

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 521 666**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/343** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)  
**A61P 25/22** (2006.01)  
**A61P 25/24** (2006.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2007 E 07827450 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014 EP 2101748**

54 Título: **Uso de incensol y de derivados del mismo para neuroprotección y para el tratamiento de la depresión y la ansiedad**

30 Prioridad:

**29.11.2006 US 861441 P**  
**16.08.2007 US 956276 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.11.2014**

73 Titular/es:

**YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM, LTD. (50.0%)**  
**Hi Tech Park Edmond Safra Campus Givat Ram Jerusalem 91390, IL y ARIEL-UNIVERSITY RESEARCH AND DEVELOPMENT COMPANY LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MOUSSAIEFF, ARIK;**  
**MECHOULAM, RAPHAEL;**  
**FRIDE, ESTHER;**  
**SHOHAMI, ESTHER;**  
**BEN NERIAH, YINON y GALLILY, RUTH**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 521 666 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

Uso de incensol y de derivados del mismo para neuroprotección y para el tratamiento de la depresión y la ansiedad

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a usos del incensol, del acetato de incensol, de sus derivados, y a composiciones farmacéuticas que los comprenden, para el tratamiento de varias enfermedades o afecciones.

### Antecedentes de la invención

10 Las especies de *Boswellia* (*Burseraceae*) son originarias de África oriental, donde su resina ("*frankincense*" "*olibanum*") se ha usado ampliamente como incienso y para varios fines médicos. Por ejemplo, estas especies son conocidas como agentes diuréticos, para el tratamiento de varias enfermedades tales como esquistosomiasis, dolor de estómago, sífilis y reumatismo (Watt, 1962). Se averiguó que la resina de *Boswellia* es útil para el tratamiento de inflamaciones (Singh & Atal, 1986), así como para varias enfermedades asociadas con afecciones inflamatorias, tales como, por ejemplo, la enfermedad de Crohn activa y el asma (Gerhardt y col., 2001; Gupta, 1998). Previamente se había informado de que las propiedades antiinflamatorias de la resina de *Boswellia* pueden atribuirse al ácido boswélico y sus derivados (Ammon y col., 1993).

15 El uso de la resina de *Boswellia* por sus propiedades psicoactivas se extiende más allá del oriente próximo y Europa. En el Ayurveda, la tradición médica India, se informa de que la resina de *Boswellia* tiene una fuerte acción sobre el sistema nervioso. En Etiopía, de donde son autóctonos los árboles de *Boswellia*, se cree que tiene un efecto tranquilizante.

20 El aislamiento del IA (acetato de incensol) y su elucidación estructural los describieron en primer lugar Corsano y Nicoletti (Corsano & Nicoletti, 1967). En 2006 se publicó el aislamiento y la investigación de varios constituyentes que incluyen el incensol de la resina de *Boswellia*, así como su potencial antiinflamatorio (Banno y col., 2006, *Journal of Ethnopharmacology* 107, 249 - 253). La Patente de EE.UU. N° 5064823 desvela compuestos triterpenoides pentacíclicos tales como el ácido  $\alpha$  boswélico y su acetato, que tienen un efecto inhibitorio sobre la topoisomerasa I y la topoisomerasa II.

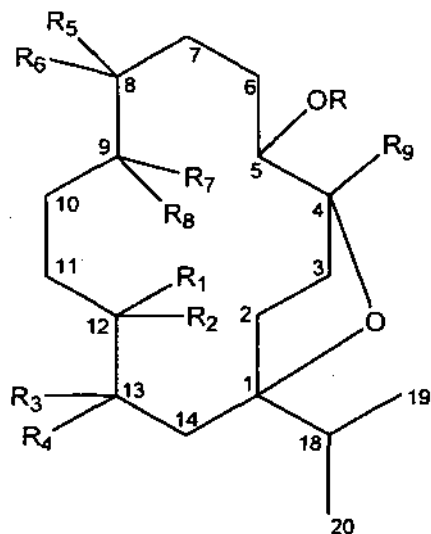
25 El documento WO 02/053138 desvela el uso de incensol y/o furanogermacrenos, derivados, metabolitos y análogos de los mismos, para la inhibición selectiva de células neoplásicas, por ejemplo, para el tratamiento, la inhibición o la prevención de lesiones precancerosas, de tumores, de crecimiento tumoral o de otras neoplasias en mamíferos.

30 El NF- $\kappa$ B (factor nuclear  $\kappa$ B) es el nombre colectivo de un grupo de factores de transcripción diméricos inducibles. El NF- $\kappa$ B se encuentra esencialmente en todos los tipos celulares y está implicado en la activación de un gran número de genes en respuesta a varias situaciones estresantes, por ejemplo, infección e inflamación. La localización subcelular del NF- $\kappa$ B está controlada por una familia de proteínas inhibidoras, las I $\kappa$ B, que se unen al NF- $\kappa$ B y enmascaran su señal de localización nuclear, evitando así su translocación nuclear. La exposición de las células a varios estímulos extracelulares da lugar a una rápida fosforilación, ubiquitinación, y finalmente, degradación proteolítica de la I $\kappa$ B, que libera al NF- $\kappa$ B para que se transloque al núcleo, donde regula la transcripción génica (Karin y Ben-Neriah, 2000). La fosforilación de la I $\kappa$ B, seguida de su degradación, se considera la principal etapa en la regulación del NF- $\kappa$ B (Ghosh & Karin, 2002).

40 El traumatismo craneoencefálico (TCE) está a menudo asociado con trastornos cognitivos permanentes, discapacidades de aprendizaje y varios problemas de comportamiento y emocionales. A pesar de los prometedores datos preclínicos, la mayoría de los ensayos clínicos realizados hasta ahora no han conseguido demostrar ninguna mejora significativa en los resultados, debido principalmente a las ineficaces terapias o debido a la elección de unos mecanismos objetivo inapropiados (Marmarou y col, 2005, Narayan y col, 2002). Un daño cerebral secundario, desencadenado por un impacto inicial, se desarrolla después de unas horas, semanas e incluso meses después del traumatismo. El daño cerebral secundario puede aumentar la mortalidad y empeorar la incapacidad, pero al contrario que la lesión primaria, puede ser potencialmente atenuado mediante el tratamiento adecuado. El TCE induce una activación neuronal en fase temprana del NF- $\kappa$ B, seguido de su notablemente prolongada activación (Beni y col, 2004) de hasta incluso 1 año (Nonaka, 1999). Algunos estudios sobre el papel del NF- $\kappa$ B en el cerebro después de un traumatismo craneoencefálico cerrado (TCEC) en ratones han revelado que la inhibición de la activación aguda del NF- $\kappa$ B está asociada con una mejora en la recuperación funcional (Beni y col, 2004).

### Sumario de la invención

50 La invención se refiere a un compuesto que tiene la fórmula estructural I, incluyendo enantiómeros, diastereómeros, solvatos, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos:



[I]

en la que,

**R** es seleccionado de entre H, -C(=O)R' y -C(=O)OR'', en los que R' es alquilo C<sub>1-25</sub> y R'' es H o alquilo C<sub>1-25</sub>;

**R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub>** son seleccionados independientemente de entre H, OH y CH<sub>3</sub>;

**R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub>** son seleccionados independientemente H y OH;

**R<sub>9</sub>** es H o CH<sub>3</sub>; o

uno de **R<sub>1</sub>** y **R<sub>2</sub>** y uno de **R<sub>3</sub>** y **R<sub>4</sub>** tomados conjuntamente forman (i) un segundo enlace entre C<sub>12</sub> y C<sub>13</sub> o (ii) un anillo epóxido, junto con el carbono al que están unidos; y/o

uno de **R<sub>5</sub>** y **R<sub>6</sub>** y uno de **R<sub>7</sub>** y **R<sub>8</sub>** tomados conjuntamente forman (iii) un segundo enlace entre C<sub>8</sub> y C<sub>9</sub> o (iv) un anillo epóxido, junto con el carbono al que están unidos; y/o

uno de **R<sub>5</sub>** y **R<sub>6</sub>** junto con R forma un enlace sencillo, formando así un anillo epóxido junto con el carbono al que están unidos,

para su uso en la neuroprotección. Además, la invención se refiere a un compuesto que tiene la fórmula estructural I para su uso en el tratamiento, la prevención o la mejora de una enfermedad o de una afección seleccionada de entre depresión, ansiedad, comportamientos obsesivo compulsivos, deterioro en la función cognitiva y deterioro en la función neuroconductual.

La invención también se refiere a un agonista del TRPV3 que tiene la fórmula estructural I para su uso en el tratamiento de una enfermedad o de una afección seleccionada de entre trastornos del estado de ánimo, ansiedad, y una combinación de las mismas.

### Breve descripción de los dibujos

Con objeto de comprender la invención y ver cómo puede realizarse en la práctica, ahora se describirán las formas de realización mediante un único ejemplo no limitante, con referencia a los dibujos anexos, en los que:

**Figura 1: muestra que el IA (acetato de incensol) y el IN (incensol) inhiben la degradación de la IκBα de una forma dependiente de la dosis.** Se preincubaron células HeLa con IA (Fig. 1A) o con IN (Fig. 1B) a las concentraciones indicadas durante 2 h antes de una exposición de 20 minutos a TNFα (20 ng/ml). Se repitieron al menos tres experimentos más con la dosis más alta indicada, resultando de forma similar.

**Figura 2: muestra que el IA dificulta la fosforilación de la IKK cascada arriba de la IKK, inhibiendo así la degradación de la IκBα y la acumulación del NF-κB en los núcleos de las células.** (A) El IA inhibe la fosforilación de la IKK. Las células HeLa se estimularon con TNFα (20 ng/ml durante 20 minutos) en ausencia o en presencia de IA (140 μM) como se muestra. Se prepararon extractos celulares completos y se analizaron para comprobar la fosforilación de la IKKα y de la IKKβ mediante una inmunotransferencia Western (WB). (B) Las células HeLa se estimularon con TNFα (20 ng/ml durante 20 minutos) en ausencia o en presencia de IA (140 μM). Las células se fijaron y después se tiñeron con anti-p65 de conejo, seguido de Ab secundario anti-conejo marcado con rojo de rodamina, y con DAPI para la localización de los núcleos (no mostrado). (B1) células HeLa, sin tratamiento; (B2) células HeLa + IA; (B3) células HeLa + TNF; (B4) células HeLa + IA + TNF. Las células se examinaron bajo un microscopio Axioscope Zeiss con una lente plan-Neofluor \* 60. Se muestran los resultados de uno de los tres experimentos independientes.

**Figura 3: muestra la actividad del IA sobre los niveles de los mediadores inflamatorios. (A(1))** Se muestran bandas representativas de la inmunotransferencia Western de la Cox2 con la tubulina como referencia. **(A(2))** se midieron los niveles de la COX-2 en células RAW 264.7 incubadas durante 24 h con LPS en presencia o en ausencia de IA (60 µM/ml); \*\*, p < 0,001. **(B)** Los macrófagos peritoneales murinos fueron activados por los LPS (1 µg/ml durante 24 h) en ausencia de IA o en presencia de IA a las concentraciones indicadas. La generación de NO se determinó mediante la medición del nitrito acumulado en los sobrenadantes; \*\*, p < 0,001. **(C)** La generación de ROS por parte de macrófagos RAW 264.7 (5 x 10<sup>5</sup> células en 0,5 ml de disolución salina equilibrada de Hank) se midió mediante quimioluminiscencia. Las células se preincubaron con varias dosis de IA durante 24 h antes de la adición de luminol (10 µl) y zymosan (30 µl) a los tubos; \*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001

**Figura 4: muestra que el IA inhibió la inflamación en el modelo de pata inflamada después de la inyección de carragenina.** Se inyectó IA (50 mg/kg) o vehículo i.p. a ratones Sabra hembra (5 por grupo) 30 min antes de la inducción del estímulo inflamatorio. Entonces se inyectaron en las patas traseras 50 µl de disolución salina o de λ-carragenina (4 %). El consiguiente hinchamiento inflamatorio se midió mediante el aumento en el volumen de la pata con un pletismómetro. El IA también reduce el enrojecimiento de la pata (como medida del eritema) y los lamidos (como medida del dolor) (datos no mostrados). Había unos efectos muy significativos del tratamiento (F = 11,7, df = 3,64, P < 0,001). \*, diferentes a los de IA + disolución salina, P < 0,05; \*\*, \*\*\*, diferentes a los de vehículo + disolución salina a un P < 0,01, P < 0,001 respectivamente; #, diferentes a los de vehículo + carragenina, P < 0,05.

**Figura 5: muestra el efecto beneficioso del IA (50 mg/kg) sobre la recuperación neuroconductual y la función cognitiva después de un traumatismo craneoencefálico cerrado (TCEC).** **(A)** Se evaluó la función motora 1 h después del TCEC y hasta los 21 días, y se expresó como ΔNSS (Ejemplo 5). Los valores de ΔNSS eran significativamente mayores en los ratones tratados con IA (barras oscuras) en comparación con los tratados con vehículo (barras claras). Este efecto era sostenido desde las 24 h hasta los 21 días posteriores a la lesión, según se determina mediante la prueba de Mann-Whitney (n = 9 - 10 por grupo; \* p < 0,01; \*\*pH 0,001, en comparación con los tratados con vehículo, el mismo día). **(B)** Los ratones se sometieron a la prueba de reconocimiento de objetos (Ejemplo 6) 3, 7, 14 y 21 días después del TCEC. Se registró el tiempo absoluto invertido en la exploración de cada uno de los dos objetos y se calculó el % de tiempo. En la situación inicial (bl), cuando se les presentaban dos objetos idénticos, el tiempo de exploración de cada objeto era de aproximadamente el 50 % en ambos grupos. En la situación de ensayo (T), después de haber sustituido uno de los sujetos por uno nuevo, se calculó el % de tiempo invertido en la exploración del nuevo objeto. Los ratones con IA invirtieron un porcentaje significativamente mayor de su tiempo de exploración junto al nuevo objeto (\*p ≤ 0,01; \*\*p < 0,001 en comparación con las mediciones de la situación inicial el mismo día) mientras que los ratones tratados con vehículo mostraron graves carencias en esta prueba y no pudieron distinguir entre los dos objetos (n = 3 - 5 / grupo).

**Figura 6: muestra que el IA (50 mg/kg) inhibe la expresión del ARNm de la IL-1β y del TNFα después de un traumatismo craneoencefálico cerrado.** Se cuantificaron los niveles del ARNm de la IL-1β y del TNFα 3 horas después de la lesión mediante una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Se usó actina β como control endógeno. \*p < 0,05 frente a vehículo, determinado mediante pruebas de la t de Student.

