de Metrazol, requerido para inducir la aparición de la primera convulsión focalizada y el inicio del clono. Otros agentes que se usan clásicamente para convulsiones parciales y generalizadas, tales como fenitoína y carbamazepina, no presentan este efecto. (H. J. Kupferberg, *Epilepsia*, **30**, s51-s56 (1989)). De igual modo, mesilato de $[S](-)$ PAI presentó una neurotoxicidad aguda significativamente mayor que mesilato de $[R](+)$ PAI. A 300 mg/kg , mesilato de $[R](+)$ PAI no presenta neurotoxicidad alguna con ratones en el ensayo de ataxia en barra giratoria. Con mesilato de $[S](-)$ PAI, cuatro de cuatro ratones presentaron neurotoxicidad y espasticidad.

Procedimientos

DT_{50} (mediana de la dosis tóxica). Este ensayo mide las deficiencias neurológicas por el ensayo de ataxia en barra giratoria. Se coloca un ratón en una barra moleteada que gira a 8 rpm . Se determina entonces si un ratón tiene

habilidad para mantener su equilibrio y permanecer sobre la barra durante un minuto en cada uno de tres experimentos.

- Prueba de infusión intravenosa programada de metrazol. Este ensayo mide el umbral mínimo de convulsión de cada animal. Se infunde metrazol a 0,185 mg/ml en las venas de la cola de los ratones. Se registra a continuación el tiempo (s) desde el inicio de la infusión hasta la aparición del primer espasmo (primera convulsión focalizada) y el inicio del clono (convulsión clónica). Los proconvulsionantes requieren menos metrazol para producir estos síntomas y, por tanto, muestran resultados en un período menor de tiempo.

Ejemplo 37

Efectos periféricos de [R] (+) PAI y [S] (-) PAI sobre la capacidad de contracción de preparaciones de músculo liso del intestino

- Se determinaron los efectos periféricos de las sales hidrocóloro de los enantiómeros de PAI en intestino aislado de conejo o cobayo. Estas observaciones proporcionan información útil sobre sus efectos secundarios periféricos relativos en seres humanos. El primer punto de contacto del sujeto con un fármaco administrado por vía oral es el tracto gastrointestinal en el que las concentraciones de fármaco son mucho mayores que después de la absorción y distribución. En el caso de hidrocóloro de PAI (PM = 208), una dosis oral de 10 mg contenida en un volumen de líquido de aproximadamente 100 ml sería equivalente a una concentración de aproximadamente 0,5 mM. Por el contrario, la concentración en plasma terapéutica de hidrocóloro de [R](+)PAI está en el intervalo nanomolar.

- El efecto de los enantiómeros de PAI en el yeyuno de conejos aislado y en el íleon de cobayos se determinó para encontrar si la ingesta de [S](-)PAI junto con [R](+)PAI (como se encuentra en PAI racémico) produciría efectos secundarios ausentes en la administración de [R](+)PAI puro. [R](+)PAI es el enantiómero preferido para la inhibición de MAO-B en el cerebro, a la vista de su potencia y alta selectividad hacia esta forma de la enzima. [S](-)PAI es mucho menos potente que [R](+)PAI en este sentido y tampoco es selectivo hacia MAO-B. En principio, su presencia en racemato de PAI se podría tolerar o pasar por alto habida cuenta de que [S](-)PAI es inerte en las dosis recomendadas de [R](+)PAI. Los resultados proporcionados en las Tablas 16 a 19 muestran que [S](-)PAI no es una sustancia inerte. Por el contrario, en íleon

de cobayos, es un relajante más potente que [R](+)PAI. Por ello, sus efectos periféricos no pueden considerarse como insignificantes. Estos datos muestran que se producirían menos efectos secundarios periféricos en la administración de [R](+)PAI puro que en la administración de PAI racémico que contiene una
5 dosis equivalente de [R](+)PAI.

TABLA 16
POTENCIACIÓN DE TIRAMINA POR CADA UNO DE LOS DOS
ENANTIÓMEROS DE PAI-HCl EN YEYUNO DE RATA

Un fragmento de yeyuno de conejo, montado en un baño de órganos, presenta
10 contracciones rítmicas que son inhibidas por norepinefrina pero no por tiramina. Sin embargo, si se trata con anterioridad el yeyuno con un inhibidor de la monoaminooxidasa tal como PAI, entonces la tiramina provoca relajación de las contracciones espontáneas. El grado de relajación se puede relacionar con la potencia relativa del inhibidor.

Fármaco y concentración (µM)		Relajación (%)
Tiramina sola	40	0
Norepinefrina	0,002	100
[R] (+) PAI solo	0,2 - 4,0	0
[S] (-) PAI solo	0,2 - 4,0	0
Tiramina	40	
después de [R] (+) PAI	0,2	67
	2	88
	40	85 - 90
después de [S] (-) PAI	0,2	0
	2	35
	40	33 - 50

15

Resultados

[S](-)PAI es mucho menos potente que [R](+)PAI como inhibidor de MAO-B cerebral. Por tanto, [S](-)PAI no es un agente útil para la prevención de la degradación de dopamina cerebral, pero puede potenciar la liberación
20 provocada por tiramina de norepinefrina en el intestino delgado. Su actividad en el intestino delgado es un efecto secundario indeseable ya que es de esperar que aumente la absorción y acción de tiramina no degradada. Así, [S](-)PAI no es una sustancia inerte cuando se usa junto con [R](+)PAI como se encuentra en PAI racémico.

25

-59-
TABLA 17

ANTAGONISMO DE CONTRACCIONES INDUCIDAS POR BETANECOL DE LA PREPARACIÓN
DE ÍLEON DE COBAYO EN PRESENCIA DE 400 µM DE CADA UNO DE LOS DOS
ENANTIÓMEROS DE PAI-HCl

5 Un fragmento de íleon de cobayo montado en una solución fisiológica en un baño de órganos se contrae de una forma dependiente de la dosis cuando se trata con betanecol que es un análogo enzimáticamente estable del neurotransmisor gastrointestinal natural acetilcolina. Estas contracciones se atenúan en presencia de PAI. Los datos se expresan en gramos-tensión.

10

Betanecol (µM)		gramos-tensión			
		control [R] (+)PAI		control [S] (-)PAI	
15	0,8	0,5	0,2	0,8	0
	2	1,5	0,3	2,0	0
	4	2,2	0,7	3,0	0
	8	4,0	1,0	3,8	0,6
	20	5,6	2,0	3,8	1,2
20	40	6,2	2,8	3,8	1,7
	80	6,2	3,1	3,8	2,6
	200	6,2	4,3	3,8	2,6

Resultados

25 S](-)PAI es casi inactivo como inhibidor de MAO-B con respecto a [R](+)PAI y, por ello, no es eficaz para prevenir la degradación de la dopamina cerebral. No obstante, es más eficaz que [R](+)PAI en la prevención de la contracción inducida por betanecol del intestino delgado. Así, [S](-)PAI no es una sustancia inerte cuando se usa con [R](+)PAI como se encuentra en PAI racémico.

