

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se origina en el campo de medicamentos contra adicciones, en particular en el campo de medicamentos para tratar trastornos de uso de alcohol (AUD, por sus siglas en inglés).

El ácido gamma-hidroxibutírico o GHB (por sus siglas en inglés) es un constituyente endógeno del cerebro de los mamíferos, el cual ejerce un papel como neurotransmisor y neuromodulador. GHB actualmente se utiliza en el tratamiento de adicción de alcoholes, en particular para reducir o evitar los síntomas de privación de alcohol y la incidencia de recaída.

El perfil farmacocinético de oxibato de sodio se caracteriza por ciertos aspectos insatisfactorios que incluyen baja biodisponibilidad (aproximadamente 30%) y eliminación rápida. De hecho, aunque el oxibato de sodio se absorbe rápidamente

después de administración oral, alcanzando su concentración plasmática pico en los siguientes 35 a 45 minutos, también es eliminado rápidamente, con una semivida muy corta (aproximadamente 30 minutos). Esta última característica farmacocinética requiere una frecuencia de administración que corresponde a 3 veces al día para obtener un resultado terapéutico satisfactorio.

El tiempo de vida corto de este medicamento representa un inconveniente grave puesto que reduce de modo considerable el cumplimiento del paciente y en consecuencia los resultados terapéuticos.

Por lo tanto, existe una necesidad general de medicamentos adicionales

dirigidos al tratamiento de los AUD y con respecto a oxibato de sodio, por un medicamento con un perfil farmacocinético más ventajoso.

Uno de los objetivos generales de la presente invención es proporcionar un medicamento nuevo, inocuo y eficaz para el tratamiento de AUD.

5 Un objetivo específico de la presente invención es proporcionar un compuesto para el tratamiento de alcoholismo o de abuso de alcohol que tenga una actividad mejorada con respecto al compuesto 4-metoxi-N-[[4-(trifluorometil)fenil]metil]-butanamida descrito en el documento WO 98/06690 A1.

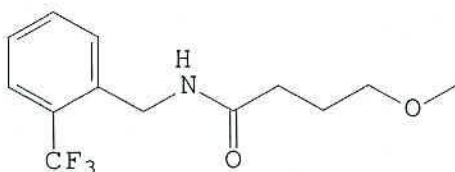
SUMARIO DE LA INVENCION

10 Los inventores han descubierto ahora que una amida seleccionada del ácido γ -hidroxibutírico se proporciona con una eficacia inesperadamente superior con respecto a compuestos conocidos, en la prevención y tratamiento de dependencia al alcohol y/o a drogas.

También se ha encontrado que el compuesto seleccionado de la invención 15 tiene una duración de acción más prolongada en comparación con GHB y sus sales.

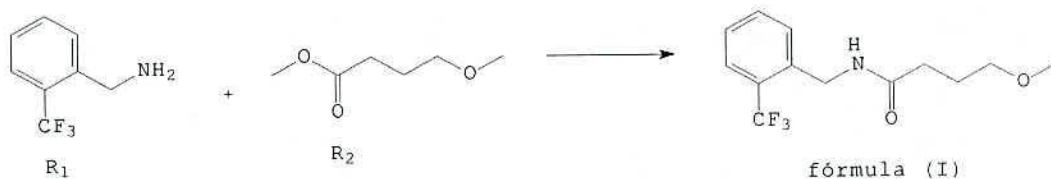
El compuesto de la invención encuentra aplicación en el campo médico, en particular en el tratamiento de adicción a sustancias psicotrópicas y/o en el tratamiento de alcoholismo y en el síndrome de privación de alcohol.

De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona un 20 compuesto seleccionado que tiene la siguiente fórmula (I)



25 fórmula (I)

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se relaciona con un proceso para la preparación de un compuesto de la fórmula (I) anterior, el proceso comprende a la etapa de hacer reaccionar un compuesto de fórmula R1 con 4-metoxibutirato de metilo de fórmula R2 de acuerdo con el siguiente esquema de reacción:



De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con el uso del compuesto de fórmula (I) como se ilustra en lo anterior en el tratamiento de trastornos del SNC y/o la adicción de etanol o tratamiento del alcoholismo, en general.

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con una composición que comprende un compuesto de fórmula (I) como se ilustra en lo anterior y por lo menos un portador fisiológicamente aceptable.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los rasgos y las ventajas de la presente invención se volverán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y a partir de los ejemplos que se proporcionan como un proceso ilustrativo y no limitante, y a partir de las figuras anexas 1 a 7, en las cuales:

la figura 1 muestra una gráfica de barras que ilustra los efectos del compuesto de fórmula (I) identificado como ACGET61 sobre la ingesta de alcohol en ratas sP expuestas a un régimen de elección libre de 2 botellas;

la figura 2 muestra la gráfica de barras que ilustran los efectos de ACGET61 sobre la autoadministración operante FR4 de alcohol en ratas sP.

la figura 3 muestra una gráfica de barras que ilustran los efectos de ACGET61 sobre la autoadministración operante PR de alcohol en ratas sP.

