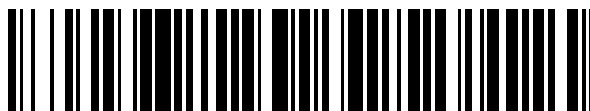


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 544**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 25/18 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/5415 (2006.01)
C07D 279/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02772790 .8**
96 Fecha de presentación: **29.09.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1429844**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.06.2004**

54 Título: **Conjugado de perfenazina y GABA y usos del mismo**

30 Prioridad:
27.09.2001 US 324936 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.04.2012

73 Titular/es:
Ramot at Tel Aviv University Ltd.
P.O. Box 39296
61392 Tel Aviv, IL y
BAR-ILAN UNIVERSITY

72 Inventor/es:
NUDELMAN, Abraham;
REPHAELI, Ada;
GIL-AD, Irit y
WEIZMAN, Abraham

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 379 544 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Conjugado de perfenazina y GABA y usos del mismo

Campo y antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere a un conjugado químico novedoso de un fármaco antipsicótico y un ácido orgánico y usos de los mismos. Más particularmente, la presente invención se refiere a un conjugado químico novedoso de un fármaco antipsicótico (que también puede tener actividad antiproliferativa y/o actividad de quimiosensibilización) y un ácido orgánico seleccionado para reducir los efectos secundarios inducidos por el fármaco antipsicótico y/o tal como para ejercer una actividad antiproliferativa y usos del mismo en el tratamiento de pacientes psicóticos y/o trastornos y enfermedades proliferativas y en quimiosensibilización. El conjugado químico novedoso de la presente invención está caracterizado por minimizar los efectos secundarios adversos en comparación con el fármaco antipsicótico de la técnica anterior.

15 Fármacos neurolépticos, también conocidos como agentes neurolépticos o neurolépticos, son fármacos antipsicóticos clásicos que se utilizan ampliamente en el tratamiento de enfermedades psicóticas y trastornos psicóticos del sistema nervioso central, tales como esquizofrenia. La eficacia antipsicótica de los neurolépticos se atribuye a su capacidad para antagonizar/bloquear los receptores de dopamina centrales. Los fármacos neurolépticos son conocidos como medicamentos antipsicóticos típicos e incluyen, por ejemplo, fenotiazinas, entre las que están alifáticas (por ejemplo, clorpromazina), piperidinas (por ejemplo, tioridazina) y piperazinas (por ejemplo, flufenazina); butirofenonas (por ejemplo, haloperidol); tioxantenos (por ejemplo, flupentixol); oxoindoles (por ejemplo, molindona); dibenzoxazepinas (por ejemplo, loxapina) y difenilpiperidinas (por ejemplo, pimozida).

20 Sin embargo, la administración de fármacos neurolépticos actualmente disponibles está frecuentemente asociada con efectos secundarios adversos. Se conoce bien en la técnica que los agentes neurolépticos inducen síntomas extrapiramidales, que incluyen rigidez, temblor, bradicinesia (movimiento lento) y bradifrenia (pensamiento lento), así como discinesia tardía, reacciones agudas distónicas y acatisia. De hecho, alrededor del 5 % de los pacientes que se tratan con terapia crónica de fármacos neurolépticos por más de un año desarrollan patología de discinesia tardía.

25 Una clase diferente de fármacos antipsicóticos incluye los antipsicóticos atípicos. Los fármacos antipsicóticos atípicos tienen un perfil de unión a receptor que incluye unión a 2 receptores de serotonina central (5-HT₂) además de a receptores de dopamina D₂. Los fármacos antipsicóticos adicionales incluyen, por ejemplo, clozapina, olanzapina y risperidona, y se caracterizan generalmente por actividad antiserotonina alta y afinidad relativamente baja a receptores de dopamina D₂. Algunos fármacos antipsicóticos atípicos, tales como clozapina, se conocen por antagonizar a receptores adrenérgicos, colinérgicos e histaminérgicos.

30 A diferencia de los neurolépticos, los antipsicóticos atípicos causan síntomas extrapiramidales mínimos y así causan raramente discinesias tardías, acatisia o reacciones distónicas agudas. Sin embargo, la administración de los mismos implica otros efectos secundarios tales como incremento de peso corporal, alteraciones del humor, disfunción sexual, sedación, hipotensión ortostática, hipersalivación, umbral de convulsiones reducido y en particular, agranulocitosis.

35 Los efectos secundarios graves que están asociados tanto con fármacos antipsicóticos típicos como con fármacos antipsicóticos atípicos, referidos también para el presente documento como antipsicóticos, establecen una limitación importante para su uso y se han realizado esfuerzos de consideración para desarrollar fármacos antipsicóticos desprovistos de estos efectos secundarios.

40 LA Patente de los EE.UU. N.º: 6.197.764 revela conjugados químicos de clozapina (un fármaco antipsicótico atípico) y un ácido graso de 12-26 átomos de carbono, preferentemente 16-22 átomos de carbono. Estos conjugados se caracterizan por la efectividad terapéutica prolongada, que permite la administración de dosis más bajas de los mismos para proporcionar un efecto terapéutico antipsicótico y así reducir la posibilidad de desarrollar efectos secundarios graves. Por lo tanto estos conjugados son beneficiosos y ventajosos sobre fármacos antipsicóticos atípicos no conjugados. Sin embargo, la Patente de los EE.UU. 6.197.764 no revela conjugados ventajosos tales que incluyan otros agentes antipsicóticos y se limitan adicionalmente a conjugados que incluyen ácidos grasos de cadena larga. Debería señalarse que los conjugados de éster de otros antipsicóticos, principalmente neurolépticos y ácidos grasos de cadena larga se conocen bien en la técnica. No obstante, tales conjugados se dirigen principalmente a facilitar la penetración cerebral del fármaco y no están destinados a reducir o evitar activamente los efectos secundarios.

45 La Patente de los EE.UU. N.º: 3.966.930 revela derivados de la fenotiazina fluoro-sustituídos que tienen propiedades neurolépticas pronunciadas y un grado relativamente bajo de efectos secundarios no deseados. Sin embargo, mientras que algunos de los derivados de fenotiazina fluorosustituídos reivindicados de la Patente de los EE.UU. N.º: 3.966.930 incluyen un radical acilo que tiene 1-17 átomos de carbono en su cadena, los datos experimentales se limitan a derivados de fenotiazina que incluyen sólo radicales acilo derivados bien de ácido oxálico o bien de ácido maleico (es decir, ácidos orgánicos que incluyen 2 a 4 átomos de carbono, respectivamente). Los derivados de

fenotiazina revelados tienen efecto terapéutico prolongado comparado con otros neurolépticos conocidos y están por lo tanto caracterizados por un grado relativamente bajo de efectos secundarios inducidos. El efecto terapéutico prolongado de estos compuestos se atribuye principalmente a los sustituyentes de fenotiazina (por ejemplo, fluoro y trifluorometilo) mientras que su conjugación con los ácidos orgánicos está dirigida sobre todo a facilitar su formulación farmacéutica.

Estudios recientes sobre el desarrollo de los síntomas extrapiramidales como un resultado del tratamiento con fármacos antipsicóticos, principalmente neurolépticos, han sugerido un mecanismo que implica un desequilibrio en los receptores dopaminérgicos D1 y D2, que está acompañado adicionalmente por actividad disminuida del sistema del ácido γ -aminobutírico (GABA) en el cerebro.

GABA es un neurotransmisor inhibitorio importante en el cerebro, que se sabe que afecta a la actividad estabilizadora del humor, a la actividad ansiolítica y a la actividad de relajante muscular y se conoce adicionalmente por estar relacionado con algunos trastornos y enfermedades del sistema nervioso central. Los estudios recientes de los síntomas extrapiramidales sugieren que los agonistas de GABA se pueden usar adicionalmente para reducir los efectos secundarios inducidos por neurolépticos y así tienen un potencial terapéutico adicional.

Los estudios previos han sugerido ya que los agonistas de GABA pueden interferir con otros neurotransmisores cerebrales y, en particular, con el sistema dopaminérgico. Así, se encontró que los agonistas de GABA pueden antagonizar el incremento inducido por neurolépticos de sensibilidad a receptores de dopamina y son por lo tanto capaces de mejorar discinesia inducida por neurolépticos [1]. Además, se constató que algunos agonistas de GABA directos conocidos (por ejemplo, muscimol y SL 76002) producen un efecto bifásico sobre catalepsia inducida por haloperidol, de tal forma que mientras que dosis bajas del agonista inhiben el comportamiento de catalepsia estereotípica, altas dosis del agonista potencian la catalepsia inducida por haloperidol. Otros estudios han comunicado que los agonistas de GABA inducen adicionalmente la actividad anticonvulsiva [2].

El uso de agonistas de GABA es limitado ya que incluyen grupos funcionales hidrófilos (por ejemplo, un grupo ácido carboxílico libre y un grupo amino libre) y por tanto no atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica (BHE). Sin embargo, se ha encontrado que la conjugación química de tales compuestos con aminoácidos grasos o péptidos podría facilitar sustancialmente su paso a través de la barrera hematoencefálica (BBE) [3].

Es más, las patentes de los EE.UU. N.ºs: 3.947.579; 3.978.216; 4.084.000; 4.129.652 y 4.138.484 revelan que compuestos similares a GABA (compuestos que están farmacológicamente relacionados con GABA) que se sabe que atraviesan la barrera hematoencefálica, tales como γ -hidroxibutirilactona, γ -hidroxibutirato, ácido aminooxiacético, 5-etil-5-fenil-2-pirrolidona, 1-hidroxi-3-amino-2-pirrolidona y ácido β -(4-clorofenil)- γ -aminobutírico, cuando se coadministran con fármacos neurolépticos, permiten el uso de dosis algo inferiores de fármacos neurolépticos para obtener el mismo efecto antipsicótico que se obtiene con dosis más altas de fármaco neuroléptico sin administrar estos compuestos similares a GABA y al mismo tiempo, reducen algo los efectos secundarios extrapiramidales. El mismo efecto antipsicótico se dice que se obtiene aunque se usen dosis menores de fármacos neurolépticos debido a que se dice que los compuestos similares a GABA potencian cualquier actividad antipsicótica del fármaco antipsicótico co-administrado.

Estudios recientes han revelado que algunos neurolépticos y, en particular, las fenotiazinas, además ejercen una potente actividad antiproliferativa en diferentes líneas celulares, tales como células neuronales, células gliales, células de melanoma, células de mama, células de colon, células de próstata, linfoma y leucemia, así como en queratocitos humanos primarios [4]. Las "fenotiazinas de tipo semimostaza nuevas" que se conocen por ejercer un efecto inhibitorio específico de calmodulina, se probaron por el Instituto del Cáncer Nacional (NCI). La actividad antiproliferativa de las fenotiazinas se observó en el examen *in vitro* de 60 líneas celulares de cáncer humano diferentes. Algunas fenotiazinas mostraron adicionalmente inhibición significativa de crecimiento tumoral en modelos animales. Estos resultados son coherentes con la baja frecuencia de aparición de cáncer en pacientes esquizofrénicos en medicación neuroléptica, en comparación con la población general.

El documento WO 02/43652 enseña el uso de diversos agentes psicotrópicos típicos y atípicos en el tratamiento de enfermedades proliferativas. En particular, el documento WO 02/43652 enseña que los agentes psicotrópicos cíclicos pueden servir como agentes efectivos en el tratamiento de numerosos tumores, incluyendo glioma, melanoma, neuroblastoma, cánceres de colon, cánceres de pulmón y cánceres de próstata, así como en el tratamiento de células cancerosas resistentes a múltiples fármacos (MDR), como las células de melanoma B16 (conocidas por ser resistentes a la doxorubicina y colchicina) y neuroblastoma (SH-SY5T, resistente a 5-FU y doxorubicina). Además, aparte de enseñar la actividad de agentes psicotrópicos en el tratamiento de cáncer MDR, el documento WO 02/43652 enseña adicionalmente el uso de los fármacos psicotrópicos como quimiosensibilizadores, a saber, como compuestos que de forma efectiva sensibilizan células cancerosas, en particular células cancerosas MDR, a fármacos citotóxicos.

Sin embargo, aunque las enseñanzas del documento WO 02/43652 son sumamente ventajosas, particularmente con respecto a la actividad anti-proliferativa y de quimiosensibilización de agentes psicotrópicos en el tratamiento de cáncer MDR, el uso de estos agentes psicotrópicos está muy limitado por los efectos secundarios adversos inducidos de este modo.

Ácido butírico (BA) y ácido 4-fenilbutírico (PBA), del que GABA es un derivado, se conocen también por actuar como agentes de diferenciación y como agentes antiproliferativos en un amplio espectro de células neoplásicas *in vitro* [5]. Tanto el ácido butírico como el ácido 4-fenilbutírico se conocen también como agentes pleotrópicos y una de sus actividades más notables es el incremento reversible del nivel de acetilación en histonas nucleares, lo que conduce a relajación de cromatina y a cambios en actividad de transcripción. [6]. Se supone que este mecanismo de acción está relacionado con la actividad anticancerígena del ácido butírico y del ácido 4-fenilbutírico.

Por tanto, la técnica anterior enseña el uso de fármacos antipsicóticos típicos y atípicos en el tratamiento de esquizofrenia y del sistema nervioso central relacionados con trastornos psicóticos y enfermedades, así como en el tratamiento de trastornos proliferativos y enfermedades tales como tumores malignos y benignos y cáncer MDR, como agentes anti-proliferativos y como quimiosensibilizadores. La técnica anterior enseña adicionalmente el uso de agonistas de GABA (incluyendo GABA en sí mismo) como agentes potenciales para reducir efectos secundarios inducidos por neurolépticos así como el uso de ácido butírico y derivados del mismo como agentes antiproliferativos.

No obstante, hay aún una necesidad ampliamente reconocida de, y sería altamente ventajoso tener, fármacos antipsicóticos caracterizados por actividad terapéutica incrementada y efectos secundarios aún reducidos, que puedan servir también como fármacos antiproliferativos y como quimiosensibilizadores.

Sumario de la invención

De acuerdo con la presente invención se proporcionan (i) conjugados químicos del fármaco antipsicótico perfenazina y el ácido orgánico GABA (ii) un procedimiento para su síntesis; (iii) uso de los mismos en el (iiia) un procedimiento para su síntesis; (iii) uso de los mismos en el tratamiento y/o prevención de trastornos psicóticos y enfermedades psicóticas reduciendo mientras los efectos secundarios característicos del correspondiente fármaco antipsicótico convencional; (v) uso de los mismos en el tratamiento y/o prevención de trastornos proliferativos y enfermedades proliferativas; y (iv) uso de los mismos como agentes quimiosensibilizantes.

Se muestra en el presente documento que conjugados químicos de medicamentos antipsicóticos se caracterizan por efectos secundarios adversos (por ejemplo, síntomas extrapiramidales) minimizados, actividad anti-psicótica y actividad antiproliferativa terapéuticas potenciadas y por actividad de quimiosensibilización. Se muestra adicionalmente en el presente documento que tales conjugados químicos proporcionan inesperadamente efectos sinérgicos en comparación con sus compuestos parentales tanto con respecto a sus efectos terapéuticos como con respecto a la minimización de los efectos secundarios.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona un conjugado químico que comprende un primer resto químico unido covalentemente a un segundo resto químico, en el que el primer resto químico es un residuo de fármaco antipsicótico y adicionalmente en el que el segundo resto químico es un residuo de ácido orgánico que se selecciona tal como para reducir los efectos secundarios inducidos por el fármaco antipsicótico cuando se administra el fármaco antipsicótico *per se* y/o para ejercer actividad antiproliferativa.

En el conjugado reivindicado, el fármaco antipsicótico es perfenazina y el ácido orgánico es GABA. Además, dicho GABA está unido a dicha perfenazina por un enlace éster entre el grupo carboxílico de dicho GABA y el grupo hidroxilo de dicha perfenazina.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende, como un ingrediente activo, el conjugado químico de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica de la presente invención está preferentemente envasada en un material de envasado y está identificada en un impreso, o en el material de envasado, para usar en el tratamiento de un trastorno psicótico o enfermedad psicótica, para usar en el tratamiento de un trastorno proliferativo o enfermedad proliferativa y/o para usar en quimiosensibilización, en combinación con un agente quimioterapéutico y/o en una afección médica para la que es beneficiosa la quimiosensibilización.

De acuerdo con todavía otro aspecto de la presente invención se proporciona un conjugado según se define en la reivindicación 1 para usar en un procedimiento de tratar o evitar un trastorno psicótico o una enfermedad psicótica en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del conjugado químico de la presente invención.

De acuerdo con características adicionales en las realizaciones preferidas de la presente invención descritas más adelante, el trastorno psicótico o la enfermedad psicótica se selecciona del grupo que consiste en esquizofrenia, paranoia, psicosis infantil, enfermedad de Huntington y síndrome de Gilles de la Tourette.

De acuerdo con aún otro aspecto de la presente invención se proporciona un conjugado según se define en la reivindicación 1 para usar en un procedimiento de tratar o evitar un trastorno proliferativo o una enfermedad proliferativa en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del conjugado químico de la presente invención.

De acuerdo con características adicionales en realizaciones preferidas de la invención descritas más adelante, se selecciona el trastorno proliferativo o la enfermedad proliferativa del grupo que consiste en un tumor cerebral, una metástasis cerebral y un tumor periférico.

5 De acuerdo con características aún adicionales en las realizaciones preferidas descritas el trastorno proliferativo es cáncer, tal como cáncer resistente a multifármacos.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un conjugado según se define en la reivindicación 1 para usar en un procedimiento de quimiosensibilización. El procedimiento comprende administrar a un sujeto en necesidad de las mismas una cantidad quimioterapéuticamente eficaz de uno o más agentes quimioterapéuticos y una cantidad efectiva quimiosensibilizante del conjugado químico de la presente invención.

10 De acuerdo con las características adicionales en las realizaciones preferidas de la invención descritas más adelante, el sujeto tiene cáncer tal como un cáncer resistente a multifármacos.

De acuerdo con la presente invención el residuo de fármaco antipsicótico es perfenazina y tiene una actividad antiproliferativa.

15 De acuerdo con la presente invención, el residuo de fármaco antipsicótico es perfenazina y tiene una actividad de quimiosensibilización.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un procedimiento para sintetizar el conjugado químico de la presente invención. El procedimiento comprende hacer reaccionar un ácido orgánico y el fármaco antipsicótico perfenazina, tal como para obtener un residuo del ácido orgánico GABA unido covalentemente a un residuo del fármaco antipsicótico perfenazina.

20 De acuerdo con la invención el residuo del ácido orgánico GABA está unido covalentemente al residuo del agente antipsicótico perfenazina por medio de un enlace éster carboxílico y el procedimiento comprende adicionalmente, antes de la reacción, convertir el ácido orgánico en un derivado de cloruro de acilo del mismo.

25 En la presente invención, el ácido orgánico es GABA que comprende un grupo amino libre. El procedimiento comprende además proteger el grupo amino libre con un grupo protector, antes de la reacción, tal como para obtener por la reacción un residuo aminoprotegido del ácido orgánico unido covalentemente al residuo del fármaco antipsicótico y retirar el grupo protector después de obtener el residuo amino protegido del ácido orgánico unido covalentemente al residuo del fármaco antipsicótico. Preferentemente, el procedimiento comprende adicionalmente, después de la protección y antes de la reacción, convertir el ácido orgánico en un derivado de acilimidazol del mismo.

30 La presente invención trata satisfactoriamente los defectos de las configuraciones actualmente conocidas proporcionando un conjugado químico nuevo y potente de un fármaco antipsicótico que induce efectos secundarios adversos minimizados para el tratamiento y prevención de los trastornos psicóticos y/o proliferativos y de las enfermedades psicóticas y/o proliferativas para usar como quimiosensibilizador. El conjugado de la presente invención se define en la reivindicación 1.

35 **Breve descripción de los dibujos**

En los dibujos:

40 FIG. 1a y 1b muestran un gráfico de barras y trazados, obtenidos por estudios de Relación Actividad Estructura (SAR), que manifiestan el efecto de perfenazina y sus conjugados químicos de acuerdo con la presente invención (AN 167, AN 168 y AN 130) sobre catalepsia total (Figura 1a) y sobre los niveles de prolactina en sangre (Figura 1b) en ratas inyectadas intraperitonealmente con 5 mg/Kg de peso corporal de perfenazina y de dosis equimoleculares de sus conjugados químicos;

FIG. 2 es una gráfica de barras que manifiesta la catalepsia total en ratas después del tratamiento con perfenazina a 5 mg/Kg y con dosis equimoleculares de sus conjugados químicos de acuerdo con la presente invención (estudios de SAR);

45 FIG. 3a y 3b muestran una gráfica de barras y trazados que manifiestan el efecto de perfenazina (5 mg/Kg), flufenazina (7,5 mg/Kg) y sus conjugados químicos (AN 167, AN 168, AN 180 y AN 187) de acuerdo con la presente invención (administrada en dosis equimolares) sobre la catalepsia total en ratas (figura 3a) y el efecto de perfenazina, flufenazina y sus conjugados químicos de GABA AN 168 y AN 187 sobre niveles en sangre de prolactina en ratas (Figura 3b);

50 FIG. 4a-b son gráficas comparativas que manifiestan el curso temporal de catalepsia en ratas, inducido por perfenazina y sus conjugados químicos de acuerdo con la presente invención (Figura 4a) y flufenazina y sus conjugados químicos de acuerdo con la presente invención (Figura 4b);

FIG. 5a y 5b muestran una gráfica de barras y trazados comparativos que manifiestan el efecto de un conjugado químico de perfenazina y GABA (compuesto AN 168) de la presente invención y una dosis equivalente de una mezcla de perfenazina y GABA en catalepsia en ratas;

5 FIG. 6 es una gráfica de barras que manifiesta el efecto de los conjugados químicos AN 167 y AN 168 de la presente invención en catalepsia total en ratas (promedios de cuatro experimentos independientes);

FIG. 7a y 7b muestran gráficas de barras que manifiestan el efecto del conjugado químico AN 168, una dosis equivalente de perfenazina y una equidosis de una muestra de perfenazina y GABA sobre catalepsia en ratones, medida en términos de porcentaje de animales que alcanzan el objetivo en 2 minutos (Figura 7a) y en términos de tiempo que les llevó a los animales alcanzar el objetivo (Figura 7b);

10 FIG. 8a y 8b presentan trazados comparativos que manifiestan el efecto de la perfenazina administrada por vía oral y de su conjugado químico AN 168 sobre catalepsia en ratas, medida por la prueba de "piano" (Figura 8b presenta los datos obtenidos en experimentos llevados a cabo 3 meses después de las pruebas presentadas en Figura 8a);

15 FIG. 9a y 9b presentan gráficas de barras que manifiestan la catalepsia total inducida en ratas por perfenazina administrada oralmente y su conjugado químico AN 168, a diversas concentraciones, medida por la prueba de "piano" (Figura 9b presenta los datos obtenidos en experimentos llevados a cabo 3 meses después de los experimentos presentados en la Figura 9a);

20 FIG. 10a y 10b son trazados comparativos y una gráfica de barras que manifiesta el efecto de diversas concentraciones de perfenazina administrada por vía oral y su conjugado químico AN 168 sobre el perfil de catalepsia (Figura 10a) y sobre el total de catalepsia (Figura 10b) en ratas, medida por la prueba de "piano" durante 24 horas;

FIG. 11 es un gráfico de barras que demuestra el efecto de perfenazina y AN 168, administrados oralmente a diversas concentraciones, sobre la catalepsia total en ratas, según se midió por el ensayo de "pared";

FIG. 12 presenta trazados comparativos que manifiestan el efecto de perfenazina y AN 168 administrados oralmente sobre los niveles en sangre de prolactina en ratas;

25 FIG. 13 presenta trazados comparativos que manifiestan el efecto de perfenazina y sus conjugados químicos de la presente invención, AN 130, AN 167 y AN 168, sobre la proliferación de células de melanoma B16 murino;

FIG. 14 presenta trazados comparativos que manifiestan el efecto de aumentar las concentraciones de perfenazina, AN 168, GABA, Vincistina y Cisplatina sobre la viabilidad de células de glioma de ratas C6;

30 FIG. 15 presenta trazados comparativos que manifiestan el efecto de incrementar las concentraciones de perfenazina, AN 168 y dexametasona sobre la viabilidad de células de linfoma T de Jurkat;

FIG. 16 es una gráfica de barras que manifiesta el efecto de diversas concentraciones de perfenazina y AN 168 sobre la viabilidad de células del glioma C6 de rata tratadas con Vincistina 30 μM ;

FIG. 17 es una gráfica de barras que manifiesta el efecto de Cisplatina (5-50 μM) y una combinación de Cisplatina (5-50 μM) y AN 168 (10 y 15 μM) sobre la viabilidad de células de glioma de ratas C6;

35 FIG. 18 es un gráfico de barras que manifiesta el efecto de perfenazina, AN 168 y Cisplatina en fragmentación de ADN en células de glioma de ratas C6;

FIG. 19 es una gráfica de barras que manifiesta el efecto de perfenazina y sus conjugados químicos AN 130, AN 167 y AN 168 en las células cerebrales normales (valores CI_{50});

40 FIG. 20 es una gráfica de barras que manifiesta el efecto de las dosis equimolares de perfenazina y AN 168 sobre la viabilidad de la célula miocítica de rata; y

FIG. 21 son gráficas comparativas que manifiestan el curso temporal de la mortalidad en ratas inyectadas intraperitonealmente con perfenazina (per) y compuesto AN 167 de la presente invención.

