

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 447 940**

51 Int. Cl.:

**A01N 37/18** (2006.01)

**A61K 31/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2008** **E 08840146 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013** **EP 2205072**

54 Título: **Métodos para el tratamiento de varias enfermedades y afecciones, y compuestos útiles para los mismos**

30 Prioridad:

**15.10.2007 US 980109 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**13.03.2014**

73 Titular/es:

**THE SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL  
STUDIES (100.0%)  
10010 N. TORREY PINES ROAD  
LA JOLLA, CA 92037, US**

72 Inventor/es:

**SCHUBERT, DAVID R.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 447 940 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos para el tratamiento de varias enfermedades y afecciones, y compuestos útiles para los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos compuestos que son útiles para el tratamiento de varios indicios, incluyendo enfermedades y afecciones neurodegenerativas, diabetes, isquemia asociada con enfermedades cardíacas y déficit de memoria, así como para la protección contra dichos indicios, por ejemplo, enfermedades y afecciones neurodegenerativas, diabetes, isquemia asociada con enfermedades cardíacas y déficit de memoria. En un aspecto particular, la presente invención se refiere a métodos para el tratamiento de enfermedades y afecciones neurodegenerativas, diabetes, isquemia asociada con enfermedades cardíacas y déficit de memoria empleando los compuestos de la invención. En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a métodos para la protección de las neuronas en un sujeto que lo necesite. En otro aspecto más, la presente invención se refiere a métodos para potenciar la neurorregeneración en un sujeto que lo necesite. En otro aspecto más, la presente invención se refiere a métodos para potenciar la formación de la memoria en un sujeto que lo necesite.

**Antecedentes de la invención**

20 Actualmente, hay pocos o ningún tratamiento farmacológico eficaz para las lesiones neuronales agudas (tales como ictus y lesión de la médula espinal) y las enfermedades neurodegenerativas crónicas (tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, degeneración de la retina, etc.). Por consiguiente, se necesitan con urgencia fármacos que pueden proteger las neuronas y/o potenciar la neurorregeneración para tratar este tipo de lesiones o enfermedades devastadoras, así como potenciar la formación de la memoria. Otros objetivos de interés incluyen la CaM quinasa II, que participa en la formación de la memoria, y la tirosina fosfatasa, que participa en enfermedades tales como la diabetes.

Los factores de crecimiento neurotróficos (incluyendo, por ejemplo, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico derivado del cerebro, neurotrofina 3, neurotrofina 4/5, factor neurotrófico ciliar, factor neurotrófico derivado de células gliales, factor de crecimiento de fibroblastos y similares) han surgido en la última década como candidatos a prometedores fármacos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas agudas y crónicas. Estos factores proteicos de crecimiento neurotrófico desempeñan un papel esencial en el mantenimiento de las poblaciones neuronales desde el desarrollo hasta la edad adulta. Sin embargo, los estudios clínicos realizados con estos factores neurotróficos a base de proteínas han demostrado ser decepcionantes debido a su bajo comportamiento farmacocinético, baja biodisponibilidad, incapacidad para penetrar en el cerebro y los efectos pleiotrópicos. Por lo tanto, se ha invertido un gran esfuerzo en la búsqueda de moléculas neurotróficas pequeñas no peptídicas.

Las moléculas neurotróficas pequeñas se pueden administrar por vía oral y tienen el potencial de atravesar satisfactoriamente la barrera hematoencefálica. Desafortunadamente, sin embargo, hasta la fecha, se han identificado pocos compuestos que sean lo suficientemente prometedores para pasar a la etapa de ensayo clínico (para las revisiones de este campo, véase, por ejemplo, Thoenen y Sendtner, *Nat. Neurosci.* 2002, Suplemento 5:1046-1050; Saragovi y Gehring, *Trends Pharmacol. Sci.*, 2000, 21:93-98; Xie y Longo, *Prog. Brain Res.*, 2000, 128:333-347. En el documento PCT/US2004/021399, presentado el 2 de julio de 2004, publicado como WO2005/006945 el 27 de enero de 2005 y la solicitud de EE.UU. Nº 11/323.987, presentada el 30 de diciembre de 2005, publicada como documento USSN 2006/0160812 el 20 de julio de 2006, ambos de los cuales se incorporan por referencia en su totalidad y para todos los efectos, se divulgan moléculas neurotróficas pequeñas a modo de ejemplo. El documento EP 1612204 divulga moléculas pequeñas para su uso en el tratamiento de enfermedades tales como la enfermedad de Alzheimer.

Una velocidad anómala de apoptosis puede ser responsable de al menos parte de la muerte celular neuronal en enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Thompson, *Science*, 1995, 267:1456-1462). Por consiguiente, sin el deseo de quedar ligado a teoría alguna, los inhibidores de las vías de apoptosis (y otras formas de muerte de las células nerviosas), se pueden usar, por tanto, para potenciar la supervivencia neuronal. Los inhibidores de caspasas a base de péptidos, enzimas clave en la vía de la apoptosis, se verán afectados por el mismo inconveniente que las neurotrofinas en términos de su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica. Los inhibidores de moléculas pequeñas de la vía de la apoptosis se encuentran todavía en la etapa de exploración temprana (para una revisión, véase Huang, *Chem. & Biol.*, 2002, 9:1059-1072).

**Resumen de la invención**

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1. El compuesto tiene varias propiedades, es decir, propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antivirales, antibacterianas y antifúngicas. El compuesto de la invención tiene, por lo tanto, la capacidad de conferir varios efectos fisiológicos beneficiosos, por ejemplo, de proteger neuronas y/o de potenciar la neurorregeneración y/o de

potenciar la formación de la memoria y/o de actuar como inhibidores de las proteínas fosfatasa o quinasa y/o de actuar como inhibidores de la lipoxigenasa. El compuesto es útil para el tratamiento de varios indicios, incluyendo enfermedades y afecciones neurodegenerativas.

- 5 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporcionan formulaciones que contienen el compuesto descrito en el presente documento, que contienen además opcionalmente uno o más compuestos adicionales neurológicamente activos y/o adyuvantes para facilitar la administración del mismo a través de la barrera hematoencefálica.

## 10 Breve descripción de las figuras

La Fig. 1A ilustra los resultados de un ensayo de abstinencia del factor trófico. Se preparan neuronas corticales primarias de embriones de rata de 18 días de vida, y se cultivan a baja densidad celular de  $1 \times 10^6$ /placa de 35 mm, en medio que contiene suero, con diferentes compuestos. Luego se analiza la viabilidad 2 días más tarde usando un ensayo fluorescente vivo/muerto (Molecular Probes).

La Fig. 1B ilustra los resultados de un ensayo de excitotoxicidad realizado con cultivos primarios murinos E14 de neuronas corticales, como se ha descrito previamente (D. Schubert y D. Piasecki, *J. Neurosci* 21 (2001) 7455-7462). Tras 11 días de cultivo, se expusieron las células a glutamato 10  $\mu$ M durante 10 min, seguido de la adición de concentraciones variables de compuestos de plomo. 24 horas más tarde, se determinó la viabilidad celular con el ensayo de MTT y se verificó usando un ensayo fluorescente vivo/muerto.

La Fig. 1C ilustra los resultados de un ensayo de privación de glucosa. Se privaron células PC12 de glucosa más o menos J147 20 nM; luego se determinó la viabilidad celular 48 horas más tarde usando el ensayo de MTT (T. Soucek, R. Cumming, R. Dargusch, P. Maher y D. Schubert, *Neuron* 39 (2003) 43-56).

La Fig. 1D ilustra los resultados de un ensayo de estrés oxidativo. Se trataron células HT22 con glutamato 5 mM y diferentes concentraciones de dos versiones de derivados de curcumina. 24 horas más tarde, se midió la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT (J. B. Davis y P. Maher, "Protein Kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line", *Brain Res.* 652 (1994) 169-173). Leyenda para la Fig. 1A, FIG. 1B y Fig. 1D: x-x, Comp. CNB-001, o-o, Comp. J147.

La Fig. 2 ilustra la capacidad del compuesto CNB-001 y del compuesto J147 de la invención para proteger las células nerviosas de la isquemia química. Se trataron células HT22 con ácido yodoacético 20  $\mu$ M durante 2 horas solo o en presencia de concentraciones variables de CNB-001 o J147. Se confirmó el % de supervivencia por microscopía y se midió tras 24 horas mediante el ensayo MTT.

Los múltiples paneles de la Fig. 3, demuestran en conjunto que un compuesto de la invención, tal como J147, facilita la inducción de LTP en sinapsis de células piramidales CA1 colaterales de Schaffer en cortes de hipocampo de rata. En concreto, la Fig. 3A demuestra el efecto de J147 (1  $\mu$ M) en la transmisión sináptica basal. Se expusieron cortes de hipocampo a J147 durante el tiempo indicado por la barra de color negro. La pendiente del potencial postsináptico excitatorio de campo (fEPSP) se expresa como el porcentaje del valor inmediatamente antes de la adición de J147.

Las Fig. 3B y 3C demuestran que J147 no afecta a la transmisión sináptica basal. En lugar de ello, se observa que J147 facilita la inducción de LTP después de una estimulación tetánica débil (15 pulsos a 100 Hz), que sola no induce LTP en los cortes de control. El efecto de J147 depende de la dosis. Los cortes de hipocampo se dejaron sin tratar o se expusieron a J147 durante el tiempo indicado por la barra de color negro, y se aplicó una estimulación tetánica débil en el punto temporal 0. La pendiente de fEPSP se expresa como el porcentaje del valor inmediatamente antes de la aplicación de la estimulación tetánica débil. La figura 3B ilustra el curso temporal de los cambios en la pendiente de fEPSP.

Para comparar los datos entre los grupos, se calcularon los promedios de las pendientes de fEPSP 30-60 minutos después de la estimulación tetánica como un índice de la magnitud de LTP; los resultados se muestran en la Fig. 3C. Todos los datos son la media  $\pm$  ETM. \*P > 0,05 frente a nada. La Fig. 3D es un control negativo, empleando un compuesto inactivo (es decir, la forma alqueno de J147 en la que los nitrógenos están sustituidos con átomos de carbono).

Los múltiples paneles de la Fig. 4 demuestran que J147 y CNB-001 son neuroprotectores contra la agregación de proteínas intracelulares y la toxicidad. La Fig. 4A ilustra la viabilidad de células MC-65 tras la exposición a las concentraciones indicadas de los compuestos, y el grado de inducción de la síntesis del fragmento C-terminal de APP mediante la eliminación de la tetraciclina. Se determinó la muerte celular 5 días más tarde mediante el ensayo de MTT y se confirmó visualmente. Los datos se representan como un porcentaje viable con respecto a los controles de fármacos más las células desinducidas.

La Fig. 4B ilustra la agregación intracelular de fragmentos C-99 de APP en células MC-65, ensayada en los días 1, 2 y 3 después de la retirada de la tet en presencia (+) o ausencia (-) de CNB-001 1  $\mu\text{M}$  o J147 10 nM. Los fragmentos de APP se detectaron con anticuerpo 6E10.

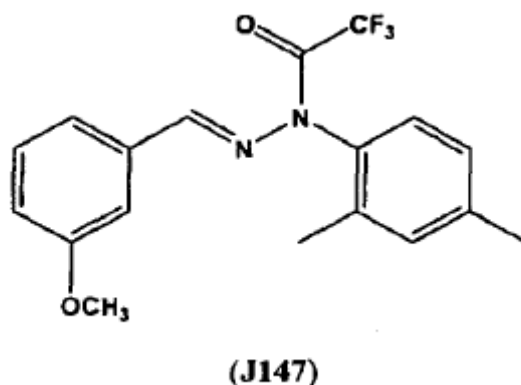
5 La Fig. 5 ilustra el efecto de la galantamina, compuesto CNB-001, compuesto J147, compuesto SK186 y compuesto SK187 en la exploración de un aparato en campo abierto por ratas Wistar adultas. Los datos representan la media  $\pm$  ETM de la locomoción, medida como el número de líneas atravesadas en el suelo del aparato en un período de aclimatación de 5 minutos inmediatamente antes del período de prueba.

