

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 455 499**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/536** (2006.01)

**A61K 31/517** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2006 E 06291167 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2014 EP 1745786**

54 Título: **Compuestos neuroprotectores y composiciones farmacéuticas que los comprenden**

30 Prioridad:

**19.07.2005 FR 0507648**

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

**15.04.2014**

73 Titular/es:

**BIOCODEX (100.0%)  
7, AVENUE GALLIENI  
94250 GENTILLY, FR**

72 Inventor/es:

**VERLEYE, MARC;  
LE GUERN, MARIE-EMMANUELLE;  
GIRARD, PHILIPPE;  
GILLARDIN, JEAN-MARIE;  
BERTHON-CEDILLE, LAURENCE y  
HUBLLOT, BERNARD**

74 Agente/Representante:

**DURÁN MOYA, Luis Alfonso**

**ES 2 455 499 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

Compuestos neuroprotectores y composiciones farmacéuticas que los comprenden

5 La presente invención se refiere a la utilización de compuestos neuroprotectores dentro del marco del tratamiento de deterioros neuronales relacionados con patologías del sistema nervioso.

10 El deterioro, especialmente la muerte neuronal, desempeña un papel esencial prácticamente en todas las patologías que implican degeneración neuronal aguda o crónica. Se supone que numerosos moduladores neuroquímicos intervienen en la aparición de lesiones del sistema nervioso. Por ejemplo, en la epilepsia, la neurotransmisión con exceso de glutamato, la alteración de la inhibición relacionada a GABA y las alteraciones del equilibrio ácido-básico, pueden comportar una serie de eventos que conducen a alteraciones y a la muerte celular.

15 Se han podido elucidar en estos últimos años varias vías bioquímicas que llevan a la muerte neuronal. Uno de los casos más documentados se refiere a la excitotoxicidad del glutamato. Este neurotransmisor aminoácido es liberado de manera excesiva en caso de isquemia, por ejemplo, lo que provoca por vía de una activación excesiva de sus receptores neuronales, un aflujo de iones calcio al interior de las neuronas y conduce a la muerte celular por necrosis o apoptosis.

20 Por definición, la neuroprotección es una actividad que tiene como consecuencia la preservación, la recuperación, la curación o la regeneración del sistema nervioso, de sus células, su estructura y su función (Vajda y otros (2002) J. Clin Neurosci.9:4-8). La neuroprotección se ejerce especialmente, tal como se indica en la **figura 9** sobre los procesos que conducen a la muerte neuronal.

25 Los mecanismos supuestos, simultáneamente complejos y variados, de la muerte neuronal, tal como el stress oxidativo, las disfunciones mitocondriales, la agregación protéica, la apoptosis y la inflamación (Youdim y otros (2005), TIPS 26: 27-35), permiten pensar que los tratamientos neuroprotectores actúan a varios niveles en el plano neurológico y bioquímico (Youdim MB y otros (2005) J. Neural. Transm. 112:519-537) (Sellal y otros (2005) Therapie, 60:89-107).

30 Por lo tanto, dentro del marco del tratamiento de los accidentes isquémicos cerebrales, se ha podido demostrar que numerosos agentes que inhiben ciertas etapas del proceso de muerte neuronal, tales como antagonistas del glutamato, agentes anti-inflamatorios, agentes moduladores de los canales iónicos, de los agentes anti-radicales libres, o incluso de los antagonistas de GABA, poseen acción neuroprotectora en los animales.

35 No obstante, los numerosos ensayos clínicos realizados hasta la actualidad no han permitido confirmar el potencial de estos compuestos como agentes neuroprotectores en el hombre.

40 Un objetivo de la presente invención es, por lo tanto, dar a conocer composiciones farmacéuticas que tienen eficacia neuroprotectora superior a la de las composiciones ya conocidas.

45 La solicitud de patente DE 34 39 055 indica que la etifoxina presenta efectos ansiolíticos y anticonvulsivos, es decir, el perfil de un antiepiléptico con una componente tranquilizante. Esta solicitud de patente indica igualmente que la etifoxina potencia en un modelo animal los efectos antiepilépticos y ansiolíticos del clobazam.

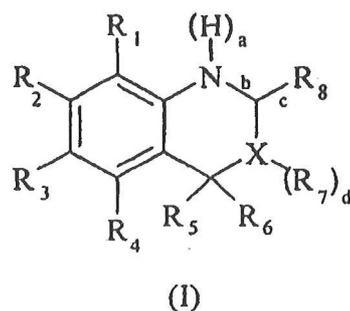
El resumen del artículo de Kruse & Kuch (1985) Arzneimittel-Forschung /Drug Research 35:133-135 indica que la etifoxina presenta efectos anticonvulsivos en ratones.

50 El artículo de Doongaji y otros (1976) Journal of Postgraduate Medicine 22:37-43 indica, por su parte, que la etafenoxina sería útil para el tratamiento de síntomas psíquicos y somáticos de la ansiedad acompañada de depresión.

La presente invención se origina, en particular, de la demostración por los inventores de que la etifoxina y la desetil-etifoxina poseen acción neuroprotectora in vitro y en los animales.

55 La invención se define por las reivindicaciones siguientes 1 a 19.

La presente invención se refiere, por lo tanto, a la utilización de, como mínimo, un compuesto de la fórmula siguiente (I):



en la que:

- 5 - a representa 0 ó 1;  
 - b representa un enlace simple o un enlace doble;  
 - c representa un enlace simple o un enlace doble;  
 - d representa 0 ó 1;  
 - x representa un átomo de oxígeno o de nitrógeno, con la reserva de que cuando X representa un átomo de oxígeno, entonces d tiene valor 0 y cuando X representa un átomo de nitrógeno, entonces d tiene valor 1;  
 10 - R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, y R<sub>4</sub>, idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, en especial escogido entre F, Cl, Br, ó I, un grupo hidrógilo, o un grupo alcóxilo de 1 ó 2 átomos de carbono;  
 - R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub>, idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo o cicloalquilo de 1 a 6 átomos de carbono, o un grupo arilo de 6 átomos de carbono cuyo núcleo aromático está eventualmente sustituido por uno o varios átomos de halógeno o uno o varios grupos hidróxilo, alcóxilo de 1 ó 2 átomos de carbono, trifluorometilo o nitro;  
 15 - R<sub>7</sub> representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilado, o un grupo alquilo o hidroxialquilo de 1 a 3 átomos de carbono;  
 - R<sub>8</sub> representa un átomo de oxígeno o un grupo –NR<sub>9</sub>R<sub>10</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>10</sub>, idénticos o diferentes, representado un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, o un grupo alquilo o hidroxialquilo de 1 a 3 átomos de carbono, con la reserva que cuando R<sub>8</sub> representa un átomo de oxígeno entonces a tiene valor de 1, b representa un enlace simple y c representa un enlace doble y cuando R<sub>8</sub> representa un grupo –NR<sub>9</sub>R<sub>10</sub> entonces a tiene valor de 0, b representa un doble enlace y c representa un enlace simple;

25 o sales farmacéuticamente aceptables, para la preparación de un medicamento con actividad neuroprotectora destinado al tratamiento de deterioros neuronales.

30 Se designa por “actividad neuroprotectora” una acción que tiene como consecuencia la preservación, recuperación, curación o regeneración del sistema nervioso, de sus células, de su estructura y de su función (Vajda y otros (2002) J Clin Neurosci 9:4-8).

35 Se designa por “deterioros neuronales”, las lesiones microscópicas de células observadas en diferentes patologías neurológicas. Estas lesiones pueden ser especialmente de tipo isquémico, atrófico, de pérdida neuronal, inclusiones intracitoplásmicas o intranucleares, degeneración neurofibrilar o granulo-vacuolar.

40 A título de ejemplo, las lesiones neuronales observadas en la enfermedad de Alzheimer asocian una degenerescencia neurofibrilar con pérdida de sinapsis en el hipocampo y las zonas próximas del lóbulo temporal, focos intracorticales de prolongaciones neuronales espesadas, simultáneamente axonales y dendríticas (neuritas), y una degenerescencia granulovacuolar. Las lesiones isquémicas observadas en accidentes vasculares isquémicos asocian un núcleo oscurecido y un citoplasma muy basófilo y retraído. Las enfermedades neurodegenerativas vienen acompañadas de lesiones de tipo de atrofia neuronal con despoblación de zonas características de la enfermedad (Augustinack y otros (2002); Acta Neuropathol.110:26-35) – (Harrison – Arnett Blackwell Ed 1995) – (Cambier – Masson Ed 2000).

45 En una forma de realización particular de la utilización, tal como se ha definido anteriormente los deterioros neuronales están relacionado con patologías escogidas dentro de una lista que comprende:

- 50 - epilepsia,  
 - accidentes vasculares cerebrales, isquémicos o hemorrágicos,  
 - enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth o la enfermedad de Friedreich,  
 - las facomatosis, en especial las neurofibromatosis,  
 - las neuropatías, tales como neuropatías carenciales, en especial, alcohólicas, neuropatías tóxicas o  
 55 medicamentosas, en especial, con la vincristina, neuropatías relacionadas con una afección metabólica, tal como diabetes, neuropatías relacionadas con un proceso inflamatorio, en especial, el síndrome de Guillain-Barré,

neuropatías infecciosas, en especial zona, y neuropatías rápidas,

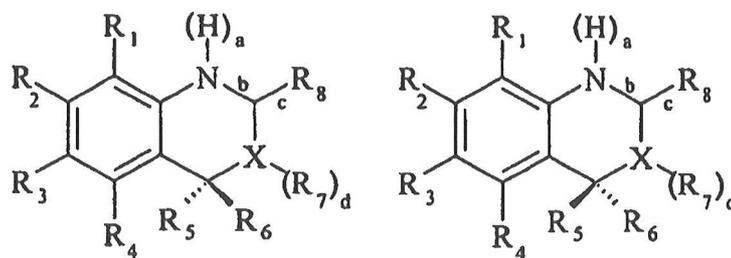
- la polineuritis paraneoplásica,
- la esclerosis en placa,
- la esclerosis lateral amiotrófica,
- la esquizofrenia,
- la depresión,
- los tumores cerebrales,
- la enfermedad de Parkinson, y otros

- las demencias, tales como enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Pick o demencia vascular.

La síntesis de los compuestos de fórmula (I) que se han definido anteriormente se puede poner en práctica fácilmente a partir de la materia de la patente francesa nº1 571 287.

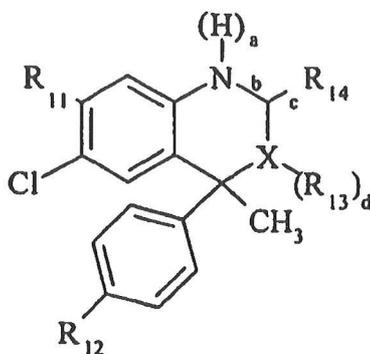
Las sales farmacéuticamente aceptables según la invención, se manifestarán de forma evidente para los técnicos en la materia, en particular las sales de clorhidrato de los compuestos de fórmula (I) según la invención son preferentes.

Tal como se comprenderá, la presente invención se refiere igualmente a la utilización, tal como se ha definido anteriormente, de formas ópticamente activas del compuesto de fórmula (I), tales como los enantiómeros siguientes (cuando R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son diferentes):



o sus mezclas, en particular su mezcla racémica.

En una forma de realización particular, la invención se refiere a la utilización tal como se ha definido anteriormente de un compuesto de la siguiente fórmula (VIII):

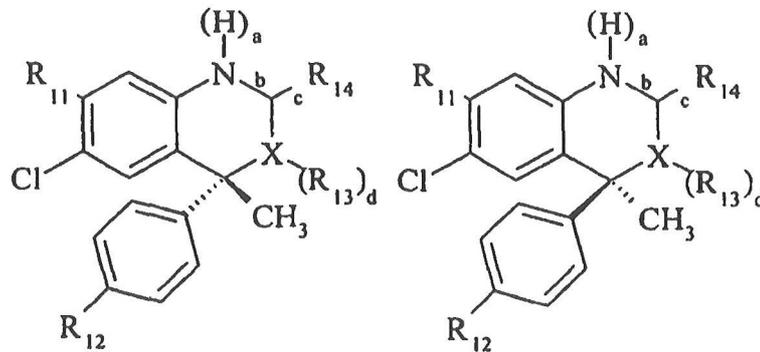


(VIII)

en la que:

- a representa 0 ó 1;
- b representa un enlace simple o un enlace doble;
- c representa un enlace simple o un enlace doble;
- d representa 0 ó 1;
- X representa un átomo de oxígeno o de nitrógeno, con la reserva de que cuando X representa un átomo de oxígeno entonces d tiene valor 0 y cuando X representa un átomo de nitrógeno, entonces d tiene valor 1;
- R<sub>11</sub> y R<sub>12</sub> idénticos o diferentes se presentan -H u -OH;
- R<sub>13</sub> representa -H o un grupo -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>;
- R<sub>14</sub> representa un átomo de oxígeno o un grupo -NH<sub>2</sub> ó -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, con la reserva de que cuando R<sub>14</sub> representa un átomo de oxígeno, entonces a tiene valor 1, b representa un enlace simple y c representa un enlace doble y que cuando R<sub>14</sub> representa un grupo -NH<sub>2</sub> ó -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> entonces a tiene valor 0, b representa un enlace doble y c representa un enlace simple.