la figura 4 y la figura 5 muestra gráficas de barras que ilustran el flujo de salida de glutamato inducido por K⁺ en cortes de hipocampo;

la figura 6 muestra los efectos de ACGET61 sobre la viabilidad celular en cultivos de célula de hipocampo expuestos a etanol (EtOH; 75 mM, 4 días);

la figura 7 muestra los efectos de ACGET61 sobre la producción de ROS en cultivos de células de hipocampo expuestas a etanol (EtOH; 75 mM, 4 días).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los inventores han encontrado que una amida seleccionada de ácido γ -hidroxibutírico que tiene la fórmula (I) como se ilustra en lo siguiente actúa como un modulador negativo eficaz del receptor de glutamato metabotrópico subtipo 5 (mGluR5) y

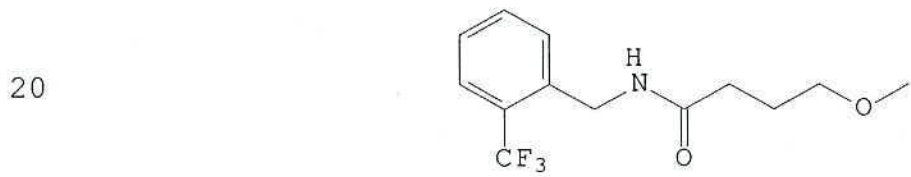
es útil específicamente en el tratamiento de trastornos en el uso de alcohol.

Además, el solicitante ha encontrado que, inesperadamente, el compuesto de fórmula (I) de la invención tiene un perfil antialcohólico mejorado con respecto a sus isómeros de posición como por ejemplo GET 73.

5 El mecanismo de acción de un compuesto de fórmula (I) de la invención se basa en una modulación compleja dirigida al receptor de glutamato metabotrópico del grupo I, sub tipo 5 (mGluR5). Esta es una clase de receptores del SNC de relevancia farmacológica. Las pruebas experimentales indican que modificaciones estructurales muy pequeñas de un compuesto dado pueden alterar notoriamente tanto la potencia como el
10 tipo de modulación de los receptores anteriores (Melancon et al., 2012).

Pruebas experimentales muestran que el compuesto de fórmula (I) de la invención tiene una alta especificidad por el receptor de grupo I, subtipo 5 (mGluR5). Esta especificidad es en la base de sus propiedades neurofarmacológicas de manera que la capacidad para reducir el consumo/ingestión de alcohol en diferentes modelos preclínicos
15 y la capacidad de alterar la neurotransmisión por glutamato a través de una modulación de mGluR5. Además, el compuesto de la invención ejerce efectos neuroprotectores.

Así, de acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto que tiene la siguiente fórmula (I)



fórmula (I)

Cuando se compara el compuesto de fórmula (I) con la amida conocida de ácido γ -hidroxibutírico, GET 73, muestra a una actividad de una mayor duración para
25 reducir el consumo de alcohol (24 h en comparación con 3 h), una eficacia en varios modelos operantes de autoadministración de alcohol (véase tabla 1) y una potencia mayor para inhibir el incremento de glutamato, inducido por CHPG, en corte de hipocampo (300 pM en comparación con 500 nM). Además, el compuesto de la invención tiene una potencia mayor en proteger neuronas del hipocampo del daño inducido por exposición crónica a alcohol (0.1 en comparación con 1 μ M) cuando se compara con amidas

conocidas de ácido γ -hidroxibutírico.

Estos efectos y actividades mejoradas de los compuestos de la invención se han basado en la modulación de receptores de glutamato metabotrópicos dirigidos del grupo I, subtipo 5 (mGluR5). Estos receptores pertenecen a la familia C de los receptores acoplados a proteína G (GPCR, por sus siglas en inglés). Se caracterizan por siete dominios α -helicoidales transmembranales (7TM) conectados a un dominio amino-terminal extracelular bi-lobulado grande. El sitio de unión ortoestérico está contenido en el dominio extracelular, mientras que los sitios de unión alostéricos conocidos actualmente se encuentran en el dominio 7TM.

La familia mGluR incluye ocho tipos de receptor, subdivididos en tres grupos (grupos I, II y III) en base en su estructura, mecanismos de traducción de señal preferidos y farmacología (Schoepp et al., 1999).

Los receptores del grupo I (mGluR1 y mGluR5) se acoplan a $G\alpha_q$, lo que genera la estimulación de fosfolipasa C y el incremento en las cantidades de calcio intracelular y de fosfato de inositol. Se ha relacionado a mGluR5 con una amplia gama de trastornos neurológicos y/o psiquiátricos, que incluyen adicción.

En el SNC, se ha demostrado que mGluR5 se expresa principalmente en la corteza, hipocampo, núcleo acumbente y el putamen caudado, regiones del cerebro que se sabe están involucradas en respuestas emocionales y motivacionales, memoria y función cognitiva.

Respecto a la adicción al alcohol, pruebas experimentales indican la importancia de los receptores mGlu5 en las propiedades de refuerzo de alcohol y motivacionales y la reinstalación del comportamiento de búsqueda de alcohol. Además, los moduladores alostéricos negativos (NAM, por sus siglas en inglés) del receptor mGlu5, como por ejemplo MPEP y MTEP demostraron ser eficaces en reducir los comportamientos de búsqueda de alcohol y tipo recaída.

