

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 418 684**

21 Número de solicitud: 201230174

51 Int. Cl.:

C07C 223/02 (2006.01)

A61K 31/138 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

07.02.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

14.08.2013

Fecha de la concesión:

29.05.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

05.06.2014

73 Titular/es:

**NEURON BIOPHARMA, S.A. (100.0%)
PARQUE TECNOLOGICO DE CIENCIAS DE LA
SALUD, AVDA. DE LA INNOVACION, 1.
18100 ARMILLA (Granada) ES**

72 Inventor/es:

**RAMOS MARTÍN, María Del Carmen;
CAMPOY GARCÍA, Sonia ;
BURGOS MUÑOZ, Javier Santos;
ADRIO FONDEVILA, José Luis y
VELASCO ALVAREZ, Javier**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **ANÁLOGOS FORMILADOS DE XANTOCILINAS COMO NEUROPROTECTORES**

57 Resumen:

Análogos formilados de xantocilinas como neuroprotectores.

La presente invención se dirige al uso de análogos formilados de xantocilinas para la fabricación de un medicamento dirigido al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, a algunos de dichos análogos, así como a procedimientos para su obtención y composiciones farmacéuticas que los comprenden. La invención también se dirige a una cepa de microorganismo de la especie *Penicillium chrysogenum* a partir de la cual se pueden obtener dichos análogos.

ES 2 418 684 B1

DESCRIPCIÓN

Análogos formilados de xantocilinas como neuroprotectores

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La invención se relaciona con la utilización de análogos formilados de las xantocilinas y de sus derivados para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, déficits cognitivos, demencias y en especial de la enfermedad de Alzheimer.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa de demencia más común. De acuerdo con la OMS en el año 2006 el número de personas afectadas por demencia ascendía a 37 millones en el mundo, de los cuales 18 millones eran enfermos de Alzheimer. En este sentido se espera que el número de pacientes se doble en los próximos 25 años, alcanzando los 34 millones en 2025. Sólo en España se estima que más de medio millón de personas sufren actualmente la EA (Mount&Downtown, Nat Med 2006; 12[7]: 780-4).

15 Los costes asociados a esta enfermedad son proporcionalmente altos. En 2005, los costes sanitarios de la enfermedad de Alzheimer y de otras demencias en los 27 países que forman la Unión Europea se estimaba en 130.000 millones de euros, unos 21.000 euros por paciente y año. Se calcula que el coste total derivado del cuidado de los enfermos de Alzheimer en Estados Unidos durante 2005 fue de 91.000 millones de dólares, detectándose un aumento en el gasto médico asociado a la enfermedad que ha superado los 160.000 millones de dólares en 2010 (Mount&Downtown, Nat Med 2006; 12[7]: 780-4).

20 Por las razones anteriores, la EA y las enfermedades asociadas con el envejecimiento como los déficits cognitivos o las demencias, se han convertido en un problema de primer orden en todo el mundo. Sin embargo, no existen fármacos eficientes que prevengan o impidan las enfermedades neurodegenerativas (EN), con lo que la búsqueda y validación de nuevos compuestos neuroprotectores que eviten el daño neuronal se ha convertido en una necesidad, especialmente teniendo en cuenta que los mecanismos patofisiológicos de las mismas aún están por dilucidar. Las patologías neurodegenerativas son consecuencia de la muerte neuronal y de la consecuente desaparición de masa cerebral, consecuencia de la ausencia de neuronas en zonas específicas del cerebro. Por este motivo, una de las estrategias válidas para el tratamiento y/o prevención de las EN es la búsqueda de fármacos que impidan la muerte neuronal, es decir, que sean neuroprotectores. Sin embargo, los fármacos utilizados hasta el momento para la EA han resultado ser sintomáticos, no evitando la progresión o la aparición de la enfermedad. Hasta el momento existen dos tipos de fármacos en el mercado: los inhibidores de acetilcolinesterasa (AChE) y la memantina, un inhibidor del receptor glutamatérgico de NMDA (ácido N-metil-D-aspartico). Las opciones terapéuticas actuales frente a la EA se basan en la inhibición de la acetilcolinesterasa con fármacos como el donepezilo, la galantamina o la rivastigmina, o en la capacidad de la memantina en antagonizar el receptor de NMDA. No obstante, se ha demostrado que el uso de rivastigmina no detiene o enlentece la progresión del daño cognitivo leve (DCL) o de la EA (Feldman et al. Lancet Neurol 2007; 6[6]: 501-12), mientras que el uso del donepezilo sólo muestra beneficios discretos a corto plazo, pero con el inconveniente de presentar efectos secundarios significativos (Birks and Flicker, Cochrane Database Syst Rev 2006; 3: CD006104). De acuerdo con la Asociación de Alzheimer americana, la llegada de fármacos que retrasaran solamente 5 años el inicio de la enfermedad reportaría un ahorro de unos 50.000 millones de dólares solamente en los Estados Unidos. En este sentido, la utilización de estrategias preventivas, como la intervención en los procesos de deterioro cognitivo leve (DCL) o MCI (del inglés *Mild Cognitive Impairment*), resultarían ser una alternativa válida.

40 El MCI, también conocido como *demencia incipiente* o *deterioro aislado de memoria*, es una de las etapas previas asociadas a la EA y a otras demencias. El MCI está reconocido como un factor de riesgo de la EA, y afecta a unos 30 millones de personas en todo el mundo, y se considera como un paso previo a la EA, donde entre el 10 y el 15% de los individuos con MCI progresan a EA cada año (Grundman et al. Arch. Neurol 2004; 61[1]: 59-66). A pesar de la significativa prevalencia del MCI y del alto riesgo de los pacientes a progresar a demencias, no existe en la actualidad ningún tratamiento o terapia para esta entidad clínica, con lo que se recomienda el uso de antioxidantes o fármacos contra la EA para el tratamiento del MCI. Así pues, en la actualidad no existen fármacos para el tratamiento del MCI, y los actuales fármacos contra la EA ofrecen pocos beneficios a los pacientes, los cuales retrasan temporalmente (en el mejor de los casos un año), algunos síntomas de la dolencia, pero no evitan su evolución.

50 Debido al poco éxito de los fármacos frente a las EN se han abierto nuevas líneas de investigación. De entre ellas cabe destacar las estrategias de búsquedas de nuevas entidades químicas (NCE, del inglés *New Chemical Entities*) a partir de biodiversidad natural. De hecho, la búsqueda de compuestos bioactivos frente a diferentes patologías es una de las materias centrales de la química de productos naturales. Recientemente se han comenzado a aplicar estrategias de búsqueda masiva de compuestos y extractos a partir de diferentes fuentes biológicas, entre las que se encuentran los microorganismos. De este modo, la búsqueda de biomoléculas activas requiere el aislamiento y cultivo de los microorganismos productores de compuestos a partir de diferentes ambientes. De hecho, de los 250.000 metabolitos bioactivos que se calcula que existen, más de 20.000 son producidos por microorganismos. Los hongos filamentosos, bacterias unicelulares y los actinomicetos son los grupos más prolíficos a la hora de producir este tipo de compuestos. Sólo, aproximadamente, un 1% de estos compuestos, unos 160, son utilizados directamente en medicina humana,

5 animal y en agricultura. Este ratio (un 0,2-0,3%) es, sin embargo, muy superior al alcanzado por la industria farmacéutica mediante nuevas entidades químicas obtenidas por síntesis (0,001%). Sólo entre los años 2005 y 2007, un 19% de los fármacos lanzados al mercado fueron productos naturales o derivados de productos naturales. La variedad química de estos metabolitos es enorme ya que depende del microorganismo, de la composición del medio de cultivo y de las condiciones en las que se realice el mismo.

10 En este sentido, se han descrito análogos formulados de xantocilina con un único sustituyente en cada anillo aromático obtenidos por fermentación mixta de *A. fumigatus* con *S. peucetis* (Zuck et al., J. Nat. Prod. 2011, 74, 1653-1657), los cuales han demostrado actividad antitumoral utilizando el panel de las 60 líneas celulares NCI-60. Dos de estos compuestos mostraron actividad frente a algunas líneas celulares (de cáncer de pulmón, sistema nervioso central, melanoma, ovárico, renal y leucemia), mientras que el resto de compuestos resultaron inactivos. Se evaluó la actividad de uno de los dos compuestos frente a *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia thailandensis* y *Fusarium pallidoroseum*, pero no mostró actividad en dichos ensayos.

15 También se ha demostrado que el análogo formulado de xantocilina aislado de *Cordyceps brunnearubra* BCC 1395, así como los compuestos hexametilados y hexaacetilados obtenidos por metilación y acetilación, muestran actividad frente al parásito de la malaria *Plasmodium falciparum*, citotoxicidad frente a células de cáncer de mama, mientras que carece de actividad frente a carcinoma epidermoide humano oral y células de cáncer de pulmón y células Vero no cancerosas (Isaka et al., J. Nat. Prod. 2007, 70, 656-658).

No obstante, no se ha demostrado para ninguno de estos compuestos aislados de los microorganismos mencionados actividad neuroprotectora.

20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Los autores de la presente invención han identificado una serie de compuestos que corresponden con análogos formulados de xantocilinas, obtenidos a partir de un extracto producido por una cepa de la especie *Penicillium chrysogenum*, los cuales han demostrado un sorprendente efecto neuroprotector frente a la muerte neuronal causada por daño oxidativo, lo que les confiere unas magníficas propiedades como compuestos neuroprotectores.

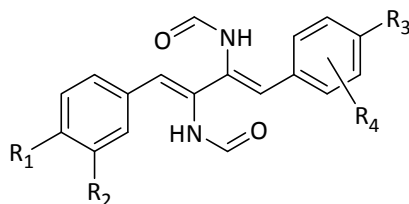
25 Además, el análisis de la capacidad antioxidante in vitro de estos compuestos ha demostrado de forma sorprendente que estos compuestos son antioxidantes.

Asimismo, se ha demostrado que estos compuestos protegen de la apoptosis causada por las modificaciones de la proteína precursora del amiloide (APP) en dos modelos celulares que portan las variantes salvaje y mutante sueca de dicha proteína, la cual está relacionada con la enfermedad de Alzheimer.

30 Los resultados experimentales obtenidos ponen de manifiesto el potencial empleo de los análogos formulados de xantocilinas en la prevención y/o tratamiento de la muerte neuronal asociada a enfermedades neurodegenerativas, déficits cognitivos, demencias, enfermedades asociadas al envejecimiento, procesos patológicos asociados a la edad y progeria.

35 Los resultados obtenidos pueden ser extrapolados con fines profilácticos o terapéuticos para su aplicación sobre la población de riesgo.

Así, un primer aspecto de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto de fórmula (I):



(I)

donde:

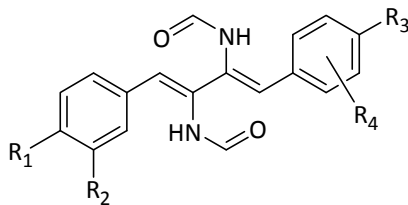
40 R_1 se selecciona entre alquilo, OH, O-alquilo, SH, S-alquilo, NH_2 , NH-alquilo, $N(\text{alquilo})_2$ y halógeno,

R_2 , R_3 y R_4 se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo, OH, O-alquilo, SH, S-alquilo, NH_2 , NH-alquilo, $N(\text{alquilo})_2$ y halógeno,

o R_1 y R_2 y/o R_3 y R_4 forman un grupo -O-alquilen-O-,

45 o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento dirigido a la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

En un segundo aspecto, la invención se dirige a compuestos de fórmula (II):



(II)

5 R₁ y R₂ se seleccionan independientemente de alquilo, OH, O-alquilo, SH, S-alquilo, NH₂, NH-alquilo, N(alquilo)₂ y halógeno, o R₁ y R₂ forman un grupo –O-alquilen-O-; y

R₃ y R₄ se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo, OH, O-alquilo, SH, S-alquilo, NH₂, NH-alquilo, N(alquilo)₂ y halógeno, o R₃ y R₄ forman un grupo –O-alquilen-O-,

o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo,

con la condición de que la fórmula (II) no incluye:

- 10
- el compuesto en el que R₁-R₄ son OH y R₄ está en posición meta del anillo aromático;
 - el compuesto en el que R₁-R₄ son OCH₃ y el sustituyente R₄ está en posición meta del anillo aromático.

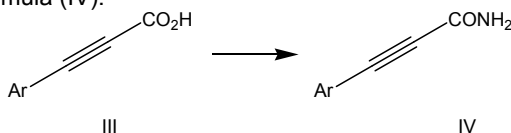
En un tercer aspecto, la invención se dirige a una formulación farmacéutica que comprenden un compuesto de fórmula (II) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención se dirige asimismo al uso de un compuesto de fórmula (II) para la preparación de un medicamento.

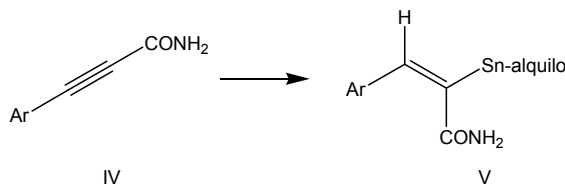
15 Adicionalmente, la invención está dirigida a un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (II) a partir de un extracto producido por la especie *Penicillium chrysogenum*.

Asimismo, la invención se dirige a un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (II) que comprende:

20 a) una reacción de adición mediante la cual el ácido aril propiónico de fórmula (III) se transforma en su correspondiente amida de fórmula (IV):

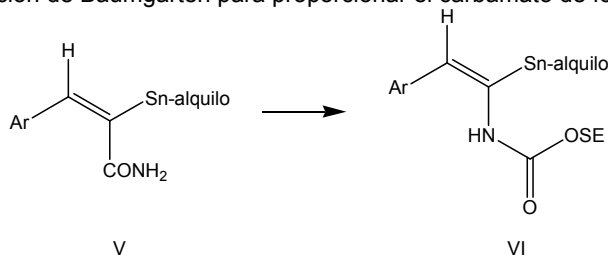


b) hacer reaccionar la amida de fórmula (IV) con un hidruro de alquilestaño para producir el estannano de fórmula (V):



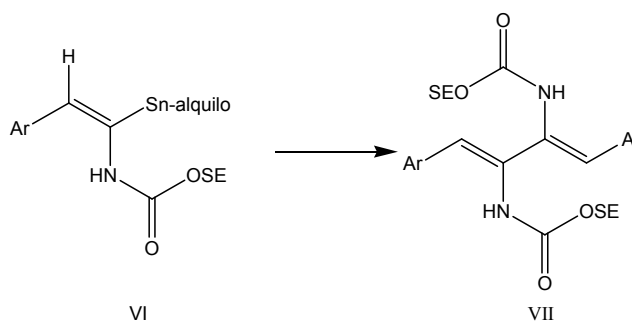
25 y, a continuación, someter el compuesto de fórmula (V) a una secuencia de reacciones que comprende:

c.1) reacción de oxidación de Baumgarten para proporcionar el carbamato de fórmula (VI) protegido:



donde SE significa un grupo protector;

30 d.1) someter el carbamato de fórmula (VI) a una reacción de homoacoplamiento para dar el compuesto de fórmula (VII):



y

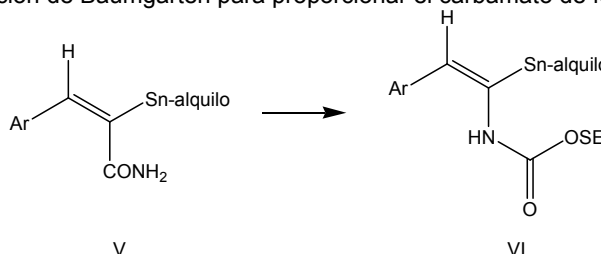
e.1) desproteger los grupos carbamato e introducir grupos formamido para obtener el compuesto de fórmula (II) de la invención;

5

o

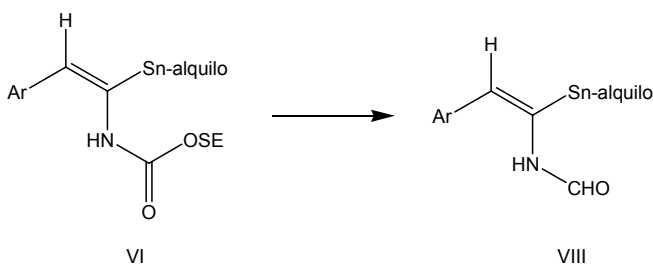
someter el compuesto de fórmula (V) a una secuencia de reacciones que comprende:

c.2) reacción de oxidación de Baumgarten para proporcionar el carbamato de fórmula (VI) protegido:



d.2) desproteger los grupos carbamato e introducir grupos formamido para obtener el compuesto de fórmula (VIII):

10



y

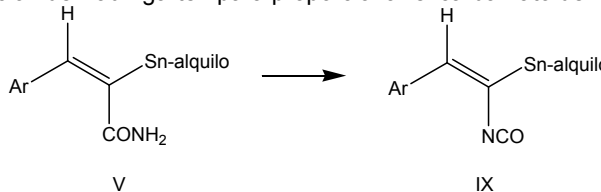
e.2) someter la formamida de fórmula (VIII) a una reacción de homoacoplamiento para proporcionar el compuesto de fórmula (II) de la invención;

15

o

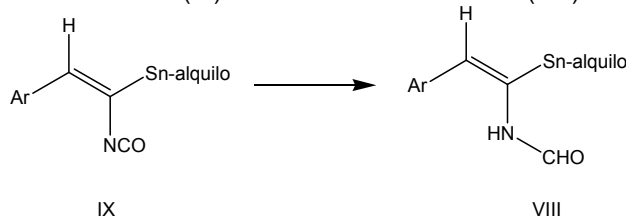
someter el compuesto de fórmula (V) a una secuencia de reacciones que comprende:

c.3) reacción de oxidación de Baumgarten para proporcionar el carbamato de fórmula (IX):



d.3) convertir el carbamato de fórmula (IX) en la formamida de fórmula (VIII):

20



y

e.3) someter la formamida de fórmula VIII a una reacción de homoacoplamiento para proporcionar el compuesto de fórmula (II) de la invención;

donde el grupo arilo incluye los sustituyentes R₁ a R₄ en función del compuesto de fórmula (II) que se desee obtener.

Finalmente, la invención se dirige a una cepa de microorganismo de la especie *Penicillium chrysogenum* depositada en el CECT con el número de registro CECT 20783.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es la fotografía de la muestra M082-08, que pertenece a una esponja marina tomada en Cabo de Gata (Almería).

10

La Figura 2 es la fotografía del aislado como cultivo puro de la muestra M082-08 inoculada sobre una placa petri con medio PDA-marino, la cepa de aislado se denominó 0882_08.

15

La Figura 3 es un diagrama de barras donde se refleja la protección de diferentes diluciones del extracto 08_055 C08 frente a la muerte celular causada por xantina 10 μ M/ xantina oxidasa 60 mU/mL (XXO). La figura muestra el porcentaje de la muerte celular (tomando el 100% la producida por XXO) de los cultivos tratados con diluciones 1/100, 1/400, 1/1.000, 1/4.000 y 1/10.000 del extracto en presencia de XXO, representando las medias \pm SD de un experimento por triplicado. * Diferencia significativa respecto al tratamiento con XXO de acuerdo al test de Student ($p < 0.05$).

La Figura 4 es un listado de los parámetros letales, subletales, teratogénicos y toxicológicos observados a 48 horas post-tratamiento en los embriones de pez cebra expuestos al extracto 08_055 C08 a las diluciones 1/100, 1/200 y 1/400.

La Figura 5 es la secuenciación del fragmento obtenido por PCR del gen 28S de la cepa 0882_08.

20

La Figura 6 es el cromatograma del análisis por HPLC/MS de baja resolución de los compuestos con pesos moleculares de m/z 340 (correspondiente al pico G27) y m/z 324 (pico G28) obtenidos a partir del fraccionamiento del extracto 08_055 C08.

La Figura 7 es el espectro de masas (ESI-TOF) del pico G28 y que corresponde al compuesto NPS0156.

La Figura 8 es el espectro de ¹H RMN del pico G28 y que corresponde al compuesto NPS0156.

La Figura 9 es el espectro de ¹³C RMN del pico G28 y que corresponde al compuesto NPS0156.

25

La Figura 10 muestra los desplazamientos químicos de ¹H (500 MHz) y ¹³C (125 MHz) para el compuesto NPS0156 en DMSO-d₆.

La Figura 11 es el espectro de masas (ESI-TOF) del pico G27 y que corresponde al compuesto NPS0155.

La Figura 12 es el espectro de ¹H RMN del pico G27 y que corresponde al compuesto NPS0155.

30

La Figura 13 es un diagrama que muestra las correlaciones observadas en los espectros de COSY (rojo) y HMBC (azul) para los protones aromáticos del sustituyente 3,4-dihidroxifenilo.

La Figura 14 muestra los desplazamientos químicos de ¹H (500 MHz) y ¹³C (125 MHz) para el compuesto NPS0155 en DMSO-d₆.

35

La Figura 15 muestra en (A) el Índice celular normalizado de las células de neuroblastoma humano SK-N-MC tratadas durante 24 h con XXO y varias concentraciones de NPS0155 (de 10 a 4.000 ng/ml). La gráfica de dispersión XY muestra la medida a tiempo real de un ensayo representativo, en medidas por duplicado; y en (B) el porcentaje del Índice celular normalizado referido a las células tratadas con XXO y con NPS0155 a las concentraciones indicadas a 20 h post tratamiento. Los resultados son la media \pm SEM de dos ensayos realizados por duplicado. * Diferencia significativa respecto al tratamiento con XXO de acuerdo al test de Student ($p < 0.05$).

40

La Figura 16 muestra en (A) el Índice celular normalizado de las células de neuroblastoma humano SK-N-MC tratadas durante 24 h con XXO y varias concentraciones de NPS0156 (de 10 a 4.000 ng/ml). La gráfica de dispersión XY muestra la medida a tiempo real de un ensayo representativo, en medidas por duplicado; y en (B) el porcentaje del Índice celular normalizado referido a las células tratadas con XXO y con NPS0156 a las concentraciones indicadas a 20 h post tratamiento. Los resultados son la media \pm SEM de dos ensayos realizados por duplicado. * Diferencia significativa respecto al tratamiento con XXO de acuerdo al test de Student ($p < 0.05$).

45

La Figura 17 muestra en (A) el análisis por citometría de flujo de la fluorescencia del yoduro de propidio frente a la cantidad de DNA, para las células portadoras de la variante salvaje del APP (APPwt) tratadas con camptotecina (CPT) 50 μ M durante 6 h y para el pre-tratamiento durante 24 h con NPS0155 a 4 y 10 μ g/ml seguido del tratamiento con CPT (el porcentaje de apoptosis indicado se mide sobre la región sub-G1 de cada una de las condiciones.); y en (B) los histogramas representativos que muestran el porcentaje de la fragmentación de DNA referido a las células APPwt tratadas con CPT y con el pre-tratamiento con NPS0155 a 4 y 10 μ g/ml, representando las medias \pm SD de dos

50

experimentos independientes por sextuplicado. * Diferencia significativa respecto al tratamiento con CPT de acuerdo al test de Student ($p < 0.05$).