150

-60-
TABLA 18

ANTAGONISMO DE LAS CONTRACCIONES INDUCIDAS POR HISTAMINA DE LA
PREPARACIÓN DE ÍLEON DE COBAYO POR CADA UNO DE LOS DOS ENANTIÓMEROS DE
PAI-HCl

5 Una dosis fija de histamina (40 nM) causa una contracción sostenida de un
fragmento de íleon de cobayo montado en solución fisiológica en un baño de
órganos. La adición creciente de cada uno de los dos enantiómeros de PAI-HCl
causa una relajación del músculo dependiente de la dosis. Los resultados se
expresan como relajación porcentual con respecto al estado inicial antes de la
10 adición de histamina que se considera como relajación del 100%.

Concentración de PAI	Relajación porcentual	
	[R] (+) PAI	[S] (-) PAI
μM		
2	0	11
4	0	15
10	0	30
20		20
30	31	33
40	37	36
100	81	71
200		90
300	92	
400	100	98
700	100	
1000		100

Resultados

15 [S](-)PAI es inactivo con respecto a [R](+)PAI como inhibidor de MAO-B en el
cerebro y, por tanto, no es útil para prevenir la degradación de dopamina
cerebral, pero es más activo que el isómero (R) para provocar la relajación del
músculo liso intestinal. Así, [S](-)PAI no es una sustancia inerte cuando se
toma junto con el isómero (R) como se encuentra en el PAI racémico.

TABLA 19

ANTAGONISMO DE CONTRACCIONES INDUCIDAS POR BETANECOL DE LA PREPARACIÓN DE ILEON DE COBAYO POR CADA UNO DE LOS DOS ENANTIÓMEROS DE PAI·HCl

Una dosis fija de betanecol (0,8 µM) causa una contracción sostenida de un
5 fragmento de ileon de cobayo montado en solución fisiológica en un baño de
órganos. La adición creciente de cada uno de los dos enantiómeros de PAI·HCl
causa una relajación de la preparación dependiente de la dosis. Los resultados
se expresan como relajación porcentual con respecto a la línea base antes de
la adición de histamina que se considera como relajación del 100%.

10

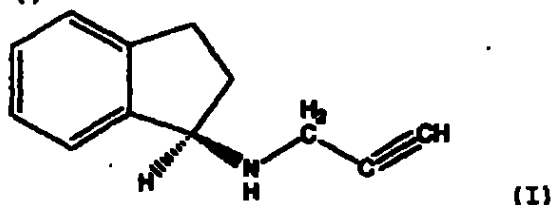
Concentración de PAI µM	Relajación porcentual	
	[R] (+) PAI	[S] (-) PAI
20	25	40 - 50
60	25 - 60	60 - 70
100	50 - 70	100
300	100	100

Resultados

[S](-)PAI es inactivo con respecto a [R](+)PAI como inhibidor de MAO-B en el
cerebro y, por tanto, no es útil para prevenir la degradación de dopamina
15 cerebral, pero es más activo que el isómero (R) para provocar la relajación del
músculo ileo intestinal. Así, [S](-)PAI no es una sustancia inerte cuando se
toma junto con el isómero (R) como se encuentra en el PAI racémico.

REIVINDICACIONES:

1. R(+)-N-propargil-1-aminoindano, CARACTERIZADO PORQUE es de la siguiente fórmula (I)



o una sal de adición ácida farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Una sal farmacéuticamente aceptable del R(+)-N-propargil-1-aminoindano de la cláusula 1, CARACTERIZADA PORQUE dicha sal es una sal mesilato, una sal esilato o una sal sulfato.
3. Una sal mesilato de R(+)-N-propargil-1-aminoindano, CARACTERIZADA PORQUE es una sal acorde con la cláusula 2.
4. Una composición farmacéutica, CARACTERIZADA PORQUE comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o de la sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de las cláusulas 1-3 y un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.
5. La composición farmacéutica de acuerdo con la cláusula 4, CARACTERIZADA PORQUE es para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, trastornos de la memoria, demencia de tipo Alzheimer (DAT), depresión y el síndrome de hiperactividad.
6. La composición farmacéutica de acuerdo con la cláusula 4, CARACTERIZADA PORQUE es para el tratamiento de una lesión neurotóxica, una lesión por traumatismo craneal, una lesión por traumatismo de la médula

espinal, síntomas de abstinencia de una sustancia adictiva o lesión estructural del nervio óptico.

7. La composición farmacéutica de acuerdo con la cláusula 4, CARACTERIZADA PORQUE es para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

8. La composición farmacéutica de la cláusula 4 ó 7, CARACTERIZADA PORQUE dicha cantidad farmacéuticamente eficaz comprende una cantidad entre 0,1 mg y 100 mg.

9. La composición farmacéutica de la cláusula 8, CARACTERIZADA PORQUE dicha cantidad farmacéuticamente eficaz comprende una cantidad entre 1 mg y 10 mg.

10. La composición farmacéutica de la cláusula 9, CARACTERIZADA PORQUE dicha cantidad farmacéuticamente eficaz es 1 mg.

11. La composición farmacéutica de cualquiera de las cláusulas 4-10, CARACTERIZADA PORQUE el vehículo farmacéuticamente aceptable es un sólido y la composición farmacéutica es una tableta.

12. Uso de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o de una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1-3, CARACTERIZADO PORQUE es para la elaboración de una composición farmacéutica.

13. El uso de acuerdo con la cláusula 12, CARACTERIZADO PORQUE la sal mesilato se usa para elaborar la composición farmacéutica.

14. El uso de acuerdo con la cláusula 12 ó 13, CARACTERIZADO PORQUE es para elaborar una composición farmacéutica para tratamiento de la enfermedad de Parkinson, de trastornos de la memoria, de demencia de tipo Alzheimer (DAT), depresión y del síndrome de hiperactividad.

15. El uso de acuerdo con la cláusula 12 ó 13, CARACTERIZADO PORQUE es para elaborar una composición farmacéutica para el tratamiento de una lesión neurotóxica, una lesión por traumatismo craneal, una lesión por traumatismo de la médula espinal, síntomas de abstinencia de una sustancia adictiva o una lesión estructural del nervio óptico.