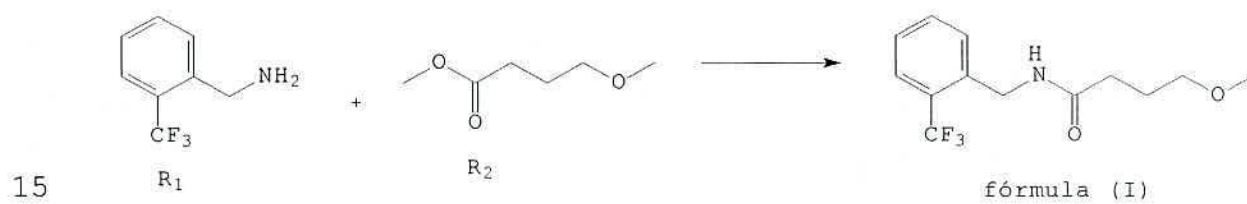
En base en estos resultados, el receptor mGluR5 se considera ampliamente como un objetivo importante para el desarrollo de medicamentos nuevos que tengan como objetivo el tratamiento de trastornos del uso de alcohol (Olive, 2009). Finalmente, MPEP y MTEP han demostrado ser neuroprotectores, proporcionando

fundamentos adicionales para el desarrollo de un medicamento que potencialmente sea capaz de contrarrestar los efectos perjudiciales ejercidos por el alcohol sobre la función e integridad del SNC.

El perfil antialcohólico del compuesto de fórmula (I) se demuestra por los experimentos reportados en el ejemplo 2 los cuales se han llevado a cabo en modelos animales bien establecidos utilizados para evaluación de diferentes aspectos de ingesta, abuso y dependencia de alcohol.

En otro aspecto de la misma, la presente invención se relaciona con un proceso para preparar el compuesto de fórmula (I), que comprende la etapa de:

hacer reaccionar un compuesto de fórmula R1 con 4-metoxibutirato de metilo de fórmula R2 de acuerdo con el siguiente esquema de reacción:

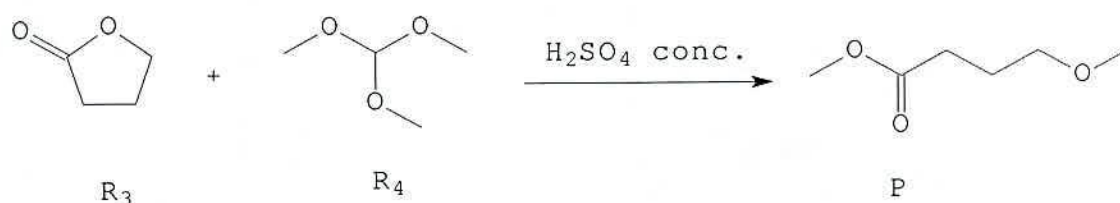


En ciertas modalidades, la reacción anterior se lleva a cabo en presencia de un catalizador, especialmente NH_4Cl , típicamente en una cantidad de 1:5 a 1:20 con respecto a la cantidad de R1. Preferiblemente, el catalizador, especialmente NH_4Cl se agrega en una cantidad de 8 a 12% en peso, respecto al peso del reactivo R1.

En algunas modalidades del proceso, los reactivos R1 y R2 son equimolares.

En ciertas modalidades, la reacción se lleva a cabo bajo calentamiento, por ejemplo, en un intervalo de temperatura de 120 a 170°C, de manera preferible de 140°C a 160°C.

De acuerdo con algunas modalidades, el 4-metoxibutirato de metilo R2 se prepara al hacer reaccionar γ -butirolactona R3 con ortoformiato de metilo R4 típicamente en un ambiente ácido, preferiblemente utilizando ácido sulfúrico y metanol como disolvente de acuerdo con el siguiente esquema de reacción: 8.7



En un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende al compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable o comestible y portadores y/o excipientes farmacéuticamente aceptables o comestibles. Como se utiliza en la presente, el término "sal" se refiere a cualquier sal de un compuesto de acuerdo con la presente invención preparado a partir de un ácido o base inorgánico u orgánico y sales formadas de manera interna. Típicamente, estas sales tienen un anión o catión fisiológicamente aceptable. El compuesto de fórmula (I) puede estar en forma cristalina. En ciertas modalidades, las formas cristalinas de los compuestos de fórmula (I) son polimorfos.

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con una composición que comprende un compuesto de fórmula (I) como se ilustra en lo anterior y por lo menos un portador fisiológicamente aceptable.

Típicamente, la composición es una composición farmacéutica en donde el compuesto de fórmula (I) está presente en una cantidad terapéuticamente eficaz.

El compuesto de fórmula (I) se puede administrar solo o en combinación con uno o más ingredientes activos como por ejemplo amidas adicionales de ácido γ -hidroxibutírico, especialmente en el tratamiento de adicción a drogas o alcoholismo o para uso en la reducción del deseo crónico de alcohólicos por bebidas alcohólicas y el hábito de consumo de bebidas alcohólicas o para el tratar el síndrome de abstinencia.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención abarcan cualquier composición elaborada al mezclar el compuesto de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones son adecuadas para uso farmacéutico en un animal o en un humano.

Opcionalmente, una composición farmacéutica puede contener otros ingredientes activos. El término "portador" se refiere a un vehículo, excipiente, diluyentes o adyuvantes con los cuales se administra el ingrediente terapéutico o activo. Cualquier portador y/o excipiente adecuado para la forma de preparación deseada para administración se contempla para usarse con los compuestos que se describen en la

presente.