La Figura 18 muestra en (A) el análisis por citometría de flujo de la fluorescencia del yoduro de propidio frente a la cantidad de DNA, para las células portadoras de la variante sueca del APP (APP_{swe}) tratadas con CPT 50 μ M durante 6 h y para el pre-tratamiento durante 24 h con NPS0155 a 4 y 10 μ g/ml seguido del tratamiento con CPT (el porcentaje de apoptosis indicado se mide sobre la región sub-G1 de cada una de las condiciones.); y en (B) los histogramas representativos que muestran el porcentaje de la fragmentación de DNA referido a las células APP_{swe} tratadas con CPT y con el pre-tratamiento con NPS0155 a 4 y 10 μ g/ml, representando las medias \pm SD de dos experimentos independientes por sextuplicado. * Diferencia significativa respecto al tratamiento con CPT de acuerdo al test de Student ($p < 0.05$).

La Figura 19 muestra en (A) el análisis por citometría de flujo de la fluorescencia del yoduro de propidio frente a la cantidad de DNA, para las células portadoras de la variante salvaje del APP (APP_{wt}) tratadas con CPT 50 μ M durante 6 h y para el pre-tratamiento durante 24 h con NPS0156 a 4 y 10 μ g/ml seguido del tratamiento con CPT (el porcentaje de apoptosis indicado se mide sobre la región sub-G1 de cada una de las condiciones.); y en (B) los histogramas representativos que muestran el porcentaje de la fragmentación de DNA referido a las células APP_{wt} tratadas con CPT y con el pre-tratamiento con NPS0156 a 4 y 10 μ g/ml, representando las medias \pm SD de dos experimentos independientes por sextuplicado. * Diferencia significativa respecto al tratamiento con CPT de acuerdo al test de Student ($p < 0.05$).

La Figura 20 muestra en (A) el análisis por citometría de flujo de la fluorescencia del yoduro de propidio frente a la cantidad de DNA, para las células portadoras de la variante sueca del APP (APP_{swe}) tratadas con CPT 50 μ M durante 6 h y para el pre-tratamiento durante 24 h con NPS0156 a 4 y 10 μ g/ml seguido del tratamiento con CPT (el porcentaje de apoptosis indicado se mide sobre la región sub-G1 de cada una de las condiciones.); y en (B) los histogramas representativos que muestran el porcentaje de la fragmentación de DNA referido a las células APP_{swe} tratadas con CPT y con el pre-tratamiento con NPS0156 a 4 y 10 μ g/ml, representando las medias \pm SD de dos experimentos independientes por sextuplicado. * Diferencia significativa respecto al tratamiento con CPT de acuerdo al test de Student ($p < 0.05$).

La Figura 21 muestra el esquema de la síntesis de xanthocillin X, como ejemplo de la ruta de síntesis para generar los análogos del compuesto NPS0155. Los pasos que se indican consisten en: **a.** ClCO_2Et , Et_3N , THF; aq NH_3 , 0 $^\circ\text{C}$, 1 h; **b.** $\text{N-Bu}_3\text{SnH}$, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, THF, 0 $^\circ\text{C}$, 0.5 h; **c.** $\text{Pb}(\text{OAc})_4$, $\text{TMS}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$, DMF, 0 $^\circ\text{C}$ a 50 $^\circ\text{C}$, 8 h; **d.** $\text{Pb}(\text{OAc})_2$, CuCl_2 , THF, 0 $^\circ\text{C}$, 0.5 h; **e.** LHMSD, HMPA, acetic formic anhydride, THF, -78 $^\circ\text{C}$, 2 h; **f.** TBAF, THF, 0 $^\circ\text{C}$ a RT, 2 h; **g.** $\text{Pb}(\text{OAc})_4$, THF, RT, 0.5 h; **h.** LiEt_3BH , THF, -78 a -30 $^\circ\text{C}$, 2 h.

La Figura 22 muestra la composición de los sustituyentes A a P en las posiciones Ar^1 y Ar^2 sobre la estructura esquemática en (II), lo que define una familia de derivados de xantocilinas.

La Figura 23 es una matriz que muestra el valor del CLOGP, definido como el log P de un compuesto, el cual es el coeficiente de partición entre n-octanol y agua, $\log(\text{C}_{\text{octanol}}/\text{C}_{\text{agua}})$, de las diferentes combinaciones de sustituyentes de la molécula de fórmula (II).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

Para facilitar la comprensión de la invención objeto de esta solicitud de patente, a continuación se expone el significado de algunos términos y expresiones utilizados en el contexto de la invención.

Una "sustancia neurotóxica" tal como aquí se utiliza son sustancias químicas que producen alteraciones funcionales, estructurales y bioquímicas del sistema nervioso central. Estos efectos adversos implican cambios que producen una desregulación o alteración del sistema nervioso. La naturaleza de dicho cambio puede ser neuroquímica, morfológica, o relacionada con la conducta y puede manifestarse transitoria o permanentemente.

El término "enfermedad neurodegenerativa", tal como aquí se utiliza, incluye enfermedades que resultan de la degeneración o deterioro del tejido nervioso, en particular de las neuronas, que conduce, a lo largo del tiempo, a una disfunción o a una incapacidad; el término degeneración incluye pérdida de la viabilidad celular, pérdida de la función celular y/o pérdida del número de células (neuronas y otras). Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de enfermedades neurodegenerativas incluyen enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Alexander, déficits cognitivos y/o psicomotores, ataxias, demencias, enfermedades cerebrovasculares, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple (EM), así como enfermedades asociadas al envejecimiento, procesos patológicos asociados a la edad y progeria. En una realización particular, dicha enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad relacionada con la muerte neuronal causada por una sustancia neurotóxica, por ejemplo, una sustancia que produce estrés de retículo endoplásmico, apoptosis, desorganización del citoesqueleto, degeneración de los ganglios basales o daño mitocondrial.

5 Los términos “neuroprotección” y “neuroprotector”, tal como aquí se utilizan, se refieren a la atenuación de los efectos de la degeneración o muerte neuronal mediante cualquier mecanismo conocido o por conocer por ejemplo, necrosis, apoptosis, autofagia, excitotoxicidad, daño oxidativo, daño mitocondrial, daño de retículo endoplásmico, deposición de subproductos, pérdida de la arquitectura celular, etc, o a la desaparición de los efectos de la degeneración o muerte neuronal mediante cualquier mecanismo conocido o por conocer por ejemplo, necrosis, apoptosis, autofagia, excitotoxicidad, daño oxidativo, daño mitocondrial, daño de retículo endoplásmico, deposición de subproductos, pérdida de la arquitectura celular, etc., o a la disminución o desaparición de sus efectos secundarios.

10 El término “sujeto”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un miembro de una especie de mamífero, e incluye, pero no se limita a, animales domésticos, primates y humanos; preferentemente, el sujeto es un ser humano, masculino o femenino, de cualquier edad o raza. En una realización particular, dicho sujeto es un mamífero que padece, o es susceptible de padecer una enfermedad neurodegenerativa, tal como una enfermedad neurodegenerativa crónica o una enfermedad asociada al envejecimiento.

15 El término “sal” debe entenderse que significa cualquier forma de derivados de xantocilinas en el que el compuesto asume una forma iónica, o está cargado y se acopla con un contraión (un catión o anión) o están en disolución. Por esto debe entenderse también complejos del compuesto activo con otras moléculas e iones, y en particular complejos que se complejan a través de interacciones iónicas.

20 El término “solvato” según esta invención debe entenderse que significa cualquier forma del derivado de xantocilinas de fórmula (I) que tenga unido otra molécula (más probablemente un disolvente) a través de un enlace no covalente. Ejemplos de solvatos incluyen hidratos y alcoholatos, por ejemplo metanolato. Preferiblemente, los solvatos son solvatos farmacéuticamente aceptables.

25 El término “profármaco” o “prodroga” se usa en su sentido más amplio y engloba aquellos derivados que se convierten *in vivo* en los compuestos de la invención. Los expertos en la técnica producirían fácilmente tales derivados, e incluyen, dependiendo de los grupos funcionales presentes en la molécula y sin limitación, los siguientes derivados de los presentes compuestos: ésteres, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, carbamatos, amidas, etc. Ejemplos de métodos bien conocidos para producir un profármaco de un compuesto de actuación dado son conocidos por aquellos expertos en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo, en Krogsgaard-Larsen *et al.*, “Textbook of Drugdesign and Discovery” Taylor & Francis (Abril 2002). Derivados o profármacos particularmente favorables son aquellos que aumentan la biodisponibilidad de los compuestos de esta invención cuando se administran tales compuestos a un paciente (por ejemplo, permitiendo que un compuesto administrado por vía oral se absorba más fácilmente en la sangre) o aquéllos que aumentan la administración del compuesto original a un compartimiento biológico (por ejemplo, el cerebro o sistema linfático) en relación con la especie original.

30 La expresión “farmacéuticamente aceptable” se refiere a composiciones y entidades moleculares que son tolerables fisiológicamente y no producen normalmente reacciones alérgicas o reacciones no favorables similares como trastornos gástricos, mareos, y reacciones del mismo estilo, cuando son administradas en humanos o animales.

35 La expresión “farmacéuticamente aceptable” significa que está aprobado por una agencia reguladora de un gobierno de estado o federal o está incluido en la Farmacopea Estadounidense u otra farmacopea reconocida de modo general para su uso en animales, y de manera más particular en seres humanos.

40 El término “alquilo” se refiere a una cadena hidrocarbonada, lineal o ramificada, consistente en átomos de carbono e hidrógeno, que no contiene insaturaciones, y que tiene de uno a doce átomos de carbono, preferiblemente de uno a ocho átomos de carbono, más preferiblemente de uno a seis átomos de carbono, y que está unida al resto de la molécula a través de un enlace sencillo. Ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, tert-butilo y hexilo.

El término “halógeno” incluye flúor, cloro, bromo o yodo.

45 El término “alquilen” en el sustituyente “O-alquilen-O” se refiere a una cadena hidrocarbonada, lineal o ramificada, consistente en átomos de carbono e hidrógeno, que no contiene insaturaciones, y que tiene de uno a doce átomos de carbono, preferiblemente de uno a ocho átomos de carbono, más preferiblemente de uno a seis átomos de carbono, y que está unida a los átomos de oxígeno a través de un enlace sencillo. Ejemplos del sustituyente “O-alquilen-O” incluyen O-metilen-O (O-CH₂-O), O-etilen-O (O-CH₂-CH₂O), O-propilen-O (O-CH₂-CH₂-CH₂O) o O-butilen-O (O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂O).

50 En un primer aspecto, la presente invención se relaciona con el uso de un compuesto de fórmula (I), tal como se ha definido previamente, o de una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable, para la preparación de un medicamento dirigido a la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

En una realización particular, R₁ se selecciona entre alquilo, OH y O-alquilo, o R₁ se encuentra unido a R₂ formando un grupo –O-alquilen-O.

En otra realización particular, R₂, R₃ y R₄ se seleccionan independientemente entre alquilo, OH y O-alquilo, o R₂ se encuentra unido a R₁ formando un grupo -O-alquilen-O, y/o R₃ y R₄ se encuentran unidos formando un grupo -O-alquilen-O.

De forma preferente, R₄ se encuentra en posición meta del anillo aromático.

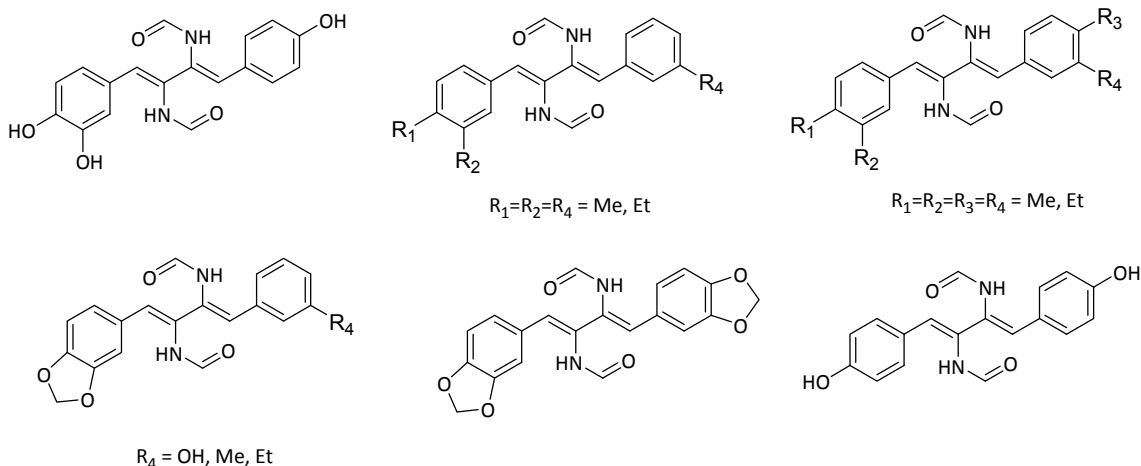
5 También de forma preferente, R₁ es OH, alquilo o forma, junto con R₂, un grupo -O-alquilen-O. Más preferentemente, R₁ es OH, etilo, metilo o forma, junto con R₂, un grupo -O-alquilen-O.

También de forma preferente, R₂ es hidrógeno, OH, alquilo o forma, junto con R₁, un grupo -O-alquilen-O. Más preferentemente, R₂ es hidrógeno, OH, etilo, metilo o forma, junto con R₁, un grupo -O-alquilen-O.

10 También de forma preferente, R₃ es OH, alquilo o forma, junto con R₄, un grupo -O-alquilen-O. Más preferentemente, R₃ es OH, etilo, metilo o forma, junto con R₄, un grupo -O-alquilen-O.

También de forma preferente, R₄ es hidrógeno, OH, alquilo o forma, junto con R₃, un grupo -O-alquilen-O. Más preferentemente, R₄ es hidrógeno, OH, etilo, metilo o forma, junto con R₃, un grupo -O-alquilen-O.

En una forma de realización aún más preferente, el compuesto de fórmula (I) se selecciona de los siguientes compuestos:



15

Los resultados de la investigación realizada por los inventores demuestran que la prevención y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, deterioro cognitivo leve, déficits cognitivos, demencias, enfermedades asociadas al envejecimiento y/o procesos patológicos asociados a la edad y progeria con los análogos de xantocilinas descritos en la presente invención, tiene lugar, al menos parcialmente, mediante neuroprotección, en particular mediante la inhibición directa de la muerte neuronal, esto es, mediante la inhibición de la muerte de las células neuronales del sistema nervioso. Por tanto, este mecanismo de acción tendría lugar sin la participación del sistema inmune.

20

Numerosos ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto tanto el efecto neuroprotector de extractos ricos en derivados de xantocilinas, como de análogos de xantocilinas, frente a la acción de diferentes sustancias neurotóxicas, como su efecto antiapoptótico en neuronas colinérgicas de origen humano.

25

En una forma de realización particular, las enfermedades neurodegenerativas se seleccionan entre enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Alexander, déficits cognitivos y/o psicomotores, ataxias, demencias, enfermedades cerebrovasculares, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple (EM), así como enfermedades asociadas al envejecimiento, procesos patológicos asociados a la edad y progeria. De forma preferente, dicha enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer.

30

Los compuestos de fórmula (I) pueden estar en forma de sales, preferiblemente sales farmacéuticamente aceptables, en forma de solvatos, preferiblemente solvatos farmacéuticamente aceptables, o en forma de profármacos. Dichas sales, solvatos o profármacos farmacéuticamente aceptables del compuesto de fórmula (I), cuando se administran al receptor, pueden proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto de fórmula (I) tal como el descrito en el presente documento. Las sales farmacéuticamente no aceptables también se encuentran dentro del alcance de la invención porque pueden ser útiles para preparar sales farmacéuticamente aceptables.

35

La preparación de sales y solvatos puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables de compuestos proporcionados en el presente documento se sintetizan a partir del

- 5 compuesto original, que contiene uno o más restos básicos, mediante métodos químicos convencionales. En general, tales sales se preparan, por ejemplo, haciendo reaccionar las formas de base libre de estos compuestos con la base o ácido apropiados en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de los dos. En general, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Los ejemplos de las sales de adición de ácido incluyen sales de adición de ácido inorgánico tales como, por ejemplo, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, nitrato, fosfato, etc., y sales de adición de ácido orgánico tales como, por ejemplo, acetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metanosulfonato, p-toluenosulfonato, etc.
- 10 Una forma farmacéuticamente aceptable preferida es la forma cristalina, incluyendo tal forma en una composición farmacéutica. En el caso de sales y solvatos, los restos de disolvente e iónicos adicionales también deben ser no tóxicos. Los compuestos de la invención pueden presentar diferentes formas polimórficas, se pretende que la invención englobe todas estas formas.
- Cualquier compuesto que es un profármaco de un compuesto de fórmula (I) se encuentra dentro del alcance de la invención.
- 15 Los compuestos de la invención también pretenden incluir compuestos que difieren sólo en presencia de uno o más átomos enriquecidos isotópicamente. Por ejemplo, compuestos que tienen las presentes estructuras, excepto para la sustitución de un hidrógeno por un deuterio o tritio, o la sustitución de un carbono por un carbono enriquecido en ^{13}C o en ^{14}C o un nitrógeno enriquecido en ^{15}N , se encuentran dentro del alcance de esta invención.
- 20 Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I) descrita anteriormente pueden incluir isómeros tales como enantiómeros o diastereoisómeros dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros únicos, enantiómeros o diastereoisómeros y mezclas de los mismos se encuentran dentro del alcance de la presente invención.
- Para su administración en la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, los análogos de xantocilinas de fórmula (I) se pueden formular en una composición farmacéutica, en una cantidad terapéuticamente efectiva, junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 25 Dicha composición farmacéutica puede contener uno o varios análogos de xantocilinas de fórmula (I) o uno o más fármacos diferentes, junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. En una realización particular, dicha composición farmacéutica comprende únicamente un derivado de xantocilina de fórmula (I). Dicha composición farmacéutica es útil para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.
- 30 Las composiciones farmacéuticas que comprenden los análogos de xantocilinas de fórmula (I) pueden formularse en cualquier forma farmacéutica de administración adecuada para su administración por la vía de administración elegida. A modo ilustrativo, no limitativo, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en una forma farmacéutica sólida de administración por vía oral (e.g., gránulos, comprimidos, cápsulas, etc.), en una forma farmacéutica líquida de administración por vía oral (e.g., soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.), en una forma farmacéutica para su administración por vía parenteral (e.g., soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.). Para ello, en cada caso, se elegirán los vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados para la forma farmacéutica de administración y vía de administración elegida, por ejemplo, aglutinantes, diluyentes, disgregantes, lubricantes, humectantes, etc., para la formulación de formas farmacéuticas de administración sólidas, y tampones, tensioactivos, etc., para la formulación de formas farmacéuticas de administración líquidas. Dichos vehículos y excipientes deben ser farmacéuticamente aceptables y farmacológicamente tolerables y han de poder ser combinados con otros componentes de la formulación sin ejercer ningún efecto adverso sobre el sujeto tratado. Información sobre dichos vehículos y excipientes, así como sobre dichas formas farmacéuticas de administración de dicho principio activo puede encontrarse en tratados de farmacia galénica. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos, en general, y de sus procedimientos de preparación puede encontrarse en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 1ª Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.
- 35 40 45 La composición farmacéutica empleada en la presente invención comprende, al menos, un análogo de xantocilinas de fórmula (I) en una cantidad terapéuticamente eficiente. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente eficiente" se refiere a la cantidad de fármaco calculada para producir el efecto deseado. La dosis de fármaco a administrar a un sujeto puede variar dentro de un amplio intervalo dependiendo de numerosos factores, entre los que se incluyen las características del fármaco utilizada, e.g., su actividad y vida media biológica, la concentración del fármaco en la composición farmacéutica, la situación clínica del sujeto, la severidad de la patología, la forma farmacéutica de administración elegida, etc. La composición farmacéutica proporcionada por esta invención se puede administrar una o más veces al día con fines preventivos o terapéuticos o con otras pautas de administración, no necesariamente diaria sino también de forma puntual, semanal, etc.
- 50 55 En un aspecto adicional, la presente invención se dirige a un compuesto de fórmula (I), o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.
- En otro aspecto adicional, la presente invención se relaciona con un método para la prevención o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, en un sujeto con necesidad de tratamiento, que comprende la administración a

dicho sujeto de una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficiente de uno o más compuestos de fórmula (I), o una sal, prodroga y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto preferido, este método de prevención o tratamiento actúa mediante neuroprotección, en particular mediante la inhibición directa de la muerte neuronal.

5 En una realización particular, la composición farmacéutica empleada para la prevención o tratamiento de las mencionadas enfermedades puede usarse junto con otros fármacos, por ejemplo, fármacos útiles en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, déficits cognitivos, demencias o enfermedades asociadas con el envejecimiento, con el fin de aumentar la eficiencia de la composición farmacéutica, generándose de este modo una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden facilitarse como una composición farmacéutica separada para su administración al mismo tiempo (administración simultánea) que la composición farmacéutica empleada o en momentos diferentes (administración secuencial). A modo ilustrativo, no limitativo, ejemplos de fármacos adicionales que pueden formar parte de la misma terapia o composición farmacéutica junto con los análogos de xantocinas de fórmula (I) son: fármacos para el tratamiento del Alzheimer (tacrina, rivastigmina, memantina, donepezilo, galantamina, estatinas...), de parkinson (carbidopa, levodopa, bromocriptina, pramipexol, ropinirol, amantadina, rasagilina...), antipsicóticos como el haloperidol, antidepresivos como la amitriptilina, ansiolíticos como el lorazepam, antiinflamatorios como la aspirina, suplementos dietéticos como las vitaminas E, C, B, el folato o el extracto de *Ginkgo biloba* o fármacos contra el resto de neurodegenerativas indicadas en la patente.

20 En un aspecto adicional, la presente invención se dirige a un compuesto de fórmula (II) como se ha definido previamente, o a una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo. Quedan excluidos de dicha fórmula:

- el compuesto en el que R₁-R₄ son OH y R₄ está en posición meta del anillo aromático; y
- el compuesto en el que R₁-R₄ son OCH₃ y el sustituyente R₄ está en posición meta del anillo aromático.

25 En una realización particular, R₁ y R₂ se seleccionan independientemente entre alquilo, OH y O-alquilo, o R₁ y R₂ se encuentran unidos formando un grupo -O-alquilen-O.

En otra realización particular, R₃ y R₄ se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo, OH y O-alquilo, o R₃ y R₄ se encuentran unidos formando un grupo -O-alquilen-O.

De forma preferente, R₄ se encuentra en posición meta del anillo aromático.