Descripción de las realizaciones preferidas

45 La presente invención es un conjugado químico del fármaco antipsicótico perfenazina unido covalentemente a un ácido orgánico, procedimiento GABA de su preparación y su uso en el tratamiento de trastornos psicóticos y enfermedades, tales como esquizofrenia, así como trastornos proliferativos y enfermedades tales como tumores cerebrales, metástasis cerebral, tumores periféricos, cáncer MDR y otras enfermedades proliferativas y como quimiosensibilizador.

50 Los principios y la operación del conjugado químico de acuerdo con la presente invención pueden entenderse mejor con referencia a los dibujos y a las descripciones acompañantes.

Mientras se concebía la presente invención, se planteó la hipótesis de que un conjugado químico que acoplase covalentemente un fármaco antipsicótico (que puede tener también actividad antiproliferativa y/o actividad de quimiosensibilización) y un agonista de GABA o un agente antiproliferativo pudiera ejercer actividad terapéutica antipsicótica o antiproliferativa alta, así como actividad de quimiosensibilización, asociada con efectos secundarios adversos minimizados.

El fundamento subyacente para esta hipótesis es como sigue: trastornos psicóticos y enfermedades, tales como esquizofrenia, se tratan por varios tipos de medicamentos antipsicóticos, que pueden dividirse en antipsicóticos típicos, tales como neurolépticos y antipsicóticos atípicos. Sin embargo, la administración de los medicamentos antipsicóticos está típicamente acompañada a corto y largo plazo de efectos secundarios adversos tales como síntomas extrapiramidales (inducidos principalmente por antipsicóticos típicos) y agranulocitosis (inducida principalmente por antipsicóticos atípicos). El desarrollo de estos efectos secundarios adversos, en particular de los síntomas extrapiramidales, se atribuye a un desequilibrio inducido en los receptores dopaminérgicos D1 y D2 y a la actividad disminuida del sistema de GABA en el cerebro.

Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que acoplar covalentemente un fármaco antipsicótico con un agonista de GABA daría como resultado un conjugado químico que ejercería actividad antipsicótica con efectos secundarios minimizados.

En particular, se asumió que un acoplamiento tal de un fármaco antipsicótico y un agonista de GABA sería altamente beneficioso a este respecto dado que ello daría como resultado un compuesto que ejercería simultáneamente una actividad antipsicótica y una actividad incrementada de GABA.

Un aumento de la actividad del sistema de GABA, que en la actualidad se logra por la administración de agonistas de GABA o de compuestos similares a GABA, se sabe que reduce los efectos secundarios inducidos por antipsicóticos y que proporciona adicionalmente otros beneficios terapéuticos relacionados con el sistema de GABA (por ejemplo, estabilización del humor y relajación). Se sabe adicionalmente que los agonistas de GABA antagonizan la sensibilidad incrementada de receptores dopaminérgicos inducida por fármacos antipsicóticos. Sin embargo, la administración de ciertos agonistas de GABA está limitada por su naturaleza hidrófila.

Por lo tanto, se planteó la hipótesis adicional de que un conjugado covalente químico obtenido acoplando covalentemente un fármaco antipsicótico y un agonista de GABA estaría caracterizado por (i) actividades sinérgicamente anti-psicóticas y de GABA incrementadas inducidas tanto por el resto de fármaco antipsicótico como por el resto agonista de GABA; (ii) efectos secundarios inducidos por antipsicóticos reducidos; (iii) características farmacocinéticas mejoradas con respecto a cruzar la barrera hematoencefálica del fármaco antipsicótico acoplado y el agonista de GABA en comparación con los compuestos parentales; y (iv) mayor afinidad por los receptores dopaminérgicos en el cerebro, lo que daría como resultado actividad antipsicótica mejorada.

Por otra parte, en la técnica se sabe que ciertos medicamentos antipsicóticos, en particular fármacos neurolépticos tales como fenotiazinas, son agentes antiproliferativos potentes y pueden servir como quimiosensibilizadores cuando se usan en combinación con fármacos quimioterapéuticos. Por lo tanto se ha planteado aún adicionalmente la hipótesis de que un conjugado químico que acopla covalentemente un fármaco antipsicótico y un resto químico que tiene actividad antiproliferativa ejercería actividad antiproliferativa y/o de quimiosensibilización incluso mayor. Tal conjugado químico podría ser altamente beneficioso en el tratamiento de trastornos y enfermedades proliferativas, especialmente en el cerebro, debido a la afinidad del derivado antipsicótico por los receptores cerebrales y a sus propiedades farmacocinéticas cerebrales mejoradas.

A pesar de reducir la invención actual a la práctica, como se ejemplifica adicionalmente en la sección de Ejemplos que sigue, se encontró que se acopló covalentemente el fármaco antipsicótico perfenazina y que dio como resultado un conjugado químico que está caracterizado sinérgicamente por (i) efectos secundarios adversos minimizados; (ii) actividad antipsicótica alta; (iii) actividad antiproliferativa alta; (iv) actividad de quimiosensibilización alta; y (v) toxicidad reducida, todo en comparación con perfenazina. El conjugado químico que incluye GABA se caracterizó adicionalmente por actividades inducidas antipsicóticas y de GABA sinérgicas.

Así, el conjugado químico se usa de acuerdo con la presente invención para tratar los trastornos psicóticos y las enfermedades psicóticas así como los trastornos proliferativos y las enfermedades proliferativas, como agentes antiproliferativos y/o como agentes quimiosensibilizadores. El conjugado químico que se utiliza para tratar trastornos y enfermedades psicóticas y/o trastornos y enfermedades proliferativas de acuerdo con la presente invención incluye un primer resto químico que está unido covalentemente a un segundo resto químico. El primer resto químico es un residuo de fármaco antipsicótico, mientras que el segundo resto químico es un ácido orgánico, seleccionado tal como para reducir los efectos secundarios inducidos por el fármaco antipsicótico cuando se administra *per se* y/o para ejercer actividad antiproliferativa.

El fármaco antipsicótico es perfenazina y el ácido orgánico es GABA. Además, dicho GABA está unido a dicha perfenazina por un enlace éster entre el grupo carboxílico de dicho GABA y el grupo hidroxilo de dicha perfenazina.

Como se usa en el presente documento, el término "resto químico" se refiere a un residuo derivado de un compuesto químico, que mantiene su funcionalidad.

El término "residuo" se refiere en el presente documento a una parte principal de una molécula que está covalentemente unida a otra molécula, según está bien aceptado en la técnica.

- 5 Por tanto, la frase "resto de fármaco antipsicótico" se refiere a una parte principal de un fármaco antipsicótico que está unida covalentemente a otro resto químico, según este término se define anteriormente.

Los residuos de fármacos antipsicóticos referidos en la descripción se derivan de los fármacos antipsicóticos típicos o de los fármacos antipsicóticos atípicos e incluyen, por ejemplo, un residuo de clorpromazina, un residuo de perfenazina, un residuo de flufenazina, un residuo de zuclopentixol, un residuo de tiopropazato, un residuo de benperidol, un residuo de bromperidol, un residuo de droperidol, un residuo de espiperona, un residuo de pimozida, un residuo de piperacetazina, un residuo de amisulprida, un residuo de sulpirida, un residuo de clotiapina, un residuo de ziprasidona, un residuo de remoxiprida, un residuo de sultoprida, un residuo de alizaprida, un residuo de nemonaprida, un residuo de clozapina, un residuo de olanzapina, un residuo de ziprasidona, un residuo de sertindol, un residuo de quetiapina, un residuo de fluoxetina, un residuo de afluvoxamina, un residuo de desipramina, un residuo de paroxetina, un residuo de sertralina, un residuo de ácido valproico y un residuo de fenitoína.

En la presente invención, el residuo de fármaco antipsicótico perfenazina ejerce adicionalmente actividad antiproliferativa.

En la presente invención, el residuo antipsicótico perfenazina ejerce adicionalmente actividad de quimiosensibilización.

- 20 Como se usa en el presente documento, el término "quimiosensibilización" significa un incremento o una mejora de la citotoxicidad medida de un agente quimioterapéutico sobre células cancerosas, particularmente células de cáncer resistentes a multifármacos, en presencia de un agente quimiosensibilizante, según se compara con el nivel de citotoxicidad ejercida por el agente quimioterapéutico en ausencia del agente quimiosensibilizante.

- 25 Los términos "agente quimiosensibilizante" y "quimiosensibilizador", que se usan intercambiabilmente en el presente documento, describen compuestos que vuelven a las células cancerosas más sensibles a la quimioterapia.

Como se indica anteriormente, el resto de fármaco antipsicótico perfenazina, de acuerdo con la presente invención, está acoplado covalentemente a un segundo resto químico, que es un residuo de ácido orgánico. En la presente invención, el ácido orgánico es GABA.

- 30 La frase "residuo de ácido orgánico" se refiere a un residuo, tal como se define en el presente documento, que se deriva de un ácido orgánico que incluye un grupo carboxílico libre.

El término "grupo carboxílico libre" incluye un grupo $-C(=O)OH$ bien en su forma protonada o bien en su estado ionizado o de sal.

- 35 El residuo de ácido orgánico, de acuerdo con la presente invención, se selecciona bien tal como para reducir los efectos secundarios que podrían inducirse por el fármaco antipsicótico si se administra solo o bien tal como para ejercer actividad antiproliferativa. El residuo de ácido orgánico hace referencia a un residuo que tiene una fórmula general $-R-C(=O)-$, donde R puede ser, por ejemplo, un residuo de hidrocarburo que tiene 1-20 átomos de carbono.

El término "hidrocarburo" como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto orgánico que incluye, como su esqueleto básico, una cadena de átomos de carbono y átomos de hidrógeno que están unidos covalentemente.

- 40 Así, el residuo de hidrocarburo puede ser alquilo o cicloalquilo.

Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a un hidrocarburo alifático saturado que incluye grupos de cadena lineal y grupos de cadena ramificada. Preferentemente, el grupo alquilo tiene 1 a 20 átomos de carbono.

- 45 Siempre que un intervalo numérico, por ejemplo, "1-20", se exponga en el presente documento, ello significa que el grupo, en este caso el grupo alquilo, puede contener 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, etc., hasta 20 átomos de carbono inclusive. Más preferentemente, el alquilo es un alquilo de tamaño medio que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. Lo más preferentemente, el alquilo tiene de 3 a 5 átomos de carbono.

- 50 Como se usa en el presente documento, el término "cicloalquilo" incluye un grupo de anillo monocíclico o condensado todo de carbono (es decir, anillos que comparten un par adyacente de átomos de carbono) en el que uno o más de los anillos no tienen un sistema de electrones pi completamente conjugado. Ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen ciclopropano, ciclobutano, ciclopentano, ciclopenteno, ciclohexano, ciclohexadieno, cicloheptano, cicloheptatrieno y adamantano.

El resto de hidrocarburo puede ser lineal o ramificado. El resto de hidrocarburo pueden estar adicionalmente saturado o insaturado. Cuando está insaturado, el resto de hidrocarburo puede incluir un enlace doble o un enlace triple en su cadena de carbono. Un resto de hidrocarburo insaturado puede incluir adicionalmente un arilo.

5 Como se usa en el presente documento, un grupo "arilo" o "Ar" se refiere grupos monocíclicos o policíclicos de anillos condensados (es decir, anillos que comparten pares adyacentes de átomos de carbono) que tienen un sistema de electrones pi completamente conjugados. Ejemplos, de grupos arilo incluyen fenilo, naftalenilo y antraceno.

10 El residuo de hidrocarburo puede estar adicionalmente sustituido o no sustituido. Cuando está sustituido, el sustituyente puede ser, por ejemplo, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heteroalíclico, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, ciano, halo, oxo, amido y amino.

15 Un grupo "heteroarilo" se refiere a un grupo de anillo monocíclico o condensado (es decir, anillos que comparten un par adyacente de átomos) que tienen en el(los) anillo(s) uno o más átomos, tales como, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno y azufre y además, que tienen un sistema de electrones pi completamente conjugado. Ejemplos de grupos heteroarilo, incluyen pirrolo, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, pirazol, piridina, pirimidina, quinolina, isoquinolina y purina. El grupo heteroarilo puede estar sustituido o insustituido. Cuando está sustituido, el grupo de sustituyentes puede ser, por ejemplo, alquilo, cicloalquilo, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, ciano, halo, oxo, amido y amino.

20 Un grupo "heteroalíclico" se refiere a un grupo de anillo monocíclico o condensado que tiene en el(los) anillo(s) uno o más átomos tales como nitrógeno, oxígeno y azufre. Los anillos pueden tener también uno o más dobles enlaces. No obstante, los anillos no tienen un sistema de electrones pi completamente conjugado. El heteroalíclico puede estar sustituido o no sustituido. Cuando está sustituido, el grupo de sustituyentes puede ser, por ejemplo, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, halo, trihalometilo, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, ciano, oxo, amido y amino.

Un grupo "hidroxilo" se refiere a un grupo -OH.

Un grupo "alcoxi" se refiere tanto a un grupo -O-alquilo como a un grupo -O-cicloalquilo, según se define en el presente documento.

25 Un grupo "ariloxi" se refiere tanto a un grupo -O-arilo como a un grupo -O-heteroarilo, según se define en el presente documento.

Un grupo "oxo" se refiere a un grupo -C(=O)-R', donde R' puede ser, por ejemplo, alquilo, cicloalquilo o arilo.

Un grupo "halo" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo.

30 Un grupo "trihalometilo" se refiere a un grupo -CX₃- en el que X es un grupo halo según se define en el presente documento.

Un grupo "amino" se refiere a un grupo -NH₂.

Un grupo "amido" se refiere a un grupo -C(=O)-NR_aR_b, donde R_a y R_b pueden ser, por ejemplo, hidrógeno, alquilo, cicloalquilo y arilo.

35 Un residuo hidrocarburo puede incluir adicionalmente uno o más heteroátomos intercalados dentro de su cadena. Los heteroátomos puede ser, por ejemplo, oxígeno, nitrógeno y/o azufre.

Un resto hidrocarburo puede ser adicionalmente un residuo que tiene una fórmula general -Z-C(=O)O-CHR₂-R₃, donde Z puede ser, por ejemplo, un enlace sencillo o un residuo hidrocarburo sustituido o no sustituido según se describe anteriormente; R₂ puede ser, por ejemplo, hidrógeno o un residuo alquilo que tiene de 1-10 átomos de carbono; y R₃ puede ser, por ejemplo, hidrógeno o un residuo hidrocarburo según se define anteriormente.

40 Así, los ejemplos representativos de ácidos orgánicos de los que puede derivarse un resto de ácido orgánico incluyen ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido ftálico, ácido isoftálico, ácido tetraftálico, ácido butírico, ácido 4-fenilbutírico, ácido 4-aminobutírico (GABA), ácido valérico, ácido propiónico, ácido retinoico, ácido acetilsalicílico e ibuprofeno.

De acuerdo con la presente invención, el segundo resto químico del producto químico conjugado es GABA.

45 Como se usa en el presente documento, la frase "residuo de agonista de GABA" se refiere a un residuo, según este término se define en el presente documento, de un agonista de GABA, mientras que el término "agonista de GABA" describe compuestos que son capaces de activar el sistema de GABA en el cerebro y por tanto están farmacológicamente relacionados con GABA. El término "agonista de GABA" se entiende así que incluye GABA en sí mismo, mientras que el término "residuo de agonista de GABA" se entiende así que incluye un residuo de GABA en sí mismo.

Así, los residuos agonistas de GABA incluyen, además del residuo de GABA (ácido γ -aminobutírico) en sí mismo, residuos de otro agonista de GABA que pueden acoplarse covalentemente a un fármaco antipsicótico.

Ejemplos de tales residuos agonistas de GABA incluyen un residuo de (\pm) baclofeno, un residuo de ácido isonipecótico, un residuo de ácido γ -hidroxibutírico, un residuo de ácido aminoacético, un residuo de ácido β -(4-clorofenil)- γ -aminobutírico, un residuo de ácido piperidin-4-sulfónico, un residuo de ácido 3-aminopropilfosfonoso, un residuo de ácido 3-aminopropilfosfínico, un residuo de ácido 3-(aminopropil)metilfosfínico y un residuo de ácido 3-(2-imidazolil)-4-aminobutanoico.

El segundo resto químico en los conjugados químicos descritos en el presente documento pero no reivindicados puede ser un residuo de agente antiproliferativo.

10 El término "residuo de agente antiproliferativo", como se usa en el presente documento, se refiere a un residuo, tal como se define en el presente documento, de un compuesto que se caracteriza por una actividad antiproliferativa.

El agente antiproliferativo puede ser ácido butírico o ácido 4-fenilbutírico. Estos compuestos se conocen por ejercer actividad anticancerosa y se caracterizan adicionalmente como compuestos de los que GABA es un derivado y pueden actuar adicionalmente como agentes miméticos de GABA.

15 Como se usa en el presente documento, la frase "enlace éster carboxílico" incluye un enlace "-O-C(=O)-".

La frase "enlace amida" incluye un enlace "-NH-C(=O)-".

La frase "enlace tioéster" incluye un enlace "-SH-C(=O)-".

20 Tales enlaces éster se conocen por ser hidrolizables por enzimas derivadas del cerebro, tales como esterasas y amidasas y ello se asume y se demuestra adicionalmente por lo tanto por los resultados experimentales descritos en el presente documento (véanse, por ejemplo, las Figuras 5a-b) que el conjugado químico de la presente invención actúa como un profármaco que se metaboliza en el cerebro y de este modo libera al mismo tiempo el fármaco antipsicótico y el ácido orgánico manteniendo, así, co-farmacocinéticas ventajosas para el fármaco antipsicótico y el ácido orgánico.

25 Este proceso es altamente ventajoso ya que proporciona (i) una acción simultánea del fármaco antipsicótico y el ácido orgánico, que de forma sinérgica dan como resultado efectos secundarios reducidos inducidos por el fármaco y actividad dual de ambos restos; (ii) afinidad más alta del profármaco para los receptores dopaminérgicos que da como resultado actividad antipsicótica sinérgicamente más alta y actividad antiproliferativa sinérgicamente más alta para con los trastornos antiproliferativos del cerebro; y (iii) permeabilidad cerebral mejorada de ambos restos químicos.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona adicionalmente un procedimiento de sintetizar el conjugado químico descrito anteriormente. El procedimiento se efectúa, generalmente, haciendo reaccionar un ácido orgánico con un fármaco antipsicótico, tal como para obtener un residuo de ácido orgánico unido covalentemente a un residuo del fármaco antipsicótico.

35 En el presente documento, las expresiones "un residuo de un ácido orgánico" y "un residuo de un fármaco antipsicótico" son equivalentes a las expresiones "residuo de ácido orgánico" y "residuo de fármaco antipsicótico", respectivamente, según se definen estos términos anteriormente. Debería ser evidente para un trabajador experto que haciendo reaccionar un ácido orgánico y un fármaco antipsicótico, para formar de este modo un enlace covalente entre ellos, se produce un producto final que incluye residuos del ácido orgánico y se produce el fármaco antipsicótico.

40 Como se discute adicionalmente en detalle anteriormente, en el conjugado de química de la presente invención, el residuo de ácido orgánico y el residuo de fármaco antipsicótico están unidos covalentemente por un enlace éster que es un enlace éster carboxílico.

45 El procedimiento de sintetizar el conjugado químico de la presente invención se lleva a cabo preferentemente convirtiendo primero el ácido orgánico en de su correspondiente derivado de cloruro de acilo, tal como para activar el ácido orgánico. El derivado de cloruro de acilo se hace reaccionar a partir de entonces con el fármaco antipsicótico, que incluye un grupo hidroxilo libre, en una reacción de adición nucleofílica bien conocida, tal como para obtener el conjugado de química deseado que tiene el residuo de ácido orgánico unido covalentemente al residuo de fármaco antipsicótico por medio de un enlace éster carboxílico. Esta reacción se lleva a cabo preferentemente bajo condiciones básicas, tal como para activar el fármaco antipsicótico y/o para neutralizar compuestos que están presentes como sus sales clorhidrato. Sin embargo, el ácido orgánico y/o el fármaco antipsicótico pueden activarse por cualquier otro procedimiento conocido.

50 En realizaciones de referencia donde los residuos están unidos covalentemente por medio de un enlace tioéster, el procedimiento de sintetizar los conjugados químicos de referencia se lleva a cabo preferentemente convirtiendo el fármaco antipsicótico de referencia en su correspondiente derivado de tiol y convirtiendo el ácido orgánico de

referencia en su derivado de cloruro de acilo correspondiente, o en cualquier otro derivado activado del mismo. El derivado tiol se hace reaccionar a partir de entonces con el ácido orgánico activado, por procedimientos bien conocidos, tales como obtener el conjugado químico de referencia deseado que tiene el residuo de ácido orgánico covalentemente unido al residuo de fármaco antipsicótico por medio de un enlace tioéster. Debería destacarse que algunos de los fármacos antipsicóticos actualmente conocidos incluyen un grupo tiol libre y por lo tanto tales fármacos pueden hacerse reaccionar directamente con un derivado de cloruro de acilo del ácido orgánico. Los fármacos antipsicóticos que no incluyen un grupo tiol libre pueden hacerse reaccionar fácilmente tal como para obtener un derivado tiol de los mismos, por procedimientos bien conocidos en la técnica.

En realizaciones de referencia donde los residuos están unidos covalentemente por un enlace amida, el procedimiento de sintetizar los conjugados químicos de referencia se lleva a cabo preferentemente convirtiendo primero el ácido orgánico de referencia en su derivado de cloruro de acilo correspondiente, tal como para activar el ácido orgánico de referencia y convirtiendo adicionalmente el fármaco antipsicótico de referencia en un derivado amina del mismo. El derivado de cloruro de acilo se hace reaccionar posteriormente con el grupo amino del fármaco antipsicótico de referencia, en una reacción de adición nucleofílica bien conocida, o por cualquier otro de los procedimientos conocidos para producir un enlace amida, tal como para obtener el conjugado químico de referencia deseado que tiene el residuo de ácido orgánico de referencia unido covalentemente al residuo de fármaco antipsicótico de referencia por medio de un enlace amida. Debería destacarse que algunos de los fármacos antipsicóticos actualmente conocidos incluyen un grupo amina libre y por lo tanto tales fármacos pueden hacerse reaccionar directamente con un derivado de cloruro de acilo del ácido orgánico. Los fármacos antipsicóticos que no incluyen un grupo amina libre pueden hacerse reaccionar fácilmente tal como para obtener un derivado amina de los mismos, por procedimientos bien conocidos en la técnica.

Los procedimientos descritos anteriormente son típicamente eficaces cuando el ácido orgánico no tiene un grupo amino libre. Sin embargo, en realizaciones de referencia donde el ácido orgánico incluye un grupo amino libre, como es el caso de los agonistas de GABA, por ejemplo y en el caso de la presente invención donde el ácido orgánico es GABA el grupo amino debería protegerse durante la reacción descrita con el fármaco antipsicótico. Se requiere proteger el grupo amino dado que es un grupo relativamente químicamente activo que puede por lo tanto participar indeseablemente en la reacción.

Por lo tanto, un procedimiento preferido de sintetizar el conjugado químico de la presente invención que incluye un residuo de GABA que tiene un grupo amino libre preferentemente se efectúa protegiendo primero el grupo amino libre. Proteger el grupo amino puede llevarse a cabo haciendo reaccionar el ácido orgánico con un grupo protector conocido tal como, terc-butoxicarbonilo (Boc) y benciloxicarbonilo (Cbz). El ácido orgánico amino-protegido se hace reaccionar después con el fármaco antipsicótico perfenazina, tal como para obtener un residuo de ácido orgánico amino-protegido unido covalentemente al residuo de fármaco antipsicótico. El grupo protector se elimina después. Adicionalmente preferentemente, el ácido orgánico amino-protegido se convierte a su derivado acilimidazol, tal como para activar el ácido orgánico antes de la reacción con el fármaco antipsicótico.

Adicionalmente de acuerdo con la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que incluye el conjugado químico de la invención como un ingrediente activo.

Como se usa en el presente documento una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los conjugados químicos descritos en el presente documento, con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un sujeto.

En adelante, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo o un diluyente que no causa irritación significativa a un sujeto y no deroga la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Ejemplos de vehículos son propilenglicol, solución salina, emulsiones y mezclas de disolventes orgánicos con agua.

En el presente documento el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un compuesto. Ejemplos de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diferentes azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el vehículo farmacéutico es una solución acuosa de ácido láctico.

A este respecto, se debería señalar que algunos de los conjugados químicos de la presente invención, de acuerdo con las realizaciones preferidas, son fácilmente solubles en medios acuosos y por ello se formulan fácilmente. Tal formulación conveniente proporciona una ventaja adicional de los conjugados químicos de la presente invención sobre los conjugados de éster conocidos de fármacos antipsicóticos, que incluyen típicamente ácidos grasos de cadena larga y son por lo tanto no solubles en medios acuosos y administrados como formulación aceitosa.

Las técnicas para formulación y administración de fármacos pueden encontrarse en "Remington's Pharmacological Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

5 Las vías de administración pueden, por ejemplo, incluir administración oral, rectal, transmucosal, transdérmica, intestinal o parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales, o intraoculares. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden elaborarse por procedimientos bien conocidos en la técnica; por ejemplo, por medio de procedimientos de mezclado, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización convencionales.

