



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 156 777**

② Número de solicitud: 009902826

⑤ Int. Cl.⁷: C07H 15/207

A61K 31/70

A61P 25/16

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **22.12.1999**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.2001**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.07.2001

⑦ Solicitante/s: **Consejo Superior de
Investigaciones Científicas
Universidad de Santiago de Compostela
Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **Fernández Lozano, Caridad;
Fernández-Mayoralas Alvares, Alfonso;
Nieto López, Ofelia;
Fontenla Gil, José Angel y
Rivas Torres, Emilia**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Derivados de β -glicosil dopamina y sus sales como agentes potenciales de reposición de dopamina en cerebro y su procedimiento de obtención.**

⑤ Resumen:

Derivados de β -glicosil dopamina y sus sales como agentes potenciales de reposición de dopamina en cerebro y su procedimiento de obtención.

La hipótesis de la invención se fundamenta en la capacidad de un residuo glucídico para actuar como un vector que transporte al neurotransmisor hacia el interior del tejido cerebral, en donde se liberaría gradualmente dopamina por hidrólisis de la unión glucídico-dopamina. Los compuestos presentan la hexosa enlazada a uno de los hidroxilos del sistema catecol de la dopamina mediante un enlace de tipo glucosídico, susceptible de ser hidrolizados por enzimas glicosidasas. Poseen utilidad potencial como nuevos agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por bajos niveles de dopamina, como la enfermedad de Parkinson.

ES 2 156 777 A1

DESCRIPCION

Derivados de β -glicosil dopamina y sus sales como agentes potenciales de reposición de dopamina en cerebro y su procedimiento de obtención.

5 **Sector de la técnica**

Producto farmacéutico. Enfermedades neurodegenerativas.

10 **Estado de la técnica**

Muchas enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por una marcada disminución de los niveles de determinados neurotransmisores en cerebro. La enfermedad de Parkinson es una manifestación del síndrome de deficiencia de dopamina en la sustancia negra, que inerva el estriado y otras áreas del cerebro asociadas con actividad motora. Un posible tratamiento basado en la administración de la propia dopamina no es factible, debido a la dificultad que encuentra esta molécula polar para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE). La terapia de reposición de dopamina cerebral se viene llevando a cabo mediante la administración de su precursor, L-DOPA, en combinación con un inhibidor periférico de dopadecarboxilasa, para evitar su rápida transformación en dopamina a este nivel, y también de un inhibidor de monoaminooxidasa B, para mantener los niveles de dopamina cerebral alcanzados, inhibiendo su degradación. No obstante, esta terapia combinada no resulta muy efectiva dado que la L-DOPA que llega al cerebro no sobrepasa el 10% de la L-DOPA administrada.

Por otra parte, es conocido que la glucosa y otras hexosas son rápidamente transportadas al interior del cerebro mediante transportadores de glucosa localizados en la membrana de las células endoteliales de la BHE. Con base en este mecanismo se puede abordar el estudio del transporte al cerebro de sustancias biológicamente activas, que no atraviesan la BHE, mediante su unión a glúcidos. Un trabajo reciente publicado en la revista *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 91, págs. 7114-7118 (1994) muestra que derivados glicosilados de péptidos análogos de encefalina promueven el transporte del péptido a través de la BHE y producen analgesia en ratones.

La patente americana 5,380,837, de fecha 10/01/95 describe la preparación de derivados α -glicosilados de catecolaminas y sus sales, y su uso. La patente se refiere a compuestos con un residuo de D-glucosa con enlace glicosídico α en posición C-3 ó C-4 de la catecolamina, y un procedimiento enzimático para su preparación. No se menciona actividad de los compuestos como suministradores de dopamina en cerebro.

Los derivados β -glicosilados de dopamina de la presente invención tienen un residuo de D-glucosa en posición C-3 ó C-4 del sistema catecol de la dopamina con enlace glicosídico β , a diferencia de los compuestos de la patente 5,380,837 que presentan enlaces glicosídicos α . Esta diferencia en la configuración del enlace glicosídico puede ser importante en el reconocimiento del glicosil derivado por el transportador de glucosa (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 91, págs. 7114-7118 (1994)).