**Figura 7: muestra que el IA ejerce un potente efecto dependiente de la dosis en la prueba del laberinto en cruz, lo que indica un efecto ansiolítico.** Se inyectaron intraperitonealmente ratones (hembras de la raza Sabra, con 3,5 - 4,5 meses de edad) 10, 30 o 50 mg/kg de acetato de incensol o con vehículo. Cada dosis se administró a 5 ratones. Cuarenta y cinco minutos después de la inyección los ratones fueron probados en el laberinto en cruz para comprobar los efectos 'ansiolíticos'. Se inyectó diazepam (5 mg/kg) a un grupo independiente de ratones como control positivo. El Anova monofactorial indicó unos efectos significativos (F = 4,2, df = 4,32, P < 0,01). Los datos se presentan como las medias ± EEM. \*, P < 0,05; \*\*, P < 0,01 en comparación con el vehículo.

**Figura 8: muestra que el IA ejerce un potente efecto antidepresivo dependiente de la dosis en la prueba de natación forzada de Porsolt, lo que indica un efecto antidepresivo.** Se inyectaron intraperitonealmente ratones (hembras de la raza Sabra, con 3,5 - 4,5 meses de edad) 10, 30 o 50 mg/kg de acetato de incensol o con vehículo. Cada dosis se administró a 5 ratones. Cincuenta minutos después de la inyección los ratones fueron probados en la prueba de natación forzada de para comprobar los efectos 'antidepresivos'. Se inyectó desipramina (5 mg/kg) a un grupo independiente de ratones como control positivo. El Anova monofactorial indicó unos efectos significativos (F = 8,9, df = 4,27, P < 0,01). Los datos se presentan como las medias ± EEM. DMI = desipramina. \*, P < 0,05; \*\*, P < 0,01; \*\*\*, P < 0,001 en comparación con el vehículo.

**Figura 9: muestra que el IA modula la expresión del c-Fos en varias áreas cerebrales.** El diagrama (Fig. 9A) ilustra las áreas cerebrales de los ratones Sabra hembra (15 - 20 semanas; n = 4 - 5) en los que el IA (50 mg/kg) modificó significativamente el número de células inmunorreactivas a c-Fos, 60 min después de la inyección i.p. de IA o de vehículo. Los dibujos se modificaron a partir de las láminas 30, 38, 45, 89 respectivamente de Paxinos y Franklin (2001). Las secciones del atlas están dispuestas desde anterior a hacia posterior d. El número debajo de cada sección indica su distancia (mm) desde el sincipucio. "A" es anterior al

sincipucio y "P" es posterior al sincipucio. El IA aumentó significativamente el c-Fos en el septo lateral (LS), el núcleo central de la amígdala (CEA) y el complejo solitario (Sol). El IA redujo significativamente el c-Fos en la corteza motora (MCTX), y el cuerpo estriado medio (MSt) y en la región del hipocampo CA3 (CA3). La **Fig. 9B** muestra unas micrografías representativas, y la **Fig. 9C** (Tabla 1) la cuantificación.

5 **Figura 10: muestra que el IA presenta un efecto de tipo antidepresivo en la prueba de natación forzada de Porsolt y un efecto ansiolítico en el laberinto en cruz elevado en los ratones naturales, pero no en los TRPV3<sup>-/-</sup>.** Se inyectaron ratones naturales y TRPV3<sup>-/-</sup> (de 18 - 20 semanas de edad) con vehículo (isopropanol:emulphor:disolución salina =1:1:18) o con IA (75 mg/kg). 30 min

10 **Figura 10: muestra que el IA presenta un efecto de tipo antidepresivo en la prueba de natación forzada de Porsolt y un efecto ansiolítico en el laberinto en cruz elevado en los ratones naturales, pero no en los TRPV3<sup>-/-</sup>.** Se inyectaron ratones naturales y TRPV3<sup>-/-</sup> (de 18 - 20 semanas de edad) con vehículo (isopropanol:emulphor:disolución salina =1:1:18) o con IA (75 mg/kg). 30 min después se probaron en a, el laberinto en cruz más elevado (5 min), seguido de b, 9 min de exposición a la prueba de natación forzada de Porsolt. En la prueba del laberinto en cruz elevado, el IA provocó que los ratones naturales (WT) invirtieran significativamente más tiempo en los aversivos brazos abiertos del laberinto (con respecto al tiempo total invertido en ambos brazos). En la prueba de natación forzada de Porsolt, la inmovilidad fue significativamente reducida por el IA en los ratones naturales, mientras que los ratones con la TRPV3 inactivada (KO) no respondieron al IA. No se apreció ninguna diferencia entre los ratones naturales y los de la TRPV3 inactivada en la respuesta al vehículo. Los datos se presentan como las medias  $\pm$  EEM;  $n = 4 - 5$ . \*  $p < 0,05$ , en comparación con los ratones naturales a los que se les inyectó vehículo (prueba de Bonferroni *a posteriori*). \*\*  $p < 0,01$ , en comparación con los ratones naturales a los que se les inyectó vehículo (prueba de Bonferroni *a posteriori*).

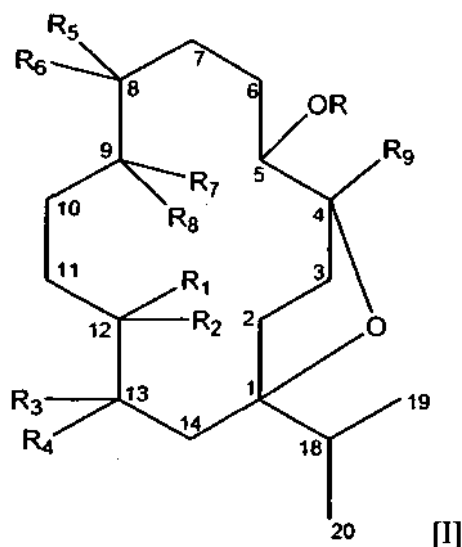
25 **Figura 12: muestra que el IA es un potente activador del TRPV3 (agonista).** a, el IA o el 2-APB provocaron una fuerte liberación de calcio en las células HEK293 transfectadas con TRPV3-YFP de los ratones en comparación con el vehículo, #,  $p < 0,001$  ( $n = 9$ ). Las células HEK293- TRPV3(+) tratadas con IA muestran una activación significativamente mayor que las células HEK293-pADNc, \*  $p < 0,001$  ( $n = 9$ ). b, el IA indujo un influjo de calcio dependiente de la dosis en las células HEK293 transfectadas con TRPV3-YFP en presencia de calcio en el medio extracelular, O,  $CE_{50} = 16 \mu M$ , pendiente de Hill = 2,2, ( $n = 10$ ). En ausencia de calcio, □, el efecto del IA se redujo notablemente, #,  $p < 0,05$  ( $n = 5$ ). c, el IA (500  $\mu M$ ) aumentó los niveles de calcio intracelular en los queratinocitos primarios de los ratones TRPV3<sup>+/+</sup> pero no en los TRPV3<sup>-/-</sup>. El alcanfor (10 mM) mostró un efecto similar. \*, #,  $p < 0,005$  ( $n = 6$ ), prueba de la *t* (bilateral). d, una célula individual representativa aumentó fuertemente el calcio en estas células. #,  $p < 0,001$  ( $n = 41 - 51$ ). g, el IA indujo un influjo de calcio muy discreto en las ratas HEK293 transfectadas con TRPV4 en comparación con el vehículo, #,  $p < 0,001$  ( $n = 26$ ). El 4 $\alpha$ PDD indujo un fuerte aumento del calcio que era significativamente mayor que el efecto del IA, \*,  $p < 0,001$  ( $n = 26$ ). Todas las barras de error indican el EEM; los valores de *p* en todas las subfiguras excepto en c representan el análisis con una ANOVA monofactorial *a posteriori* de Bonferroni.

35 **Figura 13: muestra que el IA activa una corriente de TRPV3 cuando es expresada de forma estable en células HEK293.** a, el transcurso temporal de la muestra indica la suma de las cargas de corriente activadas (desde -85 hasta -45 mV, en pC) con la aplicación de IA (200  $\mu M$ ). b, respuesta de la muestra a la corriente frente a un ascenso de voltaje para la misma célula que en a. c, la respuesta a la dosis para el IA muestra la activación de corrientes a 200  $\mu M$  en las células HEK293 TRPV3(+) (■), pero no en los controles TRPV3(-) (▲); \*,  $p < 0,001$  ANOVA monofactorial con un Dunnett *a posteriori* frente a TRPV3(-). d, el agonista de TRPV 2-APB (100  $\mu M$ ) activa corrientes en células TRPV3(+) pero no en células TRPV3(-); \*\*,  $p < 0,001$ , prueba de la *t* de Student bifactorial de datos desapareados. e, el IA (200  $\mu M$ ) no activa corrientes en las células TRPV1(+), en las células TRPV4(+), ni lo hace el vehículo en las células TRPV3(+). La respuesta de TRPV3(+) frente al IA se muestra como referencia. \*,  $p < 0,001$ . Las barras de error representan el EEM,  $n = 4 - 5$ .

### **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se basa en el hallazgo de que el incensol (IN) y el acetato de incensol (IA), poseen varias actividades farmacológicas que no eran previamente atribuidas a los compuestos aislados *per se*.

50 En el primer aspecto de la invención, se proporciona un compuesto que tiene la fórmula estructural I, incluyendo enantiómeros, diastereómeros, solvatos, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos:



en la que,

**R** es seleccionado de entre H, -C(=O)R' y -C(=O)OR'', en los que R' es alquilo C<sub>1-25</sub> y R'' es H o alquilo C<sub>1-25</sub>;

**R<sub>1</sub>**, **R<sub>2</sub>**, **R<sub>5</sub>** y **R<sub>6</sub>** son seleccionados independientemente de entre H, OH y CH<sub>3</sub>;

**R<sub>3</sub>**, **R<sub>4</sub>**, **R<sub>7</sub>** y **R<sub>8</sub>** son seleccionados independientemente H y OH;

**R<sub>9</sub>** es H o CH<sub>3</sub>; o

uno de **R<sub>1</sub>** y **R<sub>2</sub>** y uno de **R<sub>3</sub>** y **R<sub>4</sub>** tomados conjuntamente forman (i) un segundo enlace entre C<sub>12</sub> y C<sub>13</sub> o (ii) un anillo epóxido, junto con el carbono al que están unidos; y/o

uno de **R<sub>5</sub>** y **R<sub>6</sub>** y uno de **R<sub>7</sub>** y **R<sub>8</sub>** tomados conjuntamente forman (iii) un segundo enlace entre C<sub>8</sub> y C<sub>9</sub> o (iv) un anillo epóxido, junto con el carbono al que están unidos; y/o

uno de **R<sub>5</sub>** y **R<sub>6</sub>** **junto** con R forma un enlace sencillo, formando así un anillo epóxido junto con el carbono al que están unidos,

para su uso en la neuroprotección.

Por el término "uno de **R<sub>1</sub>** y **R<sub>2</sub>** y uno de **R<sub>3</sub>** y **R<sub>4</sub>** tomados conjuntamente forman un segundo enlace entre C<sub>12</sub> y C<sub>13</sub>" se entiende que el enlace formado **entre** C<sub>12</sub> y C<sub>13</sub> es un enlace π, por lo que el enlace entre C<sub>12</sub> y C<sub>13</sub> es un doble enlace.

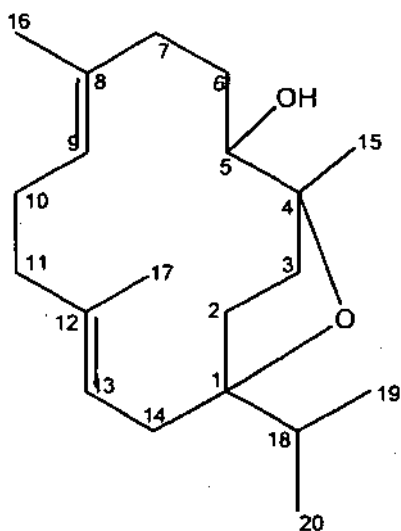
De forma análoga por el término "uno de **R<sub>5</sub>** y **R<sub>6</sub>** y uno de **R<sub>7</sub>** y **R<sub>8</sub>** tomados conjuntamente forman (iii) un segundo enlace entre C<sub>8</sub> y C<sub>9</sub>" se entiende que el enlace formado entre C<sub>8</sub> y C<sub>9</sub> es un enlace π, por lo que el enlace entre C<sub>8</sub> y C<sub>9</sub> es un doble enlace.

Se aprecia que las conformaciones del doble enlace también están en el ámbito de la presente invención.

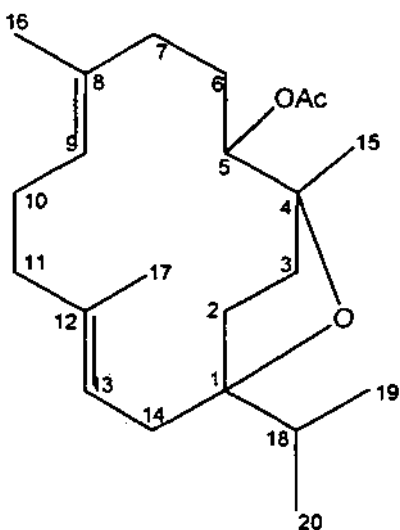
Según se usa en el presente documento el término "**alquilo C<sub>1-25</sub>**" se refiere a un hidrocarburo alifático saturado de entre 1 y 25 átomos de carbono. El alquilo C<sub>1-25</sub> puede ser un alquilo lineal o ramificado.

Siempre que se establezca un intervalo numérico, por ejemplo, "1 - 25" en el presente documento, significa que el grupo, en este caso el grupo alquilo, puede contener 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, etc., hasta, e incluyendo, 25 átomos de carbono.

De acuerdo con una forma de realización de la presente invención, el compuesto es incensol o acetato de incensol. Las estructuras de estos compuestos se muestran a continuación.