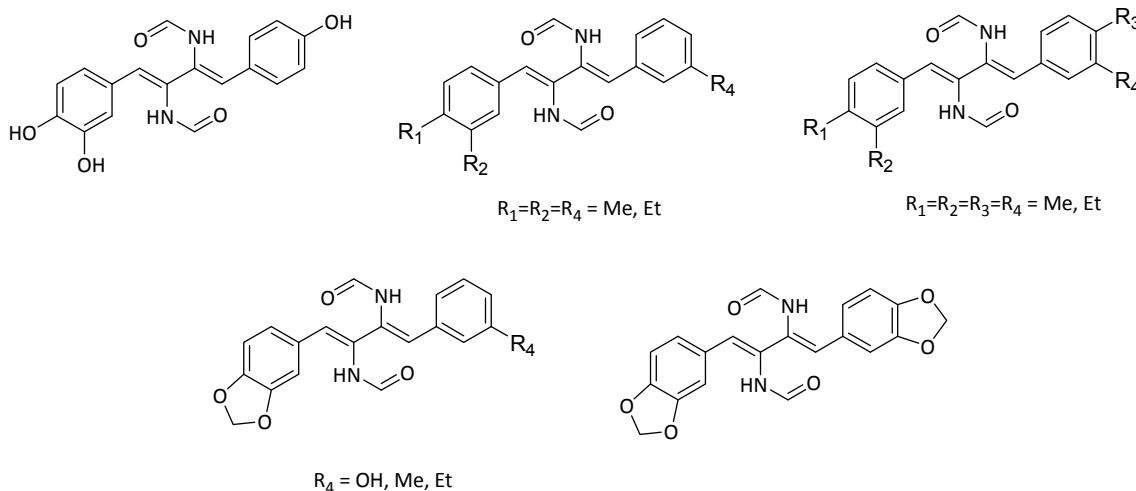
30 También de forma preferente, R₁ es OH, alquilo o forma, junto con R₂, un grupo -O-alquilen-O. Más preferentemente, R₁ es OH, etilo, metilo o forma, junto con R₂, un grupo -O-alquilen-O.

También de forma preferente, R₂ es OH, alquilo o forma, junto con R₁, un grupo -O-alquilen-O. Más preferentemente, R₂ es OH, etilo, metilo o forma, junto con R₁, un grupo -O-alquilen-O.

También de forma preferente, R₃ es OH, alquilo o forma, junto con R₄, un grupo -O-alquilen-O. Más preferentemente, R₃ es OH, etilo, metilo o forma, junto con R₄, un grupo -O-alquilen-O.

35 También de forma preferente, R₄ es hidrógeno, OH, alquilo o forma, junto con R₃, un grupo -O-alquilen-O. Más preferentemente, R₄ es hidrógeno, OH, etilo, metilo o forma, junto con R₃, un grupo -O-alquilen-O.

En una forma de realización aún más preferente, el compuesto de fórmula (II) se selecciona de los siguientes compuestos:



En un aspecto adicional, la presente invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (II), o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante o excipiente con el que se administra el principio activo. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Se emplean preferiblemente como vehículos agua o disoluciones acuosas de solución salina y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para las disoluciones inyectables. Vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin, 1995. Preferiblemente, los vehículos de la
10 invención están aprobados por la agencia reguladora de un gobierno de estado o el federal o están enumerados en la Farmacopea Estadounidense u otra farmacopea reconocida en general para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

Ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (disoluciones, suspensiones o emulsiones) para la administración oral, tópica o parenteral.

15 La administración de los compuestos o composiciones de la presente invención puede ser mediante cualquier método adecuado, tal como infusión intravenosa, preparaciones orales y administración intravenosa e intraperitoneal. Pueden administrarse composiciones farmacéuticas que contienen compuestos de la invención mediante encapsulación en liposomas o nanoesferas, en formulaciones de liberación sostenida o mediante otros medios de administración habituales.

20 Las formulaciones se pueden preparar según métodos convencionales tales como los que se describen en las Farmacopeas Española, Europea o de Estados Unidos de América, o en textos de referencia similares, por ejemplo "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 10 Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

25 La dosificación correcta de los compuestos variará según la formulación particular, el modo de aplicación, el sitio y la enfermedad neurodegenerativa particular que se esté tratando. También deben tenerse en cuenta otros factores como la edad, peso corporal, sexo, dieta, tiempo de administración, tasa de excreción, combinaciones de fármacos, sensibilidades de reacción y gravedad de la enfermedad. Puede llevarse a cabo la administración de manera continua o periódica dentro de la dosis tolerada máxima.

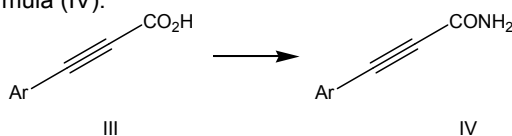
30 Los compuestos y composiciones de esta invención pueden usarse con otros fármacos para proporcionar una terapia de combinación. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición, o pueden proporcionarse como una composición aparte para la administración al mismo tiempo o en un tiempo diferente.

En un aspecto adicional, la presente invención se dirige a un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (II) a partir de un extracto producido por la especie *Penicillium chrysogenum*. De forma particular, dicho extracto es producido por una cepa de microorganismo de la especie *Penicillium chrysogenum* depositada en el CECT con el número de registro 20783.

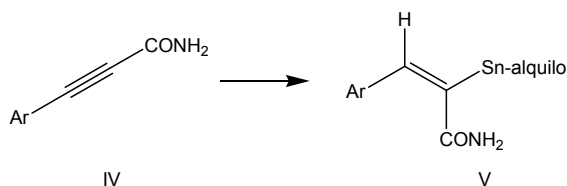
35 En una forma de realización particular, para la obtención de los compuestos de fórmula (II), se parte de una muestra procedente de una esponja marina recogida en la zona de Cabo de Gata (Almería), a partir de la cual se hace crecer una cepa correspondiente a la especie *Penicillium chrysogenum*. Dicha cepa permite obtener un extracto a partir del cual, mediante fraccionamiento y purificación, se obtienen los compuestos de fórmula (II), tal como se describe en los ejemplos 1 y 5 de la presente solicitud.

40 De forma alternativa, los compuestos de fórmula (II) se pueden obtener por vía sintética mediante un procedimiento que comprende:

- a) una reacción de adición mediante la cual el ácido aril propiónico de fórmula (III) se transforma en su correspondiente amida de fórmula (IV):



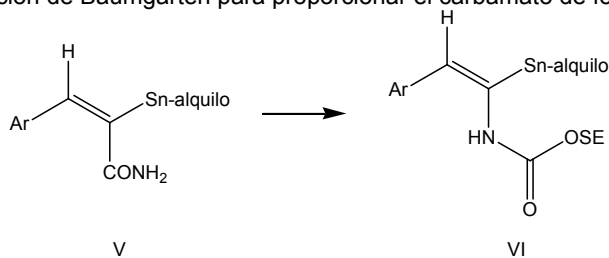
- 45 b) hacer reaccionar la amida de fórmula (IV) con un hidruro de alquilestaño para producir el estannano de fórmula (V):



y,

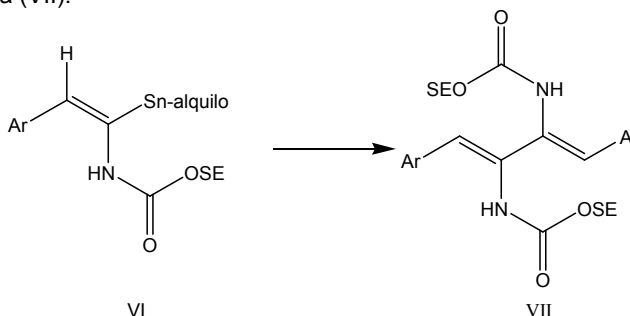
a continuación, someter el compuesto de fórmula (V) a una secuencia de reacciones que comprende:

c.1) reacción de oxidación de Baumgarten para proporcionar el carbamato de fórmula (VI) protegido:



donde SE significa un grupo protector;

d.1) someter el carbamato de fórmula (VI) a una reacción de homoacoplamiento para dar el compuesto de fórmula (VII):



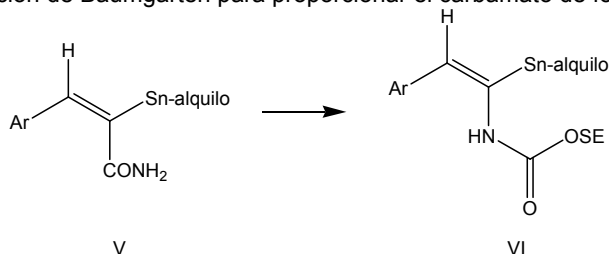
y

e.1) desproteger los grupos carbamato e introducir grupos formamido para obtener el compuesto de fórmula (II) de la invención;

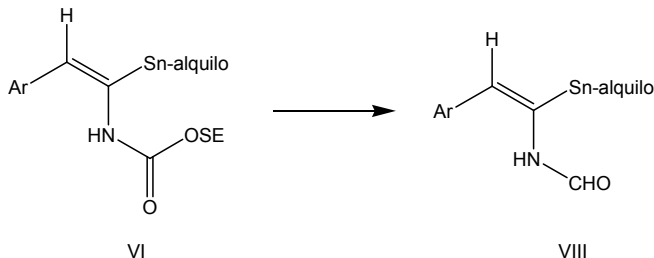
o

someter el compuesto de fórmula (V) a una secuencia de reacciones que comprende:

c.2) reacción de oxidación de Baumgarten para proporcionar el carbamato de fórmula (VI) protegido:



d.2) desproteger los grupos carbamato e introducir grupos formamido para obtener el compuesto de fórmula (VIII):



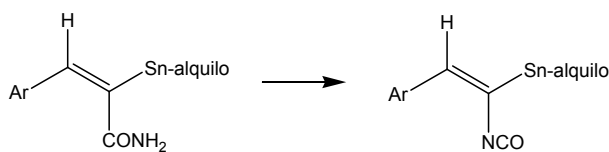
y

e.2) someter la formamida de fórmula (VIII) a una reacción de homoacoplamiento para proporcionar el compuesto de fórmula (II) de la invención;

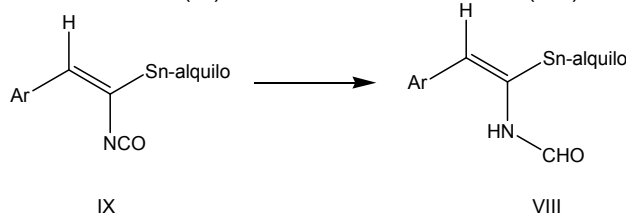
o

someter el compuesto de fórmula (V) a una secuencia de reacciones que comprende:

c.3) reacción de oxidación de Baumgarten para proporcionar el carbamato de fórmula (IX):



d.3) convertir el carbamato de fórmula (IX) en la formamida de fórmula (VIII):



y

5 e.3) someter la formamida de fórmula VIII a una reacción de homoacoplamiento para proporcionar el compuesto de fórmula (II) de la invención;

donde el grupo arilo incluye los sustituyentes R_1 a R_4 en función del compuesto de fórmula (II) que se desee obtener.

10 La etapa a) de la ruta sintética transcurre a través de la formación inicial de un cloruro de ácido con posterior adición del grupo amino. En una forma de realización particular, dicha reacción se lleva a cabo en presencia de un compuesto de fórmula XCO_2R donde X es un haluro y R un grupo alquilo, tal como se han definido previamente, y de una trialkilamina. De forma preferente, el compuesto de fórmula XCO_2R es $ClCO_2Et$ y la trialkilamina es trietilamina.

15 La etapa b) de la ruta sintética supone una hidroestanninación, de manera que se reduce el triple enlace del compuesto de fórmula (IV), incorporándose un grupo alquilestannano. En una forma de realización particular, esta reacción se lleva a cabo en presencia de un hidruro de alquilestaño y es catalizada por un compuesto de paladio. De forma preferente, el hidruro de alquilestaño es hidruro de tributilestaño y el catalizador es un complejo de Pd y trifenilfosfina, en particular, $Pd(PPh_3)_4$.

20 En una forma de realización particular, la reacción de oxidación de Baumgarten de la etapa c.1) que conduce a la obtención del carbamato protegido de fórmula (VI) se realiza utilizando un agente oxidante, como puede ser $Pb(OAc)_4$, en presencia de un silanol, como por ejemplo $TMS(CH_2)_2OH$ (2-Trimetilsilanil-etanol). Dicho silanol permite incorporar grupos silil eter con el fin de proteger los grupos carbamato.

En otra forma de realización particular, la reacción de homoacoplamiento d.1) se realiza utilizando un catalizador de cobre, por ejemplo $CuCl_2$, y $Pb(OAc)_2$.

25 La etapa e.1) de la ruta sintética se lleva a cabo en dos fases, una primera en la que se incorporan grupos formamido mediante una reacción de adición en presencia de una base fuerte y una segunda en la que se eliminan los grupos protectores del grupo carbamato.

30 En una realización particular, la mencionada incorporación de los grupos formamido se realiza con un anhídrido acético fórmico en presencia de una base fuerte como por ejemplo hexametildisilazida de litio (conocida comúnmente como LiHMDS). Por su parte, la fase de desprotección de los grupos carbamato en la etapa e.1) se puede llevar a cabo utilizando una sal de amonio cuaternaria, en concreto, fluoruro de tetra-*n*-butilamonio, ya sea en su forma de trihidrato o disuelta en THF, dado que es una sal comúnmente empleada para eliminar grupos protectores silil eter.

La reacción de oxidación de Baumgarten de la etapa c.2) corresponde con la etapa c.1) y, por tanto, se lleva a cabo con un agente oxidante en presencia de un silanol, tal como se ha mencionado para la etapa c.1).

35 La etapa d.2) de la ruta sintética se lleva a cabo en dos fases, una primera en la que se incorpora un grupo formamido mediante una reacción de adición en presencia de una base fuerte y una segunda en la que se elimina el grupo protector del grupo carbamato. En una realización particular, la mencionada incorporación del grupo formamido se realiza con un anhídrido acético fórmico en presencia de una base fuerte como por ejemplo hexametildisilazida de litio (conocida comúnmente como LiHMDS). Por su parte, la fase de desprotección del grupo carbamato en la etapa e.1) se puede llevar a cabo utilizando una sal de amonio cuaternaria, en concreto, fluoruro de tetra-*n*-butilamonio, ya sea en su forma de trihidrato o disuelta en THF, dado que es una sal comúnmente empleada para eliminar grupos protectores silil eter.

40 En otra forma de realización particular, la reacción de homoacoplamiento e.2) se realiza también utilizando un catalizador de cobre, por ejemplo $CuCl_2$, y $Pb(OAc)_2$, tal como se ha descrito para la etapa d.1).

La reacción de oxidación de Baumgarten de la etapa c.3) se lleva a cabo con un agente oxidante, tal como se ha mencionado para las etapas c.1) y c.2, pero en ausencia del silanol dado que no es necesaria la protección del grupo isocianato.

5 Por su parte, la reacción d.3) de transformación del carbamato de fórmula (VI) en la formamida de fórmula (IX) se realiza en presencia de un agente reductor. En una realización particular, dicho agente reductor es un borohidruro de litio, preferentemente trietil borohidruro de litio.

En otra forma de realización particular, la reacción de homoacoplamiento e.3) se realiza también utilizando un catalizador de cobre, por ejemplo CuCl_2 , y $\text{Pb}(\text{OAc})_2$, tal como se ha descrito para la etapa d.1) y e.2).

10 Este tipo de ruta sintética permite la obtención de los compuestos en los que los sustituyentes R_1 y R_3 y R_2 y R_4 de cada anillo aromático son iguales. Para la obtención de compuestos en los que no se da esta circunstancia, es decir para los compuestos asimétricos, se puede seguir un método como el que se describe en *Tetrahedron Letters*, 2005, 46, 5017-5020.

Un último aspecto de la invención hace referencia a una cepa de microorganismo de la especie *Penicillium chrysogenum* depositada en el CECT con el número de registro 20783.

15 Dicha cepa se obtuvo de una esponja marina, tal como se describe en el ejemplo 1 del presente documento. La identificación de la cepa se realizó mediante técnica PCR y secuenciación tal como se describe en el ejemplo 4 del presente documento, así como por observación microscópica y macroscópica.

A partir de dicha cepa, es posible obtener un extracto del cual se aíslan los compuestos empleados en la presente invención tal como se ha descrito previamente y como ponen de manifiesto los ejemplos 1 y 5 del presente documento.

20 Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados en sentido limitativo de la misma.

EJEMPLO 1. Crecimiento de la cepa 0882-08 y obtención del extracto 08_055 C08

1.1. Aislamiento y crecimiento de la cepa

25 Se aisló la muestra M082-08 de una esponja marina tomada en Cabo de Gata (Almería) (Figura 1). Para procesar la muestra se extrajo un trozo de la esponja con ayuda de pinzas y tijeras estériles y se realizaron varios lavados con Agua Marina Artificial (ASW), cuya composición en g/L es: KBr 0,1; NaCl 23,48; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10,61; $\text{KCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,47; KCl 0,66; $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,04; Na_2SO_4 3,92; NaHCO_3 0,19; H_3BO_3 0,03; esterilizada en autoclave (Presoclave II 75 L, de J.P. Selecta) a 121°C durante 20 minutos.

30 Luego se extrajeron dos trozos de 0,5 cm³, depositándolos en una placa petri de 90 mm conteniendo 30 ml de medio PDA-marino, cuya composición en g/L es: agar dextrosa patata 39; agar 5; esterilizada en autoclave (Presoclave II 75 L, de J.P. Selecta) a 121°C durante 20 minutos.

35 La placa se incubó en una estufa universal (INE700, Memmert) a 28°C durante 3-5 días, comprobando el crecimiento de las colonias periódicamente. La colonia de la cepa 0882_08 se aisló como cultivo puro con ayuda de un asa de siembra estéril, inoculándola en una placa petri de 90 mm con 30 ml de medio PDA-marino tras lo que se incubó en una estufa a 28°C (Figura 2).

40 Una vez obtenido el cultivo puro se hizo crecer en tubos de agar inclinado de medio Power (PW), cuya composición en g/L es: sacarosa 15; peptona bacteriológica 2,5; lactosa 2,5; sólidos de maceración del maíz 0,5; NaCl 2; NaNO_3 1; KCl 26,1; K_2HPO_4 0,25; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25; KH_2PO_4 0,03; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,0015; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,0005; agar 20; pH 5,5; esterilizada en autoclave (Presoclave II 75 L, de J.P. Selecta) a 121°C durante 20 minutos.

45 Transcurridos 7 días y comprobado que el cultivo había crecido y esporulado, se preparó una suspensión de esporas con el siguiente procedimiento: se añaden 5 ml de glicerol 40% (p/v) estéril a cada tubo y de 10-15 perlas de vidrio de 5 mm de diámetro. Se agita el cultivo hasta conseguir una suspensión homogénea y con ella se generan los crioviales que se conservan a -80°C en un ultracongelador (905 -86C ULT Freezer, Thermo Scientific).

1.2. Obtención del extracto

50 La preparación del cultivo para la obtención del extracto natural se realizó inoculando un tubo de polipropileno de 13 ml con 3 ml de agar inclinado de medio YES sólido, cuya composición en g/L fue: sacarosa 150; extracto de levadura 20; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; agar 10; con 0,05 ml de la suspensión de esporas conservada a -80°C. La incubación del tubo se llevó a cabo en una estufa a 28°C durante 14 días. Pasado ese tiempo se añadió al cultivo 3 mL de acetato de etilo, tras lo que se agitó vigorosamente con un vórtex durante unos segundos. Después se introdujo durante 15 minutos en un baño de ultrasonidos, tras lo que se añadió 1 g de sulfato sódico anhidro y se volvió a agitar unos

segundos en un vórtex. Se centrifugó a 3000xg. durante 10 minutos, tras lo que se recogió el sobrenadante. Al pellet resultante de la centrifugación se le añadieron otros 3 mL de acetato de etilo y se realizó otro ciclo de extracción (éste sin adición de sulfato sódico), al final del cual el sobrenadante se unió al extraído anterior. Se evaporó en un rotavapor o bajo corriente de nitrógeno, hasta sequedad, resultando entre 1 a 10 mg del extracto crudo seco. Se evaporó en rotavapor y speed-vac hasta sequedad.

EJEMPLO 2. Evaluación de la capacidad neuroprotectora y antioxidante del extracto 08_055 C08

2.1. Evaluación de la capacidad neuroprotectora

El extracto crudo obtenido se resuspendió en 800 µL de DMSO para su ensayo sobre el modelo de muerte celular por estrés oxidativo. Este ensayo se realiza sobre células en cultivo de neuroblastoma humano SK-N-MC procedentes de "American Type Culture Collection (ATCC, Cod. HTB-10™)", siguiendo estrictas normas de esterilidad y realizando la manipulación en cabinas de seguridad biológica clase II que siguen la norma europea EN 12469. Las células fueron mantenidas en medio MEM (Minimum Essential Medium Eagle (MEM) suplementado con piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, gentamicina 0,05 mg/ml y suero fetal bovino 10%. Sobre estas células se analizó la inhibición producida por el extracto de la muerte celular causada por el tratamiento con xantina/xantina oxidasa (XXO) que origina daño oxidativo (producción de radicales libres como peróxido de hidrógeno, anión superóxido, radical hidroxilo) lo que desencadena muerte celular. Estas células, en fase no superior a 15, fueron sembradas sobre placas de 96 pocillos tratadas para células adherentes con una concentración celular de 5x10⁴ células/pocillo. Tras 24 h de incubación de las células a 37°C y 5% CO₂ se realizaron los tratamientos celulares para las condiciones de control (medio de cultivo); XXO (xantina 10 µM/ xantina oxidasa 60 mU/mL, que produce la muerte del 50% de las células); XXO más el extracto a dilución final 1/100, 1/400, 1/1.000, 1/4.000 y 1/10.000. Tras 22 h de incubación se añadió el reactivo WST-1 (Roche), siguiendo las especificaciones del fabricante. El test WST-1 se basa en la medida de la actividad metabólica de tal forma que las células que están metabólicamente activas (vivas) reducen la sal de tetrazolium del WST-1 a formazán mediante el sistema succinato-tetrazolium reductasa de la cadena respiratoria mitocondrial. El formazán producido es detectado colorimétricamente.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3, como el porcentaje de muerte celular para cada dilución referido a la muerte producida por la XXO. Se observó protección a las diluciones 1/400, 1/1.000, 1/4.000 y 1/10.000 siendo la máxima del 90% a 1/400, por lo que el extracto 08_055 C08 muestra un efecto protector de la muerte de células humanas de origen neuronal causada por estrés oxidativo.

2.2. Evaluación de la capacidad antioxidante

A partir de los resultados anteriores los inventores decidieron evaluar la capacidad antioxidante in vitro del extracto, para lo que se utilizó el ensayo TEAC (capacidad de absorción por transferencia de electrones). Este método se basa en la formación del radical ferril-mioglobina producido por la reacción de la metmioglobina con el peróxido de hidrógeno, seguido por la oxidación del reactivo ABTS [ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] por la ferril-mioglobina, lo que produce el catión radical ABTS^{•+}, que puede ser determinado colorimétricamente. En este ensayo los compuestos con capacidad antioxidante suprimen la producción del radical de forma dependiente de concentración. Para cuantificar la capacidad antioxidante se usa una curva estándar con concentraciones crecientes de trolox (análogo hidrosoluble de la vitamina E), de tal forma que los resultados se indican como medida de equivalentes trolox (TE). El ensayo del extracto 08_055 C08 a dilución 1/1.000 dio un resultado de 101±18 µM TE, lo que indica que este extracto muestra capacidad antioxidante in vitro.

