

1

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

ABOGADOS

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-278000- -00003-0000

Fecha: 2014-09-05 16:23:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 30

JP

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Trámite: 11
Evento: 378
Actuación: 523

Re: PI.-ASTRAZENECA AB.-Solicitud de Patente de Invención para
"COMPUESTOS DERIVADOS DE LA 2-METIL-1-FENIL-2-(PIRIMIDIN-
2-IL)PROPAN-1-AMINA, ENANTIÓMEROS Y SALES DE LOS MISMOS,
COMPOSICIONES QUE LO COMPRENDEN".-Clase C07D 213/38.-
Expediente número 13-278.000.-

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado por fijación en lista de 29 de abril de 2014 y a mi memorial de plazo de 22 de julio de 2014.

2. Con el fin de responder las objeciones expuestas por el Señor Examinador en su Concepto Técnico correspondiente al Oficio No. **4761**, en relación con la claridad del Título y el Nivel Inventivo de la presente solicitud, me permito dirigir su atención a las siguientes modificaciones y argumentos técnicos por medio de los cuales no sólo se superan completamente dichas objeciones sino que además se establece de manera incontrovertible la patentabilidad de la solicitud en estudio.

3. **TÍTULO DE LA SOLICITUD.**

En conexión con el título de la solicitud, el Señor Examinador señala que este debe diferenciar la materia de la solicitud divisional de la solicitud originaria y además debe ser breve, descriptivo y coincidir con el objeto revelado en la descripción. En este sentido, el Señor Examinador sugiere un título para la presente solicitud.

Tomando en consideración esta objeción, me permito manifestar que teniendo en cuenta la sugerencia del Señor Examinador, el nuevo título se lee como sigue:

**"COMPUESTOS DERIVADOS DE LA 2-METIL-1-FENIL-2-(PIRIMIDIN-2-
IL)PROPAN-1-AMINA, ENANTIÓMEROS Y SALES DE LOS MISMOS,
COMPOSICIONES QUE LO COMPRENDEN".**

Sobre este particular me permito resaltar que este nuevo título refleja de manera clara el objeto de la presente invención superando así la objeción presentada por el Señor Examinador a este respecto.

4. **CAPÍTULO REIVINDICATORIO.**

De otro lado, con respeto al capítulo reivindicatorio actualmente presentado, es deseo del solicitante **modificar el capítulo reivindicatorio actualmente presentado**, de manera que se defina más claramente el objeto de la presente invención, en concordancia con las revelaciones de la descripción de la solicitud.

En conexión con el referenciado capítulo reivindicatorio modificado, me permito resaltar que este no se constituyen de ninguna manera en una ampliación al alcance de la invención, tal como fue originalmente presentada, toda vez que las nuevas reivindicaciones definen de forma más precisa el compuesto que es objeto de la presente invención de acuerdo con las enseñanzas de la descripción, tal como se expone a continuación:

Reivindicación 1. Tiene como base la reivindicación actualmente presentada, en donde se restringe considerablemente los compuestos reclamados. En consecuencia, la nueva reivindicación 1 únicamente reclama el compuesto 2-metil-1-fenil-2-(piridin-2-il)propan-1-amina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Reivindicación 2. Corresponde al isómero (S) del compuesto 2-metil-1-fenil-2-(piridin-2-il) propan-1-amina o una de sus sales farmacéuticamente aceptables que presenta sustento en la página 45 y en la página 47 de la memoria descriptiva de la presente solicitud y en la reivindicación 1 actualmente presentada.

Reivindicaciones 3 y 4. Corresponden a las reivindicaciones 3 y actualmente presentadas.

De esta forma, el capítulo reivindicatorio modificado está constituido por **4 reivindicaciones**, las cuales se refieren de forma clara y concisa a las realizaciones preferidas del compuesto de la invención de acuerdo con lo revelado dentro del texto de la descripción.

Consecuentemente, me permito resaltar que el capítulo reivindicatorio modificado supera completamente las objeciones presentadas por el Señor Examinador a este respecto y se enmarca completamente dentro de lo preceptuado en el Artículo 30 de la Decisión Andina 486 de 2000.

5. CAPÍTULO DESCRIPTIVO.

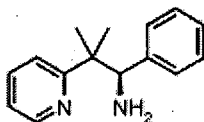
Adicionalmente, es deseo del solicitante corregir unos errores involuntarios encontrados en la memoria descriptiva tal como se expone a continuación:

- El ejemplo 2 de la memoria descriptiva ahora corresponde a la preparación del isómero (*S*)-2-metil-1-fenil-2-(piridin-2-il)propan-1-amina, dicha modificación se encuentra en la página 37, línea 11.

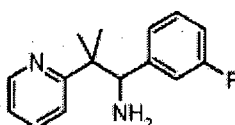
- El ejemplo 2 de la memoria descriptiva ahora corresponde a la preparación del isómero (*R*)-2-metil-1-fenil-2-(piridin-2-il)propan-1-amina, dicha modificación se encuentra en la página 45, línea 5.

En conexión con las modificaciones mencionadas, es oportuno aclarar que las mismas correcciones aplican para los valores expuestos en la tabla 1. de la memoria descriptiva página 45.

- Se ha eliminado la estructura del compuesto a continuación de la página 37, línea 6.



- Se ha eliminado la estructura del compuesto a continuación de la página 45, línea 18.



- Se han eliminado los ejemplos 4, 5 y 6 de las páginas 45 y 46, debido que los compuestos sintetizados en dichos ejemplos ya no hacen parte del capítulo reivindicatorio modificado.

En conexión con la modificación mencionada, es oportuno aclarar que las mismas correcciones aplican para los valores expuestos en la tabla 1. de la memoria descriptiva página 45, es decir, se han eliminado los valores de CI50 de los ejemplos 4 a 6.

Por lo tanto, es evidente que el capítulo descriptivo se ajusta totalmente a los requerimientos del Artículo 28 de la Decisión Andina 486 de 2000.

6. **NIVEL INVENTIVO.**

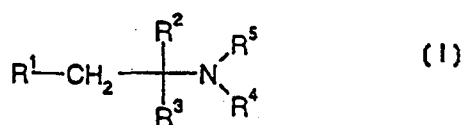
Finalmente, el Señor Examinador considera que las realizaciones reclamadas en las reivindicaciones 1 a 4 actualmente presentadas resultarían obvias a la luz de las enseñanzas de los documentos **MX PA01009448 (D1)** y **"Structural Modifications to an N-Methyl-D-aspartate Receptor Antagonist Result in Large Differences in Trapping Block" (D2)**.

A este respecto, el Señor Examinador asegura que la persona versada en la materia estaría motivada a reemplazar los compuestos divulgados en el documento D1 los átomos de hidrogeno por grupos metilo de la manera que lo sugiere el documento D2, para llegar así al objeto de la reivindicación 1 de la solicitud. Por lo cual se considera obvia.

En conexión con lo anterior, me permito señalar que los compuestos de las enseñanzas de los documentos citados no conduciría de forma evidente al compuesto 2-metil-1-fenil-2-(piridin-2-il)propan-1-amina ni el compuesto (S)-2-metil-1-fenil-2-(piridin-2-il)propan-1-amina o una de sus sales farmacéuticamente aceptables que son objeto de la presente solicitud, máxime cuando ninguno de los documentos D1 ni D2 indica de manera específica o sugiere una sustitución y menos la sustitución con dos grupos metilo en la posición 2 de la cadena alifática.

Tal y como se mencionó previamente, la solicitud de patente en cuestión está dirigida a proteger los compuestos 2-metil-1-fenil-2-(piridin-2-il)propan-1-amina y (S)-2-metil-1-fenil-2-(piridin-2-il)propan-1-amina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Sin embargo, luego de la atenta lectura del documento D1 es totalmente evidente que dicha anterioridad de ninguna manera se refiere a un compuesto como los reclamados actualmente.

Contrario a esto, el documento D1 da a conocer el compuesto de fórmula (I) como compuestos antagonistas de NMDA de baja afinidad, es la fórmula (I):



donde, R1 es piridilo, fenilo o 4-fluorofenilo;

R2 es fenilo o 4-fluorofenilo;

R3 es hidrógeno, C-6 alquilo o metoxycarbonilo;

R4 es hidrógeno o metilo, y

JOSE LLORED A CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

R5 es hidrógeno o COCH_2NH_2 , y metabolitos de los mismos, como bases libres y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Del compuesto de fórmula (I) del documento D1 es evidente, que a partir de los sustituyentes divulgados no es posible obtener de manera obvia el compuesto de la objeto de la presente solicitud.

Así mismo, el documento D1 divulga una realización preferida del compuesto de fórmula (I) que corresponde a 1-fenil-2-(2-piridil) etanamina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, más preferiblemente el isómero (S) (Pág. 3, líneas 5 - 8 de D1), claramente ni las realizaciones preferidas propuestas para el compuestos conocido en D1, motivan a la persona normalmente versada en la materia a realizar las sustituciones de dos grupo metilo en la posición 2 de la cadena alifática.

Teniendo en cuenta los argumentos expuestos anteriormente, el compuesto 1 de la presente invención (a continuación) corresponde con la sal del dihidrocloruro del compuesto 2-metil-1-fenil-2-(piridin-2-il)propan-1-amina, el compuesto 2 (a continuación) del documento D1 corresponde con el isómero (R) del compuesto 1-fenil-2-(2-piridil)etanamina. Como puede observarse la diferencia entre estos dos compuestos consiste en la presencia de dos grupos metilo en la posición 2 de la cadena alifática, que no se encuentra divulgado de forma específica ni sugerido por ninguno de los documentos citados como anterioridades. Es así como los compuestos 1 y 2 parecen ser idénticos, incluyendo su estereoquímica.

En conexión, con la obviedad en la elección de los sustituyentes y su ubicaciones espaciales en particular, cuando se aplican **las reglas de Cahn-Ingold-Prelog** para nombrar esteroisómeros de compuesto orgánicos y en particular para estos dos compuestos, es oportuno aclarar que la presencia de dos grupos metilo en el compuesto 1 cambia la prioridad de los grupos alrededor del carbono quiral. **Por lo tanto el compuesto reclamado corresponde a una configuración isomérica (S), y el revelado en D1 corresponde a una configuración isomérica (R)** (ver figura 2).

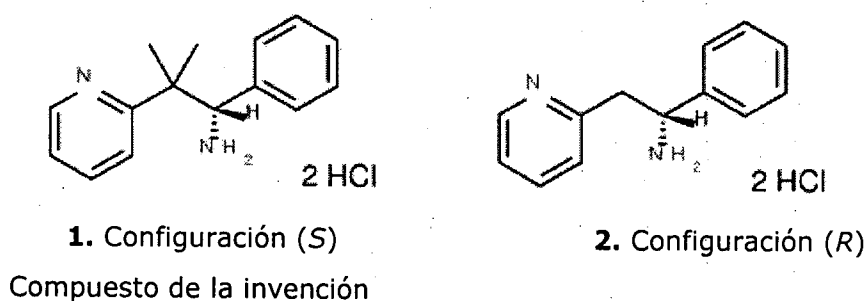


Figura 2. Configuración isomérica del compuesto de la solicitud (A) y del compuesto de D1 (B)

Es importante resaltar esta diferencia de los sustituyentes y el hecho que el documento D1 no sugiere la modificación del compuesto allí revelado para incluir sustituyentes metilo y tener la configuración isomérica (S), puesto que al no existir tal sugerencia no puede considerarse obvia la estructura particular obtenida por la presente invención.