La presente invención se refiere igualmente a la utilización, tal como se ha definido anteriormente, de las formas ópticamente activas del compuesto de fórmula (VIII), tal como los enantiómeros siguientes:

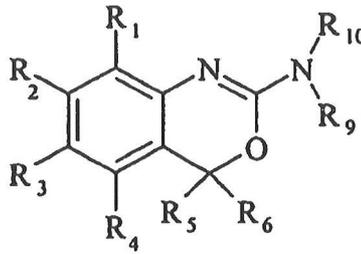


5

o sus mezclas, en particular su mezcla racémica.

En una forma de utilización particular, la invención se refiere a la utilización tal como se ha definido anteriormente de un compuesto de la siguiente fórmula (II):

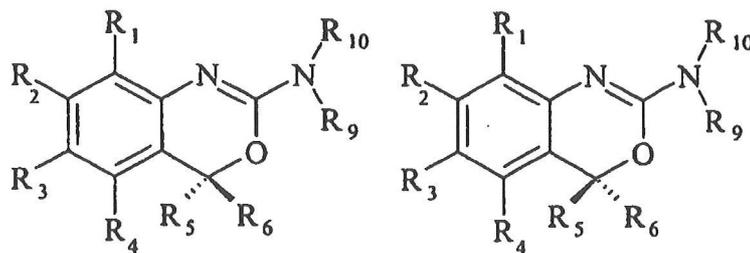
10



(II)

en la que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>10</sub> son los que se han definido anteriormente.

15 La presente invención se refiere igualmente a la utilización, tal como se ha definido anteriormente, de las formas ópticamente activas del compuesto de fórmula (II), tales como los enantiómeros siguientes (cuando R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son distintos):

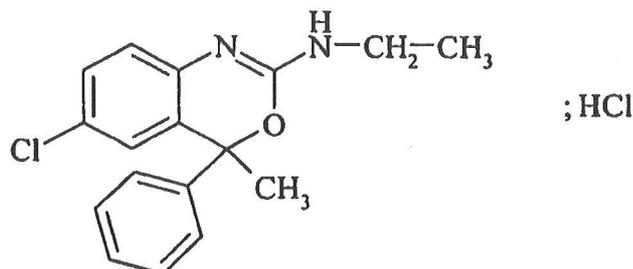


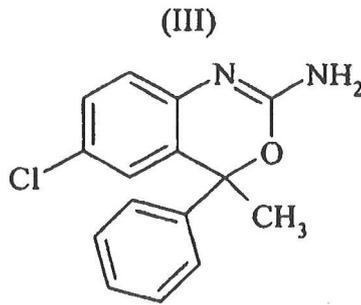
20

o sus mezclas, en particular su mezcla racémica.

En otra forma de realización particular, la invención se refiere a la utilización, tal como se ha definido anteriormente, de los compuestos siguientes de fórmulas (III) y (IV):

25



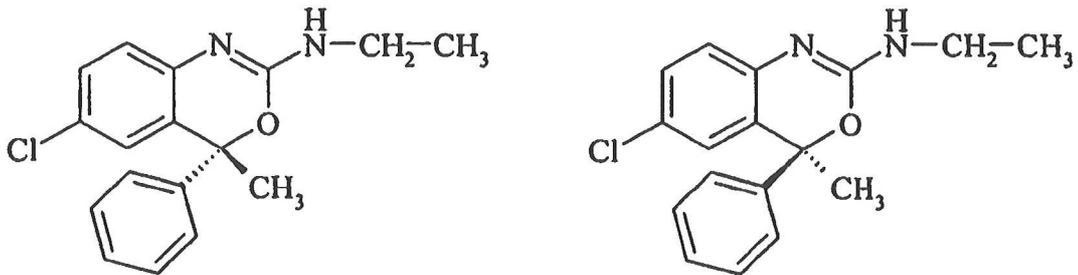


(IV)

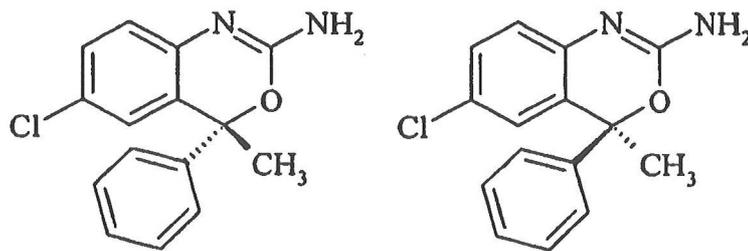
5 El compuesto de fórmula (III) es la etifoxina, o el clorhidrato de 6-cloro-2-etilamino-4-metil-4-fenil-4H-[3,1]benzoxazina.

El compuesto de fórmula (IV), la desetil-etifoxina ó 2-amino-6-cloro-4-metil-4-fenil-4H-[3,1]benzoxazina, es un metabolito de la etifoxina.

10 La presente invención se refiere igualmente a la utilización, tal como se ha definido anteriormente, de las formas ópticamente activas del compuesto de fórmula (III), tales como los enantiómeros siguientes:



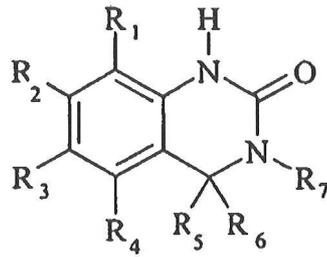
15 o sus mezclas, en particular su mezcla racémica, en especial, en forma de clorhidrato, así como la utilización, tal como se ha definido anteriormente, de las formas ópticamente activas del compuesto de fórmula (IV), tales como los enantiómeros siguientes:



20 o sus mezclas, en particular su mezcla racémica.

En otra forma de realización, la invención se refiere a la utilización, tal como se ha definido anteriormente de un compuesto de la siguiente fórmula (V):

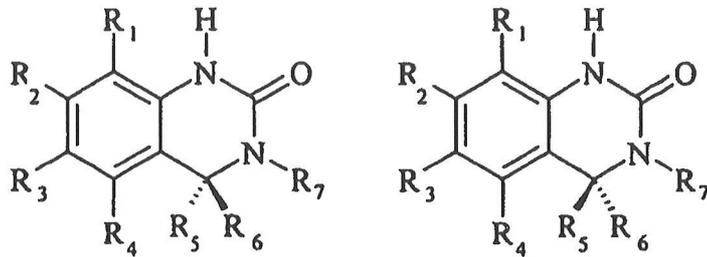
25



(V)

en la que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son los definidos anteriormente.

- 5 La presente invención se refiere igualmente a la utilización, tal como se ha definido anteriormente, de las formas ópticamente activas del compuesto de fórmula (V), tales como los siguientes enantiómeros (cuando R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son diferentes):

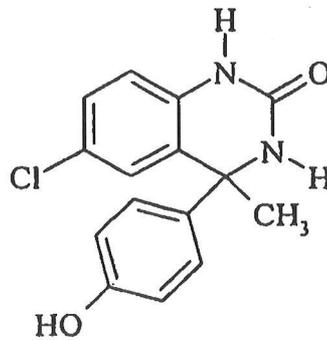


10

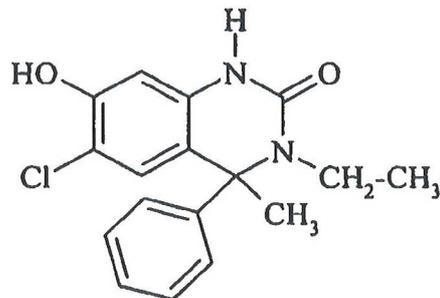
o sus mezclas, en particular su mezcla racémica.

En otra forma de realización particular, la invención se refiere a la utilización tal como se ha definido anteriormente, de compuestos de las fórmulas siguientes (VI) y (VII):

15



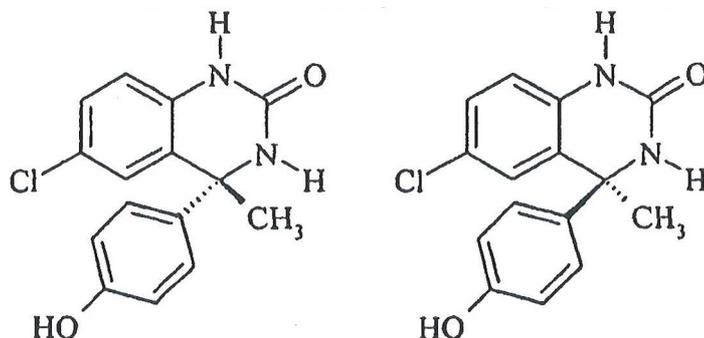
(VI)



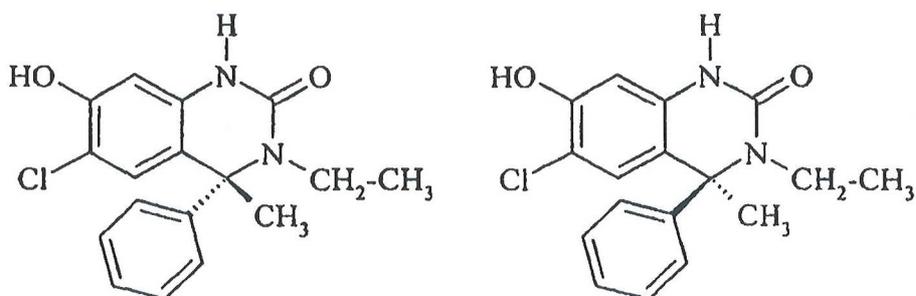
(VII)

- 20 Los compuestos de fórmula (VI) (6-cloro-4-(4-hidroxi-fenil)-4-metil-3,4-dihidro-1H-quinazolín-2-ona) y (VII) (6-cloro-3-etil-7-hidroxi-4-metil-4-fenil-3,4-dihidro-1H-quinazolín-2-ona) son metabolitos de la etifoxina.

La presente invención se refiere igualmente a la utilización, tal como se ha definido anteriormente, de las formas ópticamente activas del compuesto de fórmula (VI), tales como los enantiómeros siguientes:



o sus mezclas, en particular su mezcla racémica, así como la utilización, tal como está definida anteriormente, de las formas ópticamente activas del compuesto de fórmula (VII), tales como los enantiómeros siguientes:



o sus mezclas, en particular su mezcla racémica.

15 En una forma de realización específica de la invención, el medicamento definido anteriormente es apropiado para la administración a un individuo que tenga necesidad del mismo en una dosis unitaria aproximadamente de 50 mg hasta unos 1500 mg, en especial aproximadamente 150 a 200 mg del compuesto que se ha definido anteriormente.

20 En otra forma de realización particular de la invención, el medicamento es definido anteriormente es apropiado para la administración a un individuo que tenga necesidad de él en una dosis aproximada de 50 mg/día hasta aproximadamente 1500 mg/día, en especial aproximadamente de 150 mg/día hasta aproximadamente 200 mg/día, del compuesto tal como se ha definido anteriormente.

25 Según una forma de realización preferente de la invención, el medicamento definido anteriormente es apropiado para una administración por vía oral.

Según otra forma de realización preferente de la invención, el medicamento definido anteriormente se presenta en forma de un polvo, pastillas, gélulas o bolsitas.

30 En una forma de realización específica de la invención, el compuesto definido anteriormente está asociado, como mínimo, a un compuesto adicional destinado a la prevención o al tratamiento de las patologías que se definen a continuación.

La presente invención se refiere igualmente a productos que contienen:

35

- como mínimo, un compuesto de fórmula (I), tal como se ha definido anteriormente o sus sales farmacéuticamente aceptables, y
- como mínimo, un compuesto adicional destinado a la prevención o al tratamiento de las patologías escogidas en la lista, que comprenden:

40 - epilepsia,  
 - accidentes vasculares cerebrales, isquémicos o hemorrágicos,  
 - enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth o la enfermedad de Friedreich,  
 - las facomatosis, en especial las neurofibromatosis,  
 45 - las neuropatías, tales como neuropatías carenciales, en especial, alcohólicas, neuropatías tóxicas o

medicamentosas, en especial relacionadas con administración de vincristina, neuropatías relacionadas con una afección metabólica, tal como diabetes, neuropatías relacionadas con un proceso inflamatorio, en especial, el síndrome de Guillain-Barré, neuropatías infecciosas, en especial zona, y neuropatías rápidas,

- 5 - la polineuritis paraneoplásica,
- la esclerosis en placa,
- la esclerosis lateral amiotrófica,
- la esquizofrenia,
- la depresión,

- 10 - los tumores cerebrales,
- la enfermedad de Parkinson, y otros
- las demencias, tales como enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Pick o demencia vascular.

como producto de combinación para una utilización separada, simultaneada o desplazada en el tiempo para la prevención o tratamiento de deterioros neuronales relacionados con estas patologías.