EJEMPLO 3. Evaluación de la bioseguridad del extracto 08_055 C08

3.1. Evaluación de la seguridad en líneas celulares humanas

A partir de los resultados anteriores los inventores decidieron evaluar adicionalmente la seguridad de este extracto en dos líneas celulares humanas: de origen neuronal (SK-N-MC, Cod. ATCC HTB-10™) y hepático (HepG2, Cod. ATCC HB8065™), mediante la medida de la viabilidad de las células con el extracto 08_055 C08 a la máxima dilución (1/100) para lo que se utiliza la medida de la actividad metabólica mediante el test WST-1 (Roche). Se obtiene una viabilidad de 126±7% respecto al control en las células SK-N-MC y de 101±7% en las HepG2, por lo que el extracto 08_055 C08 no muestra toxicidad in vitro.

3.2. Evaluación de la seguridad en embriones de pez cebra

A partir de los resultados anteriores los inventores decidieron evaluar la bioseguridad en embriones de pez cebra siguiendo las especificaciones definidas en el Draft Guideline del May 30, 2006 (1st Versión) denominado "OECD guideline for the testing of chemicals draft proposal for a new guideline: Fish Embryo Toxicity (FET) Test". Este test constituye un método alternativo al test de toxicidad aguda con peces juveniles y adultos (OECD Test Guideline 203). Tres embriones de pez cebra, en 10 réplicas (n=30 por condición) fueron expuestos en cada uno de los pocillos de

una microplaca de 96 pocillos a tres concentraciones de la sustancia a evaluar (1/100, 1/200, 1/400). El test se inició inmediatamente después de la fertilización y se continuó durante 48 horas sin recambio de tratamiento. Los efectos letales, descritos por cuatro puntos finales, fueron determinados por comparación con los controles para identificar los valores de LC50, NOEC y LOEC, parámetros que se definen a continuación. LC50: Concentración de la muestra problema que produce la mortalidad del 50% de los animales. NOEC: Concentración más alta que no causa mortalidad. LOEC: Concentración más baja que produce el 100% de mortalidad. La metodología del test se basó en el uso de una serie de concentraciones del compuesto a evaluar así como un control apropiado. Los siguientes parámetros toxicológicos fueron determinados en este estudio. Parámetros letales: i) determinación de número de huevos coagulados; ii) desprendimiento de la cola; iii) ritmo cardíaco (presencia o ausencia); iv) formación de las somitas (series longitudinales del mesodermo que por delaminación, fusión y migración se convierten en el esqueleto axial, la dermis y los músculos dorsales y la pared del cuerpo y las extremidades). Además, también se estudiaron los siguientes parámetros subletales: i) movimientos espontáneos; ii) pigmentación; iii) formación de edemas; iv) formación de coágulos. Por último se estudiaron los siguientes parámetros teratogénicos: i) malformaciones en órganos y estructuras; ii) escoliosis; iii) raquitismo, iv) retardo generalizado del desarrollo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4, mostrando los parámetros de toxicidad en embrión de pez cebra en un ensayo basado en el FET a las 48 horas post-tratamiento (hpt) del extracto 08_055 C08. Se observa que a las dosis utilizadas y a tiempo final (48 h post tratamiento), no se determinó ningún fenómeno toxicológico en los embriones de pez cebra, por lo que dicho extracto mostró una extraordinaria seguridad en los modelos evaluados.

EJEMPLO 4. Identificación y escalado de la cepa 0882_08

4.1. Identificación de la cepa

La identificación de la cepa se realizó mediante una PCR que amplifica 560 pb del gen 28S. La mezcla de PCR lleva los siguientes componentes: tampón de PCR, MgCl₂ 1.5 mM, mezcla de dNTP 0.2 mM, oligonucleótidos 0.4 μM (NL1: 5'-gca tat caa taa gcg gag gaa aag-3' (SEQ ID No:1) y NL4: 5'-ggg ccg tgt ttc aag acg g-3' (SEQ ID No:2)), ADN Polimerasa PFU (Bioneer) 1 U, ADN extraído de la cepa con el kit Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega) a dilución final 1:50.

El programa de PCR consistió en: desnaturalización en 1 ciclo de 96°C durante 5 min; amplificación en 30 ciclos con tres rampas de temperatura: 94°C durante 30 seg, 60°C durante 40 seg y 72°C durante 1 min; elongación en 1 ciclo de 72°C durante 10 min.

El fragmento obtenido del gen 28S (Figura 5, SEQ ID No:3) fue secuenciado y mostró similitud con el género *Penicillium*, por comparación con la base de datos de la herramienta "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI, EE.UU), lo que coincidía con sus características microscópicas y macroscópicas. A partir de este resultado se hizo una primera aproximación de esta cepa al género *Penicillium*. Así pues, según el procedimiento descrito por Samson y Frisvad (2004) [Frisvad&Samson, Stud. Mycol. 2004; 49: 1-173], la cepa fue inoculada en los siguientes medios de cultivo e incubada durante 7 días a distintas temperaturas:

- Czapek Yeast Extract Agar (CYA). Incubada a 5°C, 26°C y 37°C
- Malt Extract Agar (MEA). Incubada a 26°C
- Yeast Extract Sucrose Agar (YES). Incubada a 26°C
- Creatine Sucrose Agar (CREA). Incubada a 26°C
- 25% Glycerol Nitrate Agar (G25N). Incubada a 26°C.

Las características utilizadas en la clasificación fueron: observación microscópica, datos del crecimiento, morfología de las colonias y formación del estado teleomórfico si lo hubiese. Los resultados de observación microscópica mostraron cuerpos fructíferos (pinces) propios del género *Penicillium*. Conidióforos con tres puntos de ramificación (terverticilados) característicos del subgénero *Penicillium*. Estipe con pared lisa. Fiálides ampuliformes. Conidios esféricos a elipsoidales, lisos.

Las características estudiadas en la observación macroscópica fueron: tamaño, textura y color de las colonias, producción de exudado y pigmento difusible y observación del reverso. Los resultados son los siguientes:

- Crecimiento en CYA a 26°C: colonias de 35 mm de diámetro. Textura aterciopelada a flocosa, fasciculada. Micelio de color blanco. Conidios de color verde grisáceo. No produce exudado. Produce pigmento difusible al medio de color amarillo. Reverso de color amarillo.
- Crecimiento en CYA a 5°C y 37°C: colonias de 10 mm de diámetro. Textura aterciopelada. Conidios de color blanco. No produce exudado ni pigmento difusible al medio. Reverso crema.

- Crecimiento en MEA y G25N a 26°C: colonias de 33 mm y 27 mm de diámetro, respectivamente. Textura flocosa. Conidios de color verde grisáceo. No produce exudado ni pigmento difusible al medio. Reverso crema.
- Crecimiento en YES a 26°C: colonias de 40 mm de diámetro. Textura aterciopelada a flocosa. Micelio de color blanco. Conidios de color verde grisáceo. No produce exudado ni pigmento difusible al medio. Reverso crema con centro grisáceo.
- Crecimiento en CREA a 26°C: escaso crecimiento, colonias de 9 mm de diámetro. Producción de ácido.

A continuación se realizó la identificación a nivel molecular por los siguientes métodos moleculares:

- Amplificación y secuenciación de la zona del DNA ribosómico que comprende los espacios intergénicos ITS1 e ITS2 y que incluye al gen 5,8S rDNA.
- Amplificación y posterior secuenciación parcial del gen de la β -Tubulina (con lecturas en las dos direcciones), con los cebadores Bt2a y Bt2b (Glas & Donaldson, Appl Environ Microb 1995; 61:1323-30).

Los productos de amplificación fueron de 495 y de 477 pares de bases respectivamente. Como resultado de su comparación con las secuencias existentes en las bases de datos, se obtuvo un 100% de similitud para la zona ITS-5.8S rDNA y un 99% para el gen de la β -Tubulina con la especie *Penicillium chrysogenum*, cepa CBS 306.48.

Así, pues se concluye que la cepa pertenece a la especie *Penicillium chrysogenum*.

4.2. Escalado del cultivo

Para el crecimiento escalado del cultivo se prepararon los cultivos para la obtención del extracto natural inoculando con 1.2 ml de suspensión de esporas por placa 25 placas de 14 cm de diámetro conteniendo 80 ml de medio YES, cuya composición en g/L es: sacarosa 150; extracto de levadura 20; MgSO₄·7H₂O 0,5; agar 10; e incubando dichas placas a 28°C durante 14 días.

La extracción del cultivo se realizó por trituración con ayuda de una batidora de forma que quedara totalmente homogéneo, después se añadió 2300 mL de acetato de etilo y se mantuvo en agitación durante 6 horas con ayuda de un agitador de varillas. Pasado este tiempo se recogió el sobrenadante y se filtró a través de un embudo de papel. Se repitió la extracción añadiendo 1900 mL de acetato de etilo y se mantuvo en agitación durante otras 4 horas. El sobrenadante se recogió junto al anterior. Todo ello se evaporó a sequedad mediante un rotavapor, resultando en 3.3 g del extracto crudo seco.

EJEMPLO 5. Fraccionamiento, purificación bioquímica y resolución de la estructura del compuesto activo presente en el extracto 08_055 C08 del cultivo de la cepa 0882_08

5.1. Fraccionamiento y purificación

El extracto 08_055 C08 se analizó por HPLC analítico (Agilent 1100-DAD, Columna Zorbax RX-C8 5 μ m 4.6X250 mm) con 5-100% acetonitrilo/agua durante 40 min y se observó que el extracto contenía metabolitos en todos los rangos de polaridad, por ello se realizó un fraccionamiento de baja presión genérico por resina de adsorción/resorción de amplio rango (SP207ss) en un cromatógrafo automatizado Combiflash®. Para ello se disolvió 1.2 g del extracto en 2 mL de acetato de etilo/metanol 50/50 y después se le añadió 5 gramos de resina sp207ss escurrida en agua, evaporando a sequedad todo el disolvente obteniendo así la cabeza de la columna de cromatografía. Así pues el total del crudo se fraccionó en un cromatógrafo automatizado Combiflash mediante columna de 70 mL (100mm x 35mm) de resina SP207ss en un gradiente parabólico de 10-100% de acetona en agua durante 25 min con un lavado adicional de 35 minutos de acetona al 100%.

Se obtuvieron 17 fracciones a las que se añadió 1.4 mL de DMSO por fracción y se evaporaron los disolventes de cromatografía mediante un evaporador centrífugo Genevac durante 7 horas, resultando las fracciones en DMSO 100% al 715X WBE (Whole Broth Equivalent o Concentración Equivalente en Fermentación).

Las fracciones se analizaron frente la muerte por xantina/xantina oxidasa (con el mismo método usado para el análisis de cribado descrito en el Ejemplo 2), obteniendo protección en varias de las fracciones analizadas, por lo que la purificación se centró en la zona de mayor actividad a diluciones altas.

Para ello se escaló el fraccionamiento, mediante HPLC preparativo, de las fracciones positivas con un gradiente del 2 al 20% de acetonitrilo/agua con una columna Zorbax SB-C8 7 μ m 21.2 x 250 mm con un flujo de 20 mL/min y detección a 210 y 280 nm. Se ensayaron las fracciones de HPLC preparativo para localizar qué pico o picos de la cromatografía presentaban actividad protectora de la muerte.

Se obtuvieron dos compuestos mayoritarios (Figura 6) en las fracciones G27 y G28, cuyo análisis por HPLC/MS de baja resolución mostró que presentaban pesos moleculares de m/z 340 y 324, respectivamente. Durante la re-purificación, apareció un tercer pico para el que, el análisis por HPLC/MS de baja resolución indicó un peso molecular m/z 324, y que por HPLC analítico y RMN/Masas se confirmó como un confórmero presente en equilibrio con el G28 original.

5.2. Resolución de la estructura

Para llevar a cabo la elucidación estructural de los dos compuestos bioactivos purificados G27 (m/z 340) y G28 (m/z 324) se utilizó una combinación de técnicas espectroscópicas que incluyeron la espectrometría de masas de alta resolución ESI-TOF y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) en una y dos dimensiones, apoyadas con búsquedas en bases de datos que usan la fórmula molecular y/o características estructurales que pueden ser deducidas a partir de los espectros de RMN del compuesto. Para esta última tarea se utilizó la última edición del Diccionario de Productos Naturales de Chapman & Hall (Chapman & Hall, 2011).

5.2.1. Elucidación de la estructura de G28

Para la elucidación de la estructura del compuesto G28 se realizó un análisis de alta resolución mediante ESI-TOF que indicó la presencia de un ión pseudomolecular a una relación m/z de 325.1169, en concordancia con una fórmula molecular de C₁₈H₁₆N₂O₄ (calculado para [M+H]⁺ 325.1183, Δ=-4.3 ppm). La presencia en el espectro de masas (Figura 7) de los correspondientes aductos de amonio (m/z 342.1418), sodio (m/z 347.0989) y potasio (m/z 363.0737) confirmó la fórmula molecular propuesta para el compuesto.

Una búsqueda de dicha fórmula molecular en el Diccionario de Productos Naturales Chapman & Hall reveló la presencia de dos moléculas con estas características, N-Nitrosoxylopine, aislada de la planta *Duguetia furfuracea*, y (1Z,3Z)-1,4-Di(4-hidroxifenil)-2,3-diformamido-1,3-butadieno, molécula previamente obtenida a partir de caldos de cultivo del hongo *Penicillium notatum*. Tras una prueba de solubilidad en distintos disolventes, se decidió que el DMSO-d₆ era el más apropiado para el registro de los espectros de RMN.

El espectro de 1H RMN (Figura 8) resultó ser bastante complejo, con un número de señales que indicaba la presencia de, al menos, 32 protones en la molécula, lo cual indujo a pensar que la molécula presentaba algún tipo de equilibrio conformacional, ya detectado durante el proceso de purificación, que daba lugar a un desdoblamiento de las señales. Adicionalmente, el espectro contenía, aparte de las señales residuales del disolvente deuterado, señales debidas únicamente a la presencia de protones aromáticos y/o de doble enlace y de protones unidos a heteroátomos, permitiendo descartar todas aquellas moléculas que contienen protones alifáticos tales como N-Nitrosoxylopine. El otro candidato encontrado en la búsqueda por fórmula molecular, (1Z,3Z)-1,4-Di(4-hidroxifenil)-2,3-diformamido-1,3-butadieno, mostraría características estructurales que podrían estar de acuerdo con el espectro observado y además incluiría dentro de su estructura dos grupos formamida, cuyo equilibrio conformacional podría ser detectado mediante RMN, dando lugar a un desdoblamiento de señales. Existían tres posibles conformaciones para los dos grupos amida: cis-cis, trans-trans y cis-trans, con dos posibilidades equivalentes para éste último debido a la simetría de la molécula. Dicha simetría determina que el número de señales distintas en protón que se observaría para las posibles conformaciones fuera de 32, coincidente con el número de señales observadas en el espectro. Para confirmar la identidad del compuesto G28 se procedió a la realización de un espectro de 13C RMN (Figura 9), todas las señales descritas de los espectros de 1H y 13C RMN se detallan en la Figura 10. Dicho espectro mostró un número de señales consistente con la existencia de confórmeros en la molécula y con unos desplazamientos químicos coincidentes con los descritos en bibliografía para (1Z,3Z)-1,4-Di(4-hidroxifenil)-2,3-diformamido-1,3-butadieno (Zuck et al, J. Nat. Prod. 2011; 74: 1653-7). Así mismo, el número de señales y desplazamientos químicos observados en el espectro de 1H RMN también están de acuerdo con los descritos para esta molécula. Se concluye por lo tanto, que el compuesto G28 obtenido en la cromatografía guiada por bioensayo del extracto 08_055 C08 posee la estructura de (1Z,3Z)-1,4-Di(4-hidroxifenil)-2,3-diformamido-1,3-butadieno.

5.2.1. Elucidación de la estructura de G27

El compuesto G27 posee una fórmula molecular C₁₈H₁₆N₂O₅ según se deduce del análisis de su espectro de masas (ESI-TOF) (m/z 341.1116, calculado para [M+H]⁺ 341.1132, Δ=-4.6 ppm). Al igual que ocurría en el caso del compuesto G28, la presencia en el espectro de masas (Figura 11) de aductos de amonio (m/z 358.1365), sodio (m/z 363.0935) y potasio (m/z 379.0676) corroboran la fórmula molecular propuesta. La molécula parece tener por lo tanto la misma naturaleza química que el compuesto G28, incluyendo un átomo de oxígeno adicional en su estructura. La búsqueda de su fórmula molecular en el Diccionario de Productos Naturales identificó en este caso tres moléculas posibles, cephalinone B, acetylnyobomycine y picrasidine E, ninguna de ellas relacionada con dicho compuesto. Parecía ser, sorprendentemente, que el compuesto G27 era un nuevo producto natural. Al igual que para el compuesto G28, el DMSO-d₆ se reveló como el disolvente más apropiado para llevar a cabo los experimentos de RMN. El espectro de protón, 1H RMN, (Figura 12) mostró mayor complejidad que el del compuesto G28, con la existencia de numerosas señales en las zonas de protones aromáticos y/o de doble enlace y en la de protones unidos a heteroátomo. La presencia de un oxígeno adicional en la estructura rompería la simetría de este compuesto y el

número de señales observables en el espectro se incrementaría notablemente, teniendo en cuenta la existencia ahora de cuatro conformeros de amida (cis-cis, trans-trans, cis-trans y trans-cis) cada uno de los cuales daría lugar a señales distintas. Sería de esperar por lo tanto la existencia de 64 señales distintas ($16 \text{ H} \times 4$ conformaciones) en el espectro de protón de la molécula. Una inspección detallada del espectro de ^1H RMN mostró la presencia de 12 señales de protones fenólicos (δH 9.67, 9.66, 9.62, 9.60, 9.20, 9.16, 9.13, 9.10, 9.02, 8.97 ($\times 2$) y 8.92), confirmando de este modo la presencia de un hidroxilo fenólico adicional con respecto al compuesto G28. Para localizar dicho grupo fenólico se analizó la región del espectro correspondiente a los protones aromáticos. En dicha región se observa la presencia de dobletes a 7.02 ($J=2.0$ Hz), 7.00 ($J=2.0$ Hz), 6.94 ($J=2.0$ Hz) y 6.92 ($J=2.0$ Hz) que correlacionaban en el espectro ^1H - ^1H COSY con un grupo de señales entre 6.77 y 6.82 ppm y en HMBC con carbonos a 121.3-121.6 ppm y a 145.1-145.6 ppm. El grupo de señales a 6.77-6.82 ppm en protón correlacionaba a su vez con un multiplete centrado a 6.70 ppm en el espectro de COSY y con señales de carbono a 115.8-116.6 y 145.1-145.6 en el espectro de HMBC. Por último, el multiplete centrado a 6.70 ppm correlacionaba en HMBC con carbonos a 126.5-126.9 ppm y a 144.9-145.3 ppm. Todos estos datos están en concordancia con el reemplazo de uno de los grupos 4-hidroxifenilo presentes en la estructura del compuesto G28 por 3-4-dihidroxifenilo en el compuesto G27 (Figura 13). Aparte de las señales ya comentadas, en el espectro de protón se observan otras señales correspondientes a los protones de los grupos NH de amida a δH 9.48 (s, $\times 2$), 9.36 (s), 9.35 (s), 9.30 (d), 9.26 (d), 9.22 (d) y 9.17(d) ppm, cuatro de ellas singletes correspondientes a las conformaciones de amida cis y las otras cuatro dobletes, correspondientes a las trans. Del mismo modo, se observan las señales de los protones de los dos grupos formamida a 8.19 (s), 8.18 (s $\times 2$), y 8.17 (s) (cis), y a 7.86 (d), 7.84 (d), 7.79 (d) y 7.77 (d) (trans). Se completan las señales observadas en el espectro con las correspondientes a los protones del sustituyente 4-hidroxibencilo (7.30-7.38 y 6.72-6.77 ppm) y las de ocho singletes correspondientes a los protones H1 y H4 del butadieno presente en la molécula (δH 6.46 ($\times 2$), 6.43, 6.39, 6.38, 6.36, 6.32). Todas las restantes señales no descritas anteriormente del espectro de ^{13}C RMN (Figura 14) y las correlaciones observadas en los espectros bidimensionales de COSY, HSQC y HMBC corroboran la estructura propuesta. El compuesto G27, obtenido en la cromatografía guiada por bioensayo del extracto 08_055 C08, posee por lo tanto la estructura de (1Z,3Z)-1-(3,4-dihidroxifenil)-4-(4-hidroxifenil)-2,3-diformamido-1,3-butadieno. La búsqueda bibliográfica de la estructura confirmó además que se trata de un nuevo producto natural.

EJEMPLO 6. Efecto protector de los picos G27 (o compuesto NPS0155) y G28 (NPS0156) sobre la muerte neuronal inducida por estrés oxidativo

A partir de los resultados anteriores los investigadores decidieron analizar el efecto neuroprotector de los compuestos NPS0155 y NPS0156. Los ensayos fueron realizados sobre células en cultivo de neuroblastoma humano SK-N-MC, mantenidas como se detalla en el Ejemplo 2.

Se analizó a tiempo real la inhibición producida por ambos compuestos de la muerte celular causada por el tratamiento con xantina/xantina oxidasa que produce daño oxidativo (generando radicales libres como peróxido de hidrógeno, anión superóxido, radical hidroxilo) lo que desencadena muerte celular. Estas células, en fase no superior a 15, fueron sembradas sobre placas de 16 pocillos específicas para el ensayo a tiempo real con el sistema RTCA (Real-Time Cell Analyzer, XCelligence, Roche) con una concentración celular de 5×10^4 células/pocillo. Tras 24 h de incubación de las células a 37°C y 5% CO_2 se procedió a los tratamientos celulares para las condiciones de control (medio de cultivo); XXO (xantina 10 μM / xantina oxidasa 60 mU/mL); XXO más G27 o G28 a 10, 40, 100, 400, 1000 ó 4000 ng/mL . Las células fueron incubadas (a 37°C y 5% CO_2) con estos tratamientos durante 72 h, recogiendo lecturas cada 10 minutos. Los valores que se obtienen son unidades arbitrarias indicadas por el Índice celular, calculada a partir de los valores de impedancia, que es una magnitud que establece la relación entre la tensión y la intensidad de corriente de las células adheridas y que se usa como medida de viabilidad celular.

Los resultados obtenidos para el compuesto NPS0155 se muestran en la Figura 15 como el Índice celular normalizado (A) de cada condición analizada a lo largo del tratamiento y como porcentaje de muerte celular (B) para cada tratamiento referido a la muerte producida por la XXO a 20 h post-tratamiento. Se observó protección de la muerte en el rango de 100 a 400 ng/mL de NPS0155, siendo la máxima del 27% a 100 ng/mL , por lo que este compuesto muestra un efecto protector de la muerte de células humanas de origen neuronal causada por estrés oxidativo.