[incensol]



[acetato de incensol] Ac = -C(=O)CH<sub>3</sub>

- 5 El término **"tratamiento, prevención o mejora"** en relación con el aspecto de la enfermedad inflamatoria, concierne a la mejora de al menos una manifestación indeseada de la enfermedad, tal como: un aumento en los periodos exentos de enfermedad, una disminución en los periodos agudos de enfermedad (en tiempo y gravedad), una disminución en la gravedad de la enfermedad, una mejora la calidad de vida, una disminución de la mortalidad así como el tratamiento profiláctico antes de que aparezca la enfermedad.
- 10 Según se usa en el presente documento, el término **"medicamento"** se refiere a una composición farmacéutica. Específicamente, se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula estructural I descrito en la presente invención en cualquier portador farmacéutico aceptable adecuado (por ejemplo, un excipiente o un diluyente), y también a las diferentes formulaciones requeridas para las diferentes vías de administración. Por ejemplo, el medicamento puede formularse para su administración oral, o puede formularse para su administración parenteral, rectal o para otras vías.
- 15

Los principios activos de una composición farmacéutica según se desvela en el presente documento pueden incluir al menos un compuesto de fórmula I, es decir como un único compuesto, o dos o más compuestos.

- 20 Por el término **"que consiste esencialmente en"** en relación con una composición farmacéutica se entiende que el principio activo incluye uno o más compuestos de fórmula I como se ha definido anteriormente y está sustancialmente exento de otros compuestos activos. Por el término **"sustancialmente exento de otros compuestos activos"** se entiende que el principio activo incluye al menos un 70 % p/p de un compuesto de fórmula I, más preferiblemente al menos un 80 % p/p, más preferiblemente al menos un 90 % p/p, incluso más

preferiblemente al menos un 95 % p/p de un compuesto de fórmula I. El principio activo puede incluir al menos una de las concentraciones indicadas anteriormente del compuesto de fórmula I y hasta un 99,9 % p/p del compuesto de fórmula I. El principio activo puede incluir también al menos una de las concentraciones indicadas anteriormente y hasta un 99 % p/p del compuesto de fórmula I.

- 5 Mediante un aspecto adicional más de la invención se proporciona un compuesto que tiene la fórmula estructural I como anteriormente en este documento definido para su uso en la neuroprotección.

En una forma de realización dicha neuroprotección es para el tratamiento, la prevención o la mejora de una enfermedad o una afección resultante de una lesión, un traumatismo o enfermedades neurodegenerativas del SNC.

- 10 El término "**tratamiento, prevención o mejora**" en relación con la neuroprotección según se usa en el presente documento, significa el tratamiento, la prevención o la reversión del empeoramiento cognitivo asociado con la pérdida de concentración, la pérdida de adquisición de memoria y la pérdida del almacenamiento o la recuperación de información incluyendo, pero no se limita a, trastornos neuronales, tales como el empeoramiento cognitivo asociado con el envejecimiento, el deterioro cognitivo y los trastornos neurodegenerativos, tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la ELA, el corea de Huntington, la demencia asociada al VIH, la demencia por cuerpos de Lewy, la esclerosis múltiple y la enfermedad priónica. El término también incluye el tratamiento, la prevención o la reversión de la disfunción neuronal asociada con la pérdida de las capacidades motoras (ataxia), tales como la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica, así como la disfunción neuronal resultante de lesiones del SNC tales como un traumatismo craneal, una apoplejía, una lesión de la médula espinal y una lesión de los nervios periféricos.

- 20 Según se usa en el presente documento el término "**enfermedad neurodegenerativa**" se refiere ampliamente a trastornos o a enfermedades que afectan al sistema nervioso y que están caracterizadas por una pérdida neuronal gradual y/o una pérdida gradual de la función neuronal, incluyendo, pero no se limitan a, deterioro de la memoria asociada a la edad, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de corea de Huntington, esclerosis múltiple y esclerosis lateral amiotrófica (ELA), demencia asociada al VIH, demencia por cuerpos de Lewy y enfermedad priónica.

En otro de sus aspectos, la presente invención proporciona un compuesto que tiene la fórmula estructural I para su uso en el tratamiento, la prevención o la mejora de una enfermedad o de una afección seleccionada de entre depresión, ansiedad, comportamientos obsesivo compulsivos, deterioro de la función cognitiva, deterioro en la función neuroconductual, y combinaciones de cualquiera de los anteriores.

- 30 El término "**deterioro de la función cognitiva y/o neuroconductual**" se refiere a una disminución en las capacidades de aprendizaje y de memoria, a una disminución en la orientación en el tiempo y en el espacio y a una disminución en la coordinación y en las capacidades de movimiento debidas a la función del SNC. El deterioro puede ser el resultado natural del envejecimiento, pero también puede ser el resultado de una lesión, de un traumatismo (provocado por accidentes, una apoplejía, una cirugía o enfermedades) o de enfermedades del SNC, especialmente de enfermedades neurodegenerativas.

- 40 Los términos "**lesión**" y "**traumatismo**" incluyen una lesión física en el SNC (o en la cabeza) como resultado de una agresión física, una lesión o un daño debido a una apoplejía, una isquemia, una hipoxia, una cirugía o una enfermedad tal como una enfermedad infecciosa del SNC (tal como la demencia asociada con el SIDA) así como una enfermedad neurodegenerativa como, por ejemplo, Alzheimer, Parkinson, corea de Huntington o demencia senil.

- 45 El término "**tratamiento, prevención o mejora de la depresión, la ansiedad o el comportamiento obsesivo compulsivo**" se refiere a la disminución o la eliminación de la gravedad de la afección, la disminución en la duración del episodio, así como el tratamiento preventivo en individuos que tienden a dichas afecciones para evitar o minimizar la aparición de estos episodios no deseados. El término "**tratamiento**" en relación con la depresión concierne a una mejora en al menos una manifestación no deseada de la enfermedad, tal como la anorexia y la bulimia, así como la manifestación de la depresión clínica.

- 50 En la presente invención se demuestra que el acetato de incensol (IA), una resina constituyente de *Boswellia*, es un potente agonista de TRPV3 que provoca un efecto sobre el comportamiento de tipo ansiolítico y de tipo antidepresivo en ratones naturales (WT) con unos cambios concomitantes en la activación del c-Fos en el cerebro. Estos efectos sobre el comportamiento no se apreciaron en los ratones TRPV3<sup>-/-</sup>, lo que sugiere que están mediados a través de los canales de TRPV3. El IA activó fuertemente los canales de TRPV3 expresados de forma estable en células HEK293 y en los queratinocitos de los ratones TRPV3<sup>+/+</sup>. No tuvo ningún efecto sobre los queratinocitos de los ratones TRPV3<sup>-/-</sup> y mostró un efecto leve o ninguno en TRPV1, TRPV2 y TRPV4. Los resultados mostrados a continuación (véase el Ejemplo 15) implican que los canales de TRPV3 del cerebro juegan un papel en la regulación emocional.

- 55 En un aspecto más de la invención, se proporciona un agonista de TRPV3 que tiene la fórmula estructural I para su uso en el tratamiento de una enfermedad o de una afección seleccionada de entre trastornos del estado de ánimo, ansiedad, y una combinación de las mismas.



Según se usa en el presente documento el término "**trastornos del estado de ánimo**" se refiere a una alteración emocional y/o del comportamiento caracterizada por crisis persistentes y frecuentes de euforia y/o depresión. Algunos ejemplos de trastornos del estado de ánimo incluyen depresión y trastornos bipolares (también conocidos como enfermedad maniaco depresiva). La ansiedad está frecuentemente asociada con trastornos del estado de ánimo, tales como la depresión.

Mediante una forma de realización específica, el trastorno afectivo es la depresión.

Dicho agonista de TRPV3 es un compuesto que tiene la fórmula estructural I como se ha definido anteriormente en este documento. En otra forma de realización adicional más, dicho compuesto es incensol o acetato de incensol.

La invención se refiere a un compuesto que tiene la fórmula estructural I para su uso en el tratamiento, la prevención o la mejora de una enfermedad o de una afección seleccionada trastornos del estado de ánimo, ansiedad, y una combinación de las mismas.

### **Compuestos de la invención**

En una forma de realización R' y/o R" de fórmula estructural I son cada uno independientemente alquilo C<sub>1-20</sub>; en una forma de realización adicional alquilo C<sub>1-15</sub>; en una forma de realización adicional más, alquilo C<sub>1-10</sub>; en una forma de realización adicional alquilo C<sub>1-6</sub>; en una forma de realización adicional, alquilo C<sub>1-5</sub>.

En otra forma de realización, el enlace entre los carbonos 8,9 y/o 12,13 es un enlace sencillo. En una forma de realización adicional, los carbonos 8,9 y/o 12,13 forman un anillo epóxido, junto con el carbono al que están unidos. En una forma de realización adicional más, los sustituyentes de los carbonos 8,9 y/o 12,13 están sustituidos para formar un diol. En otra forma de realización, uno o más de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, y R<sub>9</sub> es H.

En una forma de realización de la presente invención, el compuesto es incensol o acetato de incensol.

Los compuestos usados por los procedimientos y usos de la invención pueden ser sintetizados mediante las rutas sintéticas descritas y detalladas en G. STRAPPAGHETTI, G. PROIETTI, S. CORSANO E I. GRGURINA. Synthesis of incensol. BIOORGANIC CHEMISTRY 11, 1 - 3 (1982) y T. Kato, C. C. Yen, T. Kobayashi, Y. Kitahara. Cyclization of polienes XXI. Synthesis of DL-incensol. Chemistry letters 1191 - 1192 (1976). Los derivados de fórmula estructural I pueden ser sintetizados mediante los procedimientos descritos en Fessenden R. J. & Fessenden J. S.; Organic chemistry, 1990, Brooks/Cole Publishing company, California (págs. 257 - 301 (alcoholes), 301 - 323 (éteres y epóxidos), 529 - 591 (aldehídos y cetonas), 591 - 627 (derivados de ácidos carboxílicos), 391 - 448 (dobles enlaces)). Los procedimientos de síntesis también pueden encontrarse en libros de texto generales adicionales, por ejemplo, Morrison R. T. & Boyd R. N.; Organic chemistry, 1992, Pramount communication company, California.

### **Composiciones farmacéuticas, dosis y vías de administración**

Según se usa en el presente documento, una "**composición farmacéutica**" se refiere a una preparación de uno o más compuestos descritos en el presente documento, con otros componentes químicos inertes tales como portadores farmacéuticamente aceptables adecuados. El fin de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un mamífero.

Según se usa en el presente documento el término "**portador farmacéuticamente aceptable**" se refiere a un portador o diluyente inerte no tóxico que no provoca una irritación significativa al sujeto (mamífero) y que no anula la actividad biológica ni las propiedades del compuesto administrado.

Algunos ejemplos de portadores son, sin limitación, lactosa, sacarosa, agua, disolventes orgánicos y polietilenglicol.

Los portadores pueden incluir excipientes adicionales tales como aglutinantes, disgregantes, lubricantes, agentes tensioactivos, conservantes y agentes saborizantes.

De acuerdo con una forma de realización de la presente invención, la vía de administración de la composición se selecciona de entre oral, parenteral, inhalación, tópica, transdérmica, nasal, transmucosal (por ejemplo, intranasal), intestinal y rectal.

Adicionalmente, de acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, la vía de administración parenteral se selecciona de entre una administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal y subcutánea.

Algunas rutas adecuadas adicionales pueden ser, por ejemplo, inyecciones intramedulares, intratecales, intraventriculares directas e intraoculares.

Una forma de realización específica es la vía oral de administración.

La composición farmacéutica puede formularse para proporcionar una liberación inmediata o una liberación sostenida del principio activo desde la forma de dosificación después de su administración a un paciente mediante el empleo de unos procedimientos bien conocidos en la técnica.

La forma final de la composición incluye, pero no se limita a, un líquido, un jarabe, un elixir, una emulsión, una suspensión, unas gotas, un aerosol, una crema, un ungüento, una loción, un gel, una pasta, un polvo, un gránulo, un comprimido, una capsuleta, una píldora, una cápsula, un supositorio, un parche transdérmico o una inyección.

5 El portador farmacéuticamente aceptable elegido para la preparación de las composiciones farmacéuticas de la presente invención depende de la forma final de la composición.

Típicamente, dichos portadores incluyen excipientes adicionales tales como aglutinantes, disgregantes, adsorbentes, lubricantes, agentes humectantes, agentes tamponantes y agentes tensioactivos.

10 Las composiciones farmacéuticas se presentan preferiblemente en una forma de dosificación unitaria. La forma de dosificación unitaria, según se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente individuales adecuadas como dosis unitarias para el sujeto mamífero que se va a tratar, tal como un comprimido, una cápsula o unos polvos en viales o ampollas, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada del principio activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado.

15 Preferiblemente, la composición farmacéutica en una forma de dosificación unitaria comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del principio activo en una cantidad de entre aproximadamente 0,1 mg y 1.000 mg, más preferiblemente de entre 1 y 500 mg.

20 Las formas de dosificación orales adecuadas para su administración oral pueden presentarse en formas de dosificación unitaria farmacéuticas individuales, tales como cápsulas, obleas, cápsulas de gelatina elástica blanda, comprimidos, capsuletas o pulverizadores de aerosol, conteniendo cada una una cantidad predeterminada de los principios activos, como un polvo o en gránulos, o como una disolución o una suspensión en un líquido acuoso, un líquido no acuoso, una emulsión de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. Dichas formas de dosificación en forma de emulsiones de aceite en agua comprenden típicamente tensioactivos tales como un tensioactivo aniónico, por ejemplo, éster de fosfato aniónico o lauril sulfatos, pero pueden usarse otros tipos de tensioactivos, tales como tensioactivos catiónicos o no aniónicos, en las composiciones de la presente invención. Véase de forma general, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing, Easton Pa., última edición.

25 Con el fin de preparar una forma de dosificación en comprimido, pueden usarse ampliamente diversos portadores farmacéuticos que son bien conocidos en este campo. Como ejemplos de portadores, pueden usarse excipientes tales como lactosa, cloruro sódico, glucosa, almidón, carbonato de calcio, caolín, celulosa, aluminio silicato y similares; los aglutinantes pueden ser, por ejemplo, agua, etanol, propanol, una disolución de glucosa, una disolución de almidón, una disolución de gelatina, carboximetil celulosa, shellac, metil celulosa, polivinilpirrolidona y similares; los disgregantes pueden ser, por ejemplo, almidón, alginato de sodio, laurilsulfato de sodio, glucolato sódico de almidón y similares; los agente humectantes pueden ser, por ejemplo, glicerina, tensioactivos y similares; los adsorbentes pueden ser, por ejemplo, almidón, lactosa, caolín, bentonita, ácido silícico coloidal y similares; pueden usarse lubricantes tales como talco, estearatos, polietilenglicoles y similares. Las preparaciones de comprimidos pueden moldearse adicionalmente en comprimidos recubiertos con un recubrimiento de comprimidos habitual, por ejemplo, comprimidos recubiertos con azúcar, comprimidos recubiertos con película de gelatina, comprimidos recubiertos con un recubrimiento entérico, comprimidos recubiertos con un recubrimiento en película, o comprimidos con dos capas o con múltiples capas.