El portador puede adquirir una amplia variedad de formas, dependiendo de la forma de la preparación deseada para administración, por ejemplo, oral o parenteral (que incluye intravenosa).

5 Al preparar las composiciones para forma de dosificación oral, se puede utilizar cualquiera de los medios farmacéuticos habituales, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes saborizantes, conservadores, agentes colorantes y similares en el caso de preparaciones líquidas orales, tales como por ejemplo suspensiones, elíxires y soluciones; o portadores como por ejemplo almidones, azúcares,
10 celulosa microcristalina, diluyentes, agentes granulantes, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares en el caso de preparaciones sólidas orales tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas duras o suaves y tabletas, en donde se prefieren las preparaciones orales sólidas sobre las preparaciones líquidas. En ciertas modalidades, los compuestos de la presente invención se pueden combinar como el ingrediente activo
15 en mezcla íntima con un portador y/o excipiente farmacéutico adecuado de acuerdo con técnicas convencionales de elaboración de compuestos farmacéuticos.

Las composiciones incluyen composiciones adecuadas para administración parenteral que incluyen la administración subcutánea, intramuscular e intravenosa, nasal, rectal, tópica y oral.

20 La vía de administración adecuada en cualquier caso dado dependerá, en parte, de la naturaleza y gravedad de las condiciones que estén siendo tratadas y de la naturaleza del ingrediente activo. Una vía de administración ejemplar es la vía oral. Las composiciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en el ámbito de
25 farmacia. Las composiciones preferidas incluyen composiciones adecuadas para administración oral. Las composiciones orales se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en el ámbito de farmacia.

Las composiciones farmacéuticas en forma sólida pueden estar en forma de tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, supositorios y formulaciones de liberación sostenida.

Si se desea, las tabletas se pueden recubrir por técnicas estándar acuosas o no acuosas. En ciertas modalidades, estas composiciones y preparaciones pueden contener por lo menos 0.5 a 1 por ciento de compuesto activo. El porcentaje de compuesto activo en estas composiciones, por supuesto, puede variar y
5 convenientemente puede ser de 1 a 60%, 5 a 50%, 10 a 30 por ciento del peso de la unidad. La cantidad del compuesto activo en estas composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá la dosificación terapéuticamente activa. Los compuestos activos también se pueden administrar por vía intranasal como por ejemplo gotas líquidas o aspersiones.

10 Las tabletas, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener un aglutinante como por ejemplo goma de tragacanto, goma acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes como por ejemplo fosfato dicálcico, un agente desintegrante como por ejemplo almidón de maíz, almidón de papa, ácido algínico; un lubricante como por ejemplo estearato de magnesio; y un agente edulcorante como por ejemplo sacarosa,
15 lactosa o sacarina. Cuando una forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales de los tipos anteriores, un portador líquido como por ejemplo un aceite graso. Pueden estar presentes diversos otros materiales como recubrimientos o para modificar la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, las tabletas se pueden recubrir con goma laca, azúcar o ambos. Un azúcar o elixir puede
20 contener, además del ingrediente activo, sacarosa como un agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservadores, un colorante y un agente saborizante como por ejemplo sabor de cereza o de naranja. Para evitar la descomposición durante el tránsito a través de la porción superior del tracto gastrointestinal, la composición puede ser una formulación recubierta de manera entérica.

25 Las composiciones para administración tópica incluyen, pero no se limitan a ungüentos, cremas, lociones, soluciones, pastas, geles, barras, liposomas, nanopartículas, parches, vendajes y apósitos para heridas. En ciertas modalidades, la formulación tópica comprende un mejorador de penetración.

La administración de las composiciones se realiza bajo un protocolo y a una dosificación suficiente para reducir la dependencia de drogas o de la ingesta de

alcohol.

En ciertas modalidades, la composición farmacéutica de la invención contiene de 5% a 50% en peso, de manera preferible de 10 a 30% en peso del compuesto de fórmula (I) con respecto al peso total de la composición.

5 En algunas modalidades, en las composiciones farmacéuticas de la presente invención el principio activo o los principios activos generalmente se formulan en unidades de dosificación. La unidad de dosificación puede contener de 1 a 2000 mg, de 1 a 1000 mg, especialmente de 50 a 500 mg de un compuesto de fórmula (I) por unidad de dosificación para administración diaria. Con respecto a formulaciones con respecto a
10 cualquiera de la diversidad de vías de administración, los métodos y formulaciones para la administración de medicamentos se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, décimo séptima edición, Gennaro et al. Eds. Mack Publishing Co., 1985 y Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro AR ed. vigésima edición, 2000, Williams & Wilkins PA, Estados Unidos y Remington: The Science and Practice of Pharmacy, vigésima primera
15 edición, Lippincott Williams & Wilkins editores, 2005; y en Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and drug Delivery Systems, octava edición, Lippincott Williams & Wilkins editores, 2005, las cuales se incorporan en la presente como referencia.

Cuando se utilizan en combinación con uno o más de otros ingredientes activos, el compuesto de la presente invención y los otros ingredientes activos se pueden
20 utilizar en dosis más bajas que cuando se utiliza cada uno solo.

Una composición farmacéutica preferida es una formulación en forma para administración oral un día del compuesto activo de acuerdo con la invención en mezcla con portadores aceptables farmacéuticamente para ser administrado típicamente una vez al día, o en ciertas condiciones dos veces o más al día.