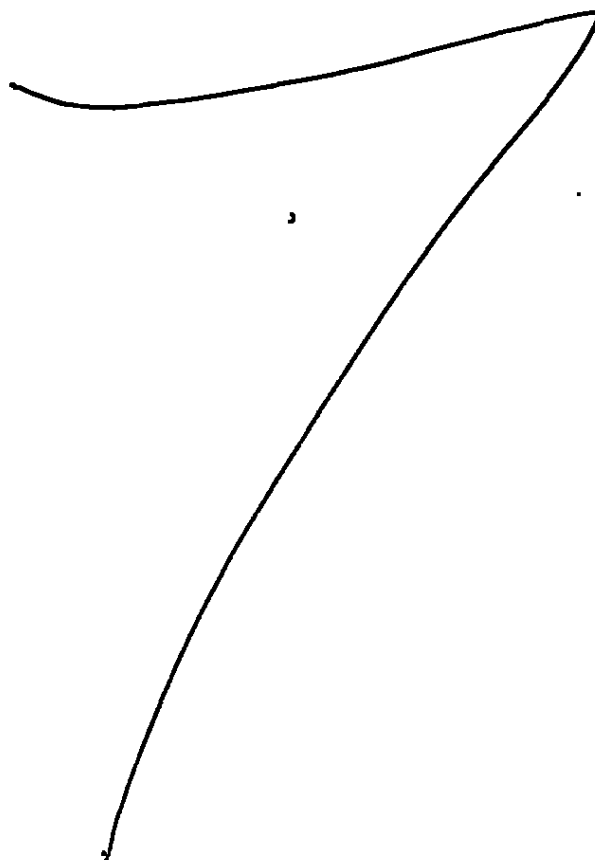
16. El uso de acuerdo con la cláusula 12 ó 13, CARACTERIZADO PORQUE es para elaborar una composición farmacéutica para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

17. El uso de cualquiera de las cláusulas 12-16, CARACTERIZADO PORQUE el R(+)-N-propargil-1-aminoindano o una sal farmacéuticamente aceptable se formula para una administración por vía oral, rectal, transdérmica o parenteral.

18. Un proceso para la preparación de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o una sal de adición ácida del mismo, CARACTERIZADO PORQUE comprende hacer reaccionar el enantiómero R(+) de 1-aminoindano con bromuro de propargilo o cloruro de propargilo en la presencia de una base orgánica o inorgánica, opcionalmente en la presencia de un solvente adecuado y aislar el enantiómero R(+) del N-propargil-1-aminoindano por cromatografía, destilación, extracción selectiva, y, si se deseara, convertir la base libre obtenida en una sal de adición ácida del mismo.

19. Un proceso para la preparación de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o una sal de adición ácida del mismo, CARACTERIZADO PORQUE comprende hacer reaccionar 1-aminoindano racémico con bromuro de propargilo o cloruro de propargilo en la presencia de una base orgánica o inorgánica, opcionalmente en la presencia de un solvente adecuado y aislar el enantiómero

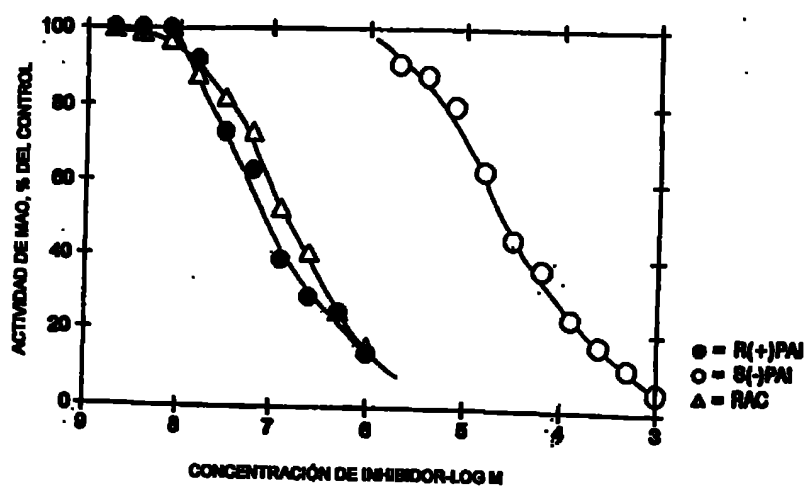
R(+) del N-propargil-1-aminoindano por cromatografía, destilación, extracción selectiva, y, si se deseara, convertir la base libre obtenida en una sal de adición ácida del mismo.