40 Con el fin de preparar una forma de dosificación en cápsula, se mezclan los compuestos de fórmula [I] como los principios activos con los diversos portadores mencionados anteriormente, y la mezcla o los gránulos preparados a partir de las mezclas se colocan en cápsulas de gelatina dura o en cápsulas blandas.

Con el fin de preparar una forma de dosificación en supositorio, pueden usarse ampliamente varios portadores que son bien conocidos en este campo. Como ejemplos de portadores pueden mencionarse polietilenglicoles, manteca de cacao, alcoholes superiores, ésteres de alcoholes superiores, gelatina, glicéridos semisintéticos y similares.

45 Con el fin de preparar una forma de dosificación en inyección, se esterilizan preparaciones líquidas, preparaciones en emulsión y preparaciones en suspensión, adicionalmente estas preparaciones son preferiblemente isotónicas con respecto a la sangre, y también pueden usarse todos los diluyentes que se usan habitualmente en este campo, por ejemplo, agua, alcohol etílico, macrogoles, propilenglicol, alcohol isoestearílico etoxilado, alcohol isoestearílico polioxilado y ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitano.

50 Adicionalmente, con el fin de preparar disoluciones isotónicas para inyección, puede añadirse una cantidad adecuada de cloruro de sodio, de glucosa o de glicerina a las preparaciones para inyección, además pueden añadirse los aditivos de disolución, agentes tamponantes, conservantes habituales, y similares.

55 Un ejemplo de un portador farmacéutico para la preparación de una preparación en emulsión para inyección es una emulsión de triglicéridos. Un ejemplo de una emulsión de triglicéridos aceptable útil en la administración intravenosa e intraperitoneal de los compuestos de la presente invención es la emulsión de triglicéridos distribuida comercialmente con el nombre comercial Intralip- id.RTM.

Además, si fuera necesario, pueden añadirse agentes colorantes, conservantes, especias, aromas, agentes

edulcorantes y otros, a las preparaciones farmacéuticas de la presente invención.

Las preparaciones tópicas tales como cremas, ungüentos, pastas, geles, lociones, parches transdérmicos, inhaladores, aerosoles, pulverizadores y similares se formulan mediante el uso de portadores y excipientes que son bien conocidos en el campo.

- 5 Los procedimientos de preparación de las composiciones incluyen la etapa de poner en asociación un compuesto de la presente invención con el portador farmacéutico. En general, las composiciones se preparan poniendo en asociación uniformemente e íntimamente un compuesto de la presente invención con portadores líquidos, semisólidos o sólidos, y después, si fuera necesario, moldear el producto.

- 10 Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse mediante procedimientos de farmacia bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante procesos convencionales de mezcla, disolución, pulverización, granulado, compresión, emulsificación, levigación o liofilización. Las técnicas para la formulación y la administración de fármacos pueden encontrarse en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

- 15 Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención pueden formularse por tanto de una forma convencional mediante el uso de uno o más portadores farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesado de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración seleccionada.

- 20 La cantidad del principio activo que puede combinarse con el portador farmacéutico para producir una forma de dosificación individual variará dependiendo del mamífero que se va a tratar y del modo de administración en particular. Por ejemplo, una composición destinada a la administración oral en seres humanos puede variar desde aproximadamente el 5 % hasta aproximadamente el 95 % p/p de la composición total.

Las formas de dosificación unitaria contendrán generalmente entre 0,1 y 1.000 mg del principio activo, más preferiblemente entre 1 y 500 mg.

- 25 La cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un principio activo administrado por vía oral puede variar entre 0,1 y 1.000 mg al día, más preferiblemente entre 1 y 500 mg al día, tanto en dosis individuales como múltiples durante un periodo de 24 horas. Para su administración oral, la cantidad terapéuticamente eficaz del principio activo puede ser varias veces mayor que la de la administración parenteral.

Las dosis anteriores se refieren a seres humanos.

- 30 La dosis administrada se administra adecuadamente una vez al día, o en varias subdosis, por ejemplo, entre 2 y 4 subdosis, que se administran a unos intervalos apropiados a lo largo del día, o con otro cronograma adecuado.

- 35 En la práctica de la invención, la cantidad del compuesto incorporado en la composición farmacéutica puede variar ampliamente. Los factores a considerar en la determinación de la cantidad precisa son bien conocidos por los expertos en la técnica. Algunos ejemplos de dichos factores incluyen, pero no se limitan a, la edad, el sexo y el peso del sujeto que se va a tratar, el uso médico previsto de los compuestos, la gravedad de la enfermedad, la forma de dosificación la vía de administración que se va a emplear y la frecuencia con la que se va a administrar la composición.

La dosis exacta puede determinarse de acuerdo con la práctica habitual en el arte médico de "ajuste de la dosis" del receptor; es decir, administrando inicialmente una dosis baja del compuesto, y aumentando gradualmente la dosis hasta que se observe el efecto terapéutico deseado.

- 40 La proporción entre la toxicidad y el efecto terapéutico para un compuesto en particular es el índice terapéutico, y puede expresarse como la proporción entre la DL50 (la cantidad de compuesto letal en el 50 % de la población) y la DE50 (la cantidad de compuesto eficaz en el 50 % de la población). Los datos del índice terapéutico obtenidos a partir de estudios animales pueden usarse en la formulación de un abanico de dosis para su uso en seres humanos. La dosis de dichos compuestos está preferiblemente en un intervalo de concentraciones plasmáticas que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar en este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosis pueden ser seleccionadas por el médico personal teniendo en cuenta la afección del paciente.

## Ejemplos

### Materiales y procedimientos

- 50 **Extracción y aislamiento del IA.** Se extrajo resina de *Boswellia carterii* (20 g, Pamir, Tel Aviv, Israel) con PE (PE) (3 veces con 150 ml). El extracto de éter de petróleo (PE) se lavó con una disolución de NaOH al 5 % (3 veces con 200 ml). La fracción acuosa resultante que contiene el ácido se acidificó después con HCl 1 M, se lavó con NaCl saturado y se volvió extraer con PE. Después se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. La fracción de PE que no contenía el ácido se acidificó con HCl (1 M) y después se lavó con una disolución saturada de NaCl y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. Después de

la evaporación, el residuo se cromatógrafió en una columna de sílice. Las fracciones se ensayaron para comprobar su actividad sobre la degradación de la I $\kappa$ B como se describe a continuación. Una fracción que eluía con un 3 % de éter dietílico en PE, que contenía el IA, mostró actividad. El IA puro se obtuvo mediante una cromatografía en una columna de HPLC semipreparativa (Spectra-physics applied bio systems absorbancia a 783 detector con una columna vydac C18 de HPLC semipreparativa - Valco). Se usaron acetonitrilo (ACN) y agua como fase móvil para la HPLC y el gradiente consistía en un 90 - 99 % de ACN durante 30 min. Se usó un instrumento Waters HPLC: bomba 600, PDA 996 detector 600 con una columna analítica C18 Symmetry (4,6 / 250 mm) para analizar el proceso de purificación. Se usaron varios procedimientos de RMN (RMN H, RMN C, DEPT, COSY, HSQC, HMBC, TOCSY y NOESY) así como un análisis de GC-MS para la elucidación estructural de los compuestos activos aislados.

Los espectros de RMN se registraron en disoluciones tanto de CDC<sub>13</sub> como de C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> mediante el uso de un espectrómetro Bruker avance de 400 MHz y se repitieron mediante el uso de un espectrómetro Varian Unity Spectrometer Varian Unity Inova de 500 MHz.

El análisis de GC-MS se realizó mediante el uso de un sistema de GCD Hewlett-Packard G1800A con un cromatógrafo de gases HP5971 con un detector de ionización electrónica. Se usó una columna SPB-5 (de 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m de espesor de la película). Se usó el siguiente procedimiento para el análisis: la columna se mantuvo a 70 °C durante 4 min, tras lo cual se aplicó un gradiente de temperatura desde 70 °C hasta 280 °C, a una velocidad de 50 grados/min (temperatura de entrada: 280 °C; temperatura del detector: 280 °C; inyección sin división; gas - Helio, 1 ml/min).

**Cultivos celulares.** Se hicieron crecer células HeLa en medio de Eagle modificado con Dulbecco complementado con un 10 % de suero bovino fetal y un 1 % (v/v) de penicilina / estreptomycin (todos de Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel), en una estufa de incubación humidificada a 37 °C.

La línea celular de macrófagos RAW 264.7 derivada de ratones BALB/c se obtuvo a partir de la American Type Culture collection (Rockville, MD, EE.UU.). Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado con Dulbecco (DMEM) complementado con un 10 % de suero bovino fetal (Hyclone, Logan, UT), un 1 % (v/v) de penicilina / estreptomycin (Beit Haemek, Israel), aminoácidos no esenciales (Sigma, St. Louis, EE.UU.), glutamina al 1 % (Beit Haemek, Israel) y piruvato al 1 % (Beit Haemek, Israel). Las células se dejaron crecer en una estufa de incubación humidificada a 37 °C.

Se recogieron macrófagos peritoneales de ratones hembra C57BL/6 cuatro días después de una inyección intraperitoneal de 1,5 ml de un medio de tioglicolato al 3 % (Difco, NJ, EE.UU.). Las células se resuspendieron en medio de Eagle modificado con Dulbecco (DMEM) complementado con un 5 % de suero bovino fetal (FCS), y se colocaron en placas (1,2 x 10<sup>5</sup> células por pocillo) en placas de 96 micropocillos de fondo redondo (Nunc, Roskilde, Dinamarca).

**Degradación de la I $\kappa$ B $\alpha$ .** Se preincubaron células HeLa con IA (50  $\mu$ g/ml, disuelto en etanol) durante 2 h, y después se estimularon durante 20 minutos con TNF $\alpha$  (20 ng/ml, Emeryville, CA, EE.UU.). Después de retirar los portaobjetos de las placas para una inmunotinción (véase a continuación), se extrajeron las proteínas de las células remanentes en las placas. Las proteínas se extrajeron de las células en tampón de lisis NP-40. Se determinó la concentración total de proteínas mediante el uso del procedimiento de Bradford. Después los lisados se analizaron mediante una inmunotransferencia Western (WB).

**Inmunotransferencia Western (WB).** Después de una separación mediante SDS-PAGE, las proteínas se inmunotransfirieron una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Millipore). La membrana se bloqueó con leche en polvo al 5 % (p/v) y después se incubó en TBST que contenía el anticuerpo primario y un 2 % (p/v) de leche en polvo. Todos los anticuerpos fosfoespecíficos se adquirieron en Cell signaling Inc. Los anticuerpos de  $\alpha$ B $\alpha$ , p65 y  $\alpha$ COX2 en Santa Cruz Inc. (California, EE.UU.). Después de la unión de un anticuerpo secundario apropiado acoplado a peroxidasa de rábano picante, las proteínas se visualizaron mediante una quimioluminiscencia mejorada de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Amersham Lifescience).

**Inmunotinción de la subunidad p65.** Se preincubaron células HeLa con IA y después se estimularon con TNF $\alpha$  según se describió en el anterior ensayo de degradación de la I $\kappa$ B $\alpha$ . Después las células se fijaron con formaldehído al 1 %, se permeabilizaron con un 0,25 % de Triton X-100, se tiñeron con anti-p65 de conejo (Santa Cruz, California, EE.UU.) y se visualizaron con un anticuerpo secundario anticonejo marcado con rojo de rodamina (Jackson ImmunoResearch, Baltimore, EE.UU.). Las células también se tiñeron con DAPI (azul) para la localización de los núcleos (datos no mostrados). Las células se examinaron bajo un microscopio Axioscope Zeiss con una lente plan-Neofluor \* 60.

**Producción de COX-2.** Se trataron células RAW 264.7 con concentraciones subtóxicas (confirmado mediante un ensayo colorimétrico de MTT) de acetato de incensol (10 - 20  $\mu$ g/ml, disuelto en etanol y diluido adicionalmente en medio) y se incubaron con lipopolisacárido (LPS, E. coli 1  $\mu$ g/ml durante 24 h, Sigma, Israel) durante 16 - 24 h. Las células tratadas con vehículo sirvieron como grupo de control.

Las proteínas se extrajeron de las células con tampón de lisis NP-40 (50 mM Tris/HCl a pH 7,5, NaCl 150 mM, 0,1 % de SDS, 1 % de NP-40, EDTA 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM (PMSF) y DTT 10 mM). La concentración

total de proteínas se determinó mediante el uso del procedimiento de Bradford y los lisados se analizaron mediante una inmunotransferencia Western.

**Niveles de óxido nítrico (NO).** Después de 2 - 3 h de incubación de los macrófagos peritoneales murinos a 37 °C, las células no adherentes se eliminaron mediante un aclarado intenso. Aproximadamente el 95 % de las células adherentes eran macrófagos. El IA se disolvió en primer lugar en etanol absoluto, y las disoluciones se diluyeron adicionalmente con medio de Eagle modificado con Dulbecco (medio DMEM). Se añadieron varias concentraciones no tóxicas a los macrófagos, seguido de la adición de 1 µg/ml de LPS para su activación. Después los macrófagos se cultivaron en una atmósfera húmeda con un 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 h. Los fluidos sobrenadantes se recogieron y se mantuvieron a -20 °C hasta su ensayo. La generación de NO se determinó midiendo el nitrito acumulado en los sobrenadantes (100 µl) de los macrófagos tratados con IA como sigue. Las células se trataron después con IA a varias dosis. Se añadió un volumen igual (100 µl) de reactivo de Griess (1 % de sulfanilamida, 0,1 % de naftaleno diamina HCl, 2 % de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) a cada sobrenadante. Después de 10 min de incubación a la temperatura ambiente, se midió la producción de color a 550 nm con un lector de ELISA. La concentración del nitrito se calculó de acuerdo con una curva patrón.