Descripción de la invención

El objeto de la presente invención es el estudio de las propiedades como agentes de reposición de dopamina en cerebro de nuevos derivados glicosilados de este neurotransmisor y su método de obtención. La hipótesis de trabajo de la invención se fundamenta en la capacidad de un residuo glucídico para actuar como un vector que transporte al neurotransmisor hacia el interior del tejido cerebral, en donde se liberaría gradualmente dopamina por hidrólisis de la unión glúcido-dopamina.

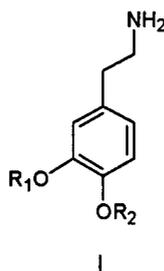
Los compuestos de la presente invención presentan la dopamina unida a una hexosa mediante enlaces susceptibles de ser hidrolizados por enzimas glicosidasas presentes en tejido cerebral.

Los derivados glicosilados de dopamina, tras su administración a ratas reserpinizadas, condujeron a un incremento de la actividad motora y, por tanto, poseen utilidad potencial como nuevos agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por bajos niveles de dopamina, como la enfermedad de Parkinson.

La presente invención se refiere a nuevos derivados β -glicosilados de dopamina y sus sales de fórmula I, donde $R_1 = \beta$ -D-hexopiranosilo y $R_2 = H$, ó $R_1 = H$ y $R_2 = \beta$ -D-hexopiranosilo.

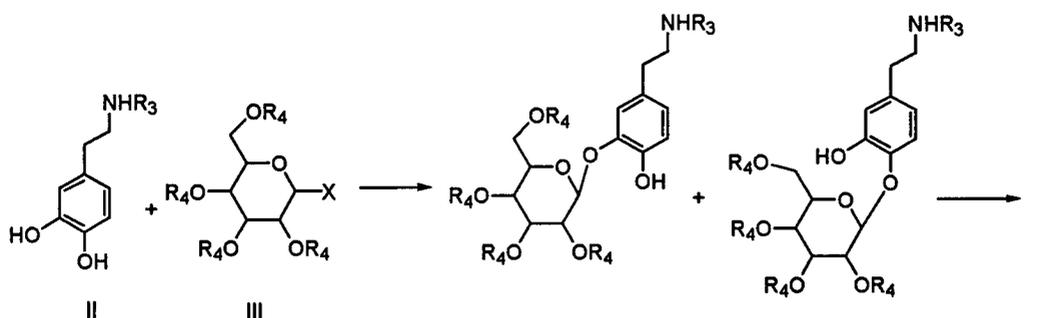
En los compuestos de fórmula I la hexosa se encuentra glicosilando uno de los hidroxilos del sistema catecol de la dopamina con configuración anomérica β . Como hexosas se seleccionan aquellas cuya

propiedad de ser transportadas eficientemente al cerebro desde el plasma sanguíneo es conocida y se describen en el trabajo de W. H. Oldendorf en *Am. J. Physiol.*, 221 (1971) 1629-1639. Así, pueden elegirse entre la D-glucosa, 2-desoxi-D-glucosa, 3-O-metil-D-glucosa, D-manosa y D-galactosa; preferentemente la D-glucosa y D-galactosa.



20

Se ha descubierto que las glicosildopaminas de fórmula I se obtienen a partir de derivados de dopamina de fórmula II, en los que R_3 es un grupo protector temporal de aminas, cuando se hacen reaccionar con un donador de β -hexopiranosilos de fórmula III, donde R_4 es un grupo protector temporal de tipo acilo y X un grupo saliente, en presencia de un promotor de los empleados en reacciones de glicosilación, dando lugar a los derivados glicosilados que, tras la desprotección del grupo amino y grupos hidroxilo, conduce a las glicosildopaminas I.



Como grupo *N*-protector R_3 se selecciona el grupo benciloxicarbonilo.

40

Como donador de glicosilo III para la reacción con II se toma preferentemente en consideración una β -peracetil-hexopiranososa ($X = OAc$) y, en este caso, $BF_3 \cdot OEt_2$ como promotor de la reacción de glicosilación. Los disolventes de la reacción de II + III pueden ser el diclorometano, tolueno, acetonitrilo y éter etílico. Las temperaturas de reacción pueden variar dentro de un amplio margen. Por lo general se trabaja entre $0^\circ C$ y unos $80^\circ C$, preferentemente a temperatura ambiente. En la realización del procedimiento se emplean por cada mol de derivado de dopamina II 1-1.5 moles de donador de glicosilo III.