10 La Fig. 6 ilustra el efecto de la galantamina, los compuestos CNB-001, J147, SK86 y SK187 en la tarea de reconocimiento de objetos en ratas Wistar. Los datos representan la media  $\pm$  ETM. \*P < 0,05 en comparación con el vehículo de control.

La Fig. 7 ilustra que J147 mejora el aprendizaje espacial y la memoria en el laberinto acuático de Morris. Se volvió opaco un tanque de agua circular de cuatro pies (121,92 cm) de diámetro, que contenía agua a 26-27  $^{\circ}\text{C}$ , con pigmento blanco, y se colocó una plataforma en el cuadrante NW. Se introdujeron aleatoriamente los ratones en el tanque frente a la pared de uno de los cuadrantes restantes para un ensayo de 50 s o hasta que encontraran la plataforma. Al llegar a la plataforma, o al finalizar los 50 s, se colocaron los ratones en la plataforma, donde se dejaron durante 15 segundos. Se realizaron cuatro ensayos por ratón cada día durante siete días consecutivos. Los datos se presentan como el tiempo medio para alcanzar la plataforma (latencia de escape) de los 4 ensayos diarios para cada grupo de ratones. Hay 3 grupos de 5 ratones cada uno. Uno es de tipo silvestre (círculos), otro es un modelo murino de Alzheimer doble transgénico (PS1 mutado y APP) (rectángulo) y el tercero es el ratón con EA más J147 que ha estado en la comida durante 4 meses a 100 ppm (diamante). Los datos muestran que los ratones con EA tienen un déficit en la memoria en relación con los animales de tipo silvestre que se corrige con la ingestión de J147.

### Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto que tiene la siguiente estructura:



30 Como es reconocido por los expertos en la materia, el compuesto de la invención se puede preparar fácilmente empleando métodos de síntesis convencionales. Por ejemplo, se puede condensar curcumina con fenilhidrazina mediante calentamiento a reflujo en tolueno durante una noche. Opcionalmente, se puede emplear una cantidad catalítica de ácido (HCl). Preferentemente, se emplearán curcumina pura (frente a la calidad técnica) y fenilhidrazina recién destilada.

Como otro ejemplo, se puede condensar 3-metoxi-benzaldehído con 2,4-dimetilfenil-hidrazina en metanol empleando condiciones convencionales de preparación de hidrazona (por ejemplo, calentando en el microondas para acelerar el tiempo de reacción). A continuación, se acila el NH libre con TFAA (anhídrido trifluoroacético), además de cantidades catalíticas (0,1 %) de DMAP (dimetilaminopiridina), THF (tetrahidrofurano) o DCM (diclorometano).

Como otro ejemplo más, los pirazoles contemplados por la presente invención se pueden preparar mediante la reacción de una 1,3-diona adecuadamente sustituida con una hidrazina adecuadamente sustituida (por ejemplo, fenilhidrazina). Véase, por ejemplo, *J. Med. Chem.* 40: 3057-63 (1997).

El compuesto de la invención se puede emplear opcionalmente en forma de una composición que incluye un compuesto que tiene la estructura de Fórmula (I) y un vehículo farmacéuticamente aceptable para el mismo. En algunas realizaciones, el vehículo farmacéuticamente aceptable es adecuado para la administración oral.

50

En algunas realizaciones, el compuesto de la invención se puede emplear opcionalmente en forma de sales farmacéuticamente aceptables. "Farmacéuticamente aceptable" se refiere a las propiedades de un compuesto, incluyendo la seguridad, la toxicidad y similares, de forma que un profesional médico o veterinario razonablemente prudente no sería disuadido de la administración de dicho compuesto a un sujeto. Dichas sales se preparan generalmente mediante la reacción del compuesto de la invención con una base o un ácido orgánico o inorgánico adecuado. Las sales orgánicas representativas incluyen sales de metanosulfonato, acetato, oxalato, adipato, alginato, aspartato, valerato, oleato, laurato, borato, benzoato, lactato, fosfato, toluenosulfonato (tosilato), citrato, malato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, napsilato, metanosulfonato, 2-naftalensulfonato, nicotinato, bencenosulfonato, butirato, canforato, canforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, glucoheptanoato, glicerofosfato, heptanoato, hexanoato, undecanoato, 2-hidroxietanosulfonato, etanosulfonato y similares. Las sales inorgánicas representativas se pueden formar a partir de ácidos inorgánicos tales como sulfato, bisulfato, hemisulfato, clorhidrato, clorato, perclorato, bromhidrato, yodhidrato, y similares. Los ejemplos de una sal de base incluyen sales de amonio; sales de metales alcalinos tales como sales de sodio, sales de potasio y similares; sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio, sales de magnesio y similares; sales con bases orgánicas tales como sales de dicitclohexilamina, N-metil-D-glucamina, feniletilamina y similares; y sales con aminoácidos tales como arginina, lisina y similares. Dichas sales se pueden preparar fácilmente empleando los métodos bien conocidos en la materia.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, se proporcionan formulaciones que comprenden uno o más de los compuestos anteriormente descritos y un vehículo farmacéuticamente aceptable para el mismo. Los vehículos farmacéuticamente aceptables a modo de ejemplo incluyen sólidos, soluciones, emulsiones, dispersiones, micelas, liposomas, y similares. Opcionalmente, el vehículo farmacéuticamente aceptable empleado en el presente documento comprende además un recubrimiento entérico.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables contemplados para su uso en la práctica de la presente invención son los que vuelven a los compuestos de la invención susceptibles de ser administrados por vía oral, vía sublingual, vía transdérmica, vía subcutánea, vía intracutánea, vía intratecal, vía intraocular, vía rectal, vía intravenosa, vía intramuscular, vía tópica, vía nasal, vía intraperitoneal, vía vaginal, vía intracraneal, vía intraventricular, y similares.

Por lo tanto, las formulaciones de la presente invención se pueden usar en forma de un sólido, una solución, una emulsión, una dispersión, una micela, un liposoma y similares, de modo que la formulación resultante contenga el compuesto de la presente invención, como principio activo, en mezcla con un vehículo o excipiente orgánico o inorgánico adecuado para aplicaciones comestibles o parenterales. El principio activo se puede preparar, por ejemplo, con los vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos habituales para comprimidos, microgránulos, cápsulas, supositorios, soluciones, emulsiones, suspensiones y cualquier otro adecuado para su uso. Los vehículos que se pueden usar incluyen glucosa, lactosa, goma de acacia, gelatina, manitol, pasta de almidón, trisilicato de magnesio, talco, almidón de maíz, queratina, sílice coloidal, almidón de patata, urea, triglicéridos de longitud de cadena media, dextranos, y otros vehículos adecuados para su uso en la fabricación de preparados, en forma sólida, semisólida o líquida. Además, se pueden usar agentes adyuvantes, estabilizantes, espesantes y colorantes, y perfumes. El/los compuesto/s activo/s se incluye/n en la formulación en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en el proceso o afección patológica.

Las formulaciones de la invención que contienen el principio activo pueden estar en una forma adecuada para un uso oral, por ejemplo, en forma de comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. Las formulaciones destinadas para un uso oral se pueden preparar de acuerdo con cualquier método conocido en la materia para la fabricación de composiciones farmacéuticas, y dichas formulaciones puede contener uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina, agentes aromatizantes tales como menta, aceite de gaulteria o cereza, agentes colorantes y agentes conservantes con el fin de proporcionar preparaciones farmacéuticamente atractivas y agradables al paladar. Los comprimidos que contienen el principio activo en mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos usados pueden ser, por ejemplo, (1) diluyentes inertes tales como carbonato de calcio, lactosa, fosfato cálcico o fosfato sódico; (2) agentes de granulación y disgregantes tales como almidón de maíz, almidón de patata o ácido algínico; (3) agentes aglutinantes tales como goma de tragacanto, almidón de maíz, gelatina o goma arábiga; y (4) agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden estar sin recubrir o se pueden recubrir mediante técnicas conocidas para retrasar la desintegración y la absorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar así una acción sostenida durante un período más largo. Se puede emplear, por ejemplo, un material de retardo temporal tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. También se pueden recubrir mediante técnicas tales como las descritas en las patentes de EE.UU. Nº 4.256.108; 4.160.452 y 4.265.874, para formar comprimidos terapéuticos osmóticos para una liberación controlada.

En algunas realizaciones, las formulaciones contempladas para un uso oral pueden estar en forma de cápsulas de gelatina dura en las que el principio activo esté mezclado con diluyente/s sólido/s inerte/s, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín. También pueden estar en forma de cápsulas de gelatina blanda en las que el principio activo esté mezclado con agua o un medio oleoso, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Las formulaciones de la invención pueden estar en forma de una suspensión inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con métodos conocidos usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, en forma de una solución en 1,3-butanodiol. Convencionalmente, se emplean aceites fijos estériles como medio disolvente o de suspensión. Con este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo suave, incluyendo mono- o di-glicéridos sintéticos, ácidos grasos, aceites vegetales de origen natural como el aceite de sésamo, aceite de coco, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, etc., o vehículos grasos sintéticos como oleato de etilo o similares. Se pueden incorporar tampones, conservantes, antioxidantes y similares según se requiera.

Las formulaciones de la invención también se pueden administrar en forma de supositorios para la administración rectal del fármaco. Estas formulaciones se pueden preparar mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado, tal como manteca de cacao, ésteres de glicéridos sintéticos de polietilenglicoles, que son sólidos a temperaturas ordinarias, pero que se licúan y/o disuelven en la cavidad rectal para liberar el fármaco. Debido a que cada sujeto puede presentar una amplia variedad en cuanto a la gravedad de los síntomas y a que cada fármaco tiene características terapéuticas únicas, el modo preciso de administración, la dosis empleada y el protocolo de tratamiento para cada sujeto se deja a la discreción del practicante.

La expresión "cantidad eficaz", como se aplica a los compuestos de la invención, significa la cantidad necesaria para efectuar el resultado terapéutico deseado, por ejemplo, un nivel eficaz para tratar, curar o aliviar los síntomas de un estado patológico para el que se esté administrando el compuesto terapéutico, o para establecer la homeostasis. Las cantidades eficaces para el objetivo terapéutico particular buscado dependerán, por supuesto, de varios factores, incluyendo el trastorno que se esté tratando, la gravedad del trastorno, la actividad del compuesto específico usado, la vía de administración, la velocidad de eliminación del compuesto específico, la duración del tratamiento, los fármacos usados en combinación o coincidentes con el compuesto específico, la edad, el peso corporal, el sexo, la dieta y el estado de salud general del paciente y factores similares bien conocidos en las técnicas y ciencias médicas. Estas y otras consideraciones generales tomadas en cuenta en la determinación de la "cantidad eficaz" son conocidas por los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en Gilman *et al.*, eds, Goodman and Gilman: "The Pharmacological Bases of Therapeutics", VIII ed., Pergamon Press, 1990; y "Remington's Pharmaceutical Sciences", XVII ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, cada uno de los cuales se incorporan por referencia en el presente documento. Las cantidades eficaces de los compuestos de la invención generalmente están en el intervalo de aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg/día; prefiriéndose los niveles en el intervalo de aproximadamente 0,05 a 10 mg/kg/día.