- 15 En una forma de realización preferente de la invención, el compuesto adicional definido anteriormente se escoge en la lista que comprende:

- un antiepiléptico, en especial:

- 20 • Ácido valproico,
- Barbitúricos,
- Carbamacepina,
- Etosuximida,
- 25 • Gabapentina,
- Lamotrigina,
- Stiripentol,
- Tiagabina,
- Vigabatrin,

- un antiparkinson, en especial:

- dopaminérgico, tal como:
  - 35 → Levodopa asociada a un inhibidor de la dopadecarboxilasa,
  - Agonistas dopaminérgicos,
- anticolinérgico, tal como:
  - 40 → Biperideno,
  - Triexilfenidilo,
  - Tropatepina,
- un inhibidor de la monoamina oxidasa B (IMAO B),
- 45 • un inhibidor de la catecol-O-metil transferasa (COMT),

- un compuesto destinado al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, en especial:

- 50 • un anticolinesterásico, tal como:
  - Donepecil,
  - Galantamina,
  - Rivastigmina,
- 55 • Un antagonista de los receptores NMDA, tal como:
  - Memantina,

60 - un compuesto destinado al tratamiento de los AVC (accidentes vasculares cerebrales) isquémicos en fase aguda (Alteplasa) y sus consecuencias (Dihidroergocristina, Piracétam), en especial, según el tipo de AVC:

- Heparina,
- Aspirina,
- Nicardipina.

- un compuesto destinado al tratamiento de la esclerosis en placas, en especial:

- 5
- Interferon  $\beta$ ,
  - Acetato de glatirámero,
  - Mitoxantrona,

- un compuesto destinado al tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica, en especial:

- 10
- Riluzol,

- un compuesto destinado al tratamiento del síndrome de Guillen Barré, en especial:

- 15
- Inmunoglobulinas humanas de tipo G,
  - Tegelina,

- un compuesto destinado al tratamiento de las hemorragias cerebrales, en especial:

- 20
- Nimodipina,

- un antidepresivo, en especial:

- 25
- un imipramínico, tal como:
    - Anafranil,
    - Clomipramina,
    - Amoxapina,
    - Amitriptilina,

- 30
- un inhibidor selectivo de la captación de la serotonina, tal como:

- 35
- Fluoxetina,
  - Paroxetina,
  - Citalopram,
  - Fluvoxamina,

- un inhibidor selectivo de la captación de la serotonina y de la noradrenalina, tal como:

- 40
- Venlafaxina,
  - Mirtazapina,
  - Tianeptina,

- un compuesto destinado al tratamiento de la esquizofrenia, en especial:

- 45
- un psicotropo, tal como:

- Olanzapina,
- Risperidona,
- Clozapina,

- 50
- un neuroléptico, tal como

- Haloperidol,
- Pipotiazina,

- 55
- un compuesto destinado al tratamiento de tumores cerebrales, en especial, un agente de quimioterapia,
  - un compuesto destinado al tratamiento de la neuropatía diabética, en especial, un compuesto destinado a la corrección de problemas metabólicos (insulina),
  - un compuesto destinado al tratamiento de la polineuritis alcohólica, en especial, la vitamina B1.

- 60
- De manera ventajosa, el compuesto de fórmula general (I) o sus sales farmacéuticamente aceptables, se utilizan como coadyuvante destinado a aumentar los efectos de compuestos destinados al tratamiento de las patologías definidas anteriormente, tal como los compuestos adicionales definidos con anterioridad.

**DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS****Figura 1**

La figura 1 representa los efectos de concentraciones crecientes de etifoxina (en abcisas,  $\mu\text{M}$ ) sobre la densidad de marcado de las prolongaciones neuríticas (en ordenadas, porcentaje de superficie marcada) en ausencia (control) o en presencia de glutamato (2 ó 10 mM) después de 6 horas de incubación. Cada una de las columnas representa la media  $\pm$  desviación estándar de la media (8 mediciones por grupo). FGF representa el factor de crecimiento. El signo de estrella (\*) representa  $p < 0,05$  con respecto a las muestras respectivas (dosis 0) y el signo de barras cruzadas (#) representado por  $p < 0,05$  con respecto a los controles (sin glutamato).

**Figura 2**

La figura 2 representa los efectos de concentraciones crecientes de etifoxina (en abcisas  $\mu\text{M}$ ) sobre la densidad de marcado de las prolongaciones neuríticas (en ordenadas, porcentaje de superficie marcada) en ausencia (control) o en presencia de glutamato (2 ó 10 mM) después de 24 horas de incubación. Cada una de las columnas representa la media  $\pm$  desviación estándar de la media (8 mediciones por grupo). FGF representa el factor de crecimiento. El signo de estrella (\*) representa  $p < 0,05$  con respecto a las muestras respectivas (dosis 0) y el signo de barras cruzadas (#) representado por  $p < 0,05$  con respecto a los controles (sin glutamato).

**Figura 3**

La figura 3 representa los efectos de las concentraciones crecientes de desetil-etifoxina (en abcisas,  $\mu\text{M}$ ) sobre la densidad de marcado de las prolongaciones neuríticas (en ordenadas, porcentaje de superficie marcada) en ausencia (control) o en presencia de glutamato (2 ó 10 mM) después de 6 horas de incubación. Cada una de las columnas representa la media  $\pm$  desviación estándar de la media (8 mediciones por grupo). FGF representa el factor de crecimiento. El signo de asterisco (\*) representa  $p < 0,05$  con respecto a las muestras respectivas (dosis 0) y el signo de barras cruzadas # representa  $p < 0,05$  con respecto a los controles (sin glutamato).

**Figura 4A y Figura 4B**

Las figuras 4A y 4B representan los efectos de concentraciones crecientes de etifoxina (en abcisas, mg/kg) administradas por vía intraperitoneal (Figura 4A) o por vía oral (Figura 4B) con respecto al tiempo de supervivencia (en ordenadas, en segundos, media  $\pm$  desviación estándar de la media) de ratones sometidos a hipoxia hipobárica inducida por disminución de la presión atmosférica a 160 mmHg (9 ó 10 animales por grupo). El signo de asterisco (\*) representa  $p < 0,05$  con respecto a las muestras respectivas, en la prueba estadística ANOVA.

**Figura 5A y Figura 5B**

Las figuras 5A y 5B representan los efectos de concentraciones crecientes de etifoxina (en abcisas, mg/kg) administradas por vía intraperitoneal (figura 5A) o por vía oral (figura 5B) con respecto al tiempo de supervivencia (en ordenadas, en segundo, media  $\pm$  desviación estándar de la media) de ratones sometidos a una hipoxia histotóxica inducida por una administración interperitoneal de 15 mg/kg de cianuro potásico (9 a 19 animales por grupo). El signo de asterisco (\*) representa  $p < 0,05$  con respecto a las muestras respectivas, en la prueba estadística ANOVA.

**Figura 6A y Figura 6B**

Las figuras 6A y 6B representan los efectos de concentraciones crecientes de etifoxina (en abcisas, mg/kg) administradas por vía intraperitoneal (figura 6A) o por vía oral (figura 6B) con respecto al tiempo de supervivencia (en ordenadas, en segundos, media  $\pm$  desviación estándar de la media) de ratas sometidas a una hipoxia histotóxica inducida por la administración intravenosa de 4 mg/kg de cianuro potásico (9 o 10 animales por grupo). El signo de asterisco (\*) representa  $p < 0,05$  con respecto a las muestras respectivas, en la prueba estadística ANOVA.

**Figura 7A y Figura 7B**

Las figuras 7A y 7B representan los efectos de concentraciones crecientes de desetil-etifoxina (en abcisas, mg/kg) administradas por vía intraperitoneal (figura 7A) o por vía oral (figura 7B) con respecto al tiempo de supervivencia (en ordenadas, en segundos, medio  $\pm$  separación estándar de la media) de ratones sometidos a hipoxia hipobárica inducida por disminución de la presión atmosférica a 160 mmHg (10 A 20 animales por grupo). El signo de asterisco (\*) representa  $p < 0,05$  con respecto a las muestras respectivas, en la prueba estadística ANOVA.

**Figura 8A y Figura 8B**

Las figuras 8A y 8B representan los efectos de concentraciones crecientes de desetil-etifoxina (en abcisas mg/kg) administradas por vía intraperitoneal (figura 8A) o por vía oral (figura 8B) con respecto al tiempo de supervivencia (en ordenadas, en segundos, medio  $\pm$  en dirección estándar de la media) de ratas sometidas

a hipoxia histotóxica inducida por administración intravenosa de 4 mg/kg de cianuro potásico (10 animales por grupo). El signo de asterisco (\*) representa  $p < 0,05$  con respecto a las muestras respectivas, en la prueba estadística ANOVA.

5 **Figura 9**  
La figura 9 representa el impacto de los tratamientos de la enfermedad de Parkinson; adaptado de Fenelon (2005) Rev. Prat. 714-716.

10 **EJEMPLOS**

**EJEMPLO 1**

**Evaluación de los efectos neuroprotectores de la etifoxina en cultivos mixtos de neuronas corticales y de astrocitos de ratas en presencia de un exceso de glutamato**

15 El principio del estudio a consistido en evaluar la supervivencia de las neuronas corticales en co-cultivo con astrocitos después de la aplicación de un neurotóxico, con glutamato en exceso.

20 En efecto, el glutamato es responsable de la excitotoxicidad (activación excesiva de receptores neuronales) implicada en la muerte neuronal consecutiva a numerosas afecciones, entre ellas accidentes vasculares cerebrales, crisis de epilepsia o ciertas afecciones neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Huntington o esclerosis lateral amiotrófica.

25 La supervivencia neuronal está cuantificada por la importancia de la densidad de la red de prolongaciones neuríticas marcada por un anticuerpo antineurofilamentos en ausencia o en presencia de glutamato.

**1. Materiales y métodos**

30 1.1. Cultivos celulares

**Tipo celular:** Primer cultivo de neuronas corticales de embriones de rata de 14 días y primer cultivo de astrocitos corticales de ratas recién nacidas.  
**Medio de cultivo:** DMEM-Ham F12 (Invitrogen 21331020)  
 B27 2% (invitrogen 17504044)  
 L-glutamina 2mM (Invitrogen 25030024)  
 Penicilina 50 UI/ml – Streptomycin 50 µg/ml (Invitrogen 15070063)  
 Factor de crecimiento nervioso 10 ng/ml (NGF, Invitrogen 13290.010)  
**Medio de supervivencia:** MEM (Invitrogen 21090022)  
 L-glutamina 2Mm (Invitrogen 25030024)  
 Penicilina 50 UI/ml – Streptomycin 50 µg/ml (Invitrogen 15070063)  
 Suplemento N2 (Invitrogen 17502-048)

40 1.2 Citotoxicidad previa

45 Placas: 96 pozos  
 Tiempo de cultivo: 8 días  
 Células/pozo: neuronas corticales + astrocitos  
 Gamma de producto: a partir de 100 µM y después relación 3  
 Replicaciones: 3  
 50 Contacto células/producto: 48 horas  
 Parámetros de evaluación: observación microscópica e hidrólisis en MTT.  
 MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiozol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

55 1.3 Tratamiento y análisis de la red de las prolongaciones marcadas con un anticuerpo anti-neurofilamentos

Las neuronas corticales han sido extraídas de córtex de embriones de rata de 14 días y han sido cultivadas en medio de cultivo en placa de 96 pozos en una estufa a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> saturado de humedad. Después de 2 días de cultivo, han sido sembrados astrocitos procedentes de córtex de ratas nuevas en los pozos (según una proporción de un astrocito para 4 neuronas). Después de 10 días de cultivo, las neuronas maduras sintetizan los neurofilamentos (proteína de estructura específica de las neuronas maduras); además estas neuronas expresan en su superficie receptores funcionales del glutamato y pueden estar, por lo tanto, intoxicadas.

65 Al 12º día de cultivo, el medio ha sido sustituido por medio de seguimiento con o sin etifoxina con 3 concentraciones y las neuronas han sido intoxicadas o no por glutamato (Sigma G1501) a 2 mM y 10 mM. Cada estado de cultivo ha sido realizado en 4 pozos. Los cultivos han sido incubados durante 2 periodos de tiempo (6 y 24 horas).

Se ha realizado un control positivo en medio del cultivo de supervivencia conteniendo factor de crecimiento nervioso (NGF; 10 ng/ml) y factor básico de crecimiento de fibroblastos (FGFb; 5 ng/ml) y las células han sido intoxicadas en las mismas condiciones.

5 Al final los dos períodos de tiempo de incubación (6 y 24 horas), los tapices celulares han sido fijados y marcados por un anticuerpo monoclonal antineurofilamentos 68 y 200 kD (DAKO M0762) y después revelados por un conjugado anticuerpo de cabra antiinmunoglobulina de ratón-Alexia flúor 488 (Interchim A-11029). Se han realizado controles sin anticuerpo primario. Todos los controles eran negativos (sin marcado no específico). Después de lavados extensos en PBS, los preparados han sido observados en epi-fluorescencia (microscopio Nikon Diaphot 10 300).