45

Las glicosildopaminas de fórmula general I pueden obtenerse en forma de amina o sus sales de amonio.

50

Como nuevos glicosil derivados de dopamina serán mencionados en detalle:

1 (fórmula general I con $R_1 = \beta$ -O-glucopiranosilo, $R_2 = H$). Trifluoroacetato de 3,4-dihidroxi-3-O-(β -D-glucopiranosilo)feniletilamonio.

55

2 (fórmula general I con $R_1 = H$, $R_2 = \beta$ -O-glucopiranosilo). Trifluoroacetato de 3,4-dihidroxi-4-O-(β -D-glucopiranosilo)feniletilamonio.

60

Los nuevos derivados glicosilados de dopamina muestran una buena estabilidad en plasma de rata (de 3 a 24 horas). En presencia de enzimas hidrolíticas específicas de enlaces entre los residuos glucídicos y dopamina, se ha podido comprobar que éstas actúan hidrolizando esos puntos de unión. Además, se ha descubierto que su administración a ratones reserpinizados produce un incremento de la actividad motora (Figura 1). Cuando los compuestos de tipo I ($R_1 = \beta$ -O-glucopiranosilo, $R_2 = H$ y $R_1 = H$, $R_2 = \beta$ -O-glucopiranosilo) se incubaron con un homogenato cerebral de rata, pudo observarse la formación de

dopamina libre durante las primeras horas. Los ensayos biológicos llevados a cabo con los nuevos derivados glicosilados de dopamina a los que se refiere la presente invención, ponen de manifiesto su utilidad terapéutica potencial como agentes reguladores de los niveles de dopamina, en enfermedades caracterizadas por deficiencias de este neurotransmisor en cerebro.

5

Los siguientes ejemplos describen el procedimiento de síntesis y la actividad biológica de algunos de los productos preparados. Se debe entender, no obstante, que la invención no se limita a los reactivos y condiciones recogidas en los ejemplos.

10 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Estudio de actividad motora, cm/h recorridos por los ratones reserpinizados tras la administración de los compuestos:

15

0 Vehículo.

1 Fórmula general I con $R_1 = \beta$ -D-glucopiranosilo, $R_2 = H$.

2 Fórmula general I con $R_1 = H$, $R_2 = \beta$ -D-glucopiranosilo.

20

3 Anfetamina.

Ejemplos

25

A. *Síntesis de glicosildopamina de fórmula general I: compuestos 1 (I con $R_1 = \beta$ -O-glucopiranosilo, $R_2 = H$) y 2 (I con $R_1 = H$, $R_2 = \beta$ -O-glucopiranosilo).*

30

A una solución de II ($R_3 =$ benciloxicarbonilo) (667mg, 2.32 mmol) y III ($R_4 = X = Ac$) (906 mg, 2.32 mmol) en diclorometano anhidro (24 ml) se adiciona, gota a gota, el promotor de la glicosilación $BF_3 \cdot OEt_2$ (1.427ml, 11.6 mmol). La mezcla de reacción se agita bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 4 h. Pasado este tiempo, se diluye con diclorometano y se lava sucesivamente con solución saturada de $NaHCO_3$ y agua. La fase orgánica se seca (Na_2SO_4), se filtra y concentra. El residuo se pasa por una columna de gel de sílice (hexano/acetato de etilo 2:1 \rightarrow 1:1) como eluyente. Se obtienen así dos β -glucosildopamina protegidos (67%, $R_{f1} = 0.40$ -hexano/acetato de etilo 1:1, m.p. = 42-45°C, $[\alpha]_D^{20}$ -13.2° (*c* 1, $CHCl_3$); $R_{f2} = 0.30$ hexano/acetato de etilo 1:1, m.p. = 87-89°C, $[\alpha]_D^{20}$ -65.7° (*c* 1, $CHCl_3$)).