Se divulgan métodos para tratar una amplia variedad de indicios, por ejemplo, afecciones neurológicas, cáncer, diabetes, artritis, enfermedad de Alzheimer, traumatismo y otras enfermedades agudas y/o crónicas. Los indicios neurológicos a modo de ejemplo incluyen cualquier enfermedad o afección en la que se desee potenciar la formación de la memoria, reducir la pérdida de memoria, mejorar la pérdida de memoria, inhibir la muerte celular o similar, así como cualquier enfermedad que esté etiológicamente relacionada con la alteración de la regulación de las neurotrofinas o sus receptores, la inhibición de Bcl-2 o Bcl-X<sub>L</sub>; la inhibición de los miembros de la familia Bcl-2 pro-apoptótica (por ejemplo, Bax y Bad) para evitar la muerte celular no deseada, la inhibición de IAP (inhibidor de las proteínas apoptóticas), la potenciación de la unión de IAP a las caspasas, la desestabilización/el bloqueo del plegamiento anómalo de proteínas habitualmente solubles en formas muy compactadas insolubles y similares. Como se usa en el presente documento, "afección patológica" se refiere a un trastorno tal como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, amiloidosis senil sistémica, enfermedad priónica, tembladera, encefalopatía espongiiforme bovina, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker, diabetes de tipo II, diabetes de aparición en edad adulta, insulinoma, esclerosis lateral amiotrófica, amiloidosis de amiloide A, amiloidosis AL, polineuropatía amiloide familiar (de tipo portugués, japonés y sueco), amiloidosis transtirretiniana familiar, fiebre mediterránea familiar, nefropatía amiloide familiar con urticaria y sordera (síndrome de Muckle-Wells), amiloidosis sistémica hereditaria no neuropática (polineuropatía amiloide familiar III), amiloidosis familiar de tipo finlandés, cardiomiopatía amiloide familiar (de tipo danés), amiloide cardíaco aislado, amiloidosis atrial aislada, amiloidosis (primaria) idiopática, mieloma o amiloidosis asociada a macroglobulinemia, amiloidosis nodular cutánea localizada primaria asociada con el síndrome de Sjogren, amiloidosis (secundaria) reactiva, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo islandés, amiloidosis asociada con hemodiálisis a largo plazo, amiloidosis renal hereditaria asociada con el fibrinógeno, amiloidosis asociada con el carcinoma medular de la tiroides, amiloidosis sistémica hereditaria asociada con la lisozima, ictus, isquemia (por ejemplo, isquemia cardíaca), traumatismo, neuropatía retiniana, neuropatía periférica, neuropatía diabética, neuropatía de fondo y similares.

Se divulgan métodos para tratar la lesión neuronal aguda, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad eficaz de un compuesto como se describe en el presente documento a un sujeto en necesidad del mismo.

Como es fácilmente reconocido por los expertos en la materia, la lesión neuronal aguda engloba lesiones tales como ictus, lesión de la médula espinal, y similares. En dichos casos, los expertos en la materia reconocen que las células nerviosas mueren como resultado de las vías bioquímicas que incluyen necrosis y diversas formas de muerte celular programada. Además, las células gliales pueden participar en la muerte celular. Sin el deseo de quedar ligado a

teoría alguna, se cree que los compuestos de la invención son eficaces, al menos en parte, mediante la prevención de la activación de células gliales y la posterior liberación de compuestos neurotóxicos.

5 Como se usa en el presente documento, "tratar" se refiere a inhibir o detener el desarrollo de una enfermedad, un trastorno o una afección y/o provocar la reducción, remisión o regresión de una enfermedad, un trastorno o una afección. Los expertos en la materia entenderán que es posible usar diversas metodologías y ensayos para evaluar el desarrollo de una enfermedad, un trastorno o una afección, y de manera similar, se pueden usar diversas metodologías y ensayos para evaluar la reducción, remisión o regresión de una enfermedad, un trastorno o una afección.

10 Como se usa en el presente documento, "administrar" se refiere a proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto a un sujeto, usando administración oral, sublingual, intravenosa, subcutánea, transcutánea, intramuscular, intracutánea, intratecal, epidural, intraocular, intracraneal, por inhalación, rectal, vaginal y similares. También se contempla la administración en forma de cremas, lociones, comprimidos, cápsulas, microgránulos, 15 polvos dispersables, gránulos, supositorios, jarabes, elixires, grageas, soluciones inyectables, soluciones acuosas o no acuosas estériles, suspensiones o emulsiones, parches y similares. Los principios activos se pueden formular con vehículos farmacéuticamente aceptables, no tóxicos, incluyendo, glucosa, lactosa, goma de acacia, gelatina, manitol, pasta de almidón, trisilicato de magnesio, talco, almidón de maíz, queratina, sílice coloidal, almidón de patata, urea, dextranos y similares.

20 La vía de administración preferida variará con el indicio clínico. Se tendrá que producir necesariamente cierta variación en la dosis dependiendo del estado del paciente que se esté tratando, y el médico, en cualquier caso, determinará la dosis apropiada para cada paciente. La cantidad eficaz de compuesto por dosis unitaria depende, entre otras cosas, del peso corporal, la fisiología y la pauta de inoculación seleccionada. Una dosis unitaria de 25 compuesto se refiere al peso de compuesto empleado por cada administración sin el peso del vehículo (cuando se usa vehículo).

30 Los sistemas de administración dirigida, tales como matrices poliméricas, liposomas, microesferas, nanopartículas y similares, pueden aumentar la concentración eficaz de un agente terapéutico en el lugar donde se necesita el agente terapéutico y reducir los efectos no deseados del agente terapéutico. Con una administración más eficaz de un agente terapéutico, se reducen las concentraciones sistémicas del agente, porque se pueden administrar menores cantidades del mismo, acumulándose los mismos o mejores resultados terapéuticos. Las metodologías aplicables al aumento de la eficiencia en la administración de agentes terapéuticos, por lo general, se centran en la fijación de un resto de dirección al agente terapéutico o a un vehículo que posteriormente se carga con un agente terapéutico.

35 Se han diseñado diversos sistemas de administración de fármacos mediante el uso de vehículos tales como proteínas, péptidos, polisacáridos, polímeros sintéticos, partículas coloidales (es decir, liposomas, vesículas o micelas), microemulsiones, microesferas y nanopartículas. Estos vehículos, que contienen agentes farmacéuticamente útiles atrapados, tienen por objeto lograr la liberación controlada del fármaco específico de la 40 célula o específico del tejido.

45 Los compuestos descritos en el presente documento se pueden administrar en forma de liposomas. Como es conocido en la técnica, los liposomas derivan generalmente de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas. Los liposomas están formados por cristales líquidos hidratados mono- o multilamelares que están dispersos en un medio acuoso. Se puede usar cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable capaz de formar liposomas. Los compuestos descritos en el presente documento, cuando están en forma de liposomas, pueden contener, además de los compuestos descritos en el presente documento, estabilizantes, conservantes, excipientes y similares. Los lípidos preferidos son los fosfolípidos y las fosfatidil-colinas (lecitinas), tanto naturales como 50 sintéticos. Los métodos para formar liposomas son conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Prescott, Ed., "Methods in Cell Biology", Volumen XIV, Academic Press, Nueva York, N. Y., (1976), pág. 33 *et seq.*)

55 Se pueden usar varios enfoques de administración para suministrar agentes terapéuticos al cerebro salvando la barrera hematoencefálica. Dichos enfoques utilizan inyecciones intratecales, implantes quirúrgicos (Ommaya, *Cancer Drug Delivery*, 1: 169-178 (1984) y la patente de EE.UU. Nº 5.222.982), infusión intersticial (Bobo *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 91: 2076-2080 (1994)), y similares. Estas estrategias administran un agente en el SNC mediante la administración directa en el líquido cefalorraquídeo (LCR) o en el parénquima cerebral (ECF).

60 La administración de fármacos en el sistema nervioso central a través del líquido cefalorraquídeo se realiza, por ejemplo, por medio de un dispositivo implantable subduralmente que recibe el nombre de "reservorio de Ommaya" por su inventor. El fármaco se inyecta en el dispositivo y, posteriormente, se libera en el líquido cefalorraquídeo que rodea el cerebro. Se puede dirigir hacia zonas específicas de tejido cerebral expuesto que luego adsorben el fármaco. Esta adsorción es limitada, ya que el fármaco no se desplaza libremente. Para la administración del agente, se usa un dispositivo modificado, mediante el cual se implanta el reservorio en la cavidad abdominal y el fármaco inyectado es transportado por el líquido cefalorraquídeo (tomado de y devuelto a la columna vertebral) hacia 65 el espacio ventricular del cerebro. A través de la derivatización de omega-3, los complejos biomoleculares específicos del sitio pueden superar la limitación en cuanto a la adsorción y el movimiento de los agentes

terapéuticos a través del tejido cerebral.

Otra estrategia para mejorar la administración del agente en el SNC consiste en aumentar la absorción del agente (adsorción y transporte) a través de la barrera hematoencefálica y la absorción del agente terapéutico por las células (Broadwell, *Acta Neuropathol.*, 79: 117-128 (1989); Pardridge *et al.*, *J. Pharmacol. Experim. Therapeutics*, 255: 893-899 (1990); Banks *et al.*, *Progress in Brain Research*, 91:139-148 (1992); Pardridge, "Fuel Homeostasis and the Nervous System", ed.: Vranic *et al.*, Plenum Press, Nueva York, 43-53 (1991)). El paso de agentes a través de la barrera hematoencefálica al cerebro se puede mejorar bien mejorando la permeabilidad del propio agente o modificando las características de la barrera hematoencefálica. Por lo tanto, el paso del agente se puede facilitar aumentando su liposolubilidad mediante la modificación química y/o mediante su acoplamiento a un vehículo catiónico o mediante su acoplamiento covalente a un vector peptídico capaz de transportar el agente a través de la barrera hematoencefálica. Los vectores de transporte de péptidos también se conocen como compuestos permeabilizadores de la barrera hematoencefálica (patente de EE.UU. N° 5.268.164). En la patente de EE.UU. N° 6.005.004, se describen macromoléculas específicas del sitio con características lipófilas útiles para la administración en el cerebro.

Otros ejemplos (patente de EE.UU. N° 4.701.521 y patente de EE.UU. N° 4.847.240) describen un método de unión covalente de un agente a un vehículo macromolecular catiónico que entra en las células a velocidades relativamente superiores. Estas patentes enseñan la mejora en la absorción celular de biomoléculas en las células cuando se unen covalentemente a resinas catiónicas.

La patente de EE.UU. N° 4.046.722 desvela fármacos contra el cáncer unidos covalentemente a polímeros catiónicos con el fin de dirigirlos a las células que portan antígenos específicos. Los vehículos poliméricos tienen pesos moleculares de aproximadamente 5.000 a 500.000. Dichos vehículos poliméricos se pueden emplear para administrar compuestos descritos en el presente documento de manera dirigida.

En las patentes de EE.UU. N° 4.631.190 y 5.144.011, se describe otro trabajo que implica la unión covalente de un agente a un polímero catiónico a través de una molécula intermedia (también conocida como espaciador) sensible a los ácidos. Se ligan covalentemente varias moléculas espaciadoras, tales como el ácido *cis*-aconítico, al agente y al vehículo polimérico. Estas controlan la liberación del agente desde el vehículo macromolecular cuando se somete a un leve aumento de la acidez, tal como el que probablemente se produce dentro de un lisosoma de la célula. El fármaco se puede hidrolizar selectivamente a partir del conjugado molecular y liberarse en la célula en su forma no modificada y activa. Los conjugados moleculares se transportan a los lisosomas, donde son metabolizados bajo la acción de las enzimas lisosomales a un pH sustancialmente más ácido que otros compartimentos o fluidos del interior de una célula u organismo. El pH de un lisosoma ha demostrado ser de aproximadamente 4,8, mientras que durante la etapa inicial de la digestión del conjugado, el pH es posiblemente tan bajo como 3,8.

Se divulgan métodos para tratar la enfermedad neurodegenerativa crónica, comprendiendo dichos métodos administrar una cantidad eficaz de un compuesto según lo descrito en el presente documento a un sujeto en necesidad del mismo.

Como los expertos en la materia reconocerán fácilmente, la enfermedad neurodegenerativa crónica abarca indicios tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, glaucoma, degeneración de la retina, degeneración macular, pérdida de audición relacionada con la edad, deterioro cognitivo leve, demencia (incluyendo, por ejemplo, demencia frontotemporal, demencia por SIDA, y similares), parálisis supranuclear progresiva, ataxias espinocerebelosas, y similares.