Los resultados obtenidos para el compuesto NPS0156 se muestran en la Figura 16 como el Índice celular normalizado (A) de cada condición analizada a lo largo del tratamiento y como porcentaje de muerte celular (B) para cada tratamiento referido a la muerte producida por la XXO a 20 h post-tratamiento. Se observó protección de la muerte en el rango de 10 a 1.000 ng/mL de NPS0156, siendo la máxima del 69 % a 100 ng/mL , por lo que este compuesto muestra un efecto protector de la muerte de células humanas de origen neuronal causada por estrés oxidativo.

EJEMPLO 7. Efecto antioxidante de los compuestos NPS0155 (G27) y NPS0156 (G28)

A partir de los resultados anteriores los investigadores decidieron analizar la capacidad antioxidante in vitro de los compuestos NPS0155 y NPS0156 mediante el ensayo TEAC, descrito en el Ejemplo 2. Para cuantificar la capacidad antioxidante se utilizó una curva estándar con concentraciones crecientes de trolox (análogo hidrosoluble de la vitamina E), de tal forma que los resultados se indican como medida de equivalentes trolox (TE). El ensayo de NPS0155 dio un resultado de $81 \pm 19 \mu\text{M TE}/\mu\text{g}$ compuesto, lo que indica que este compuesto muestra capacidad antioxidante in vitro. El ensayo de NPS0156 dio un resultado de $104 \pm 29 \mu\text{M TE}/\mu\text{g}$ compuesto, lo que indica que este compuesto muestra capacidad antioxidante in vitro.

EJEMPLO 8. Efecto antiapoptótico de los compuestos NPS0155 y NPS0156 en células con APP salvaje y mutado

A partir de los resultados anteriores los investigadores decidieron analizar el efecto antiapoptótico de los compuestos NPS0155 y NPS0156. Los ensayos fueron realizados sobre dos líneas de células en cultivo de neuroblastoma humano SK-N-MC transfectadas establemente con construcciones que expresan el gen de la proteína precursora de amiloide (APP) que codifica para la isoforma mayoritariamente expresada en el cerebro, de 695 aminoácidos, clonadas en el vector de expresión pcDNA3.1 (Invitrogen). Una de las líneas expresa el gen APP salvaje (APPwt) y la otra expresa el gen APP con la mutación sueca (APPswe) que es una mutación doble en el exón 16 del gen y produce una transversión de G a T resultando en el cambio de aminoácido Lys595Asn y otra transversión de A a C que produce el cambio Met596Leu, estando dicha mutación relacionada con la enfermedad de Alzheimer en su forma senil o hereditaria. Las células fueron mantenidas como las células parentales SK-N-MC, como se detalla en el Ejemplo 2, utilizando genética a $400 \mu\text{g/ml}$ como antibiótico de selección. Para determinar el efecto sobre la apoptosis (muerte celular programada) de los compuestos NPS0155 y NPS0156, se analizó la fragmentación de DNA mediante citometría de flujo, producida por el tratamiento con camptotecina (CPT) que inhibe la enzima topoisomerasa I, lo que impide la duplicación del DNA y desencadena muerte celular apoptótica. Las dos líneas celulares, en fase no superior a 10, fueron sembradas sobre placas de 12 pocillos tratadas para células adherentes con una concentración celular de 4×10^5 células/pocillo. Tras 24 h de incubación de las células a 37°C y 5% CO_2 se procedió al pre-tratamiento de las células con 4 y $10 \mu\text{g/mL}$ de NPS0155 o de NPS0156 durante 24 h; posteriormente se trataron con $50 \mu\text{M}$ CPT durante 6 h. Tras el tratamiento las células se recogieron junto con su medio de cultivo y se centrifugaron a $300 \times g$ durante 5 min. Se eliminó el medio, se realizó un lavado con PBS y se fijaron durante 2 minutos con $500 \mu\text{L}$ de etanol al 70% a -20°C . Una vez fijadas se centrifugaron a $400 \times g$ durante 5 min, se lavaron con PBS y se les añadió yoduro de propidio a 0.05 mg/mL , diluido en buffer de ciclo (Citrato sódico 0.1%, Nonidet P-40 0.3% y RNasa 0.02 mg/mL) y se incubaron 1 hora a 37°C . Se mantuvieron 18 h a 4°C y, pasado este tiempo, se analizaron por citometría de flujo, comparando la fluorescencia del yoduro de propidio frente a la cantidad de DNA.

Los resultados obtenidos para el compuesto NPS0155 en las células APPwt se recogen en la Figura 17 donde se muestra el porcentaje de apoptosis en la región sub-G1 de cada una de las condiciones (A), así como el porcentaje de la inhibición de la apoptosis de cada tratamiento referido a la apoptosis producida por CPT (B). Se observó protección del NPS0155 a las dos dosis ensayadas en las células APPwt.

Los resultados obtenidos para el compuesto NPS0155 en las células APPswe se recogen en la Figura 18 donde se muestra el porcentaje de apoptosis en la región sub-G1 de cada una de las condiciones (A), así como el porcentaje de la inhibición de la apoptosis de cada tratamiento referido a la apoptosis producida por CPT (B). Se observó protección del NPS0155 a las dos dosis ensayadas en las células APPswe.

Los resultados obtenidos para el compuesto NPS0156 en las células APPwt se recogen en la Figura 19 donde se muestra el porcentaje de apoptosis en la región sub-G1 de cada una de las condiciones (A), así como el porcentaje de la inhibición de la apoptosis de cada tratamiento referido a la apoptosis producida por CPT (B). Se observó protección del NPS0156 a las dos dosis ensayadas en las células APPwt.

Los resultados obtenidos para el compuesto NPS0156 en las células APPswe se recogen en la Figura 20 donde se muestra el porcentaje de apoptosis en la región sub-G1 de cada una de las condiciones (A), así como el porcentaje de la inhibición de la apoptosis de cada tratamiento referido a la apoptosis producida por CPT (B). Se observó protección del NPS0156 a las dos dosis ensayadas en las células APPswe.

En conclusión, en este ejemplo se muestra que los compuestos NPS0155 y NPS0156 presentan un efecto protector de la apoptosis en células humanas de origen neuronal que expresan el APP salvaje y mutado.

EJEMPLO 9. Síntesis y diseño de análogos de xantocilinas con capacidad neuroprotectora**9.1. Síntesis de análogos de xantocilinas**

A partir de los resultados anteriores los inventores decidieron diseñar un proceso de síntesis de derivados de xantocilinas basados en el compuesto NPS0155, para lo que se basaron en la síntesis de la xanthocillin X, (Tatsuta et

al 2005. Tetrahedron Letters 46: 5017-20). La ruta de síntesis diseñada se representa en la Figura 21. Dicha síntesis consiste en transformar el ácido arilpropiónico (1) en su amida, (2); esta amida (2) se convierte en el estannano (3) por adición de hidruro de tributilestaño. Por oxidación de Baumgarten se obtiene el carbamato (4), que tiene la estereoquímica apropiada para dar por una reacción de homoacoplamiento catalizada por paladio el producto (5). Este producto tiene el esqueleto correspondiente al tipo de análogo de interés. Las dos últimas reacciones tienen por objeto desproteger los carbamatos e introducir los grupos formamido.

Esta estrategia de síntesis admite cierta flexibilidad. Alternativamente a la ruta $3 \rightarrow 4 \rightarrow 5 \rightarrow 6$, puede pasarse de 3 al isocianato 7 mediante la oxidación de Baumgarten (sin el atrapado con el silanol), transformar 7 en la formamida 8 y realizar entonces el homoacoplamiento para dar 6 (ruta $3 \rightarrow 7 \rightarrow 8 \rightarrow 6$) o también, convertir el carbamato 4 en la formamida 8 y realizar entonces el homoacoplamiento para dar 6 (ruta $3 \rightarrow 4 \rightarrow 8 \rightarrow 6$).

Utilizando la ruta descrita para la xanthocillin X se obtiene el compuesto que se esquematiza en la Figura 22 y para generar diferentes análogos del compuesto G27 se introducen en las posiciones Ar1 y Ar2 los siguientes grupos:

- hidroxifenil: 1 ó 2 radicales (A y B) (p.e., 4-hidroxifenil)
- metoxifenil: 1 ó 2 radicales (C, D y E) (p.e., 4-metoxifenil)
- 1,3-benzodioxolil (F) (p.e., 1,3-benzodioxol-5-il)
- metilfenil: 1 ó 2 radicales (G y H) (p.e., 4-metilfenil)
- etilfenil: 1 ó 2 radicales (I y J) (p.e., 4-etilfenil)
- fenil (K)
- alcoxihiidroxifenil: 1 ó 2 radicales (L, M o N) (p.e., 3-hidroxi-4-metoxifenil o 3-hidroxi-4-etoxifenil)
- etoxifenil: 1 ó 2 radicales (O y P) (p.e., 4-etoxifenil)

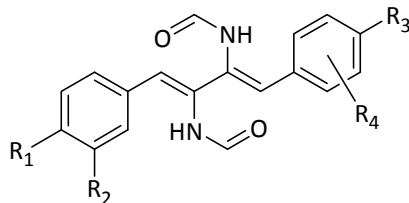
A partir de los grupos A a P descritos en la Figura 22, se realizaron estudios de combinación de residuos en la molécula de fórmula (II), analizándose el efecto de las diferentes estructuras sobre el índice de lipofilicidad teórica, el cual resulta esencial para predecir el paso de barrera hematoencefálica (BHE), siendo éste un parámetro que condiciona el uso de moléculas como potenciales neuroprotectores, tal y como se muestra en la Figura 23.

9.2. Diseño de nuevos análogos derivados de xantocilinas para su uso como neuroprotectores

A partir de los distintos derivados mostrados en el punto anterior, los inventores decidieron analizar la lipofilicidad de las combinaciones de sustituyentes en las posiciones Ar1 y Ar2 de fórmula (II). La lipofilicidad fue determinada por el valor del CLOGP, definido como el log P de un compuesto, el cual es el coeficiente de partición entre n-octanol y agua, $\log(\text{coctanol}/\text{cagua})$. La lipofilicidad teórica resulta esencial para predecir el paso de barrera hematoencefálica (BHE) por difusión pasiva, siendo dicho paso mayor conforme mayor es el valor de CLOGP. Los resultados de los valores de CLOGP se presentan en la Figura 23, y fueron calculados a partir de la aplicación on-line Osiris Property Explorer (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>). Sorprendentemente las diferentes combinaciones en los residuos incrementan notablemente los valores de CLOGP, y por tanto su potencial paso de BHE, respecto a los compuestos NPS0155 (combinación A+B) y NPS0156 (A+A).

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula (I):



(I)

5 donde:

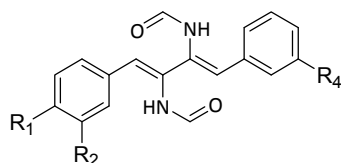
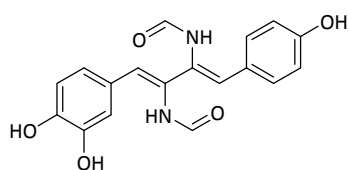
R₁ se selecciona entre alquilo, OH, O-alquilo, SH, S-alquilo, NH₂, NH-alquilo, N(alquilo)₂ y halógeno,

R₂, R₃ y R₄ se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo, OH, O-alquilo, SH, S-alquilo, NH₂, NH-alquilo, N(alquilo)₂ y halógeno,

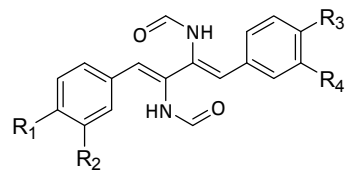
10 o R₁ y R₂ y/o R₃ y R₄ forman un grupo –O-alquilen-O-,

o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento dirigido a la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

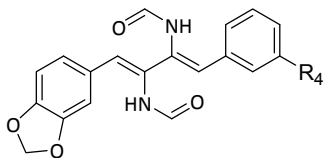
- 15 2. Uso según reivindicación 1, donde las enfermedades neurodegenerativas se seleccionan entre enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve, enfermedad de Huntingon, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Alexander, déficits cognitivos y/o psicomotores, ataxias, demencias, enfermedades cerebrovasculares, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple (EM), así como enfermedades asociadas al envejecimiento, procesos patológicos asociados a la edad y progeria.
- 20 3. Uso según reivindicación 1 ó 2, donde la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde R₁ se selecciona entre alquilo, OH y O-alquilo, o R₁ se encuentra unido a R₂ formando un grupo –O-alquilen-O-.
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde R₂, R₃ y R₄ se seleccionan independientemente entre alquilo, OH y O-alquilo, o R₂ se encuentra unido a R₁ formando un grupo –O-alquilen-O-, y/o R₃ y R₄ se encuentran unidos formando un grupo –O-alquilen-O-.
- 25 6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde R₄ se encuentra en posición meta del anillo aromático.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde R₁ es OH, etilo, metilo o forma, junto con R₂, un grupo –O-alquilen-O-.
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde R₂ es hidrógeno, OH, etilo, metilo o forma, junto con R₁, un grupo –O-alquilen-O-.
- 30 9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde R₃ es OH, etilo, metilo o forma, junto con R₄, un grupo –O-alquilen-O-.
10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde R₄ es hidrógeno, OH, etilo, metilo o forma, junto con R₃, un grupo –O-alquilen-O-.
- 35 11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el compuesto de fórmula (I) se selecciona de los siguientes compuestos:



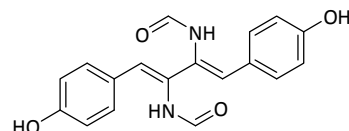
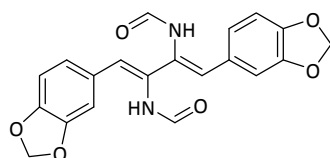
$R_1=R_2=R_4 = \text{Me, Et}$



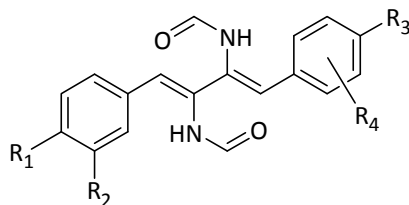
$R_1=R_2=R_3=R_4 = \text{Me, Et}$



$R_4 = \text{OH, Me, Et}$



12. Un compuesto de fórmula (II):



(II)

5 donde:

R_1 y R_2 se seleccionan independientemente de alquilo, OH, O-alquilo, SH, S-alquilo, NH_2 , NH-alquilo, $\text{N}(\text{alquilo})_2$ y halógeno, o R_1 y R_2 forman un grupo $-\text{O}-\text{alquilen}-\text{O}-$; y

R_3 y R_4 se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo, OH, O-alquilo, SH, S-alquilo, NH_2 , NH-alquilo, $\text{N}(\text{alquilo})_2$ y halógeno, o R_3 y R_4 forman un grupo $-\text{O}-\text{alquilen}-\text{O}-$,

10 o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo,

con la condición de que la fórmula (II) no incluye:

- el compuesto en el que R_1-R_4 son OH y R_4 está en posición meta del anillo aromático;
- el compuesto en el que R_1-R_4 son OCH_3 y el sustituyente R_4 está en posición meta del anillo aromático.

15 13. Compuesto según reivindicación 12, donde R_1 y R_2 se seleccionan independientemente entre alquilo, OH y O-alquilo, o R_1 y R_2 se encuentran unidos formando un grupo $-\text{O}-\text{alquilen}-\text{O}-$.

14. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 12 y 13, donde R_3 y R_4 se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo, OH y O-alquilo, o R_3 y R_4 se encuentran unidos formando un grupo $-\text{O}-\text{alquilen}-\text{O}-$.

15. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, donde R_4 se encuentra en posición meta del anillo aromático.

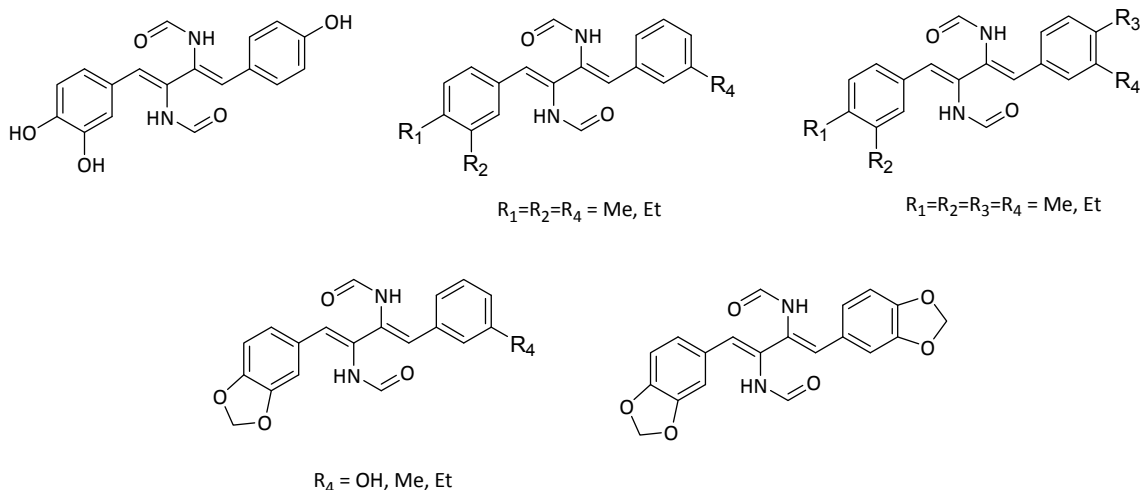
20 16. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, donde R_1 es OH, etilo, metilo o forma, junto con R_2 , un grupo $-\text{O}-\text{alquilen}-\text{O}-$.

17. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, donde R_2 es OH, etilo, metilo o forma, junto con R_1 , un grupo $-\text{O}-\text{alquilen}-\text{O}-$.

25 18. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, donde R_3 es OH, etilo, metilo o forma, junto con R_4 , un grupo $-\text{O}-\text{alquilen}-\text{O}-$.

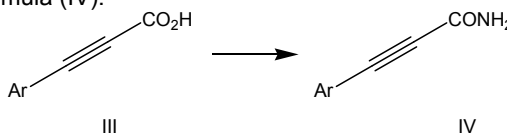
19. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18, donde R_4 es hidrógeno, OH, etilo, metilo o forma, junto con R_3 , un grupo $-\text{O}-\text{alquilen}-\text{O}-$.

20. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 19, donde el compuesto de fórmula (II) se selecciona de los siguientes compuestos:

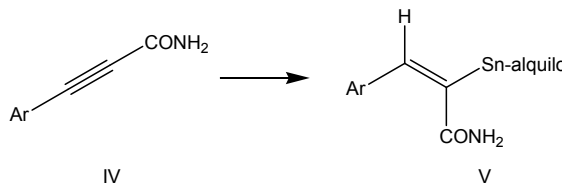


21. Una formulación farmacéutica que comprenden un compuesto de fórmula (II) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
22. Uso de un compuesto de fórmula (II) para la preparación de un medicamento.
- 5 23. Un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (II) a partir de un extracto producido por la especie *Penicillium chrysogenum*.
24. Un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (II) que comprende:

- a) una reacción de adición mediante la cual el ácido aril propiónico de fórmula (III) se transforma en su correspondiente amida de fórmula (IV):

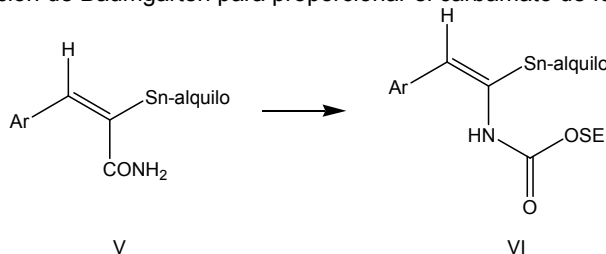


- b) hacer reaccionar la amida de fórmula (IV) con un hidruro de alquilestano para producir el estannano de fórmula (V):



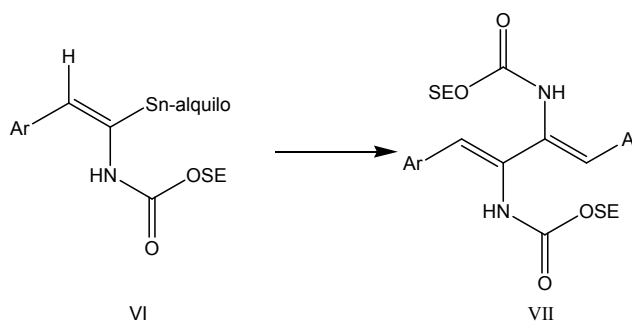
- y, a continuación, someter el compuesto de fórmula (V) a una secuencia de reacciones que comprende:

- c.1) reacción de oxidación de Baumgarten para proporcionar el carbamato de fórmula (VI) protegido:



donde SE significa un grupo protector;

- d.1) someter el carbamato de fórmula (VI) a una reacción de homoacoplamiento para dar el compuesto de fórmula (VII):



y

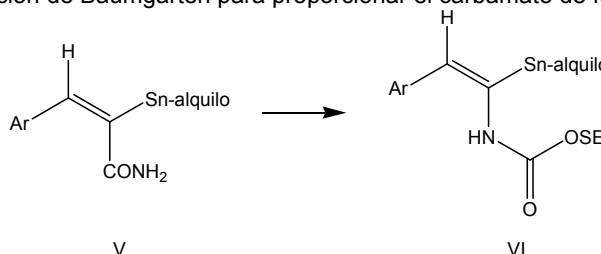
e.1) desproteger los grupos carbamato e introducir grupos formamido para obtener el compuesto de fórmula (II) de la invención;

5

o

someter el compuesto de fórmula (V) a una secuencia de reacciones que comprende:

c.2) reacción de oxidación de Baumgarten para proporcionar el carbamato de fórmula (VI) protegido:



d.2) desproteger los grupos carbamato e introducir grupos formamido para obtener el compuesto de fórmula (VIII):

10



y

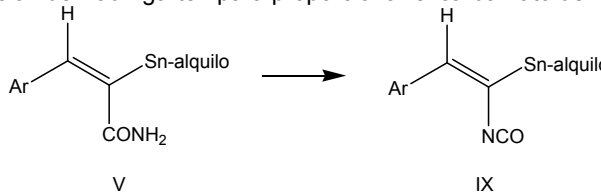
e.2) someter la formamida de fórmula (VIII) a una reacción de homoacoplamiento para proporcionar el compuesto de fórmula (II) de la invención;

15

o

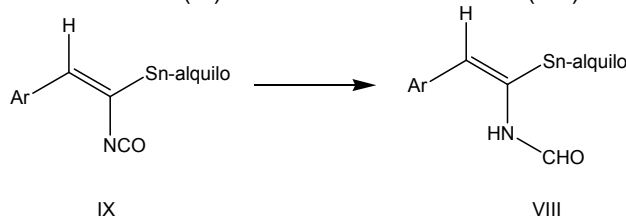
someter el compuesto de fórmula (V) a una secuencia de reacciones que comprende:

c.3) reacción de oxidación de Baumgarten para proporcionar el carbamato de fórmula (IX):



d.3) convertir el carbamato de fórmula (IX) en la formamida de fórmula (VIII):

20



y

e.3) someter la formamida de fórmula VIII a una reacción de homoacoplamiento para proporcionar el compuesto de fórmula (II) de la invención;

donde el grupo arilo incluye los sustituyentes R₁ a R₄ en función del compuesto de fórmula (II) que se desee obtener.