25 De acuerdo con otro aspecto de la misma, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) para usarse como un medicamento.

De acuerdo con algunas modalidades, la presente invención proporciona los compuestos de fórmula (I) para usarse en el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados con la adicción a drogas o a alcohol.

De acuerdo con algunas modalidades, el compuesto de fórmula (I) se

utiliza en el tratamiento de una enfermedad del SNC y/o en el tratamiento de adicciones a drogas o alcohol. En algunas modalidades, el compuesto de fórmula (I) se utiliza en el tratamiento de una o más enfermedades o trastornos del SNC que se seleccionan de catalepsia, narcolepsia, insomnio, síndrome de apnea del sueño obstructiva, depresión, ansiedad, insomnio asociado con esquizofrenia, sedación excesiva, temblor esencial, síndrome de fatiga crónica, insomnio crónico y neuroprotección de sustancias dañinas.

De acuerdo con una modalidad preferida, el compuesto de fórmula (I) o una composición farmacéutica que contiene este compuesto (I) como ingrediente activo es para usarse en la prevención o tratamiento de alcoholismo, formas de dependencia del alcohol, mal uso del alcohol, abuso del alcohol y abstinencia.

Típicamente, el compuesto de fórmula (I) o una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de este compuesto (I) como ingrediente activo se puede utilizar para evitar la recaída en sujetos quienes dependen del alcohol, para superar los períodos de abstinencia de ingesta de alcohol o para limitar la cantidad de alcohol ingerido por un sujeto y para motivar al sujeto a cambiar su comportamiento con respecto a la ingesta de alcohol.

Debe entenderse que todos los aspectos identificados como preferidos y ventajosos para el derivado de la invención se deben considerar como similarmente preferidos y ventajosos también para el proceso de producción, las composiciones farmacéuticas y los usos pertinentes.

De acuerdo con un aspecto adicional, la invención proporciona un método para la prevención o tratamiento a adicción a drogas, abuso de alcohol, trastornos en el uso de alcohol como se describen en lo anterior, el método comprende la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I) o una composición farmacéutica que contiene a este compuesto (I).

En un aspecto adicional, la presente invención también se relaciona con politerapias o tratamientos con un compuesto de fórmula (I) o una composición farmacéutica que los contiene. En algunas modalidades, los compuestos de fórmula (I) y sus composiciones farmacéuticas y métodos para administrarlos son útiles en el tratamiento de adicción a drogas o alcoholismo cuando se administran en combinación

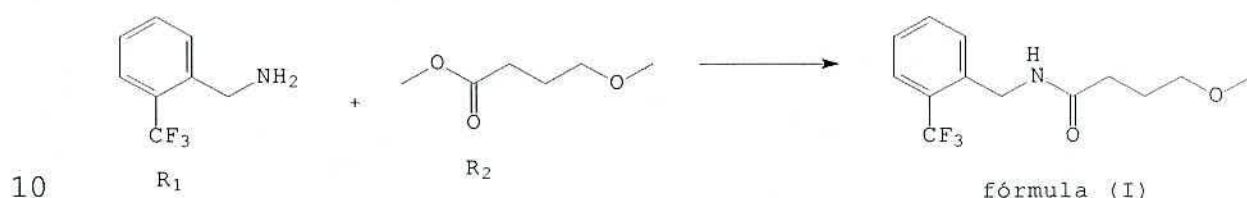
con otros agentes farmacológicos o ingredientes activos.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para propósitos ilustrativos y no limitantes.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Preparación del compuesto de fórmula (I) (denominado como ACGET61)



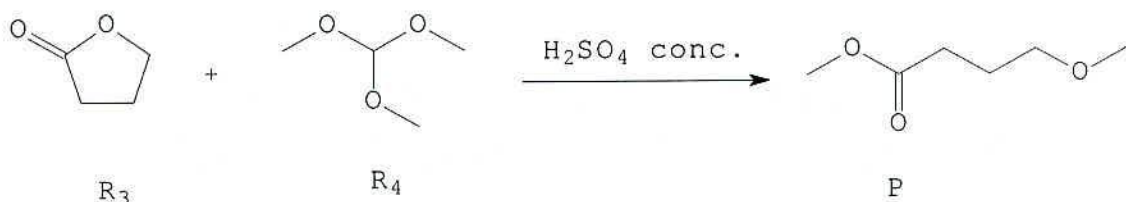
En un matraz de fondo redondo equipado con un condensador eficiente y un agitador magnético, se agregan R₁ (peso molecular: 175.088; 4.43 g) y R₂ (peso molecular: 132.16; 3.347 g) en una relación molar 1:1. Después se agregan 443 mg de NH₄Cl como catalizador (10% en peso con respecto a R₁). La mezcla se calienta a 150°C durante 45 h y adquiere un color verde profundo/púrpura oscuro. La desaparición del reactivo se verifica por CCD (AcOEt: hexano, 1:2) utilizando ninhidrina como agente de detección (que se prepara disolviendo 200 mg de ninhidrina en 150 ml de EtOH).

20 Cuando el reactivo ha desaparecido por completo, la mezcla de reacción se enfría y el residuo se disuelve en DCM, se lava tres veces con HCl 3N y después con agua hasta pH neutro.

El producto crudo que se obtiene de esta manera se purifica por cromatografía en columna eluyendo con un gradiente de AcOEt: hexano (de 1:10 a 1:1).