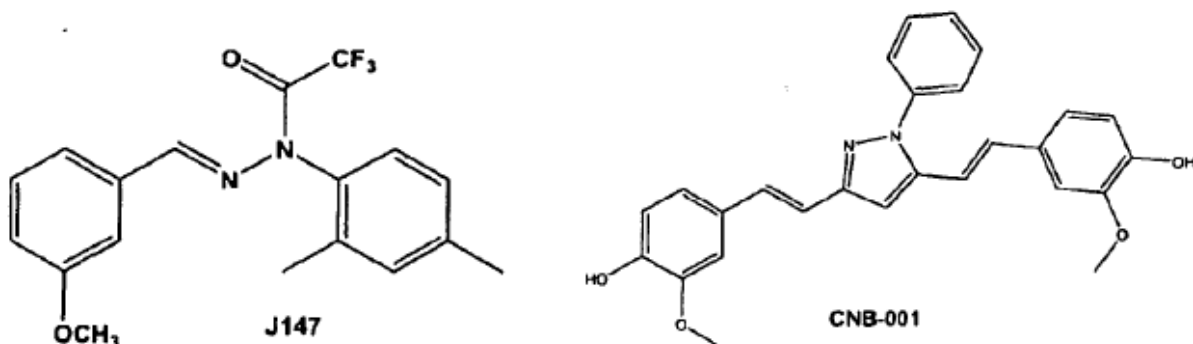
Se divulgan métodos de protección de las neuronas en un sujeto que lo necesita, comprendiendo dichos métodos administrar una cantidad eficaz de un compuesto según lo descrito en el presente documento a dicho sujeto. Como se usa en el presente documento, la expresión "protección de las neuronas" se refiere a la prevención del daño en los nervios, deterioro de las neuronas y/o muerte de las neuronas, independientemente de la causa o del agente causante. A lo largo de la vida neuronal, las neuronas son sometidas a diversos factores que afectan y contribuyen al proceso de envejecimiento natural, lo que puede producir un deterioro de la fisiología, morfología y similares de las neuronas. Las neuronas también están sometidas a diversos factores que causan lesiones y daños, provocando la reducción o la pérdida de parte de o todas sus características fisiológicas y morfológicas. Los factores pueden ser endógenos (por ejemplo, citoquinas, excitotoxinas y similares; o los liberados tras una ictus u otro daño) o factores exógenos, tales como alcohol, productos farmacéuticos, y similares.

Se divulgan métodos para potenciar la neuroregeneración en un sujeto que lo necesita, comprendiendo dichos métodos administrar una cantidad eficaz de un compuesto según lo descrito en el presente documento a dicho sujeto. Como se usa en el presente documento, "neuroregeneración" se refiere al nuevo crecimiento de las proyecciones neuronales para reparar el daño producido en las mismas (donde el cuerpo celular permanece intacto) y el surgimiento de nuevas proyecciones. La neuroregeneración puede ser necesaria en un sujeto cuando haya neuropatías. Las neuropatías a modo de ejemplo incluyen neuropatía retiniana, neuropatía periférica, neuropatía de fondo y similares.



Se divulgan métodos para potenciar la formación de la memoria, comprendiendo dichos métodos administrar una cantidad eficaz de un compuesto según lo descrito en el presente documento a un sujeto en necesidad del mismo.

- 5 La invención se describirá ahora con mayor detalle por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes. El compuesto de la invención y los compuestos útiles para la comparación de las propiedades neuroquímicas con el mismo, incluyen los siguientes:



#### EJEMPLO 1

##### 10 *Ensayos generales para la detección de la actividad neuroprotectora*

Se pueden preparar neuronas corticales primarias a partir de embriones de ratas Sprague-Dawley macho de 18 días de vida según lo descrito (Liu y Schubert, *J. Neurochem.*, 1997, 69:2285-2293 y *J. Neurochem.*, 1998, 71:2322-2329). En síntesis, se disecciona la corteza cerebral bajo un microscopio anatómico, y se libera de las meninges y los vasos sanguíneos. Se corta la corteza en trozos pequeños, y luego se disocia mediante digestión con tripsina y se hace pasar a través de una punta de pipeta. Se suspenden las neuronas disociadas en diversos medios y se siembran en placas de cultivo de tejidos recubiertas con polilisina de 35 mm (por ejemplo,  $1 \times 10^6$  células/placa). Se pueden usar varias condiciones de cultivo diferentes como se conoce en la técnica. Los compuestos de la invención se pueden añadir a placas de cultivo celular. La supervivencia celular se puede medir 1 a 2 días después de la administración de los compuestos.

Se puede usar un medio que contiene suero, que incluye un medio esencial mínimo (Sigma) que contiene glucosa 30 mM, glutamina 2 mM, piruvato 1 mM, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100  $\mu$ g/ml) y suero de ternero fetal al 10 %. A una densidad de siembra de  $1 \times 10^6$  células/placa, la mayoría de las neuronas mueren tras una semana de cultivo en este medio. Si se siembra a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/placa, entonces sobrevive la mayoría de las neuronas. Lo más probable es que la supervivencia neuronal dependiera de la densidad celular en este sistema dependiera de los factores neurotróficos secretados por las neuronas, no por las células gliales. Los resultados son los mismos cuando la proliferación glial es inhibida por el arabinósido de citosina.

30 Se puede emplear un medio libre de suero que contenga DMEM/F-12 más suplementos de  $N_2$  (Invitrogen). Cuando se sembró a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/placa, casi todas las neuronas murieron en tres días. Los mecanismos de muerte celular en este medio de cultivo tienden más a ser el estrés oxidativo y la deficiencia de factor trófico.

#### EJEMPLO 2

##### 35 *Ensayos de abstinencia del factor trófico*

Las relaciones entre la estructura y la actividad de los compuestos de acuerdo con la presente invención se pueden determinar mediante la medición de la abstinencia del factor trófico en neuronas corticales primarias de ratón. Como se muestra en la Fig. 1A-Fig. 1D, los compuestos se añaden a cultivos primarios de baja densidad de neuronas corticales de rata E18 en el momento de la siembra, y se determina la supervivencia celular dos días después mediante varios métodos.

#### EJEMPLO 3

##### 45 *Ensayos de excitotoxicidad*

Las relaciones entre la estructura y la actividad de diversos compuestos de acuerdo con la presente invención también se pueden determinar mediante la medición de la excitotoxicidad en neuronas corticales primarias de ratón de la siguiente manera.

El ensayo de excitotoxicidad se lleva a cabo con cultivos primarios de neuronas corticales preparadas a partir de cortezas embrionarias de ratones BALB/c de 14 días según lo descrito (Schubert y Piasecki, *J. Neurosci.* 21:7455-7462, 2001). Se siembran las células a  $1 \times 10^5$  células/pocillo en placas de microvaloración recubiertas con poli-L-lisina y laminina de 96 pocillos. Tras 11 días de cultivo, se exponen las neuronas corticales a glutamato 10  $\mu$ M durante 10 min, seguido de la adición de concentraciones variables de los compuestos de la invención. 24 horas después, se determina la viabilidad celular con el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). La reducción de MTT es un método ampliamente usado para la medición de la proliferación y la viabilidad celular (Mosmann, *J. Immunol. Methods* 65:55-63, 1983).

También se realizan ensayos de toxicidad similares a los descritos anteriormente con los compuestos de la invención usando células HT22 en un ensayo para el estrés oxidativo. Tras la exposición con glutamato 1 mM, 2 mM, 2,5 mM o 5 mM, se determina la viabilidad celular con el ensayo de MTT.

El Compuesto J147 mostró una  $CE_{50}$  de ~5 nM tras la exposición con glutamato 5 mM.

Se encuentran relaciones distintas entre la estructura y la actividad con la abstinencia del factor trófico y los ensayos de HT22. También se encuentra que los compuestos de acuerdo con la presente invención protegen contra la excitotoxicidad en neuronas corticales primarias de ratón con eficacias similares.

#### 20 EJEMPLO 4

##### ***Evaluación farmacocinética de los compuestos de la invención***

El presente ejemplo demuestra la capacidad de los compuestos de la invención para atravesar la barrera hematoencefálica en ratones. Se estudiaron las propiedades farmacocinéticas de una sola dosis oral de los compuestos a modo de ejemplo de acuerdo con la invención, es decir, el Comp. 11-001 y el Comp. J147, en ratones BALB/c hembra de 10 semanas de vida. Se emulsiona el Comp 11-001 o el Comp J147 en carboximetilcelulosa al 2,5 % a una concentración de 20 mg/ml y se administra por sonda a una dosis de 400 mg/kg de peso corporal o 200 mg/kg de peso corporal, respectivamente. A continuación, se sacrifican los ratones a diversos intervalos después de la administración (0, 1 h, 2 h, 4 h y 6 h).

Se obtiene plasma de sangre (mezclada con  $K_3EDTA$  para prevenir la coagulación) mediante centrifugación a 4.300 g durante 10 min, se extrae dos veces con acetato de etilo/propanol (9:1, v/v). Se centrifugan los extractos a 5.000 g durante 10 min para formar capas acuosas/orgánicas. Se centrifuga la capa orgánica que contiene Comp 11-001 se centrifuga a 20.000 g durante 10 min para sedimentar las partículas. La recuperación de la extracción a partir del plasma es del aproximadamente 90 %. Se analizaron treinta  $\mu$ l del mismo mediante HPLC dotada de una columna de fase inversa C18 – el Comp. 11-001 se detecta a 330 nm. El sistema disolvente de elución es acetonitrilo al 50 %, agua al 50 % y 1 g/l de ácido trifluoroacético con un caudal de 1 ml/min.

Para estudiar la distribución de los compuestos de acuerdo con la invención en el cerebro en diversos intervalos de tiempo (0, 1 h, 2 h, 4 h y 6 h) tras la sonda (400 mg/kg o 200 mg/kg como se ha indicado anteriormente), se anestesian los ratones con hidrato de cloral y se perfunden a través del corazón con solución salina tamponada con fosfato (PBS) para eliminar la sangre del cerebro. A continuación, se decapitan los ratones, se extirpan los cerebros, y se congelan rápidamente y se almacenan a -80 °C antes de su posterior análisis. Para medir el nivel de compuesto de la invención en el cerebro, se homogenizan trozos de cerebro pesados por sonicación en 3 volúmenes de PBS. A continuación, se extraen los homogeneizados y se miden mediante HPLC como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1. Concentración en plasma y contenido cerebral del Comp 11-001 o J147 tras una sola dosis oral (400 mg/kg o 200 mg/kg) por sonda

Tiempo tras la sonda	Concentración en plasma ( $\mu$ g/ml)		Contenido cerebral ( $\mu$ g/g de cerebro)	
	11-001	J147	11-001	J147
0 h	0	0	0	0
1 h	1,84	5,6	2,62	3,9
2 h	2,30	0,3	1,28	2,8
4 h	1,25		0,89	
6 h	0,67		0,95	

El presente estudio muestra que los compuestos de ejemplo de acuerdo con la invención (11-001 y J147) se absorben rápidamente en la sangre y se distribuyen rápidamente hacia el cerebro. La concentración en plasma máxima para 11-011 se alcanza aproximadamente 2 horas después de la administración, mientras que la

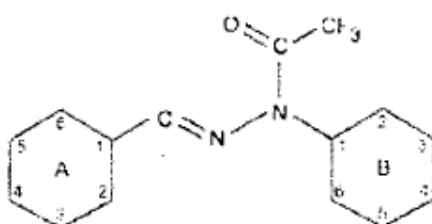
concentración en plasma máxima de J147 se alcanza incluso más rápido, solamente aproximadamente 1 hora después de la administración. La concentración máxima en el cerebro para ambos compuestos de ejemplo se alcanza aproximadamente 1 hora después de la sonda, aunque el Compuesto J147 tiene una mayor capacidad para ser retenido en el cerebro que el Compuesto 11-011, quizás debido a la mayor hidrofobicidad del primero. Seis horas después de la administración, se ha eliminado la mayor parte del compuesto de ensayo de la sangre y del cerebro.