35

Cada uno de los glicósidos obtenidos en la etapa anterior se disuelven en metóxido sódico 0.1M y se agita durante 1.5h a temperatura ambiente. A continuación, se trata con amberlita IR-120 (H^+) hasta pH neutro, se filtra y se concentra. El residuo se pasa por una columna de gel de sílice (acetato de etilo/metanol 7:1) obteniendo así los glicósidos regioisómeros desacetilados (82% $R_{f1} = 0.67$, 90% $R_{f2} = 0.56$ acetato de etilo/metanol 4:1).

40

Los compuestos desacetilados disueltos en metanol, en presencia de 1.6 equivalentes de ácido trifluoroacético, se hidrogenan utilizando paladio sobre carbono activado como catalizador, durante 1 hora a temperatura ambiente. La suspensión se filtra sobre celita y se concentra a sequedad obteniendo así los productos finales 1 y 2 en forma de sus sales de trifluoroacetato (1, 99%, R_f 0.28 acetato de etilo/acético/agua 4:2:1, $[\alpha]_D^{20}$ -35.7° (*c* 1, CH_3OH); 2, 99%, R_f 0.25, acetato de etilo/acético/agua 4:2:1, $[\alpha]_D^{20}$ -39.7° (*c* 1, CH_3OH)).

45

50

B. *Estudios de actividad biológica.*

B.1. *Estudios de estabilidad* de los compuestos 1 y 2 (1 con $R_1 = \beta$ -D-glucopiranosilo, $R_2 = H$ y $R_1 = H$, $R_2 = \beta$ -D-glucopiranosilo, respectivamente).

55

Los estudios de estabilidad se efectuaron, en ambos casos, incubando el compuesto a una concentración 0.5 mM en el medio correspondiente a $T = 37^\circ C$. El seguimiento del comportamiento de los glicoconjugados se efectuó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se utilizó una enzima comercial para el estudio de la hidrólisis de los compuestos (β -glucosidasa de almendras, 20 unidades en tampón Na_3PO_4 0.1M pH=5.0). También se efectuaron estudios de estabilidad con plasma de rata y extracto de cerebro de rata, preparado éste según el método descrito por Withers y col. *Biochem. J.* 301, (1994), 343-48. En la tabla 1 se recogen los resultados obtenidos.

60

TABLA 1

5	Medio de incubación T=37°C	Estabilidad ($t_{1/2}$) Compuesto 1	Compuesto 2
10	β -Glucosidasa (20 u)	2 h	1.5h
	Homogenato cerebral	> 48 h	> 48 h
	Plasma de rata	> 48 h	> 48 h

B.2. Estudios de motilidad.

15 La actividad motora se monitorizó durante períodos de 1 o 3 horas con el sistema de vídeo digital Ethovision (v 1.90). Se utilizaron ratones reserpinizados como modelo experimental de la enfermedad de Parkinson. El síndrome se induce mediante la administración de reserpina (5 mg/Kg i.p., 18h antes del ensayo) que produce una fuerte reducción de las reservas de dopamina cerebral. A los distintos grupos de animales se les administró:

20 a) Vehículo, a los animales control tomados como referencia.

b) Anfetamina (2.5 mg/Kg), a un segundo grupo de animales, para poder establecer una relación comparativa del efecto producido por este potente liberador de Dopamina con el previsible efecto de los nuevos compuestos.

c) Los glicosil derivados de Dopamina (10 mg/Kg) que corresponden a las siguientes estructuras:

1 (fórmula general I con $R_1 = \beta$ -D-glucopiranosilo, $R_2 = H$)

2 (fórmula general I con $R_1 = H$, $R_2 = \beta$ -D-glucopiranosilo).

35 Inmediatamente después de la administración, los animales se depositaron en las, cajas de experimentación (50x50 cm) y se estudio la evolución del comportamiento locomotor del animal. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1.