Así mismo, no puede considerarse obvio el hecho que la persona normalmente versada en la materia a partir de las enseñanzas de D1 no tenía información sobre el efecto técnico que podía tener un compuesto de (S) 2-metil-1-fenil-2-(piridin-2-il)-propan-1-amina en el tratamiento de la depresión, dado que dicho compuesto nunca fue ensayado.

En relación con el efecto técnico sorprendente del compuesto de la invención, el solicitante ha evaluado la actividad del compuesto 1 (S) 2-metil-1-fenil-2-(piridin-2-il)-propan-1-amina, frente a la actividad del Compuesto 2 divulgado en las anterioridades citadas por el Examinador, de acuerdo con el ensayo descrito en el Anexo 1. En donde el solicitante ha encontrado de manera sorprendente una ventaja técnica del compuesto de la presenta invención asociada a la concentración inhibitoria IC₅₀, como se muestra en los resultados a continuación:

Compound	Mean IC ₅₀ (μM)
Compound 1	3
Compound 2	10

Este ensayo evidencia que el compuesto 1, (S) 2-metil-1-fenil-2-(piridin-2-il)-propan-1-amina, presenta un sorprendente efecto antagonista de NMDA con una concentración inhibitoria 50 más de tres veces menor a la requerida con el compuesto 2 conocido en la anterioridad. En este sentido, con el compuesto 1 de la invención es posible inhibir la unión del antagonista natural del receptor con una cantidad significativamente menor de compuesto.

Es así, como el cambio inesperado en la actividad del compuesto de la invención no habría sido predicho por la persona medianamente versada en la materia. Por lo tanto, las reivindicaciones de la presente solicitud presentan altura inventiva frente a los documentos citados por el señor Examinador.

En este punto es importante señalar, que los resultados mostrados para este ensayo fueron obtenidos con un método experimental diferente al ensayo realizado la para evaluación biológica descrita en la descripción de la presente invención (Pág. 46 y

47 de la solicitud). Por lo tanto, los resultados obtenidos de valores IC_{50} no son comparables.

Por su parte, el documento D2 da a conocer un estudio en donde se evaluaron 23 compuesto estructuralmente relacionados a la baja afinidad de antagonistas de NMDA. En este sentido, el Señor Examinador resalta ciertos compuestos que según su opinión, le sugerirían a la persona del oficio normalmente versada en la materia la obtención del compuesto que es objeto de la presenta invención.

En este sentido, vale la pena resaltar que partiendo de las enseñanzas del documento D2 de ninguna manera es posible derivar de manera obvia los compuestos objeto de la presente invención.

En conexión con lo anterior, y contrario con la afirmación de Señor Examinador, el documento D2 de ninguna manera sugiere una sustitución en la posición 2 de la cadena alifática de dos grupos metilo. Es evidente que ninguna de las enseñanzas de los compuestos conocidos en D2 conducirían de manera obvia a la obtención de compuestos doblemente sustituidos en la posición 2 de la cadena alifática, ni mucho menos que se pueda derivar de manera obvia el efecto técnico sorprendente asociado a la actividad inhibitoria de los compuestos de la invención.

En este sentido, es deseo del solicitante presentar evidencia que permita soportar de manera clara el efecto técnico sorprendente de los compuestos de la invención. Por lo tanto, el Anexo 2. corresponde al artículo de *Gene C. Palmer, A Edward F. Cregan, Paul Bialobok, Simon G. Sydserff, Thomas J. Hudzik, And Dennis J. McCarthy "The Low-Affinity, use-Dependent NMDA Receptor Antagonist AR-R15896AR"*, da a conocer el compuesto 3. Que presenta la estructura a continuación:

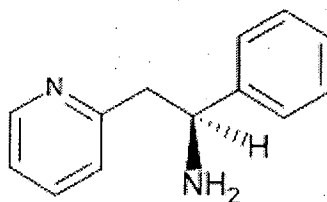


Figura 3. Compuesto 3. Configuración del isómero (S) del compuesto del documento D2. Nombrado como AR-R15896AR.

Es claro que el compuesto 3 tampoco presenta la sustitución con dos metilos en la posición 2 de la cadena alifática, el cual corresponde al isómero (R) del compuesto 2 expuesto en la Figura 2. Adicionalmente, Palmer et al. en particular describe la potencia del compuesto 2 respecto a la potencia del compuesto 3. En este sentido, menciona que la actividad del compuesto 3, es decir el isómero (S), resulto poseer mayor potencia en

el sitio del canal iónico con un valor IC_{50} : 1.3 μ M, mientras que el compuesto 2, es decir el isómero (*R*) presento un valor de IC_{50} de 6.9 μ M, además que exhibió un perfil preclínico mejorado asociado a la potencia y seguridad cuando fue probado *in vivo* e *in vitro*. (Pág. 407)

Basado en lo expuesto anteriormente, es evidente que la persona del oficio normalmente versada en la materia debería extrapolar directamente la relación de la potencia relativa entre el isómero (*S*) con un valor de IC_{50} : 1.3 μ M y el isómero (*R*) con un valor de IC_{50} de 6.9 μ M, para afirmar que la misma relación de potencia relativa debe existir entre los compuestos estructuralmente equivalentes que presentan dos sustituciones de metilo; para concluir finalmente que el compuesto estructuralmente más cercano al compuesto 2, es decir el isómero (*R*), presentaría más baja potencia que el isómero (*S*).

En otras palabras, todos los compuestos estructuralmente cercanos al compuesto 2, presentarían menor potencia relativa en el sitio del canal iónico, por ende, teniendo en cuenta la similitud estructural entre los compuestos 1 y 2, el compuesto 1 que corresponde al isómero (*S*) del compuesto de la invención debería presentar menor potencia relativa en el sitio del canal iónico.

Contrario con lo expuesto anteriormente, el Solicitante ha encontrado sorprendentemente que el isómero (*S*) del compuesto 2-metil-1-fenil-2-(piridin-2-il)propan-1-amina, es de hecho más potente que el isómero (*R*), tal y como se exhibe en la Tabla 1. (Página 45 de la memoria descriptiva), en donde notoriamente el ejemplo 2, el compuesto (*S*)-2-metil-1-fenil-2-(piridin-2-il)propan-1-amina presenta un valor de 6.4 μ M y el Ejemplo 3, el compuesto el compuesto (*R*)-2-metil-1-fenil-2-(piridin-2-il)propan-1-amina presenta un valor de 35 μ M.

Sumado a lo anterior, las potencias relativas entre los dos isómeros estructuralmente más cercanos, son totalmente contrarios con los resultados predichos en el documento de Palmer et al. Por lo tanto, dicho efecto técnico inesperado no habría podido ser previsto a partir de las enseñanzas de los documento D1 y D2. En consecuencia, la persona normalmente versada en la materia no habría podido derivar de manera obvia dicha actividad.

Asimismo, no resultaría obvio realizar una sustitución con dos grupos metilo en la posición 2 de la cadena alifática, aun así asumiendo que es obvia dicha sustitución, el experto en la materia no podría predecir que los compuestos mantendrían la misma actividad ni mucho menos cuál de los isómeros (*S*) o (*R*) presentaría efecto técnico inesperado asociado a la actividad.

JOSE LLORED A CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

De acuerdo con los argumentos expuestos a lo largo del presente memorial, y contrario a la afirmación hecha por el Examinador, el Compuesto 1, presenta ventaja técnica mejorada frente al compuesto divulgado en las anterioridades.

Tan es así, que la persona versada en la materia debe realizar múltiples cambios y deducciones partiendo de las enseñanzas del estado de la técnica como se muestra a continuación:

Seleccionar la inclusión de una sustitución sobre el átomo de carbono número 2 de la cadena alifática.

Seleccionar que esa sustitución corresponda a DOS grupos metilo; y

Seleccionar dentro de las realizaciones preferidas el isómero (S) del compuesto de la invención.

Por lo tanto, me permito resaltar que las enseñanzas de los documentos citados de ninguna manera sugieren el compuesto 2-metil-1-fenil-2-(piridin-2-il) propan-1-amina, enantiómeros y sales de los mismos, y por lo tanto, la persona versada en la materia no derivaría de forma evidente el compuesto que es objeto de la presente invención a partir de las enseñanzas de estos documentos.

Finalmente, en relación con el argumento del Señor Examinador en donde afirma *"que existe solapamiento de la materia reclamada en la reivindicación independiente 1, con materia que ya fue objeto de estudio de fondo y decisión mediante la Resolución No. 60353 del 17 de octubre de 2013 en la solicitud originaria"*, me permito llamar la atención de su Despacho con el fin de recalcar que en virtud de las modificaciones realizadas al capítulo reivindicatorio presentado junto con este memorial, la materia actualmente reclamada cumple con los requisitos de patentabilidad y no se encuentra protegida por el beneficio de patente en Colombia.

Así mismo, la invención ha sido reconocida como patentable por los Examinadores de China, Cuba, Japón, Méjico, Taiwán y Ucrania, y en especial resaltamos a la Oficina De Japón, teniendo en cuenta, el reciente acuerdo firmado entre dicha Oficina y la Oficina Nacional para el estudio acelerado de patentes, el cual entró en vigencia a partir del 1 de Septiembre de 2014, y en donde se desprende la posibilidad de que a pesar de la independencia con la que cuenta la SIC y los acuerdos firmados con otros países como Japón y La Oficina Española de Marcas y Patentes, dicha entidad, ha empezado a darle credibilidad a las decisiones tomadas por dichas autoridades de Patentes a través de la figura del "Patent Prosecution Highway PPH".

En este sentido, recientemente Colombia ha firmado el acuerdo del PPH con Japón, permitiendo así reconocer que a pesar de la independencia de las Oficinas de

Patentes, si una solicitud ha sido reconocida como patentable en dichos países como en el presente caso en Estados Unidos, se entiende que la decisión emitida por dicha oficina, tiene más peso y puede ser tenida en cuenta a la hora de revisar la patentabilidad de una solicitud, hecho que evidentemente representa un claro indicio a favor de la misma.

De conformidad con lo antes mencionado, me permito anexar la materia protegida por la patente japonesa No. 5491524, con el fin de demostrar la identidad entre la materia reclamada y la materia protegida por beneficio de patente. Anexo 3.

En conexión con lo discutido anteriormente, me permito referirme al señalamiento que hace el Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina con respecto a las definiciones de "obvio" y "evidente" en la evaluación del Nivel Inventivo de una solicitud de patente:

"Resulta pertinente, a los efectos del artículo 4 de la Decisión 344, definir qué se entiende por "obvio" y por "evidente" a fin de determinar qué se debe entender por nivel inventivo.