10 Composiciones y formulaciones farmacéuticas para usar de acuerdo con la presente invención pueden formularse así de manera convencional usando uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y productos auxiliares, que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

15 Para inyección, el conjugado químico de la invención puede formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer, o tampón de solución salina fisiológica con o sin disolventes orgánicos tales como propilenglicol, polietilenglicol. Para administración transmucosal, se usan penetrantes en la formulación.

Tales penetrantes se conocen generalmente en la técnica.

20 Para administración oral, el conjugado químico de la invención puede formularse fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten a los conjugados de la invención formularse como comprimidos, píldoras, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones para ingestión oral por un paciente. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden fabricar usando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, añadiendo después productos auxiliares adecuados si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes útiles son, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido algínico o una sal de los mismos tal como alginato de sodio.

30 Los núcleos de las grageas se proporcionan con revestimientos adecuados. Para este propósito, se pueden usar soluciones de azúcar concentradas que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes.

35 Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los revestimientos de comprimidos o grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

40 Las composiciones farmacéuticas, que se pueden usar oralmente, incluyen cápsulas de dos piezas hechas de gelatina así como cápsulas blandas, cápsulas selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de dos piezas pueden contener los ingredientes activos mezclados con una carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y opcionalmente, estabilizadores. En cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizadores. Todas las formulaciones para administración oral deberían estar en dosificaciones adecuadas para la vía de administración elegida.

45 Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formuladas de modo convencional.

50 Para administración por inhalación, los conjugados químicos para su uso de acuerdo con la presente invención se administran convenientemente en forma de una presentación de pulverización de aerosol a partir de un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para usar en un inhalador o insuflador se pueden formular conteniendo una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

55 Los conjugados químicos descritos en el presente documento también pueden formularse para administración parenteral, por ejemplo, por inyección de bolo o por infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en contenedores de dosificación multidosis con opcionalmente, un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones

en vehículos aceitosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, agentes estabilizantes o agentes dispersantes.

5 Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas del compuesto activo en forma soluble en agua. Adicionalmente se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos como suspensiones oleosas para inyección adecuadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener sustancias, que incrementen la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril, libre de pirógeno, antes de usarse.

15 El conjugado químico de la presente invención pueden formularse también en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden comprender también vehículos o excipientes en fase sólida o en fase de gel adecuados. Ejemplos de tales vehículos o excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.

20 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para usar en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que el ingrediente activo está contenido en una cantidad eficaz para alcanzar el propósito previsto. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente efectiva quiere decir una cantidad de conjugado químico efectiva para evitar, aliviar o mejorar síntomas de enfermedad o para prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando.

25 La determinación de una cantidad efectiva terapéuticamente está bien dentro de la capacidad de aquellos expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en el presente documento.

30 Para el conjugado químico usado en el procedimiento de la invención, la cantidad o dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de actividad en cultivos celulares y/o animales. Por ejemplo, una dosis puede formularse en modelos animales para lograr una concentración circulante que incluye la CI_{50} según se determina por ensayos de actividad (por ejemplo, la concentración del compuesto de prueba, que logra una inhibición semimáxima de la actividad de proliferación). Tal información puede usarse para determinar con más precisión dosis útiles en seres humanos.

35 La toxicidad y la eficacia terapéutica del conjugado químico descrito en el presente documento se puede determinar por procedimientos farmacéuticos estándar en animales de experimentación, por ejemplo, determinando la CI_{50} y la DL_{50} (dosis letal que causa la muerte en un 50 % de los animales probados) para un compuesto sujeto. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de actividad y estudios de animales se pueden usar en formular un intervalo de dosificación para usar en el ser humano.

40 La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación, la vía de administración y la dosificación exactas se pueden escoger por el médico personal en vista de la afección del paciente. (Véase por ejemplo, Fingl, y cols., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", capítulo 1 página 1).

45 La cantidad y el intervalo de dosificación pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles plasmáticos del resto activo que son suficientes para mantener los efectos anti-psicóticos y/o antiproliferativos, llamados la concentración mínima efectiva (CME). Las CME variarán para cada preparación, pero se pueden estimar a partir de datos *in vitro* y/o *in vivo*, por ejemplo, la concentración necesaria para alcanzar el 50-90 % de inhibición de proliferación de ciertas células puede establecerse usando los ensayos descritos en el presente documento. Las dosificaciones necesarias para lograr las CEM dependerán de las características individuales y de la vía de administración. Los ensayos de HPLC o los bioensayos completos pueden usarse para determinar concentraciones en plasma.

50 Los intervalos de dosificación pueden determinarse también usando el valor de CEM. Las preparaciones se deberían administrar usando un régimen, que mantiene los niveles plasmáticos por encima de las CEM durante el 10-90 % del tiempo, preferentemente durante el 30-90 % y lo más preferentemente durante el 50-90 %.

Dependiendo de la gravedad y responsividad de la afección a tratarse, la dosificación puede ser también una administración individual de una composición de liberación lenta descrita en el presente documento, con el curso del

tratamiento durando desde varios días hasta varias semanas o hasta que la cura se lleva a cabo o se logra la disminución del estado morbosos.

La cantidad de una composición a administrarse será, por supuesto, dependiente del sujeto que se esté tratando, la gravedad de la afección, la manera de administración, el juicio del médico que prescribe, etc.

- 5 Las composiciones de la presente invención pueden, si se desea, presentarse en un envase o accesorio dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contengan el ingrediente activo. El envase puede, por ejemplo, comprender lámina de metal o de plástico, tal como un envase tipo blíster. El envase o dispositivo dispensador puede estar acompañado por instrucciones para la administración. El envase o dispensador también puede estar acompañado por un aviso asociado con el envase en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la elaboración, el uso o la venta de productos farmacéuticos, aviso que está reflejando la aprobación por la agencia de la forma de las composiciones o de la administración humana o veterinaria.

- 10 Tal aviso, por ejemplo, puede ser de etiquetado aprobado por la U.S. Food and Drug Administration para fármacos de prescripción o de un inserto de producto aprobado. Las composiciones que comprenden un conjugado químico de la invención formulado en un vehículo farmacéutico compatible también se pueden preparar, situarse en un contenedor apropiado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada. Las afecciones adecuadas indicadas en la etiqueta pueden incluir, por ejemplo, tratamiento de esquizofrenia, paranoia, psicosis infantil, enfermedad de Huntington, síndrome de Gilles de Tourette, trastornos proliferativos de cerebro y cáncer MDR y quimiosensibilización, según se ha definido este término anteriormente.

- 15 Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, la composición farmacéutica se envasa en un material de envasado y se identifica en impreso, o en el material de envasado, para uno o más de los siguientes usos: para usar en el tratamiento de trastornos psicóticos o enfermedades psicóticas, para usar en el tratamiento de trastornos proliferativos cerebrales o periféricos, para usar en el tratamiento de cáncer tal como cáncer MDR y para usar en quimiosensibilización, en combinación con un agente quimioterapéutico y/o en una afección médica para la que la quimiosensibilización es beneficiosa.

Adicionalmente de acuerdo con la presente invención, se proporciona un conjugado de acuerdo con la reivindicación 1 para usar en un procedimiento para tratar o evitar un trastorno psicótico o enfermedad psicótica en un sujeto (por ejemplo, un ser humano). El procedimiento se lleva a cabo administrando una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más conjugados químicos de la invención a un sujeto tratado.

- 20 Como se usa en el presente documento, el término "procedimiento" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una determinada tarea incluyendo aquellas maneras, medios, técnicas y procedimientos bien conocidos por, o fácilmente desarrollados a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por practicantes de las técnicas químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

- 25 En el presente documento, el término "tratar" incluye abolir, inhibir sustancialmente, ralentizar o invertir la progresión de una enfermedad, mejorando sustancialmente síntomas clínicos de una enfermedad o evitando sustancialmente la aparición de síntomas clínicos de una enfermedad.

- Como se usa en el presente documento, la frase "trastorno psicótico o enfermedad psicótica" se refiere a un trastorno o enfermedad caracterizado por una afección psicótica como resultado de un deterioro en el sistema nervioso central. Ejemplos de trastornos psicóticos y enfermedades que son tratables usando el conjugado químico de la invención, incluyen esquizofrenia, paranoia, psicosis infantil, enfermedad de Huntington y síndrome de Gilles de la Tourette.

- El término "administración" como se usa en el presente documento se refiere a un procedimiento para llevar el conjugado químico de la presente invención dentro de un área o un sitio en el cerebro que está afectado por el trastorno psicótico o la enfermedad psicótica.

El conjugado químico de la presente invención se puede administrar intraperitonealmente. Más preferentemente, se administra por vía oral.

El término "sujeto" se refiere a los animales, típicamente mamíferos que tienen una barrera hematoencefálica, incluyendo seres humanos.

- 50 La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de conjugado químico que se está administrando que aliviará en algún grado uno o más de los síntomas del trastorno psicótico o de la enfermedad que se está tratando.

Una cantidad terapéuticamente efectiva de acuerdo con este procedimiento de la presente invención preferentemente oscila entre 1 mg/kg corporal y 50 mg/kg corporal, más preferentemente entre 2 mg/kg corporal y

30 mg/kg corporal, más preferentemente entre 2 mg/kg corporal y 20 mg/kg corporal y lo más preferentemente entre 2 mg/kg corporal y 10 mg/kg corporal.

5 La presente invención se refiere así a un conjugado químico que ejerce actividad antipsicótica. El conjugado químico de la presente invención es altamente ventajoso dado que ejerce actividad antipsicótica potenciada y está caracterizado adicionalmente por efectos secundarios minimizados.

El término "efectos secundarios" como se usan en el presente documento se refiere a los síntomas adversos que pueden desarrollarse como resultado de administrar a un sujeto un cierto fármaco. Tales síntomas pueden incluir, por ejemplo, síntomas extrapiramidales, como se detalla más adelante y están típicamente asociados con la administración de fármacos antipsicóticos.

10 Adicionalmente de acuerdo con la presente invención se proporciona un conjugado de acuerdo con la reivindicación 1 para usar en un procedimiento para tratar o evitar un trastorno proliferativo o una enfermedad proliferativa en un sujeto (por ejemplo, un ser humano). El procedimiento se lleva a cabo administrando una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado químico de la invención a un sujeto tratado.

15 Como se usa en el presente documento, el término "trastorno proliferativo o enfermedad proliferativa" se refiere a un trastorno o enfermedad caracterizado por proliferación celular. Las condiciones de proliferación celular que se pueden evitar o tratar por la presente invención incluyen, por ejemplo, tumores malignos tales como cáncer y tumores benignos.

20 Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" se refiere a diversos tipos de neoplasmas malignos, la mayoría de los cuales pueden invadir tejidos circundantes y pueden metastatizar a diferentes sitios, según se definen por el Medical Dictionary de Stedman 25ª edición (Hensyl ed., 1990). Los ejemplos de cánceres que pueden tratarse por el conjugado químico de la presente invención incluyen cánceres de piel y de cerebro. Estos cánceres pueden adicionalmente colapsarse. Por ejemplo, cánceres de cerebro incluyen glioblastoma multiforme, astrocitoma anaplásico, astrocitoma, ependioma, oligodendroglioma, meduloblastoma, meningioma, sarcoma, hemangioblastoma y tumor parenquimal pineal. Asimismo, los cánceres de piel incluyen melanoma y sarcoma de Kaposi. Otras enfermedades cancerosas tratables usando los conjugados químicos de la presente invención incluyen papiloma, blastoglioma, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, astrocitoma, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer pancreático, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, leucemia, linfoma, linfoma de Hodgkin y linfoma de Burkitt. Otros, trastornos proliferativos no cancerosos son también tratables usando los conjugados químicos de la presente invención. Tales trastornos proliferativos no cancerosos incluyen, por ejemplo, estenosis, reestenosis, estenosis de la endoprótesis, reestenosis del injerto vascular, artritis, artritis reumatoide, retinopatía diabética, angiogénesis, fibrosis pulmonar, cirrosis hepática, aterosclerosis, glomerulonefritis, nefropatía diabética, síndromes de microangiopatía trómbica y rechazo de trasplante.

35 Como se demuestra en la sección de Ejemplos que sigue, el conjugado químico de la presente invención ejerce actividad antiproliferativa alta y potente sobre una amplia variedad de células de cáncer, incluyendo las células cancerosas MDR.

Como se demuestra adicionalmente en la sección de Ejemplos que sigue, el conjugado químico de la presente invención ejerce además actividad de quimiosensibilización cuando se usa en combinación con diversos fármacos quimioterapéuticos.

40 Por tanto, adicionalmente de acuerdo con la presente invención se proporciona un procedimiento de quimiosensibilización, según se define este término anteriormente. El procedimiento se lleva a cabo administrando a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más agentes quimioterapéuticos y una cantidad efectiva quimiosensibilizante del conjugado químico de la presente invención.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad efectiva quimiosensibilizante" describe una cantidad suficiente para quimiosensibilización mensurable en presencia de cantidades terapéuticas de un agente quimioterapéutico.

Este procedimiento es particularmente útil en los casos donde el sujeto tiene cáncer MDR tal como leucemia, linfoma, carcinoma o sarcoma. De acuerdo con la presente invención el agente quimioterapéutico puede ser, por ejemplo, uno de los siguientes: un agente alquilante tal como una mostaza de nitrógeno, una etilenimina y un metilmelamina, un sulfonato de alquilo, una nitrosourea y un triazeno; un antimetabolito tal como un análogo del ácido fólico, un análogo de pirimidina y un análogo de purina; un producto natural tal como un alcaloide de vinca, una epipodofilotoxina, un antibiótico, una enzima, un taxano y un modificador de la respuesta biológica; agentes misceláneos, tales como un complejo de coordinación de platino, una antracenediona, una antraciclina, una urea sustituida, un derivado de metilhidrazina, o un supresor adrenocortical; o una hormona o un antagonista tal como un adrenocorticosteroide, una progestina, un estrógeno, un antiestrógeno, un andrógeno, un antiandrógeno, o un análogo de la hormona de liberación de gonadotropina. Preferentemente, el agente quimioterapéutico es una

mostaza de nitrógeno, una epipodofilotoxina, un antibiótico, o un complejo de coordinación de platino. Un agente quimioterapéutico más preferido es Cisplatina o Vincistina.

Por tanto, la presente invención muestra un conjugado químico novedoso de la perfenazina antipsicótica, que ejerce actividad antipsicótica, más alta, efectos secundarios sustancialmente más bajos y toxicidad más baja que el antipsicótico no conjugado correspondiente. Este conjugado novedoso ejerce adicionalmente actividad antiproliferativa y actividad de quimiosensibilización y se puede usar beneficiosamente por lo tanto en el tratamiento de trastornos proliferativos bien como profármaco caracterizado por efectos secundarios reducidos, toxicidad baja y afinidad alta para con células cerebrales o bien como un quimiosensibilizador que se usa en combinación con fármacos quimioterapéuticos.

10 Ejemplos

Se hace referencia ahora a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención.

Síntesis química y de análisis

El conjugado químico de la presente invención y los conjugados de referencia se sintetizaron haciendo reaccionar los agentes neurolépticos perfenazina y flufenazina con los ácidos grasos de cadena corta ácido propiónico, ácido butírico y ácido valérico y con ácido 4-fenilbutírico y ácido γ -aminobutírico (GABA). Los compuestos se prepararon en rendimientos elevados y se aislaron como sólidos cristalinos, solubles en ácido láctico al 1 %.

Síntesis de conjugados químicos preparados a partir de perfenazina o flufenazina y un ácido orgánico - procedimiento general: Una mezcla de un agente neuroléptico perfenazina o flufenazina (1 equivalente), un derivado de cloruro de acilo de un ácido graso de cadena corta (1,1 equivalentes) y, opcionalmente, Et_3N (2 equivalentes) (usados liberando materiales de partida encontrados como sus sales de HCl) en 5-10 ml de dimetilformamida (DMF) se agitó a temperatura ambiente, en atmósfera de nitrógeno, durante 24 horas. La mezcla se repartió después entre acetato de etilo y agua. La fase orgánica se lavó a partir de entonces con NaHCO_3 al 5 % y salmuera, se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se evaporó, dando el producto deseado.

Síntesis de 4-fenilbutirato de perfenazina de referencia (AN 130): Se hicieron reaccionar perfenazina y cloruro de 4-fenilbutirilo (el cloruro de acilo de ácido 4-fenilbutírico) como se describe anteriormente. El residuo en bruto obtenido se purificó por cromatografía en gel de sílice, usando una mezcla de metanol:acetato de etilo 1:10 como eluyente. El producto se obtuvo como un aceite amarillo (rendimiento del 78 %).

RMN de ^1H (CDCl_3): $\delta = 1,94$ (quint, $J = 6$ Hz, 4 H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2$), 2,32 (t, $J = 6$ Hz, 2H, CO_2CH_2), 2,64 (m, 12H, seis NCH_2), 3,93 (t, $J = 5,6$ Hz, 2H, ArNCH_2), 4,17 (t, $J = 5,3$ Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 6,82-7,30 (m, 12H, Ar, Ph) ppm.

RMN- ^{13}C (CDCl_3): $\delta = 23,25$ ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2$), 26,46 ($\text{ArNCH}_2\text{CH}_2$), 33,56 (CH_2Ph), 35,06 (CH_2CO_2), 45,10 (ArNCH_2), 52,23 (dos NCH_2), 52,72 (dos NCH_2), 55,25 ($\text{ArNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 57,04 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 61,32 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), (C_1 , C_{10}), 122,51 (C_3), 123,15 (C_8), 123,86 ($\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_2)_2$), 125,13 (C_2), 126,02 (p-Ph), 127,56 (C_9), 127,63 (C_7), 128,01 (o-Ph), 128,41 (m-Ph), 128,49 (C_4), 173,33 (CO_2) ppm.

EM (Cl, *i*-Bu): m/z (%) = 550 (MH^+ , 1,7).

Síntesis de butirato de perfenazina de referencia (AN 167): Se hicieron reaccionar perfenazina y cloruro de butirilo (el cloruro de acilo de ácido butírico) como se describe anteriormente. El producto se obtuvo como un aceite amarillo (rendimiento del 74 %) y se usó sin purificación adicional.

RMN de ^1H (CDCl_3): $\delta = 0,93$ (t, $J = 7,36$ Hz, 3H, Me), 1,63 (sext, $J = 7,44$ Hz, 2H, CH_2Me), 1,95 (quint, $J = 6,7$ Hz, 2H, $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2$), 2,27 (t, $J = 7,46$ Hz, 2H, CO_2CH_2), 2,43 (m, 10H, cinco NCH_2), 2,57 (t, $J = 5,96$ Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3,66 (t, $J = 5,96$ Hz, 2H, ArNCH_2), 4,18 (t, $J = 5,9$ Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 6,66 (m, 7H, Ar) ppm.

RMN- ^{13}C (CDCl_3): $\delta = 13,54$ (CH_3CH_2), 18,29 (MeCH_2), 24,06 ($\text{ArNCH}_2\text{CH}_2$), 36,03 (CH_2CO_2), 45,15 (ArNCH_2), 53,09 (dos NCH_2), 53,23 (dos NCH_2), 55,30 ($\text{ArNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 56,51 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 61,48 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 115,64 (C_1 , C_{10}), 122,02 (C_3), 122,69 (C_8), 123,27 (C_5), 124,52 (C_6), 127,23 (C_7), 127,29 (C_9), 127,68 (C_4), 133,00 (C_2), 144,32 (C_{12}), 146,29 (C_{11}), 173,37 (CO_2) ppm.

EM (Cl, NH_3): m/z (%) = 473 (M^+ , 100), 474 (MH^+ , 82,64).

Síntesis de propionato de perfenazina de referencia (AN 177): Perfenazina y cloruro de propionilo (el cloruro de acilo de ácido propiónico) se hicieron reaccionar como se describe anteriormente. El producto se obtuvo como un aceite amarillo (rendimiento del 85 %) y se usó sin purificación adicional.

RMN de ^1H (CDCl_3): $\delta = 1,12$ (t, $J = 7,53$ Hz, 3H, Me), 1,95 (quint, $J = 6,8$ Hz, 2H, $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2$), 2,32 (c, $J = 7,57$ Hz, 2H, CO_2CH_2), 2,51 (m, 10H, cinco NCH_2), 2,61 (t, $J = 5,95$ Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3,89 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H, ArNCH_2), 4,16 (t, $J = 9,92$ Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 6,98 (m, 7H, Ar) ppm.

RMN-¹³C (CDCl₃): δ = 9,01 (CH₃), 24,08 (ArNCH₂CH₂), 27,44 (CH₂CO₂), 45,18 (ArNCH₂), 53,09 (dos NCH₂), 53,26 (dos NCH₂), 55,32 (ArNCH₂CH₂CH₂), 56,50 (NCH₂CH₂O), 61,63 (NCH₂CH₂O), 115,67 (C₁, C₁₀), 122,05 (C₃), 122,72 (C₈), 123,30 (C₅), 124,56 (C₆), 127,26 (C₇), 127,33 (C₉), 127,71 (C₄), 133,03 (C₂), 144,35 (C₁₂), 146,32 (C₁₁), 174,24 (CO₂) ppm.

5 EM (Cl, NH₃): m/z (%) = 459 (MH⁺, 100), 458 (M, 47,63).

Síntesis de valerato de perfenazina de referencia (AN 178): Se hicieron reaccionar perfenazina y cloruro de acilo (el cloruro de acilo del ácido valérico) según se describe. El residuo en bruto obtenido se purificó por cromatografía en gel de sílice, usando una mezcla de acetato de etilo:hexano 7:4 como eluyente. El producto se obtuvo como un aceite amarillento (rendimiento del 75 %).

10 RMN de ¹H (CDCl₃): δ = 0,86 (t, J = 7,23 Hz, 3H, Me), 1,29 (sext, J = 6,97 Hz, 2H, CH₂Me), 1,56 (quint, J = 7,09 Hz, 2H, CH₂CH₂CO₂), 1,87 (quint, J = 6,79 Hz, 2H, ArNCH₂CH₂), 2,26 (t, J = 7,64 Hz, 2H, CH₂CO₂), 2,37 (m, 10H, cinco NCH₂), 2,54 (t, J = 5,93 Hz, 2H, ArNCH₂), 4,14 (t, J = 5,95 Hz, 2H, NCH₂CH₂O), 6,53-7,14 (m, 7H, Ar) ppm.

15 RMN-¹³C (CDCl₃): δ = 13,51 (CH₃CH₂), 22,02 (CH₂Me), 23,89 (CH₂CH₂Me), 26,82 (ArNCH₂CH₂), 33,80 (CH₂CO₂), 45,07 (ArNCH₂), 53,00 (dos NCH₂), 53,16 (dos NCH₂), 55,09 (ArNCH₂CH₂CH₂), 56,46 (NCH₂CH₂O), 61,42 (NCH₂CH₂O), 111,68 (c, J = 3,77 Hz, C₁), 115,73 (C₁₀), 118,74 (c, J = 3,77 Hz, C₃), 122,85 (C₈), 123,77 (C₆), 124,02 (c, J = 272 Hz, CF₃), 127,20 (C₇), 127,29 (C₉), 127,42 (C₄), 129,34 (c, J = 32 Hz, C₂), 129,69 (C₅), 144,08 (C₁₁), 145,51 (C₁₂), 173,45 (CO₂) ppm.

EM (Cl, Cl/NH₃): m/z (%) = 522 (MH⁺, 100).

20 **Síntesis de propionato de flufenazina de referencia (AN 179):** Flufenazina y cloruro de propionilo (el cloruro de acilo de ácido propiónico) se hacen reaccionar como se describe anteriormente. El producto se obtuvo como un aceite amarillento (95 % de rendimiento) y según se usó sin purificación adicional.

RMN de ¹H (CDCl₃): δ = 1,12 (t, J = 7,55 Hz, 3H, Me), 1,91 (quint, J = 7,18 Hz, 2H, ArNCH₂CH₂), 2,32 (c, J = 7,56 Hz, 2H, CO₂CH₂), 2,45 (m, 10H, cinco NCH₂), 2,59 (t, J = 5,92 Hz, 2H, NCH₂CH₂O), 3,93 (t, J = 7,12 Hz, 2H, ArNCH₂), 4,17 (t, J = 5,95 Hz, 2H, NCH₂CH₂O), 6,67-7,14 (m, 7H, Ar).

25 RMN-¹³C (CDCl₃): δ = 8,91 (Me), 23,87 (ArNCH₂CH₂), 27,33 (CH₂CO₂), 45,05 (ArNCH₂), 52,98 (dos NCH₂), 53,17 (dos BCN₂), 55,07 (ArNCH₂CH₂CH₂), 56,42 (NCH₂CH₂O), 61,54 (NCH₂CH₂O), 111,65 (c, J = 3 Hz, C₁), 115,71 (C₁₀), 118,73 (c, J = 3,77 Hz, C₃), 122,84 (C₈), 123,73 (C₆), 123,99 (c, J = 272 Hz, CF₃), 127,18 (C₇), 127,27 (C₉), 127,41 (C₄), 129,30 (c, J = 32 Hz, C₂), 129,65 (C₅), 144,05 (C₁₁), 145,48 (C₁₂), 174,10 (CO₂).

EM (Cl, Cl/NH₃): m/z (%) = 494 (MH⁺, 100).

30 **Síntesis de butirato de flufenazina de referencia (AN 180):** La flufenazina y el cloruro de butirilo se hicieron reaccionar como se describe anteriormente. El producto se obtuvo como un aceite amarillento (al 97 % de rendimiento) y se usó sin purificación adicional.