**Producción de ROS (especies de oxígeno reactivas) por parte de los macrófagos RAW 264.7.** Las células Raw 264.7 se rascaron, se lavaron y se resuspendieron en disolución salina equilibrada de Hank (sin rojo de fenol). Para la medición de la quimioluminiscencia se añadieron 0,5 ml de suspensión celular (5 x 10<sup>5</sup> células) a cada tubo del luminómetro, junto con varias dosis del IA ensayado (disuelto en etanol y diluido adicionalmente con Hank). Las células se incubaron durante 24 h. Se añadieron 10 µl de luminol (Sigma, St. Louis, EE.UU.) y 30 µl de zymosan (Sigma, St. Louis, EE.UU.) a los tubos, y la quimioluminiscencia se midió inmediatamente con un luminómetro (Biolumate LB 95, Berhold, Wilbad, Alemania).

**Modelo de la pata inflamada.** Se usaron ratones Sabra hembra para evaluar la respuesta al IA o al vehículo en un modelo *in vivo* de inflamación. Se administró el fármaco o el vehículo 30 min antes de la inducción del estímulo inflamatorio. A los ratones (5 por grupo) se les inyectó *i.p.* vehículo (isopropanol:emulphor:disolución salina = 1:1:18) o vehículo que contenía IA (50 mg/kg, *i.p.*). El emulphor (un aceite vegetal polietoxilado) es un emulsionante comercial. En las patas traseras se inyectaron 50 µl de disolución salina (izquierda o derecha alternativamente) o λ-carragenina (4 %, derecha o izquierda alternativamente), mediante el uso de agujas de 26G. El consiguiente hinchamiento inflamatorio se midió mediante el aumento en el volumen de la pata con un pletismómetro (Ugo-Basile, Italia). Se analizaron el volumen de la pata así como el enrojecimiento (como una medida del eritema) y los lamidos (como una medida del dolor) antes de la aplicación de la carragenina y cada 60 min hasta las 4 h.

**Análisis estadístico.** Se usó la prueba de la *t* de Student para evaluar las diferencias entre los grupos tratados con control y con IA. Para evaluar el efecto de dosis-respuesta se realizó un análisis de los datos mediante el uso de un ANOVA monofactorial, seguido de unas comparaciones de Bonferroni *a posteriori*. Los resultados del modelo de la pata se analizaron mediante un ANOVA seguido de unas comparaciones de Bonferroni *a posteriori* en cada punto temporal.

Para el análisis de la inmunorreactividad del c-Fos, se identificaron los núcleos positivos basándose en su forma redonda y en su densidad óptica, al menos dos veces la del fondo. Las cifras de los núcleos inmunorreactivos a c-Fos se promediaron entre los hemisferios derecho e izquierdo para obtener un número representativo para la región dada en cada ratón. Las pruebas de la *t* de Student se llevaron a cabo mediante la comparación del grupo de control (vehículo) con el grupo de IA.

Las respuestas al IA en los ratones naturales frente a los TRPV3<sup>-/-</sup> se evaluaron mediante el uso de un análisis de la varianza bifactorial (ANOVA) con comparaciones de Bonferroni *a posteriori* (programa informático Graphpad Prism 4).

### Animales y procedimientos

Se usaron ratones Sabra hembra (Harlan, Israel, de 2,5 - 3,5 meses de edad) para el modelo inflamatorio de la pata. Se usaron ratones Sabra hembra (Harlan, Israel, de 15 - 20 semanas de edad) y ratones hembra naturales C57BL/6 o con el TRPV3 inactivado (de 18 - 20 semanas de edad) para las evaluaciones de comportamiento. Se alojaron diez ratones en cada caja. Para los estudios crónicos, los ratones se alojaron en grupos de ocho. La temperatura de la sala de los animales se mantuvo a entre 20 - 22 °C, el ciclo de luz era de 12 h con las luces encendidas (8 - 20 h); 12 h con las luces apagadas (20 - 8.00 h). Se usaron ratones hembra para todas las evaluaciones de comportamiento, con objeto de evitar confusiones debido a la potencial aparición de heridas inducidas por las peleas entre machos (véase también la siguiente Sección "Animales y Procedimientos" relativa al Ejemplo 15).

Los ratones se ensayaron consecutivamente en el laberinto en cruz elevado y en la prueba de natación forzada. El cuidado y los protocolos con los animales cumplían las directrices del U.S. National Institutes of Health, detalladas en la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, y se aplicaron en conformidad con el Institutional Ethics Committee.

**Fármacos e inyecciones para los ensayos de comportamiento**

El IA, el IN y el extracto se disolvieron en una mezcla de isopropanol:cremophor:disolución salina = 1:1:18. El volumen de inyección era de 10 µl/g de peso corporal. Las inyecciones se realizaron por la vía intraperitoneal (i.p.).

**Ensayos de comportamiento****5 Laberinto en cruz elevado**

Los ratones se colocaron en la plataforma central (10 X 10 cm) entre los brazos abiertos (10 X 45 cm) y cerrados (10 X 45 X 40 cm) de un laberinto en cruz. Se registró el número de entradas y el tiempo invertido en cada uno de los brazos. Según han descrito otros (Crawley, 2000; Treit y Menard, 1998), se calculó un efecto 'ansiolítico' tanto en la proporción entre las entradas en los brazos abiertos con respecto a las entradas totales en los brazos, como el % de tiempo en los brazos abiertos proporcional al tiempo en los brazos cerrados. A los ratones (hembra de raza Sabra, de 3,5 - 4,5 meses de edad) se les inyectaron intraperitonealmente 10, 30 o 50 mg/kg de acetato de incensol o de vehículo. Cada dosis fue administrada a 5 ratones. Cincuenta minutos después de la inyección, los ratones fueron probados en el laberinto en cruz para comprobar los efectos 'antidepresivos'. Se inyectó desipramina (5 mg/kg) a un grupo independiente de ratones como control positivo. El Anova monofactorial indicó unos efectos significativos (F = 8,9, df = 4,27, P < 0,01). Todas las dosis tuvieron unos efectos 'antidepresivos', pero sólo la dosis de 0 y de 30 mg/kg eran significativas. Los datos se presentan como las medias ± EEM. DMI = desipramina\*) P < 0,05, \*\*) P < 0,01, \*\*\*) P < 0,001 en comparación con el vehículo

**Prueba de natación forzada de Porsolt (FST)**

Los ratones se colocaron en un vaso de precipitados de vidrio de 2 litros (11 cm de diámetro) lleno de agua (24 ± 1 °C) hasta 30 cm desde el fondo (de forma que el ratón no podía tocar el fondo, y a 8 cm del borde (de forma que el ratón no podía escapar). Se registró el tiempo de inmovilidad (cuando el animal no se mueve excepto por pequeños movimientos necesarios para flotar) mediante 3 experimentadores después de 2, 6 y 9 min.

**Para el Ejemplo 15, se llevaron a cabo los siguientes experimentos:**

**Fármaco.** El IA se aisló como se ha descrito anteriormente en Materiales y procedimientos. Después se disolvió en etanol para los ensayos *in vitro* o en isopropanol para los ensayos *in vivo*. Se preparó una disolución madre de 20 mg/ml para los ensayos *in vitro* y de 50 mg/ml para los ensayos *in vivo*.

**Cultivo celular**

Las células humanas HEK 293 que expresaban de forma estable el TRPV1 eran un amable obsequio de Merck Research Laboratories (Whitehouse Station, NJ). Las células se cultivaron en medio esencial mínimo, Eagle, modificado con aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio 1 mM, L-glutamina 2 mM y 1,5 g/l de bicarbonato de sodio (ATCC, Mabassas, VA), que contenía un 1 % de penicilina-estreptomina y un 10 % de suero bovino fetal. Las células se pasaron tres veces por semana mediante el uso de Tripsina-EDTA 1 x (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se hicieron crecer bajo un 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

Se cultivaron las líneas celulares TRPV3-YFP [O'dell, D. K., Rimmerman, N., Pickens, S. R. & Walker J. M. Fatty acyl amides of endogenous tetrahydroisoquinolines are active at the recombinant human TRPV1 receptor. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 6164 - 6169 (2007)], TRPV4 y con transfección simulada en DMEM 1x con L-glutamina (Mediatech, Inc. Herndon, VA), que contenía un 1 % de penicilina-estreptomina (Invitrogen, Carlsbad, CA) y un 10 % de suero bovino fetal.

Las células HEK293 se transfectaron de forma transitoria con un plásmido TRPV2 de rata mediante el uso del reactivo lipofectamina (Invitrogen, Carlsbad, California) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después se mantuvieron en medio de Eagle modificado con Dulbecco / 10 % de suero bovino fetal complementado con penicilina, estreptomina y L-glutamina. Los queratinocitos primarios de cachorros de ratón deficientes en TRPV3 y TRPV3+/+ (con 1 - 4 días) se recogieron y se cultivaron como se ha descrito previamente [Chung, M. K., Lee, H., Mizuno, A., Suzuki, M. & Caterina, M. J. TRPV3 and TRPV4 mediate warmth-evoked currents in primary mouse keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 21569 - 21575 (2004)].

**Imágenes de calcio de las células HEK 293.** Las células HEK293 que expresan el TRPV1, el TRPV3 y el TRPV4 se colocaron en placas 24 - 48 h antes de obtener las imágenes en placas de 96 pocillos, cargadas con 3 µM de Fura-2 AM y las imágenes se obtuvieron como se ha descrito previamente [O'dell, D. K., Rimmerman, N., Pickens, S. R. & Walker J. M. Fatty acyl amides of endogenous tetrahydroisoquinolines are active at the recombinant human TRPV1 receptor. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 6164 - 6169 (2007)].

Para la obtención de imágenes de calcio de cada célula individual, se colocaron en placas células HEK293 de rata que expresan el TRPV2 y de ratón HEK293 que expresan el TRPV3-YFP en cubreobjetos de vidrio recubiertos con colágeno. Las células se cargaron durante 60 min con 3 µM de Fura-2 AM.

**Imágenes de calcio de queratinocitos TRPV3 +/- y TRPV3.** Se recogieron queratinocitos primarios de cachorros de ratón deficientes en TRPV3 y naturales (con 1 - 4 días) y se cultivaron como se ha descrito [Chung, M. K., Lee, H., Mizuno, A., Suzuki, M. & Caterina, M. J. TRPV3 and TRPV4 mediate warmth-evoked currents in primary mouse keratinocytes. *J. Biol Chem.* 279, 21569 - 21575 (2004)].

5 Las células se colocaron en placas en portaobjetos de vidrio ( $10^5/\text{cm}^2$ ) y se incubaron durante 48 - 60 h, después se cargaron con fura-2 AM (20  $\mu\text{M}$ , 0,04 % de ácido pleurónico, a 32 °C durante 1 h) en tampón de imagen que contiene (en mM): 130 de NaCl, 2,5 de  $\text{CaCl}_2$ , 0,6 de  $\text{MgCl}_2$ , 10 de HEPES, 1,2 de  $\text{NaHCO}_3$ , 10 de glucosa, a pH 7,45. La imagen ratiométrica de  $\text{Ca}^{2+}$  se realizó como se ha descrito previamente [O'dell, D. K., Rimmerman, N., Pickens, S. R. & Walker J. M. Fatty acil amides of endogenous tetrahydroisoquinolines are active at the recombinant human TRPV1 receptor. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 6164 - 6169 (2007)]. El fármaco se añadió al baño después de un periodo de registro de la situación inicial. Las mediciones de calcio crearon a partir de 30 células por cubreobjetos seleccionadas aleatoriamente.

15 **Registro electrofisiológico.** Las corrientes se registraron mediante el uso de una pinza de voltaje de célula completa. Se sacaron las pipetas del vidrio microcapilar (A-M Systems). Se transfirió un cubreobjetos que contiene las células a una cámara de 300  $\mu\text{L}$  que estaba constantemente perfundida (1 - 2 ml/min) con una disolución externa. Se generaron los protocolos de voltaje y los datos fueron digitalizados y registrados mediante el uso del programa informático Pulse (HEKA Elektronik) junto con un amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments), y los datos se analizaron mediante el uso de un programa interno de análisis de Visual Basic (Microsoft).

20 La disolución de la pipeta contenía (en mM): 121,5 de Kgluconato, 10 de HEPES, 17 de KCl, 9 de NaCl, 1 de  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 de EGTA, 2 de MgATP y 0,5 de NaATP, pH 7,2. La disolución externa contenía (en mM): 120 de NaCl, 5 de KCl, 1 de  $\text{MgCl}_2$ , 2 de  $\text{CaCl}_2$ , 10 de glucosa y 20 de HEPES, pH 7,4 con NaOH. La carga medida (pC) se definió como la carga obtenida entre -85 y -45 mV mediante un estímulo de voltaje ascendente (desde -85 mV hasta +35 mV, 0,54 mV/ms; manteniendo el potencial a -55 mV). Las corrientes se muestrearon a 5 kHz. Siempre que era posible se alternaban las células experimentales y las de control. Los valores de control se obtuvieron a partir de las células adyacentes sin una fluorescencia detectable de YFP, que se asumía que no expresaban el TRPV3.

25 **Análisis de datos de los datos de las imágenes de calcio.** El análisis de los datos de las imágenes de calcio se realizó mediante el uso de un ajuste a una curva de regresión no lineal (Graphpad 4 Prism, San Diego, CA). Las pruebas de la  $t$  y el ANOVA monofactorial se calcularon mediante el uso de SPSS (Chicago, IL). En los experimentos con queratinocitos, la respuesta inducida por el fármaco en cada célula se tomó como la máxima medición posterior al fármaco con el tiempo menos el promedio de las últimas 5 mediciones previas al fármaco. Se analizaron las respuestas farmacológicas promediadas en 30 células por cubreobjetos seleccionadas aleatoriamente con pruebas de la  $t$  bifactoriales de datos despareados.

30 Para el análisis de la inmunorreactividad a c-Fos, se identificaron los núcleos positivos basándose en su forma redonda y en su densidad óptica, al menos dos veces la del fondo. Las cifras de los núcleos inmunorreactivos a c-Fos se promediaron entre los hemisferios derecho e izquierdo para obtener un número representativo para la región dada en cada ratón. Las pruebas de la  $t$  de Student se llevaron a cabo mediante la comparación del grupo de control (vehículo) con el grupo de IA.