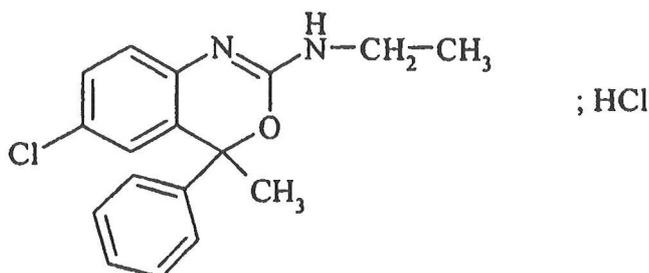
Para cada pozo de cultivo (4 pozos por condición experimental), se han realizado 2 imágenes con ayuda de una cámara Nikon DXM 1 200F pilotada por un programa LUCIA 6.0.

15 Todas las imágenes han sido efectuadas en las mismas condiciones y con reglajes de cámara idénticos.

Se han realizado análisis de la densidad de las redes de prolongaciones marcadas con el anticuerpo anti-neurofilamentos con ayuda del programa LUCIA 6.0. Un primer tratamiento de las imágenes ha permitido aumentar la intensidad del marcado específico de las prolongaciones. Las zonas positivas al marcado han sido binarizadas y el porcentaje de marcado por imagen ha sido analizado (superficie marcada/superficie total analizada).

#### 1.4. Producto estudiado

25 La etifoxina (clorhidrato de 6-cloro-2-etilamino-4-metil-4-fenil-4H-[3,1]benzoxazina) es puesta en solución con la concentración de 100 mM en DMSO y después es diluida sucesivamente en el medio de cultivo (concentración de DMSO  $\leq$  0,1%, v/v).



30 1.5 Expresión y análisis estadístico de los resultados

Los resultados (valores medios  $\pm$  error estándar en la media (ESM), son expresados en porcentaje de marcado por campos de microscopio (n = 8 mediciones/condiciones de cultivo). El análisis de variancia tiene 2 factores (Etifoxina y glutamato), seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Student Newman-Keuls ha sido utilizado para la comparación estadística de los resultados.

40 Los resultados obtenidos con el control positivo (FGF) han sido comparados con las muestras con ayuda de la prueba t de Studen o de Mann y Whitney, según el caso. El umbral de significatividad había sido fijado en  $p < 0,05$  (programa SigmaStat – V3.1, SPSS inc).

## 2. Resultados

### 45 2.1 Citotoxicidad de la etifoxina

Se ha realizado una primera experiencia (prueba clásica utilizada para medir la relación de supervivencia celular) por el objetivo de estudiar la citotoxicidad de la etifoxina con respecto a neuronas corticales en presencia de astrocitos en cultivo y determinar de esta manera la concentración máxima no tóxica de etifoxina.

50 El análisis visual realizado con microscopio después de 48 horas de incubación muestra una mortalidad neuronal con una concentración de 33 y 100  $\mu$ M de etifoxina, mientras que la mortalidad de los astrocitos se ha observado en la concentración de 100  $\mu$ M. Las concentraciones de etifoxina conservadas para el estudio propiamente dicho son de 1, 3 y 10  $\mu$ M.

55 2.2 de los efectos de la etifoxina sobre la densidad de neurofilamentos en presencia de glutamato después de 6 horas de incubación (Figura 1)

En el medio de cultivo de control (sin glutamato), la etifoxina aumenta de manera dependiente de la dosis, la densidad de neurofilamentos marcados con un efecto estadísticamente significativo con la dosis de 10  $\mu\text{M}$ .

5 El glutamato con las concentraciones de 2 y 10 mM reduce de manera estadísticamente significativa la densidad de neurofilamentos. La etifoxina con concentraciones en 3 y 10  $\mu\text{M}$ , así como el FGF se oponen de manera estadísticamente significativa a la disminución de la densidad de neurofilamentos inducido por el glutamato.

### 2.3 Efectos de etifoxina sobre la densidad de neurofilamentos en presencia de glutamato después de 24 horas (Figura 2)

10 En el medio de cultivo de control, tal como anteriormente, la etifoxina aumenta de manera estadísticamente significativa la densidad de neurofilamentos con la dosis de 10  $\mu\text{M}$ . Las concentraciones de 1 y 3  $\mu\text{M}$  no tienen efectos.

15 El glutamato con concentraciones de 2 y 10 mM reduce de manera importante el marcado de los neurofilamentos que es próxima a 0.

20 La etifoxina con la concentración de 10  $\mu\text{M}$  y los FGF se oponen de manera estadísticamente significativa a los efectos de 2 mM de glutamato.

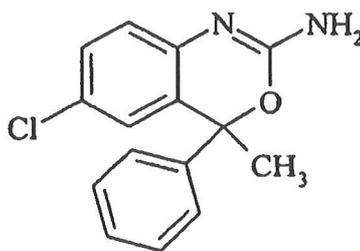
Los resultados revelan, por una parte, que la etifoxina posee efecto sobre el crecimiento neuronal o efecto neurotrófico, tal como lo muestra el aumento de la densidad de las redes de neurofilamentos en el cultivo de control después de 6 y 24 horas de incubación.

25 Por otra parte, ponen también en evidencia un efecto neuroprotector de la etifoxina después de intoxicación por el glutamato. En efecto, la etifoxina, tal como los factores de crecimiento, se opone a la reducción de las redes de neurofilamentos inducida por un acceso de glutamato.

### EJEMPLO 2

30 **Evaluación de los efectos neuroprotectores de la desetil-etifoxina en cultivos mixtos en neuronas corticales y de astrocitos de ratas en presencia de un exceso de glutamato**

35 La metodología del **Ejemplo 1** ha sido aplicada a un metabolito activo de la etifoxina, ha saber la desetil-etifoxina (2-amino-6-cloro-4-metil-4-fenil-4H-[3,1]benzoxacina), que ha sido puesta en solución con una concentración de 100 mM en DMSO y después se ha diluido sucesivamente en el medio de cultivo (concentración de DMSO  $\leq$  0,1%, v/v).



40 Desetil-etifoxina

### Citotoxicidad de la desetil-etifoxina

45 El análisis visual realizado al microscopio después de 48 horas de incubación muestra una mortalidad neuronal a la concentración de 33 y 100  $\mu\text{M}$  de desetil-etifoxina, mientras que la mortalidad de los astrocitos se ha observado con la concentración de 100  $\mu\text{M}$ . Las concentraciones de desetil-etifoxina conservadas para el estudio propiamente dicho han sido de 1, 3 y 10  $\mu\text{M}$ .

50 Efectos de la desetil-etifoxina sobre la densidad de neurofilamentos en presencia de glutamato después de 6 horas de incubación (Figura 3)

En el medio de cultivo de control (sin glutamato), la desetil-etifoxina aumenta de manera estadísticamente significativa la densidad de neurofilamentos marcados a la dosis de 10  $\mu\text{M}$ .

55 El glutamato con la concentración de 2 mM reduce de manera estadísticamente significativa la densidad de neurofilamentos. Solo la concentración de 10  $\mu\text{M}$  de desetil-etifoxina se opone al efecto del glutamato. Por el contrario, la desetil-etifoxina con las concentraciones de 1, 3 y 10  $\mu\text{M}$ , se oponen de manera estadísticamente

significativa a la disminución de la densidad de neurofilamentos marcados inducida por 10  $\mu$ M de glutamato.

### **EJEMPLO 3**

#### **5 Efecto protector de la etifoxina en 3 modelos de hipoxia en ratones y en ratas**

10 Numerosas situaciones patológicas, tales como crisis de epilepsia o accidentes vasculares cerebrales, se traducen por hipoxia, local o generalizada, de los tejidos nerviosos, lo que conduce a su destrucción parcial o total, en especial por muerte neuronal. En un animal puesto en condiciones de hipoxia severa, la destrucción del tejido nervioso conduce, rápidamente a la muerte del animal. Los efectos de la etifoxina sobre la duración de supervivencia de ratones o ratas puestos en situación de hipoxia han sido estudiados, por lo tanto, con la finalidad de evaluar su eficacia neuroprotectora.

#### **15 1. Material y métodos**

##### 1.1 Hipoxia hipobárica en ratones

###### *Animales*

20 Se han utilizado ratones macho NMRI de Janvier, con pesos comprendidos entre 25 y 30 gramos después de una aclimatación de, como mínimo, 7 días en el recinto ( $t^{\circ} = 22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; higrometría  $50 \pm 20\%$ ; nutrición UAR "A04" SAFE (Augy, Francia) y agua del grifo *ad libitum*; ciclo nictemeral de 12 horas (luz de 7 a 19 horas).

###### *Protocolo*

25 Los ratones no sometidos a ayuno son repartidos al azar en lotes de 10.

Se ha adaptado el protocolo de Nakaniski y otros (1973) Life Sciences, 13, 467-474 para realizar el modelo.

30 Cada uno de los ratones ha sido situado en un secador (envolvente hermética) en el que se disminuye la presión atmosférica de 760 a 160 mmHg con ayuda de una trompa de agua. Esta depresión ha sido efectuada en un minuto y provoca la muerte en los animales de muestra aproximadamente en 1 minuto.

35 Se observa entonces el tiempo de supervivencia del animal que corresponde a la diferencia entre el momento en que tiene lugar la muerte del ratón, apreciada por paro respiratorio, menos el tiempo necesario para la inducción de la hipoxia.

Los productos a estudiar son administrados por vía intraperitoneal (i.p.) (0,1 ml/10 g), 30 minutos antes de la inducción de la hipoxia hipobárica, o por vía oral (0,1 ml/10 g p.o.) 1 hora antes de la hipoxia.

##### 40 1.2 Hipoxia por KCN (i.p) en los ratones

###### *Animales*

45 Se han utilizado ratones macho CD1 de Charles River, de pesos comprendidos entre 20 y 25 gramos después de una aclimatación mínima de 7 días en el recinto ( $t^{\circ} = 22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; higrometría  $50 \pm 20\%$ ; nutrición UAR "A04"; ciclo nictemeral de 12 horas (luz de 7 a 19 horas).

###### *Protocolo*

50 Los ratones no sometidos a ayuno, son repartidos al azar en lotes de 10.

55 Cada ratón recibe por vía intraperitoneal (i.p.) (0,1 ml/10g) una solución extemporánea de cianuro potásico (KCN) en NaCl a 0,9% (1,5 mg/ml). Esto corresponde a una dosis de 15 mg/kg de KCN que provoca la muerte en los animales de muestra en varios minutos.

Se anota el momento en que tiene lugar la muerte para cada ratón, apreciada por paro cardíaco.

Los productos a estudiar son administrados por vía intraperitoneal (i.p.) (0,1 ml/10 g), 30 minutos antes de la inyección de KCN o por vía oral (0,1 ml/10 g p.o.) 1 hora antes del KCN.

##### 60 1.3 Hipoxia por KCN (i.v.) en ratas

###### *Animales*

65 Se utilizan ratas macho Wistar de Janvier, con pesos comprendidos entre 180 y 200 gramos después de una aclimatación de, como mínimo, 7 horas en el recinto ( $t^{\circ} = 22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; higrometría  $50 \pm 20\%$ ; nutrición UAR "A04" SAFE (Augy, Francia); ciclo nictemeral de 12 horas (luz de 7 a 19 horas).

Protocolo

Las ratas no sometidas a ayuno, son repartidas al azar en lotes de 10.

5 El protocolo es adaptado de Lamar y otros (1988) Drug Develop. Res., 14, 297-304.

Cada rata recibe por vía intravenosa (i.v.) (0,1 ml/100g) una solución extemporánea de cianuro potásico (KCN) en NaCl a 0,9% (4 mg/ml). Esto corresponde a una dosis de 4 mg/kg de KCN que provoca la muerte en los animales de la muestra en algunos minutos.

Se anota momento en que tiene lugar la muerte para cada rata, apreciado por paro cardíaco.

10 Los productos a estudiar son administrados por vía intraperitoneal (i.p.) (0,5 ml/100 g), 30 minutos antes de la inyección de KCN, o por vía oral (0,5 ml/100 g p.o.) 1 hora antes del KCN.

1.4 Productos

15 Se pone en solución clorhidrato de etifoxina en Tween 80 a 1%. El cianuro potásico (Merck) es solubilizado en NaCl a 0,9%.

1.5 Estadísticas

20 La prueba estadística utilizada es un análisis de variancia de un factor para determinar los grupos tratados que difieren del grupo de muestra que recibe el vehículo con el umbral de 5%.

2. Resultados2.1 Hipoxia hipobárica en ratones

La inducción de depresión para obtener hipoxia hipobárica comporta la muerte en 40 a 60 segundos en los ratones sin tratamiento o que reciben el líquido vehículo.