35 RMN de ¹H (CDCl₃): δ = 0,93 (t, J = 7,4 Hz, 3H, Me), 1,32 (sext, J = 7,4 Hz, 2H, CH₂Me), 1,92 (quint, J = 7,18 Hz, 2H, ArNCH₂CH₂), 2,27 (t, J = 7,4 Hz, 2H, CP₂CH₂), 2,45 (m, 10H, cinco NCH₂), 2,58 (t, J = 5,9 Hz, 2H, NCH₂CH₂O), 3,93 (t, J = 7,2 Hz, 2H, ArNCH₂), 4,17 (t, J = 5,98 Hz, 2H, NCH₂CH₂O), 6,67-7,13 (m, 7H, Ar) ppm.

RMN-¹³C (CDCl₃): δ = 13,42 (CH₃CH₂), 18,20 (MeCH₂), 23,85 (ArNCH₂CH₂), 35,92 (CH₂CO₂), 45,02 (ArNCH₂), 52,97 (dos NCH₂), 53,14 (dos NCH₂), 55,04 (ArNCH₂CH₂CH₂), 56,43 (NCH₂CH₂O), 61,39 (NCH₂CH₂O), 111,62 (c, J = 3 Hz, C₁), 115,68 (C₁₀), 118,68 (c, J = 3,77 Hz, C₃), 122,80 (C₈), 123,70 (C₆), 123,98 (c, J = 272 Hz, CF₃), 127,15 (C₇), 127,24 (C₉), 127,38 (C₄), 129,27 (c, J = 32 Hz, C₂), 129,62 (C₅), 144,03 (C₁₁), 145,46 (C₁₂), 173,23 (CO₂) ppm.

40 EM (Cl/CH₄): m/z (%) = 507,18 (M⁺, 75,3), 508,18 (MH⁺, 57,57), 419,13 (M-C₄H₈O₂, 82).

Síntesis de valerato de flufenazina de referencia (AN 181): Flufenazina y cloruro de valerilo (el cloruro de acilo de ácido valérico) se hicieron reaccionar como se describe. El residuo en bruto obtenido se purificó por cromatografía en gel de sílice, usando una mezcla de acetato de etilo:hexano 7:4 como eluyente. El producto se obtuvo como un aceite amarillento (rendimiento del 75 %).

45 RMN de ¹H (CDCl₃): δ = 0,86 (t, J = 7,23 Hz, 3H, Me), 1,29 (sext, J = 6,97 Hz, 2H, CH₂Me), 1,56 (quint, J = 7,09 Hz, 2H, CH₂CH₂CO₂), 1,87 (quint, J = 6,79 Hz, 2H, ArNCH₂CH₂), 2,26 (t, J = 7,64 Hz, 2H, CH₂CO₂), 2,37 (m, 10H, cinco NCH₂), 2,54 (t, J = 5,93 Hz, 2H, ArNCH₂), 4,14 (t, J = 5,95 Hz, 2H, NCH₂CH₂O), 6,53-7,14 (m, 7H, Ar) ppm.

50 RMN-¹³C (CDCl₃): δ -13,51 (Me), 22,02 (CH₂Me), 23,89 (CH₂CH₂Me), 26,82 (ArNCH₂CH₂), 33,80 (CH₂CO₂), 45,07 (ArNCH₂), 53,00 (dos NCH₂), 53,16 (dos NCH₂), 55,09 (ArNCH₂CH₂CH₂), 56,46 (NCH₂CH₂O), 61,42 (NCH₂CH₂O), 111,68 (c, J = 3,77 Hz, C₁), 115,73 (C₁₀), 118,74 (c, J = 3,77 Hz, C₃), 122,85 (C₈), 123,77 (C₆), 124,02 (c, J = 272 Hz, CF₃), 127,20 (C₇), 127,29 (C₉), 127,42 (C₄), 129,34 (c, J = 32 Hz, C₂), 129,69 (C₅), 144,08 (C₁₁), 145,51 (C₁₂), 173,45 (CO₂).

EM (Cl, Cl/NH₃): m/z (%) = 522 (MH⁺, 100).

Síntesis de los conjugados químicos preparados a partir de perfenazina o flufenazina y aminoácidos orgánicos - procedimiento general: Una mezcla de un aminoácido N-prottegido (1 equivalente) y carbonildiimidazol (CDI) (1,1 equivalentes) en 10 ml de DMF se agitó, en atmósfera de nitrógeno, durante 1 hora. Se añadió perfenazina o flufenazina (1 equivalente) a partir de entonces y la mezcla de agitó en atmósfera de nitrógeno, a 90 °C, durante 24 horas. La suspensión resultante se evaporó y se fraccionó entre acetato de etilo y agua. La fase acuosa se extrajo dos veces con acetato de etilo y la capa orgánica combinada se lavó tres veces con NaHCO₃, dos veces con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó. El producto N-prottegido se obtuvo como un aceite amarillo.

10 El grupo N-protector se retiró del producto como sigue: A una solución del producto N-prottegido en acetato de etilo, se añadió gota a gota una solución de HCl 4N en acetato de etilo. La mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó a partir de entonces y el residuo se secó adicionalmente en vacío alto. El producto obtenido, como una sal de triclorhidrato, se recrystalizó a partir de una mezcla de metanol/éter, se filtró y se secó.

15 **Síntesis de N-boc-4-aminobutirato de perfenazina:** Se hacen reaccionar perfenazina y N-f-boc-GABA (ácido 4-aminobutírico protegido por N-t-boc) según se describe anteriormente. El producto en bruto se purificó por cromatografía en gel de sílice, usando una mezcla de acetato de etilo:etanol 20:1 como eluyente. El producto se obtuvo como un aceite amarillento (rendimiento del 63 %).

20 RMN de ¹H (CDCl₃): δ = 1,43 (s, 9H, *f-Bu*), 1,82 (quint, *J* = 7,18 Hz, 2H, CH₂CH₂NHBoc), 1,90 (quint, *J* = 7,18 Hz, 2H, ArNCH₂CH₂), 2,35 (t, *J* = 8,97 Hz, 2H, CO₂CH₂), 2,42 (m, 10H, cinco NCH₂), 2,60 (t, *J* = 5,98 Hz, 2H, NCH₂CH₂O), 3,16 (c, *J* = 6,85 Hz, 2H, CH₂NHBoc), 3,84 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H, ArNCH₂), 4,18 (t, *J* = 5,98 Hz, 2H, NCH₂CH₂O), 5,10 (s ancho, 1H, NH), 6,83 (m, 7H, Ar) ppm.

25 RMN-¹³C (CDCl₃): δ = 23,92 (CH₂CH₂NHBoc), 24,98 (ArNCH₂CH₂), 28,21 (*f-Bu*), 39,50 (CH₂CO₂), 45,05 (ArNCH₂), 52,89 (dos NCH₂), 53,03 (dos NCH₂), 55,15 (ArNCH₂CH₂CH₂), 56,34 (NCH₂CH₂O), 60,13 (CH₂NHBoc), 61,29 (NCH₂CH₂O), 78,80 (CMe₃), 115,60 (C₁, C₁₀), 121,96 (C₃), 122,65 (C₈), 123,22 (C₅), 124,45 (C₆), 127,21 (C₇, C₄), 127,62 (C₉), 132,93 (C₂), 144,23 (C₁₂), 146,23 (C₁₁), 155,79 (NCO₂), 172,92 (CO₂) ppm.

30 **Síntesis de N-boc-4-aminobutirato de flufenazina de referencia:** Flufenazina y N-t-boc-GABA (ácido 4-aminobutírico N-t-boc-prottegido) se hicieron reaccionar como se describe anteriormente. El producto en bruto se purificó por cromatografía en gel de sílice, usando una mezcla de acetato de etilo:etanol 20:1 como eluyente. El producto se obtuvo como un aceite amarillento (rendimiento del 75 %).

RMN de ¹H (CDCl₃): δ = 1,49 (s, 9H, *t-Bu*), 1,77 (quint, *J* = 6,38 Hz, 2H, CH₂CH₂NHBoc), 1,90 (quint, *J* = 6,96 Hz, 2H, ArNCH₂CH₂), 2,35 (t, *J* = 6,38 Hz, 2H, CO₂CH₂), 2,45 (m, 10H, cinco NCH₂), 2,58 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H, NCH₂CH₂O), 3,14 (c, *J* = 5,8 Hz, 2H, CH₂NHBoc), 3,94 (t, *J* = 6,38 Hz, 2H, ArNCH₂), 4,2 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H, NCH₂CH₂O), 4,92 (s ancho, 1H, NH), 6,8-7,2 (m, 7H, Ar) ppm.

35 RMN-¹³C (CDCl₃): δ = 23,88 (CH₂CH₂NHBoc), 25,07 (ArNCH₂CH₂), 28,28 (*f-Bu*), 39,60 (CH₂CO₂), 45,13 (ArNCH₂), 52,94 (dos NCH₂), 53,04 (dos NCH₂), 55,13 (ArNCH₂CH₂CH₂), 56,43 (NCH₂CH₂O), 60,22 (CH₂NHBoc), 61,36 (NCH₂CH₂O), 78,92 (CMe₃), 111,77 (c, *J* = 3 Hz, C₁), 115,82 (C₁₀), 118,85 (c, *J* = 3,77 Hz, C₃), 122,97 (C₈), 123,91 (C₆), 124,05 (c, *J* = 272 Hz, CF₃), 127,30 (C₇), 127,39 (C₉), 127,52 (C₄), 129,42 (c, *J* = 32 Hz, C₂), 129,82 (C₅), 144,12 (C₁₁), 145,58 (C₁₂), 155,82 (NCO₂), 173,01 (CO₂) ppm.

40 **Síntesis de triclorhidrato de 4-aminobutirato de perfenazina (AN 168):** N-boc-4-aminobutirato de perfenazina, preparado como se describe anteriormente, se hizo reaccionar con HCl como se describe anteriormente. El producto de triclorhidrato se obtuvo como un aceite semisólido viscoso (rendimiento cuantitativo).

45 RMN de ¹H (CDCl₃): δ = 1,93 (quint, *J* = 7,14 Hz, 2H, CH₂CH₂NH₂), 2,23 (m, 2H, ArNCH₂CH₂), 2,61 (t, *J* = 7,14 Hz, 2H, CO₂CH₂), 3,01 (m, 2H, CH₂NH₂), 3,33 (m, 2H, ArNCH₂CH₂CH₂), 3,48-3,87 (m, 10H, cinco NCH₂), 4,10 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H, NCH₂CH₂O), 4,48 (m, 2H, ArNCH₂), 7-7,31 (m, 7H, Ar) ppm.

RMN-¹³C (CDCl₃): δ = 22,34 (CH₂CH₂NH₂), 22,93 (ArNCH₂CH₂), 31,11 (CH₂CO₂), 39,56 (CH₂NH₂), 44,76 (ArNCH₂), 49,42 (dos NCH₂), 49,61 (dos NCH₂), 55,29 (ArCH₂CH₂CH₂), 56,08 (NCH₂CH₂O), 58,64 (NCH₂CH₂O), 116,69 (C₁₀), 117,20 (C₁), 123,49 (C₃), 124,19 (C₈), 125,44 (C₅), 126,42 (C₆), 128,20 (C₇), 128,56 (C₉), 128,80 (C₄), 134,23 (C₂), 144,97 (C₁₂), 147,37 (C₁₁), 173,04 (CO₂) ppm.

50 EM (Cl/CH₄): m/z (%) = 403,09 (MH⁺-C₄H₇NO, 100), 489,18 (MH⁺, 1,7).

Síntesis de triclorhidrato de 4-aminobutirato de flufenazina de referencia (AN 187): N-boc-4-aminobutirato de flufenazina se hace reaccionar con HCl, como se describe anteriormente. El producto se obtuvo como un sólido blanco (rendimiento del 75 %).

ES 2 379 544 T3

RMN de ^1H (CDCl_3): δ = 1,93 (quint, J = 7,25 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2,29 (quint, J = 5,42 Hz, 2H, $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2$), 2,49 (t, J = 7,14 Hz, 2H, CO_2CH_2), 2,99 (t, J = 7,54 Hz, 2H, CH_2NH_2), 3,39 (t, J = 4,87 Hz, 2H, $\text{ArNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3,40 (t, J = 5,42 Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3,4-4,0 (m, 8H, cuatro NCH_2), 3,91 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4,18 (t, J = 6,12 Hz, 2H, ArNCH_2), 7,02-7,33 (m, 7H, Ar) ppm.

5 RMN- ^{13}C (CDCl_3): δ = 22,76 ($\text{ArNCH}_2\text{CH}_2$), 23,36 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 31,49 (CH_2CO_2), 39,96 (CH_2NH_2), 45,21 (ArNCH_2), 49,57 (dos NCH_2), 50,02 (dos NCH_2), 55,72 ($\text{ArNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 56,48 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 58,99 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 113,41 (c, J = 3,77 Hz, C_1), 117,80 (C_{10}), 120,70 (c, J = 3,77 Hz, C_3), 124,89 (C_8), 126,24 (C_6), 125,59 (c, J = 272 Hz, CF_3), 128,75 (C_7), 128,97 (C_9), 129,25 (C_4), 130,96 (c, J = 32 Hz, C_2), 132,51 (C_5), 145,12 (C_{11}), 147,25 (C_{12}), 173,48 (CO_2) ppm.

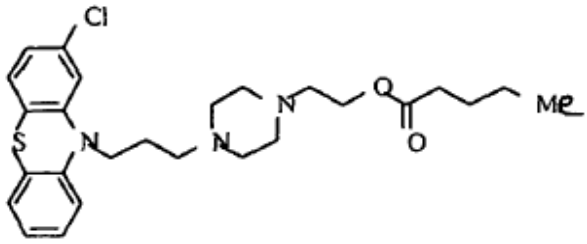
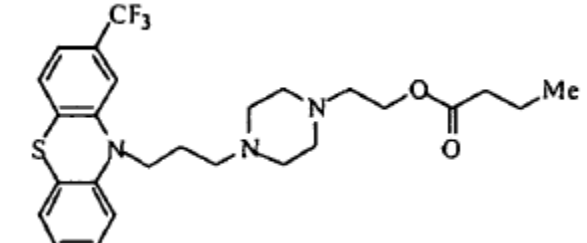
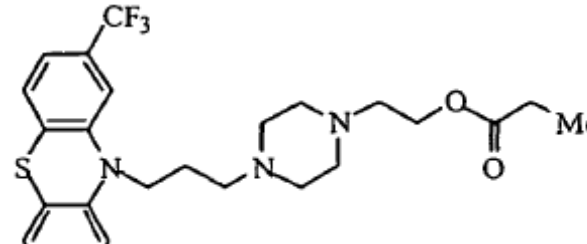
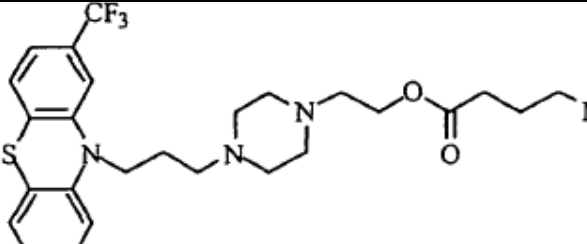
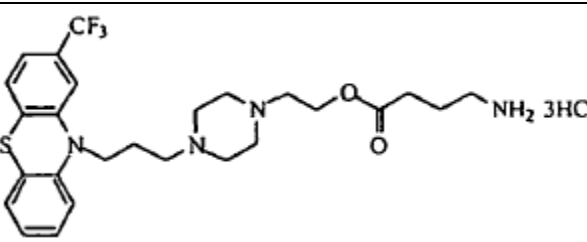
10 EM (Cl/CH_4): m/z (%) = 523 (MH^+ , 0,5), 280 ($\text{M}-\text{C}_{14}\text{H}_9\text{NF}_3\text{S}$, 100).

La Tabla 1 presenta los conjugados químicos sintetizados por los procedimientos descritos anteriormente.

Tabla 1

referencia AN-130	4-fenilbutirato de perfenazina $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{ClN}_3\text{O}_2\text{S}$ 550,16	
referencia AN-167	Butirato de perfenazina $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{ClN}_3\text{O}_2\text{S}$ 474,06	
AN-168	Triclorhidrato de 4-aminobutirato de perfenazina $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{ClNO}_2\text{S} \cdot 3 \text{HCl}$ 598,46	
referencia AN-177	Propionato de perfenazina $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{ClN}_3\text{O}_2\text{S}$ 460,03	

(continuación)

Referencia AN-178	Valerato de perfenazina $C_{26}H_{34}ClN_3O_2S$ 488,09	
Referencia AN-180	Butirato de flufenazina $C_{26}H_{32}F_3N_3O_2S$ 507,61	
Referencia AN-179 (NSK-I-52)	Propionato de flufenazina $C_{25}H_{30}F_3N_3O_2S$ 493,59	
Referencia AN-181 (NSK-I-42)	Valerato de flufenazina $C_{27}H_{34}F_3N_3O_2S$ 521,64	
Referencia AN-187	Triclorhidrato de 4-aminobutirato de flufenazina $C_{26}H_{33}F_3N_4O_2S \cdot 3 HCl$ 632,01	

Materiales y procedimientos experimentales

5 **Líneas celulares:** Se usaron en este estudio carcinoma de próstata humano (PC-3), carcinoma de colon humano (HT-29), melanoma murino (B-16) y su subclón resistente a fármacos (B-16 MDR), fibroblastos de ratón (3T3), leucemia mieloide (HL60) y su subclón resistente a fármacos (HL 60 MX2), línea celular de endometrio (MES SA) y su subclón resistente al fármaco (MES DX5), linfoma Jurkat T y leucemia monocítica (U-937).

Los cultivos primarios de fibroblastos de rata se obtuvieron a partir de ratas recién nacidas usando procedimientos conocidos [7].

Las neuronas y las células de la glía se prepararon a partir de cerebros de embriones de ratonas ICR preñadas (días 14-15). Los ratones se diseccionaron y se homogeneizaron en una mezcla de medio L-15 de Leibowitch (Beth Aemek), gentamicina 75 µg/ml y glutamina 0,2 mM. Las células, 300-500 K/pocillo, se sembraron en microplacas de 96 pocillos tratadas con poli-D-lisina. El cultivo neuronal seleccionado se obtuvo añadiendo, 48 horas a partir de entonces, 5-fluorodeoxiuridina (FUDR) y uridina a la mitad de las placas. Los cultivos no tratados incluyeron una mezcla de células neuronales y células gliales. Las células se cultivaron en RPMI o en medio DMEM suplementado con FCS al 10 % (suero bovino fetal) y con glutamina 2 mM y se incubaron a 37 °C en un incubador de CO₂ humidificado al 5 %.

El cultivo de miocitos de rata se preparó a partir de ratas recién nacidas Wistar de 1-2 días de edad (Harlan). Se usaron treinta ratas recién nacidas obteniendo aproximadamente 25-30 millones de células. Para este fin, los corazones se diseccionaron y se sometieron a disociación tisular enzimáticamente a temperatura ambiente usando RDB™ (una proteasa aislada a partir de extracto de higuera). Este protocolo se repitió cinco veces, hasta que las células se dispersaron completamente. Las células dispersas se preplaquearon en matraces de cultivo de tejidos, 3 x 10⁶/ml en medio DMEM, durante 45 minutos y se transfirieron después a una placa de microvaloración revestida de gelatina durante 24 horas, a fin de reducir células no miocíticas. El agente citotóxico ARO-C se añadió a partir de entonces al cultivo, eliminando de este modo células que se dividen y dejando sólo los miocitos que no se dividen en el cultivo. Las células se incubaron durante 4 días y se llevó a cabo una inspección microscópica a partir de entonces.

Proliferación de células cancerosas y normales: La proliferación se midió por ensayo de rojo neutro [8] o por un ensayo fluorométrico cuantificando el contenido de ADN [9]. En el ensayo de rojo neutro, el rojo neutro es absorbido por los lisosomas, causando así coloración de las células vivas. El análisis cuantitativo se realiza por ensayo colorimétrico (lector de ELISA a 550 nm). En el ensayo fluorométrico, se usa azul de alamar como un indicador de redox. Se midió la fluorescencia de azul de alamar a una longitud de onda de excitación de 544 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm (FLUOstar BMG Lab Technologies, Offenburg, Alemania).

Apoptosis y fragmentación de ADN: La fragmentación de los núcleos celulares se estudió por análisis citométrico de flujo de células teñidas con yoduro de propidio. Este análisis se llevó a cabo usando un FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA) equipado con un láser iónico de argón ajustado a una longitud de onda de excitación de 480 nm y con un Módulo de Discriminación de Doble (DDM). El software de lisis II (Becton Dickinson) se usó para adquisición de datos. Los cambios nucleares apoptóticos se evaluaron de acuerdo con los criterios de Nicolletti y cols. [13].

Quimiosensibilización: El efecto quimiosensibilizante de perfenazina y su conjugado químico AN 168 se midió *in vitro*. Diversas concentraciones de perfenazina o de AN 168 se coadministraron conjuntamente con un agente quimioterapéutico bien a células de glioma de ratas C6 o bien a células de linfoma T de Jurkat. La viabilidad de células y/o la fragmentación de ADN tras el tratamiento bien con el agente quimioterapéutico, perfenazina, AN 168, bien con una combinación del agente quimioterapéutico y perfenazina o bien con una combinación de un agente quimioterapéutico con AN 168 se midieron como se describe anteriormente.

Animales: Se adquirieron de Harlan (Israel) ratas machos adultos jóvenes (150-230 g). Los animales se dividieron 2-5/jaula y se albergaron en condiciones controladas en el animalario durante una semana antes de los experimentos. Se llevaron a cabo los experimentos con animales no inmunizados, en un procedimiento de doble ciego. En cada experimento se probaron diversos grupos de tratamiento (aproximadamente de 5-10 animales cada uno).

Se adquirieron de Harlan (Israel) ratones machos y hembras adultos jóvenes. Los animales se albergaron durante 4-7 días en condiciones controladas anteriores a la experimentación. Los experimentos se llevaron a cabo en un procedimiento de doble ciego. En cada experimento se probaron diversos grupos de tratamiento (aproximadamente de 10 animales cada uno).

Catalepsia en ratas: La manifestación de los efectos secundarios extrapiramidales inducidos por neurolepticos típicos se evaluó por la aparición de comportamiento cataleptico estereotípico en ratas tras el tratamiento neuroleptico. La catalepsia se determinó por dos procedimientos: (i) midiendo el tiempo necesario que le lleva a un animal colgando en la pared de una jaula mover sus patas traseras y alcanzar una superficie plana (la prueba de "pared"); y (ii) las ratas se colocaron en una superficie plana con sus extremidades anteriores inclinadas en una barra plana (5,5 cm de altura) asemejándose a una posición de tocar el piano. La catalepsia se determinó por el tiempo que le llevó a un animal descender y alcanzar la superficie plana (la prueba de "piano"). El tiempo máximo de seguimiento fue de 2 minutos y estas medidas se llevaron a cabo cada hora e individualmente para cada animal. Estas pruebas proporcionan una evaluación de actividad bloqueante de dopamina central (DA) y son criterios aceptables para síntomas extrapiramidales inducidos por fármacos antipsicóticos [10]. La catalepsia inducida total y el curso temporal de la misma se midieron para perfenazina, flufenazina y para compuestos AN 167, AN 168, AN 177, AN 178, AN 180 y AN 187 (véase Tabla 1 más adelante) comparando diferentes grupos de compuestos y

diferentes afecciones. En general, se inyectaron a los animales intraperitonealmente 5 mg/Kg del fármaco parental perfenazina y 7,5 mg/Kg de flufenazina y dosis equimoleculares de sus conjugados químicos relacionados de la presente invención, disueltos en ácido láctico al 1 %. En un conjunto diferente de medidas, AN 168 y perfenazina, disueltos en 1 % de ácido láctico, se administraron oralmente a los animales.

- 5 **Catalepsia en ratones:** La aparición de comportamiento cataléptico estereotípico en ratones tras el tratamiento neuroléptico se midió en dos conjuntos diferentes de experimentos.

10 En el primer conjunto, los machos adultos se dividieron en grupos y cada grupo se trató bien por perfenazina (1,5 mg/kg 9 ratones), una mezcla de perfenazina y una dosis equimolar de GABA (7 ratones), bien por una dosis equimolar de AN-168 (8 ratones) o bien por ningún tratamiento (grupo control, 6 ratones). La catalepsia se determinó usando un sistema de dos jaulas y una barra entre ellas. El ratón se colgó en medio de la barra y el porcentaje de animales que alcanzan el objetivo en 2 minutos se sometió a seguimiento 1 hora, 2 horas y 3 horas tras el tratamiento.

15 En el segundo conjunto, las hembras jóvenes se dividen en grupos y cada grupo se trató bien por 2,5 mg/kg de perfenazina (6), bien por una mezcla equimolar de perfenazina y una dosis de GABA (6), bien por una dosis equimolar de AN-168 (7 ratones) o bien por ningún tratamiento (grupo control, 7 ratones). La catalepsia se determinó usando el sistema descrito anteriormente. El ratón se colgó en medio de la barra y se midió el tiempo que le llevó al animal alcanzar el objetivo.

20 **Secreción de prolactina:** Los neurolépticos típicos inducen la hiperprolactinemia, que está frecuentemente asociada con galactorrea y con función gonadal y sexual dañadas [11]. La medida del nivel de prolactina en plasma circulatorio se usó por lo tanto como un marcador bioquímico sensible para la actividad antipsicótica de los neurolépticos conocidos y los conjugados químicos de la presente invención, tras administración intraperitoneal o administración oral de los mismos. Por tanto, se recogió sangre de la órbita ocular puncionada de ratas sometidas a anestesia con éter y el ensayo se llevó a cabo usando Millenia, kit de ensayo inmunométrico de enzima prolactina de ratas (DPC, EE.UU.).