Por lo tanto, estos resultados muestran que los compuestos de ejemplo de acuerdo con la invención se pueden absorber por vía oral y atravesar la barrera hematoencefálica.

10 **EJEMPLO 5**

Análisis preliminar de SAR de J147 usando ensayos de oxitosis de TFW, MC65 y HT-22

15 Se llevaron a cabo análisis preliminares de SAR en la serie de compuestos expuestos a continuación, en base a la siguiente estructura genérica:



Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Compuesto	A	B	CE <sub>50</sub> de HT-22	CE <sub>50</sub> de TFW	CE <sub>50</sub> de MC65
J147	3 OCH <sub>3</sub>	2,4-dimetilo	6 nM	50 nM	10 nM
Sk35	4 OCH <sub>3</sub>	2,4-dimetilo	4 nM	35 nM	10 nM
HF 38FP	H	H	33 nM	70 nM	80 nM
HF 39FP	H	2,4-dimetilo	37 nM	>1 μM	220 nM
HF 40FP	3 OCH <sub>3</sub>	H	75 nM	100 nM	250 nM
HF 41FP	H	4-metilo	33 nM	> 1 μM	>1 μM
HF 42FP	3 OCH <sub>3</sub>	4-metilo	80 nM	700 nM	50 nM
HF 43FP	H	2-metilo	50 nM	800 nM	400 nM
HF 43 FO	3 OCH <sub>3</sub>	2-metilo	68 nM	>1 μM	130 nM
Sk36	4 CO <sub>2</sub> H	2,4-dimetilo	100 nM	300 nM	300 nM
Sk37	4 OCO <sub>2</sub> H	2,4-dimetilo	>1 μM	>1 μM	>1 μM
J147A	3 OCH <sub>3</sub> TFA sustituido con acetilo	2,4-dimetilo	70 nM	>1 μM	280 nM

HT22 = Toxicidad oxidativa del glutamato (oxitosis)  
 TFW = Ensayo de abstinencia del factor trófico  
 MC65 = Toxicidad amiloide intracelular

20

**EJEMPLO 6**

**Los compuestos de la invención alteran la fosforilación de CREB**

25 El presente ejemplo demuestra la capacidad de los compuestos de la invención para alterar la actividad de una quinasa o una fosfatasa que participa en la fosforilación del factor de transcripción neuroprotector, la proteína de unión de AMP cíclico (CREB). La activación de CREB se ha relacionado con la supervivencia celular y, por consiguiente, se considera que es una diana terapéutica validada (Vaishnov, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307:855-860 (2003)). Similar al concepto de muerte celular programada, que implica factores de transcripción fundamentales en el cambio en el programa de muerte de las células nerviosas, existe el concepto de control transcripcional de la vida celular programada. Por ejemplo, estudios recientes de la activación del factor de

30

transcripción de CREB en modelos de ictus han demostrado que CREB es fosforilada (y presumiblemente activada) en las neuronas que sobreviven a esta lesión. Otros estudios demuestran que la vía de supervivencia de CREB puede ser inactivada por neurotoxinas y genes implicados en trastornos neurodegenerativos.

5 Se evalúa la fosforilación de CREB en respuesta al estrés oxidativo en presencia de los compuestos de la invención. Se añade glutamato a células HT22 en presencia o ausencia del Comp. CNB-001 (a 1  $\mu$ M). A continuación, se mide la proporción de la CREB fosforilada con respecto a la CREB total en función del tiempo. Además, todas las células HT22 mueren en ausencia del Comp. CNB-001, y más del 90 % viven en presencia del Comp. CNB-001.

10 Se exploró un grupo de 14 proteínas quinasa contra el Comp CNB-001. El Comp CNB-001 inhibió parcialmente la isoforma con especificidad nerviosa de las quinasas JNK y JNK-3. Ninguna de las otras enzimas que se ensayaron, incluyendo JNK-1 o JNK-2, se vieron afectadas. En las células HT22 y las neuronas corticales primarias, el Comp. CNB-001 bloqueó la fosforilación de p38 y JNK causada por el glutamato en aproximadamente un 30 %, e inhibió la muerte celular. No se alteró la fosforilación de las otras quinasas ensayadas.

15

#### EJEMPLO 7

##### **Efectos neuroprotectores de los compuestos de la invención contra el estrés oxidativo**

20 El presente ejemplo hace una demostración de los efectos protectores impartidos por los compuestos de la invención contra el estrés oxidativo inducido por el glutamato. Véase la Figura 1D. Véase también Tan *et al* (*Curr. Topics Med. Chem* 1:497-506 (2001)) para obtener más información sobre las vías de señalización usadas para matar y proteger las células HT22 de la muerte celular inducida por el estrés oxidativo.

25 Se tratan neuronas del hipocampo HT22 con glutamato 5 mM y concentraciones crecientes de los compuestos de la invención. Se mide la viabilidad celular 24 horas después mediante el ensayo de MTT (Davis y Maher, *Brain Res.* 652 169-173 (1994)).

#### EJEMPLO 8

30

##### **Efectos de los compuestos de la invención en las células nerviosas sometidas a isquemia química**

La isquemia debida a la pérdida de riego sanguíneo puede ser un problema con las enfermedades que afectan a la vascularización cerebral. El presente ejemplo demuestra los efectos protectores impartidos por los compuestos de la invención contra la isquemia inducida químicamente.

35

La mayoría de los modelos de cultivo celular de isquemia utilizan cultivos corticales primarios que están expuestos a alguna forma de privación de oxígeno y glucosa. Si bien estos ensayos pueden imitar mejor las condiciones *in vivo* que los ensayos que emplean líneas de células neuronales, presentan una serie de problemas que dificultan su uso para la exploración rutinaria de posibles compuestos neuroprotectores. El problema más grave es que las condiciones necesarias para matar un porcentaje fijo de células son muy variables de un experimento a otro, dificultando mucho la obtención de valores precisos de la actividad neuroprotectora. Para evitar este y otros problemas, se usó una línea de células nerviosas de ratón en combinación con isquemia química como criba para los posibles fármacos neuroprotectores para la isquemia. Para inducir la isquemia química, se usó ácido yodoacético (IAA), inhibidor irreversible muy conocido de la enzima glicolítica gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) (véase B. S. Winkler *et al.*, "Modulation of the Pasteur effect in retinal cells: implications for understanding compensatory metabolic mechanisms", en *Exp Eye Res* 76 (2003) 715-723), en combinación con la línea de células de hipocampo de ratón HT22. El IAA se ha usado en una serie de otros estudios para inducir la isquemia en células nerviosas. Los cambios producidos tras el tratamiento con IAA de células neuronales son muy similares a los cambios que se han observado en modelos animales de traumatismo e isquemia del SNC. Estos incluyen alteraciones en el potencial de membrana, ruptura de fosfolípidos, pérdida de ATP y aumento de especies reactivas del oxígeno. Un tratamiento de 2 h de las células HT22 con IAA 20  $\mu$ M provoca más del 90 % de muerte celular 20 horas más tarde. Esta dosis tóxica es altamente reproducible de ensayo a ensayo, ya que solo es necesario usar una dosis de IAA, facilitando mucho la exploración de diferentes compuestos en un amplio intervalo de concentraciones.

55

La Figura 2 muestra que la muerte celular causada por el tratamiento de células HT22 con IAA 20  $\mu$ M se puede prevenir mediante los compuestos a modo de ejemplo de la invención, J147 y CNB-001 de pirazol relacionado con CNB-115A. El éxito en este ensayo ha demostrado recientemente ser predictivo de la capacidad para trabajar en el modelo de ictus/isquemia de conejo (véase P. Maher *et al.*, "A novel approach to screening for new neuroprotective compounds for the treatment of stroke, *Brain Res* 1173 (2007) 117-125).

60

**EJEMPLO 9****Efectos de los compuestos de la invención en las enzimas implicadas en la formación de la memoria**

5 Los compuestos de la invención tienen la capacidad de activar la CaM quinasa II alfa, una enzima clave implicada en la formación de la memoria.

10 Para evaluar la capacidad de un compuesto de ensayo para activar la CaM quinasa II alfa, se pueden preparar neuronas de hipocampo HT22 o neuronas corticales de una semana de vida de embriones de rata de 18 días de acuerdo con procedimientos publicados (por ejemplo, Soucek *et al*, *Neuron* 39: 43-56 (2003) y Li *et al.*, *Neuron* 19:453-463 (1997)). Así pues, por ejemplo, las células adecuadas se pueden tratar con 1-2  $\mu\text{M}$  de un compuesto de la invención a modo de ejemplo durante una cantidad adecuada de tiempo (por ejemplo, 15, 30, 60 o 120 minutos).

15 A continuación, se lisan las células y se aplican a un gel adecuado para la separación (por ejemplo, papel de fosfocelulosa P81, gel de poliacrilamida que contiene SDS, y similares). Luego se puede ensayar la actividad de CaMKII usando un anticuerpo que reconozca la fosfotreonina de cadenas tanto alfa como beta de la CaM quinasa II. Los compuestos de la invención potencian un aumento en la actividad de CaMKII del 10 % o superior.

**EJEMPLO 10**

20

**Evaluación de los compuestos de la invención en el ensayo de discriminación de objetos con ratones**

25 Para este estudio, se usan sesenta ratones C57B1/6 machos adultos jóvenes de los Laboratorios Jackson (Bar Harbor, Maine). Los ratones se reciben con aproximadamente 42 días de vida. Tras la recepción, los ratones reciben números únicos de identificación (marca en la cola) y se alojan agrupados en jaulas de policarbonato con tapas de filtro. Todos los animales permanecen alojados en grupos de cuatro durante el resto del estudio. Todos los ratones se aclimatan a la sala de colonia durante al menos dos semanas antes de la prueba y, posteriormente, se someten al ensayo con un tiempo de vida medio de 58 días. Durante el período de aclimatación, los ratones se examinan de manera regular, se manipulan y se pesan para asegurar un estado de salud y una idoneidad adecuados. Los ratones se mantienen en un ciclo de luz/oscuridad de 12/12, encendiéndose la luz a las 7:30 a.m. La temperatura ambiente se mantiene entre 20 y 23 °C con una humedad relativa mantenida entre el 30 % y 70 %. Durante el estudio, se proporcionan pienso y agua se proporcionaron a discreción. En cada ensayo, los animales se asignan aleatoriamente a los grupos de tratamiento y se ajustan según la edad. Los animales no son perturbados entre los días de ensayo.

35

Todos los experimentos se llevan a cabo a temperatura ambiente bajo una iluminación artificial entre las 9.00 a.m. y las 4:00 p.m. Los datos transcritos se verifican uno a uno.

40 Todos los ratones se manejan en dos días consecutivos previos a la prueba. Luego, se habitúan los ratones a un entorno circular en campo abierto ( $d = 45,7 \text{ cm}$ ,  $h = 15 \text{ cm}$ ) durante una hora en grupos de cuatro por jaula. Cada espacio se compone de acrílico transparente (se colocó papel de construcción negro en los lados para bloquear la reflexión). La presencia de la reflexión redujo el tiempo de exploración de los sujetos en estudios piloto previos. Veinticuatro horas después de la habituación, se vuelven a colocar los ratones en el mismo espacio para un ensayo de entrenamiento y se les deja que exploren un conjunto de dos objetos idénticos colocados equidistantes tanto entre sí como entre las paredes del espacio. Cada ratón es entrenado durante un total de 15 minutos y luego devuelto a su jaula. Veinticuatro horas más tarde, se vuelven a colocar los sujetos en el mismo espacio en presencia de tanto el objeto conocido (previamente explorado) como de un objeto nuevo. Las posiciones espaciales del objeto conocido y del objeto nuevo (es decir, lados izquierdo-derecho) están compensadas entre los sujetos. La diferencia en el tiempo dedicado a explorar cada objeto durante el ensayo de prueba se usa como un índice de reconocimiento de objetos y retención de memoria. Se registra el ensayo de prueba de cada animal, y se observan y valoran estos registros una vez completado el ensayo. Se puntúan los 10 primeros minutos de cada sesión y se calcula el reconocimiento de objetos usando la fórmula:

55

(Tiempo dedicado al nuevo objeto x 100)/(Tiempo total para explorar ambos objetos)

Los datos se analizan mediante un análisis unidireccional de varianza (ANOVA) seguido de comparaciones post-hoc con el ensayo de Fisher cuando fue apropiado. Un efecto se considera significativo si  $p < 0,05$ . Los datos se representan como la media y el error estándar de la media. Los valores atípicos que caen por encima y por debajo de dos desviaciones estándar de la media se eliminan del análisis final.