70

FIGURA 1

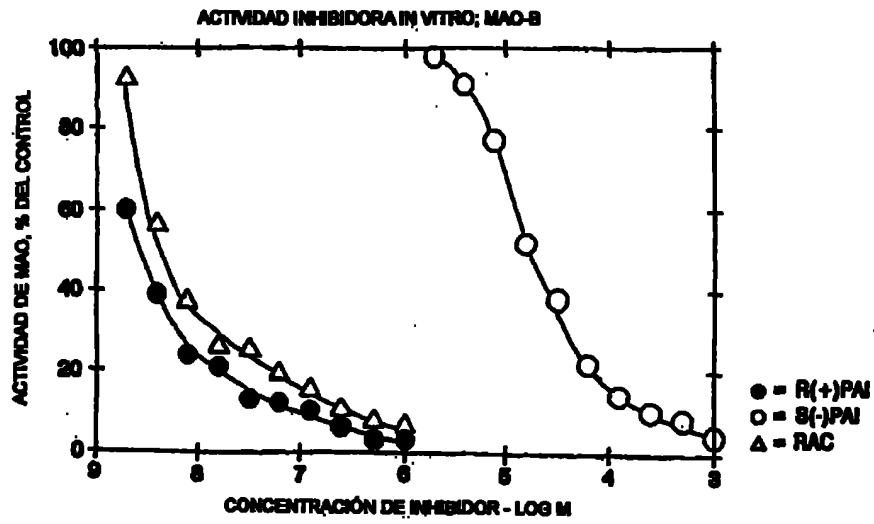
ACTIVIDAD INHIBIDORA IN VITRO; MAO-A



1/20

70

FIGURA 2



2/20

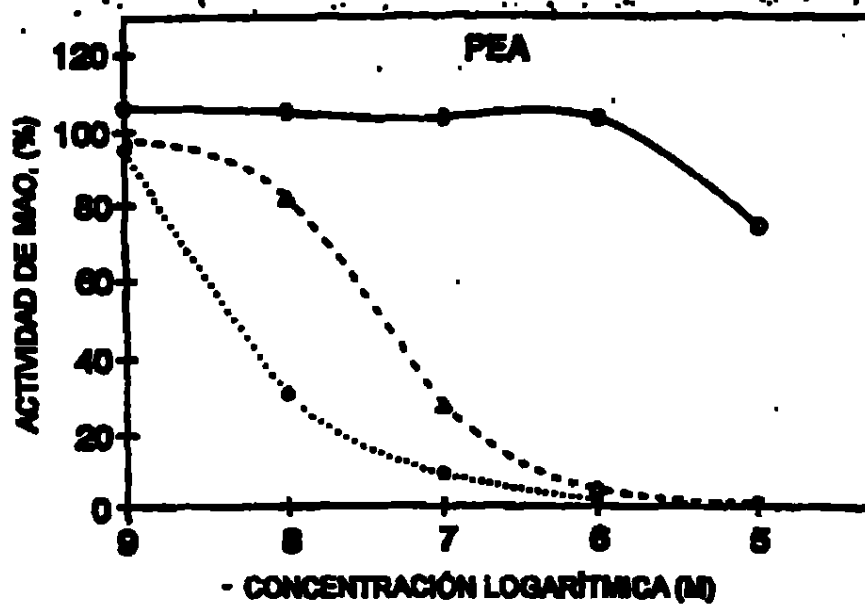
2x

72

3/20

FIGURA 3A

CORTEZA HUMANA

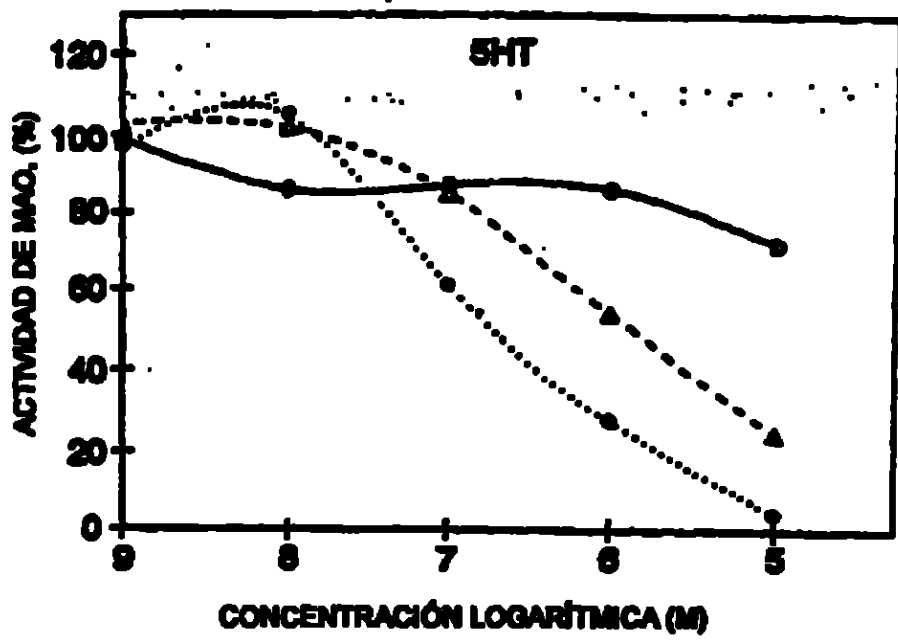


- S(-)PAI
- R(+)-PAI
- △—△ RAC

4/20

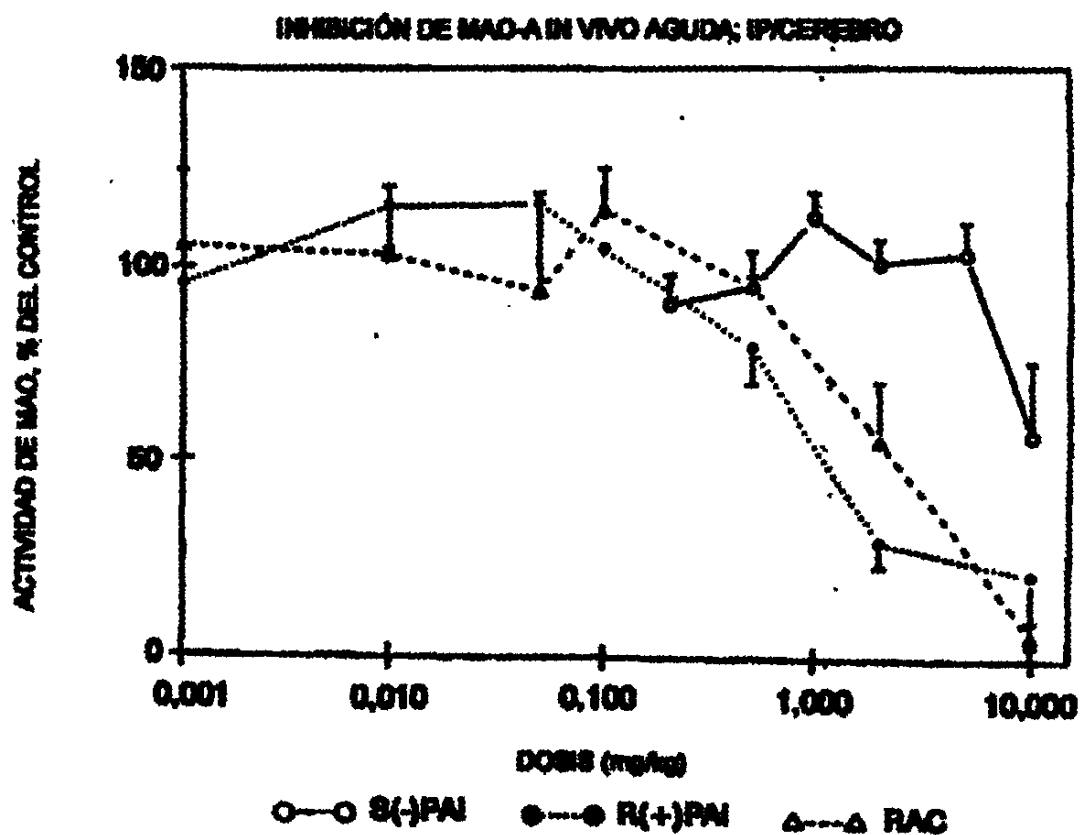
FIGURA 3B

CORTEZA HUMANA



- S(-)PAI
- R(+)-PAI
- △---△ RAC

FIGURA 4

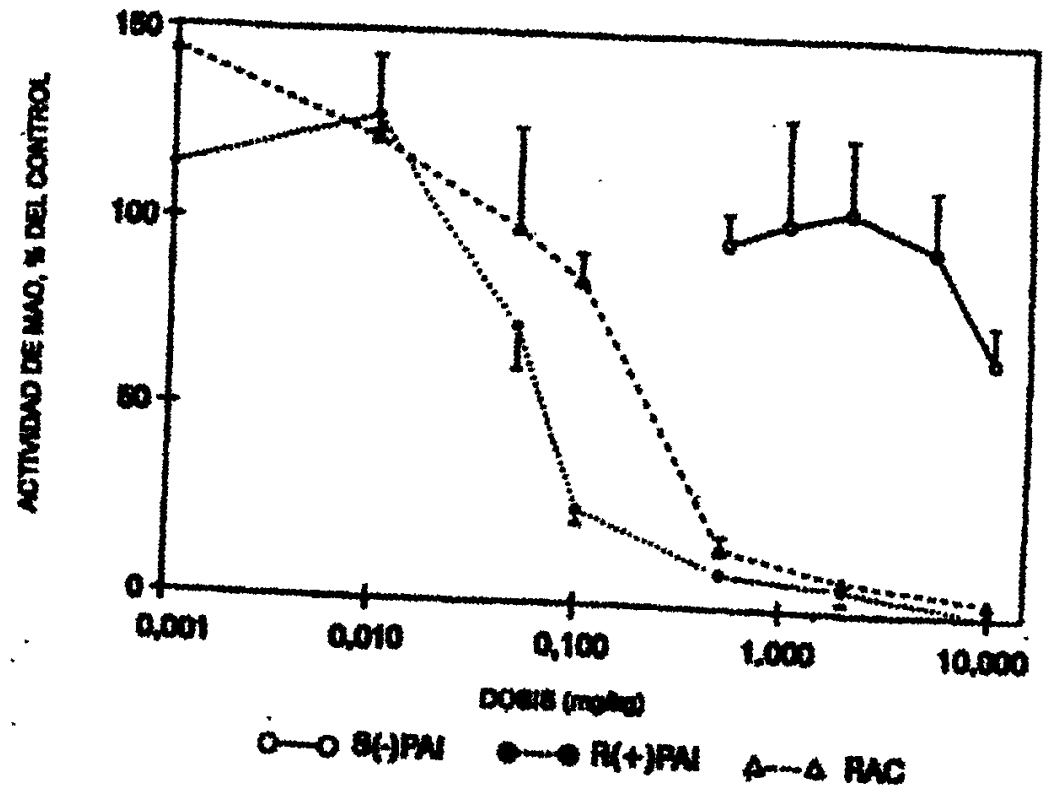


8/20

74

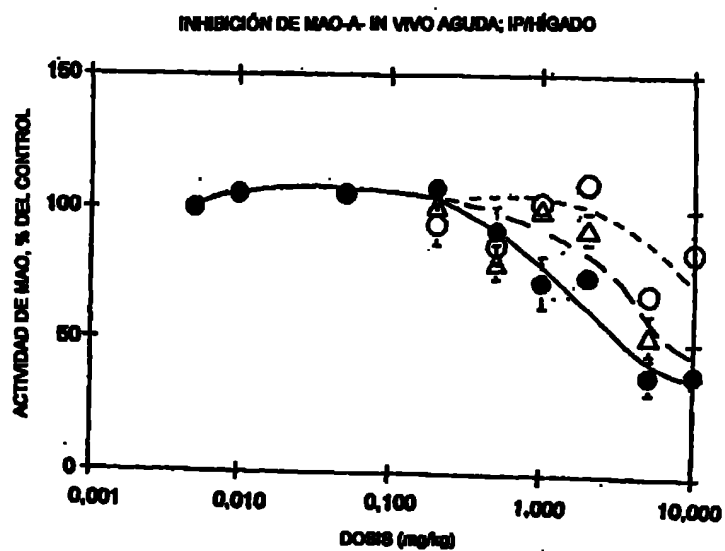
FIGURA 8

INHIBICIÓN DE MAO-B IN VIVO AGUDA; IPYGERERRO



02/0

FIGURA 8

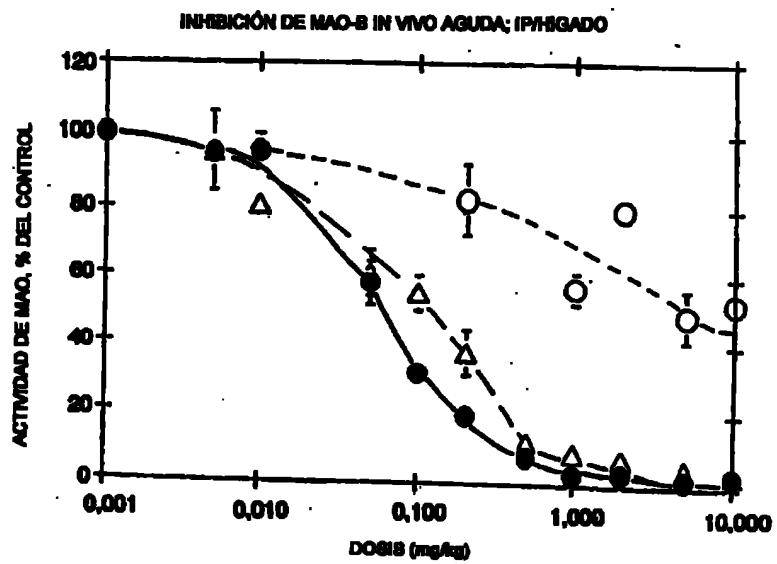


7/20

20

77

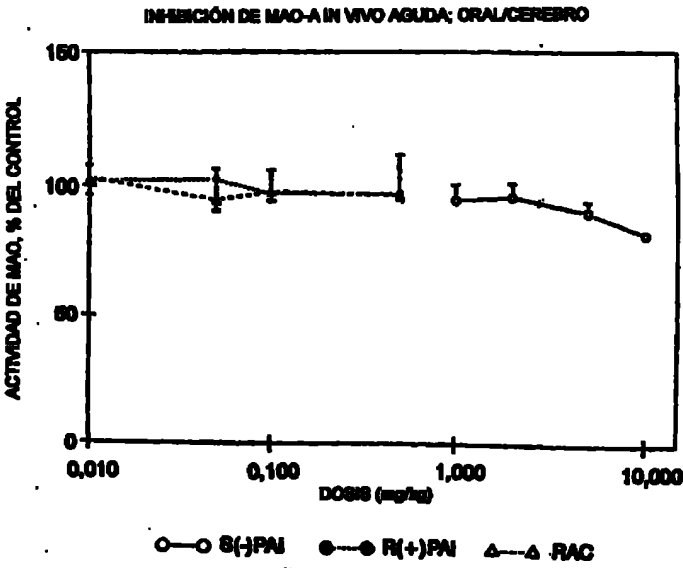
FIGURA 7



8/20

27

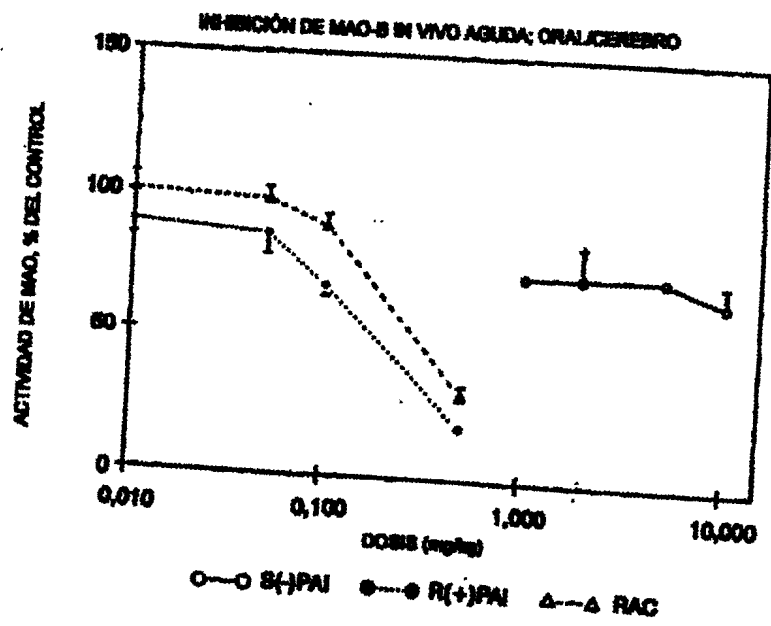
FIGURA 8



9/20

28

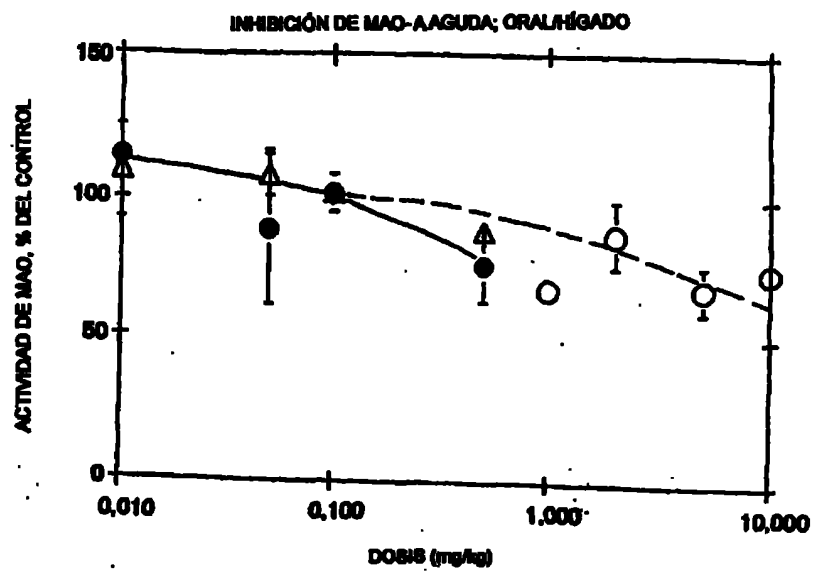
FIGURA 8



18/20

79

FIGURA 10

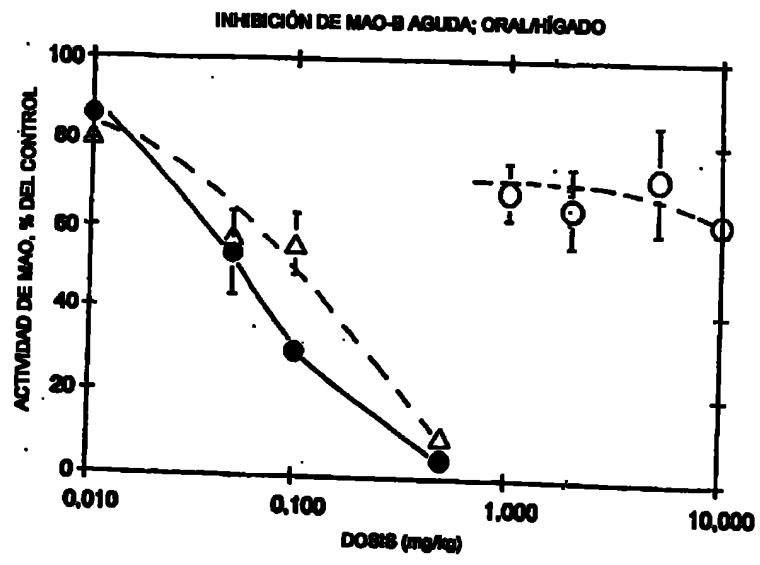


11/20

88

9/

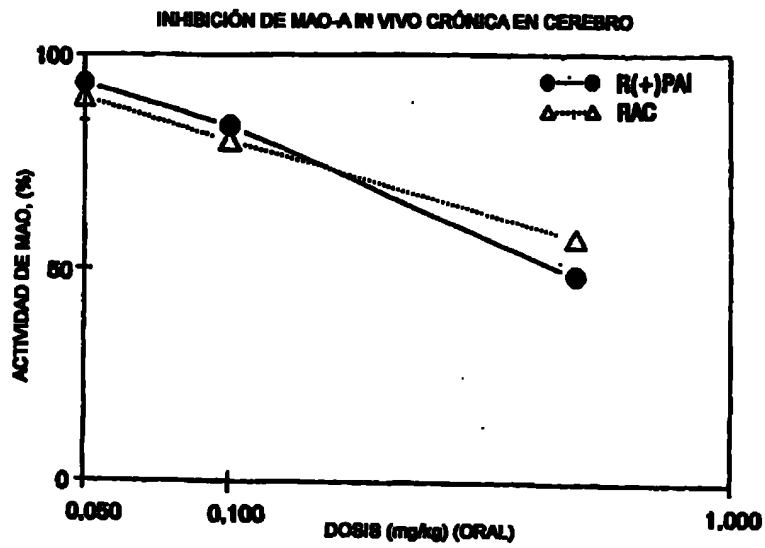
FIGURA 11



12/20