Lo obvio es aquello que salta a la vista de manera clara y directa; lo "que se encuentra o pone delante de los ojos, muy claro o que no tiene dificultad". Mientras que lo evidente consiste en la "certeza clara y manifiesta de la que no se puede dudar; cierto, claro, patente y sin la menor duda". De forma que algo que resulte obvio no es necesariamente evidente; empero lo que es evidente, es también obvio.

En este orden de ideas, se puede concluir que una invención goza de nivel inventivo cuando a los ojos de un experto medio en el asunto de que se trate, se necesita algo más que la simple aplicación de los conocimientos técnicos en la materia para llegar a ella, es decir, que de conformidad con el estado de la técnica el invento no sea consecuencia clara y directa de dicho estado."

Dentro de este marco de ideas y a la luz de los argumentos expuestos en el presente memorial, me permito resaltar que al no "saltar a la vista de manera clara y directa" a partir de los documentos citados el Compuesto, como el que es objeto de la presente invención y al no tenerse "certeza clara y manifiesta" a partir de las enseñanzas de dichos documentos de que este compuesto presentaría actividad mejorada frente a los compuestos del estado de la técnica, resulta innegable el Nivel Inventivo de la solicitud en estudio con respecto a los documentos citados.

7. **CONCLUSIÓN.**

Para finalizar me permito resaltar que el nuevo título de la solicitud refleja completamente la materia para la cual se busca protección.

De otra parte, en virtud de los argumentos discutidos, se estableció que la materia reclamada por el mencionado capítulo reivindicatorio modificado de ninguna manera puede resultar evidente a partir de los documentos D1 y D2, máxime cuando ninguno de dichos documentos sugiere una sustitución sobre la posición 2 de la cadena alifática ni mucho menos la sustitución con dos grupos metilo, ni mucho menos derivara de manera obvia el efecto técnico inesperado del isómero (S), tal y como se reclama en la presente solicitud. Por lo tanto resulta innegable que la solicitud en estudio es inventiva con respecto a los documentos citados.

8. Anexo al presente memorial me permito presentar:

- (i) Copia de la página **48** que corresponde al capítulo reivindicatorio modificado, discutido dentro del presente memorial, constituido por **4** reivindicaciones;
- (ii) Copia de las páginas **37, 45 y 46** de las correcciones realizadas a la memoria descriptiva;
- (ii) Anexo I. *"Aislamiento de una línea de célula CHO / Humana NR1/NR2A estable";*
- (iv) Anexo II. Gene C. Palmer, A Edward F. Cregan, Paul Bialobok, Simon G. Sydserff, Thomas J. Hudzik, And Dennis J. McCarthy ***"The Low-Affinity, use-Dependent NMDA Receptor Antagonist AR-R15896AR"***; y
- (v) Anexo III. Reivindicaciones protegidas por la Oficina de patentes Japonesa bajo el número JP 5491524, con su respectivo certificado de traducción.

JOSE LLORED A CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

9. En vista de lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las modificaciones y los argumentos presentados y conceder el privilegio de patente solicitado.

Señor Superintendente,



ALICIA LLORED A RICAURTE

T. P. 53.215

Dirección para Notificaciones: notificacionespatentes@lloredacamacho.com

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que es:

5

2-metil-1-fenil-2-(piridin-2-il)propan-1-amina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Un compuesto que es:

10

(S)-2-metil-1-fenil-2-(piridin-2-il)propan-1-amina o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

3. Una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, donde la sal farmacéuticamente aceptable es un fumarato del compuesto.

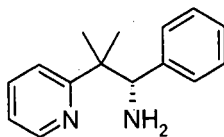
15

4. Una composición farmacéutica que comprende: un compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 1, 2 ó 3 y un adyuvante, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

20

1H), 7.25-7.28 (m, 2H), 7.38-7.40 (m, 3H), 8.00 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 8.11 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 8.56 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.77 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H); ^{13}C RMN (75 MHz, CD_3OD): δ 22.2, 22.6, 43.7, 62.4, 126.2, 126.4, 128.1, 128.9, 129.6, 133.3, 142.9, 146.9. MS: m/z 227.

Ejemplo 2: La (S)-2-metil-1-fenil-2-(piridin-2-il)propan-1-amina se preparó partiendo de 2-metil-1-fenil-2-(piridin-2-il)propan-1-amina racémica utilizando cromatografía SFC quiral. Este aceite se disolvió en acetato de isopropilo y se añadió una solución 5-6 N de HCl en alcohol isopropílico. La mezcla se concentró y se lavó con éter para obtener 3 como un sólido blanco. p.f. = 188 °C. ^1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 1.59 (s, 3H), 1.76 (s, 3H), 5.09 (s, 1H), 7.25-7.28 (m, 2H), 7.38-7.40 (m, 3H), 8.00 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 8.11 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 8.56 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.77 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H). MS: m/z 227.



A continuación se describe una ruta alternativa para generar el ejemplo 2:

(75 MHz, DMSO-d 6): δ ppm 23.7, 25.7, 43.8, 62.7, 121.3, 122.3, 128.0, 128.1, 128.6, 135.5, 137.4, 137.8, 148.7, 164.9, 168.3. MS: m/z 227.

5 Ejemplo 3: La (R)-2-metil-1-fenil-2-(piridin-2-il)propan-1-amina se preparó partiendo de 2-metil-1-fenil-2-(piridin-2-il)propan-1-amina racémica utilizando cromatografía SFC quiral. Este aceite se disolvió en acetato de isopropilo y se
10 añadió una solución 5-6 N de HCl en alcohol isopropílico. La mezcla se concentró y se lavó con éter para obtener 4 como un sólido blanco. p.f. = 188 °C. ^1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 1.59 (s, 3H), 1.76 (s, 3H), 5.09 (s, 1H), 7.25-7.28 (m, 2H), 7.38-7.40 (m, 3H), 8.00 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 8.11 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 8.56 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 8.77 (d, J = 5.7 Hz, 1H). MS:
15 m/z 227.

Evaluación biológica

La actividad antagonista de NMDA se puede evaluar in vitro estudiando la capacidad de un compuesto para inhibir la
20 unión del antagonista del receptor 10,11-dihidro-5-metil-5H-dibenzo[a,d]-ciclohepten-5,10-imina (MK801) al receptor. El método fue descrito por Foster y Wong, Br. J. Pharmacol. 91, 403-409 (1987).

Los valores de CI_{50} de los ejemplos 1-6 se exponen en la
25 Tabla 1.

Tabla 1

Compuesto del ejemplo #	Unión de MK801 CI_{50} (uM)
Ejemplo 1	12
Ejemplo 2	6.4
Ejemplo 3	35

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica

WO 2010/074647**PCT/SE2009/051493**

la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

Anexo I.

Aislamiento de una línea de célula CHO / Humana NR1/NR2A estable;

Células (CHO-K1) de Ovario de Hamster de China fueron transfectadas con reagente Effectene^R siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células fueron triplemente transfectadas con plásmidos pTet-Off, pTRE2-pur hNR1, y pGEN IRES Hyg-hNR2A. La transfección se hizo en un medio que contiene F12, de Hamster, 10% FBS, 2 mM L-Glutamina, 200 μ M quetamina y 2 μ g/ml doxiciclina. 24 horas después de la transfección, las células fueron divididas 1:10 en un medio en el cual 200 μ M de quetamina fueron remplazados con 20 μ M MK-801. Después de 24 horas adicionales (24 horas después de la transfección), se llevó a cabo una selección antibiótica así: 1 μ g/ml puomicina, 500 μ g/ml higromicina, y 500 μ g/ml de geneticina (G418). Después de dos semanas en el medio de selección (con cambios de medio cada 3-5 días), se desarrollaron 15-20 clones en el frasco. Estos clones fueron acumulados y cultivados durante una semana adicional. Las células fueron luego plateadas clonalmente en dos láminas con 96 depósitos a 1 célula/depósito por dilución limitante. Después de tres semanas, las células fueron tripsinizadas y cada lámina original con 96 depósitos fue dividida en dos: una lámina fue cultivada en presencia de 2 μ g/ml doxiciclina y la otra fue cultivada para ensayo sin doxiciclina. Después de tres días, las láminas de ensayo fueron protegidas contra la expresión funcional NMDAR estimulándolas con 50 μ M glicina/100 μ M glutamato. Dos clones positivos fueron expandidos y examinados para ver la respuesta a la dosis de glutamato con glicina fijada en 30 μ M. Un clon, CHO-1H8 dio una respuesta fuerte, dependiente de la dosis al glutamato y fue seleccionado para caracterización adicional.

Cultivo de Célula CHO-1H8:

Para cultivo de rutina, se mantuvieron células CHO-1H8 en Hamsters F-12 + 2 mM L-Glutamina (PAA, E15-817), 10% FBS (Sigma, F7442), 1 μ g/mL puomicina (Invitrogen A1113802), 250 μ g/mL higromicina (Invitrogen 10687010), 250 μ g/mL geneticina (Invitrogen 11811-098), 1 μ g/mL doxiciclina (Sigma D9891), y 3000 μ M del bloqueador de canal NMDA del ácido (R)- α -amino-6,7-dimetil-3-(fosfonometil)-2-quinolinopropanóico (CAS 170847-87-7, Swahn et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 1996, 1635). Las células que se usaron en el ensayo funcional fueron crecidas en el mismo medio que anteriormente, pero 1 μ g/mL doxiciclina fue remplazada por 2 μ g/mL tetraciclina (Sigma T7660) tres días antes de la inducción. El medio de crecimiento fue remplazado cada 2-3 días, i.e. lunes-miércoles-viernes. Para la inducción de la expresión NMDAR, se cultivaron células CHO-1H8 sin doxiciclina o tetraciclina (pero con CAS 170847-87-7) durante 48 horas en un medio preparado con el Sistema Tet Aprobado FBS (BD Biosciences).

Experimentos con abrazadera de parche automatizado:

Los experimentos con abrazadera de parche permiten la detección de corrientes por medio del canal NR1/NR2A en la línea de célula descrita anteriormente. Con el fin de monitorear el bloque de las corrientes específicas del canal NR1/NR2A, se desarrolló e implementó un ensayo electrofisiológico en el instrumento electrofisiológico automatizado QPatch16 (Sophion).