25 **Criterios de comportamiento:** Se observó sedación de los animales tratados por los conjugados químicos de la presente invención y se valoró como se describe más adelante (Tabla 2). El grado de sedación y movilidad de los animales en los diferentes grupos tratados se evaluó usando una puntuación de 0 a 3, mientras que una puntuación de 0 representa animales activos y móviles, una puntuación de 1 representa animales tranquilos y móviles, una puntuación de 2 representa animales tranquilos e inmóviles y una puntuación de 3 representa animales completamente atáxicos y no alerta. El comportamiento de los animales tratados proporcionó una estimación de la eficacia neuroléptica de los neurolépticos conocidos probados y de los conjugados químicos, así como de la gravedad de los síntomas extrapiramidales inducidos por lo tanto.

35 **Toxicidad:** La toxicidad *in vitro* se determina midiendo el efecto de los compuestos probados (bien neurolépticos conocidos o bien los conjugados químicos de la invención) sobre cultivos primarios de neuronas y sobre neuronas y células de la glía del cerebro completo obtenidos a partir de los cerebros de ratones neonatales. La toxicidad *in vitro* de perfenazina y su conjugado químico AN 168 se determinó también con miocitos de rata. La toxicidad aguda *in vivo* según se determinó por la DL₅₀ se evaluó en ratones ICR de 2 meses de edad tras la administración de una dosis de bolo intraperitoneal única de fármaco.

Resultados experimentales

40 **Actividad de catalepsia inducida y antipsicótica de perfenazina y conjugados químicos que contienen la misma:** La actividad de catalepsia inducida y antipsicótica de perfenazina 5 mg/kg y concentraciones equimoleculares de sus conjugados químicos AN 130, AN 167 y AN 168 (véase Tabla 1 más adelante) se midió inyectando intraperitonealmente los compuestos, se disolvió en ácido láctico al 1 %, a ratas macho Wistar adultas jóvenes (pesando 150-200 gramos), divididas 5 por jaula y se determinó por el ensayo de "pared" descrito anteriormente. Un grupo de animales control se trató con el vehículo (ácido láctico) sólo. Los efectos del tratamiento tanto en catalepsia como en secreción de prolactina se siguieron durante un periodo de 2 horas y los resultados se presentan en las Figuras 1a y 1b.

50 La Figura 1a muestra los datos obtenidos por catalepsia inducida como la suma de 3 determinaciones que se llevaron a cabo en duplicados a los 0, 60 y 120 minutos después del tratamiento. Cada columna representa el promedio de 5 animales. El tiempo total se normalizó a perfenazina (por ejemplo, al 100 %). Los datos obtenidos muestran que se indujo catalepsia por el tratamiento de perfenazina y la referencia AN 130 mientras que la referencia AN 167 y la referencia AN 168 no indujeron catalepsia en absoluto.

55 La Figura 1b muestra los niveles en sangre de prolactina medidos a 0, 60 y 120 minutos después del tratamiento y representa la suma de tres determinaciones en cada referencia temporal. El nivel de prolactina en sangre sirve como un marcador bioquímico para la actividad antipsicótica de los compuestos. Los datos obtenidos mostraron perfiles similares del nivel en sangre de prolactina en los animales cuando se trataron con perfenazina, referencia AN 130, AN 167 o AN 168, que alcanzó el máximo a los 60 minutos y disminuyó a partir de entonces. Los niveles de

prolactina en sangre, en cada punto temporal, en los animales tratados con los conjugados de referencia AN 130, de referencia AN 167 y de referencia AN 168 son similares a aquellos de perfenazina, indicando que la actividad antipsicótica de los conjugados químicos es similar a aquella del fármaco parental. En los animales control, tratados con el vehículo (ácido láctico al 1 %) sólo estaba inalterado el nivel de prolactina.

5 **Estudios de SAR (Relación Actividad Estructura):** Se han realizado estudios de SAR para perfenazina y los conjugados químicos que incluyen la misma. La catalepsia inducida se midió como se describe anteriormente y se determinó por la prueba de "pared". Los resultados se presentan en la Figura 2. El conjugado de perfenazina y GABA, AN 168, se encontró que era el más efectivo, dando como resultado reducción casi máxima de catalepsia inducida, seguido por el valerato de referencia que contiene conjugado AN 178, el propionato de referencia que
10 contiene conjugado AN 177 y el butirato de referencia que contiene conjugado AN 167. Este experimento muestra una reducción significativa de la catalepsia inducida tras el tratamiento con los conjugados químicos en comparación con la catalepsia inducida por tratamiento con perfenazina *per se*.

Catalepsia y comportamiento animal inducido por perfenazina, flufenazina y conjugados químicos que contienen las mismas: Perfenazina, flufenazina y los conjugados químicos que contienen ácido butírico y GABA de las mismas (AN 167, AN 168, AN 180 y AN 187, véase la Tabla 1) se probaron para la catalepsia total inducida de este modo, el curso temporal de la catalepsia inducida y el comportamiento animal tras la administración de los mismos. Las medidas se llevaron a cabo tras las siguientes inyecciones intraperitoneales de perfenazina a 5 mg/Kg, concentraciones equimolares de referencia AN 167 y AN 168, flufenazina a 7,5 mg/Kg y concentraciones equimolares de referencia AN 180 y referencia AN 187. La catalepsia se determinó por la prueba de "pared".

20 La Figura 3a demuestra la catalepsia total inducida por los compuestos probados. Los datos obtenidos son una suma de las determinaciones tomadas a 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240 y 420 minutos tras la administración, con la normalización a tiempo total a perfenazina y flufenazina (= 100 %). Ambos conjugados químicos de referencia que contienen ácido butírico, AN 167 y AN 180, redujeron catalepsia significativamente. El GABA que contiene conjugados de perfenazina, AN 168, la abolió, mientras que el conjugado de GABA de referencia de flufenazina, AN 187, la redujo considerablemente.

La Figura 3b muestra el nivel de sangre de prolactina medido a 0, 60 y 120 minutos después del tratamiento con perfenazina, su conjugado de GABA AN 168, flufenazina y su conjugado de referencia de GABA AN 187. Los datos obtenidos muestran perfiles similares del nivel en sangre de prolactina en los animales cuando se tratan con perfenazina, flufenazina o con sus conjugados químicos de GABA, que alcanzaron el máximo a 60 minutos y disminuyeron a partir de entonces. Los niveles de prolactina en sangre, en cada punto temporal, en los animales tratados con AN 168 y referencia AN 187 fueron similares a aquellos de perfenazina y flufenazina, respectivamente.

La Figura 4a demuestra el curso temporal de la catalepsia inducida por perfenazina y los conjugados químicos que contienen la misma, durante un periodo de 7 horas. La catalepsia inducida por perfenazina alcanzó su máximo después de 2 horas y declinó a partir de entonces. El conjugado que contiene ácido butírico de referencia AN 167 indujo catalepsia reducida en comparación con perfenazina mientras que los animales tratados con el conjugado que contiene GABA AN 168 no tuvieron catalepsia a lo largo del periodo de 7 horas entero del estudio.

La Figura 4b demuestra el curso temporal de la catalepsia inducida por flufenazina y los conjugados químicos que contienen la misma, durante un periodo de 7 horas. Los animales tratados con flufenazina presentaron catalepsia durante las 7 horas medidas mientras que aquellos tratados con referencia AN 180 y con referencia AN 187 mostraron catalepsia más baja. La catalepsia inducida por referencia AN 180 fluctuó durante el tiempo de medida mientras que la catalepsia inducida por AN 187 de referencia se abolió al final del periodo de 7 horas. Ninguno de los animales en el estudio tuvieron catalepsia después de 24 horas.

El efecto de la administración del compuesto probado sobre el comportamiento animal se midió evaluando el grado de sedación y movilidad del animal tras el tratamiento descrito anteriormente, usando una puntuación de 0 a 3. Una puntuación de 0 representa animales activos y móviles, 1 representa animales tranquilos y móviles, 2 representa animales tranquilos e inmóviles y 3 representa animales completamente atáxicos y no alerta. Las puntuaciones obtenidas se resumen en la Tabla 2 más adelante y demuestran el efecto reducido de los conjugados químicos sobre el comportamiento animal en comparación con aquel de los fármacos conocidos.

Tabla 2

	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min	240 min
Perfenazina	1	2	2	3	2	2
AN-167	0	1	1	2	2	2
AN-168	0	0	1	1	1	1
Flufenazina	1	2	3	3	2	2

(continuación)

	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min	240 min
AN-180	1	2	3	2	1	1
AN-187	1	2	2	2	1	1

5 **Catalepsia inducida en ratas por AN 168 y una mezcla de perfenazina y GABA:** El efecto de AN 168, el conjugado de GABA de perfenazina, sobre la catalepsia inducida en ratas se comparó con la catalepsia inducida por una mezcla de sus fármacos parentales -perfenazina y GABA no conjugados-. La catalepsia se midió a los 60, 90 y 120 minutos tras una inyección intraperitoneal del conjugado o de la mezcla descrita y se determinó por la prueba de "pared".

La Figura 5a muestra los datos obtenidos para la catalepsia total inducida por los diversos tratamientos. Los animales en el grupo tratado con AN 168 mostraron catalepsia muy baja mientras que la catalepsia en el grupo tratado con la mezcla de perfenazina y GABA fue alta.

10 La figura 5b muestra el curso temporal de catalepsia tras ambos tratamientos y demuestra catalepsia reducida en animales tratados con AN 168, que se abolió después de 120 minutos.

Catalepsia inducida en ratas por referencia AN y AN 168: La catalepsia total inducida por AN 167 y AN 168 en cuatro experimentos independientes se puso a prueba y se comparó con catalepsia inducida por perfenazina en las mismas condiciones experimentales.

15 El promedio de la catalepsia total tras dosis equimolares de AN 167 y AN 168, como porcentaje de la catalepsia inducida por perfenazina, se muestra en la Figura 6. Aunque AN 167 indujo catalepsia más baja en comparación con perfenazina, AN 168 redujo la catalepsia inducida a casi un valor cero.

20 **Catalepsia inducida en ratones por perfenazina, por una mezcla de perfenazina y GABA y por AN 168:** El efecto de AN 168, el conjugado de GABA de perfenazina, sobre la catalepsia inducida en ratones se comparó con la catalepsia inducida por perfenazina sola y por una mezcla de la perfenazina no conjugada con fármacos parentales y de GABA. La catalepsia se midió a los 60, 90 y 120 minutos después de una inyección intraperitoneal del tratamiento y se determinó como se describe más adelante.

25 La figura 7a muestra los datos obtenidos para la catalepsia inducida por los diversos tratamientos en términos de porcentaje de animales que alcanzan los objetivos en dos minutos. Los animales en el grupo tratado con AN 168 presentaron discapacidad sustancialmente más baja mientras que los animales en los grupos tratados con perfenazina sola y con una mezcla de perfenazina y GABA presentaron catalepsia más alta.

30 La Figura 7b muestra los datos obtenidos para la catalepsia inducida por los diversos tratamientos, 2 y 3 horas después de los tratamientos anteriores, en términos del tiempo que les lleva a los animales alcanzar el objetivo. Los animales en el grupo tratado con AN 168 fueron mucho más rápidos que los animales tratados con perfenazina sola y con una mezcla de perfenazina y GABA.

35 **Catalepsia inducida, comportamiento animal inducido y actividad antipsicótica de perfenazina administrada oralmente y conjugado de GABA AN 168:** Como AN 168, se encontró que el conjugado químico de perfenazina y GABA es el conjugado químico más efectivo actualmente cuando se administra intraperitonealmente, se llevaron a cabo experimentos comparativos adicionales con el fin de determinar la eficacia oral de este conjugado químico en comparación con perfenazina. Para este fin, la catalepsia inducida, los niveles de prolactina en sangre y el comportamiento animal se midieron como se describe anteriormente, tras administración bien de AN 168 o bien de perfenazina sola a ratas. Los animales, divididos 5 por jaula, se trataron por administración oral de perfenazina o de AN-168 disueltos en ácido láctico al 1 %. Los animales control recibieron vehículo (ácido láctico) sólo.

40 La catalepsia inducida por la administración oral de diversas concentraciones de AN 168 y perfenazina se midió por la prueba de "pared" y la prueba de "piano" descritas anteriormente. El curso temporal de catalepsia se midió 4-24 horas tras administración oral de perfenazina 2,5, 5, 10 y 20 mg/kg y de dosis equimolares moleculares respectivas de AN-168 a 3,5, 7, 14 y 28 mg/kg. La catalepsia total representa la suma de catalepsia promedio por grupo tratado durante las 4-24 horas de seguimiento.

45 La Figura 8a muestra el curso temporal de catalepsia tras los diversos tratamientos, según se miden por la prueba de "piano" durante 4-6 horas y demuestra la reducción consistente en el comportamiento cataléptico a todas las concentraciones de AN 168. El análisis estadístico indicó que la reducción fue más significativa ($p < 0,05$) en la dosis baja e intermedia de AN 168 (7 y 14 mg/kg) en comparación con sus respectivas dosis equimolares de perfenazina. A dosis más altas del conjugado químico (14 y 28 mg/kg) los síntomas catalépticos detectados fueron consistentemente menores que aquellos de perfenazina aunque las diferencias fueron menos sustanciales. Se

- 5 asume sin embargo que estas diferencias más pequeñas entre la catalepsia inducida por el fármaco y el conjugado químico a las dosis más altas resultan del procedimiento de valoración. Debido a consideraciones prácticas, la señal cataléptica máxima medida se limitó a 120 segundos. Sin embargo, en realidad, se estima que la señal cataléptica máxima inducida por perfenazina es más alta que la facilitada por el conjugado químico. Esta estimación está adicionalmente respaldada por las diferencias más grandes y sustanciales entre AN-168 y perfenazina que se observaron, a dosis altas, tanto para la catalepsia determinada por la prueba de "pared" como por la puntuación de sedación, que se describe más adelante. Además, los experimentos dirigidos mostraron que la rigidez muscular y la taquípnea se observaron sólo en los animales tratados con las dosis intermedias y altas de perfenazina (10 y 20 mg/kg) y no en los animales tratados con las dosis equimolares respectivas del conjugado químico.
- 10 La Figura 8b muestra el curso temporal de catalepsia tras los diversos tratamientos, según se miden por la prueba de "piano" durante 4-6 horas en experimentos separados llevados a cabo 3 meses después de los experimentos presentados en la Figura 8a. Los datos obtenidos indican que a dosis altas de AN 168 (14 y 28 mg/kg), se indujo catalepsia más alta en comparación con los experimentos de procedimiento. La espectrometría de RMN mostró que tuvo lugar descomposición lenta, debida probablemente a hidrólisis y por lo tanto se afectaron las propiedades únicas del conjugado químico. Estos resultados sugieren que este compuesto se debería almacenar en viales sellados y exponer sólo antes de usar. Debería destacarse a este respecto que el conjugado químico análogo de flufenazina, AN 187, no parece ser higroscópico y por lo tanto no tiende a descomponerse tras un almacenamiento prolongado.
- 15 Las figuras 9a y 9b muestran la catalepsia total inducida por la administración oral de 5,10 y 20 mg/kg de perfenazina y las dosis equimolares respectivas de AN-168 de 7, 14 y 28 mg/kg, observadas durante 4-6 horas. La figura 9b presenta los datos obtenidos en experimentos llevados a cabo 3 meses después de los experimentos presentados en Figura 9a. Aunque la reducción en el comportamiento cataléptico inducida por AN 168 en comparación con perfenazina es menos significativa en los datos presentados en la Figura 9b, está mostrando claramente que la catalepsia inducida por AN 168 es consistentemente más baja que aquella inducida por perfenazina.
- 20 Las figuras 10a y 10b muestran el perfil de catalepsia (Figura 10a) y la catalepsia total (Figura 10b) según se miden por la prueba de "piano" durante 24 horas tras los diversos tratamientos. Los datos obtenidos demuestran que el efecto cataléptico máximo tanto de perfenazina como de AN-168 se logró 5-6 horas tras el tratamiento y que 24 horas tras el tratamiento la catalepsia se redujo en todos los grupos de tratamiento. Estos datos están en línea con el curso temporal clínico observado por perfenazina administrada a pacientes (una vez diaria).
- 25 La Figura 11 muestra la catalepsia total tras los diversos tratamientos, como se mide por la prueba de "pared" y demuestra claramente que los síntomas catalépticos fueron casi abolidos tras el tratamiento con todas las dosis probadas de AN 168.
- 30 El efecto de la administración oral del conjugado químico AN 168 sobre el comportamiento animal se midió evaluando el grado de sedación y movilidad animal, 4-6 horas después de tratamientos orales con diversas concentraciones de AN 168 y perfenazina, usando una puntuación de 0 a 3, como se describe más adelante. Las puntuaciones obtenidas se resumen en la Tabla 3 más adelante y demuestran el efecto reducido del conjugado químico en comportamiento animal en comparación con perfenazina.
- 35

Tabla 3

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Puntuación de sedación
perfenazina	20	3
perfenazina	10	2
perfenazina	5	1
perfenazina	2,5	0
AN 168	28	2
AN 168	14	1
AN 168	7	0
AN 168	3,5	0
control		0

Como un marcador para la actividad dopaminérgica de los compuestos administrados oralmente, se midieron los niveles de prolactina en sangre 0, 90 y 180 minutos tras los diversos tratamientos descritos anteriormente. Los datos obtenidos se resumen en la Figura 12 y demuestran los perfiles similares del nivel de prolactina en sangre en los animales tratados con perfenazina y AN 168. Los niveles de prolactina en sangre, en cada punto temporal, en los animales tratados con AN 168 fueron similares a aquellos de perfenazina, a dosis bajas e intermedias, mientras que a una dosis más alta el nivel de prolactina en sangre en los animales tratados con AN 168 era mucho mayor en comparación con animales tratados con perfenazina.

Estos resultados demuestran que AN 168 es altamente eficiente y por lo tanto relevante para uso clínico, a dosis bajas (por ejemplo, 3,5 y 7 mg/kg), cuando se administra oralmente. Se muestra adicionalmente en el presente documento que a estas dosis bajas, AN 168 causó síntomas extrapiramidales mínimos y por lo tanto casi desprovistos de actividad antagonista en la ruta nigro-estriatal.

Actividad antiproliferativa: La actividad antiproliferativa de perfenazina, los conjugados químicos de la misma AN 167, AN 168 y AN 177, flufenazina, los conjugados químicos de la misma AN 179, AN 180, AN 181 y AN 187 y de ácido butírico (BA), ácido 4-fenilbutírico (PBA) y GABA se midió por las pruebas de proliferación llevadas a cabo (usualmente en más de un experimento independiente) con células normales y transformadas. Las células se subcultivaron y los compuestos probados se añadieron a esto en concentraciones crecientes. Los valores de CI₅₀ se determinaron por regresión lineal del porcentaje de supervivencia de las células. Los valores de CI₅₀ obtenidos por los compuestos probados con las diversas líneas celulares probadas se resumen en la Tabla 4 y en la Tabla 5 más adelante.

Tabla 4

Células Fármacos	B16 MDR	B16	HT-29	PC-3	3T3	Fibroblastos de rata normales
Perfenazina	18,45 ± 5,4 n = 3*	12,5 ± 1,29 n = 4	8,85 ± 2,7 n = 4	23,1 ± 2,3 n = 2	26,6	
BA	8000 ± 546 n = 3	1300 ± 113 n = 3	7170 ± 2034 n = 4			5540
GABA	> 20000 n = 3	> 20000 n = 3	> 20000 n = 3			> 20000
AN-167	41,5 ± 1,8 n = 3	17,3 ± 4,5 n = 5	13,3 ± 2,4 n = 4	49,1	21,7	31,64
AN-168	23 ± 16 n = 3	26,8 ± 1,8 n = 3	23,1 ± 9 n = 3	45,5	25	45,8
AN-130	58	36,5 ± 8,1 n = 5	17,27 ± 3,07 n = 5	52,9 ± 28,7 n = 3		41,9 ± 16,8 n = 2
AN-177			25,8		24,6	
AN-178			11,5		18,6	
* Número de experimentos independientes.						

Tabla 5

Células Fármacos	HL60	HL 60 MX2 (MDR)	MES SA	MES SA DX5 (MDR)	JURKAT	U-937
Perfenazina	19,76	22,55	15,31	16,24	11,34	21,30
AN 167	17,29	19,86	17,23	20,90	11,40	23,28
AN 168	15,14	18,36	18,20	17,16	11,35	14,23
AN 177	15,13	17,59				

(continuación)

Células	HL60	HL 60 MX2 (MDR)	MES SA	MES SA DX5 (MDR)	JURKAT	U-937
Fármacos						
Flufenazina	20,94	21,77	14,79	13,74	14,30	21,51
AN 179	18,25	21,42				
AN 180	19,00	18,76	11,96	12,74	10,43	12,25
AN 181	14,79	16,69				
AN-187	18,57	17,10	14,37	9,47	10,31	18,86

Estos resultados muestran que aunque GABA, por sí solo, falla en demostrar una actividad antiproliferativa significativa ($CI_{50} > 20$ mM), y de BA (intervalo de CI_{50} de 1-8 mM) y PBA (intervalo de CI_{50} de 2-12 mM, datos no mostrados) mostró actividad antiproliferativa apreciable pero relativamente baja, sus respectivos conjugados de perfenazina y flufenazina tuvieron actividad significativamente alta (CI_{50} intervalo de 8-60 μ M).

Estos resultados demuestran adicionalmente la actividad antiproliferativa versátil de los conjugados químicos de la presente invención en una amplia diversidad de líneas celulares, incluyendo células resistentes a multifármaco (MDR), tales como HL 60 MX2, subclón B16 MDR y MES SA DX5.

La Figura 13 muestra los resultados obtenidos en un experimento representativo donde se midió el efecto de perfenazina y los conjugados químicos de la misma sobre la proliferación de células de melanoma B16 murino. Se encontró que referencia AN 167 y AN 168 eran relativamente activos como fármacos antiproliferativos.

El efecto citotóxico de perfenazina, GABA y el conjugado químico de los mismos AN 168, se midió y comparó con el efecto citotóxico de los fármacos quimioterapéuticos conocidos Cisplatina y Vincristina, sobre las células de glioma de rata C6. Las células se subcultivaron y los compuestos probados se añadieron en concentraciones crecientes de hasta 100 mM. La viabilidad de las células tras estos tratamientos (24 horas) se determinó por el procedimiento de rojo neutro descrito anteriormente y los resultados se presentan en la Figura 14. Los valores de CI_{50} de perfenazina y AN 168 se determinaron tal como se describe anteriormente y se encontró que son 19,2 μ M y 24,2 μ M, respectivamente.

Como se muestra en la Figura 14, los datos obtenidos de la actividad antiproliferativa demostraron la actividad antiproliferativa superior de los conjugados químicos de la presente invención, en comparación con fármacos quimioterapéuticos conocidos representativos. Las células de glioma C6 se conocen como células MDR, y en efecto, se encontró que la actividad antiproliferativa de fármacos quimioterapéuticos conocidos es sustancialmente baja. En contraste, se encontró que AN 168 ejerce una actividad antiproliferativa alta, causando muerte celular sustancial a concentraciones relativamente bajas (aproximadamente 20 μ M).

La Figura 15 presenta los datos obtenidos tras el tratamiento de células de linfoma T Jurkat con concentraciones crecientes de perfenazina y se midieron dosis equimolares de su conjugado químico AN 168 coadministrando estos compuestos con concentraciones variantes de fármacos quimioterapéuticos conocidos tales como Vincristina, Cisplatina y Dexametasona. Los resultados se presentan en términos de viabilidad celular, determinada por el procedimiento de azul de alamar y demuestran el efecto citotóxico superior de AN 168 y perfenazina, en comparación con dexametasona. Los valores de CI_{50} de perfenazina y AN 168 fueron 16 μ M y 19 μ M, respectivamente.

Se debería destacar adicionalmente que aunque perfenazina, flufenazina y sus conjugados químicos ejercen actividad antiproliferativa a aproximadamente la misma medida, el uso clínico de los conjugados químicos de la presente invención es altamente superior sobre el uso clínico de los fármacos neurolépticos, ya que la administración de los conjugados químicos está casi completamente desprovista de efectos secundarios adversos.

Efecto quimiosensibilizante por co-administración de perfenazina o AN 168 y fármacos quimioterapéuticos: Los efectos quimiosensibilizantes de 5, 10 y 15 μ M de perfenazina y dosis equimolares de su conjugado químico 168 se midieron coadministrando estos compuestos con concentraciones variantes de fármacos quimioterapéuticos conocidos tales como Vincristina, Cisplatina y Dexametasona. La viabilidad celular y/o la fragmentación del ADN, determinadas como se describe en el presente documento en la sección de procedimientos se compararon siguiendo estos tratamientos combinados con los resultados obtenidos siguiendo tratamientos con el fármaco quimioterapéutico solo.

La figura 16 presenta los datos obtenidos tras tratamiento de 24 horas de línea celular de glioma de rata C6 (células MDR) con Vincistina (30 μM), perfenazina, AN 168 y combinaciones de los mismos. Los resultados demuestran claramente el efecto quimiosensibilizante de AN 168, que, cuando se co-administra con el fármaco quimioterapéutico, potencia sustancialmente el efecto citotóxico del mismo, incluso a concentraciones bajas de conjugado de química (por ejemplo, de 5 μM), en comparación con la actividad citotóxica del fármaco cuando se administra solo.