25. Cepa de microorganismo de la especie *Penicillium chrysogenum* depositada en el CECT con el número de registro 20783.

Figura 1



Figura 2

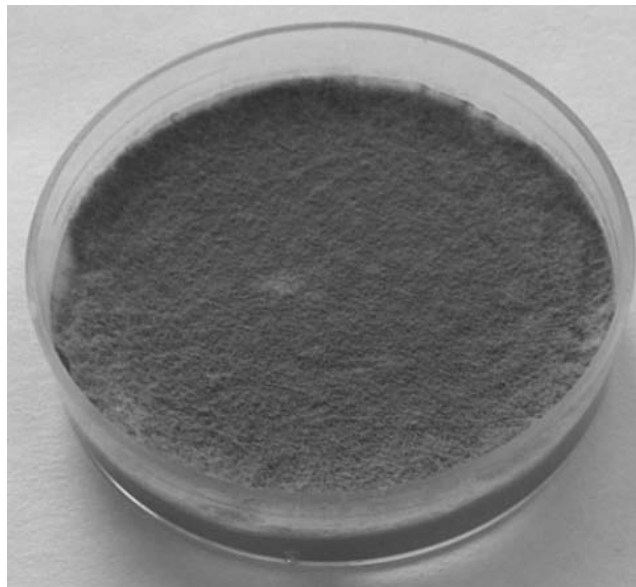


Figura 3

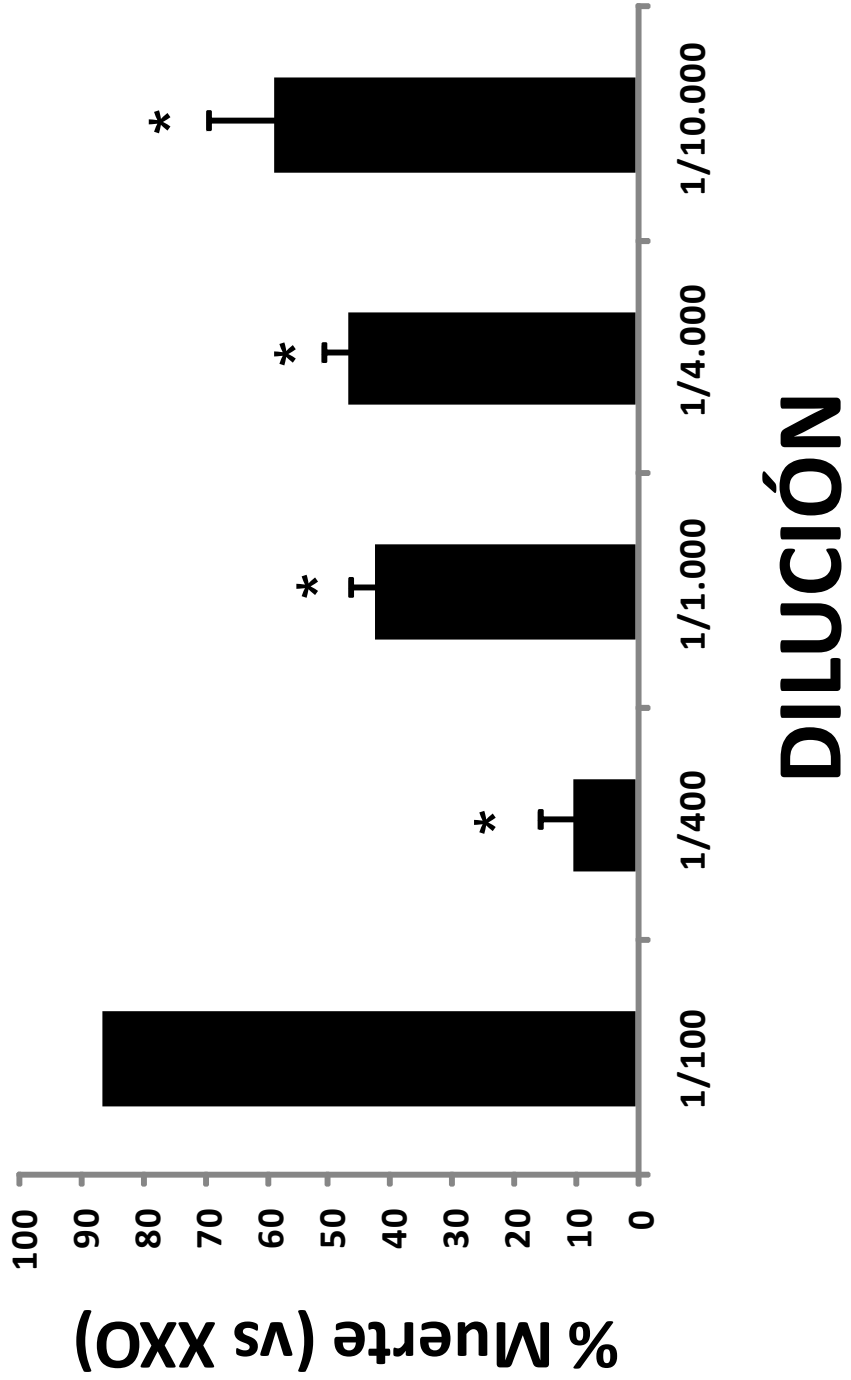


Figura 4

FET: 48 horas post-tratamiento	DILUCIÓN EXTRACTO		
TOXICIDAD DE EMBRIONES DE PEZ CEBRA	1/100	1/200	1/400
Parámetros letales:			
Huevos coagulados	0%	0%	0%
Desprendimiento de la cola	+	+	+
Ritmo cardíaco:	+	+	+
- Ritmo cardíaco lento	0%	0%	0%
- Ritmo cardíaco muy lento	0%	0%	0%
- Pericarditis	0%	0%	0%
Formación de somitas	+	+	+
Parámetros subletales:			
Movimientos espontáneos	100%	100%	100%
Pigmentación	100%	100%	100%
Formación de edemas	0%	0%	0%
Formación de coágulos:			
- Coágulo en cabeza	0%	0%	0%
- Coágulo en cabeza-ojo	0%	0%	0%
- Coágulo en yolk	0%	0%	0%
- Coágulo en pericardio	0%	0%	0%
- Coágulo en cola	0%	0%	0%
Parámetros teratogénicos:			
Malformaciones en órganos y estructuras			
- Malformación general	0%	0%	0%
- Malformación en yolk-cola	0%	0%	0%
- Malformación en yolk	0%	0%	0%
- Malformación en final de cola	0%	0%	0%
Escoliosis	0%	0%	0%
Raquitismo	0%	0%	0%
Retardo generalizado del desarrollo	0%	0%	0%
Parámetros toxicológicos generales			
LC ₅₀		> 1/100	
NOEC		1/100	
LOEC		> 1/100	

Figura 5

CccgctccgaGCCGAgCGCGTTCCTCGGTCTAGGCAGGTCGCATTGCACCCTCGGCTATAAGACGCCCTAGGG
GCGTTACCTTCCGAGGGCCTTTGACCGACCGCCAAACCGACGCTGGCCCGCCCGCGGGGAAGTACACCGG
CACGAATGCCGGCTGAACCCCGCGAGCGAGTCTGGTCGCAAGCGCTTCCCTTCAACAATTTACGTGCTTTTT
AACTCTTTTTCAAAGTGCTTTTCATCTTTCGATCACTCTACTTGTGCGCTATCGGTCTCCGGCCAATATTTAGCT
TTAGATGAAATTTACCACCCATTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCGTGAAGGAGCTTACACGGGC
GCGGACACCCCATCCATACGGGATTCTCACCTCTATGACGTCCCGTTCAGGGCACTTAGATGGGGACCGC
TCCCGAAGCATCCTCTACAAATTACAATGCGGACCCGAAgGAGCCaGCTTTCAAATTTGAGCTCTTGCCGCTT
CACTCGCcgTTaCtGGGGCAATCCCTGTTGGTTTCtttctccgct

Figura 6

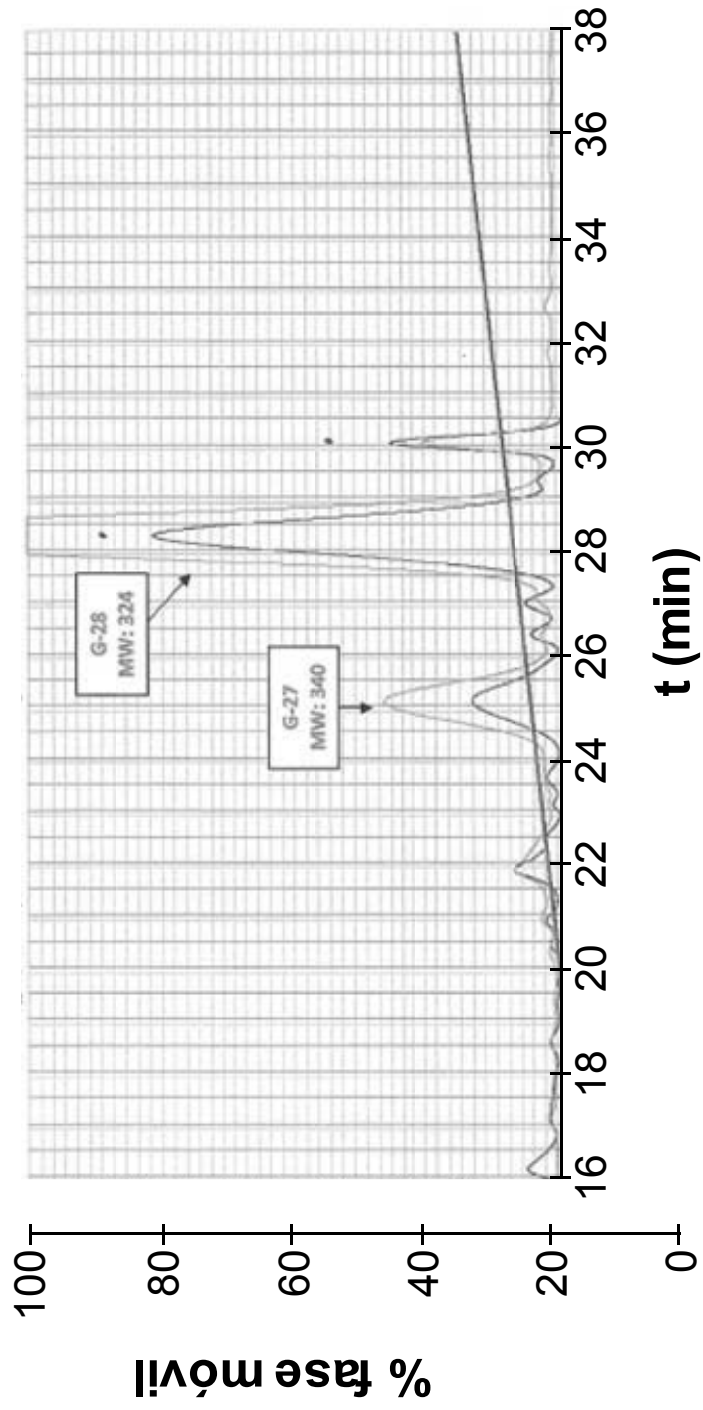


Figura 7

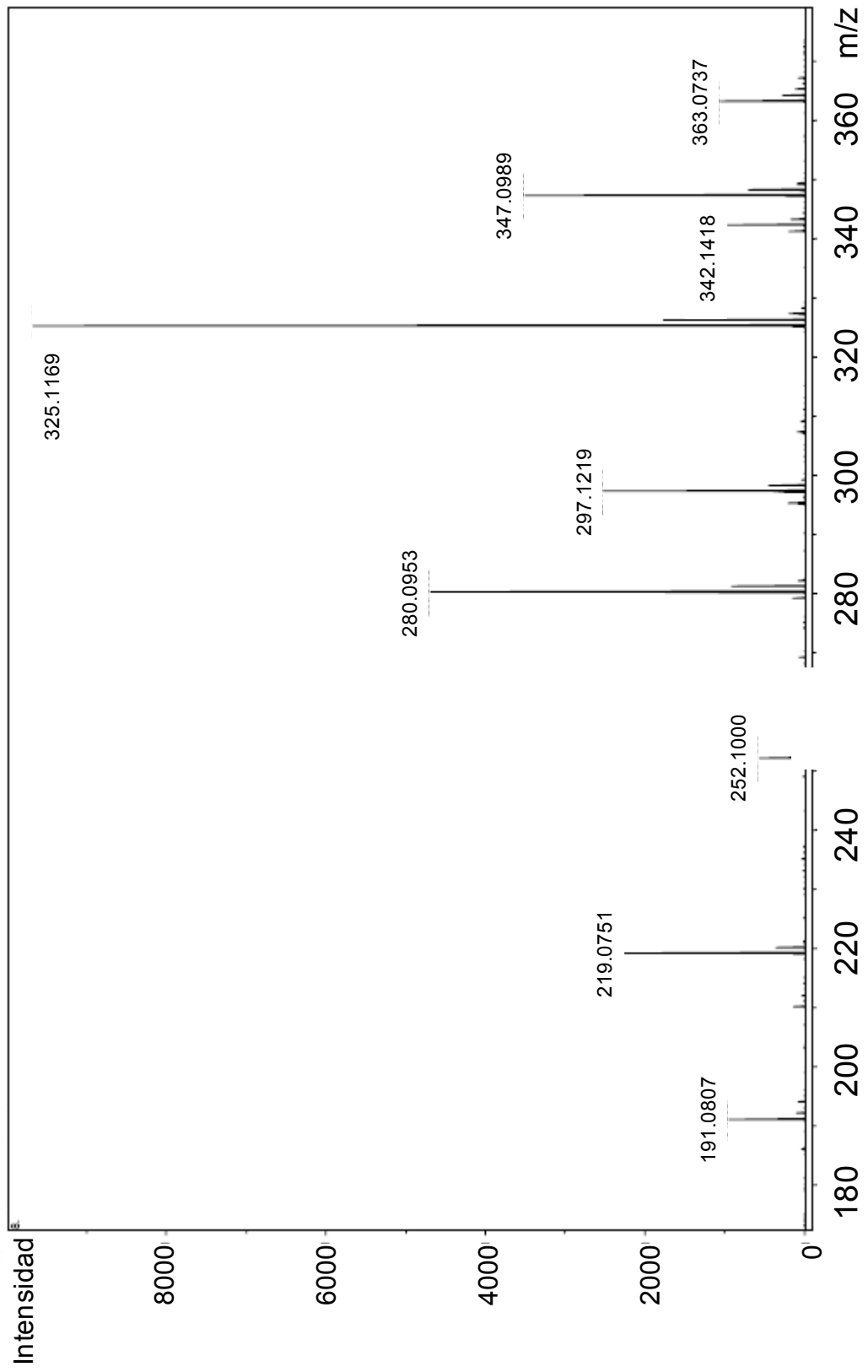


Figura 8

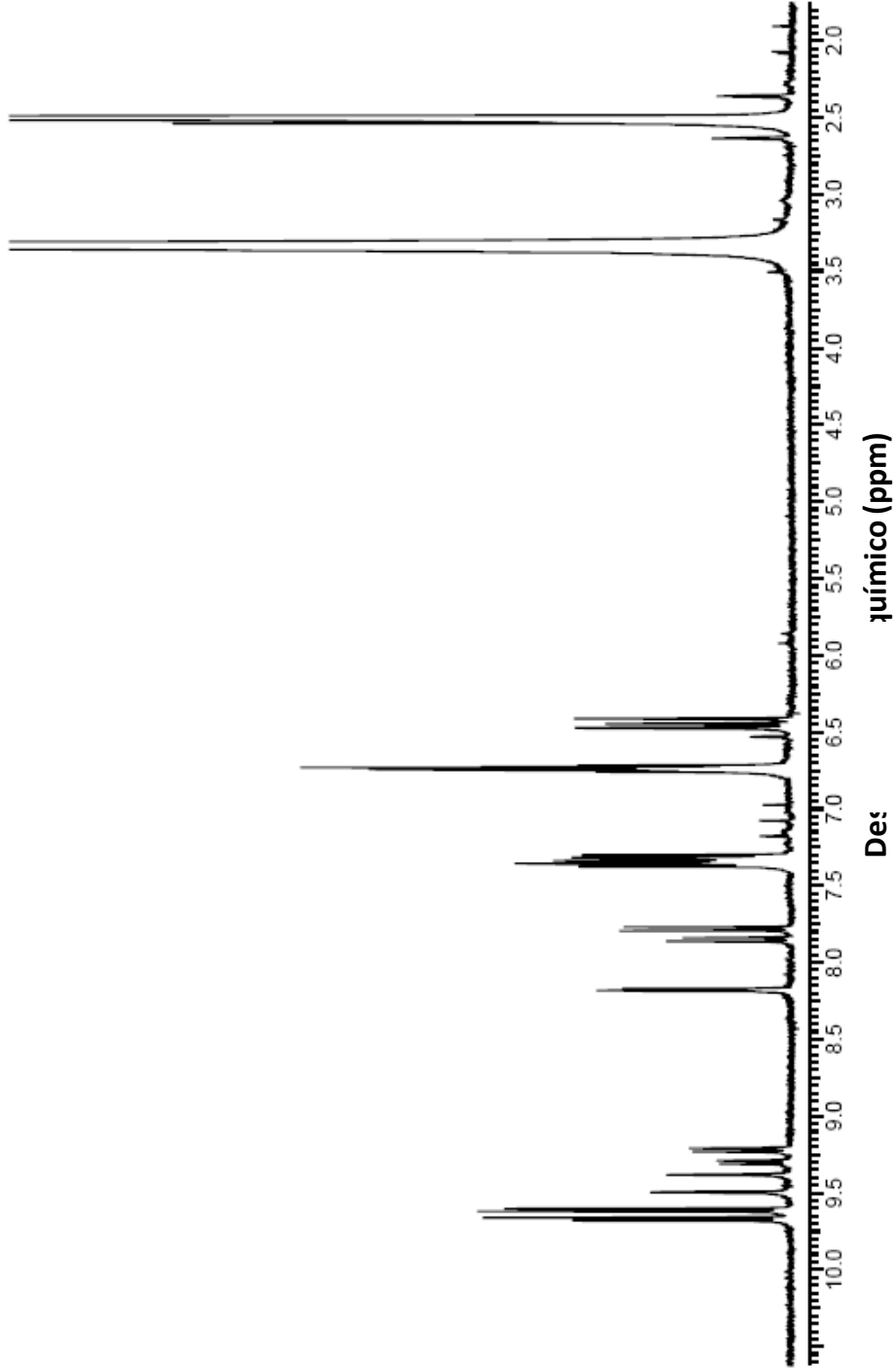


Figura 9

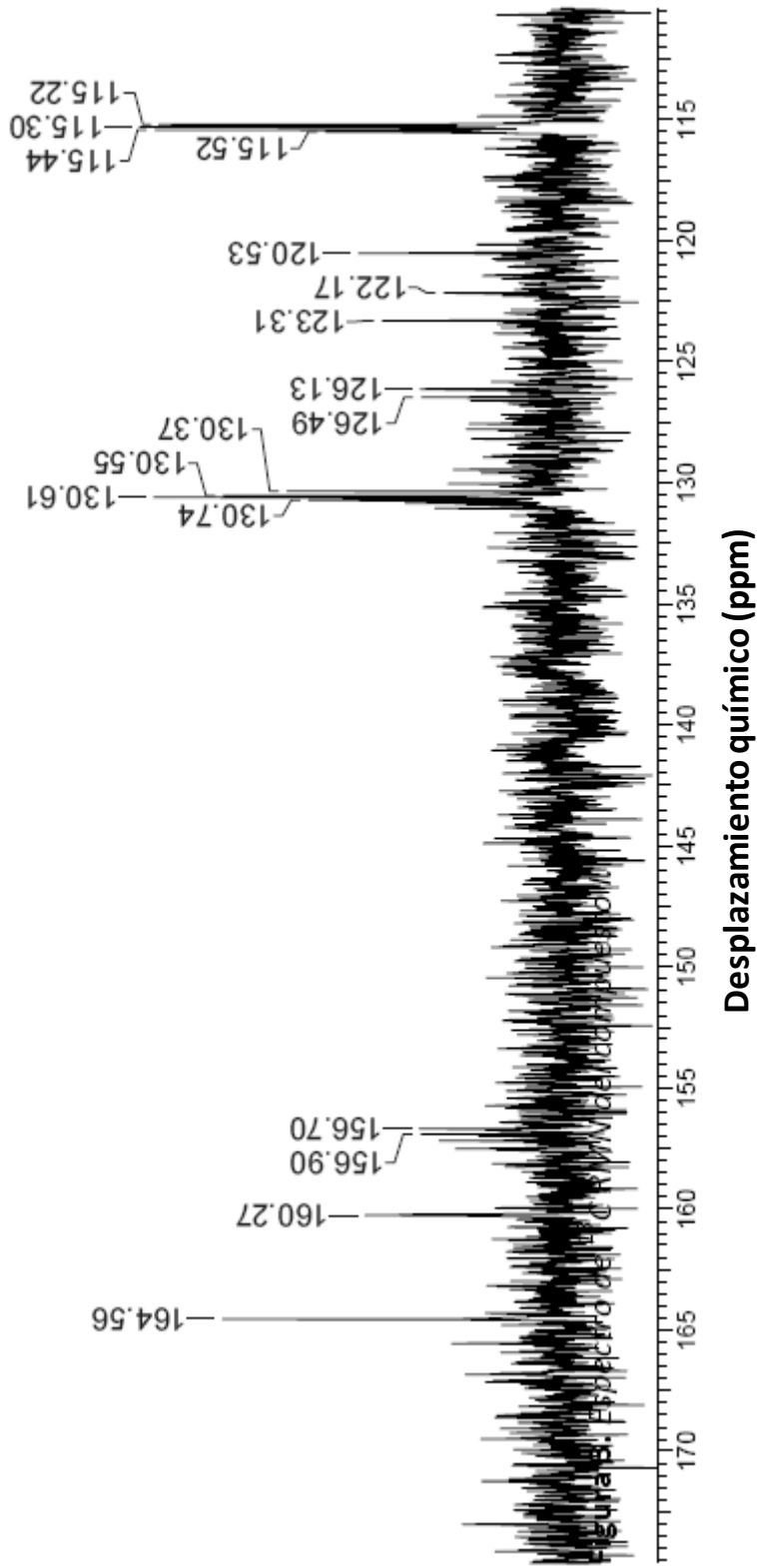


Figura 10

Posición	δ_C	δ_H (mult., J en Hz)
1, 1'	130.4-131.0	
2, 2'	123.3, 122.1, 120.5	6.48 (s), 6.48 (s), 6.47 (s), 6.41 (s)
3, 3'	126.5, 126.2, 126.1	
4, 4', 8, 8'	130.4-131.0	7.30-7.37 (m)
5, 5', 7, 7'	115.5, 115.4, 115.3, 115.2	6.72-6.76 (m)
6, 6'	157.5, 157.1, 156.9, 156.7	
9, 9'		9.50 (s), 9.38 (s), 9.30 (d, 11.0), 9.22 (d, 11.4)
10, 10'	164.5, 160.2	8.18 (s), 8.17 (s), 7.85 (d, 11.0), 7.78 (d, 11.4)
6-OH, 6'-OH		9.68 (s), 9.66 (s), 9.62 (s), 9.60 (s)