El producto puro (ACGET61, peso molecular, 275.11) se obtiene como un sólido blanco/rosa claro con un rendimiento de 64%.

25 **SÍNTESIS DE 4-METOXIBUTIRATO DE METILO (REACTIVO R₂)**



En un matraz de fondo redondo equipado con un condensador eficiente y un agitador magnético se mezclan γ -butirolactona R_3 (peso molecular: 86.06; 1 equivalente; $d = 1.12$), ortoformiato de trimetilo R_4 (peso molecular: 106.12; 1.9 equivalentes, $d = 0.97$) y ácido sulfúrico concentrado (1 ml por 10 ml de γ -butirolactona R_3) en MeOH (4 ml por g de γ -butirolactona R_3). La mezcla se calienta a 60°C durante 26 h, bajo agitación. La desaparición del reactivo se verifica por CCD (AcOEt: hexano, 1:1) utilizando solución de Pancaldi como agente detector (que se prepara al disolver 25 g de molibdato de amonio y 5 g de sulfato de cerio en 450 ml de H_2O y 50 ml de ácido sulfúrico concentrado).

Al final de la reacción, el disolvente se evapora bajo presión reducida. El residuo se disuelve en AcOEt y se lava con una solución saturada de $NaHCO_3$ hasta pH = 8.

El aceite amarillo claro crudo se diluye bajo vacío (punto de ebullición: 163 a 164°C, p: 760 Torr). Se obtiene el producto puro (P, peso molecular: 132.16) como un aceite incoloro con un rendimiento de 80%.

EJEMPLO 2

PERFIL ANTIALCOHÓLICO DEL COMPUESTO DE FÓRMULA (I) (DENOMINADO COMO ACGET 61) EN RATAS SARDINIAN QUE PREFIEREN ALCOHOL (sP)

Perfil antialcohólico de ACGET61 en ratas Sardinian que prefieren alcohol (sP)

Ratas Sardinian que prefieren alcohol (sP) representan una de las pocas líneas de ratas que selectivamente se crían en todo el mundo por su alta preferencia y consumo de etanol (Colombo et al., 2006) y se utilizan en múltiples procesos experimentales validados para la evaluación de diferentes aspectos de ingesta de alcohol. Estos procesos experimentales incluyen mantenimiento de ingesta de alcohol y autoadministración operante de alcohol.

MANTENIMIENTO DE INGESTIÓN DE ALCOHOL

En este proceso se exponen a ratas sP a un régimen de elección libre de 2 botellas entre alcohol (10% v/v) y agua. Bajo esta condición, los animales pueden seleccionar entre una botella que contiene la solución de alcohol y una botella que

contiene agua, y consumen voluntariamente aproximadamente 6 g/kg/día de alcohol, con una preferencia por alcohol de aproximadamente 90%. Este proceso constituye un modelo experimental valioso de la *fase de bebedor activo* del alcoholismo humano; la ingesta de alcohol de ratas sP expuestas a este modelo se ha encontrado que se reduce
5 por medicamentos, por ejemplo GHB, naltrexona y baclofeno que reducen la ansiedad por el consumo de alcohol en alcohólicos humanos, demostrando la validez predictiva de este modelo.

En general, los resultados experimentales demuestran que la administración oral aguda de ACGET61 a dosis que varían de 25 a 100 mg/kg ejercen
10 una reducción de larga duración en el consumo de alcohol sin afectar la ingestión de agua y alimentos. De manera notable, la reducción inducida por ACGET61 perdura incluso por 24 horas, como se ha observado repetidamente en por lo menos tres experimentos independientes. Los resultados de estos experimentos, expresados como consumo acumulativo de alcohol, agua y alimentos, se reportan en la figura 1.

En conclusión, la mejoría principal en la actividad antialcohólica de ACGET61 respecto a su isómero de posición, GET73, consiste en la duración de actividad: GET 73 muestra casi la misma potencia en reducir el consumo de alcohol (10, 25, 50 mg/kg) pero este efecto dura por solo tres horas (véase la tabla 1 para la comparación; Loche et al., 2012).

20 **AUTOADMINISTRACIÓN OPERANTE DE ALCOHOL**

En estos procesos, se entrena a ratas sP a autoadministrarse alcohol o sacarosa al oprimir una palanca, y la cantidad de trabajo (presión en la palanca) requerido para obtener alcohol varía de acuerdo con el objetivo del protocolo único de refuerzo, la relación fija (FR, por sus siglas en inglés) o relación progresiva (PR, por sus siglas en
25 inglés).

Se utiliza de manera sistemática solución de sacarosa (3%, p/v) en estos experimentos como un reforzador alternativo, con el fin de determinar si los compuestos de prueba ejercen un efecto selectivo sobre la autoadministración de solución de alcohol (15%, v/v).

En la prueba FR, la rata obtiene alcohol o sacarosa en respuesta a cuatro

presiones consecutivas de la palanca (FR4), mientras que en PR, el número de presionados de palanca necesarios para obtener alcohol o sacarosa aumenta progresivamente hasta que la rata deja de presionar la palanca (punto de ruptura; BP). Cada sesión de FR4 o PR/BP dura 30 minutos.

5 Bajo condiciones experimentales, las ratas sP muestran un comportamiento robusto de presionado de palanca, demostrando que el alcohol posee, en esta línea de ratas, propiedades fuertes de refuerzo y motivacionales (Colombo et al., 2006).