La Figura 17 presenta los datos obtenidos tras el tratamiento de la línea celular de glioma de rata C6 (MDR) con Cisplatina a diversas concentraciones entre 5 μM y 50 μM y con una combinación de Cisplatina y 10 y 15 μM de AN 168. Los resultados se presentan en términos de viabilidad celular, medida por el procedimiento de rojo neutro y demuestran claramente que mientras que las células eran completamente resistentes a Cisplatina a todas las concentraciones probadas, el tratamiento combinado de Cisplatina y AN 168 volvió a las células susceptibles al fármaco quimioterapéutico.

La figura 18 muestra los datos de fragmentación de ADN obtenidos tras el tratamiento de células de glioma C6 de rata con Cisplatina (30 μM), perfenazina (25 y 50 μM), AN 168 (25, 50 μM), una combinación de Cisplatina (30 μM) y AN 168 (50 μM), comparada con células no tratadas. La fragmentación de ADN se determinó por el procedimiento citométrico de flujo de yoduro de propidio descrito anteriormente. Los resultados demuestran que mientras que la Cisplatina solo no tiene ningún efecto de fragmentación de ADN, perfenazina y AN 168 indujeron ambos espectacularmente un incremento en fragmentación de ADN. Estos resultados sugieren que el efecto quimiosensibilizante de los conjugados químicos de la presente invención resulta de esta actividad de los mismos.

Toxicidad: La toxicidad in vitro de perfenazina, AN 167 y AN 168 se midió en cultivos primarios de células neuronales y en una mezcla de células neuronales y gliales, obtenida a partir de cerebros de ratones neonatales. Los cultivos celulares se trataron con los compuestos probados durante 24 horas y se determinó su viabilidad a partir de entonces por la prueba colorimétrica de rojo neutro. Los valores de CI_{50} obtenidos en estas pruebas demuestran que la perfenazina y AN 167 tuvieron toxicidad similar mientras que AN 168 presentó una toxicidad significativamente más baja para células cerebrales normales, como se muestra en la Figura 19. La toxicidad in vitro de perfenazina y AN 168 se midió adicionalmente en miocitos de ratas cultivados. La Figura 20 presenta la viabilidad celular, determinada según se describe anteriormente, tras el tratamiento con diversas concentraciones de perfenazina o AN 168. Los datos obtenidos muestran que AN 168 no causó descenso alguno en viabilidad celular a todas las concentraciones, mientras que la perfenazina causó una disminución del 20 % en viabilidad celular a concentraciones altas.

La toxicidad in vivo de perfenazina y referencia AN 167 se evaluó tras la administración intraperitoneal de una dosis individual de los mismos a ratones. Los valores de DL_{50} , determinados dos semanas tras el tratamiento, fueron 109 mg/kg para perfenazina y 120 mg/kg para referencia AN 167. Además de la toxicidad más baja de referencia AN 167 comparada con perfenazina (per), la mortalidad causada por el compuesto conjugado se retrasó, como se muestra en la Figura 21.

Los resultados del experimento definido anteriormente demuestran la eficacia alta y ventajosa del conjugado químico novedoso de la presente invención en ejercer actividad antipsicótica, actividad antiproliferativa y actividad quimiosensibilizadora, con toxicidad minimizada para células normales y efectos secundarios minimizados.

Referencias citadas por cifras

(Se citan en el texto referencias adicionales)

1. Lloyd KG, Morselli PL, Depoortere H, Fournier V, Zivkovic B, Scatton B, C Broekkamp, Worms P, Bartholini G. The potential use of GABA agonists in psychiatric disorders: evidence from studies with progabide in animal models and clinical trials. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1983, 18, 957-66.
2. Capasso A, Biondi A, Palagiano F, Bonina FP, Montenegro L, de Caprariis P, Pistorio E, Sorrentino L. Anticonvulsive activity of a new GABA mimetic drug. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 1997, 7, 57-63.
3. Toth I. A novel chemical approach to drug delivery: lipid amino conjugates. *J. Drug Target.* 1994, 2, 217-39.
4. Nordenberg J, Fenig E, Landau M, Weizman R, Weizman A. Effects of psychotropic drugs on cell proliferation and differentiation. *Biochem. Pharmacol.* 1999 58, 1229-369.
5. a) Prasad KN. Butyric acid: A small fatty acid with diverse biological functions. *Life Sci* 1980, 27, 1351-1358.
b) Kruh J. Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol. Cell Biochem.* 1982, 42, 65-82.
6. Wolfe A. Transcriptional control. Sinful repression. *Nature* 1997, 387, 16-17.

7. Shalitin N, Friedman M, Schlesinger H, Barhum Y, Levy MJ, Schaper W, Kessler-Icekson G. The effect of angiotensin II on myosin heavy chain expression in cultured myocardial cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 1996, 32, 573-8.
- 5 8. Kopf-Maier P, Kolon B. An organoid culture assay (OCA) for determining the drug sensitivity of human tumor. *Int. J. Cancer* 1992, 51, 99-107.
9. Mc Cafferty TA, y cols. *In Vitro Cellular Develop. Biol.*, 1988, 24, 247.
10. Worms P, Kan JP, Wermuth CG, Biziere K. Dopamine-like activities of an aminopyridazine derivative, CM 30366: a behavioural study. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1986, 334, 246-5.
11. a) Pieron C., Effect of centrally acting drugs on serum prolactin levels in rhesus monkeys. *Neuroendocrinology*, 1978, 27, 136-47; b) Rubin RT. Prolactin and schizophrenia in: *Psychopharmacology The Third Generation of Progress*. Meitzer HI. (Ed) Nueva York, Raven Press 1987, 803-8.
12. a) Yale LH, Sowinski FA, Bernstaein J. Trifluoromethylphenothiazines. US 3.227.708, 4 de enero, 1966; b) Buus JLM, Lassen N. Phenothiazine derivatives, compositions thereof and methods of preparation thereof. US 3.966.930, 29 de junio, 1976.
- 15 13. Nicolletti I., Migliorato G., Pagliacci M.C., Grimsani F. y Riccardi C: A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium-iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, 139, 271-79 1991.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un conjugado químico que comprende un primer resto químico unido covalentemente a un segundo resto químico, en el que dicho primer resto químico es un residuo de fármaco antipsicótico y adicionalmente en el que dicho segundo resto químico es un residuo de ácido orgánico, en el que dicho fármaco antipsicótico es perfenazina y dicho ácido orgánico es GABA y en el que dicho GABA está unido a dicha perfenazina por medio de un enlace éster entre un grupo carboxílico de dicho GABA y un grupo hidroxilo de dicha perfenazina.
2. Una composición farmacéutica que comprende, como un ingrediente activo, el conjugado químico de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, que está envasada en un material de envasado e identificada en impreso, o en dicho material de envasado, para su uso en el tratamiento de un trastorno psicótico o enfermedad psicótica.
- 15 4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, en la que dicho trastorno psicótico o enfermedad psicótica está seleccionado del grupo que consiste en esquizofrenia, paranoia, psicosis infantil, enfermedad de Huntington y síndrome de Gilles de la Tourette.
5. El conjugado químico de la reivindicación 1, identificado para su uso en tratar o evitar un trastorno psicótico o enfermedad psicótica en un sujeto.
- 20 6. El conjugado químico de la reivindicación 5, en el que dicho trastorno psicótico o enfermedad psicótica está seleccionado del grupo que consiste en esquizofrenia, paranoia, psicosis infantil, enfermedad de Huntington y síndrome de Gilles de la Tourette.
7. Un procedimiento para sintetizar el conjugado químico de la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento:
hacer reaccionar dicho GABA y dicha perfenazina, para obtener un residuo de GABA, unido covalentemente a un residuo de dicha perfenazina por medio de un enlace éster.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, que comprende además:
25 proteger un grupo amino de GABA con un grupo protector, antes de dicha reacción, para obtener por dicha reacción un residuo amino-protegido de dicho GABA unido covalentemente a dicho residuo de dicha perfenazina; y eliminar dicho grupo protector después de obtener dicho residuo amino-protegido de dicho GABA covalentemente unido a dicho residuo de dicha perfenazina.