30 La etifoxina aumenta de manera significativa el retraso en la aparición de la muerte a partir de 30 mg/kg i.p o p.o. (**Tabla 1 y Figuras 4A-4B**).

**Tabla 1:** Efectos de la etifoxina en el tiempo de supervivencia el hipoxia hipobárica inducida por disminución de la presión atmosférica a 160 mmHg en los ratones (*n* número de animales, *m* media, *esm* desviación estándar de la media).

Vías	Dosis (mg/kg)	n	Tiempo de supervivencia en segundos (m ± esm)	Porcentajes de variación	Prueba estadística ANOVA
i.p.	0	20	57,5±2,0		
	3	10	64,5±3,4	+12	ns
	10	19	66,1±3,0	+15	ns
	30	19	81,8±4,6	+42	p<0,05
	50	10	138,5±23,3	+141	p<0,05
	75	10	132,0±21,6	+130	p<0,05
p.o.	0	20	55,5±2,3		
	30	10	81,5±4,5	+47	p<0,05
	100	20	95,3±5,6	+72	p<0,05
	200	10	99,5±2,7	+79	p<0,05
	300	20	115,5±8,6	+108	p<0,05

2.2 Hipoxia a KCN (i.p.) en ratones

40 La administración de 15 mg/kg i.p de KCN comporta la muerte en un tiempo de 90 a 120 segundos en los ratones sin tratamiento o que reciben el vehículo líquido.

La etifoxina aumenta de manera significativa el retraso en la aparición de la muerte a partir de 50 mg/kg i.p, pero no modifica significativamente el tiempo de supervivencia por vía oral (**Tabla 2 y Figuras 5A-5B**).

**Tabla 2:** Efectos de la etifoxina sobre el tiempo de supervivencia en hipoxia histotóxica inducida por cianuro potásico (15 mg/kg i.p.) en ratones (*n* número de animales, *m* media, *esm* desviación estándar de la media).

Vías	Dosis	n	Tiempo de supervivencia en segundos (m ± esm)	Porcentajes de variación	Prueba estadística ANOVA
i.p.	0	19	106±9		
	3	19	122±7	+15	ns
	10	20	113±5	+7	ns
	30	18	129±11	+22	ns
i.p.	0	19	91±4		
	30	16	108±4	+19	ns
	50	18	124±8	+36	p<0,05
p.o.	75	17	133±6	+46	p<0,05
	0	9	108±11		
	100	9	94±6	-13	ns
	200	10	123±12	+14	ns
	300	10	102±7	-6	ns

5 **2.3 Hipoxia a KCN (i.v) en ratas**

La administración de 4 mg/kg i.v de KCN comporta la muerte en un tiempo de 50 a 60 segundos en ratas sin tratamiento o que reciben el vehículo líquido.

10 La etifoxina aumenta de manera significativa el retraso en la aparición de la muerte a partir de 50 mg/kg i.p y 200 mg/kg p.o **Tabla 3 y Figuras 6A-6B).**

**Tabla 3:** Efectos de la etifoxina sobre el tiempo de supervivencia en hipoxia histotóxica inducida por cianuro potásico (4 mg/kg i.v.) en ratas (*n* número de animales, *m* media, *esm* desviación estándar de la media).

Vías	Dosis	n	Tiempo de supervivencia en segundos (m ± esm)	Porcentajes de variación	Prueba estadística ANOVA
i.p.	0	10	56,6±2,6		
	30	10	60,3±2,0	+7	ns
	50	10	107,3±6,1	+90	p<0,05
	75	10	144,3±11,5	+155	p<0,05
p.o..	0	9	55,4±1,1		
	50	10	59,5±2,1	+7	ns
	100	10	60,1±1,2	+8	ns
	200	10	63,9±2,0	+15	p<0,05

**EJEMPLO 4**

20 Se aplica la metodología del **Ejemplo 3** a la desetil-etifoxina que se ha puesto en solución en Tween 80 a 1%.

1 **Hipoxia hipobárica en ratones**

La desetil-etifoxina muestra actividad antihipóxica a partir de 30 mg/kg i.p.. Por vía oral, comporta un aumento significativo de la duración de supervivencia a partir de 200 mg/kg **(Tabla 4 y Figuras 7A-7B).**

**Tabla 4:** Efectos de la desetil-etifoxina sobre el tiempo de supervivencia en hipoxia hipobárica inducida por disminución de la presión atmosférica a 160 mmHg en ratones (*n* número de animales, *m* media, *esm* desviación estándar de la media).

Vías	Dosis	n	Tiempo de supervivencia en segundos (m ± esm)	Porcentajes de variación	Prueba estadística ANOVA
i.p.	0	10	53,5±2,2		
	30	9	71,7±4,8	+34	p<0,05
	50	9	70,7±4,3	+32	p<0,05
	75	10	69,8±2,7	+30	p<0,05

Vías	Dosis	n	Tiempo de supervivencia en segundos (m ± esm)	Porcentajes de variación	Prueba estadística ANOVA
p.o..	0	10	42,0±2,3		
	100	10	61,0±2,6	+45	ns
	200	10	94,9±9,9	+126	p<0,05
	300	10	94,8±11,2	+126	p<0,05

2 Hipoxia a KCN (i.p) en ratas

5 En esta prueba, la desetil-etifoxina aumenta el tiempo de supervivencia de manera no significativa para 75 mg/kg i.p. a razón de una fuerte variabilidad. Por vía oral, muestra una actividad anti-hipóxica a partir de 100 mg/kg p.o (**Tabla 5 y Figuras 8A-8B**).

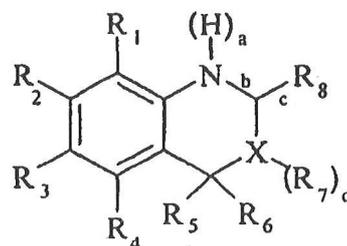
**Tabla 5:** Efectos de la desetil-etifoxina sobre el tiempo de supervivencia en hipoxia histotóxica inducida por cianuro potásico (4 mg/kg i.p.) en ratas (*n* número de animales, *m* media, *esm* desviación estándar de la media).

10

Vías	Dosis	n	Tiempo de supervivencia en segundos (m ± esm)	Porcentajes de variación	Prueba estadística ANOVA
i.p.	0	10	57,1±1,2		
	30	10	55,0±1,5	-4	ns
	50	10	55,6±1,5	-3	ns
	75	10	72,7±5,5	+27	ns
p.o..	0	10	57,3±1,0		
	50	10	58,8±1,9	+3	ns
	100	10	81,3±3,8	+42	p<0,05
	200	10	81,7±4,1	+43	p<0,05

## REIVINDICACIONES

1. Utilización de, como mínimo, un compuesto de la siguiente fórmula (I):



(I)

5

en la que:

- a representa 0 ó 1;
  - b representa un enlace simple o un enlace doble;
  - c representa un enlace simple o un enlace doble;
  - d representa 0 ó 1;
  - X representa un átomo de oxígeno o de nitrógeno, con reserva de que cuando X representa un átomo de oxígeno entonces d tiene valor de 0 y cuando X representa un átomo de nitrógeno entonces d tiene valor de 1;
  - R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, y R<sub>4</sub>, idénticos o distintos, representan un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, especialmente escogido entre F, Cl, Br ó I, un grupo hidróxilo, o un grupo alcóxilo de 1 ó 2 átomos de carbono;
  - R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub>, idénticos o distintos, representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo o cicloalquilo de 1 a 6 átomos de carbono, o un grupo arilo de 6 átomos de carbono cuyo núcleo aromático está eventualmente sustituido por uno o varios átomos de halógeno o uno o varios grupos hidróxilo, alcóxilo de 1 ó 2 átomos de carbono, trifluorometilo o nitro;
  - R<sub>7</sub> representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidróxilo, o un grupo alquilo o hidroxialquilo de 1 a 3 átomos de carbono;
  - R<sub>8</sub> representa un átomo de oxígeno o un grupo -NR<sub>9</sub>R<sub>10</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>10</sub>, idénticos o distintos, que representan un átomo de hidrógeno, un grupo hidróxilo, o un grupo alquilo o hidroxialquilo de 1 a 3 átomos de carbono, con la reserva de que cuando R<sub>8</sub> representa un átomo de oxígeno, entonces a tiene valor de 1, b representa un enlace simple y c representa un enlace doble y que cuando R<sub>8</sub> representa un grupo -NR<sub>9</sub>R<sub>10</sub>, entonces a tiene valor de 0, b representa un doble enlace y c representa un enlace simple;
- o sales farmacéuticamente aceptables,  
para la preparación de un medicamento con actividad neuroprotectora destinado al tratamiento de deterioros neuronales.

30

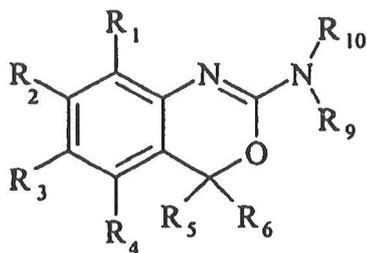
2. Utilización, según la reivindicación 1, para la preparación de un medicamento que tiene actividad de regeneración de las células del sistema nervioso central destinado al tratamiento de deterioros neuronales.

3. Utilización, según la reivindicación 1 ó 2, en el que los deterioros neuronales están relacionados con patologías escogidas dentro de la lista que comprende:

- epilepsia,
- accidentes vasculares cerebrales, isquémicos o hemorrágicos,
- enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth o la enfermedad de Friedreich,
- las facomatosis, en especial las neurofibromatosis,
- las neuropatías, tales como neuropatías carenciales, en especial, alcohólicas, neuropatías tóxicas o medicamentosas, en especial con la vincristina, neuropatías relacionadas con una afección metabólica, tal como diabetes, neuropatías relacionadas con un proceso inflamatorio, en especial, el síndrome de Guillain-Barré, neuropatías infecciosas, en especial zona, y neuropatías rápidas,
- la polineuritis paraneoplásica,
- la esclerosis en placa,
- la esclerosis lateral amiotrófica,
- la esquizofrenia,
- la depresión,
- los tumores cerebrales,
- la enfermedad de Parkinson, y otros
- las demencias, tales como enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Pick o demencia vascular.

55

4. Utilización, según una de las reivindicaciones 1 a 3, de un compuesto de la siguiente fórmula (II):

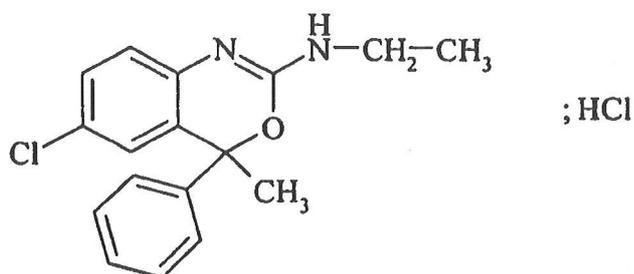


(II)

en la que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>10</sub> son los definidos anteriormente.

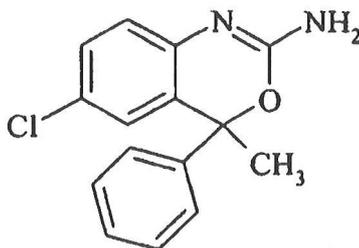
5

5. Utilización, según una de las reivindicaciones 1 a 4, de los compuestos de las siguientes fórmulas (III) y (IV):



; HCl

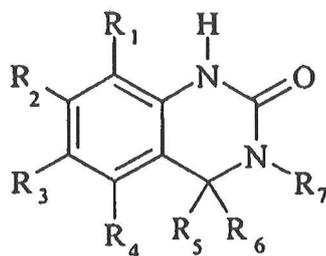
(III)



(IV)

10

6. Utilización, según una de las reivindicaciones 1 a 3, de un compuesto de la siguiente fórmula (V):

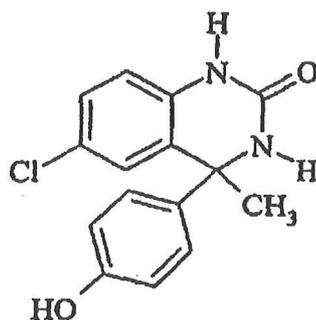


(V)

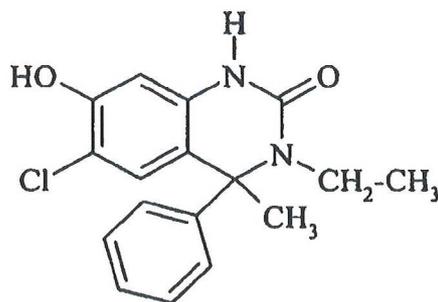
15

en la que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son los definidos en la reivindicación 1.