Figura 11

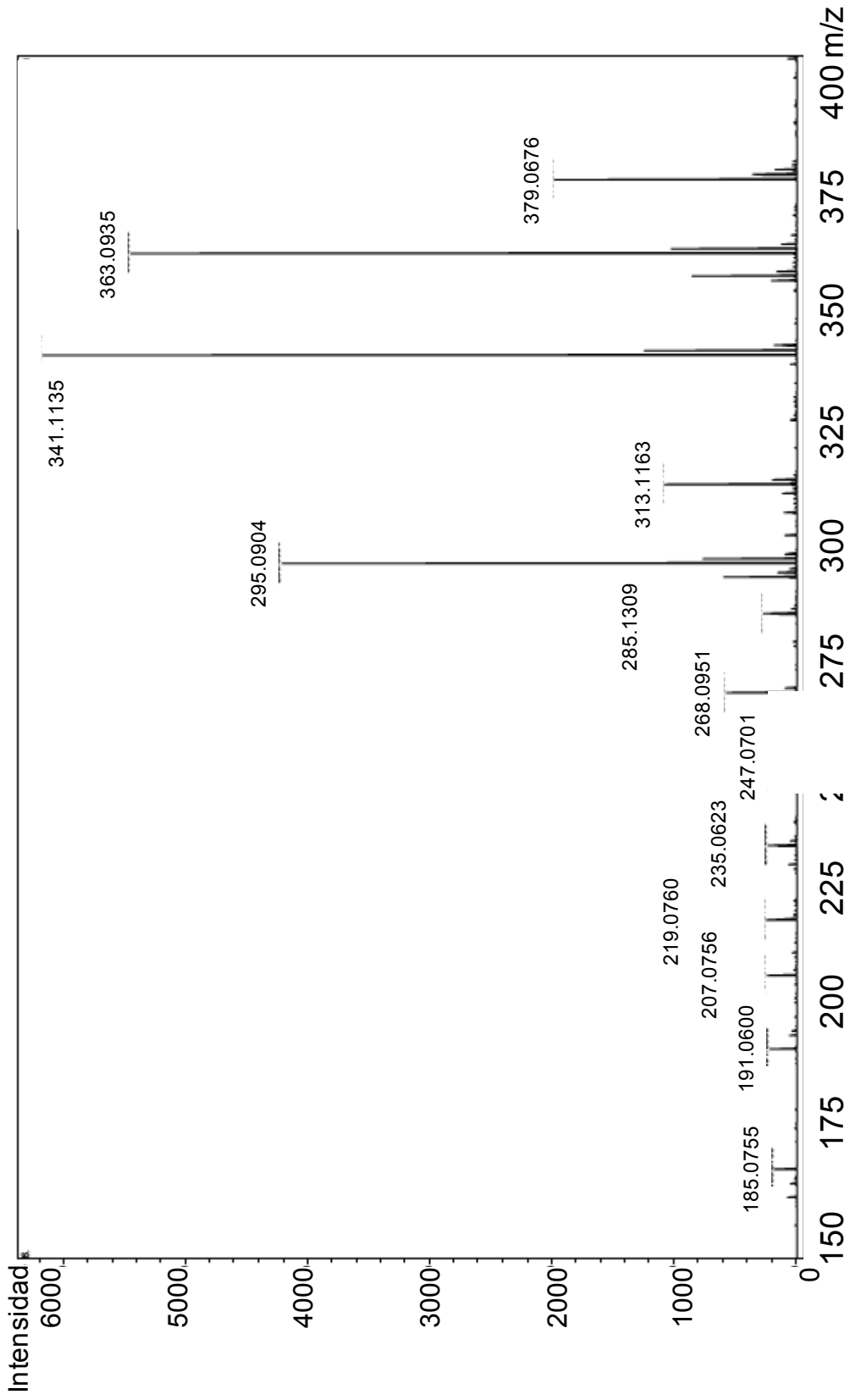


Figura 12

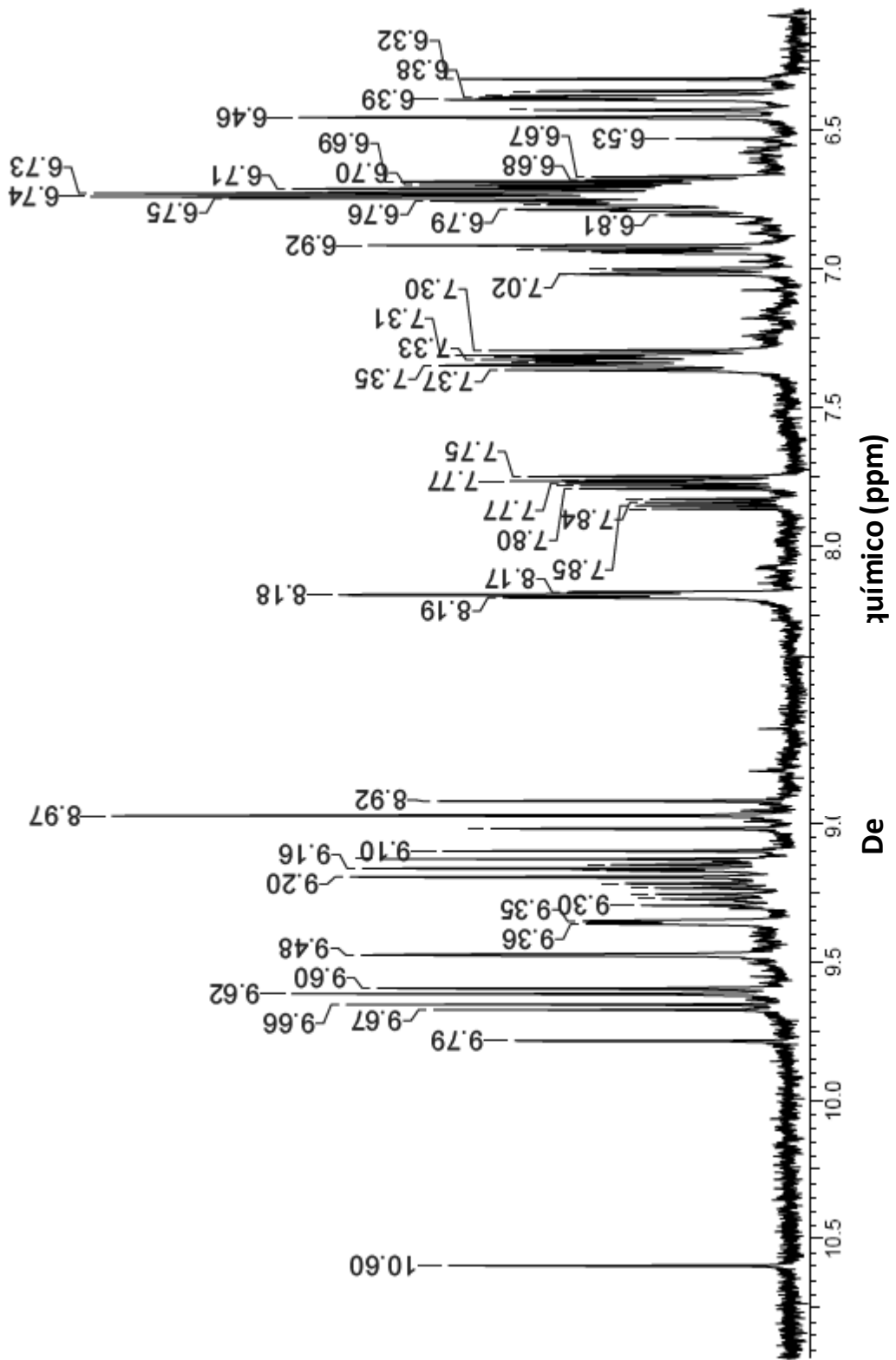


Figura 13

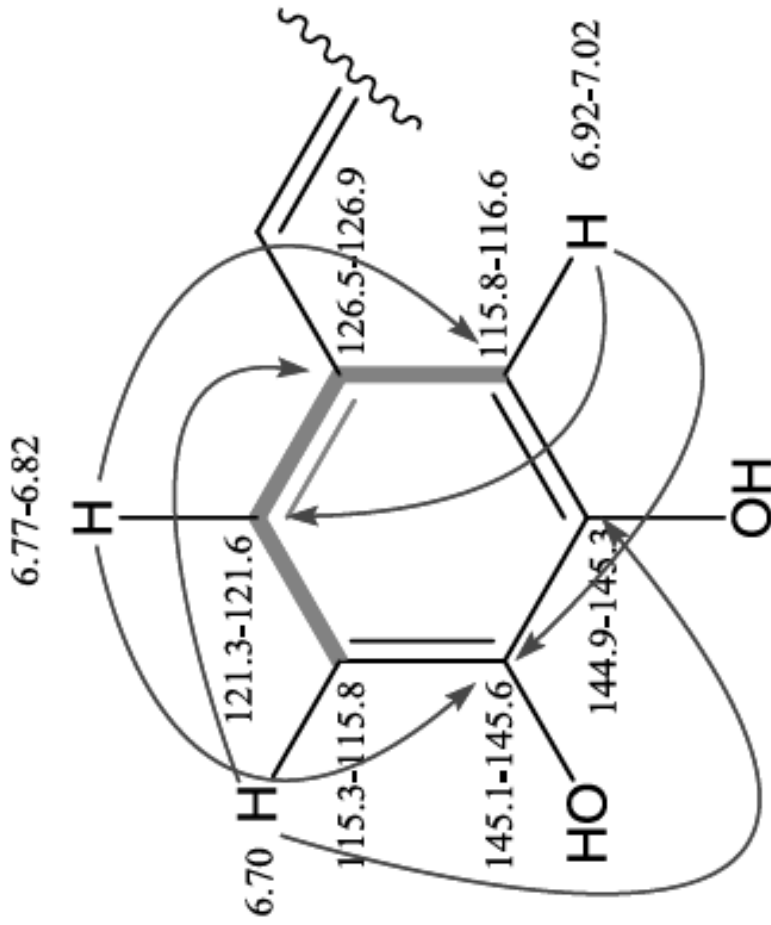


Figura 14

Posición	δ_c	δ_H (mult., J en Hz)
1	129.5-131.1	
2	120.3-123.6	6.46 (s), 6.46 (s), 6.43 (s), 6.39 (s)
3	126.5-126.9	
4	115.8-116.6	7.02 (d, 2.0), 7.00 (d, 2.0), 6.94 (d, 2.0), 6.92 (d, 2.0)
5	144.9-145.3	
6	145.1-145.6	
7	115.3-115.8	6.70 (m)
8	121.3-121.6	6.76-6.82 (m)
9 ^a		8.19 (s), 8.18 (s), 7.84 (d, 11.1), 7.77 (d, 11.1)
10 ^b	164.6, 160.3	9.48 (s), 9.36 (s), 9.30 (d, 11.1), 9.22 (d, 11.1)
5-OH ^c		9.20 (s), 9.16 (s), 9.13 (s), 9.10 (s)
6-OH ^c		9.02 (s), 8.97 (s), 8.97 (s), 8.92 (s)
1'	130.4-130.8	
2'	120.6-123.1	6.39 (s), 6.38 (s), 6.36 (s), 6.32 (s)
3'	126.1-126.5	
4', 8'	130.7, 130.6, 130.5, 130.4	7.30-7.38 (m)
5', 7'	115.3-115.7	6.72-6.76 (m)
6'	156.7-157.2	
9' ^a		8.18 (s), 8.17 (s), 7.86 (d, 11.3), 7.79 (d, 11.2)
10' ^b	164.6, 160.3	9.48 (s), 9.35 (s), 9.26 (d, 11.3), 9.17 (d, 11.2)
6'-OH		9.68 (s), 9.66 (s), 9.62 (s), 9.60 (s)

^{a, b, c} Asignaciones intercambiables.