40

45

50

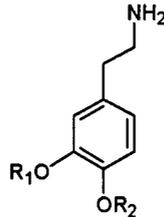
55

60

REIVINDICACIONES

1. Derivados de β -glicosil dopamina y sus sales de fórmula general I.

5



10

I

15

donde $R_1 = \beta$ -D-hexopiranosilo; $R_2 = H$, ó $R_1 = H$ y $R_2 = \beta$ -D-hexopiranosilo

2. Derivados de β -glicosil dopamina según reivindicación 1 **caracterizado** porque el residuo R_1 ó R_2 de α, β -D-hexopiranosilo puede ser de glucosa, 2-desoxiglucosa, 3-O-metilglucosa, manosa o galactosa.

20

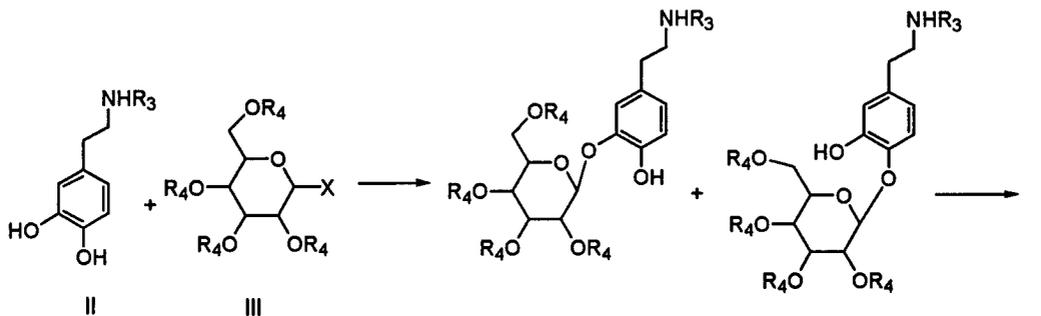
3. Procedimiento para la obtención de β -glicosil dopamina de fórmula I según la reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque: en una primera etapa un derivado de dopamina de fórmula II, donde R_3 es un grupo protector temporal de aminas, se hace reaccionar con un donador de β -D-hexopiranosilo de fórmula III -donde R_4 es un grupo acilo, X un grupo saliente, y la hexosa es una de entre las mencionadas en la reivindicación 2 en presencia de un promotor de glicosilación; en una segunda etapa se lleva a cabo una reacción de O-desacilación, y en una tercera etapa se desprotege el grupo amino en presencia de un ácido, en su caso, para obtener sus sales de amonio.

25

4. Procedimiento según la reivindicación 3 **caracterizado** porque la reacción de β -glicosilación se realiza con un β -peracetil-hexopiranososa en presencia de trifluoruro de boro eterato como promotor.

30

35



40

45

5. Procedimiento según la reivindicación 3 **caracterizado** porque la etapa de O-desacilación se lleva a cabo con metóxido sódico en metanol.

6. Procedimiento según la reivindicación 3 **caracterizado** porque cuando R_3 es un grupo benciloxi-carbonilo la etapa de N-desprotección se lleva a cabo con hidrógeno en presencia de catalizador de paladio sobre carbono y, cuando se obtienen las sales de amonio, ácido trifluoracético.