7. Utilización, según la reivindicación 1, 2, 3 ó 6, de compuestos de las siguientes fórmulas (VI) y (VII):



(VI)



(VII)

- 5 8. Utilización, según una de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el medicamento es apropiado para la administración a un individuo que tiene necesidad del mismo con una dosis unitaria de 50 mg a 1500 mg, especialmente de 150 a 200 mg del compuesto, tal como se ha definido en una de las reivindicaciones 1 y 4 a 7.
- 10 9. Utilización, según una de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el medicamento es apropiado para la administración a un individuo que tiene necesidad del mismo a una dosis de 50 mg/día a 1500 mg/día, en especial de 150 mg/día a 200 mg/día, del compuesto, tal como se ha definido en una de las reivindicaciones 1 y 4 a 7.
- 15 10. Utilización, según una de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el medicamento es apropiado para administración por vía oral.
- 20 11. Utilización, según una de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el medicamento se presenta en forma de polvo, pastillas, cápsulas o bolsitas.
- 25 12. Utilización, según la reivindicación 1, en la que el compuesto es etifoxina y el medicamento ejerce un efecto neurotrófico.
- 30 13. Utilización, según una de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el compuesto, tal como se ha definido en una de las reivindicaciones 1 y 4 a 7 está asociado, como mínimo, a un compuesto adicional destinado a la prevención o al tratamiento de patologías definidas en la reivindicación 3.
- 35 14. Producto que contiene:
- como mínimo, un compuesto de fórmula (I) tal como se ha definido en una de las reivindicaciones 1 y 4 a 7 o sus sales farmacéuticamente aceptables, y
  - como mínimo, un compuesto adicional destinado a la prevención o al tratamiento de las patologías escogidas en la lista que comprende:
    - epilepsia,
    - accidentes vasculares cerebrales, isquémicos o hemorrágicos,
    - 40 - enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth o la enfermedad de Friedreich,
    - las facomatosis, en especial las neurofibromatosis,
    - las neuropatías, tales como neuropatías carenciales, en especial, alcohólicas, neuropatías tóxicas o medicamentosas, en especial con la vincristina, neuropatías relacionadas con una afección metabólica, tal como diabetes, neuropatías relacionadas con un proceso inflamatorio, en especial, el síndrome de Guillain-Barré,

- neuropatías infecciosas, en especial zona, y neuropatías rdicas,
- la polineuritis paraneoplásica,
  - la esclerosis en placa,
  - la esclerosis lateral amiotrófica,
- 5 - la esquizofrenia,
- la depresión,
  - los tumores cerebrales,
  - la enfermedad de Parkinson, y otros
  - las demencias, tales como enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Pick o demencia vascular.
- 10 como producto de combinación para utilización separada, simultánea o desplazada en el tiempo para el tratamiento de deterioros neuronales relacionados con estas patologías.
- 15 15. Compuesto de fórmula (I), tal como se ha definido en una de las reivindicaciones 1 y 4 a 7, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su utilización, como medicamento con actividad neuroprotectora en el tratamiento de deterioros neuronales.
- 20 16. Compuesto de fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su utilización, según la reivindicación 15, a título de medicamento con actividad de regeneración de las células del sistema nervioso central en el tratamiento de deterioros neuronales.
- 25 17. Compuesto de fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su utilización, según la reivindicación 15 ó 16, en el que los deterioros neuronales estn relacionados con las patologías escogidas en la lista que comprende:
- epilepsia,
  - accidentes vasculares cerebrales, isquémicos o hemorrágicos,
  - enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth o la enfermedad de Friedreich,
- 30 - las facomatosis, en especial las neurofibromatosis,
- las neuropatías, tales como neuropatías carenciales, en especial, alcohólicas, neuropatías tóxicas o medicamentosas, en especial con la vincristina, neuropatías relacionadas con una afección metabólica, tal como diabetes, neuropatías relacionadas con un proceso inflamatorio, en especial, el síndrome de Guillain-Barré,
  - las demencias, tales como enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Pick o demencia vascular.
- 35 - la polineuritis paraneoplásica,
- la esclerosis en placa,
  - la esclerosis lateral amiotrófica,
  - la esquizofrenia,
  - la depresión,
- 40 - los tumores cerebrales,
- la enfermedad de Parkinson, y otros
- 45 18. Compuesto de fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su utilización, según una de las reivindicaciones 15 a 17, en el que el compuesto, tal como se ha definido en una de las reivindicaciones 1 y 4 a 7 está asociado, como mínimo, a un compuesto adicional destinado a la prevención o tratamiento de las patologías definidas en la reivindicación 17.
- 50 19. Compuesto de fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su utilización, según la reivindicación 15, en el que el compuesto es etifoxina y ejerce un efecto neurotrófico.