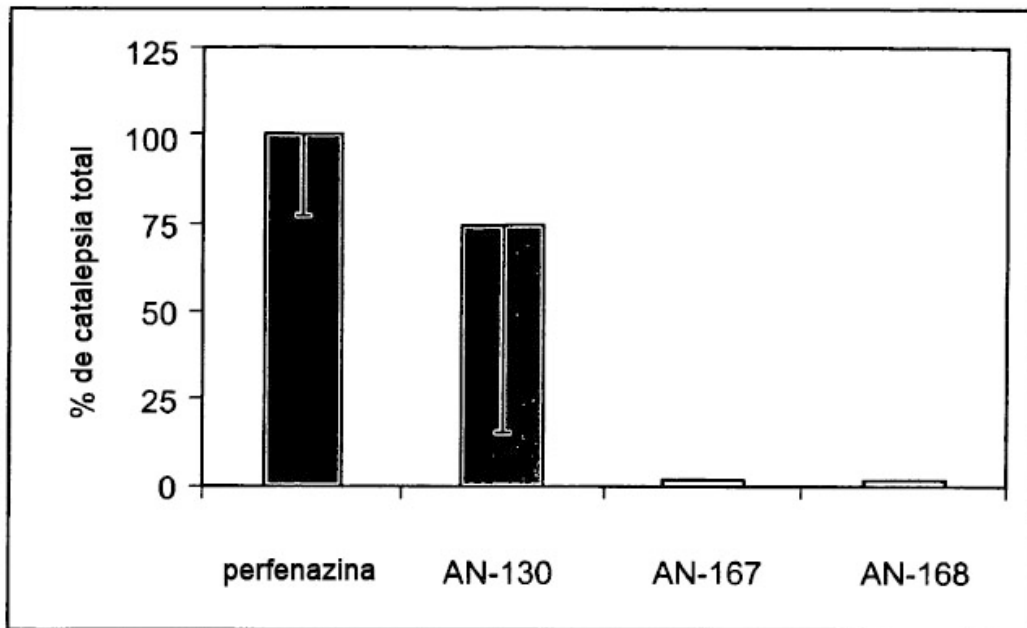


Fig. 1a

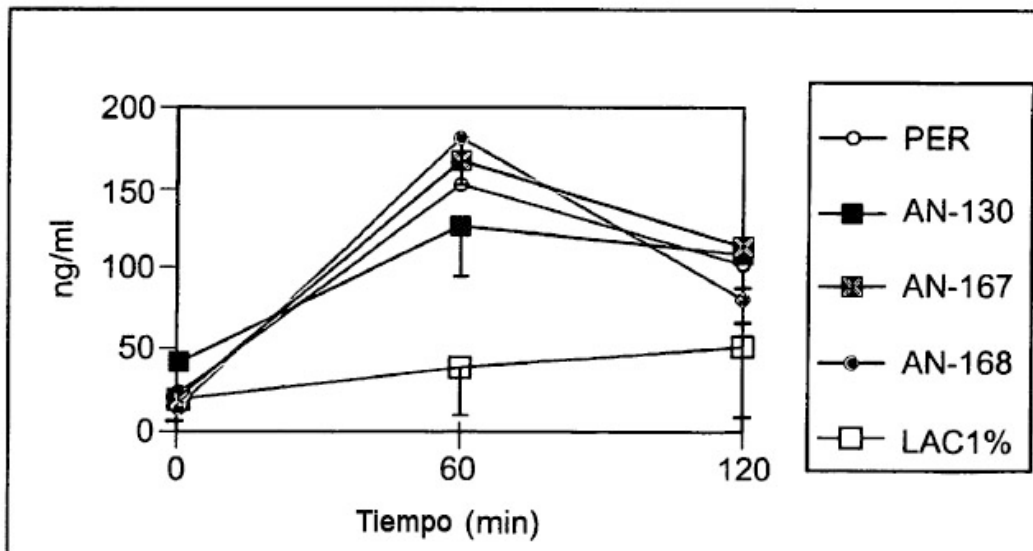


Fig. 1b

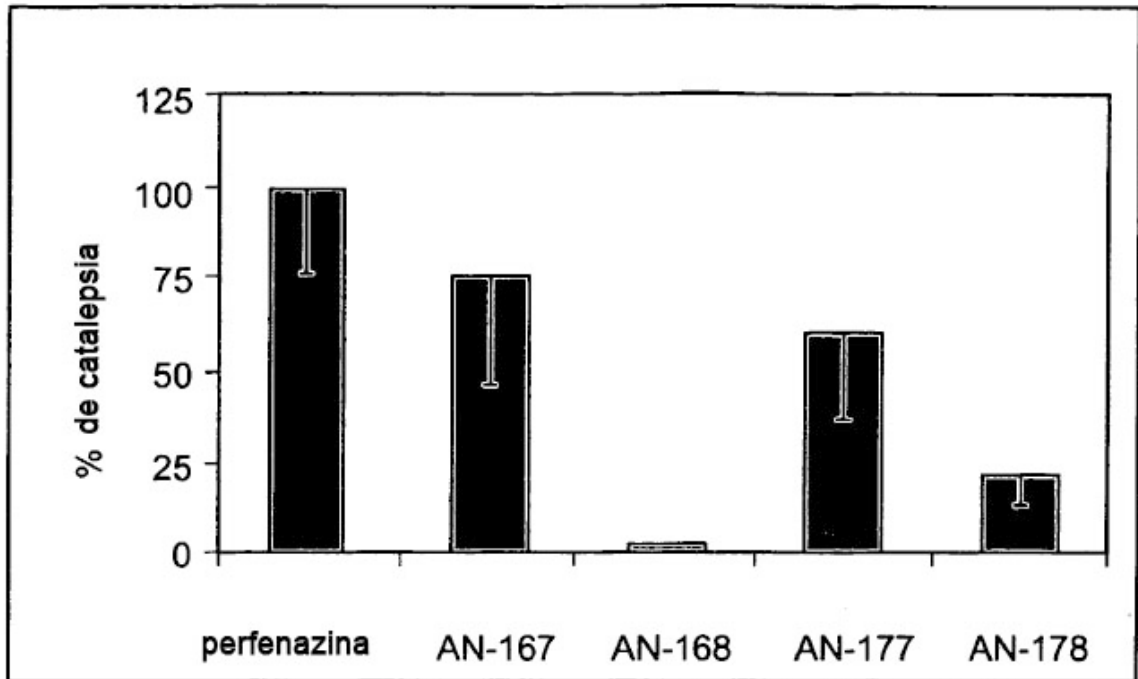


Fig. 2

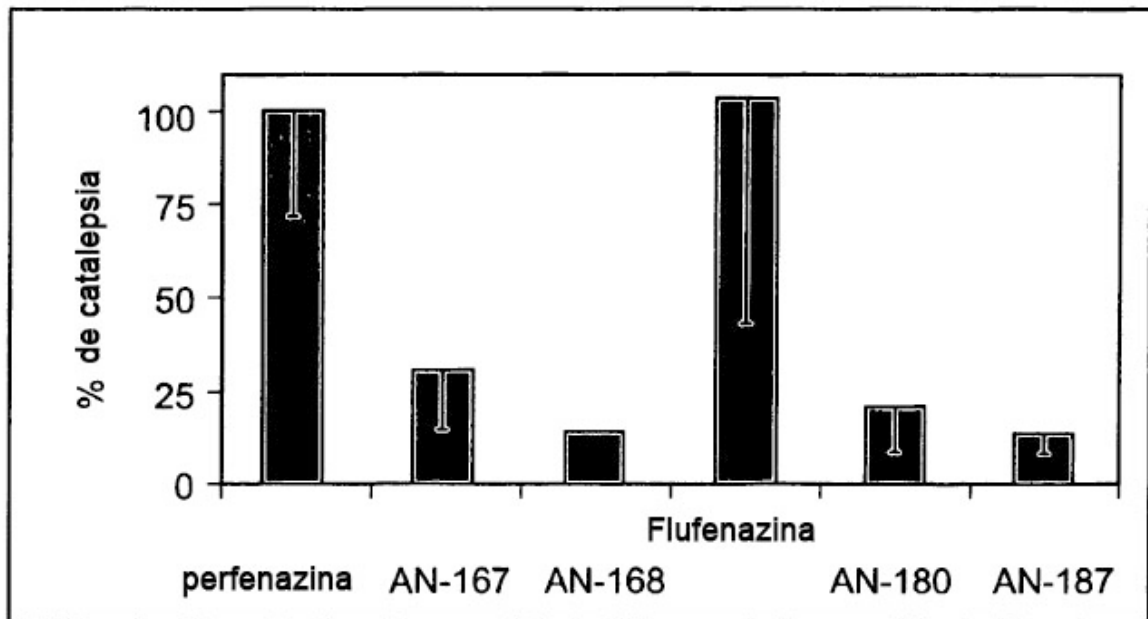


Fig. 3

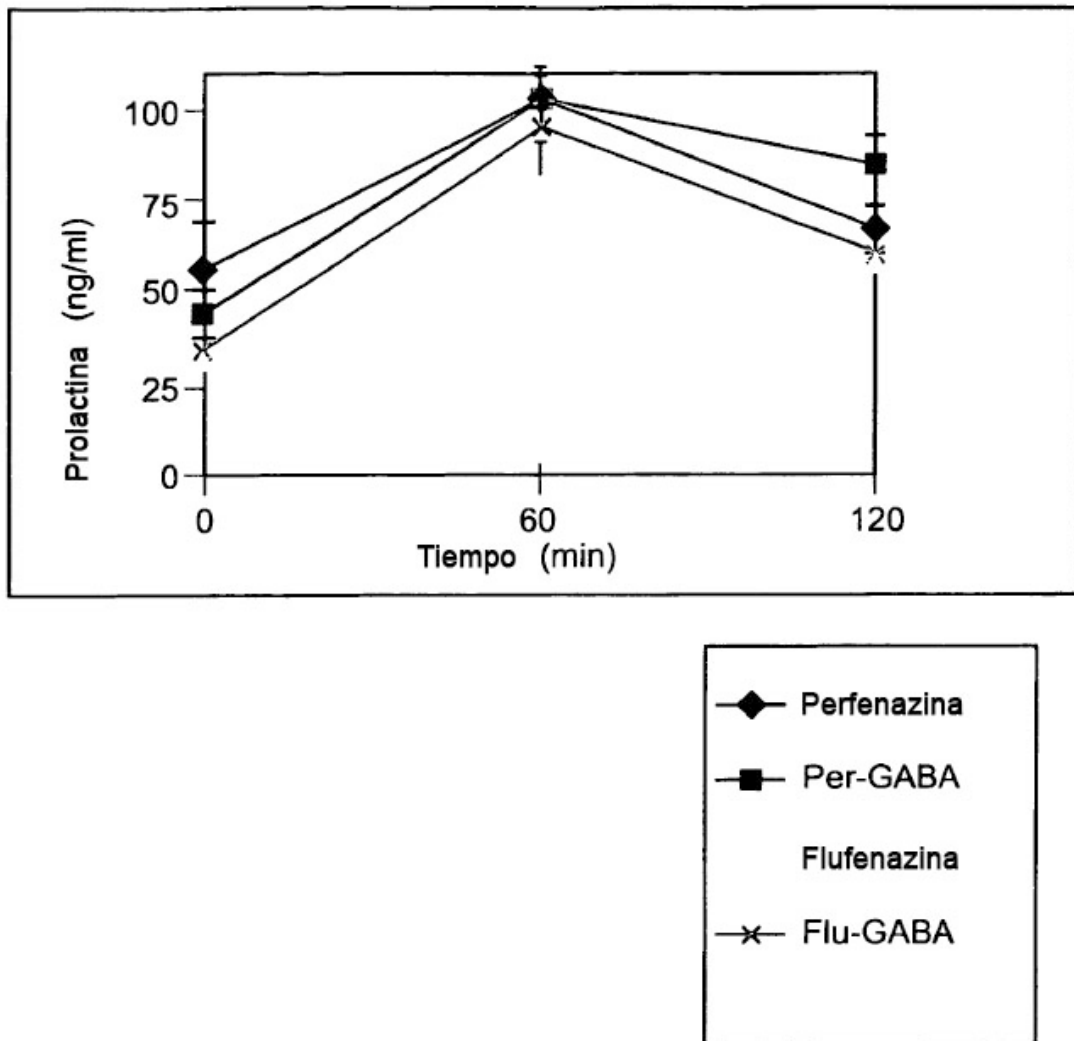


Fig. 3b

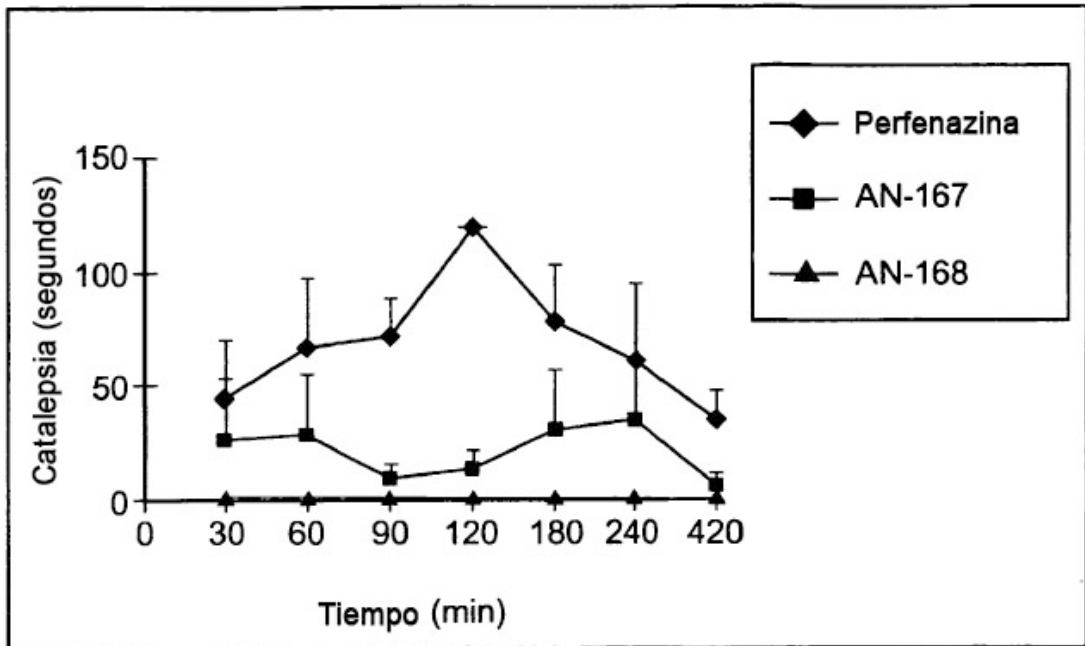


Fig. 4a

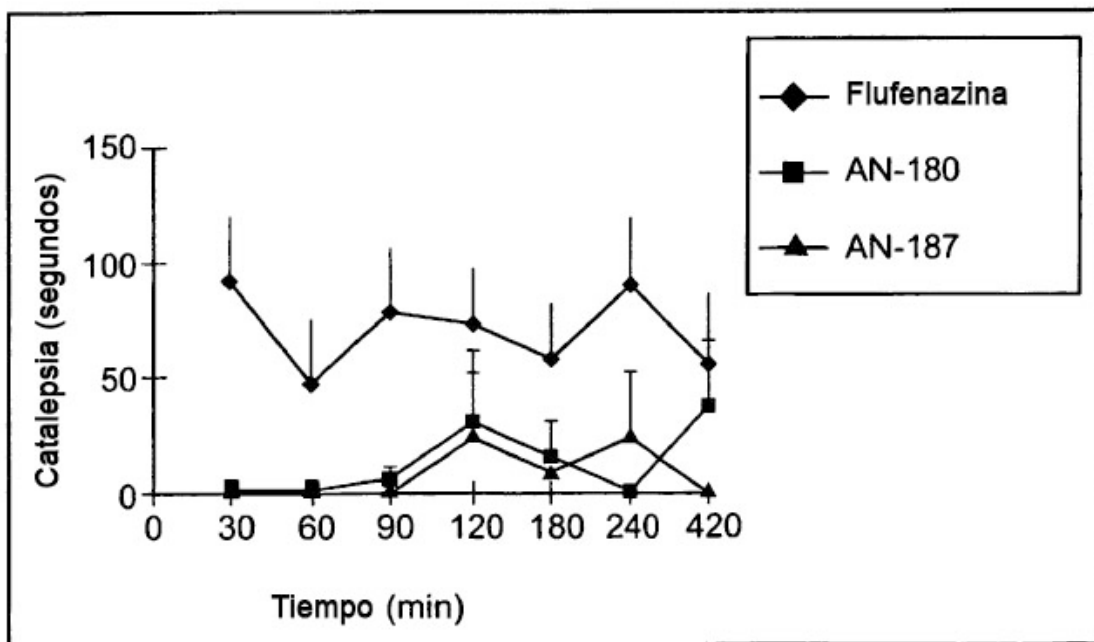


Figura 4b

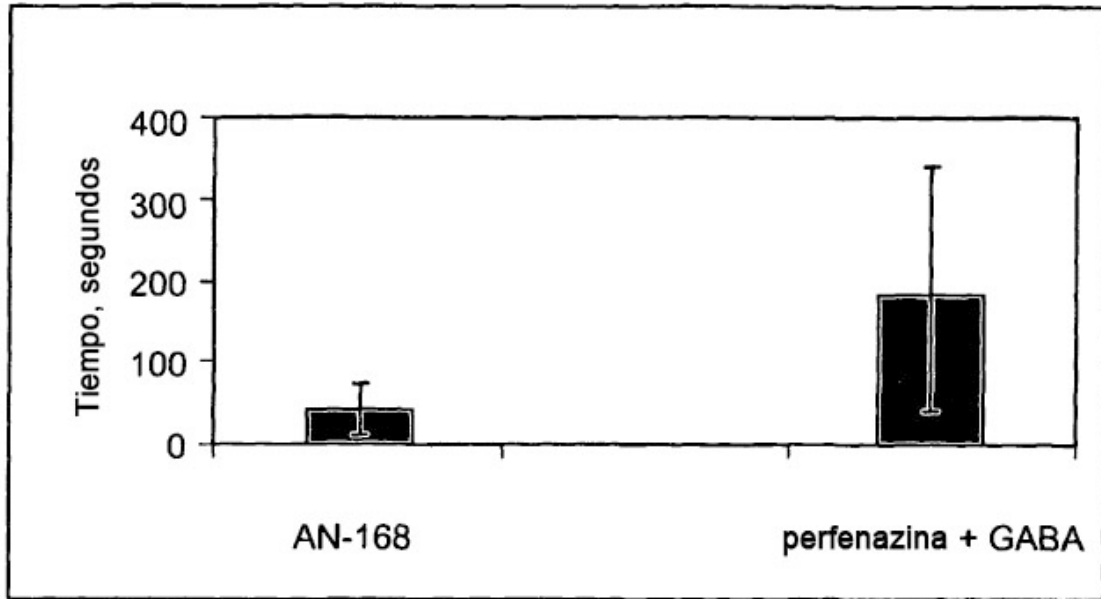


Fig. 5a

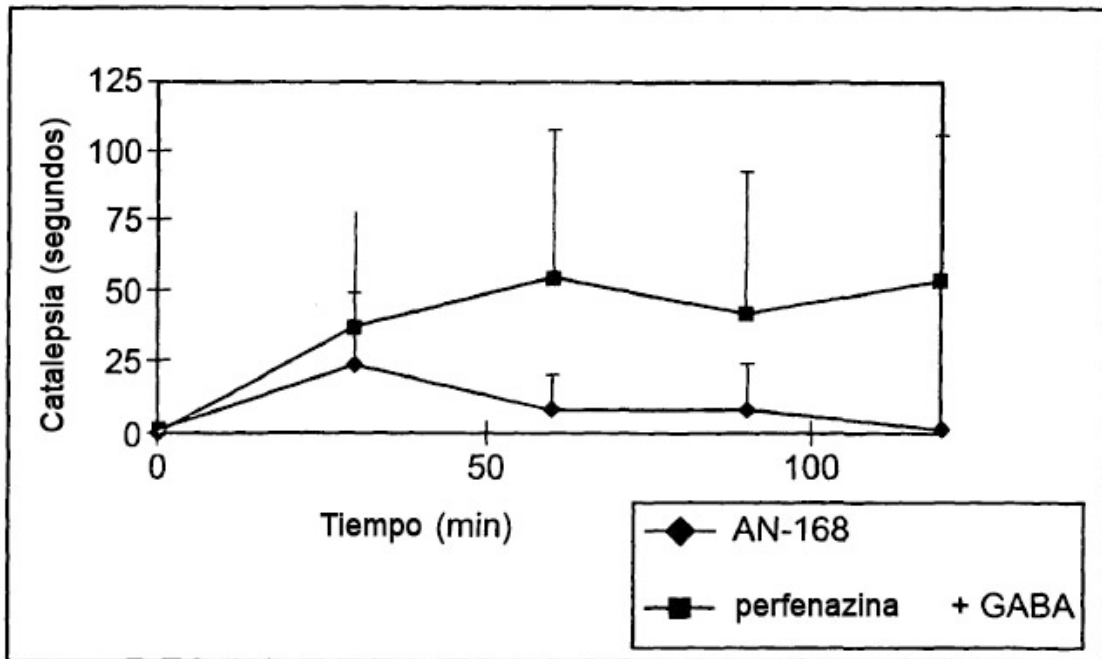


Fig. 5b

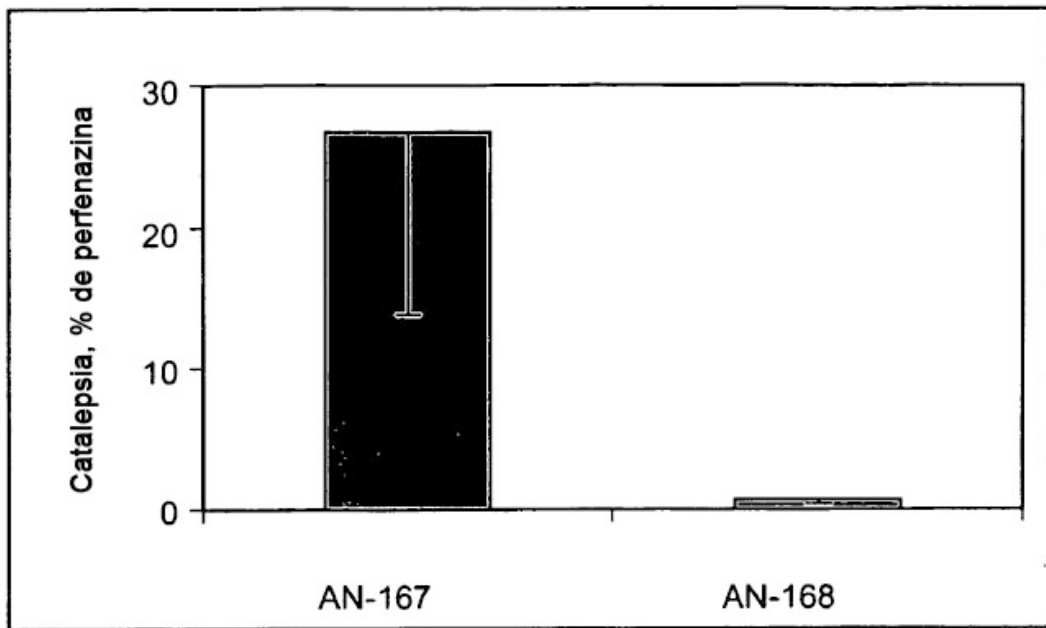


Fig. 6

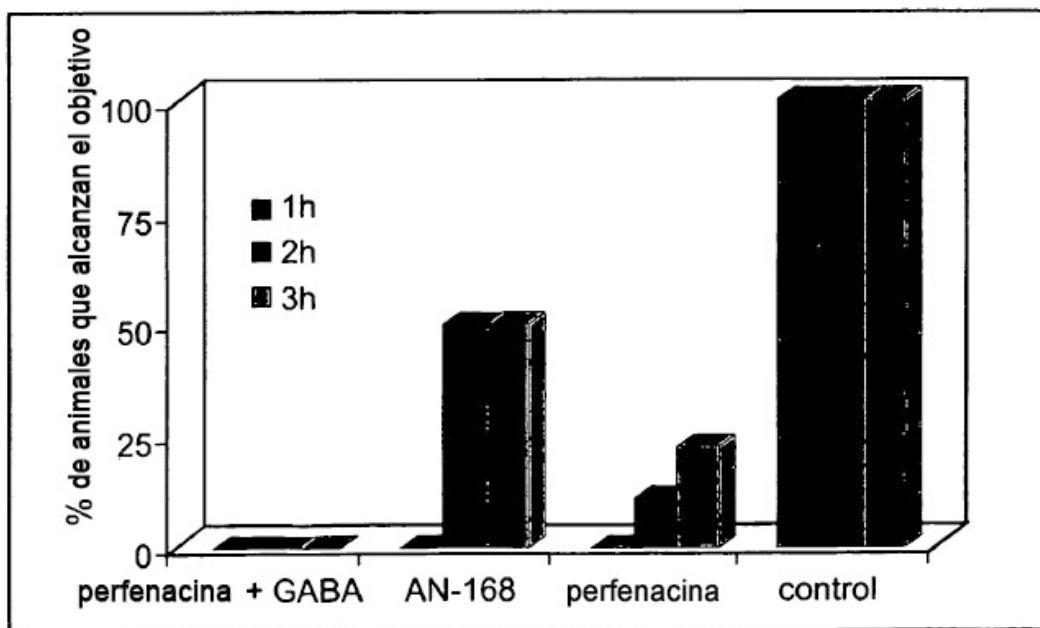


Fig. 7a

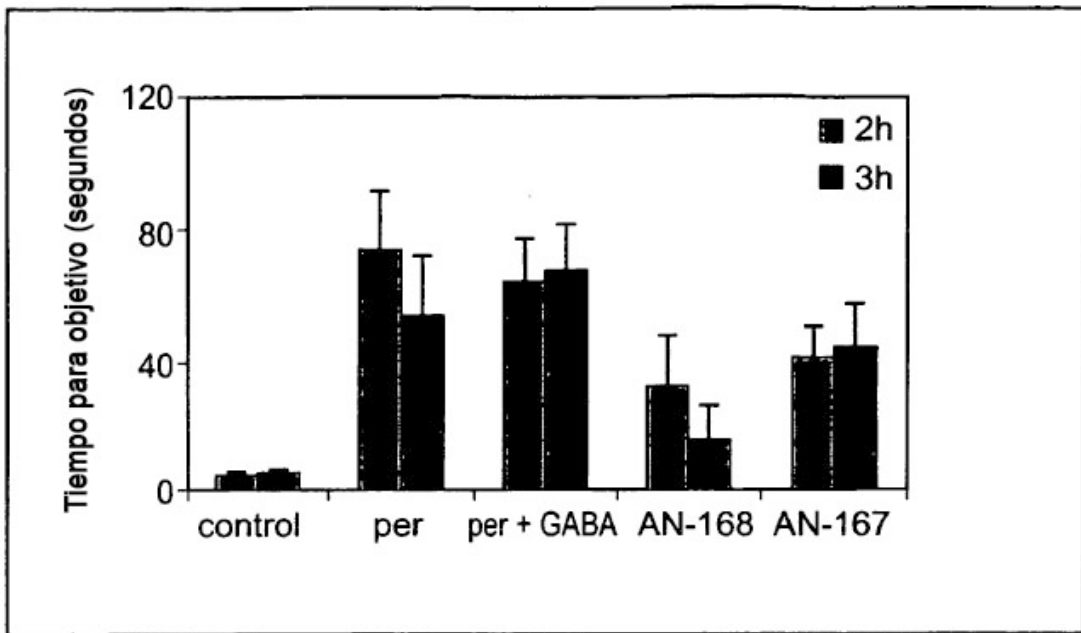


Fig. 7b

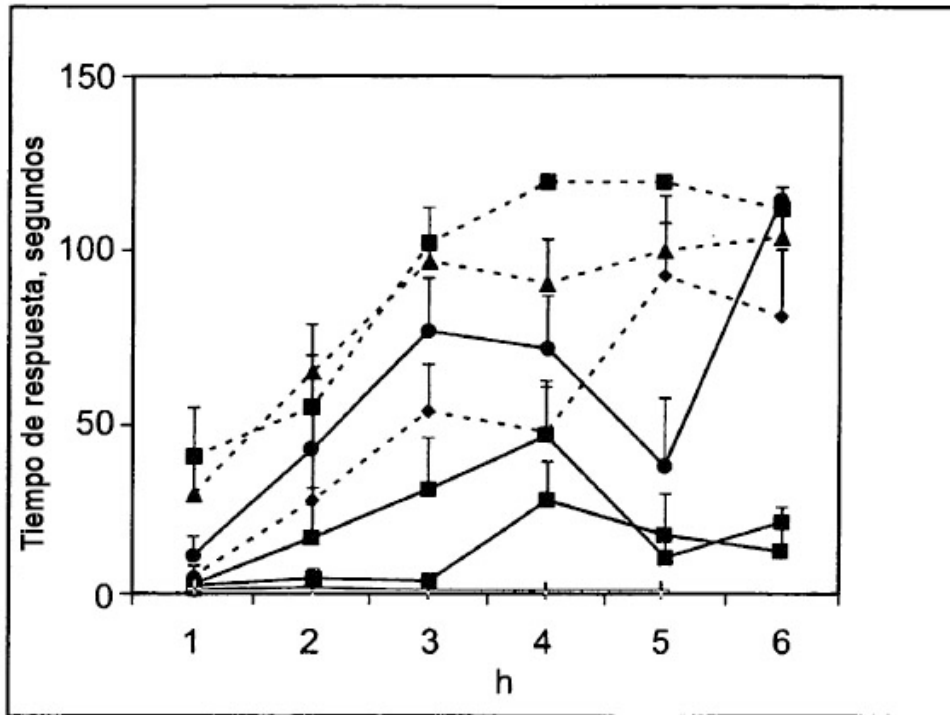


Fig. 8a

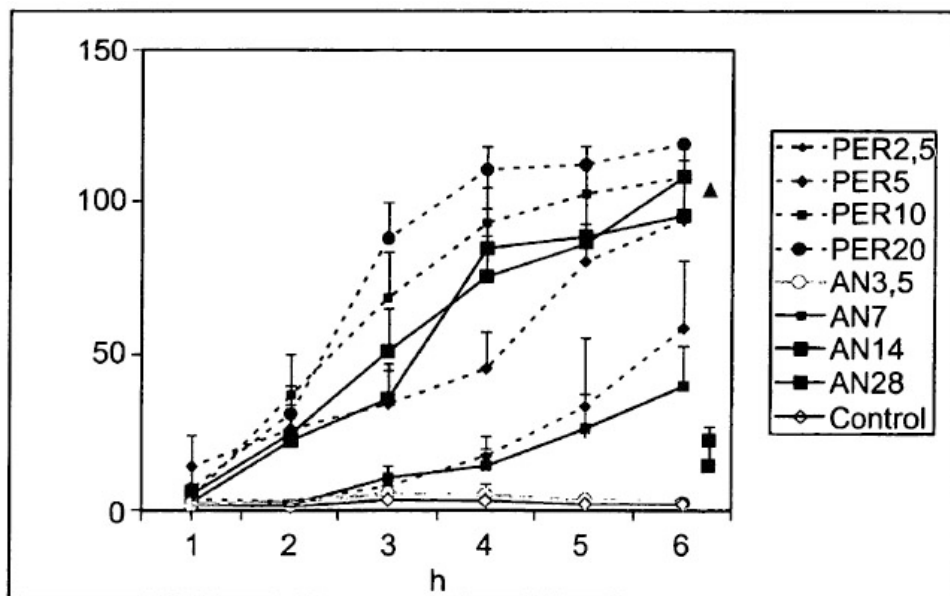


Fig. 8b

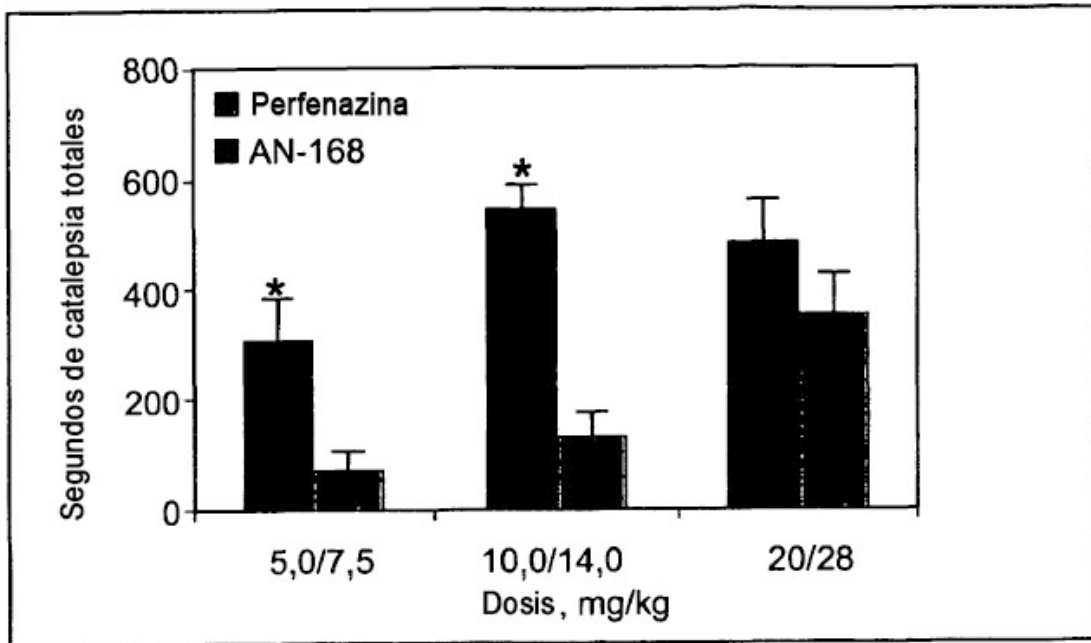