Las células NR1/NR2A fueron inducidas durante 48 horas y disociadas con TrypLE Express (GIBCO, 12604) inmediatamente antes de ser usadas. Las células fueron resuspendidas en un amortiguador de almacenamiento QPatch (500 ml CHO-S-SFM II (Invitrogen, 12052), HEPES 25 mM, CAS 170847-87-7 (100 μ M) a 1-2 millones de células por ml y se cargaron en el instrumento QPatch16. Las células fueron vertidas en los depósitos QPlate y se estableció configuración para todas las células usando los flúidicos integrados y controles de presión del instrumento y se siguieron los protocolos recomendados por el fabricante. La solución para el baño extracelular está compuesta de (mM): NaCl 140, KCl 5, BaCl₂ 1, HEPES 5, glucosa 3, pH ajustado a 7.35-7.4 usando NaOH. La solución intracelular contiene (mM): CsF 120, NaCl 10, HEPES 10, Na₂ fosfocreatina 20, EGTA 10 (en CsOH), Na₂ATP 4, GTP 0.3, pH ajustado a 7.3 usando CsOH. Se tomaron muestras de las corrientes a 2 KHz y se filtraron a 1 KHz.

Con el fin de evaluar los efectos de los compuestos de análisis como inhibidores de los canales NR1/NR2A, primero se activaron los canales por adición de un NMDA agonista NMDAR (Sigma, M3262) y Glicina (Merck, 3570) a la solución de baño extracelular. Las células NR1/NR2A fueron grapadas a -60 mV. Las corrientes de NR1/NR2A fueron registradas durante 12 sec después de la activación con 100 μ M NMDA/10 μ M Glicina ($I_{control}$). Luego se agregó 0.41 μ M del compuesto en presencia de 100 μ M NMDA/10 μ M Glicina y se registró durante 10 sec seguido de lavado con dos adiciones salinas ($I_{análisis}$). Se llevó a cabo un registro de línea de base antes de la activación del canal NR1/NR2A ($I_{línea de base}$).

Se hicieron adiciones y registros similares con 1.23 μ M, 3.70 μ M, 11.11 μ M y 33.33 μ M de los compuestos de análisis secuencialmente.

Se calculó el porcentaje de inhibición de las corrientes NR1/NR2A en cada concentración del compuesto de análisis como $100 \times (1 - I_{análisis} / I_{control})$.

Los valores del porcentaje de inhibición fueron calculados en cada concentración del compuesto de análisis para cada célula y se utilizó el programa a la medida de la curva GraphPad (V. 4.03, Prism) para ajustarlo con una ecuación Hill para proporcionar valores IC₅₀ y valores de inclinación Hill.

The Low-Affinity, Use-Dependent NMDA Receptor Antagonist AR-R 15896AR

An Update of Progress in Stroke

GENE C. PALMER,^a EDWARD F. CREGAN, PAUL BIALOBOK,
SIMON G. SYDSERFF, THOMAS J. HUDZIK, AND DENNIS J. MCCARTHY
Astra Arcus USA, Rochester, New York 14602, USA

ABSTRACT: Use-dependent *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists protect neurons from the lethal consequences of excessive stimulation by excitatory amino acids. Clinical development of high-affinity compounds such as MK801 have been limited due to untoward side effects. Toward this end, the lower-affinity use-dependent NMDA antagonists have greater margins of safety and have advanced to clinical trials for stroke, epilepsy, head trauma and chronic neurodegenerative disorders. AR-R 15896AR is currently in Phase II trials for stroke and has been repeatedly demonstrated to afford neuroprotection in a variety of *in vivo* and *in vitro* models associated with ischemia/excitotoxic conditions.

INTRODUCTION

Conditions of trauma, ischemia or seizures promote enhanced release of the excitatory neurotransmitter, glutamate in the brain. Excessive stimulation of critical postsynaptic *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) subtype receptors by glutamate results in a massive depolarization concomitant with excessive amounts of Ca^{2+} accumulating within the neuron, culminating in cell death—the “Excitotoxic Amino Acid Hypothesis” advanced by Olney.¹ Use-dependent antagonists acting within the ion channel of the NMDA receptor have been shown repeatedly to protect susceptible neurons against the deleterious consequences of ischemia/anoxia, head trauma and/or seizures.^{2–5} The major problem with clinical application of high-affinity competitive and uncompetitive NMDA receptor antagonists is their propensity to produce untoward side effects. Low-affinity, use-dependent NMDA receptor antagonists likewise exhibit neuroprotection, but side effects are less common.^{6–8} At least five such compounds are currently undergoing clinical trials for stroke (NPS 1506, AR-R 15896AR),^{9,10} head trauma (NPS 1506, HU-211),^{9,11} epilepsy (remacemide hydrochloride, ($\pm$)-5-aminocarbonyl-10,11-dihydro-5*H*-dibenzo[*a,d*]cyclohepten-5,10-imine (ADCI)),^{7,8} and chronic neurodegenerative disorders such as Alzheimer’s, Parkinson’s, and Huntington’s diseases (memantine and remacemide hydrochloride).^{4,8} The present report focuses principally upon the state of development of AR-R 15896AR with respect to its mechanism of action(s) and neuroprotective properties.

^aCorresponding author: Gene C. Palmer, Ph.D., Astra Arcus USA, P.O. Box 20890, Rochester, NY 14602. Phone, 716/274-5575; fax, 716/272-3910.
e-mail, eugene.palmer@arcus.us.astra.com

Background

AR-R 15896AR is the [S] enantiomer of [R,S]-alpha-phenyl-2-pyridine-ethanamine dihydrochloride (other designations used are FPL 15896AR and ARL-15896AR) which was discovered in our laboratories using a rational chemical synthesis and screening approach to develop a highly safe, rapidly acting, single isomeric form of a low-affinity, use-dependent NMDA receptor antagonist with an uncomplicated pharmacokinetic profile. The [S] enantiomer turned out to possess greater potency at the ion channel site than the [R] enantiomer, AR-R 15895AR (respective IC_{50} s = 1.3 μ M and 6.9 μ M), plus it exhibited a more favorable preclinical profile when tested *in vivo* and *in vitro* with respect to potency and safety.¹² Regarding safety, AR-R 15896AR did not show any evidence of:

- (1) Abuse liability in rats trained to self-administer phencyclidine (PCP) or cocaine, nor did it elicit any evidence of PCP-like behaviors in rats evaluated in an open field.¹³ In fact when given in high doses (30 or 60 mg/kg, p.o.) AR-R 15896AR significantly attenuated the stereotyped behavioral responses produced by PCP in the open field test (Hudzik, unpublished).
- (2) Impairments in learning acquisition or memory (delayed nonmatching to sample) or related operant paradigms.^{14,15}
- (3) Motor impairment in either mice or rats required to perform a series of complex motor skills.^{10,12}

Preclinical Pharmacokinetics

In pharmacokinetic studies in rats, plasma and brain levels of AR-R 15896AR were rapidly attained following either i.v. or p.o. administration. Kinetics were linear with a terminal half-life of 4.75 (i.v.) to 5.42 (p.o.) hr. In fact, brain levels exceeded that of plasma, while the ratio of brain to plasma concentration and brain to plasma-free concentration remained constant over time. Moreover, there was a direct correlation between brain levels and efficacy of AR-R 15896XX (XX = free base) in the rat maximal electroshock seizure test following either i.v. or p.o. dosing, indicating a relative independence from blood-brain barrier mechanisms (absorption, distribution, excretion, first pass metabolism, etc.) limiting the bioavailability of orally administered AR-R 15896AR.¹²

Clinical

Following a successful toxicology evaluation in which rats and dogs were continuously exposed to intravenous levels of AR-R 15896AR for 30 days, the compound entered a randomized, double-blind, placebo-controlled Phase I clinical trial with healthy male volunteers (20–38 years). In a second study a single ascending multiple dose administration was carried out over 3 days in both young male or older male and female volunteers (55–70 years). Doses were given i.v. over a 15-min period at the low doses (1, 3, 10, and 20 mg) and over a 60-min period for the high doses (80, 120 and 160 mg). AR-R 15896AR exhibited linear kinetics and was rapidly distributed with a terminal half-life of 13.6 hr. Central nervous system (CNS) side effects were minor and included dose-related dizziness, abnormal vision, headache, paraesthesia and impaired concentration. Younger volunteers tolerated a loading dose of

160 mg with nine maintenance doses of up to 70 mg administered every 8 hr over a 3 day period, while older volunteers tolerated a similar regimen with a loading dose of 120 mg followed by maintenance doses of 60 mg. Side effects were similar, and dizziness was the most common complaint (see also Ref. 10). The first Phase IIa clinical study in patients with acute stroke has been completed. The results are currently undergoing analysis.

MECHANISMS OF ACTION

NMDA-Associated Actions

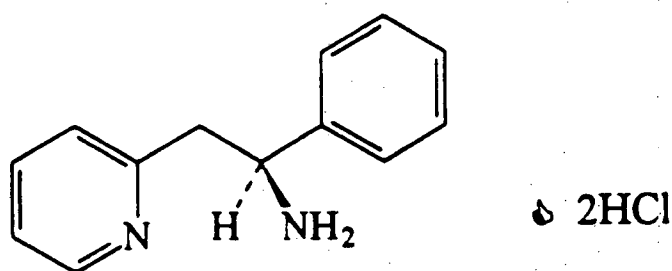
Receptor Affinity

Two separate experiments reported the binding affinity of AR-R 15896AR as determined by its ability to displace labeled MK801 in the presence of glycine from rat cortical synaptic membrane fractions. The reported K_i values were $0.7 \mu\text{M}$ ¹⁶ and $1.3 \mu\text{M}$.¹⁰ Experiments using quantitative receptor autoradiography examined the binding characteristics of AR-R 15896AR in different regions of the rat brain. The resultant IC_{50} values in (μM) were: frontal cortex = 53.8; striatum = 46.8; entorhinal cortex = 40.3; hippocampal CA1 = 48; hippocampal dentate gyrus = 42.1; and the cerebellar granular cell layer value of 17.2 was significantly less than the forebrain regions.^{17,18} The differences in AR-R 15896AR binding affinities between membrane fractions and autoradiography into intact cells are mostly likely unique to the preparations, i.e., in the broken cell preparation the compound in the presence of excess amounts of glycine and glutamate has greater access to the ion channel site.

Possible Subunit Specificity

Additional differences between high- and low-affinity uncompetitive NMDA receptor antagonists have been attributed to their regional localization in the brain (see above)^{17,18} and possible receptor subtype classifications.¹⁹ Quantitative receptor autoradiography was used to compare regional binding characteristics of both low-affinity and high-affinity use-dependent NMDA receptor antagonists in the rat brain. The high-affinity compounds exhibited considerably greater binding affinities (MK801 > thienylcyclohexyl piperidine (TCP) > PCP) that were notable in the forebrain and less so in the cerebellum. In contrast, the low-affinity compounds, namely the [S]-isomer of the desglycyl metabolite of remacemide > memantine > [R]-isomer of the desglycyl metabolite of remacemide > FPL 15853 > AR-R 15896 > budipine > amantadine > remacemide, exhibited greater binding affinities in the cerebellum than in the forebrain structures.^{17,18} In related work, Monaghan and Larsen¹⁹ examined NMDA channel-blocking potencies at recombinant NMDA receptors (NR1b/2A-C) expressed in *Xenopus* oocytes and noted that the lower-affinity compounds—AR-R 15896AR, the desglycyl metabolite of remacemide, ARL 15609 and dextromethorphan—exhibited greater affinities at the NR1b/2C subtype, while MK801 and TCP appeared equally potent at all receptor subtypes. The NR1b/2C NMDA receptor subtype is typically localized in the cerebellum. Interesting were the findings by Small *et al.*,²⁰ who demonstrated that the NR2C subunits are differentially expressed in rat hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation.