8/

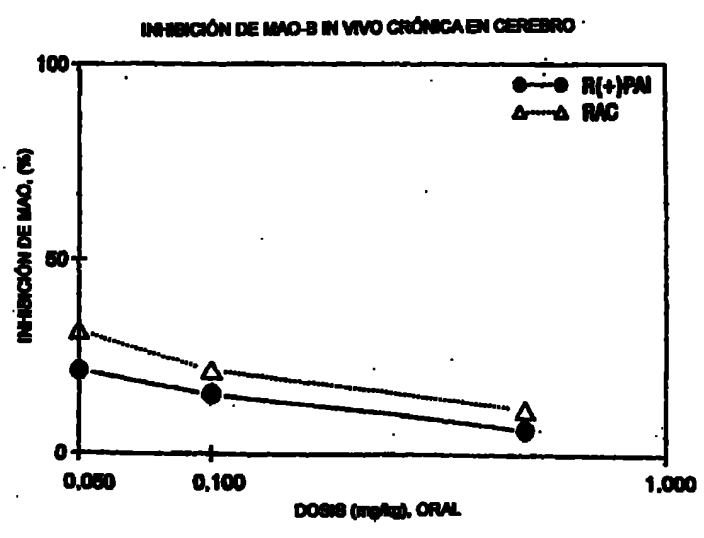
FIGURA 12



13/20

81

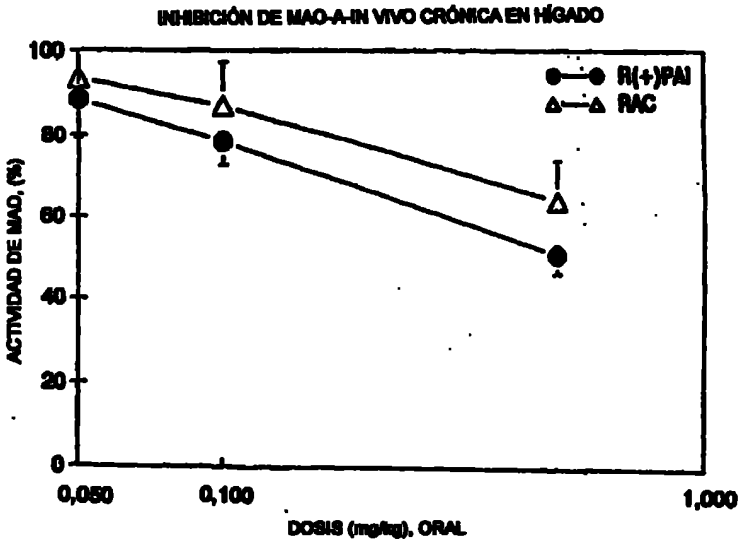
FIGURA 13



14/20

21

FIGURA 14

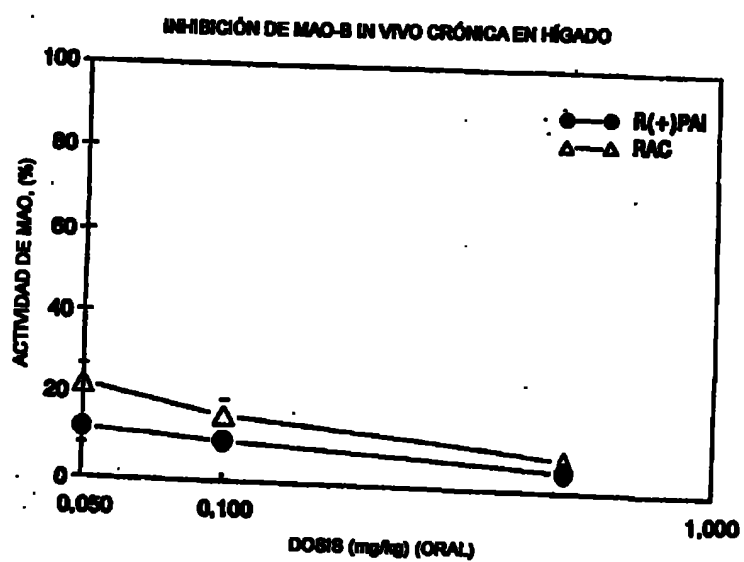


18/20

84

85

FIGURA 18

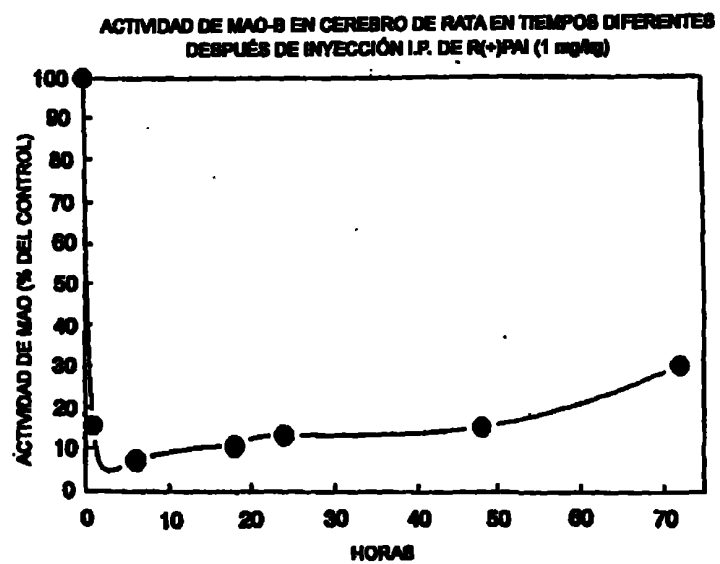


18/20

86

86

FIGURA 10



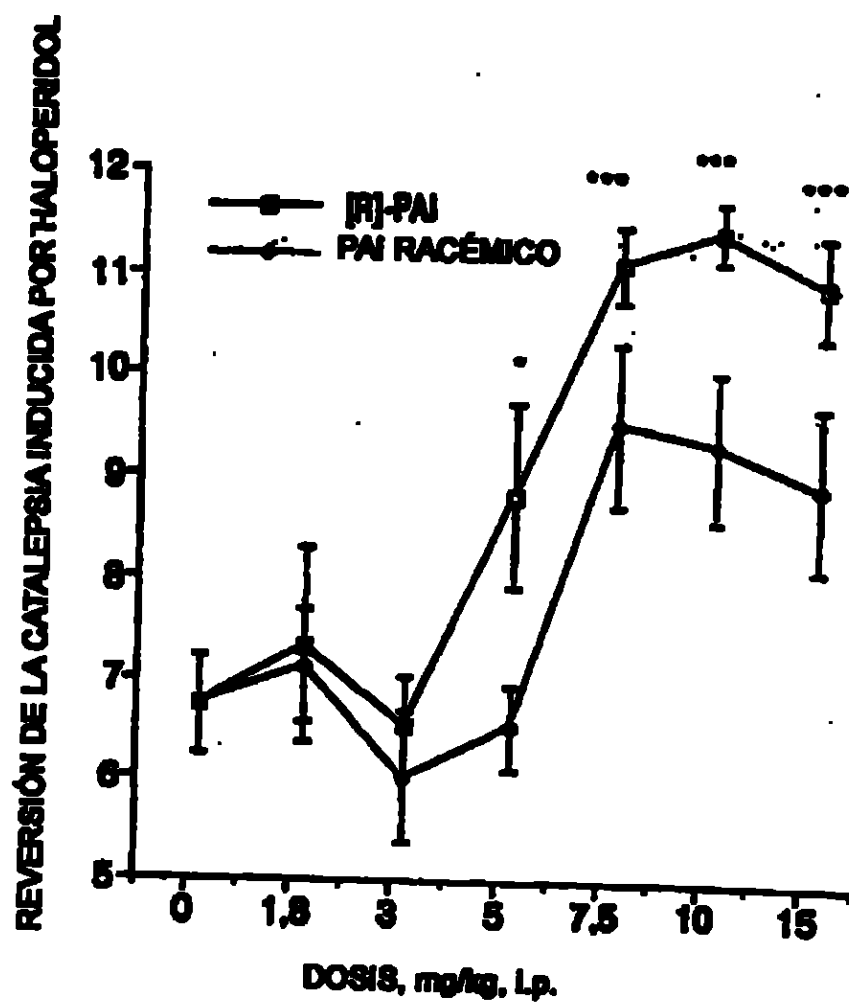
17/20

86

87 88

18/20

FIGURA 17



19/20

FIGURA 18

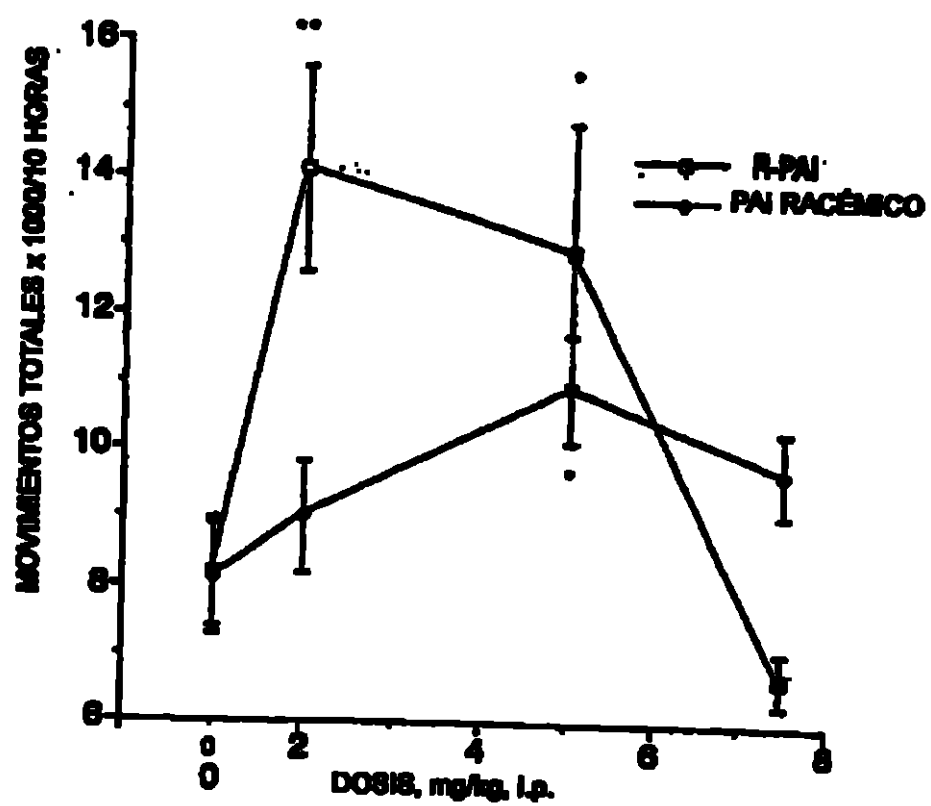
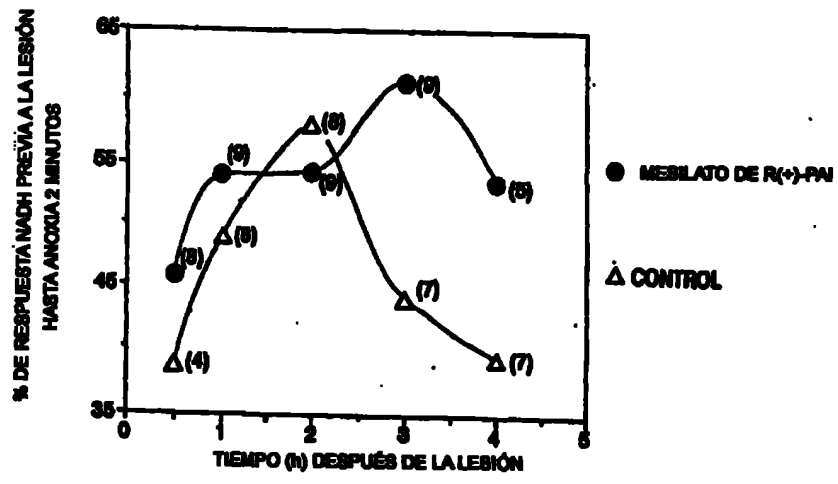


FIGURA 18



20/20

89

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ✓	()	()
MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA (X)	INCOMPLETA ()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable:

Fecha:

91

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RODRIGUEZ D'ALEMAN DILIA MARIA

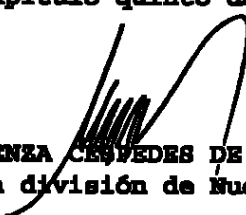
REFERENCIA	Radicación No. 5 128040
	Trámite 2
	Evento 1
	Actuación 430
	Oficio No. 4539

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