60

**EJEMPLO 11****Evaluación de los compuestos de la invención en el ensayo de discriminación de objetos con ratas**

65 Este modelo se basa en la mayor exploración espontánea de un nuevo objeto en comparación con un objeto conocido mostrada por los roedores (véase Ennaccor y Delacour en *Behav. Brain Res.* 31:47 (1988)). Se evalúa la

capacidad cognitiva de ratas Wistar macho en un aparato de ensayo que comprende un espacio de campo abierto situado en una sala de sonido atenuado bajo una luz tenue. Se capturan imágenes del campo abierto con una cámara digital, y se visualizan en un monitor situado en una sala contigua. Cada rata se somete al procedimiento por separado y se tiene cuidado de eliminar cualquier señal olfativa/gustativa mediante la limpieza del espacio y de los objetos de ensayo con alcohol entre los ensayos y las ratas.

En todos los estudios, se emplearon ratas Wistar macho adultas. Se colocaron los animales en las salas experimentales a los 80 días de su nacimiento y recibieron un número de identificación único (marca en la cola). Se alojaron por parejas en jaulas de policarbonato con tapas de filtro y se aclimataron durante 3 días antes de comenzar los estudios. Los animales se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, manteniendo la temperatura a  $22 \pm 2$  °C y la humedad relativa aproximadamente al 50 %. La comida y el agua se proporcionaron a discreción.

Todos los animales fueron examinados, manipulados y pesados durante otros dos días previos al inicio del estudio para asegurar un estado de salud y una idoneidad adecuados, y para minimizar el estrés inespecífico asociado a la manipulación. Cada animal fue asignado aleatoriamente a los grupos de tratamiento y se ajustó según el número de jaulas. El experimento de reconocimiento de nuevos objetos se realizó durante la fase del ciclo de luz de los animales. Los tratamientos farmacológicos se ajustaron a lo largo de los días y los animales solo se usaron una vez.

Para este estudio, se usaron los siguientes compuestos: se disolvió compuesto de referencia (Galantamina; 3 mg/kg) en solución salina al 0,9 % y se administró i.p. 1 hora antes del ensayo a un volumen de dosis de 1 ml/kg, y todos los compuestos de ensayo se manejaron en disolución y se mantuvieron a -80 °C hasta su uso. Todos los compuestos se administraron por vía oral 60 min antes del entrenamiento a un volumen de 1 ml/kg de peso corporal.

Tras un período de habituación de 5 minutos, se colocó cada rata en el espacio de ensayo en presencia de dos objetos idénticos (formas de plástico). Cada rata se colocó en el mismo sentido y en la misma posición del espacio, y se registró el tiempo dedicado a explorar activamente los objetos durante un período de ensayo de 5 minutos (T1). Entre los ensayos, la rata fue devuelta a su jaula. Tras 24 horas, se volvió a colocar cada rata en el espacio de ensayo durante 5 minutos (T2) en la presencia de uno de los objetos conocidos y un objeto nuevo, y se volvió a registrar el tiempo dedicado a explorar los dos objetos. El orden de presentación y la posición de los objetos (izquierda/derecha) fue al azar entre las ratas para evitar el sesgo de orden o preferencia de lugar. Se usó un índice de preferencia por cada objeto, la proporción entre el tiempo dedicado a explorar bien el objeto conocido o el objeto nuevo con respecto al tiempo total dedicado a explorar los dos objetos (durante el T2 de la sesión de retención) para medir la función cognitiva.

Durante el período de aclimatación de 5 minutos en el aparato, los animales fueron puntuados en cuanto a su comportamiento exploratorio. Los animales tratados con J147 a una dosis de 5 mg/kg mostraron una tendencia hacia una mayor locomoción en comparación con los controles tratados con vehículo ( $p = 0,059$ ). No se observó ninguna diferencia significativa en la locomoción entre ninguno de los otros grupos de tratamiento (Fig. 5).

Los datos se analizan mediante un análisis unidireccional de varianza (ANOVA) seguido de comparaciones post-hoc con el ensayo de Fisher cuando fue apropiado. Un efecto se consideró significativo si  $p < 0,05$ . Los datos de las siguientes tablas se presentan como la media y el error estándar de la media.

**Tabla de ANOVA para el índice de reconocimiento**

	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor P	Lambda	Potencia
Tratamiento	9	7657,481	850,831	2,407	,0193	21,666	,894
Residual	70	24740,426	353,435				

**Tabla de medias para el índice de reconocimiento**

	Recuento	Media	Desviación estándar	Error estándar
*Vehículo	8	51,922	21,822	7,715
Galantamina (3mg/kg)	8	74,037	20,711	7,323
J147 (5 mg/kg)	8	63,053	16,828	5,950
J147 (10 mg/kg)	8	54,213	7,986	2,824
J147 (25 mg/kg)	8	51,372	19,151	6,771
Salk001 (5 mg/kg)	8	63,663	11,769	4,161

ES 2 447 940 T3

Salk001 (10 mg/kg)	8	77,964	12,904	4,562
Salk001 (25 mg/kg)	8	45,226	30,571	10,809
SK186	8	61,507	20,945	7,405
SK187	8	55,390	15,400	5,445

**Tabla de ANOVA para la actividad locomotora**

	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor P	Lambda	Potencia
Tratamiento	9	70180,813	7797,868	2,565	,0130	23,087	,916
Residual	70	212788,375	3039,834				

**PLSD de Fisher para el índice de reconocimiento**

**Efecto: Tratamiento**

**Nivel de significación: 5 %**

	Dif. media	Dif. Crít.	Valor P	
*vehículo, Galantamina (3mg/kg)	-22,114	18,748	,0215	S
*vehículo, J147 (5 mg/kg)	-11,130	18,748	,2404	
*vehículo, J147 (10 mg/kg)	-2,291	18,748	,8082	
*vehículo, J147 (25 mg/kg)	,550	18,748	,9535	
*vehículo, Salk001 (5 mg/kg)	-11,741	18,748	,2158	
*vehículo, Salk001 (10 mg/kg)	-26,042	18,748	,0072	S
*vehículo, Salk001 (25 mg/kg)	6,697	18,748	,4786	
*vehículo, SK186	-9,585	18,748	,3114	
*vehículo, SK187	-3,467	18,748	,7133	
Galantamina (3 mg/kg), J147 (5 mg/kg)	10,984	18,748	,2466	
Galantamina (3 mg/kg), J147 (10 mg/kg)	19,824	18,748	,0385	S
Galantamina (3 mg/kg), J147 (25 mg/kg)	22,665	18,748	,0185	S
Galantamina (3 mg/kg), Salk001 (5 mg/kg)	10,374	18,748	,2736	
Galantamina (3 mg/kg), Salk001 (10 mg/kg)	-3,927	18,748	,6774	
Galantamina (3 mg/kg), Salk001 (25 mg/kg)	28,811	18,748	,0031	S
Galantamina (3 mg/kg), SK186	12,530	18,748	,1869	
Galantamina (3 mg/kg), SK187	18,647	18,748	,0512	
J147 (5 mg/kg), J147 (10 mg/kg)	8,840	18,748	,3502	
J147 (5 mg/kg), J147 (25 mg/kg)	11,681	18,748	,2182	
J147 (5 mg/kg), Salk001 (5 mg/kg)	-,610	18,748	,9484	
J147 (5 mg/kg), Salk001 (10 mg/kg)	-14,911	18,748	,1172	
J147 (5 mg/kg), Salk001 (25 mg/kg)	17,827	18,748	,0620	
J147 (5 mg/kg), SK186	1,546	18,748	,8699	
J147 (5 mg/kg), SK187	7,663	18,748	,4177	
J147 (10 mg/kg), J147 (25 mg/kg)	2,841	18,748	,7634	

ES 2 447 940 T3

J147 (10 mg/kg), Salk001 (5 mg/kg)	-9,450	18,748	,3182	
J147 (10 mg/kg), Salk001 (10 mg/kg)	-23,751	18,748	,0138	S
J147 (10 mg/kg), Salk001 (25 mg/kg)	8,987	18,748	,3423	
J147 (10 mg/kg), SK186	-7,294	18,748	4404	
J147 (10 mg/kg), SK187	-1,177	18,748	9007	
J147 (25 mg/kg), Salk001 (5 mg/kg)	-12,291	18,748	,1953	
J147 (25 mg/kg), Salk001 (10 mg/kg)	-26,592	18,748	,0061	S
J147 (25 mg/kg), Salk001 (25 mg/kg)	6,147	18,748	,5153	
J147 (25 mg/kg), SK186	-10,135	18,748	,2847	
J147 (25 mg/kg), SK187	-4,017	18,748	,6704	
Salk001 (5 mg/kg), Salk001 (10 mg/kg)	-14,301	18,748	,1327	
Salk001 (5 mg/kg), Salk001 (25 mg/kg)	18,438	18,748	,0538	
Salk001 5 mg/kg), SK186	2,156	18,748	,8192	
Salk001 5 mg/kg), SK187	8,274	18,748	,3818	
Salk001 (10 mg/kg), Salk001 (25 mg/kg)	32,738	18,748	,0009	S
Salk001 (10 mg/kg), SK186	16,457	18,748	,0844	
Salk001 (10 mg/kg), SK187	22,574	18,748	,0190	S
Salk001 (25 mg/kg), SK186	-16,281	18,748	,0877	
Salk001 (25 mg/kg), SK187	-10,164	18,748	,2833	
SK186, SK187	6,117	18,748	,5173	
<b>PLSD de Fisher para la actividad locomotora</b> <b>Efecto: Tratamiento</b> <b>Nivel de significación: 5 %</b>				
	Dif. media	Dif. Crít.	Valor P	
*vehículo, Galantamina (3mg/kg)	14,250	54,981	,6068	
*vehículo, J147 5 mg/kg)	-52,875	54,981	,0592	
*vehículo, J147 (10 mg/kg)	-43,375	54,981	,1201	
*vehículo, J147 (25 mg/kg)	-49,750	54,981	,0754	
*vehículo, Salk001 (5 mg/kg)	8,375	54,981	,7622	
*vehículo, Salk001 (10 mg/kg)	-12,625	54,981	,6484	
*vehículo, Salk001 (25 mg/kg)	16,750	54,981	,5454	
*vehículo, SK186	33,250	54,981	,2318	
*vehículo, SK187	-35,875	54,981	,1974	
Galantamina (3mg/kg), J147 (5 mg/kg)	-67,125	54,981	,0174	S
Galantamina (3mg/kg), J147 (10 mg/kg)	-57,625	54,981	,0402	S
Galantamina (3mg/kg), J147 (25 mg/kg)	-64,000	54,981	,0232	S
Galantamina (3mg/kg), Salk001 (5 mg/kg)	-5,875	54,981	,8319	
Galantamina (3mg/kg), Salk001 (10 mg/kg)	-26,875	54,981	,3330	
Galantamina (3mg/kg), Salk001 (25 mg/kg)	2,500	54,981	,9280	