However, the supposition that one particular NMDA receptor subtype is the molecular target responsible for the pathological processes underlying ischemia is tenuous, because compounds more selective for NR2B²¹ and possibly NR2D⁹ subunits likewise exhibited neuroprotection.



In Vitro Electrophysiology

Hippocampal slices were removed from young adult male Sprague-Dawley rats and maintained in a tissue bath. The ability of test compounds to antagonize the effects of NMDA in a use-dependent manner on the synaptic field potential amplitude was investigated. AR-R 15896AR significantly blocked NMDA-induced depolarization with an IC_{50} of 26 μ M. MK801 produced greater than 50% inhibition at 0.03 μ M (Fig. 2). To insure specificity of the preparation to NMDA, another study by E. Harris (unpublished) used the hippocampal slice preparation with electrophysiological recordings made from the α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) receptor-sensitive Schaffer collateral pathway (input from CA3 to CA1). These Schaffer collateral responses were not influenced by concentrations of up to 300 μ M of AR-R 15896AR.

Kinetics of Receptor Block/Unblock

One of the major differences between low- and high-affinity use-dependent NMDA receptor antagonists is the more rapid kinetic rates for blocking and unblocking from the ion channel site. The rapid rate of unblocking results in less membrane trapping of the low-affinity antagonists between the cycles of ion channel opening/closing and does not result in the cumulative, perhaps less desirable, total block interfering with the frequency of repetitive stimulation, observed for the high-affinity compounds. Blanpeied and co-workers²² investigated such a role for the low-affinity antagonists, amantadine and memantine, using cell culture systems expressing subtypes of NMDA receptors. Both compounds blocked NMDA-activated channels by binding to a site at which they could be trapped after channel closure and following unbinding of agonist. When memantine and high-affinity antagonists were washed off after steady state block, a percentage of the blocked channels released rather than trapped the drug. Thus memantine exhibited partial trapping, while PCP and MK801 remained almost totally trapped. This property of memantine was evident in recombinant NMDA receptors composed of NR1 with either NR2A or NR2B subunits.²² This study is supported by the electrophysiological investigations of Monaghan and Larsen,¹⁹ who measured receptor on/off kinetic rates of high- and low-affinity un-

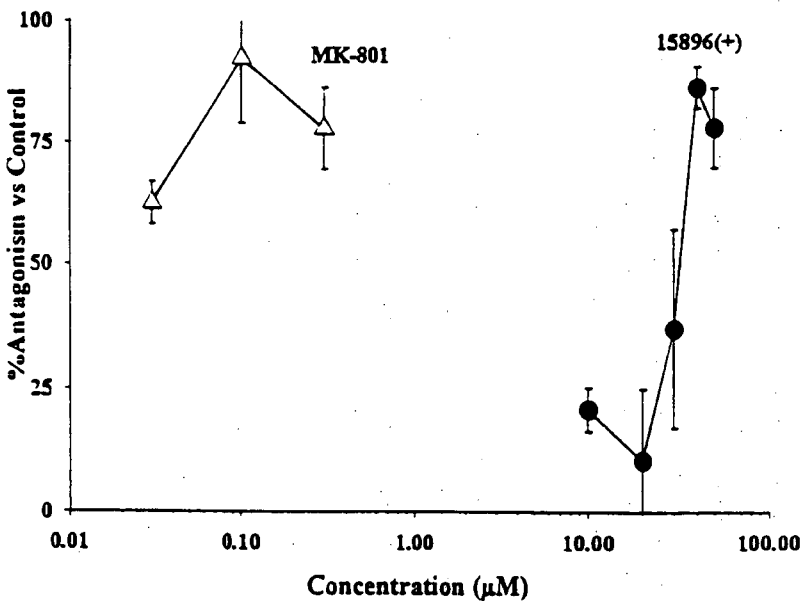


FIGURE 2. Electrophysiology: inhibition of NMDA-induced depolarization in rat hippocampal slices by AR-R 15896AR ($IC_{50} = 26 \mu M$) or MK801. NMDA was applied 3 times to each slice. The amount of depolarization block caused by the third application of NMDA ($20 \mu M$ per pulse) in the presence of drug was expressed as a percentage of the effect in control slices exposed to NMDA alone. The values are the mean percentage $\pm$ SE, $n = 4-5$ slices per data point (for complete description of methods see Ref. 37).

competitive antagonists, including AR-R 15896AR, using recombinant NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. Again the high-affinity compounds, MK801 and TCP, displayed slower on/off kinetics.

In further kinetic work with NMDA receptors, Black *et al.*²³ demonstrated that cultured rat cortical neurons respond to an excitatory amino acid challenge with a rapid triggered entry of Ca^{2+} into the cell. NMDA or glutamate-triggered $[Ca^{2+}]_{in}$ responses were prevented by uncompetitive NMDA receptor antagonists in a use-dependent manner, i.e., a second exposure of the excitatory amino acid was necessary before inhibition could be detected. The kinetics of the block differed between the low-affinity and the high-affinity compounds. The low-affinity, use-dependent antagonists (AR-R 15896AR, the desglycyl metabolite of remacemide, dextromethorphan, memantine, and ADCI) acted more rapidly, but were only capable of partial prevention of the NMDA-triggered $[Ca^{2+}]_{in}$, whereas the block by the high-affinity compounds (MK801, PCP, and ARL-16247AA) was slow in onset, sustained, and completely prevented $[Ca^{2+}]_{in}$. Kinetic analyses indicated the more potent compounds also possessed the slowest unblocking rates.

Voltage-clamp techniques were used to characterize further the kinetics and voltage-dependence of the block of NMDA-induced currents in primary cultures of rat

cortical neurons. Thus when NMDA currents were held at -60 mV, AR-R 15896AR caused a rapid and reversible, use-dependent inhibition of current with an EC_{50} of 9.8 μ M. Alternatively, the EC_{50} for NMDA was unaffected by AR-R 15896AR, indicating the uncompetitive nature of the block. AR-R 15896AR remained trapped within the ion channel upon removal of NMDA until subsequent NMDA reexposure, whereupon currents recovered rapidly. The forward rate constant for AR-R 15896AR was slower than that for memantine, while the reverse rate constant was faster for AR-R 15896AR.²⁴ A recent similar study by this group²⁵ attempted to characterize the degree of NMDA ion channel trapping by the low-affinity, use-dependent antagonists AR-R 15896AR, memantine and ketamine. The onset and relief of block was fastest for AR-R 15896AR and slowest for ketamine. All three compounds produced a similar steady state of block after 30 sec of co-application with NMDA. No significant increase in ion channel trapping occurred after 30 sec. However, after a 120-sec period of washout there were significant differences in the degree of trapping among each of the antagonists: 54% for AR-R 15896, 71% for memantine, and 86% for ketamine. This work confirms earlier work conducted by Subramanian *et al.*,²⁶ and by Jones and Rogawski,²⁷ who likewise used voltage clamp recordings from cultured rat hippocampal neurons. In their work the inhibition of NMDA currents with the isomers of remacemide hydrochloride or ADCI were rapid, reversible, as well as strongly use- and voltage-dependent.

In conclusion these biochemical and electrophysiological findings demonstrated major class differences between low- and high-affinity uncompetitive antagonists regarding both the mechanisms controlling NMDA-triggered entrance of Ca^{2+} into the neurons, as well as the kinetics for the on/off rates of receptor blockade and degree of ion channel trapping. It has been suggested that the low-affinity, use-dependent NMDA antagonists may have reduced toxicity, because they reach steady state block more rapidly due to their rapid on/off kinetics.⁶ Further work will be required to affirm this hypothesis.

Na⁺ Channels

In spite of the fact that compounds usually found active in the maximal electroshock seizure test inhibit Na^{+} channels,²⁸ we have been unable to demonstrate such actions for AR-R 15896AR. The compound did not limit sustained repetitive firing (fast Na^{+} channels) in dissociated mouse spinal neurons, nor with patch clamp techniques did it produce a high-frequency, use-dependent block of Na^{+} channels in rat cortical neurons.¹⁰

Sigma Receptors

It is of interest that AR-R 15896AR exhibited affinity at the sigma-1 receptor; the IC_{50} for displacement of [^3H]-(+)-pentazocine from synaptosomal membrane fractions from rat brain was 4.5 μ M.¹⁰ Sigma-1 affinity, however, was only 4.4-fold greater than that observed for displacement of a sigma-2 ligand combination [^3H]1,3-di-ortho-tolylguanidine (DTG) + 5 μ M dextromethorphan. Sigma-1 agonists elicit an emetic-like behavior in pigeons.²⁹ AR-R 15896AR similarly produced emesis in this assay ($ED_{50} = 29.7$ mg/kg, i.m. [95% confidence limits = 19–48]), and the action was reversed by pretreatment with the sigma-1 selective antagonist, BMY14802 ($AD_{50} = 0.14$ mg/kg, i.m.). Chronic haloperidol treatment (2.5 mg/kg/

b.i.d./14days) desensitizes sigma-1 receptors and thereby attenuated by 60% the emetic response to a high dose of AR-R 15896AR (56 mg/kg). Sigma-1 receptor activity is linked to neuroprotection, which is discussed in the section on Hypoxia and Global Ischemia.

NEUROPROTECTION

In Vitro

Prevention of Neuronal Injury/Death

Under *in vitro* conditions, NMDA receptor antagonists effectively reduced neuronal damage in cell cultures following addition of the excitatory amino acids, glutamate or NMDA.^{4,5} In our initial experiments, hippocampal neurons were isolated from fetal rat brains and maintained in culture. The preparation was highly susceptible to injury as indexed by release of lactate dehydrogenase (LDH) within 5 min after exposure to either 250 μ M NMDA or kainate. The addition of AR-R 15896AR or MK801 to the cultures immediately after exposure to the excitatory amino acids prevented LDH release measured at 24 hr. The lowest doses required to produce significant inhibition were 100 μ M for AR-R 15896AR and 1 μ M for MK801. The AMPA antagonist, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), was ineffective in this system.¹⁰

Black and co-workers¹⁶ using cortical cultures taken from 18-day-old fetal rats demonstrated that the cell death occurring within 24 hr after a 15-min exposure to 50 μ M glutamate or NMDA was completely prevented by incubation with AR-R 15896AR (25–50 μ M). As discussed in the section on Receptor Kinetics, AR-R 15896AR and the low-affinity, use-dependent NMDA antagonists rapidly and partially prevented NMDA-triggered influx of $[Ca^{2+}]_{in}$ into the neurons. In contrast, the high-affinity antagonists were slower acting, but completely shut down Ca^{2+} influx.^{16,23} Critical levels of intercellular Ca^{2+} are required to maintain normal homeostatic mechanisms. Thus the reduced toxicity attributed to the low-affinity compounds may be explained in part by preventing only the excessive accumulation of Ca^{2+} into the neuron during hyperstimulation by excitatory amino acid transmitters. Moreover, an early and persistent loss of protein kinase C activity, which precedes any morphological signs of cell damage, is a characteristic feature of cerebral ischemia.¹⁶ Indeed, the loss of membrane-associated protein kinase C activity occurring within 4 hr as a consequence of added glutamate or NMDA was likewise reversed following addition of 50 μ M AR-R 15896AR.¹⁶ Activation of glutamate receptors also affects the distribution of the cytoskeletal protein, microtubule-associated protein (MAP2), within neuronal cell bodies and dendrites.³⁰ Glutamate-triggered $[Ca^{2+}]_i$ increases calpain activity, which degrades MAP.³¹ This provides one of the earliest and most sensitive markers of ischemic neuronal injury. With the identical cortical culture preparation,¹⁶ these investigators³² discovered that addition of AR-R 15896AR (50 μ M) or MK801 (10 μ M) totally prevented the NMDA-induced loss of MAP2 that occurs within 2 min of NMDA exposure.