35 **Animales y procedimientos.** Se usaron ratones Sabra hembra (Harlan, Israel, de 15 - 20 semanas de edad) y ratones hembra naturales C57BL/6 o con TRPV3 inactivado (de 18 - 20 semanas de edad) [Chung, M. K., Lee, H., Mizuno, A., Suzuki, M. & Caterina, M. J. TRPV3 and TRPV4 mediate warmth-evoked currents in primary mouse keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 21569 - 21575 (2004)] para las evaluaciones de comportamiento. Se alojaron 10 ratones en cada caja. El cuidado y los protocolos con los animales cumplían las directrices del U.S. National Institutes of Health, detalladas en la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, y se aplicaron en conformidad con el Institutional Ethics Committees. Para la inmunotinción de c-Fos, se usaron ratones Sabra hembra (véase anteriormente). La temperatura de la sala de los animales se mantuvo a entre 20 - 22 °C, el ciclo de luz era de 12 h con las luces encendidas (8:00 - 20:00 h); 12 h con las luces apagadas (20:00 - 8:00 h). A los ratones se les inyectó acetato de incensol intraperitoneal (*i.p.*) en una mezcla de isopropanol:cremophor:disolución salina (1:1:18) a un volumen de 10  $\mu\text{L/g}$  de peso corporal

#### **Ejemplo 1: el IA y el IN inhiben la degradación de la I $\kappa$ B $\alpha$ .**

50 El IA y el IN se ensayaron a diferentes concentraciones para comprobar su actividad sobre la degradación de la I $\kappa$ B $\alpha$  en células HeLa estimuladas con TNF $\alpha$ . Ambos compuestos inhibieron la degradación de la I $\kappa$ B $\alpha$  de una forma dependiente de la dosis (**Fig. 1A, 1B**).

#### **Ejemplo 2: el IA inhibe la I $\kappa$ B $\alpha$ mediante el deterioro de la actividad de la IKK.**

55 Con objeto de demostrar experimentalmente que el IA inhibe la ruta de la NF- $\kappa$ B cascada arriba de las IKK, se ensayaron los efectos del IA sobre la fosforilación de las IKK inducida por el TNF $\alpha$ . Estos experimentos demostraron la inhibición de la fosforilación de las IKK $\alpha$  / IKK $\beta$  por parte del IA (Fig. 2A). Después de la degradación del  $\kappa$ B $\alpha$ , el NF- $\kappa$ B está libre para acumularse en el núcleo. La inmunotinción de la subunidad p65 del NF- $\kappa$ B demostró que el IA inhibía la acumulación nuclear del NF- $\kappa$ B después de la estimulación con TNF $\alpha$  en células HeLa (**Fig. 2B**).

**Ejemplo 3: el IA bloquea la respuesta inflamatoria mediada por el NF- $\kappa$ B *in vitro* e *in vivo*.** Para investigar si el efecto inhibitor del NF- $\kappa$ B por parte del IA confiere una actividad antiinflamatoria, se determinaron, como se ha detallado en el presente documento anteriormente en Materiales y procedimientos, los niveles de COX-2, de producción de óxido nítrico y de ROS con y sin IA en diferentes líneas celulares. La actividad antiinflamatoria *in vivo* del IA se examinó en el modelo de pata inflamada de ratones. La producción de COX-2 en células RAW 264.7 estimuladas con LPS fue inhibida por el IA a una dosis de 60  $\mu$ M ( $P < 0,001$ ) (**Fig. 3A**). La producción de NO por parte de los macrófagos peritoneales murinos se determinó midiendo el nitrato acumulado en los sobrenadantes con un lector de placas ELISA. El IA inhibió la generación de NO de una forma dependiente de la dosis (ANOVA  $P < 0,0001$ ), alcanzando aproximadamente un 45 % de la producción de NO a 80  $\mu$ M ( $p = 0,0022$ ) (**Fig. 3B**). Se sabe que los ROS son importantes en varios procesos biológicos y patológicos, y que están implicados en la inflamación. Por lo tanto ensayamos los efectos del IA sobre la generación de ROS mediante células Raw 264.7 activadas con Zymozan a tres concentraciones. Se encontró un significativo efecto inhibitor dependiente de la dosis (ANOVA  $P < 0,0001$ ), alcanzando aproximadamente un 45 % de la inhibición a 60  $\mu$ M ( $p = 0,0021$ ) (**Fig. 3C**).

Habiendo establecido que el IA inhibe la expresión de varios mediadores inflamatorios clave *in vitro*, se estudiaron las propiedades antiinflamatorias del IA *in vivo*. Entonces se averiguó que el IA reducía significativamente la inflamación en el modelo de pata inflamada de ratones durante un periodo de 4 h. La disminución en el volumen de la pata inflamada en los ratones tratados refleja una disminución en el edema, que es un componente de la respuesta inflamatoria. Había unos efectos muy significativos del tratamiento ( $F = 11,7$ ,  $df = 3,64$ ,  $P < 0,001$ ), del tiempo ( $F = 10,6$ ,  $df = 4,64$ ,  $P < 0,0001$ ) y de la interacción ( $F = 3,9$ ,  $df = 12,64$ ,  $P < 0,001$ ) (**Fig. 4**). El IA también redujo significativamente otros parámetros inflamatorios, tales como el enrojecimiento y el dolor (datos no mostrados).

#### **Ejemplo 5: efecto del IA sobre la respuesta funcional posterior al TCEC**

Para examinar el efecto del IA sobre la recuperación funcional después de un TCEC, se compararon los parámetros de los ratones lesionados tratados con IA con los de los ratones lesionados tratados con vehículo.

En la 1ª h posterior al TCEC, se evaluó el estado funcional de los ratones de acuerdo con un conjunto de 10 tareas neuroconductuales (puntuación de gravedad neurológica, NSS) que prueba los reflejos, la coordinación en la vigilia y las capacidades motoras. Se otorgaba un punto para la ausencia de reflejo o la incapacidad de realizar una tarea en particular. Por lo tanto, una puntuación de 10 refleja el máximo deterioro neurológico. Los ratones se dividieron por igual en grupos con vehículo \ IA de acuerdo con sus puntuaciones de NSS. Sólo los ratones con una NSS  $> 4$  en la 1 h posterior a la lesión fueron incluidos en el estudio. Inmediatamente después de la evaluación de la NSS1h, los ratones se asignaron aleatoriamente a una inyección intraperitoneal (i.p.) con vehículo (isopropanol:Emulphor - un emulsionante comercial:disolución salina = 1:1:18) o con vehículo que contenía IA (50 mg/kg,  $n = 9 - 10$  ratones / grupo). La recuperación ( $\Delta$ NSS<sub>t</sub>) se definió como la diferencia entre la NSS1h y la NSS medida en cualquier punto temporal posterior, y se determinó en varios puntos temporales hasta los 21 días posteriores al TCEC.

Las NSS en la 1ª h eran similares en ambos grupos, (de  $7,03 \pm 0,19$  y de  $7,03 \pm 0,19$ , respectivamente) lo que indicaba que no había ninguna diferencia en la gravedad inicial de la lesión. Se observó una recuperación notablemente mayor en la capacidad motora del grupo con IA 24 h después de la lesión en comparación con el vehículo ( $\Delta$ NSS =  $1,00 \pm 0,12$  frente a  $0,41 \pm 0,09$ , respectivamente,  $P = 0,002$ ), según se representa en la **Fig. 5A**. Los valores de la  $\Delta$ NSS aumentaron con el tiempo en ambos ratones con IA y con vehículo como resultado de la recuperación espontánea, pero continuaron siendo significativamente mayores en los ratones con IA en todos los puntos temporales subsiguientes, hasta 3 semanas después de la lesión.

#### **Ejemplo 6: efecto del IA sobre la función de la memoria**

La función de la memoria fue evaluada mediante una ORT (prueba de reconocimiento de objetos) y los resultados están representados en la **Fig. 5B**. Mientras que los ratones naturales no lesionados no se veían afectados por el IA (datos no mostrados), tenía un fuerte efecto sobre los animales lesionados. Ambos grupos invirtieron el mismo tiempo en los dos objetos ( $\sim 50$  % del tiempo total de exploración) en las mediciones de la situación inicial, en todos los momentos posteriores al TCEC. Sin embargo, en la prueba realizada 4 h después, cuando se sustituía un objeto nuevo por uno de los familiares, los ratones tratados con IA invirtieron la mayor parte de su tiempo de exploración con el nuevo objeto, al contrario que los animales tratados con vehículo, que no memorizaron el objeto "antiguo". A los 3 días después de la lesión, los animales tratados con IA invirtieron unos tiempos significativamente mayores en la exploración del objeto nuevo ( $P = 0,01$ ), similares a los tiempos invertidos por un animal no expuesto. Este efecto del IA se sostuvo durante 7 y 14 días. A los 21 días, parece que los ratones tratados con vehículo recuperaron su capacidad, y el tiempo de exploración alcanzó un nivel similar al de los ratones tratados con IA.

#### **Ejemplo 7: efecto sobre la formación de edema en tejidos**

Se observó un pronunciado aumento en el agua tisular en el hemisferio izquierdo (ipsilateral) de todos los ratones lesionados a las 24 h después de la lesión, lo que indica el efecto de la lesión en ambos grupos. Aunque la acumulación de agua tendía a ser menor en los ratones con IA ( $81,47 \pm 0,35$  % en los de IA frente al  $82,16 \pm 0,30$  % en los de vehículo), la diferencia no alcanzó una significación estadística ( $P = 0,15$ ).



**Ejemplo 8: efecto del IA sobre el perfil de expresión de citocinas después del TCEC**

Dado que se demostró anteriormente en este documento que las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  son reguladas por aumento en las 1 - 4 h posteriores al TCEC, y que su inhibición está asociada con una mejor recuperación. Se cuantificaron los niveles de ARNm de estas citocinas a las 3 horas después del TCEC mediante el uso de una PCR en tiempo real. Sus cantidades se expresan con respecto a la actina  $\beta$ , y a partir de la **Fig. 6** se aprecia que el IA inhibió significativamente la expresión del ARNm de ambas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  ( $P < 0,05$ ,  $n = 5$  / grupo).

**Ejemplo 9: efecto del IA sobre la temperatura corporal**

Treinta minutos después del tratamiento con IA (a saber, 90 min después del TCEC), se observó una leve hipotermia ( $\sim 1$  °C) y de corta duración ( $\sim 30 - 60$  min) en los ratones tratados con IA en comparación con los tratados con vehículo (datos no mostrados).

**Ejemplo 10: efecto ansiolítico del IA:**

Quando se coloca por primera vez en el laberinto en cruz elevado, el comportamiento de un ratón se basa ampliamente en su nivel de ansiedad. Los ratones normales que no han recibido ningún fármaco ansiolítico se comportarán de una forma moderadamente ansiosa en este nuevo entorno. Por lo tanto, tienden a preferir los brazos cerrados sobre los menos seguros brazos abiertos. Sin embargo, los ratones tratados con fármacos ansiolíticos (por ejemplo, diazepam, habitualmente conocido como valium) tienden a estar menos ansiosos, por lo que invierten más tiempo en los 5 brazos abiertos en comparación con los ratones normales, y generalmente son menos activos. Cuarenta y cinco minutos después de la inyección, los ratones fueron probados en el laberinto en cruz para comprobar los efectos 'ansiolíticos' del IA (**Fig. 7**). Se inyectó diazepam (5 mg/kg) a un grupo independiente de ratones como control positivo. El Anova monofactorial indicó unos efectos significativos ( $F = 4,2$ ,  $df = 4,32$ ,  $P < 0,01$ ). Los datos se presentan como las medias  $\pm$  EEM.

\*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$  en comparación con el vehículo.

**Ejemplo 11:** el factor de transcripción c-Fos es un producto de un gen temprano inmediato y su aumento sirve como marcador de un aumento en la actividad neuronal. Por lo tanto se usa en secciones histológicas para cartografiar regiones cerebrales que son activadas o atenuadas después del tratamiento con fármacos psicoactivos. El IA aumentó significativamente el c-Fos en el septo lateral, el núcleo central de la amígdala y el núcleo solitario, mientras que redujo significativamente el c-Fos en la corteza motora, el estriado medio y la región CA3 del hipocampo (**Figs. 9 A - C**). El núcleo central de la amígdala y el septo lateral juegan unos papeles importantes en la expresión de las emociones; se asume que la expresión del c-Fos en el núcleo central de la amígdala es debida a circuitos que están involucrados tanto por fármacos ansiolíticos como ansiogénicos.

Los datos de los ensayos de comportamiento junto con la inmunotinción de c-Fos establecen los efectos ansiolíticos y antidepresivos del IA.

**Ejemplo 12:** el IA (75 mg/kg) ejerció un potente efecto de tipo ansiolítico en los ratones naturales, mientras que los ratones TRPV3<sup>-/-</sup> invirtieron los mismos tiempos en los brazos abiertos, independientemente de si les habían inyectado IA o sólo vehículo (**Fig. 10a**;  $F_{\text{raza}} = 6,3$ ,  $df 1, 14$ ,  $p < 0,05$ ;  $F_{\text{interacción}} = 5,0$ ,  $df 1,14$ ,  $p < 0,05$ ). En la prueba de natación forzada de Porsolt, el IA redujo significativamente el tiempo de inmovilidad en los ratones naturales, pero no en los TRPV3<sup>-/-</sup> ( $F_{\text{IA}} = 5,5$ ,  $df 1,16$ ,  $p < 0,04$ ;  $F_{\text{interacción}} = 5,9$ ,  $df 1,16$ ,  $p < 0,03$ ) (**Fig. 10b**). No se registraron diferencias significativas entre los ratones naturales tratados con vehículo y los ratones TRPV3<sup>-/-</sup> tratados con vehículo en las pruebas de natación forzada y del laberinto en cruz elevado.

Estos resultados indican que los efectos del IA en modelos preclínicos de antidepresivos y ansiolíticos están mediados a través de los canales TRPV3.