Galantamina (3mg/kg), SK186	19,000	54,981	,4930	
Galantamina (3mg/kg), SK187	-50,125	54,981	,0733	
J147 (5 mg/kg), J147 (10 mg/kg)	9,500	54,981	,7314	
J147 (5 mg/kg), J147 (25 mg/kg)	3,125	54,981	,9101	
J147 (5 mg/kg), Salk001 5 mg/kg)	61,250	54,981	,0295	S
J147 (5 mg/kg), Salk001 (10 mg/kg)	40,250	54,981	,1487	
J147 (5 mg/kg), Salk001 (25 mg/kg)	69,625	54,981	,0138	S
J147 (5 mg/kg), SK186	86,125	54,981	,0026	S
J147 (5 mg/kg), SK187	17,000	54,981	,5395	
J147 (10 mg/kg), J147 (25 mg/kg)	-6,375	54,981	,8178	
J147 (10 mg/kg), Salk001 (5 mg/kg)	51,750	54,981	,0647	
J147 (10 mg/kg), Salk001 (10 mg/kg)	30,750	54,981	,2685	
J147 (10 mg/kg), Salk001 (25 mg/kg)	60,125	54,981	,0325	S
J147 (10 mg/kg), SK186	76,625	54,981	,0070	S
J147 (10 mg/kg), SK187	7,500	54,981	,7864	
J147 (25 mg/kg), Salk001 (5 mg/kg)	58,125	54,981	,0386	S
J147 (25 mg/kg), Salk001 (10 mg/kg)	37,125	54,981	,1824	
J147 (25 mg/kg), Salk001 (25 mg/kg)	66,500	54,981	,0185	S
J147 (25 mg/kg), SK186	83,000	54,981	,0036	S
J147 (25 mg/kg), SK187	13,875	54,981	,6163	
Salk001 (5 mg/kg), Salk001 (10 mg/kg)	-21,000	54,981	,4488	
Salk001 (5 mg/kg), Salk001 (25 mg/kg)	8,375	54,981	,7622	
Salk001 (5 mg/kg), SK186	24,875	54,981	,3700	
Salk001 (5 mg/kg), SK187	-44,250	54,981	,1130	
Salk001 (10 mg/kg), Salk001 (25 mg/kg)	29,375	54,981	,2903	
Salk001 (10 mg/kg), SK186	45,875	54,981	,1006	
Salk001 (10 mg/kg), SK187	-23,250	54,981	,4019	
Salk001 (25 mg/kg), SK186	16,500	54,981	,5514	
Salk001 (25 mg/kg), SK187	-52,625	54,981	,0604	
SK186, SK187	-69,125	54,981	,0145	S

En la Fig. 6, se muestran los efectos de los compuestos de ensayo sobre el índice de memoria. El análisis de varianza de una vía mostró un efecto significativo del tratamiento. Los compuestos de referencia galantamina (3 mg/kg), así como CNB-001 a 10 mg/kg aumentaron significativamente el índice de reconocimiento.

5

**EJEMPLO 12**

***Propiedades de rendimiento a modo de ejemplo de los compuestos de la invención***

10 En la Tabla 2, se resumen las propiedades de rendimiento a modo de ejemplo de los compuestos de la invención, de la siguiente manera:

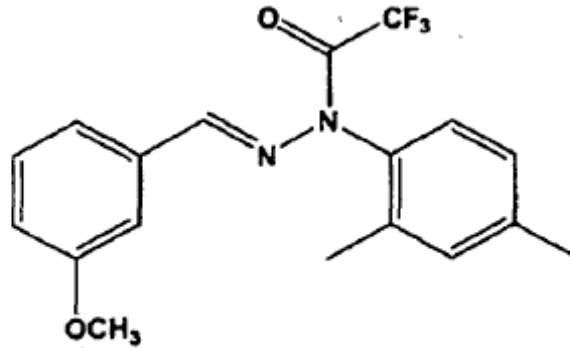
Tabla 2

<b>ENSAYOS:</b>	CNB-001	J147
<b>Cultivo celular</b>		
Toxicidad amiloide		
Extracelular	500 nM	10 nM
Intracelular	200 nM	3 nM
Disociación amiloide	+	-
Abstinencia del factor trófico	500 nM	10 nM
Privación de glucosa	+	+
Toxicidad oxidativa del glutamato	500 nM	5 nM
<b>Isquemia <i>in vitro</i></b>		
Nervio cortical	+	+
Células ganglionares de la retina	+	+
Células de hipocampo de ratón	+	ND
<b>Modelos animales</b>		
Ictus de conejo	+	ND
Memoria	+	+
Animal	+	+
LTP	+	+
CREB	+	+
CaM quinasa II	+	+
Datos del análisis SAR	+	+
Efecto no visible de toxicología en el peso de los animales ni el estado de salud general	500 ppm en comida varios meses (ratones)	300 mg/kg por sonda 10 días (ratones)
Modo de acción	Posible inhibidor de la proteína quinasa	Clase de diana conocida
ND = no determinado + = resultado positivo o activación enzimática		

Los resultados resumidos en la Tabla 2 demuestran que los compuestos a modo de ejemplo de acuerdo con la invención, es decir, el Comp CNB-001 y el Comp J147, tienen una excelente actividad neuroprotectora.

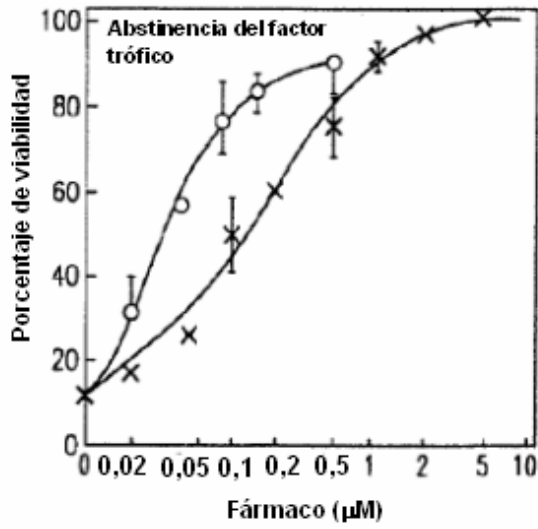
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la estructura de Fórmula (1):

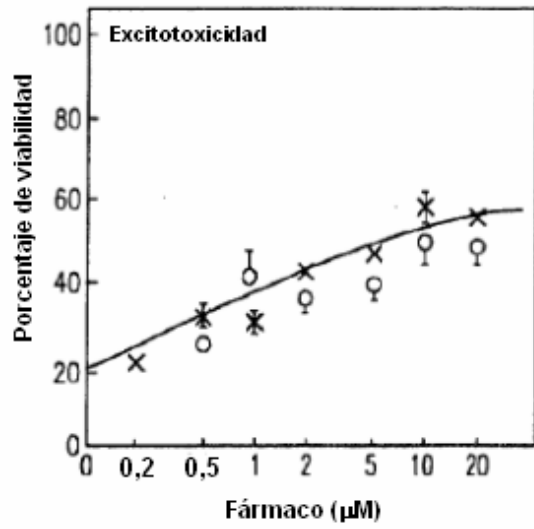


(I)

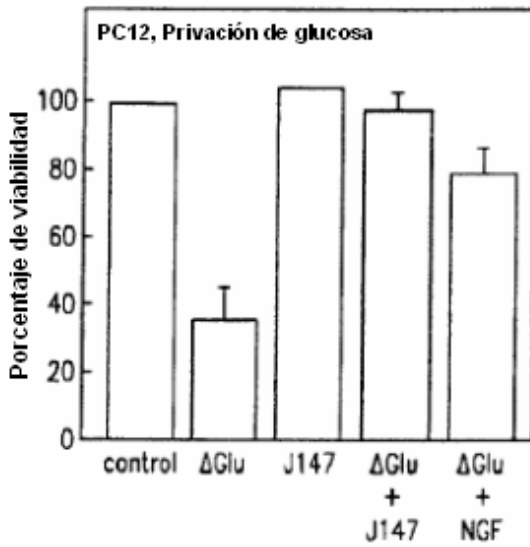
- 5 2. Una composición que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable del mismo.
3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una composición de acuerdo con la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de la lesión neuronal aguda (incluyendo ictus o lesión de la médula espinal) y de la enfermedad neurodegenerativa crónica, la protección de las neuronas en un sujeto que lo necesita o la potenciación de la neurorregeneración y/o la formación de la memoria en un sujeto que lo necesita.
- 10 4. Un compuesto o una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la enfermedad neurodegenerativa crónica está seleccionada del grupo que consiste en: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica y degeneración de la retina.
- 15 5. Un compuesto o una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la enfermedad neurodegenerativa crónica es la enfermedad de Alzheimer.