FR4

10 Una cantidad de 100 mg/kg de ACGET61 ejercen un efecto reductor selectivo sobre las propiedades de refuerzo de alcohol en ratas sP expuestas al protocolo de refuerzo FR4, como se muestra en la figura 2, en donde el número total de respuestas de palanca y la cantidad de ingesta de alcohol (en g/kg) y de ingesta de sacarosa (en ml/kg) en la sección de 30 min se reportan. Específicamente, la figura 2 muestra los
15 efectos de ACGET61 sobre la autoadministración operante FR4 de alcohol en ratas sP. Se reporta el número de presionado de palanca y la cantidad de ingesta de alcohol o sacarosa. *p < 0.05 versus grupo tratado con vehículo.

PR/BP

 ACGET61, 50 y 100 mg/kg reduce tanto el número de presionado de
20 palanca como el punto de ruptura para alcohol en ratas sP expuestas a PR, incluso si el efecto no es específico para alcohol, siendo el compuesto capaz de reducir también la respuesta por sacarosa, como se vuelve evidente en la figura 3. Específicamente, la figura 3 muestra los efectos de ACGET61 sobre la autoadministración operante PR de alcohol en ratas sP. El número de presionado de palanca y el punto de ruptura para alcohol o
25 sacarosa se reporta. * p < 0.05 y ** p < 0.01 versus grupo tratado con vehículo.

 De manera notable, GET73 no demostró efecto alguno sobre los mismos modelos, excepto por una reducción significativa de ingesta d sacarosa en ratas sP expuestas a PR y a las que se administró con 50 mg/kg (véase tabla 1 más adelante, para la comparación).

TABLA 1 - PERFIL ANTIALCOHÓLICO DE GET73 Y ACGET61 EN RATAS sP

	GET 73		ACGET61	
MODELO EXPERIMENTAL	dosis efectiva, mg/ml	duración del efecto	dosis efectiva, mg/ml	duración del efecto
mantenimiento	10 - 25 - 50	3 h	25 - 50 -100	24 h
FR4	sin efecto (hasta 50)	nd	100	nd
PR/BP	50 #	nd	50 - 100*	nd
nd: no determinado; # limitado a sacarosa; * para alcohol y sacarosa				

Perfil neuroquímico *in vitro* de ACGET61

En base en resultados previos obtenidos para GET 73, los cuales alteran la neurotransmisión aminoacidérgica en el hipocampo de rata, probablemente a través de una modulación compleja de los receptores de glutamato metabotrópicos subtipo 5 (mGluR5) (Beggiato et al., 2013; Ferraro et al., 2011, 2013), se evaluó al isómero de posición ACGET61 *in vitro* en cortes de hipocampo, al medir las cantidades de GABA y glutamato en diferentes condiciones experimentales.

Efectos de ACGET61 sobre GABA basal y flujo de salida de glutamato

No se ejercieron efectos por ACGET61 (10 y 100 µM) sobre la liberación basal de GABA y glutamato

Efectos de ACGET61 sobre el flujo de salida de GABA y glutamato inducido por K⁺

Se llevaron a cabo estudios adicionales que tiene como objetivo explorar el efecto de ACGET61 (10 pM - 10 µM) en cortes de hipocampo estimulados con KCl.

ACGET61, en concentraciones entre 10 nM y 10 µM no ejerce efectos de reversión, excepto para la disminución significativa en GABA inducida por la concentración más alta (datos no mostrados). La concentración de ACGET61 menor de 10 nM, específicamente 100, 300 y 500 pM induce una reducción modesta y no significativa en el flujo de salida de glutamato inducido por K⁺ que se ilustra en la figura 4. Específicamente, la figura 4 muestra el efecto de ACGET61 a concentraciones pM sobre el flujo de salida de glutamato inducido por K⁺ en los cortes de hipocampo estimulados con KCl.

Efectos de ACGET61 en el incremento en el flujo de salida de glutamato inducido por K^+ , inducido por el agonista de receptor mGluR5, CHPG

La interacción de ACGET61 con el agonista de mGluR5, CHPG se exploró en cortes de hipocampo estimulados con KCl. La adición del medio de perfusión de ACGET61, 300 pM (una concentración en sí misma ineficaz) es capaz de contrarrestar, por lo menos en parte, el incremento del flujo de salida de glutamato inducido por K^+ ejercido por CHPG, como se muestra en la figura 5. Específicamente, la figura 5 - cortes de hipocampo estimulados con KCl - flujo de salida de glutamato inducido por K^+ . El efecto de ACGET61, 300 pM sobre el incremento en el flujo de salida de glutamato inducido por CHPG 100 μ M. ** $p < 0.01$ versus control; ° $p < 0.05$ versus ACGET61 + CHPG.

Este resultado preliminar indica que ACGET61 posee un perfil neuroquímico sugerente de una modulación negativa a mGluR5. De manera notable, aunque se realizaron investigaciones adicionales que tienen como objetivo explorar diferentes concentraciones de pM, la potencia de ACGET61 parece ser mayor en comparación con la ejercida por GET 73 a 500 nM en el mismo modelo.