Figura 15

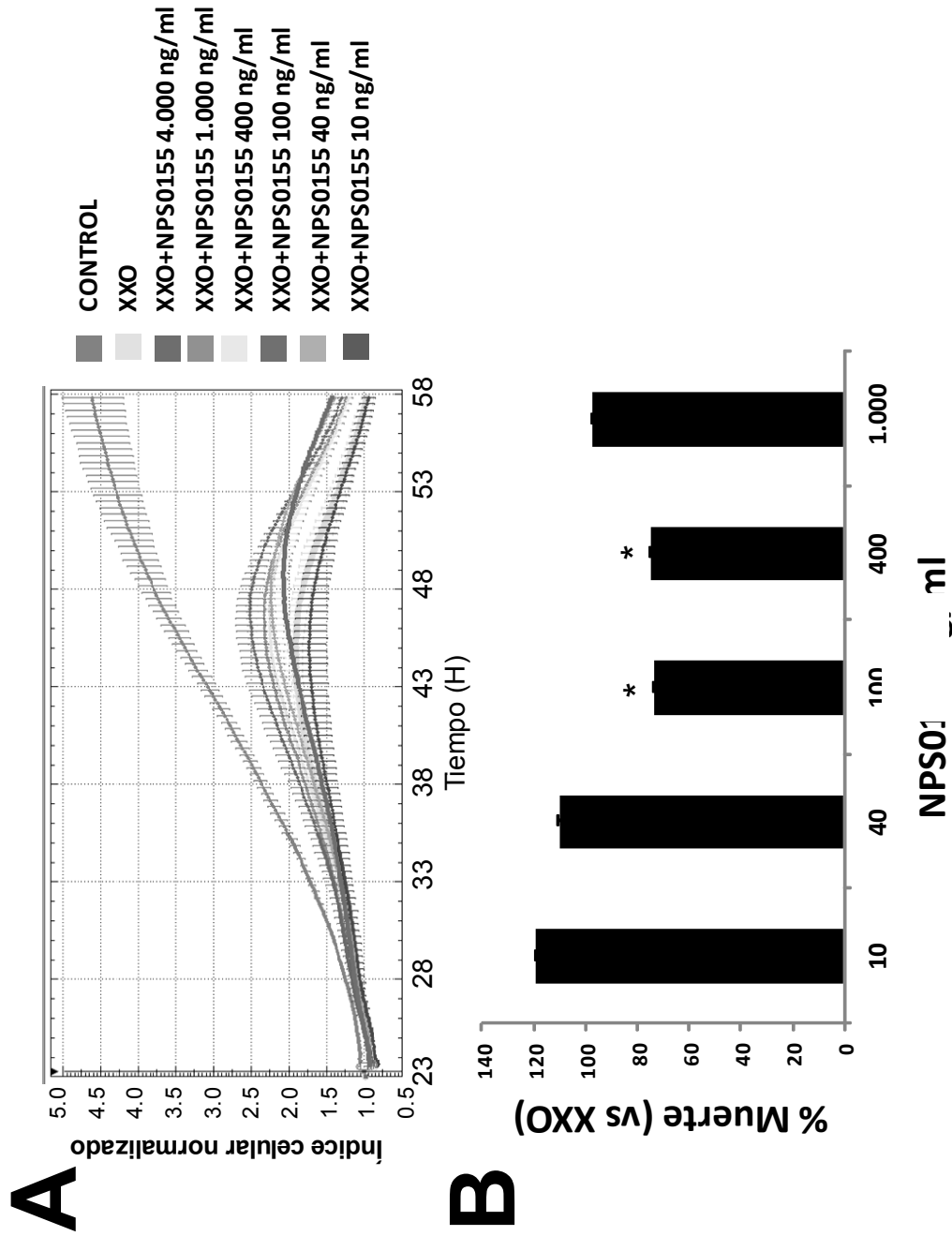


Figura 16

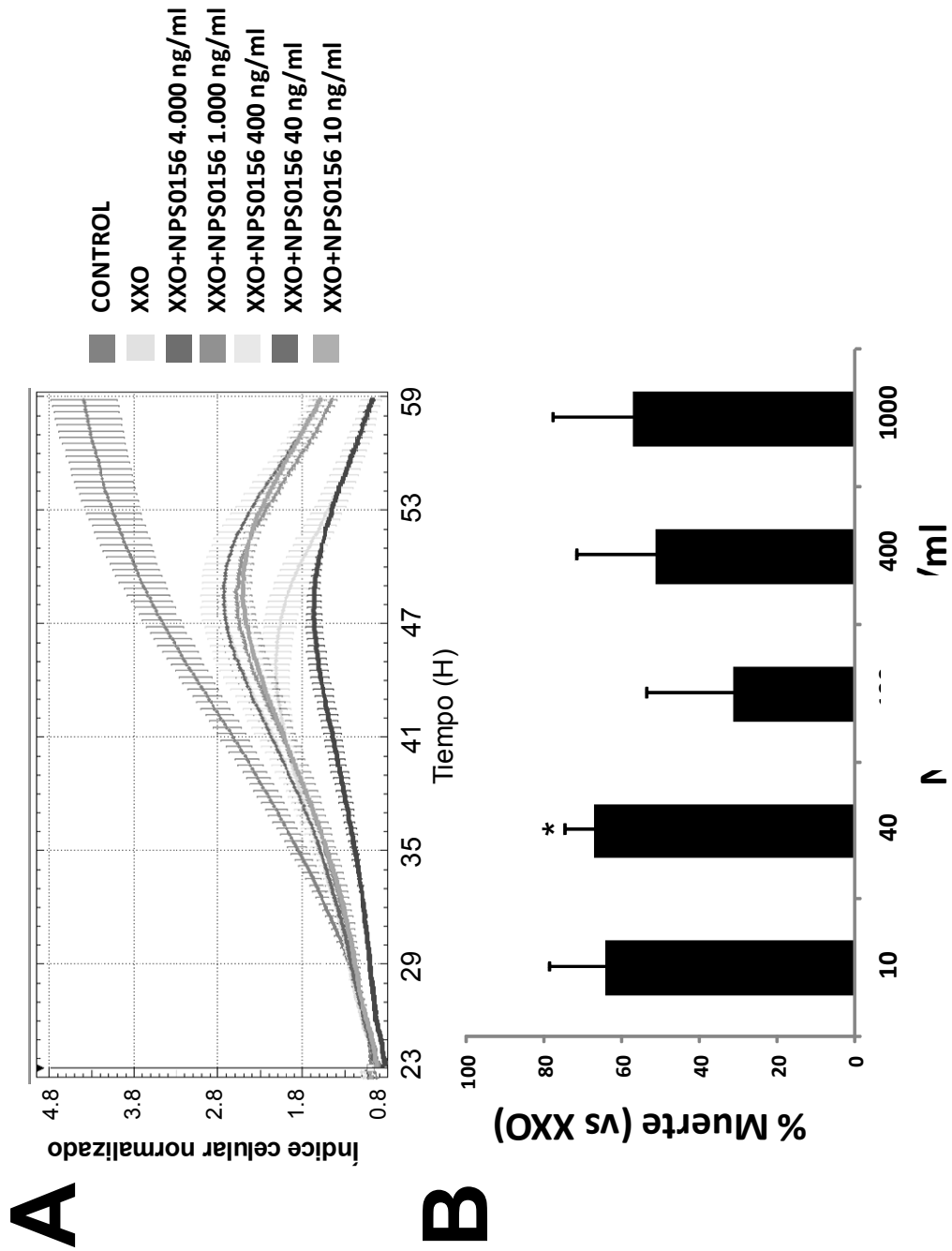


Figura 17

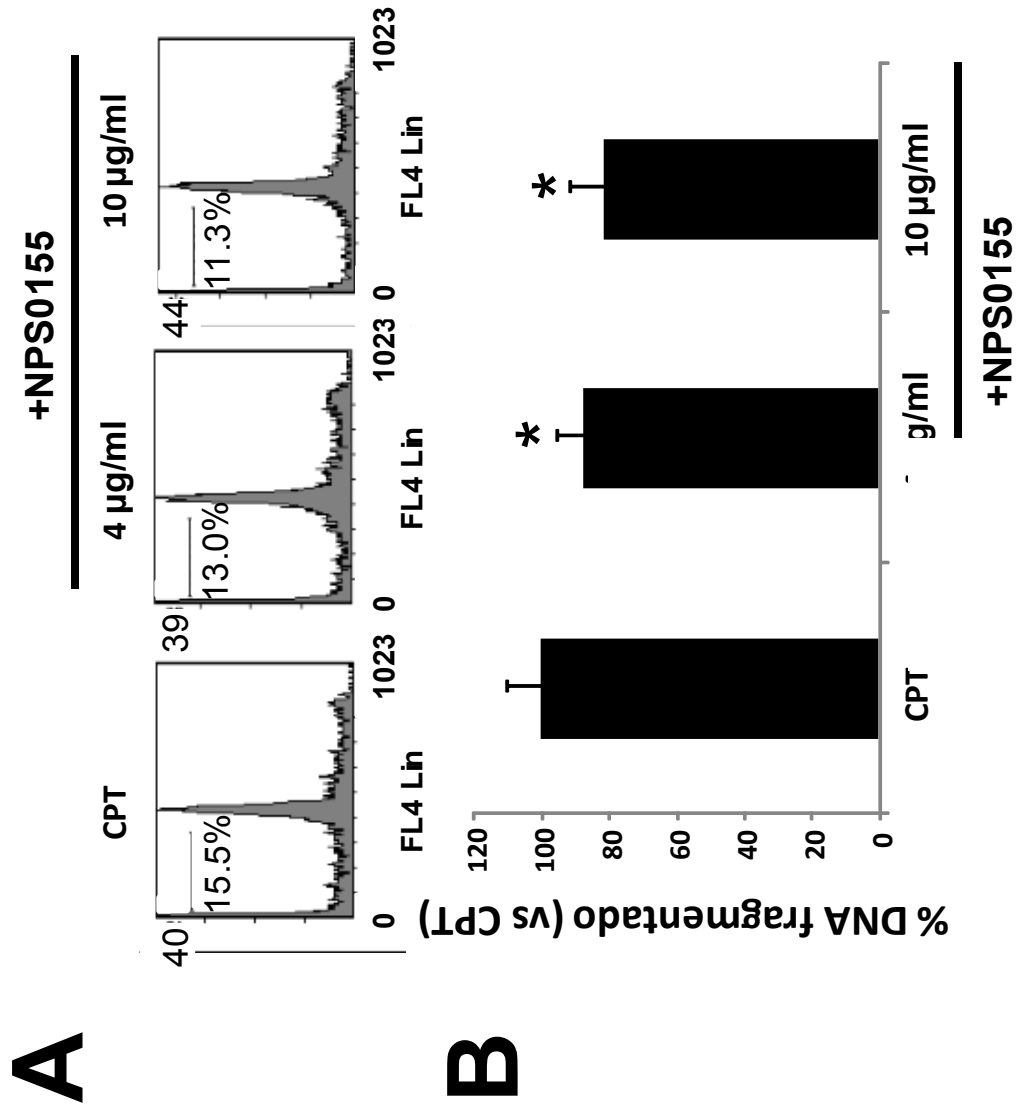


Figura 18

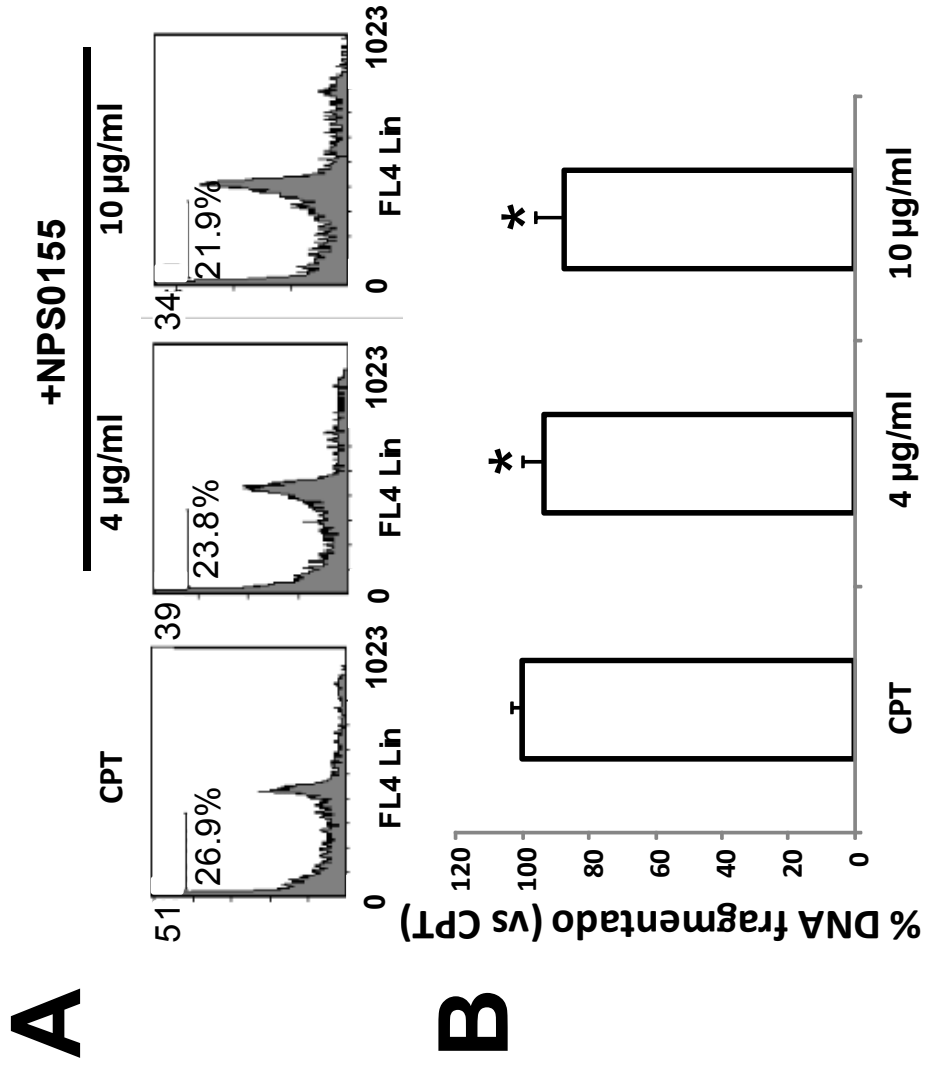


Figura 19

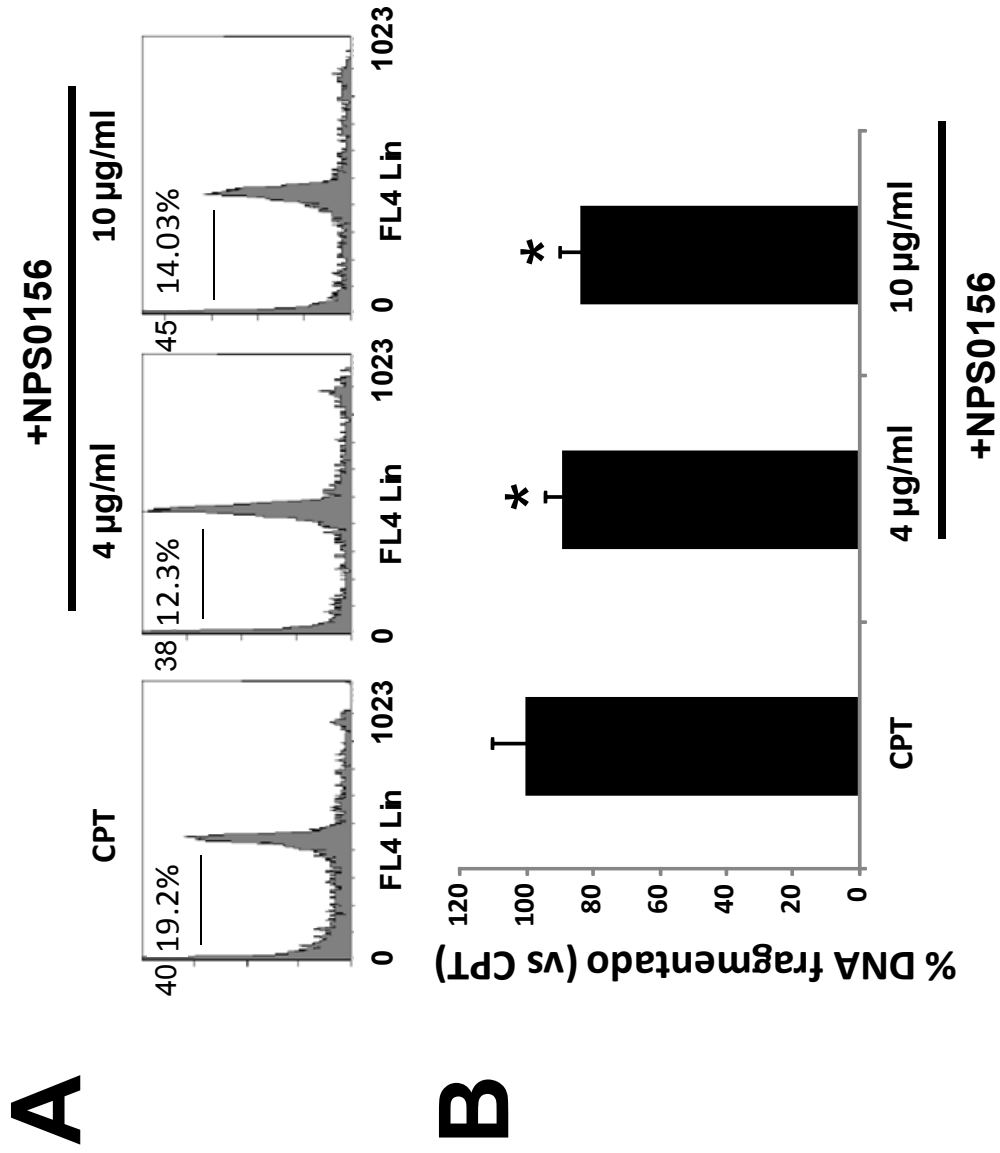


Figura 20

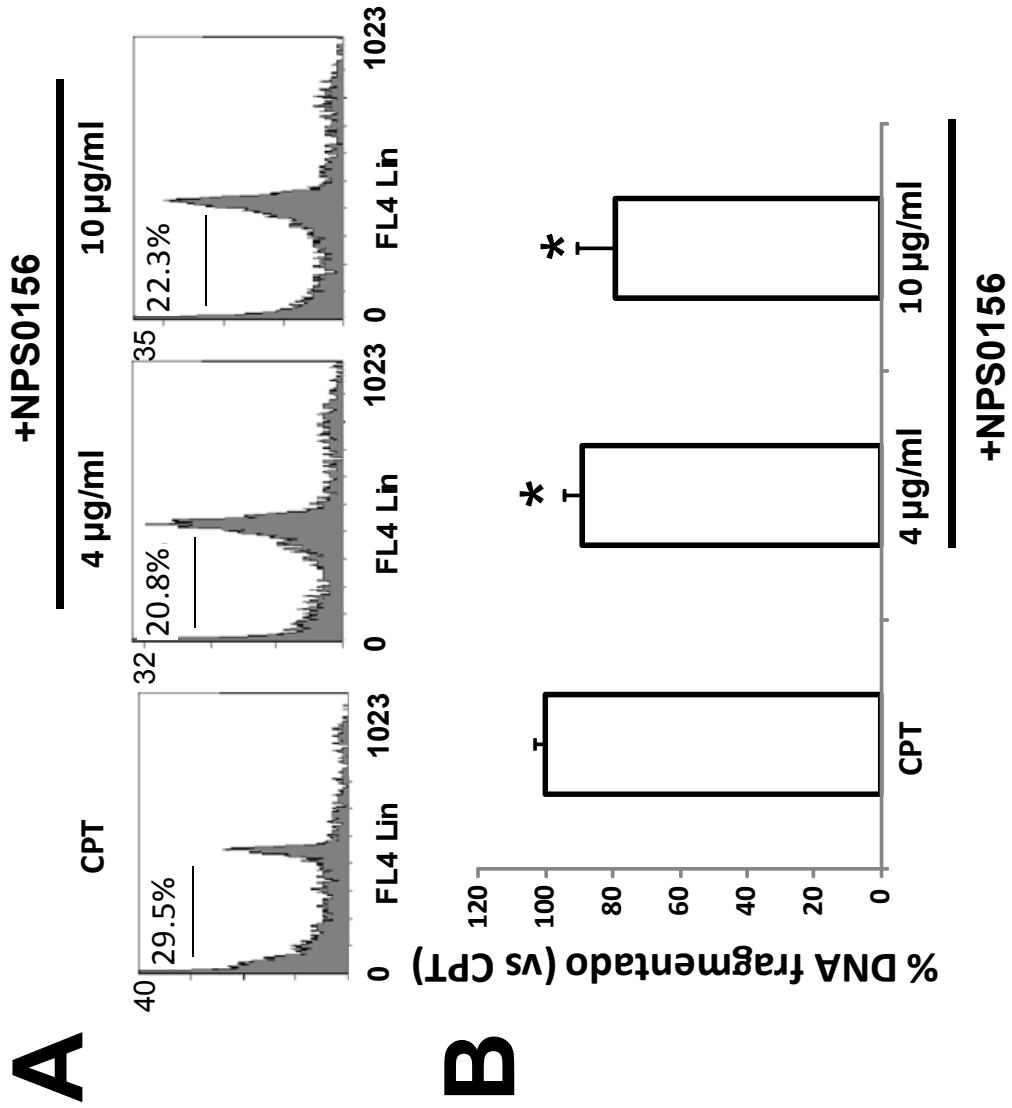
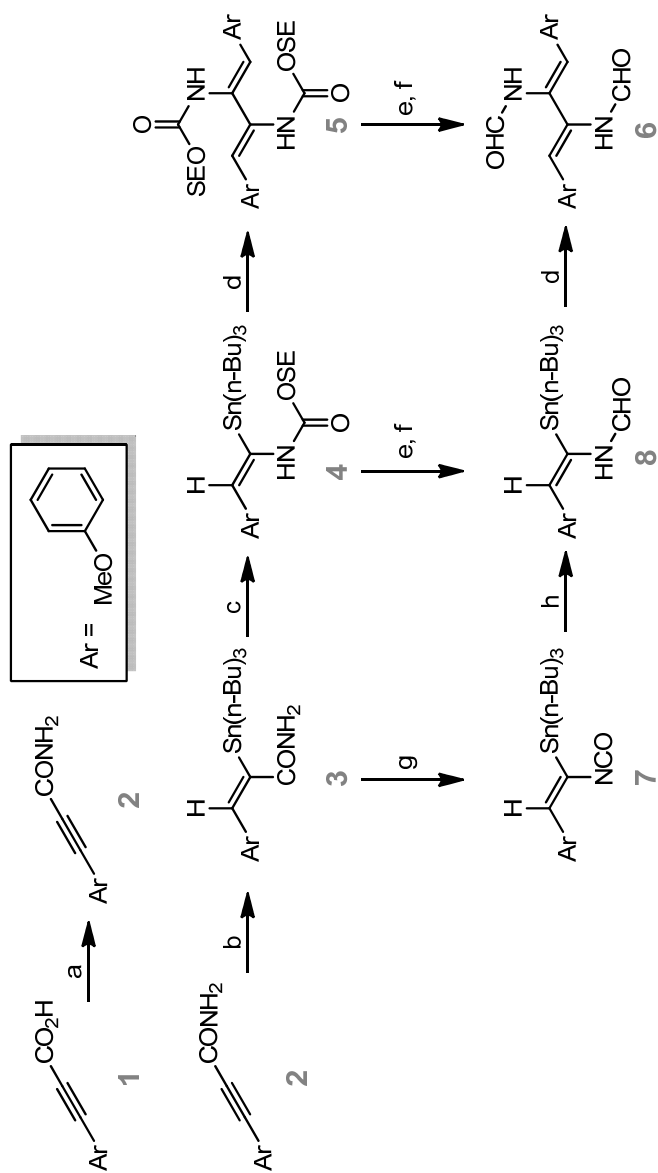


Figura 21



- a) ClCO_2Et , Et_3N , THF; aq NH_3 , 0°C , 1 h
 b) $\text{N-Bu}_3\text{SnH}$, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, THF, 0°C , 0.5 h
 c) $\text{Pb}(\text{OAc})_4$, $\text{TMS}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$, DMF, 0°C a 50°C , 8 h
 d) $\text{Pb}(\text{OAc})_2$, CuCl_2 , THF, 0°C , 0.5 h
 e) LHMDS , HMPA , acetic formic anhydride, THF, -78°C , 2 h
 f) TBAF , THF, 0°C a RT , 2 h
 g) $\text{Pb}(\text{OAc})_4$, THF, RT , 0.5 h
 h) LiEt_3BH , THF, -78°C a -3°C

Figura 22

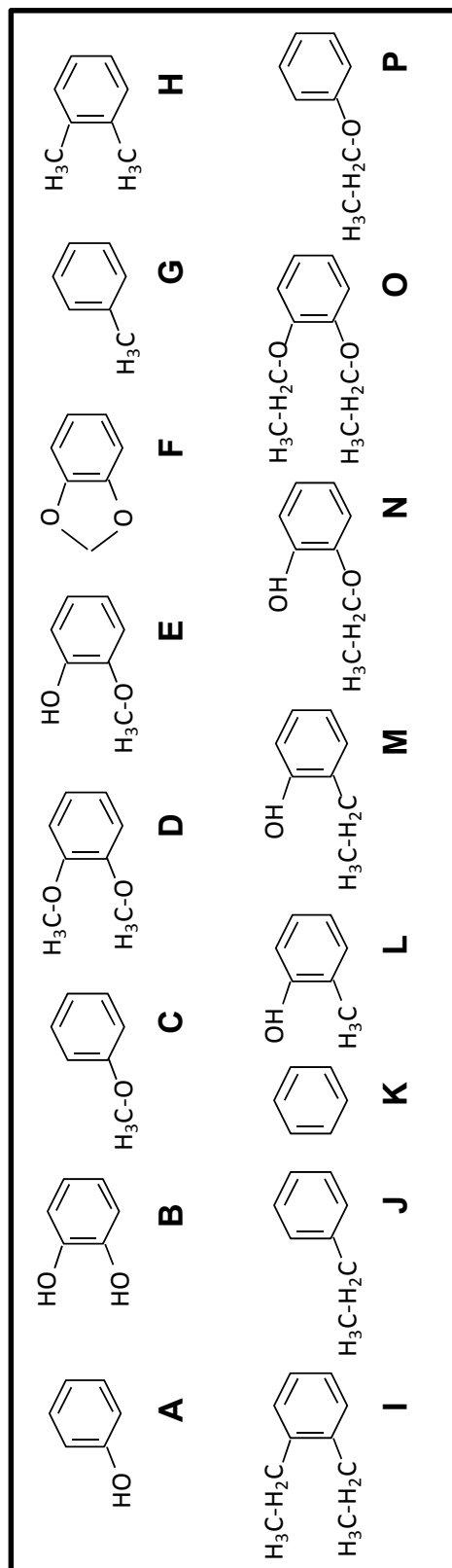
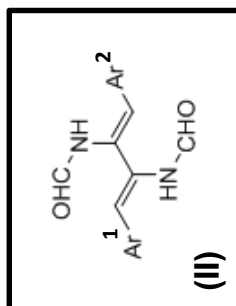


Figura 23

$A_1^{A_1}$ $A_1^{A_2}$	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
A	3,71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	3,41	5,61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	3,90	3,60	4,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	3,79	3,50	6,49	3,88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	6,10	5,80	6,30	6,19	6,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	6,61	6,31	6,80	6,70	6,50	7,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	6,82	6,52	7,02	6,91	6,72	7,22	7,44	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	7,14	6,84	7,33	7,23	7,03	7,55	7,75	8,07	-	-	-	-	-	-	-	-
I	7,85	7,55	8,05	7,94	7,75	8,25	8,46	8,78	7,49	-	-	-	-	-	-	-
J	7,18	6,88	7,37	7,27	7,07	7,58	7,79	8,11	8,82	8,15	-	-	-	-	-	-
K	4,00	3,71	4,20	6,60	6,40	6,91	7,12	7,44	8,15	7,48	4,30	-	-	-	-	-
L	6,52	6,22	6,72	6,61	6,42	6,92	7,14	7,45	8,17	7,49	6,82	6,84	-	-	-	-
M	6,88	6,58	7,07	7,00	6,78	7,28	7,49	7,81	8,52	7,85	7,18	7,55	7,55	-	-	-
N	6,54	6,24	6,73	6,63	6,43	6,94	7,15	7,47	8,18	7,51	6,84	6,85	7,21	6,87	-	-
O	7,17	6,87	7,36	7,26	7,06	7,57	7,78	8,10	8,81	8,14	7,47	7,48	7,84	7,50	8,13	-
P	6,84	6,54	7,03	6,93	6,73	7,24	7,45	7,77	8,48	7,81	7,14	7,15	7,51	7,17	7,80	7,47

ES 2 418 684 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> NEURON BIOPHARMA, S.A.

<120> ANÁLOGOS FORMILADOS DE XANTOCILINAS COMO NEUROPROTECTORES

<130> P8015ES00

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> NL1

<400> 1

gcatatcaat aagcggagga aaag 24

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> NL4

<400> 2

ggtccgtggt tcaagacgg 19

<210> 3

<211> 564

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 28S

<400> 3

cccgcgtccg agccgagcgc gttcctcggg ctaggcaggt cgcattgcac cctcggctat 60

aagacgcccc taggggcggt accttccgag ggcctttgac cgaccgccc aaccgacgct 120

ggcccgcgccg cggggaagta caccggcacg aatgccggct gaaccccgcg agcgagtctg 180

gtcgcaagcg cttccctttc aacaatttca cgtgcttttt aactctcttt tcaaagtgct 240

tttcatcttt cgatcactct acttgtgcmc tateggctctc cggccaatat ttagctttag 300

atgaaattta ccaccattt agagctgcat tcccaaacia ctcgactcgt cgaaggagct 360

tcacacgggc gcggacaccc catcccatac gggattctca ccctctatga cgtcccgttc 420

cagggcactt agatggggac cgctcccga gcatcctcta caaattacia tgcggacccc 480

gaaggagcca gctttcaaat ttgagctctt gccgcttcac tcgcccgttac tggggcaatc 540

cctgttggtt tcttttctc cgt 564



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201230174

②② Fecha de presentación de la solicitud: 07.02.2012

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C07C223/02** (2006.01)
A61K31/138 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	M ISAKA et al, Journal Natural Products 2007, vol 70, nº 4, págs 656-658. "A Xantocillin-like alkaloid from the insect pathogenic fungus Cordyceps brunnearubra BCC 1395", todo el documento	1-23
A	K TATSUTA et al, Tetrahedron Letters 2005, vol 46, nº 30, págs 5017-5020. "The first stereoselective total synthesis of antiviral antibiotic xantocillin X dimethylether", esquema 3	24

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 nº:

Fecha de realización del informe
17.07.2013

Examinador
M. P. Fernández Fernández

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07C, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, CAS, REGISTRY, ESPACENET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.06.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-25	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-25	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	M ISAKA et al, Journal Natural Products 2007, vol 70, nº 4, págs 656-658. "A Xantocillin-like alkaloid from the insect pathogenic fungus Cordyceps brunnearubra BCC 1395", todo el documento	2007
D02	K TATSUTA et al, Tetrahedron Letters 2005, vol 46, nº 30, págs 5017-5020. "The first stereoselective total synthesis of antiviral antibiotic xantocillin X dimethylether", esquema 3	2005

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) de la reivindicación 1 para la elaboración de un medicamento destinado a la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, deterioro cognitivo, enfermedades asociadas a la edad, etc (reivindicaciones 1-3), en las reivindicaciones 4-10 se concretan los sustituyentes de la fórmula general y en la reivindicación 11 se reivindican específicamente seis de estos compuestos. La reivindicación 12 se refiere a los compuestos de fórmula (II) con la salvedad de que en la fórmula (II) no se incluyen los compuestos en los que R1 a R4 son OH o OCH3 estando el sustituyente R4 en posición meta del anillo aromático; en las reivindicaciones 13-19 se concretan los sustituyentes de la fórmula (II) y en la reivindicación 20 se reivindican específicamente cinco de estos compuestos. Las reivindicaciones 21 y 22 se refieren al uso de los compuestos de fórmula (II) para la preparación de un medicamento y la formulación farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (II). Las reivindicaciones 23 y 24 describen el procedimiento para la obtención de un compuesto de fórmula (II) bien a partir de un extracto producido por *Penicillium chrysogenum* o por síntesis química. Finalmente en la reivindicación 25 se reivindica una cepa de la especie *Penicillium chrysogenum*.

El documento D1 divulga la estructura de la cordyformamida, compuesto (4), éste y su análogo O-metilado son los excluidos en la reivindicación 12, su actividad biológica (página 657 columna izquierda) se divulga como activo frente a la malaria, no se menciona su posible uso frente a enfermedades neurodegenerativas.

El documento D2 divulga la síntesis del dimetiléter de xantocilina X utilizando un derivado de estaño, los compuestos que se describen en la solicitud se sintetizan utilizando este tipo de derivados de estaño aplicado a los compuestos de fórmula (II) de la solicitud.

En el estado de la técnica no se han encontrado divulgados los compuestos de fórmula (II) de la solicitud por lo que se consideran nuevos y, por consiguiente, el procedimiento para su síntesis; tampoco se ha encontrado divulgada la actividad biológica dirigida a la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas ni la cepa de *Penicillium chrysogenum* de la reivindicación 25.

Por tanto, se considera que las reivindicaciones 1-25 de la solicitud cumplen los requerimientos de novedad y actividad inventiva según los Art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.