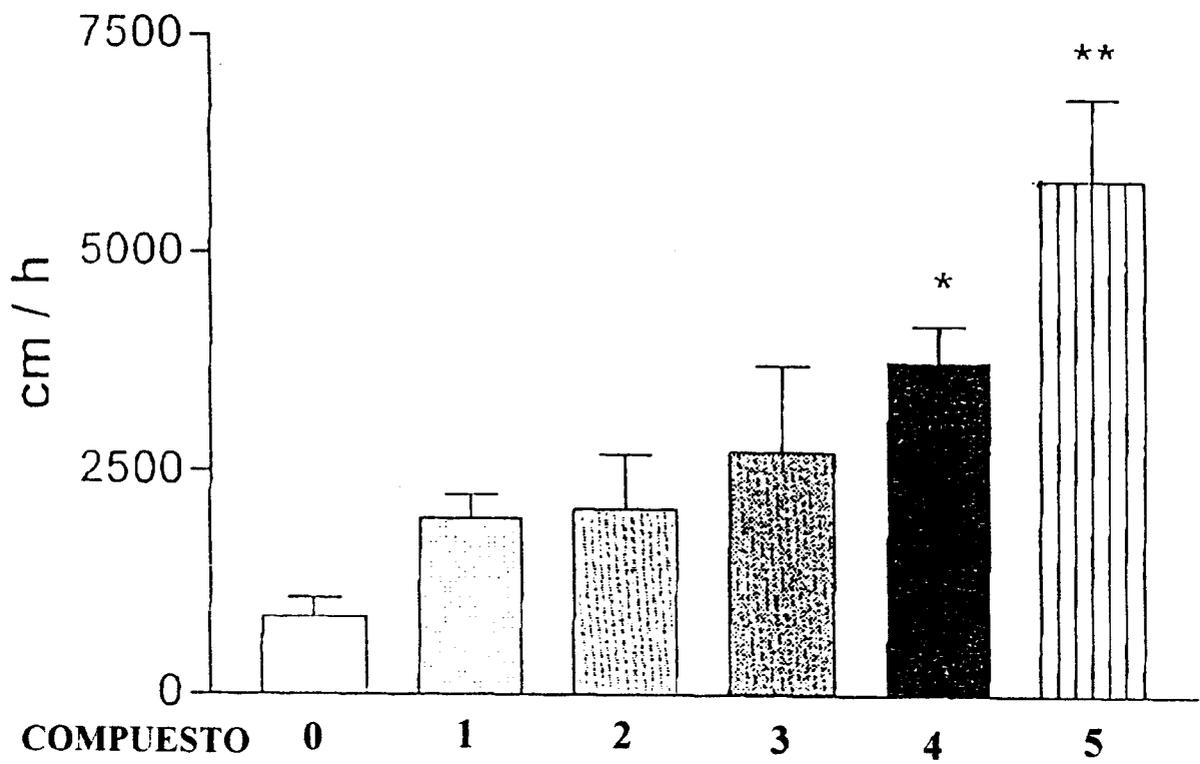
50

7. Derivados de β -glicosil dopamina de fórmula general I, según las reivindicaciones de 1 y 2, **caracterizados** porque tras su administración a ratas reserpinizadas conducen a un incremento de la actividad motora y, por tanto, poseen utilidad potencial como agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades **caracterizadas** por bajos niveles de dopamina.

55

60

Figura 1





INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C07H 15/207, A61K 31/70, A61P 25/16

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HOPKINS, T.L. y col. Identification of Catecholamine beta-Glucosides in the Hemolymph of the Tobacco Hornworm, <i>Manduca sexta</i> (L.), during Development. <i>Insect Biochem. Mol. Biol.</i> , 1995, Vol. 25, N° 1, páginas 29-37. RN 50908-96-8	1,2
X	MUELLER, D.D. y col. 1H and 13C NMR of 3-O and 4-O Conjugates of Dopamine and Other Catecholamines. <i>Bioconjugate Chem.</i> , 1993, Vol. 4, N° 1, páginas 47-53. RN 50908-06-8	1,2
X	YUMI ISHIZAKI y YOSHISHIGE UMEBACHI. FURTHER STUDIES ON DOPAMINE AND N-ACYLDOPAMINE DURING THE PUPAL STAGE OF PAPILO XUTHUS (LEPIDOPTERA: PAPILIONIDAE). <i>Comp. Biochem. Physiol.</i> , 1990, Vol. 97B, N° 3, páginas 563-567. RN 50909-01-8	
X	HOPKINS, T.L. y col. CATECHOLAMINES IN HAEMOLYMPH AND CUTICLE DURING LARVAL, PUPAL AND ADULT DEVELOPMENT OF MANDUCA SEXTA (L.). <i>Insect Biochem.</i> , 1984, Vol. 14, N° 5, páginas 533-540. RN 50909-01-8	1,2
X	PEDER OLESEN LARSEN y col. TYROSINE O-GLUCOSIDE AND DOPAMINE 3-O-GLUCOSIDE IN SEEDS OF ENTADA PURSAETHA. <i>Phytochemistry</i> , 1973, Vol. 12, N° 9, páginas 2243-7. RN 50908-96-8 y RN 50909-01-8	1,2

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe

29.05.2001

Examinador

E. Albarrán Gómez

Página

1/1