Perfil neuroprotector *in vitro* de ACGET61

Los efectos neurotóxicos del alcohol han sido bien documentados, tanto en animales como en humanos y el hipocampo representa un área de cerebro particularmente sensible a los efectos dañinos del alcohol. Diferentes modelos preclínicos han sido utilizados para estudiar los efectos neurotóxicos del alcohol. Uno de estos modelos consiste en exponer cultivos de hipocampo organotípicos a alcohol, el cual ejerce diversos efectos que incluyen una reducción en la viabilidad celular y un incremento en las especies de oxígeno reactivas (ROS, por sus siglas en inglés).

En base en resultados previos obtenidos para GET 73, los cuales demuestran un interesante perfil neuroprotector en cultivos de hipocampo expuestos a alcohol, ACGET61 se evaluó en el mismo modelo.

Brevemente, se expusieron de manera crónica a etanol (75 mM; 4 días) cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata y se determinaron los efectos neuroprotectores de ACGET61 al evaluar la viabilidad celular (ensayo MTT) y la

producción de especies de oxígeno reactivas (fluorescencia con rodamina 123).

Se evaluó ACGET61 a diferentes concentraciones que varían entre 0.01 y 10 μM y ejerció efectos positivos tanto en parámetros experimentales, incrementando la viabilidad celular como en la disminución en la producción de ROS en cultivos de hipocampo expuestos a etanol.

Ensayo MTT

La exposición a etanol indujo una disminución en la viabilidad celular, como se indica por la disminución significativa ($p < 0.01$) de los valores de absorbancia respecto a los valores de cultivo de células control. ACGET61 0.1, 1 y 10 μM se agregó 1 hora antes y durante la exposición de etanol crónica evitando el daño inducido por etanol, siendo la viabilidad celular no significativamente diferente respecto al grupo control pero significativamente diferente respecto al grupo con etanol ($p < 0.05$). ACGET61 (0.01-10 μM), por sí mismo, no altera la viabilidad celular en cultivos de células de hipocampo no expuestos a etanol. Los resultados, expresados como porcentaje de viabilidad neuronal medida en cultivos de control, se muestra en la figura 6. Específicamente, la figura 6 muestra los efectos de ACGET61 sobre la viabilidad celular en cultivos de células de hipocampo expuestos a etanol (EtOH; 75 mM, 4 días) ** $p < 0.01$ respecto al control; ° $p < 0.05$ respecto a EtOH 75 mM.

Producción de ROS

La exposición a etanol induce un incremento significativo en la producción de ROS ($p < 0.001$) medido por emisión de fluorescencia de rodamina 123.

La adición de ACGET61 0.1, 1 y 10 μM 1 h antes y durante la exposición crónica a etanol evita el incremento, inducido por etanol, en la producción de ROS, siendo la producción de ROS no significativamente diferente respecto al grupo control, pero significativamente diferente respecto al grupo de etanol ($p < 0.01$; $p < 0.001$).

ACGET61 (0.01-10 μM) en sí mismo no altera la producción de ROS en cultivos de células de hipocampo ni expuestas a etanol. Los resultados, expresados como el porcentaje de producción de ROS medido en cultivos control, se muestran en la figura 7. Específicamente, la figura 7 muestra los efectos de ACGET61 sobre la producción de ROS en cultivos de células de hipocampo expuesta a etanol (EtOH; 75 mM, 4 días). ** $p <$

0.01, *** p < 0.001 respecto al control; °°p < 0.01, °°°p < 0.001 respecto a EtOH 75 mM.

De manera notable, estos efectos neuroprotectores se ejercieron por ACGET61 a 0.1, 1 y 10 µM, sugiriendo una potencia mayor respecto a su isómero de posición, GET 73: de hecho, la concentración eficaz mínima para ACGET61 fue de 0.1 µM

5 en comparación con 1 µM para GET 73.

EJEMPLO 3

Composición farmacéutica

	N-[(2-trifluorometil)bencil]-4-	50 mg
	metoxibutiramida (ACGET61)	
10	Celulosa microcristalina (como desintegrante apropiado)	60 mg
	Talco (como lubricante)	10 mg
	laurilsulfato de sodio (como tensioactivo)	5 mg
	fosfato de calcio (como agregante-diluyente)	200 mg
15	carbonato de magnesio (como diluyente-aglutinante)	100 mg

EJEMPLO 4

Composición farmacéutica

	N-[(2-trifluorometil)bencil]-4-	150 mg
	metoxibutiramida (ACGET61)	
20	almidón de maíz (como desintegrante apropiado)	100 mg
	behenato de glicerilo (como lubricante)	10 mg
	polisorbato (como tensioactivo)	10 mg
	carbonato de magnesio (como diluyente-aglutinante)	150 mg
	lactosa (como diluyente)	150 mg

25

EJEMPLO 5

Composición farmacéutica con recubrimiento de película/liberación modificada

	N-[(2-trifluorometil)bencil]-4-	500 mg
	metoxibutiramida (ACGET61)	
	Celulosa microcristalina (como	200 mg

	desintegrante apropiado)	
	crospovidona (como agente anti-agregante)	50 mg
	almidón (como diluyente-desintegrante)	50 mg
	sílice coloidal (como agente de secado)	10 mg
5	estearato de magnesio (como lubricante)	10 mg
	hipromelosa (como agente de recubrimiento)	50 mg
	Macrogol (como agente plastificante)	10 mg
	dióxido de titanio (como colorante)	10 mg

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

15

20

25