Microglia Activation

Application of the beta amyloid fragment 1–42 to microglia in culture results in secretion of a neurotoxic factor, a process inhibited by NMDA receptor antago-

nists.³³ In a preliminary study using ciliary neuronal cultures from E9 chick embryos, the EC₅₀ for inhibition of cell death by the neurotoxic microglia was approximately 1.3 μ M for AR-R 15896AR (D. Giulian, unpublished data).

Hypoxia/Global Ischemia

In Vitro: Hypoxia

Uptake of [⁴⁵Ca²⁺] was measured in cultured cerebellar granular cells obtained from rat pups following exposure to hypoxia. The following excitatory amino acid receptor antagonists exhibited the approximate EC₅₀s for inhibition of Ca²⁺ uptake: MK801 (45 nM), AR-R 15896AR (110 μ M), the AMPA receptor antagonist, 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo-(*F*)-quinoxaline (NBQX, 5 μ M), the glutamate release inhibitor, riluzole (110 μ M) and the polyamine site acting compound, ifenprodil (110 μ M). Thus agreement exists between the efficacy of glutamate compounds to inhibit the hypoxia-induced increase in [Ca²⁺]_i into cerebellar granular cells and their neuroprotective action in hypoxic models *in vivo*.³⁴ In a preliminary report, exposure of a rat brain coronal cortical slice preparation to hypoxia and hypoglycemia evoked a marked release of glutamate, which was inhibited by addition of AR-R 15896AR (100 μ M).³⁵ It is of interest that considerably higher concentrations of NMDA antagonists were necessary to afford neuroprotection under *in vitro* conditions of hypoxic injury when compared to neuronal injury resulting from direct application of the excitatory amino acids.

In Vivo: Hypoxia

Hypoxia has been used as a preclinical screen for discovery of compounds with potential neuroprotective properties. The procedure is rapid and eliminates any confounding anesthesia, but control of body temperature is essential to eliminate false positive agents. Dosages that increase survival time under hypoxic conditions may be predictive of the doses that will protect in more complex preclinical models of ischemia.^{36,37} In our investigations we have found that low-affinity, use-dependent NMDA antagonists, notably AR-R 15896AR, remacemide hydrochloride, and FPL 13950AA extended survival time when mice and rats were exposed to an hypoxic challenge.³⁶⁻³⁸ Moreover, we have observed a consistent relationship between affinity for sigma-1 receptors and prolongation of survival time for such compounds. In keeping with its sigma-1 receptor properties, the anti-hypoxic actions exhibited by a large oral dose of AR-R 15896AR (78.8 mg/kg) were reversed in mice with the sigma-1 selective ligand (+)-pentazocine (3 mg/kg, s.c.) (T. Hudzik, unpublished). Thus both sigma and NMDA receptor properties must contribute to the salutary effects of AR-R 15896AR regarding neuroprotection in models of hypoxia/global ischemia.

In Vivo: Global Ischemia

Several investigations indicate efficacy of low-affinity, use-dependent NMDA receptor antagonists in animal models of global ischemia; especially regarding the delayed cell death in the particularly vulnerable hippocampal CA1 neurons. When rats were subjected to the 4-vessel occlusion technique of forebrain ischemia, the CA1 neurons were spared following both acute and chronic administration of AR-R 15896AR, remacemide hydrochloride or FPL 13950AA.³⁶⁻³⁸ Moreover, remace-

mide hydrochloride and FPL 13950AA likewise prevented CA1 neuronal death and improved neurological outcome in dogs subjected to 8 min clamping of the ascending aorta.^{36,37} Notably, AR-R 15896AR treatment was not protective in the gerbil model of forebrain ischemia, an event due to the extremely short half-life (less than 30 min) of the orally administered compound in this species.³⁸ AR-R 15896AR treatment did not protect CA1 or striatal neurons in the rat 2-vessel occlusion model of ischemia in which the animals were subjected to hypotension concomitant with clamping the common carotid arteries whilst being maintained under anesthesia throughout the procedure.³⁸ In the same model neither AR-R 15896AR nor MK801 prevented blood-brain barrier opening occurring at 6 hr after introduction of ischemia.³⁹

Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO) Models of Focal Ischemia

Spontaneously Hypertensive Rat (SHR) Model of Transient Ischemia

The model consists of unilateral ligation of the common carotid artery in tandem with clamping the middle cerebral artery for either 1.5 or 2 hr followed by reinstitution of cerebral blood flow for 22 hr or up to 42 days post-MCAO. The unique feature of the model is that the lesion is predominantly cortical in nature.⁴⁰ In the first investigation, AR-R 15896AR was administered i.p. in three sequential doses within a 12-hr period. The time of initial dosing varied from 0.5 hr pre-MCAO to 2 hr post-MCAO. Significant cortical protection at 22 hr was observed at all initial dosing times up to 1 hr post-MCAO. In the second study AR-R 15896AR (10 mg/kg, s.c.; peak plasma level of 3527 ng/ml attained) was administered at 0.5, 4 and 12 hr post-MCAO. At 2 and 6 days after ischemia T₂-weighted magnetic resonance images indicated significantly less cortical damage in the treatment group. These animals were subsequently tested between 30–45 days for forepaw dexterity in the staircase test. Interestingly, the forepaw deficit observed on the side ipsilateral to the lesion was improved in the treatment group. Due to maturation of the lesion (shrinkage, atrophy and phagocytic removal of damaged tissue), the histopathology was unremarkable.^{10,38}

Rat Intraluminal Technique of Transient MCAO

The model is a useful, noninvasive, reversible method of preventing blood flow achieved by insertion of an intraluminal filament into the internal carotid to block the MCA at its origin. A characteristic feature of the model is that prominent damage occurs in both the striatum (subcortical) as well as the cortex. The model is "sub-strain specific" in that consistent lesions are achieved in only certain strains of rats originating from specific suppliers. Moreover, survival among strains varies with the duration of MCAO. Four experiments were conducted with AR-R 15896AR. Histopathological evaluation was the end point to determine efficacy. In the first two experiments the duration of MCAO in Wistar rats was 2 hr. The compound was infused beginning at 5 min post-occlusion followed by insertion of an ALZET minipump, all calibrated to maintain a specified plasma level of AR-R 15896XX for one week.

- (1) A dose response evaluation indicated that neuroprotection was achieved when the plasma level of AR-R 15896XX reached 2259 ng/ml or higher for one week (TABLE 1).

TABLE 1. Dose response relationship between AR-R 15896XX plasma levels and focal ischemic damage in the Wistar Rat subjected to 2 hr MCAO followed by 1 week recirculation

Conditions	Plasma Level ng/ml	Cortex % infarction	Subcortex % infarction	Total % infarction
Control	<MDL	11.3 ± 1.3	8.4 ± 0.2	24.1 ± 2.6
AR-R 15896AR	682 ± 38.6	10.8 ± 2.6	7.1 ± 0.5 <i>p</i> = 0.04	22.1 ± 3.7
Control	<MDL	8.5 ± 2.1	9.0 ± 0.4	20.04 ± 2.6
AR-R 15896AR	1885 ± 163	6.5 ± 1.7	8.2 ± 0.9	18.2 ± 2.2
Control	<MDL	15.5 ± 4.0	12.9 ± 0.4	29.7 ± 2.8
AR-R 15896AR	2682 ± 168	4.3 ± 1.8 <i>p</i> = 0.009	8.4 ± 1.5 <i>p</i> = 0.035	15.7 ± 2.5 <i>p</i> = 0.009

NOTE: Male rats received 2 hr MCAO via the intraluminal monofilament technique followed by reflow for 1 week. Five min after MCAO a 30-min infusion of AR-R 15896AR was followed by implantation of an ALZET minipump all calibrated to deliver a specified plasma level of AR-R 15896XX (XX = free base). Histopathological assessments of the H&E stained sections were performed using a microscope and a C-imaging system (Comprix, Cranberry Township, PA). A volumetric measure of tissue necrosis was calculated by summing product of areas and the interval distance. Tissue damage was expressed as the percent of the contralateral hemisphere to control to account for differences between animals as well as fixation artifacts. Values are mean ± SE; *n* = 6–13 animals. Data were analyzed by an overall two-factor ANOVA followed by a post-hoc one-factor ANOVA comparing differences in neural damage between vehicle-treated controls and AR-R 15896AR-treated animals. MDL = minimal detectable limit.

- (2) Maintenance of an AR-R 15896XX plasma level of greater than 2300 ng/ml for one week afforded neuroprotection out to 8 weeks post-MCAO (TABLE 2).
- (3) An acute single dose treatment of AR-R 15896AR (20.3 mg/kg, i.p.) given at 10 min after reflow in a Lister Hooded rat subjected to 60 min MCAO likewise afforded neuroprotection after 23 hr (FIG. 3).
- (4) A complicated magnetic resonance imaging (MRI), behavioral and histopathology study was attempted using a Sprague-Dawley strain subjected to 60 min transient MCAO; however, the degree of damage in all study groups was so variable that meaningful data with AR-R 15896AR could not be attained. The one factor was that survivability of the animals out to 60 days was twice as great in the treatment groups (J. Peeling and D. Corbett, unpublished).