Fig. 9a

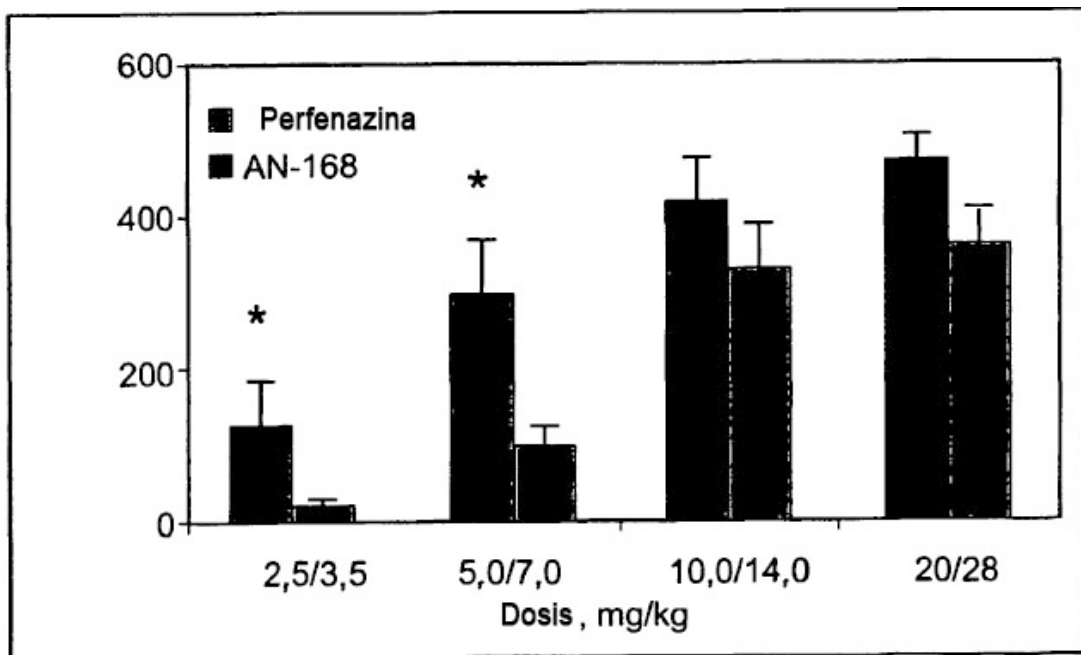


Fig. 9b

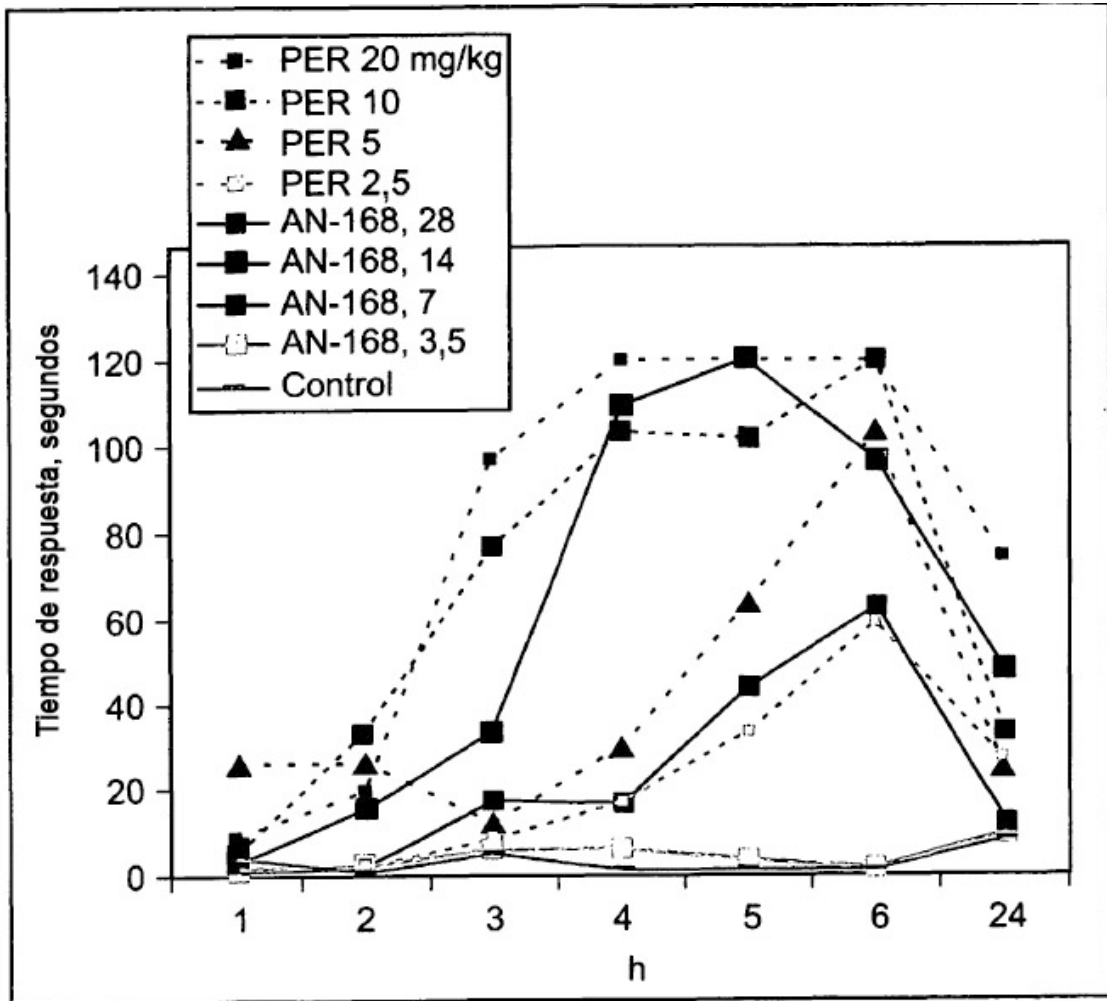


Fig. 10a

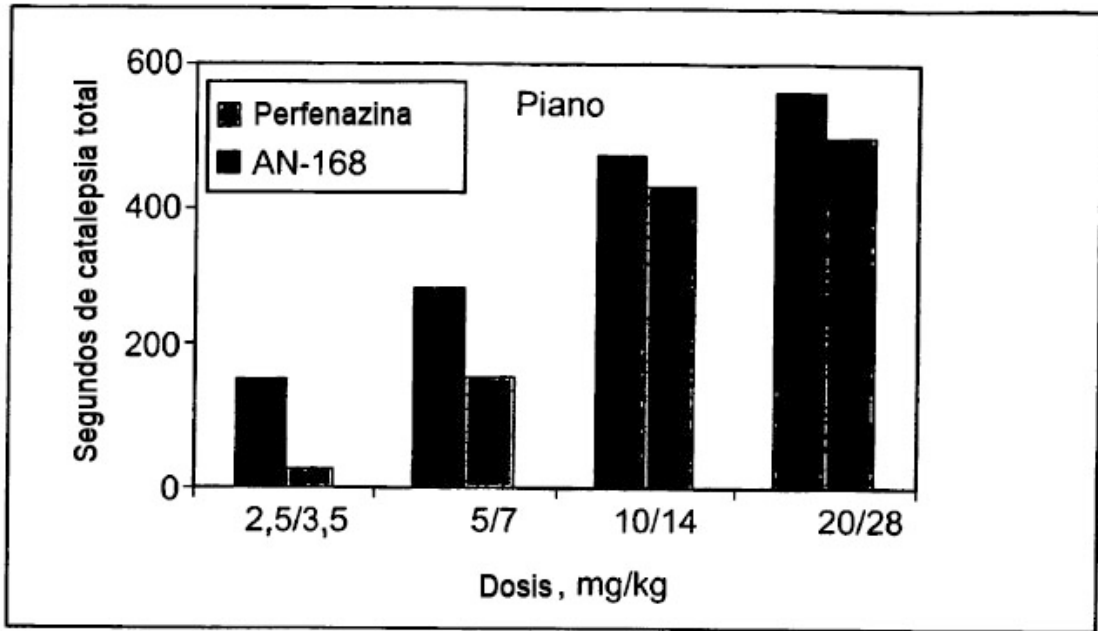


Fig. 10b

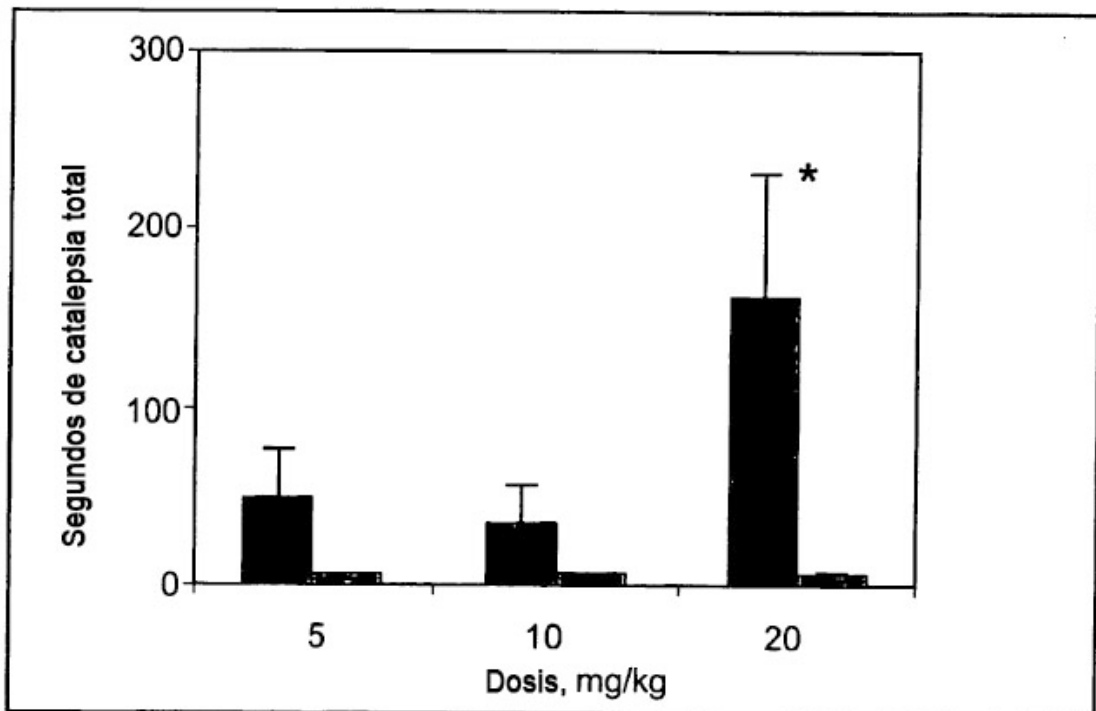


Fig. 11

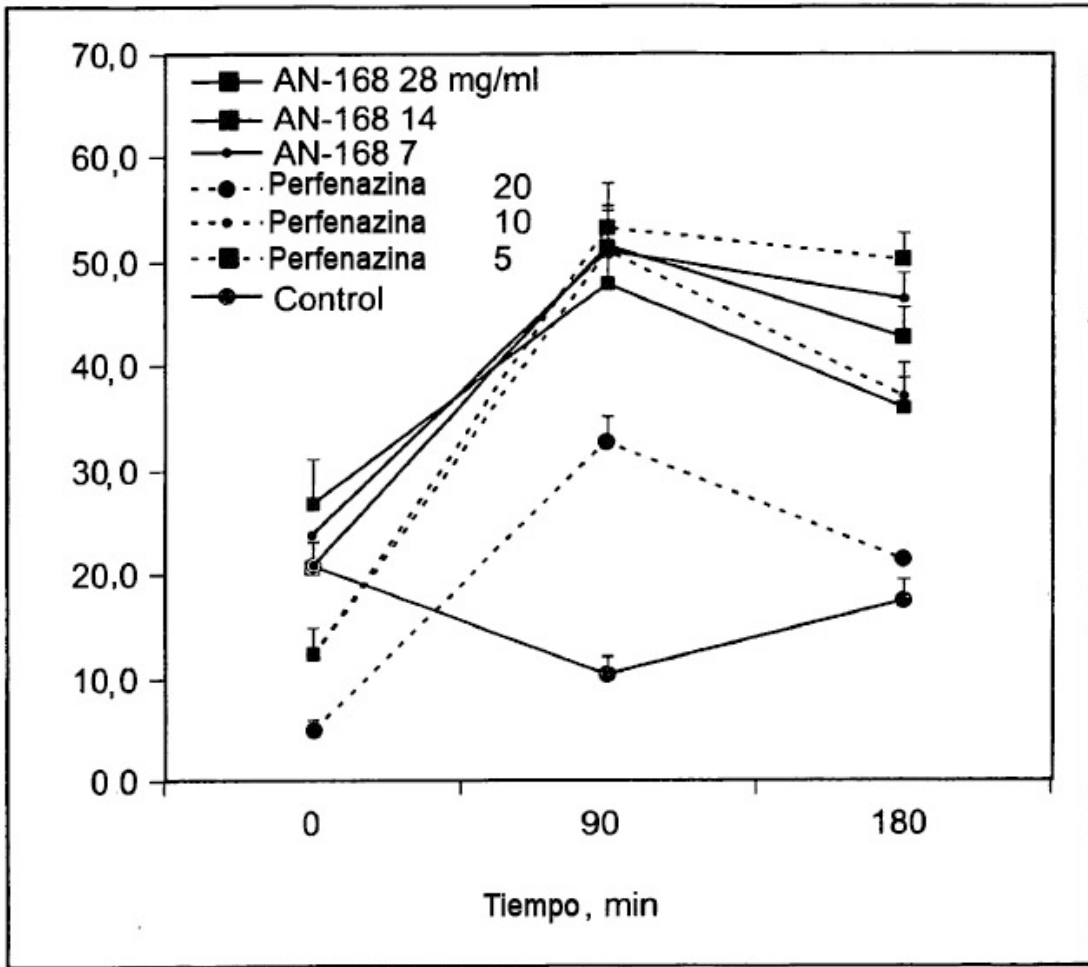


Fig. 12

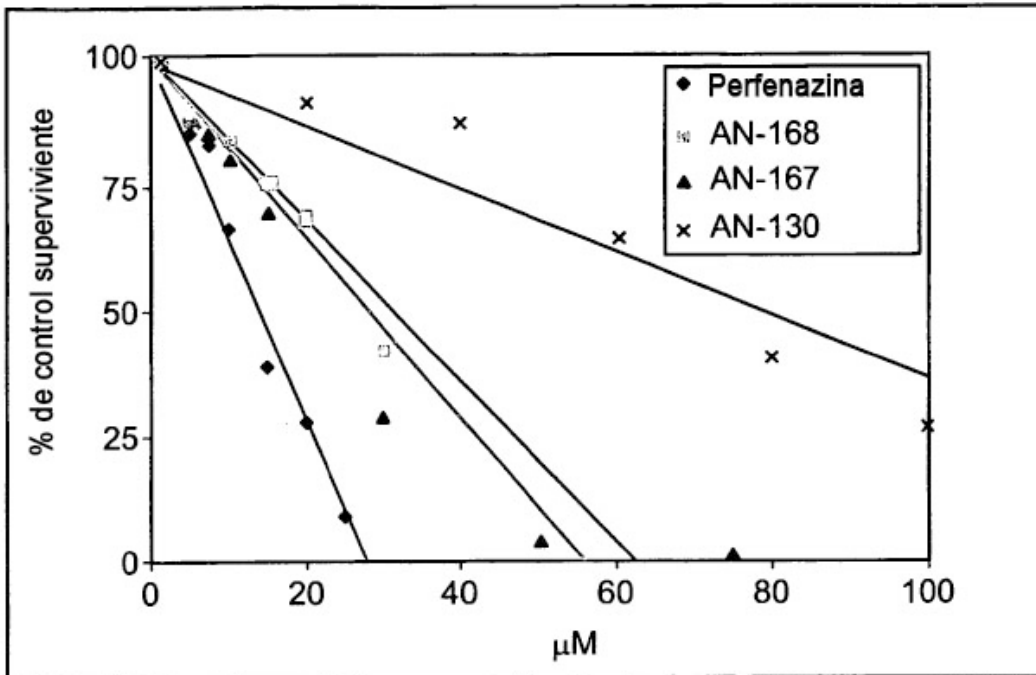


Fig. 13

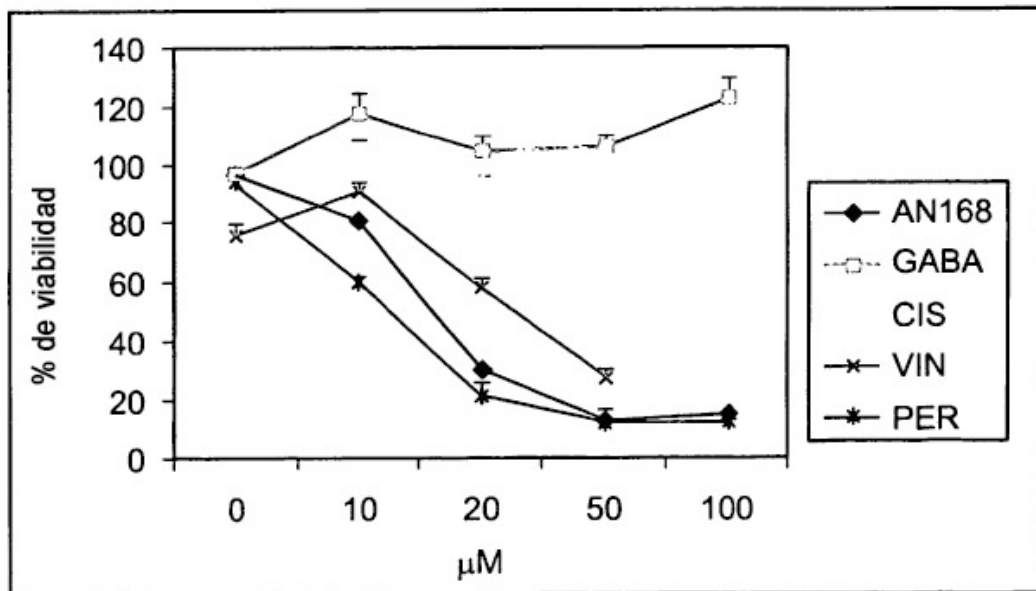


Fig. 14

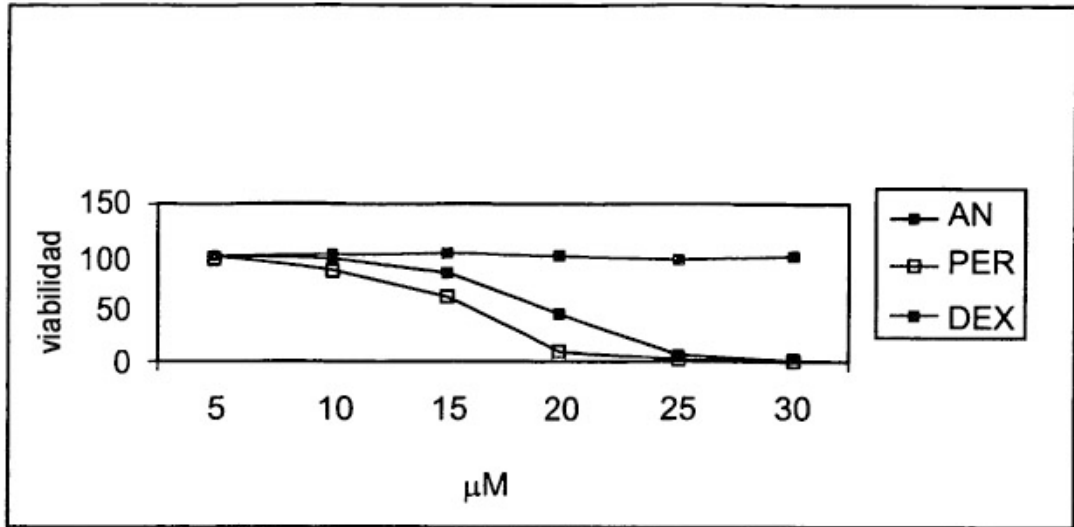


Fig. 15

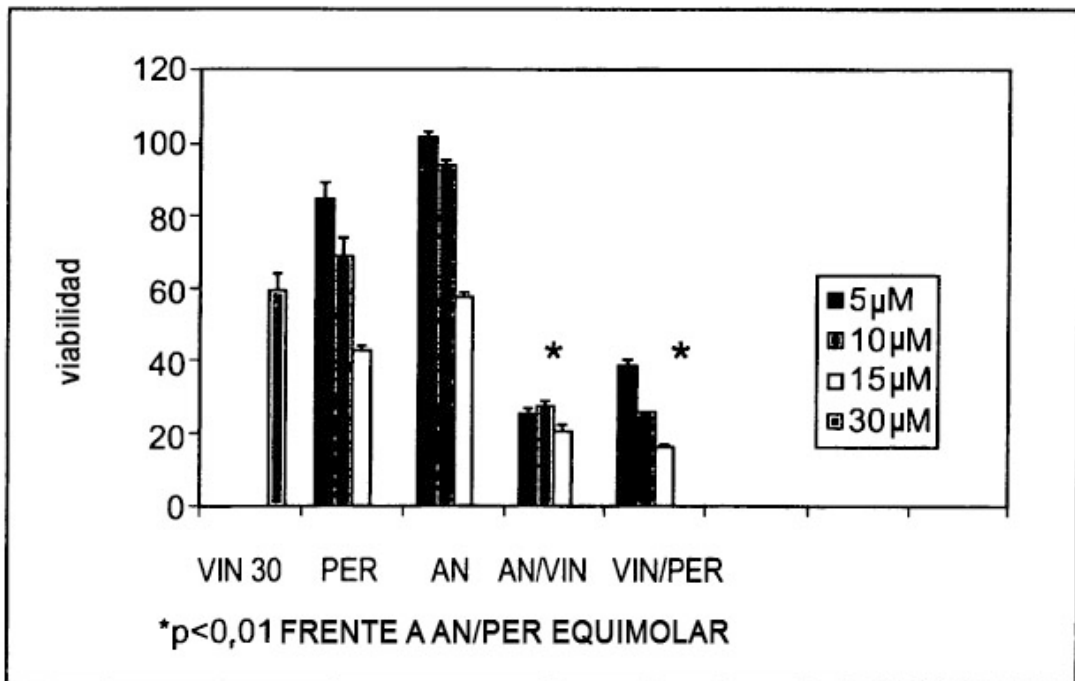


Fig. 16

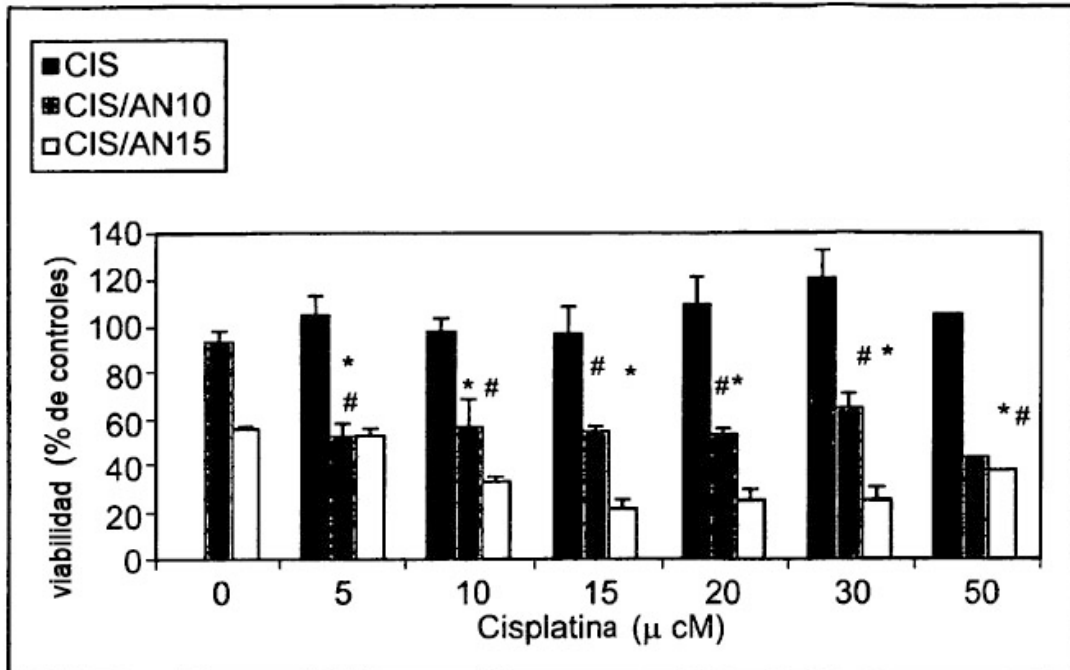


Fig. 17

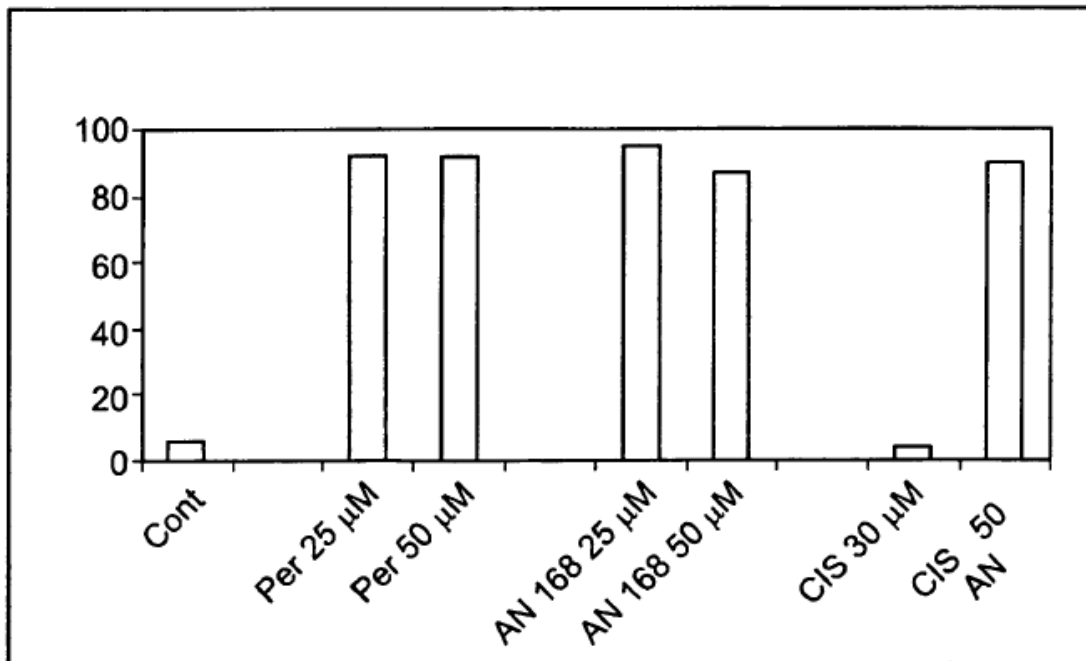


Fig. 18

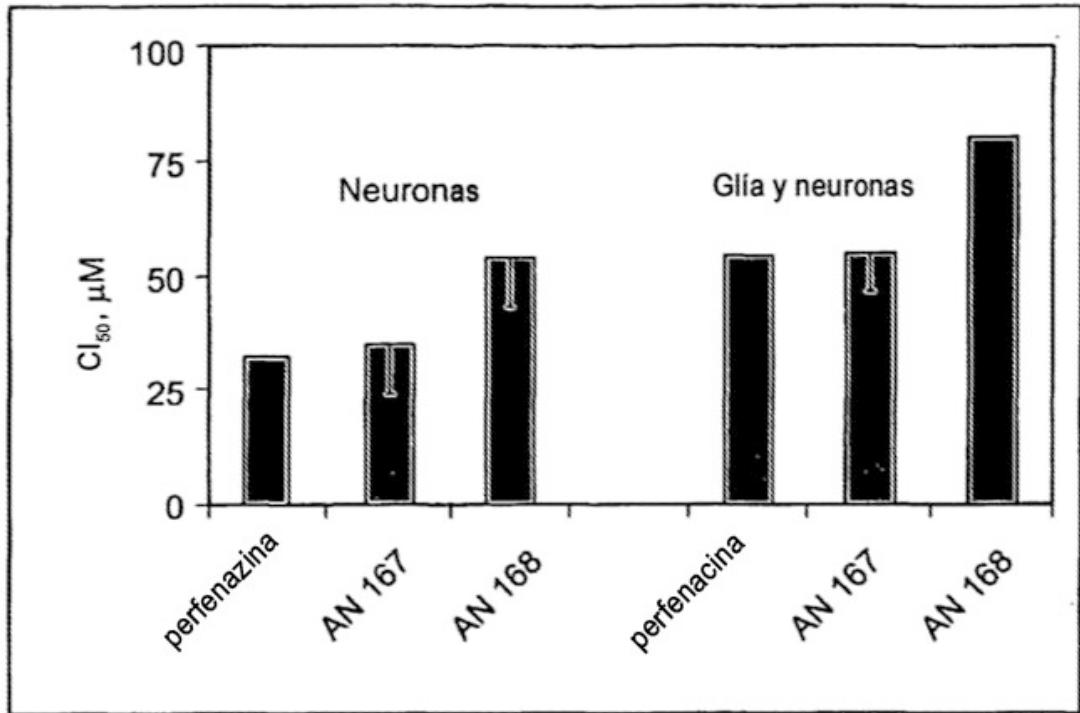


Fig. 19

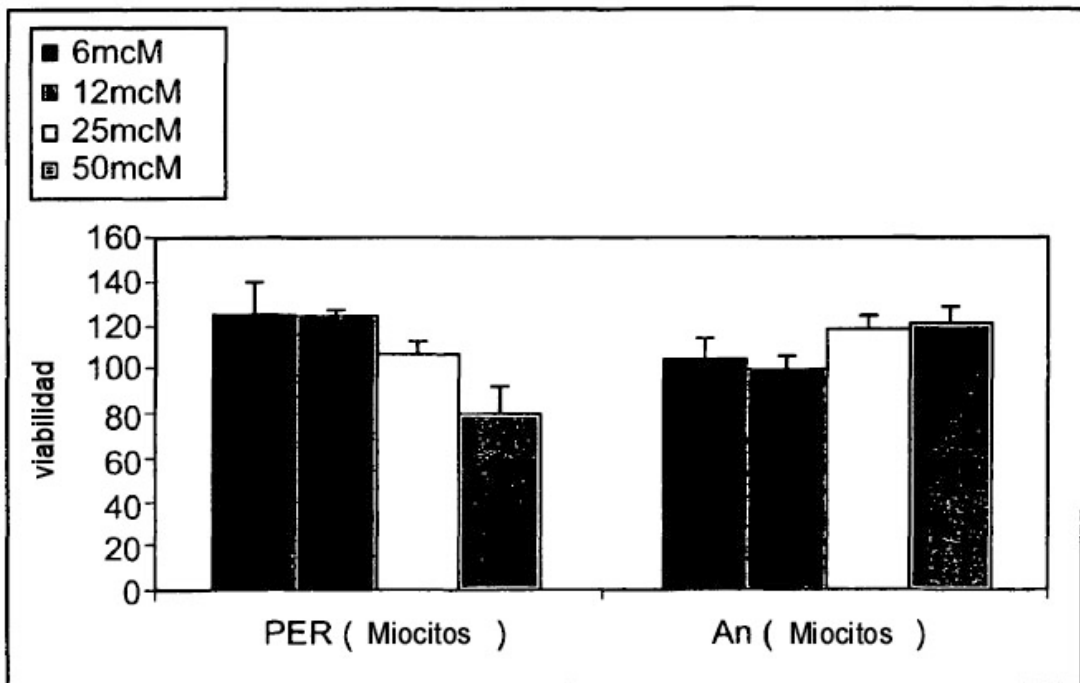


Fig. 20

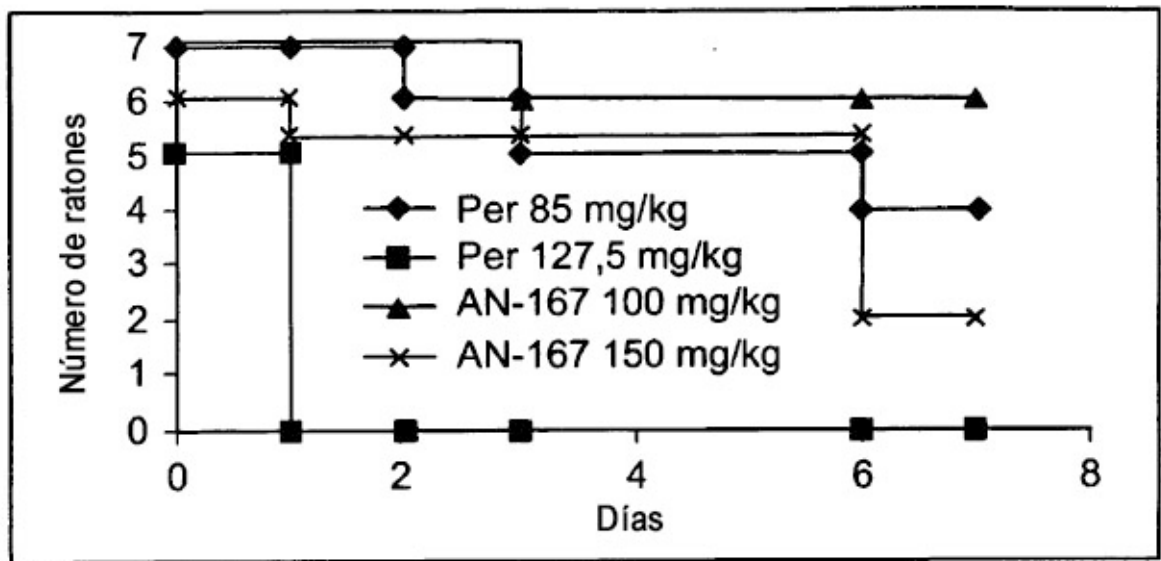


Fig. 21