1. Debe allegar copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por el(los) inventor(s) al(los) solicitante(s) o a su(s) causante(s) (art. 26-k, Dec 486/2000).
2. Debe allegar los poderes otorgados al abogado que aparece en la solicitud como apoderado, con el lleno de los requisitos exigidos en el Código de Procedimiento Civil. Cuando se requiera debe allegarse la sustitución de los poderes, otorgada por quien aparece como apoderado principal. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de las sociedades solicitantes. Con sus correspondientes traducciones y legalizaciones.
3. Para efectos de la publicación en la gaceta se recomienda allegar el extracto diligenciado.

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMONA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 27 ABR. 2006
adpal

92

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 05-128040-00001-0000
Fec: 2008-08-27 17:05:24 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 2 PATENTES
Eve: 1 REGDEPOSITO
Act 487 SOLICIPRORROGA Folio: 2

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

SEÑORES
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
E. S. D.

REF: EXPEDIENTE NR. 05128040 ✓
SOLICITANTE: 1. TEVA PHARMACEUTICAL INDUSTRIES LTD.
2. TECHNION RESEARCH AND DEVELOPMENT
FOUNDATION, LTD. ✓
FECHA DE LA SOLICITUD: DICIEMBRE 20, 2005
TITULO: R-ENANTIÓMERO DE N-PROPARGIL-1-AMINOIDÁN,
SALES, COMPOSICIONES Y USOS DE ÉSTOS

ASUNTO: SOLICITUD DE PRORROGA DEL TERMINO LEGAL

DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, en mi condición de apoderada de la sociedad solicitante en el expediente de la referencia, atentamente solicito a Usted se me conceda una prórroga del término fijado mediante auto notificado el 27 DE Abril DE 2006, que vence el 27 de Junio de 2006 para dar respuesta a la acción oficial de examen de forma, requerida por el examinador.

Fundamento mi solicitud en el artículo 39 de la Decisión 486 de 2.000 del Acuerdo de Cartagena.

Anexo, el recibo de pago respectivo para efectos de lo anterior, y agradezco su atención.

Señor Jefe,



DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

TLR/srr

p-728

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 05-128040- -00001-0000
Fec: 2006-06-27 17:05:34 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tm. 2 PATENTES
Evs: 1 REGDEPOSITO
Act 487 SOLICIPRORROGA Folios: 2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 37,429
FECHA : MAYO 17 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE NOBET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	49045929	17/05/2006	7,214,000.

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-08	PRORROGA DE TERMINOS	69,000.00
		31 PRORROGA DE TERMINOS	69,000.00
		TOTAL :	\$ 69,000.00

SESENTA Y NUEVE MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____