The investigation demonstrating neuroprotection of one week treatment with AR-R 15896AR out to 8 weeks in time after MCAO should answer the continuing arguments as to whether or not specific classes of neuroprotective drugs only postpone the onset of irreversible ischemic injury.⁴¹

TABLE 2. Effect of one week dosing with AR-R 15896AR on histopathological outcomes at 1, 2, 4 & 8 weeks post-MCAO in the Wistar rat

Conditions	1-Week	2-Weeks	4 Weeks	8 Weeks
Percent Infarct Volume: Cortex				
Control	2.8 ± 1.4	5.1 ± 1.3	3.1 ± 1.1	4.1 ± 1.1
AR-R 15896AR	0.5 ± 0.1 <i>p</i> = 0.01	2.0 ± 1.0 <i>p</i> = 0.06	0.9 ± 0.7 <i>p</i> = 0.02	1.3 ± 0.6 <i>p</i> = 0.03
Percent Infarct Volume: Striatum/Subcortex				
Control	6.1 ± 0.9	6.9 ± 0.5	3.3 ± 0.6	3.7 ± 0.5
AR-R 15896AR	5.1 ± 1.3	4.1 ± 0.8 <i>p</i> = 0.01	1.5 ± 0.5 <i>p</i> = 0.04	2.1 ± 0.6 <i>p</i> = 0.06
Percent Total Infarct Volume (Cortex + Subcortex)				
Control	12.4 ± 2.8	23.1 ± 2.6	19.6 ± 2.9	19.7 ± 3.3
AR-R 15896AR	9.7 ± 2.1	13.1 ± 3.2 <i>p</i> = 0.03	11.9 ± 3.8	12.1 ± 3.0

NOTE: Male rats received 2 hr MCAO via the intraluminal monofilament technique followed by reflow up to 8 weeks. Five min after MCAO a 30-min infusion of AR-R 15896AR was followed by implantation of an ALZET minipump all calibrated to deliver a plasma level of >2250 ng/ml. The 1 week AR-R 15896XX (free base) plasma level was 2259 ± 55 ng/ml. The remainder of the conditions are described in the legend to TABLE 1. Values are mean ± SE; *n* = 7–11 animals/data point. Since the tissue data did not exhibit a normal distribution, statistics were performed with Kruskal-Wallis ANOVA on ranks comparing differences in neural damage between vehicle-treated controls and AR-R 15896AR-treated animals.

Feline Model of Transient MCAO

Focal ischemia was induced in cats maintained under anesthesia by direct clamping of the MCA via the transorbital approach. At 30 min into a 90-min MCAO the cats received an i.v. infusion of AR-R 15896AR (170 µg/kg/min, calibrated to achieve a plasma level of approximately 1166 ng/ml) or saline. At 6 hr post-MCAO the cats were positioned for MRI and diffusion, and T2-weighted images were taken over the ensuing 2 hr, at which time the animals were sacrificed and the brains processed for histopathological evaluation. In the AR-R 15896AR treatment group the percent reduction in mean infarct volumes (mm³) for the following determinations were: 1) diffusion-weighted MRI reduced by 70%; 2) T2-weighted MRI reduced by 82%; and 3) histopathology reduced by 67%.^{10,42}

Rat Intraluminal Model of Permanent MCAO

The technique is similar to that described above except the monofilament is left in place for 24 hr, at which time the brains are removed and stained with 2,3,5-tetraphenyltetrazolium chloride (TTC). In our preliminary ongoing experiments both dextrorphan (20 mg/kg, s.c. given at 15 and 135 min post-MCAO) and AR-R 15896AR (30 mg/kg, s.c. given at 5 min and 6 hr post-MCAO) appeared to reduce the extensive damage observed in the cortex of Wistar rats (*p* = 0.05, Student's two-tailed *t* test, *n* = 7–8). The mean percent ± SE values for cortical damage comparing the lesion side to the contralateral hemisphere were: control = 32.2 ± 4.9; dextrorphan = 18.3 ± 3.9; and AR-R 15896AR = 19.5 ± 3.7.

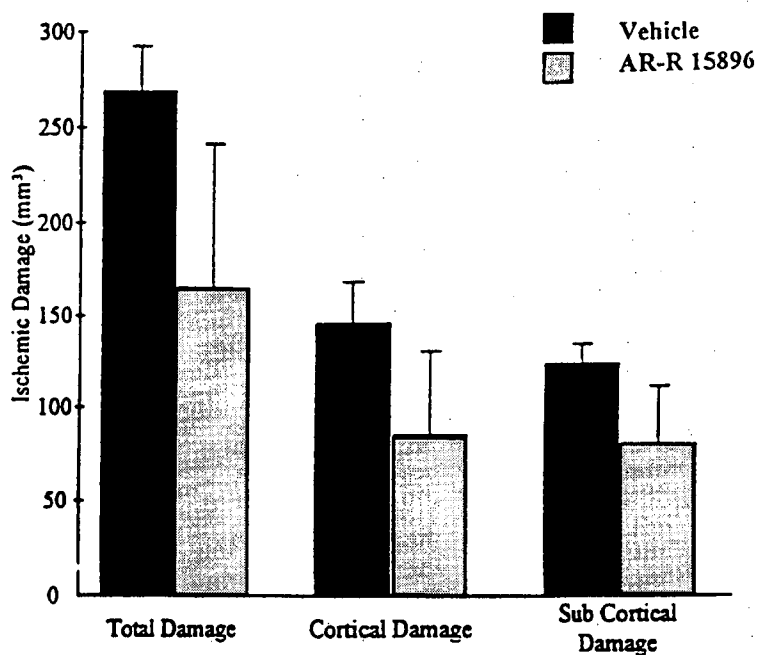


FIGURE 3. Neuroprotection by an acute injection of AR-R 15896AR 10 min after 60-min MCAO (intraluminal monofilament technique) plus 23 hr recirculation in the Lister Hooded rat. Cresyl violet stained sections (20 microns thick) were evaluated for neuronal damage using traditional light microscopic techniques with evaluation of cells for altered morphology, pyknosis and cytoplasmic staining differences. The damage was transcribed onto prematched stereotaxic sections and the areas digitized and integrated against position on the interaural plane. The amount of damage is expressed as the volume of ischemic injury in mm³. The data are expressed as the mean $\pm$ SD, $n = 6$ for both groups. All values for AR-R 15896AR-treated animals are significantly different from the controls ($p < 0.05$, ANOVA with post-hoc Newman Keuls analyses). AR-R 15896AR was given as a single injection (20.3 mg/kg, i.p.) at 70 min post-MCAO.

In Vivo: Models of Direct Neuronal Injury

Excitatory Amino Acid-Induced Seizures

Pretreatment of mice with AR-R 15896AR (i.p.) prevented seizures and the associated mortality following i.v. administration of either the NMDA analog, *N*-methyl-DL-aspartate (NMDLA), or kainic acid. The respective ED₅₀s were 50 and 23 mg/kg for NMDLA and 50 and 29.7 mg/kg for kainate.^{10,12}

Malonate-Induced Striatal Toxicity

Intrastriatal administration of malonic acid results in neurotoxicity within 72 hr. Malonate inhibits mitochondrial respiratory functions associated with complex II in

the electron transport chain, a process inhibited by NMDA receptor antagonists, and may represent a model of slow excitotoxic cell death.¹⁸ If AR-R 15896AR was administered intraventricularly (200 μ M), or s.c. (8.9 mg/kg) to rats either 30 min before or 5 min after malonate, there was at 72 hr an approximate 80% reduction in lesion volume in the striatum. MK801 was equally effective; however, the effective dose was associated with prominent side effects.¹⁸

Intracerebral Hemorrhage

A solution of collagenase (0.7 U)/heparin (1.4 U) was infused into the striatum of rats, followed by a loading dose of AR-R 15896AR and insertion of an ALZET minipump, both calibrated to maintain plasma levels of ~2,000 ng/ml for one week. Damage was assessed over a 21-day period using T₂-weighted MRI, behavioral testing, followed by histopathology at 22 days. The MRI and histopathology were unremarkable; however, behavioral and quality of life indices were improved (the latter significantly).¹⁰ While the results indicate a lack of neuroprotection following intracerebral hemorrhage, they are encouraging from the standpoint that stroke patients can be treated immediately without the fear that those suffering intracerebral hemorrhage would be further worsened by the compound.

CONCLUSIONS

The demonstration of neuroprotection using a variety of *in vitro* and *in vivo* models with AR-R 15896AR supports the continuing clinical trials for the compound for use in acute stroke. The unique features of AR-R 15896AR are its favorable pharmacokinetic profile, safety, simple metabolism, single isomeric form, and its efficacy in animal models of stroke, epilepsy and neural injury. The recent attempts to define mechanistically the differences between high-affinity and low-affinity, use-dependent NMDA receptor antagonists include: 1) regional activity at NMDA receptor subtypes in the brain; 2) differential response to limiting excitatory amino acid-triggered $[Ca^{2+}]_{in}$ into the neuron; 3) rapid kinetics of receptor block/especially, receptor unblock; and 4) less membrane trapping of the compound within the channel site between excitatory amino acid pulses.

REFERENCES

1. OLNEY, J.W. 1978. Neurotoxicity of excitatory amino acids. In *Kainic Acid as a Tool in Neurobiology*. E.G. McGeer, J.W. Olney & P.L. McGeer, Eds.: 37-70. Raven Press, New York.
2. BUCHAN, A.M. 1990. Do NMDA antagonists protect against cerebral ischemia: are clinical trials warranted? *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 2: 1-26.
3. CHAPMAN, A.G., J.H. SWANN *et al.* 1990. Cerebroprotective and anticonvulsant action of competitive and non-competitive NMDA antagonists. In *Amino Acids: Chemistry, Biology and Medicine*. G. Lubec & G.A. Rosenthal, Eds.: 219-232. Escom Publishers, Amsterdam.
4. GEE, K.R. 1994. Therapeutic potential of PCP receptor ligands. *Exp. Opin. Invest. Drugs* 3: 1021-1030.
5. COLLINS, R.C., B.H. DOBKIN *et al.* 1989. Selective vulnerability of the brain: new insights into the pathophysiology of stroke. *Ann. Int. Med.* 110: 992-1000.