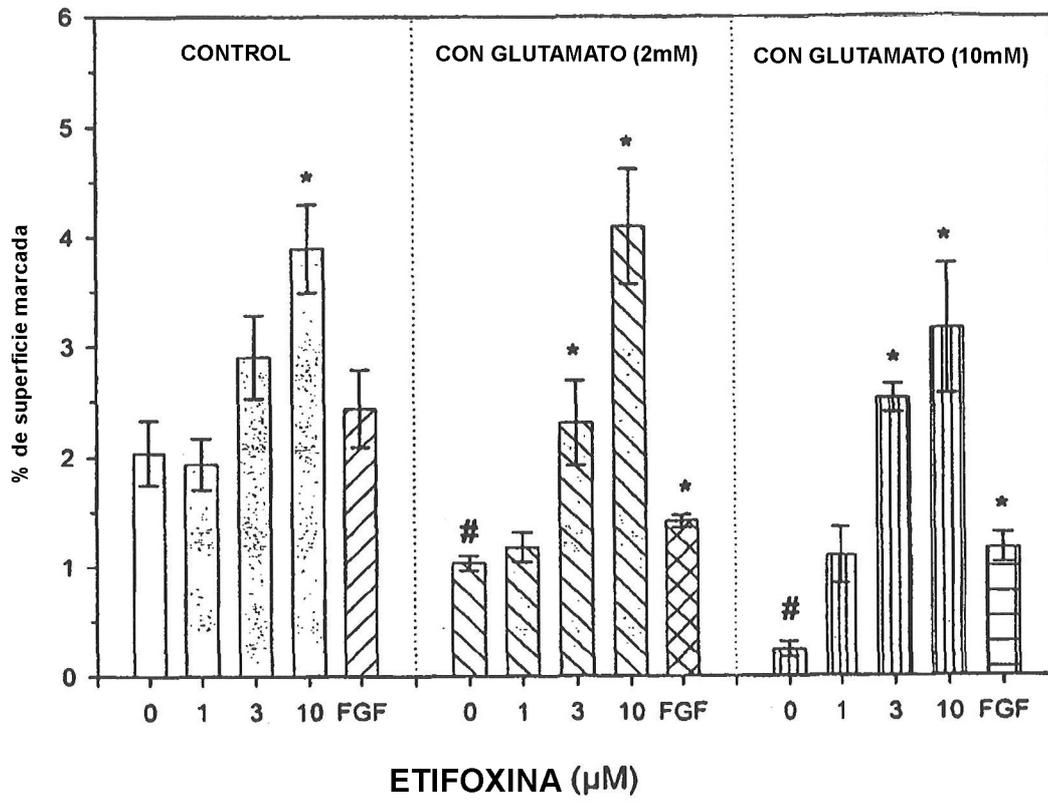


Figura 1

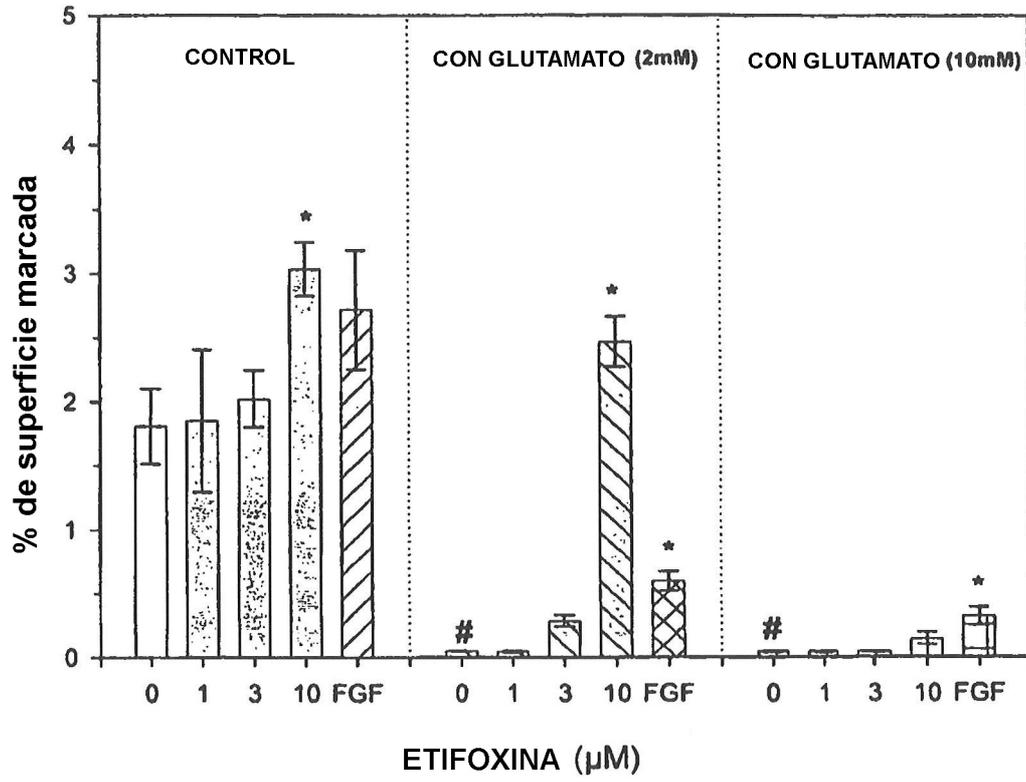


Figura 2

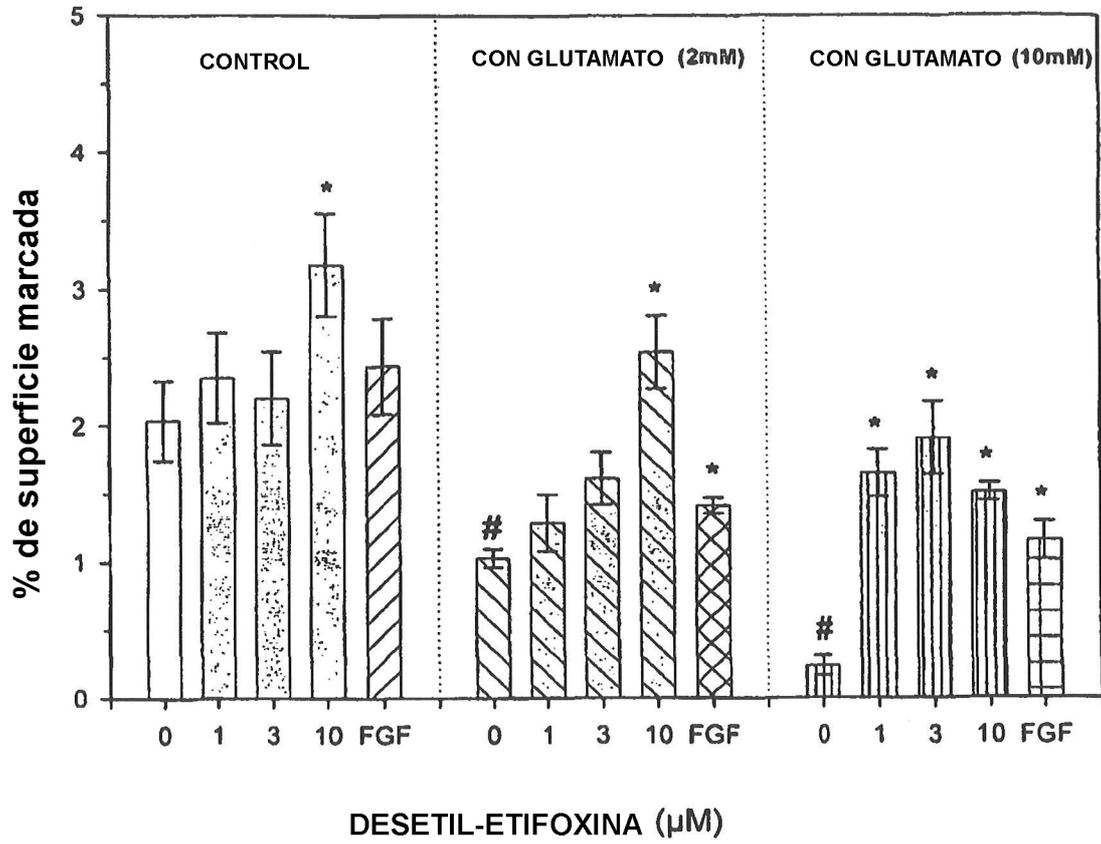
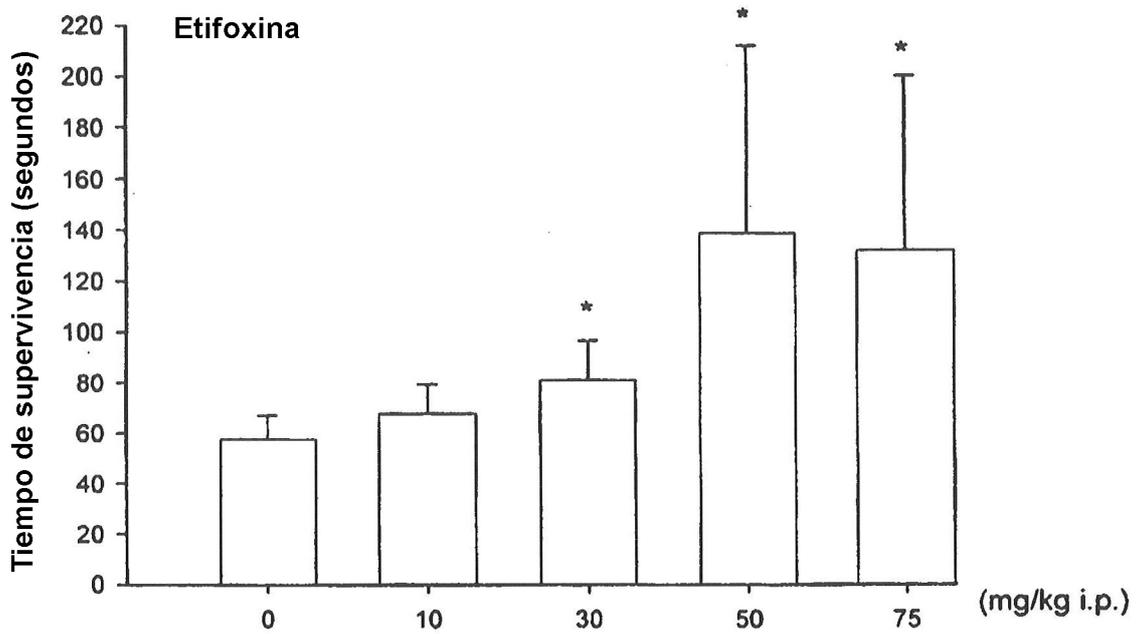
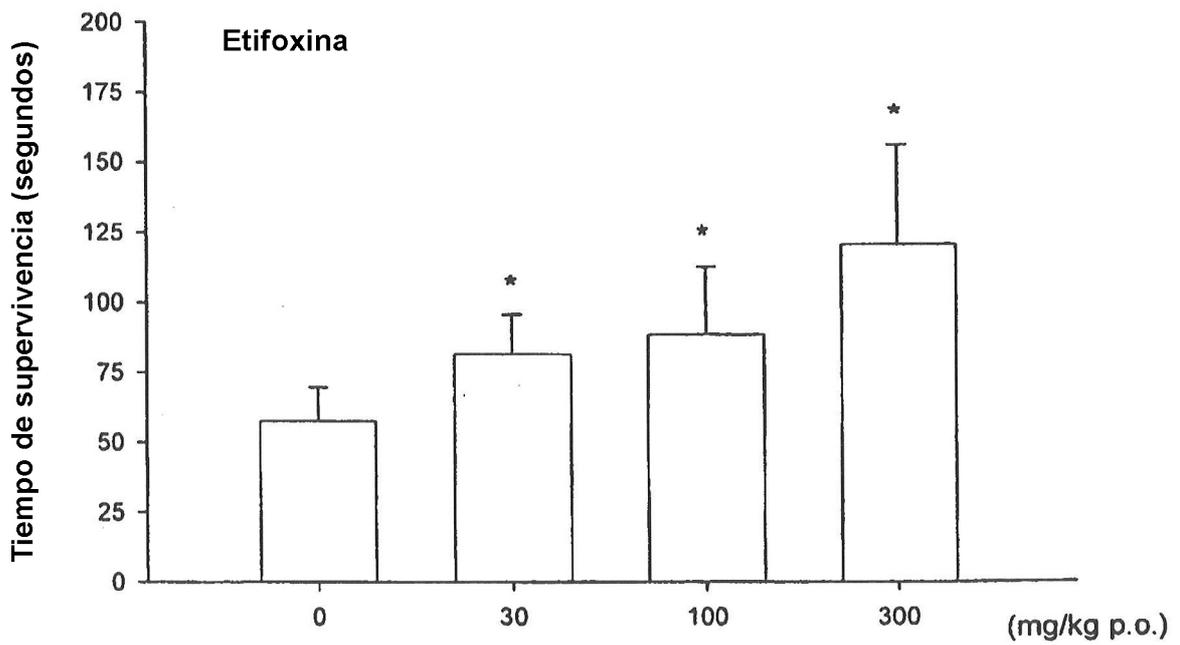