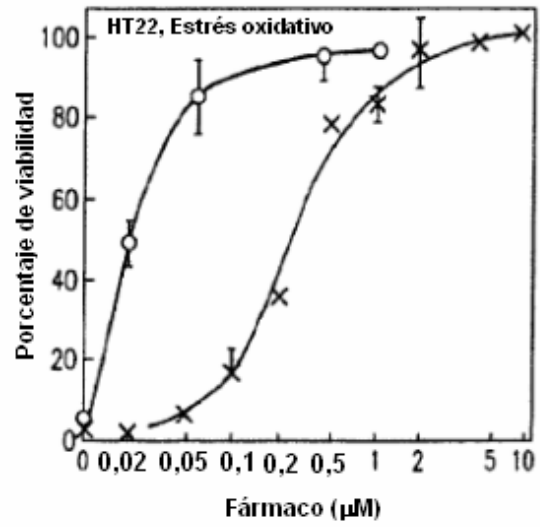
**FIG. 1A**



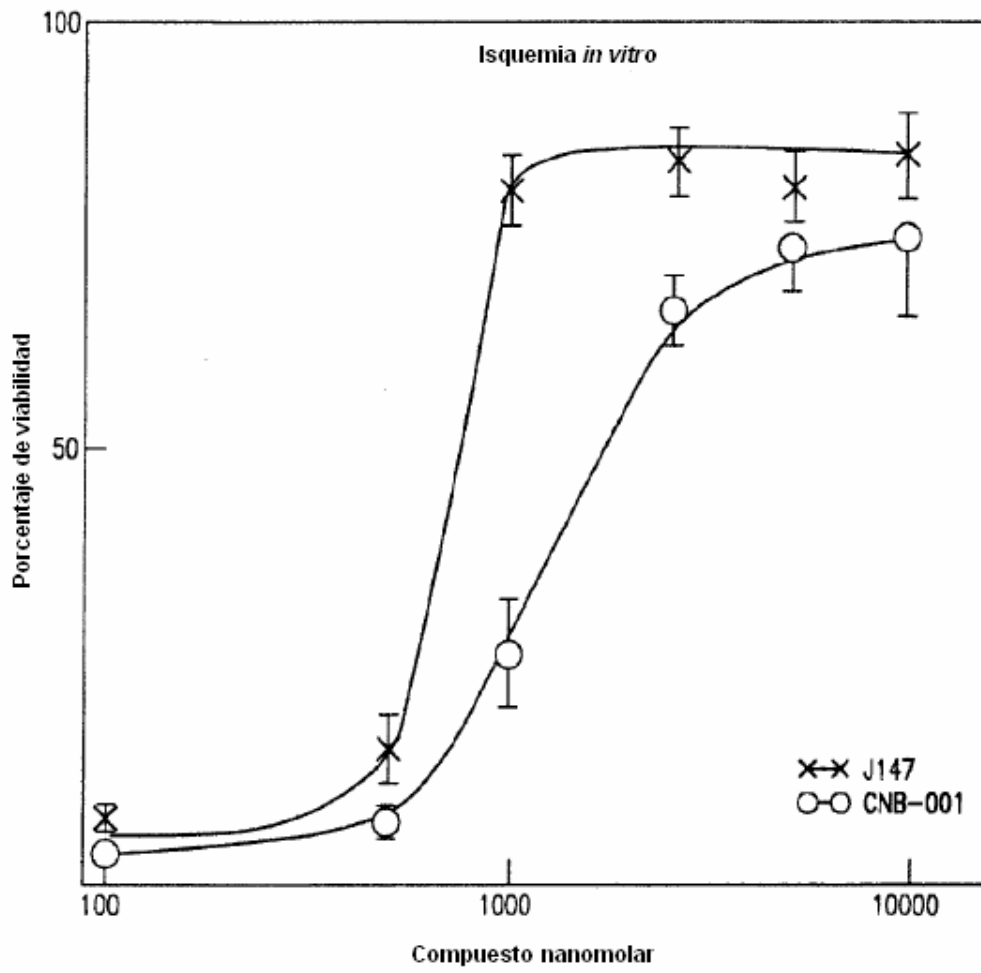
**FIG. 1B**



**FIG. 1C**



**FIG. 1D**



**FIG. 2**

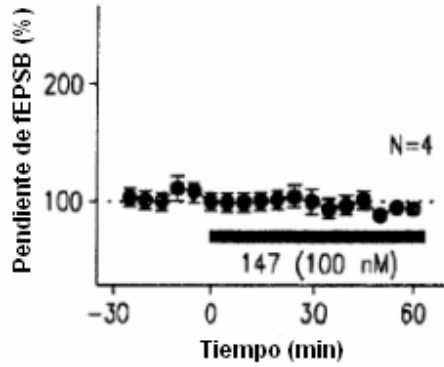


FIG. 3A

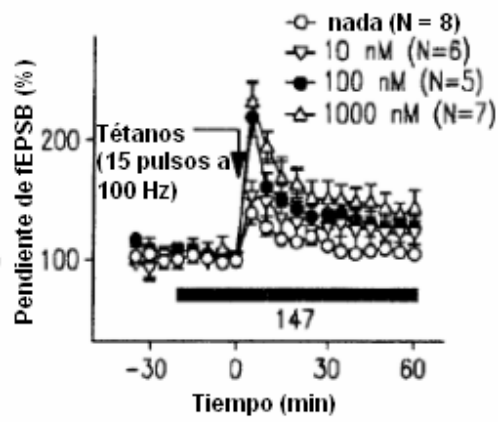


FIG. 3B

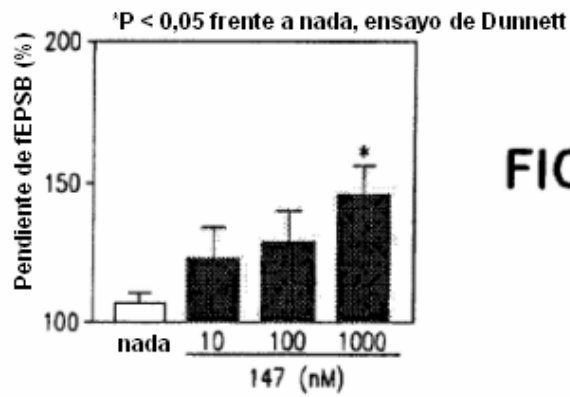


FIG. 3C

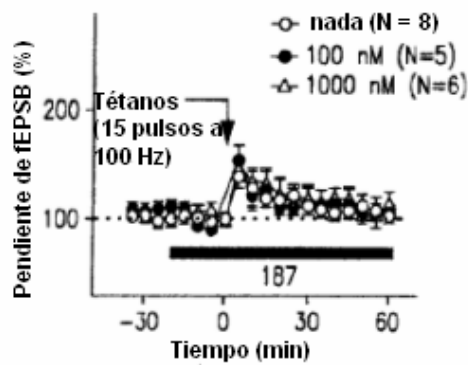
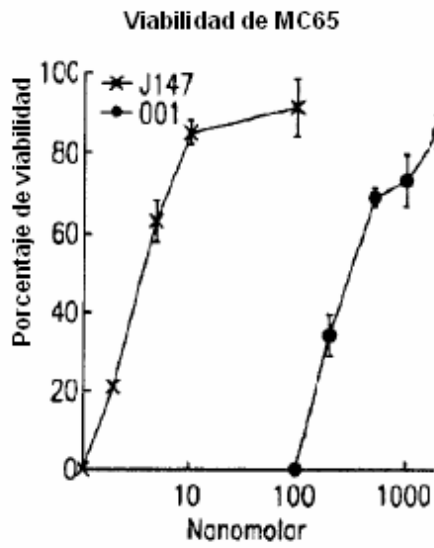
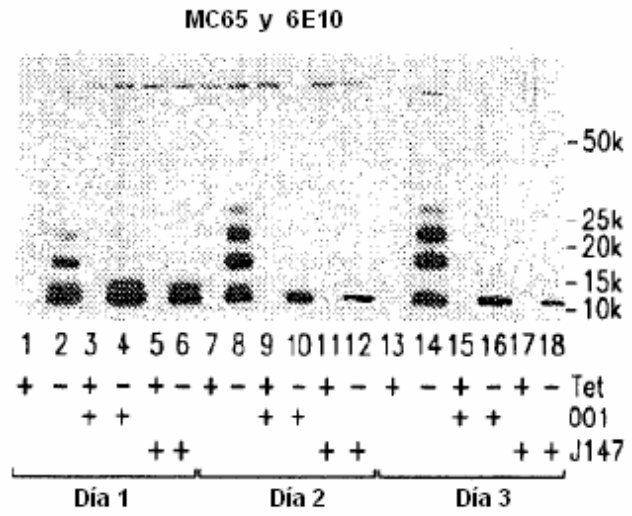


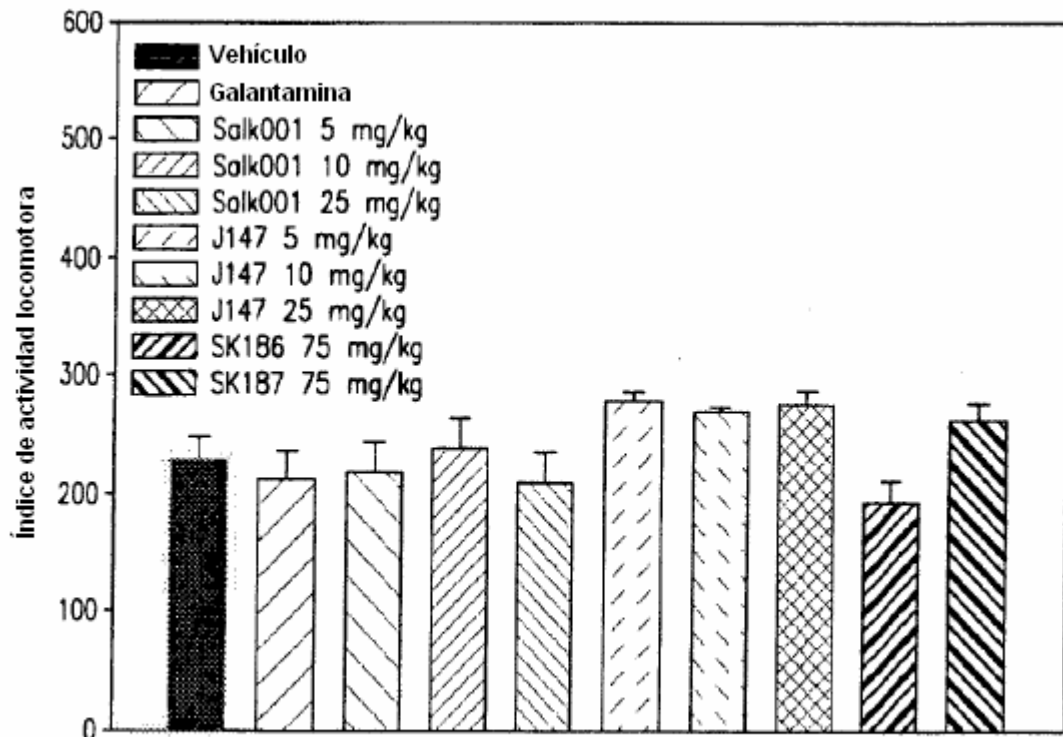
FIG. 3D



**FIG. 4A**



**FIG. 4B**



**FIG. 5**

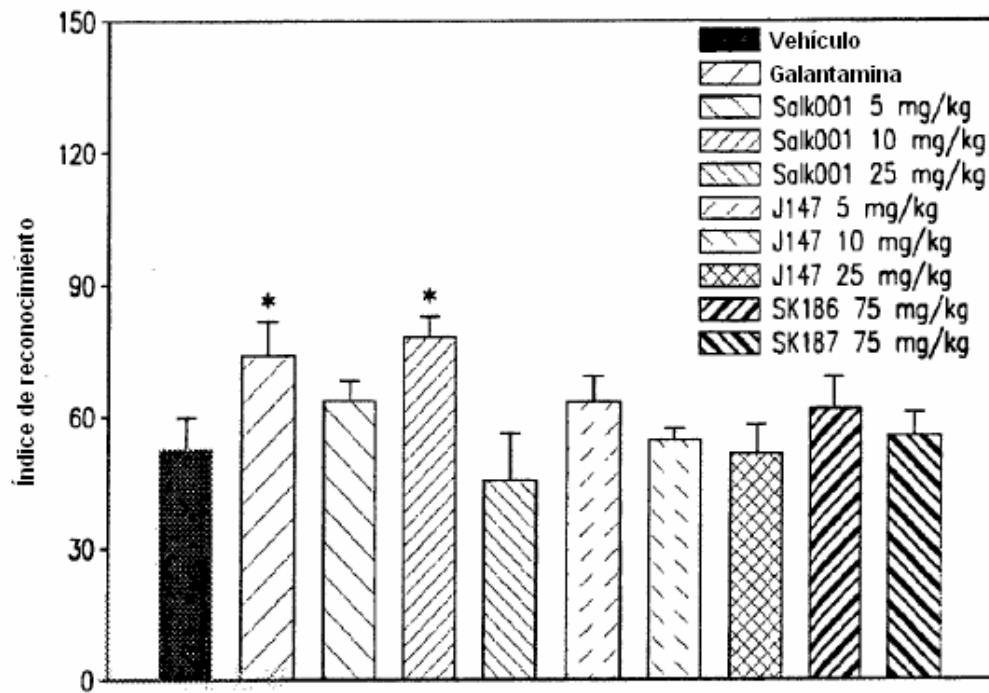


FIG. 6



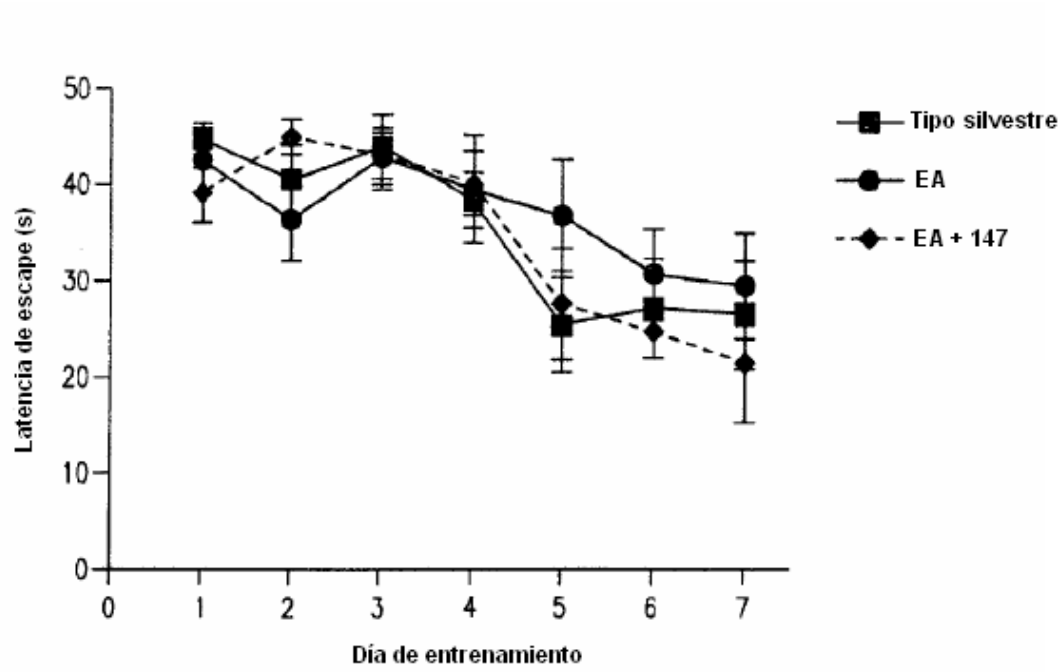


FIG. 7