6. ROGAWSKI, M.A. 1993. Therapeutic potential of excitatory amino acid antagonists: channel blockers and 2,3-benzodiazepines. *Trends Pharmacol.* **14**: 325–331.
7. GRANT, K.A., G. COLOMBO *et al.* 1996. Dizocilpine-like discriminative stimulus effects of low-affinity uncompetitive NMDA antagonists. *Neuropharmacology* **35**: 1709–1719.
8. PALMER, G.C. & J.B. HUTCHISON. 1997. Preclinical and clinical aspects of remacemide hydrochloride. In *Excitatory Amino Acids—Clinical Results with Antagonists*. P. Herrling, Ed.: 109–120. Academic Press, New York.
9. MUELLER, A.L. 1998. Preclinical neuroprotectant efficacy of NPS 1506, a novel NMDA receptor antagonist. In *Glutamate Pharmacology Therapeutic Implications*. International Business Communications, Southborough, MA.
10. PALMER, G.C., J.A. MILLER *et al.* 1997. Low affinity NMDA receptor antagonists, the neuroprotective potential of ARL 15896AR. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **825**: 220–231.
11. SHOHAMI, E., R. GALLILY *et al.* 1997. Cytokine production in the brain following closed head injury: Dexanabinol (HU-211), a neuroprotective agent, in normal volunteers. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **35**: 361–365.
12. PALMER, G.C., R.J. MURRAY *et al.* 1999. [S]-AR-R 15896AR, a novel anticonvulsant: acute safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **288**: 121–132.
13. HUDZIK, T.J., L. FREEDMAN *et al.* 1996. Remacemide hydrochloride and ARL 15896AR lack abuse potential: additional differences from other uncompetitive NMDA antagonists. *Epilepsia* **37**: 544–550.
14. HUDZIK, T.J. & G.C. PALMER. 1995. Effects of anticonvulsants in a novel operant learning paradigm in rats: comparison of remacemide hydrochloride and FPL 15896AR to other anticonvulsant agents. *Epilepsy Res.* **21**: 183–193.
15. WIDZOWSKI, D., P. BIALOBOK *et al.* 1997. Low affinity non-competitive (LANC) NMDA antagonists do not impair memory and have reduced behavioral performance effects compared to other classes of NMDA antagonists. *Soc. Neurosci.* **23**: 1758.
16. BLACK, M.A., R. TREMBLAY *et al.* 1995. *N*-Methyl-D-aspartate- or glutamate-mediated toxicity in cultured rat cortical neurons is antagonized by FPL 15896AR. *J. Neurochem.* **65**: 2170–2177.
17. PORTER, R.H.P. & J.T. GREENAMYRE. 1995. Regional variations in the pharmacology of NMDA receptor channel blockers: implications for therapeutic potential. *J. Neurochem.* **64**: 614–623.
18. GREENE, J.G., R.H. PORTER *et al.* 1996. ARL-15896, a novel *N*-methyl-D-aspartate receptor ion channel antagonist: neuroprotection against mitochondrial metabolic toxicity and regional pharmacology. *Exp. Neurol.* **137**: 66–72.
19. MONAGHAN, D.T. & H. LARSEN. 1997. NR1 and NR2 subunit contributions to *N*-methyl-D-aspartate receptor channel blocker pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **280**: 614–620.
20. SMALL, D.L., M.O. POULTER *et al.* 1997. Alteration in NMDA receptor subunit mRNA expression in vulnerable and resistant regions of *in vitro* ischemic rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* **232**: 87–90.
21. GILL, R., A. BOURSON *et al.* 1998. Do excitatory amino acid receptors play a role in neuronal degeneration following acute stroke? In *Glutamate Pharmacology Therapeutic Implications*. International Business Communications, Southborough, MA.
22. BLANPIED, T.A., F.A. BOECKMAN *et al.* 1997. Trapping channel block of NMDA-activated responses by amantadine and memantine. *J. Neurophysiol.* **77**: 309–323.
23. BLACK, M., T. LANTHORN *et al.* 1996. Study of potency, kinetics of block and toxicity of NMDA receptor antagonists using fura-2. *Eur. J. Pharmacol.* **317**: 377–381.
24. MEALING, G.A.R., T.H. LANTHORN *et al.* 1997. Antagonism of *N*-methyl-D-aspartate-evoked currents in rat cortical cultures by ARL 15896AR. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **281**: 376–383.

25. MEALING, G.A.R., T.H. LANTHORN *et al.* 1999. Differences in the degree of trapping of low affinity uncompetitive NMDA receptor antagonists with similar kinetics of block. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **288**: 204–210.
26. SUBRAMANIAN, S., S.D. DONEVAN *et al.* 1996. Block of the *N*-methyl-D-aspartate receptor by remacemide and its des-glycine metabolite. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **276**: 161–168.
27. JONES, S.M. & M.A. ROGAWSKI. 1992. The anticonvulsant ($\pm$)-5-aminocarbonyl-10,11-dihydro-5*H*-dibenzo[*a,d*]cyclohepten-5,10-imine (ADCI) selectively blocks NMDA-activated current in cultured rat hippocampal neurones: kinetic analysis and comparison with dizocilpine. *Mol. Neuropharmacol.* **2**: 303–310.
28. MACDONALD, R.L. 1989. Antiepileptic drug action. *Epilepsia* **30**(Suppl. 1): S19–S28.
29. HUDZIK, T.J., B.R. DECOSTA *et al.* 1993. Sigma receptor mediated emetic responses in pigeons: agonists, antagonists and modifiers. *Eur. J. Pharmacol.* **236**: 279–287.
30. BIGOT, D., A. MATUS *et al.* 1991. Reorganization of the cytoskeleton in rat neurons following stimulation with excitatory amino acids *in vitro*. *Eur. J. Neurosci.* **3**: 551–558.
31. FADDIS, B.T., M.J. HASBANI *et al.* 1997. Calpain activation contributes to dendritic remodeling after brief excitotoxic injury *in vitro*. *J. Neurosci.* **17**: 951–959.
32. LAFERIERE, N.B., R. TREMBLAY *et al.* 1999. AR-R 15896AR blocks the early NMDA-induced loss of MAP2 in primary cortical cultures. *Neurol. Res.* **21**: 524–528.
33. GIULIAN, D.L., J. HAVERKAMP *et al.* 1996. Specific domains of beta-amyloid from Alzheimer plaque elicit neuron killing in human microglia. *J. Neurosci.* **16**: 6021–6037.
34. CROSS, A.J., A.R. GREEN *et al.* 1998. The effect of chlormethiazole (Zendra), dizocilpine, AR-R 15896 and NBQX on hypoxia induced increases of Ca^{2+} entry into rat cerebellar granule cells *in vitro*. *Soc. Neurosci.* **24**: 979.
35. JOHNS, L., A.J. SINCLAIR *et al.* 1998. The effects of ARL 15896 on *in vitro* hypoxia/hypoglycemia-induced amino acid release from rat cortical slices. *Forum Eur. Neurosci. Poster # 33.25*.
36. PALMER, G.C., E.F. CREGAN *et al.* 1995. Neuroprotective actions of 2-amino-*N*-(1,2-diphenylethyl)-acetamide hydrochloride (FPL 13950) in animal models of hypoxia and global ischemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **274**: 991–1000.
37. PALMER, G.C., E.F. CREGAN *et al.* 1995. Neuroprotective properties of the uncompetitive NMDA receptor antagonist remacemide hydrochloride. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **576**: 236–247.
38. CREGAN, E.F., J. PEELING *et al.* 1997. [(*S*)-Alpha-phenyl-2-pyridine-ethanamine dihydrochloride], a low affinity uncompetitive *N*-methyl-D-aspartic acid antagonist, is effective in rodent models of global and focal ischemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **283**: 1412–1424.
39. PRESTON, E., J. WEBSTER *et al.* 1998. Lack of evidence for direct involvement of NMDA receptors or polyamines in blood-brain barrier injury after cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* **813**: 191–194.
40. BUCHAN, A.M., D. XUE *et al.* 1992. A new model of temporary focal neocortical ischemia in the rat. *Stroke* **23**: 273–279.
41. CORBETT, D. & S. NURSE. 1998. The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. *Prog. Neurobiol.* **54**: 531–548.
42. SUTHERLAND, G.R., J.T. PERRON *et al.* AR-R 15896AR reduces cerebral infarct volume following focal ischemia in cat. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* In press.

VERIFICATION OF TRANSLATION

I, Junji YUITA, a translator of c/o Subaru Patent Office, Kojimachi Koyo Bldg., 10, Kojimachi 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan, hereby declare:

1. that I know well both the Japanese and English languages;
2. that I translated the document identified as Japanese Patent No. 5491524, registered on March 7, 2014 from Japanese to English;
3. that to the best of my knowledge and belief, the attached English translation is a true and correct translation of the document identified above

Date: August 4, 2014

By:



Junji YUITA

JP 5491524 B2 2014.5.14

(19) Japanese Patent Office (JP) (12) Patent Published (B2) (11) JP Patent No. 5491524
(P5491524)

(45) Publication Date: May 14, 2014 (24) Registration Date: March 7, 2014

(51) Int. Cl	F1
C07D 213/38 (2006.01)	C07D213/38 CSP
A61K 31/4402 (2006.01)	A61K 31/4402
A61P 25/24 (2006.01)	A61P 25/24
A61P 25/16 (2006.01)	A61P 25/16
A61P 25/08 (2006.01)	A61P 25/08

No. of Claims: 12 (Total of 27 pages) Continue on last page

(21) Application No. 2011-543474 (P2011-543474)	(73) Patentee: 391008951
(86)(22) Filing Date: December 22, 2009	ASTRAZENECA AKTIEBOLAG
(65) Laid-Open No. 2012-513993 (P2012-513993A)	SE-151 85 Södertälje, Sweden
(43) Laid-Open Publication Date: June 21, 2012	(74) Agent: 100127926
(86) International Application No. PCT/SE2009/051493	Junji YUITA, patent attorney
(87) International Publication No. WO2010/074647	(74) Agent: 100140132
(87) International Publication Date: July 1, 2010	Noriyuki TAKEBAYASHI, patent attorney
Examination Request: March 5, 2012	
(31) Priority Application No. 61/140,673	
(32) Priority Date: December 24, 2008	
(33) Priority Country: US	
Accelerated Examination Requested	

(54) [Title of the Invention] ETHANAMINE COMPOUNDS DEPRESSION

(57) [Claims]

1. 2-Methyl-1-phenyl-2-(pyridin-2-yl)propan-1-amine or a pharmaceutically acceptable salt thereof.
2. The compound of claim 1 which is (S)-2-methyl-1-phenyl-2-(pyridin-2-yl)propan-1-amine or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

JP 5491524 B2 2014.5.14

3. The compound of claim 2 wherein the pharmaceutically acceptable salt is a salt formed from hydrochloric, hydrobromic, sulfuric, phosphoric, citric, tartaric, lactic, pyruvic, acetic, succinic, fumaric, maleic, methanesulphonic, or benzenesulphonic acid.
4. The compound of claim 2 or 3 which is (S)-2-methyl-1-phenyl-2-(pyridin-2-yl)propan-1-amine fumarate.
5. The compound of claim 2 or 3 which is (S)-2-methyl-1-phenyl-2-(pyridin-2-yl)propan-1-amine dihydrochloride.
6. The compound of claim 2 which is (S)-2-methyl-1-phenyl-2-(pyridin-2-yl)propan-1-amine.
7. A pharmaceutical composition comprising the compound of any of claims 1-6 and a pharmaceutically acceptable adjuvant, carrier, or diluent.
8. The compound of any of claims 1-6 for use as a medicament.
9. Use of a compound as claimed in any of claims 1-6 in the manufacture of a medicament for the therapy of depression.
10. The use of claim 9, wherein the depression is major depressive disorder.
11. The compound of any one of claims 1-6 for use in the treatment of depression.
12. The compound of claim 11, wherein the depression is major depressive disorder.

[Field of the Invention]**[Technical Field]****[0001]**

Disclosed herein is at least one ethanamine derivative, at least one pharmaceutical composition comprising at least one ethanamine derivative disclosed herein, and at least one method of using at least one ethanamine derivative disclosed herein for treating depression. The compounds may also have utility in the treatment of other diseases, including Parkinson's disease, pain states, such as neuropathic pain, as well as epilepsy and neurotrauma.