Figura 3



**Figura 4A**



**Figura 4B**

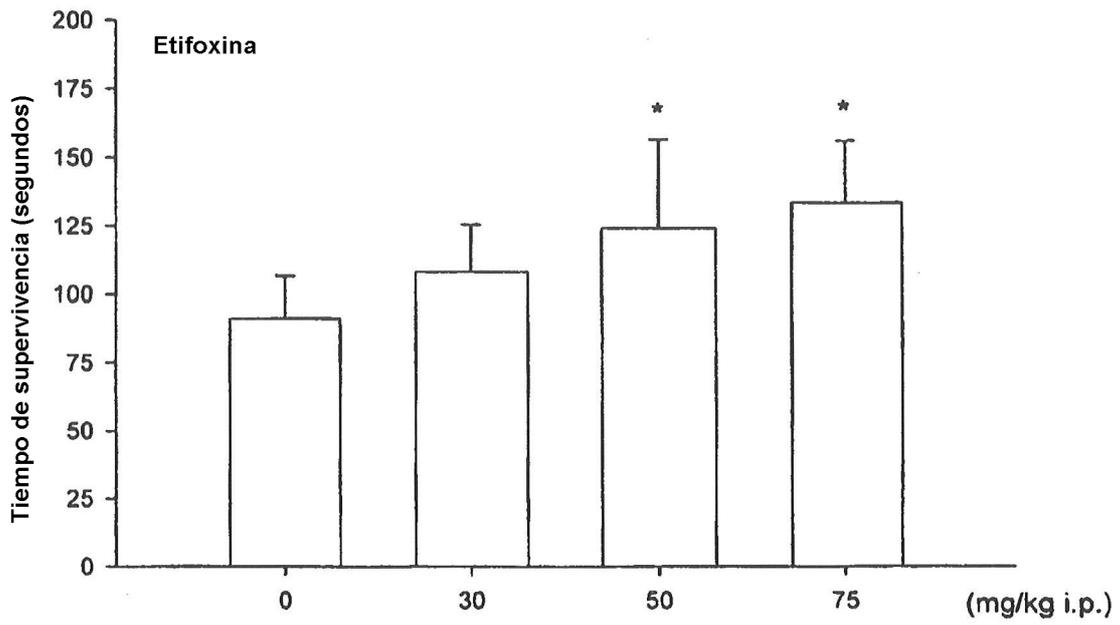


Figura 5A

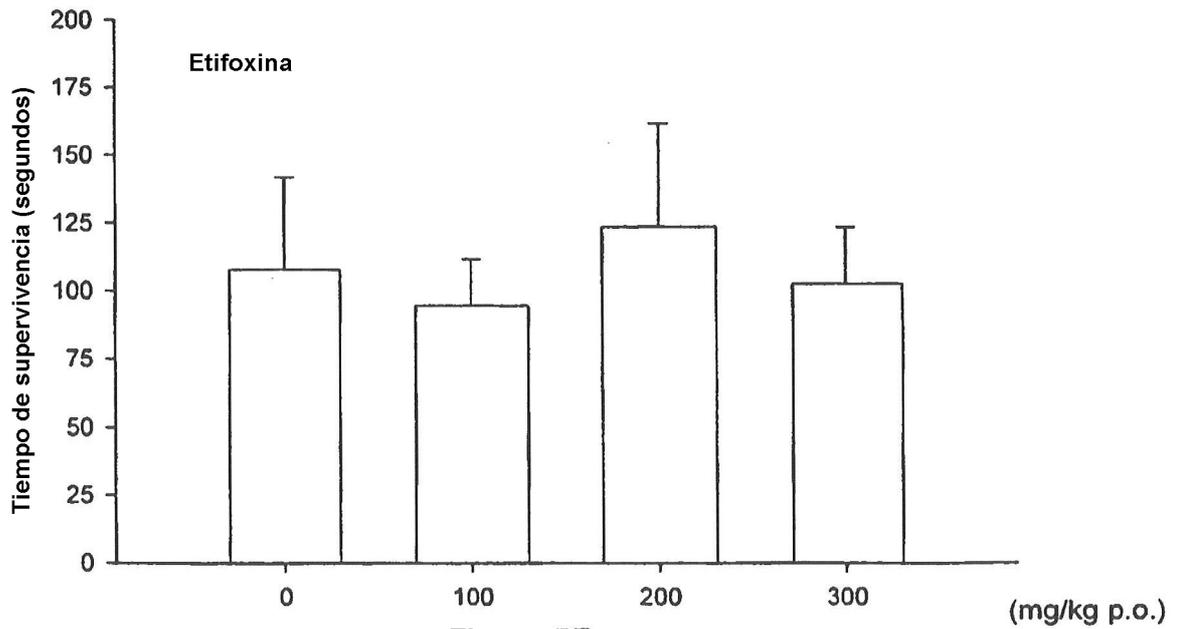


Figura 5B

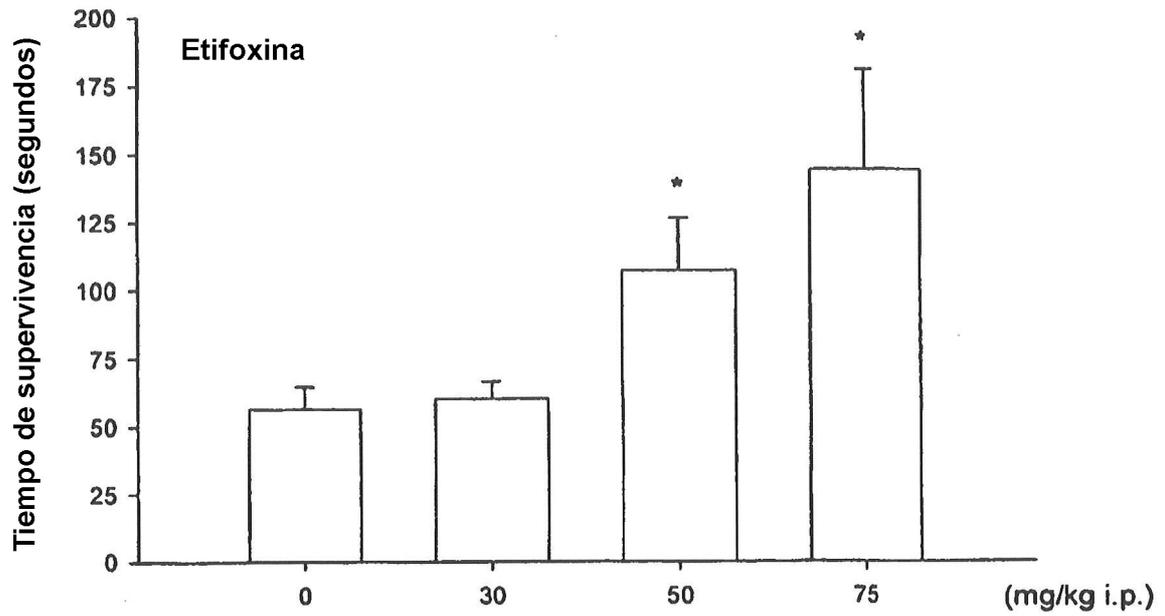


Figura 6A

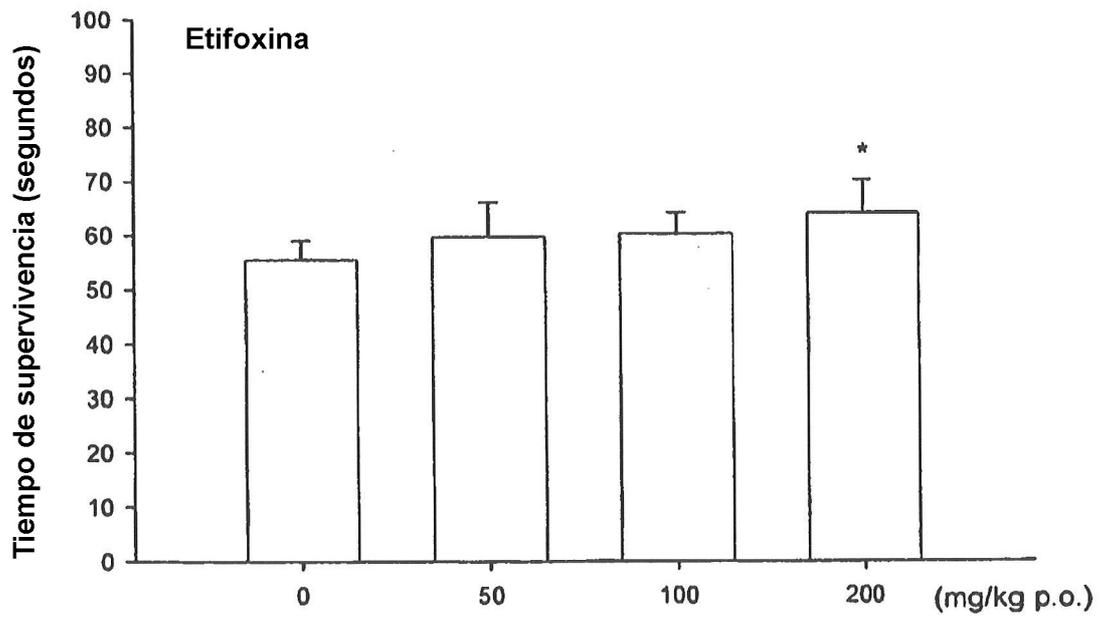
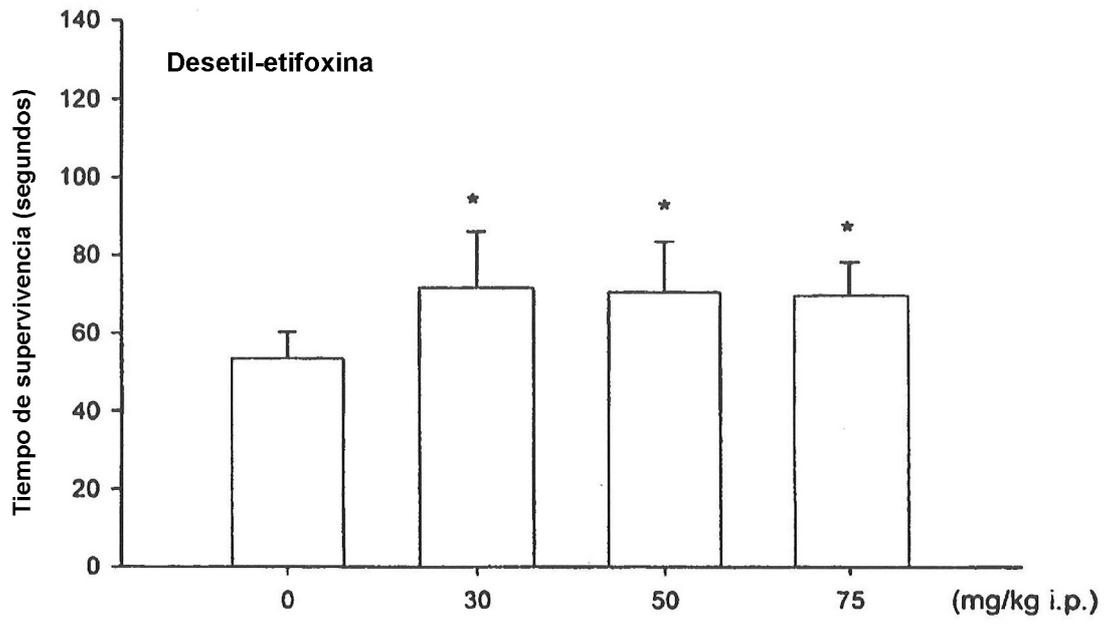
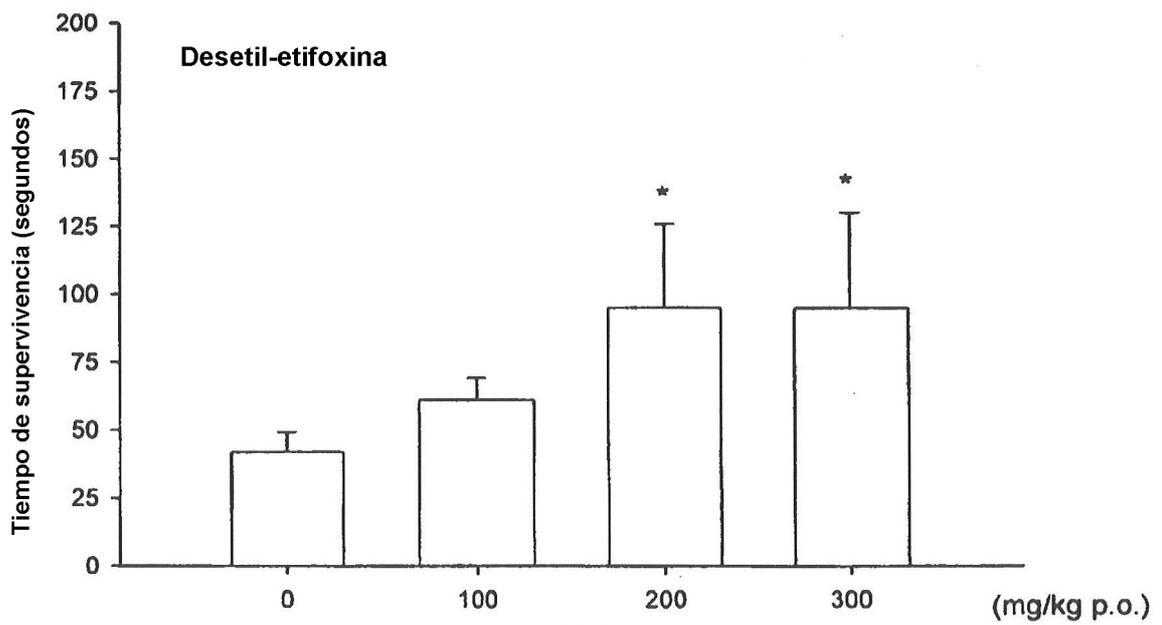


Figura 6B



**Figura 7A**



**Figura 7B**

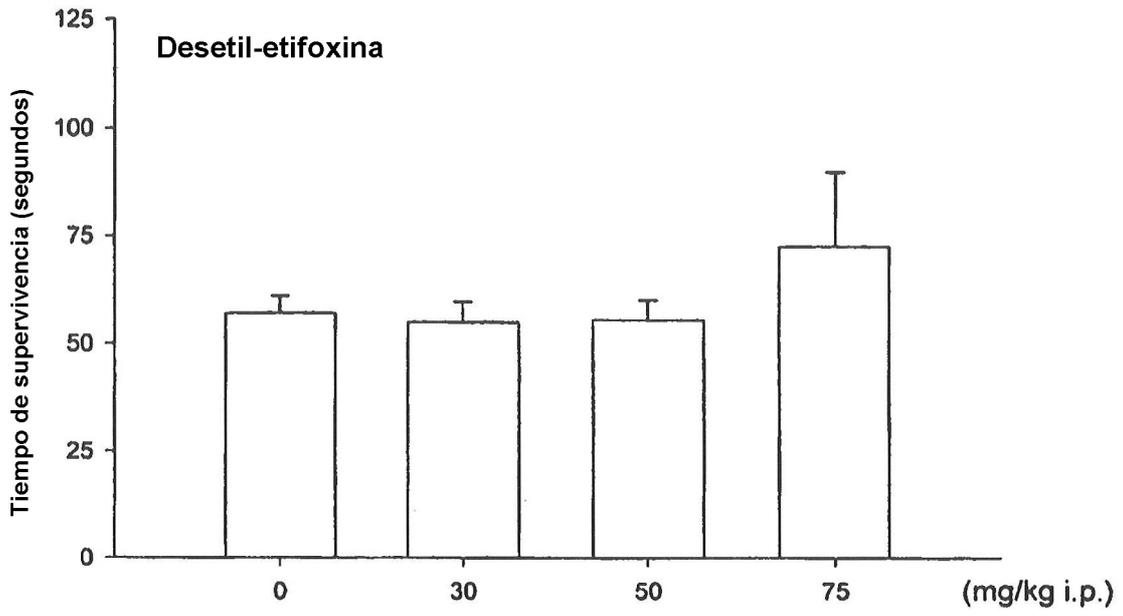


Figura 8A

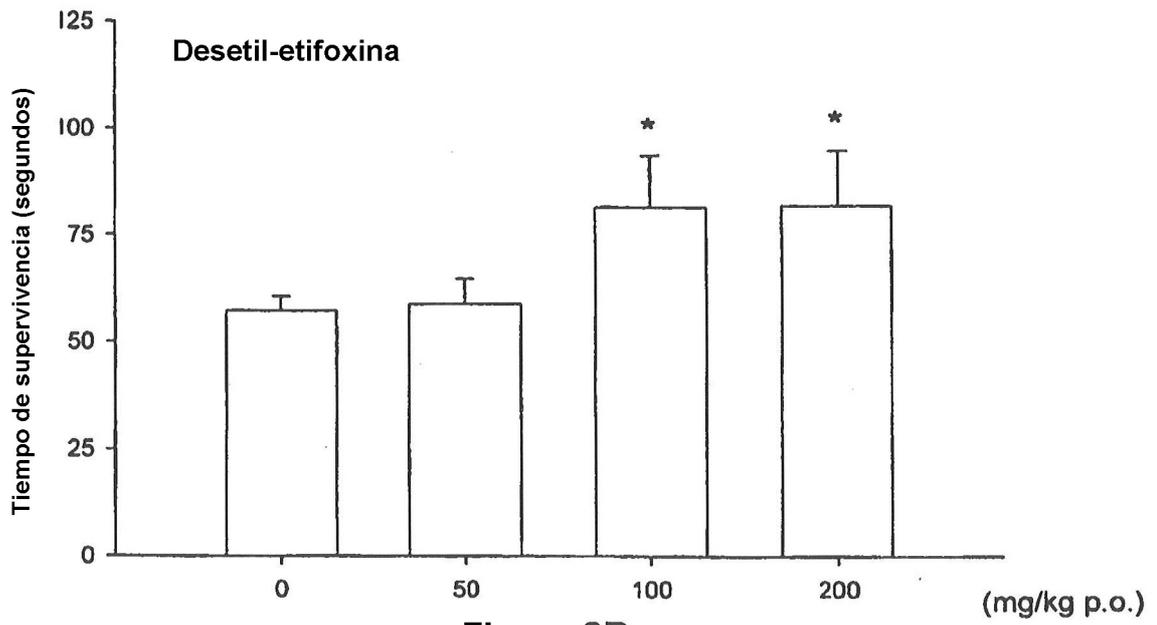


Figura 8B

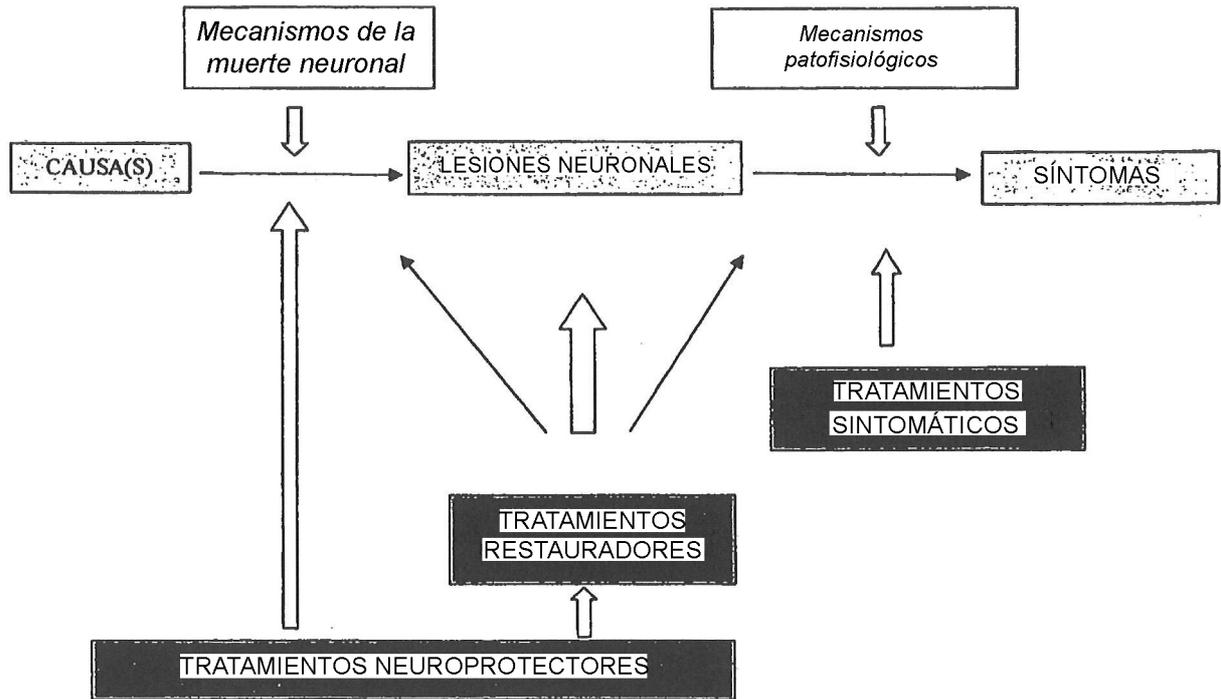


Figura 9