**Ejemplo 13: efecto antidepresivo del IA:**

Usamos la prueba de natación forzada de Porsolt para examinar el efecto antidepresivo del IA. El procedimiento se basa en la observación de que un ratón, cuando se le obliga a nadar en una situación de la que no puede escapar, acabará dejando de moverse después de un periodo inicial de actividad vigorosa, realizando únicamente aquellos movimientos necesarios para mantener su cabeza por encima del agua. Esta inmovilidad del comportamiento característica y fácilmente identificable indica un estado de desesperación en el que la rata ha aprendido que es imposible escapar y se resigna a las condiciones experimentales. Cincuenta minutos después de la inyección, los ratones se probaron en la prueba de natación forzada de Porsolt para comprobar los efectos 'antidepresivos' (**Fig. 8**). Se inyectó desipramina (5 mg/kg) a un grupo independiente de ratones como control positivo. El Anova monofactorial indicó unos efectos significativos ( $F = 8,9$ ,  $df = 4,27$ ,  $P < 0,01$ ). Los datos se presentan como las medias  $\pm$  EEM. DMI = desipramina

\*,  $P < 0,05$ ; \* \*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$  en comparación con el vehículo

**Ejemplo 15: el IA afecta a los parámetros del comportamiento**

Para estudiar los efectos funcionales del IA en el SNC, se ensayó el IA en un conjunto de ensayos de comportamiento estándar en ratones (ratones Sabra hembra, de 15 - 20 semanas de edad), a saber: el laberinto en cruz elevado [Crawley, J. N. What's Wrong with my Mouse? Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice (Wiley-Liss, Nueva York, 2000)], en la prueba de natación forzada de [Petit-Demouliere, B., Chenu, F. & Bourin, M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology* 177, 245 - 255 (2005)], en la prueba de locomoción en campo abierto y en la respuesta cataléptica en una prueba en círculo [Fride, E. & Mechoulam, R. Pharmacological activity of the cannabinoid receptor agonist, anandamida, a brain constituent. *Eur. J. Pharmacol.* 231, 313 - 314 (1993)]. El ensayo del laberinto en cruz elevado se basa en la preferencia de los ratones por los brazos cerrados de un laberinto, debido aparentemente al miedo a los espacios abiertos. A 50 mg/kg, el IA ejerció un potente efecto de tipo ansiolítico, provocando que los ratones invirtieran significativamente más tiempo en los aversivos brazos abiertos del laberinto. En la prueba de natación forzada de Porsolt, un ensayo estándar para la evaluación de los efectos antidepressivos, el IA redujo significativamente la inmovilidad registrada durante 9 minutos, indicando así una inversión de la respuesta de abulia. Un círculo significativo. Se apreció una dependencia de la dosis en todos los ensayos (10 - 100 mg/kg, datos no mostrados), y los hallazgos se replicaron en 7 experimentos independientes.

El IA (100  $\mu\text{M}$ ) aumentó significativamente el influjo de calcio ( $\text{CE}_{50} = 16 \mu\text{M}$ ; pendiente de Hill = 2,2; **Fig. 12 a, b, d**) en células HEK293 que expresan de forma estable el TRPV3-YFP de ratón. Cuando se eliminó el calcio del medio extracelular, se redujo significativamente el aumento en el calcio en respuesta al IA (**Fig. 12b**), proporcionando pruebas adicionales del influjo de calcio a través de los canales de TRPV3. El efecto del IA sobre el TRPV3 se asemeja al efecto del agonista de amplio espectro difenilborinato de 2-aminoetilo (2-APB), que sirvió como control positivo (**Fig. 12 a, d**). El IA (500  $\mu\text{M}$ ) también indujo un influjo de calcio en los queratinocitos primarios de ratones naturales, pero no en los ratones TRPV3<sup>-/-</sup> [Moqrich A., Hwang S. W., Earley T. J., Petrus M. J., Murray A. N., Spencer K. S., Andahazy M., Story G. M. & Patapoutian A. Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and canfor sensor in the skin. *Science*. 307, 1468 - 72 (2005)] (**Fig. 12c**). El efecto del IA (500  $\mu\text{M}$ ) se asemeja al del alcanfor (10 mM), un conocido agonista del TRPV3. El IA, a una concentración (100  $\mu\text{M}$ ) que era máximamente eficaz en las células que expresan el TRPV3, no indujo influjo de calcio en las células HEK293 transfectadas transitoriamente con TRPV2 de rata (**Fig. 12f**), y sólo provocó un influjo de calcio mínimo en las células HEK293 que expresan el TRPV de rata y el TRPV4 humano (**Fig. 12 e, g**).

El IA también activó una corriente de cationes en las células HEK293 de ratón que expresan el TRPV3-YFP (**Fig. 13 a - c**) con unas propiedades coherentes con la activación del TRPV3 [Smith G. D. y col., TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* 418, 186 - 190 (2002)] y similar a la corriente activada por el 2-APB, que sirvió como control positivo (**Fig. 13d**). Esta corriente no era activada en las células HEK293 que no expresaban el TRPV3 y también estaba ausente en las células que expresan el TRPV 1 y el TRPV4 (**Fig. 13e**).

Se estudió el efecto del IA en diferentes regiones cerebrales mediante la observación del efecto del IA en la inmunorreactividad a c-Fos en los cerebros de los ratones 60 min después de la administración del IA (50 mg/kg; *i.p.*). El factor de transcripción c-Fos es un producto de un gen temprano inmediato y su aumento sirve como marcador de un aumento en la actividad neuronal. Por lo tanto se usa en secciones histológicas para cartografiar regiones cerebrales que son activadas o atenuadas después del tratamiento con fármacos psicoactivos [Werme, M., Ringholm, A., Olson, L. & Brene S. Differential patterns of induction of NGFI-B, Nor1 and c-fos ARNms in striatal subregions by haloperidol and clozapine. *Brain Res.* 863, 112 - 119 (2000); y Dragunow, M., Robertson, G. S., Faull, R. L., Robertson, H. A. & Jansen, K. D2 dopamina receptor antagonists induce fos and related proteins in rat striatal neurons. (1990) *Neuroscience* 37, 287 - 294]. El IA aumentó significativamente el c-Fos en el septo lateral, el núcleo central de la amígdala y el núcleo solitario, mientras que redujo significativamente el c-Fos en la corteza motora, el estriado medio y la región CA3 del hipocampo (**Fig. 9**; Tabla 1). El núcleo central de la amígdala y el septo lateral juegan unos papeles importantes en la expresión de las emociones [Thompson, B. L. & Rosen, J. B. Immediate-early gene expression in the central nucleus of the amygdala is not specific for anxiolytic or anxiogenic drugs. *Neuropharmacology* 50, 57 - 68 (2006); y Henry, B., Vale, W. & Markou, A. The effect of lateral septum corticotropin-releasing factor receptor 2 activation on anxiety is modulated by stress. *J. Neurosci.* 26, 9142 - 9152 (2006)]; se asume que la expresión del c-Fos en el núcleo central de la amígdala es debida a circuitos que están involucrados tanto por fármacos ansiolíticos como ansiogénicos [Thompson, B. L. & Rosen, J. B. Immediate-early gene expression in the central nucleus of the amygdala is not specific for anxiolytic or anxiogenic drugs. *Neuropharmacology* 50, 57 - 68 (2006).]

Los datos de los ensayos de comportamiento junto con la inmunotinción de c-Fos establecen los efectos ansiolíticos y antidepressivos del IA. Dado el fuerte efecto del IA sobre los canales TRPV3, y la observación de que el IA no interactúa con una larga lista de receptores que se sabe que están implicados en la psicoactividad, se investigó la posibilidad de que sus efectos sobre el comportamiento estén mediados a través de los canales TRPV3 del SNC. Por lo tanto, se repitió el conjunto de ensayos de comportamiento con ratones naturales y TRPV3<sup>-/-</sup>, a los que se les administraron IA o vehículo.

El IA (75 mg/kg) ejerció un potente efecto de tipo ansiolítico en los ratones naturales, mientras que los ratones TRPV3<sup>-/-</sup> invirtieron los mismos tiempos en los brazos abiertos, independientemente de si les habían inyectado IA o

sólo vehículo (**Fig. 10a**;  $F_{\text{raza}} = 6,3$ ,  $df$  1, 14,  $p < 0,05$ ;  $F_{\text{interacción}} = 5,0$ ,  $df$  1,14,  $p < 0,05$ ). En la prueba de natación forzada de Porsolt, el IA redujo significativamente el tiempo de inmovilidad en los ratones naturales, pero no en los TRPV3<sup>-/-</sup> ( $F_{\text{IA}} = 5,5$ ,  $df$  1,16,  $p < 0,04$ ;  $F_{\text{interacción}} = 5,9$ ,  $df$  1,16,  $p < 0,03$ ) (**Fig. 10b**). Se registraron diferencias significativas entre los ratones naturales tratados con vehículo y los ratones TRPV3<sup>-/-</sup> tratados con vehículo en las pruebas de natación forzada y del laberinto en cruz elevado.

Estos resultados indican que los efectos del IA en modelos preclínicos de antidepresivos y ansiolíticos están mediados a través de los canales TRPV3.

Conjuntamente, los datos aquí presentados, junto con la expresión del ARNm del TRPV3 en el cerebro, indican que los canales TRPV3 afectan a los procesos emocionales y de comportamiento en el SNC, además de sus conocidos efectos sobre la sensibilidad térmica.

### **Referencias:**

The Complete Parallel Bible, Proverbs, 27, 9, (Oxford University Press, 1989).

Ammon, H. P., Safayhi H., Mack T. y Sabieraj J. (1993) *J Ethnopharmacol* 38,113 - 9.

Barnes P. J., Karin M. (1997) *N. Engl J Med.* 336, 1066 - 71.

Beni SM, Kohen R, Reiter RJ, Tan DX, Shohami E (2004) Melatonin-induced neuroprotection after closed head injury is associated with increased brain antioxidants and attenuated late-phase activation of NF-kappaB and AP-1. *FASEB J* 18, 149 - 51.

Chung, M. K., Lee, H., Mizuno, A., Suzuki, M. & Caterina, M. J. TRPV3 and TRPV4 mediate warmth-evoked currents in primary mouse keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 21569 - 21575 (2004).

Crawley, J. N. What's Wrong with my Mouse? Behavioral Phenotyping, of Transgenic and Knockout Mice (Wiley-Liss, Nueva York, 2000).

Corsano, S. & Nicoletti, R. The structure of incensole. *Tetrahedron* 23, 1977 - 1984 (1967).

Dragunow, M., Robertson, G. S., Faull, R. L., Robertson, H. A. & Jansen, K. D2 dopamine receptor antagonists induce fos and related proteins in rat striatal neurons. (1990) *Neuroscience* 37, 287 - 294.

Foo S. Y., Nolan G. P. *Trends Genet.* (1999) 15 229 - 35.

Fride, E. & Mechoulam, R. Pharmacological activity of the cannabinoid receptor agonist, anandamide, a brain constituent. *Eur. J. Pharmacol.* 231, 313 - 314 (1993).

Gacs-Baitz E., Radics L. Fardella G. y Corsano S. (1978) *Journal of Chemical Research (S)*, 1701 - 1709.

Gerhardt, H, Seifert, F, Buvari, P, Vogelsang, H, Reppges, R. (2001) *Zeitschrift-fur-Gastroenterologie* 39, 7 - 11.

Ghosh S. y Karin M. (2002) *Cell* 109, S81 - S96.

Gupta, I., Gupta, V., Parihar, A., Gupta, S., Ludtke, R., Safayhi, H., Ammon, H. P. (1998) *Eur J Med Res* 3, 511 - 4.

Hansson G. K. (2001) *Ann N Y Acad Sci.* 947 157 - 65; análisis 165 - 6.

Haoxing Xu y col., *Nature Neuroscience* (2006) 9, 628 - 635.

Henry, B., Vale, W. & Markou, A. The effect of lateral septum corticotropin-releasing factor receptor 2 activation on anxiety is modulated by stress. *J. Neurosci.* 26, 9142 - 9152 (2006).

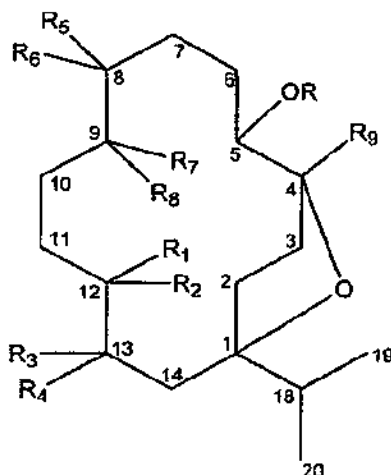
H. Z. Hu y col., *J Biol Chem* 279, 35741 (20 de agosto de 2004).

Karin M. y Ben-Neriah Y. (2000) *Annual Review of Immunology* 18, 621 - 663.

- T. Kato, C. C. Yen, T. Kobayashi, Y. Kitahara. Cyclization of polyenes XXI. Synthesis of DL-incensole. Chemistry letters 1191 - 1192 (1976),
- H. Lee, M. J. Caterina, Pflugers Arch 451, 160 (octubre de 2005).
- 5 Marmarou A, Guy M, Murphey L, Roy F, Layani L, Combal JP, Marquer C; American Brain Injury Consortium (2005) A single dose, three-arm, placebo-controlled, phase I study of the bradykinin B2 receptor antagonist Anatibant (LF16-0687Ms) in patients with severe traumatic brain injury. J Neurotrauma 22, 1444 - 55.
- Moqrich A., Hwang S. W., Earley T. J., Petrus M. J., Murray A. N., Spencer K. S., Andahazy M., Story G. M. & Patapoutian A. Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. Science. 307, 1468 - 72 (2005).
- 10 Narayan RK, Michel ME, Ansell B, y col. (2002) Clinical trials in head injury. J Neurotrauma 19, 503 - 57.
- Nonaka M, Chen XH, Pierce JE, Leoni MJ, McIntosh TK, Wolf JA, Smith DH (1999) Prolonged activation of NF-kappaB following traumatic brain injury in rats. J Neurotrauma 16, 1023 - 34.
- O'dell, D. K., Rimmerman, N., Pickens, S. R. & Walker J. M. Fatty acyl amides of endogenous tetrahydroisoquinolines are active at the recombinant human TRPV1 receptor. Bioorg. Med. Chem. 15, 6164 - 6169 (2007).
- 15 Paxinos G. & Franklin K. B. J. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (Academic Press, Oxford, 2001).
- Petit-Demouliere, B., Chenu, F. & Bourin, M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. Psychopharmacology 177, 245 - 255 (2005).
- Singh G. B, Atal C. K. (1986) Agents and Actions 18, 407 - 412.
- 20 Smith G.D. y col., Nature 418, 186 (11 de julio de 2002).
- Syrovets, T., Buchele, B., Krauss, C., Laumonnier, Y. y Simmet, T. (2005), J Immunol. 174, 498 - 506.
- Strappaghetti, G., Proietti G., Proietti, S. Corsano, S. y I. Grgurina, I. Synthesis of incensole. Bioorganic Chemistry 11, 1 - 3 (1982).
- 25 Thompson, B. L. & Rosen, J. B. Immediate-early gene expression in the central nucleus of the amygdala is not specific for anxiolytic or anxiogenic drugs. Neuropharmacology 50, 57 - 68 (2006).
- Treit, D. & Menard, J. en In vivo Neuromethods eds Boulton, A., Baker, G. & Bateson, A. (Humana Press, Totowa, 1998), pág. 89.
- Vogt-Eisele, AK y col., Monoterpenoid agonists of TRPV3, British Journal of Pharmacology (2007) 151, 530 - 540.
- 30 Watt, J. M. (1962) The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa, 2ª Ed., Livingstone LTD., Edimburgo y Londres.
- Werme, M., Ringholm, A., Olson, L. & Brene S. Differential patterns of induction of NGFI-B, Nor1 and c-fos mRNAs in striatal subregions by haloperidol and clozapine. Brain Res. 863, 112 - 119 (2000).
- La Patente de EE.UU. Nº 5064823
- El documento WO 02/053138
- 35

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula estructural I, incluyendo enantiómeros, diastereómeros, solvatos, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos:



[I]

5

en la que,

R es seleccionado de entre H,  $-C(=O)R'$  y  $-C(=O)OR''$ , en las que R' es alquilo C<sub>1-2</sub> y R'' es H o alquilo C<sub>1-25</sub>; **R<sub>1</sub>**, **R<sub>2</sub>**, **R<sub>5</sub>** y **R<sub>6</sub>** son seleccionados independientemente de entre H, OH y CH<sub>3</sub>;

**R<sub>3</sub>**, **R<sub>4</sub>**, **R<sub>7</sub>** y **R<sub>8</sub>** son seleccionados independientemente H y OH;

10 **R<sub>9</sub>** es H o CH<sub>3</sub>; o

uno de **R<sub>1</sub>** y **R<sub>2</sub>** y uno de **R<sub>3</sub>** y **R<sub>4</sub>** tomados conjuntamente forman (i) un segundo enlace entre C<sub>12</sub> y C<sub>13</sub> o (ii) un anillo epóxido, junto con el carbono al que están unidos; y/o

uno de **R<sub>5</sub>** y **R<sub>6</sub>** y uno de **R<sub>7</sub>** y **R<sub>8</sub>** tomados conjuntamente forman (iii) un segundo enlace entre C<sub>8</sub> y C<sub>9</sub> o (iv) un anillo epóxido, junto con el carbono al que están unidos; y/o

15 uno de **R<sub>5</sub>** y **R<sub>6</sub>** junto con R forma un enlace sencillo, formando así un anillo epóxido junto con los carbonos a los que están unidos,

para su uso en neuroprotección.

2. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha neuroprotección es para el tratamiento, la prevención o la mejora de una enfermedad o de una afección resultante de una lesión, un traumatismo o enfermedades neurodegenerativas del SNC.

20

3. Un compuesto que tiene la fórmula estructural I como se ha definido en la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento, la prevención o la mejora de una enfermedad o de una afección seleccionada de entre depresión, ansiedad, comportamientos obsesivo compulsivos, deterioro en la función cognitiva y deterioro en la función neuroconductual.

25

4. Un agonista de TRPV3 que tiene la fórmula estructural I como se ha definido en la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o de una afección seleccionada de entre trastornos del estado de ánimo, ansiedad, y una combinación de los mismos.

5. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 o 4, en el que dicho compuesto es incensol o acetato de incensol.

30

6. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho compuesto es incensol.

7. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho compuesto es acetato de incensol.

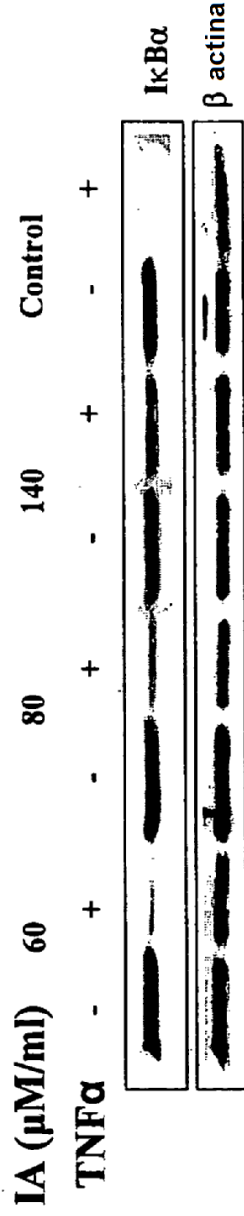


Figure 1A

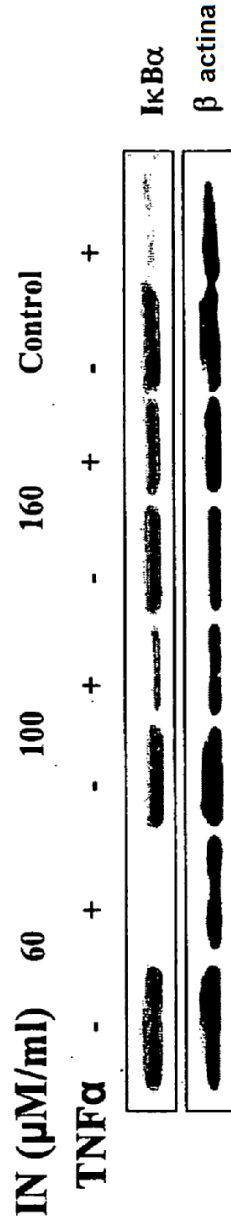


Figure 1B

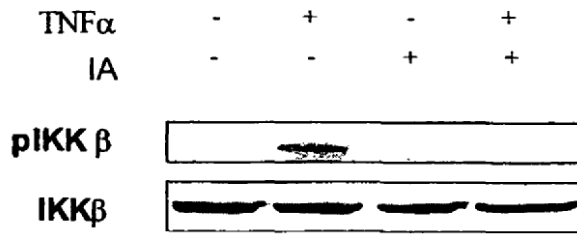


Figura 2A

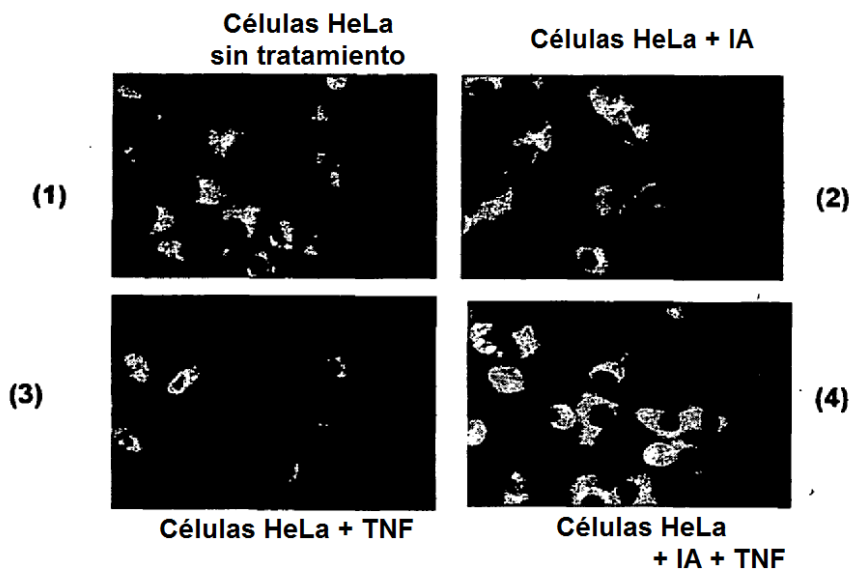


Figura 2B

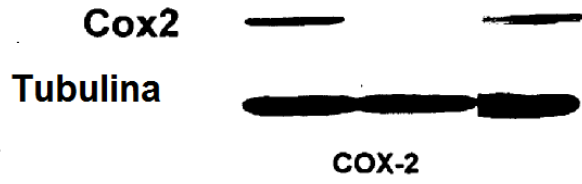


Figura 3A (1)

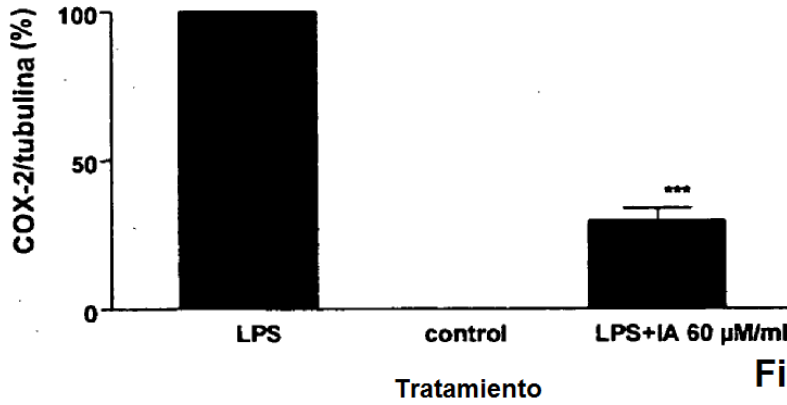


Figura 3A (2)

Inhibición de la producción de NO por parte del IA

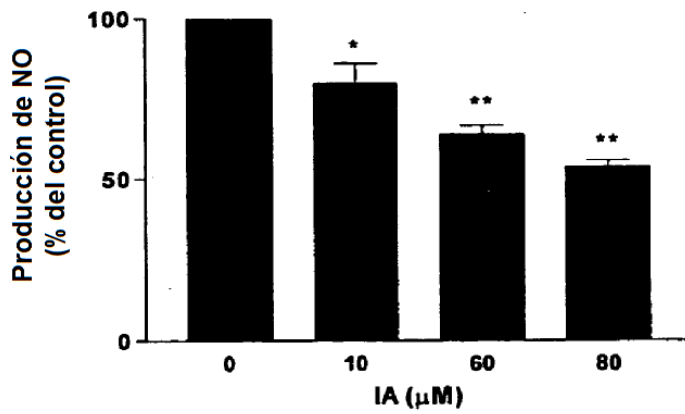


Figura 3B

Inhibición de la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS)

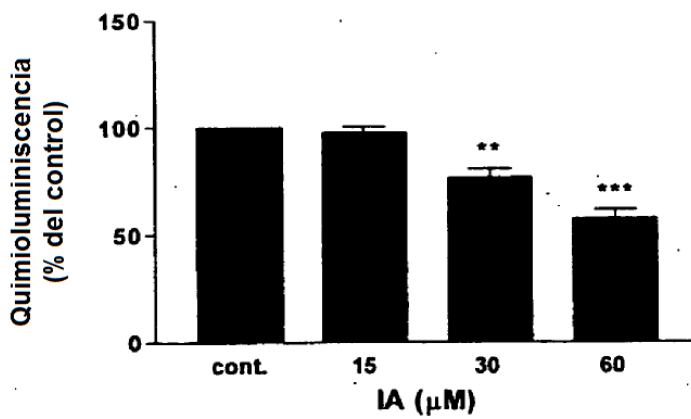


Figura 3C



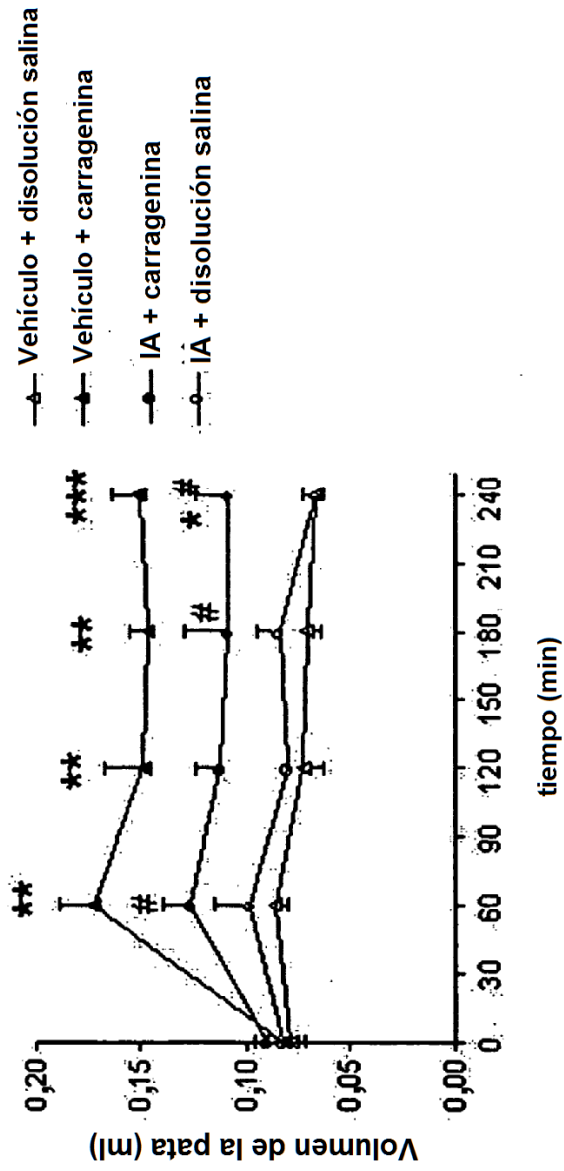


Figura 4

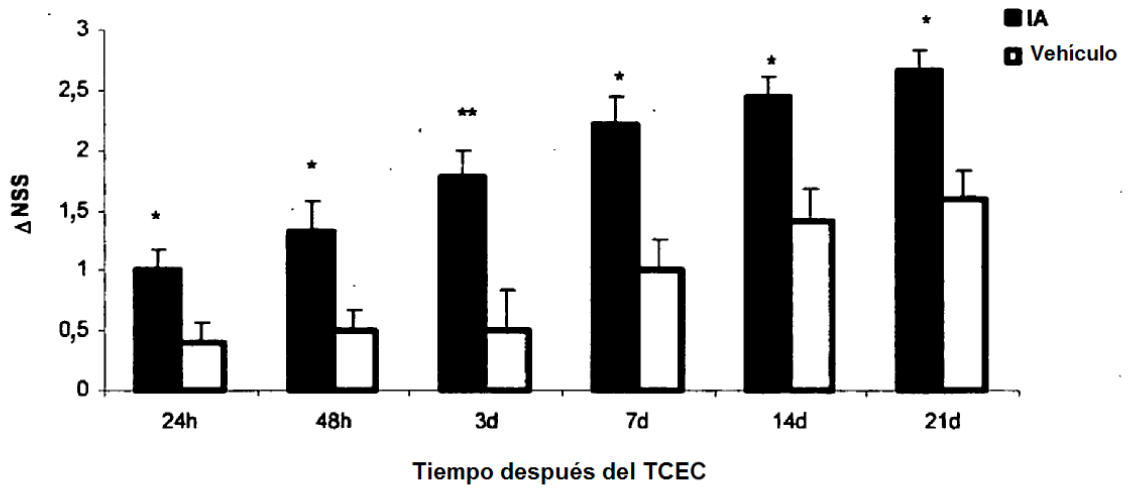


Figura 5A

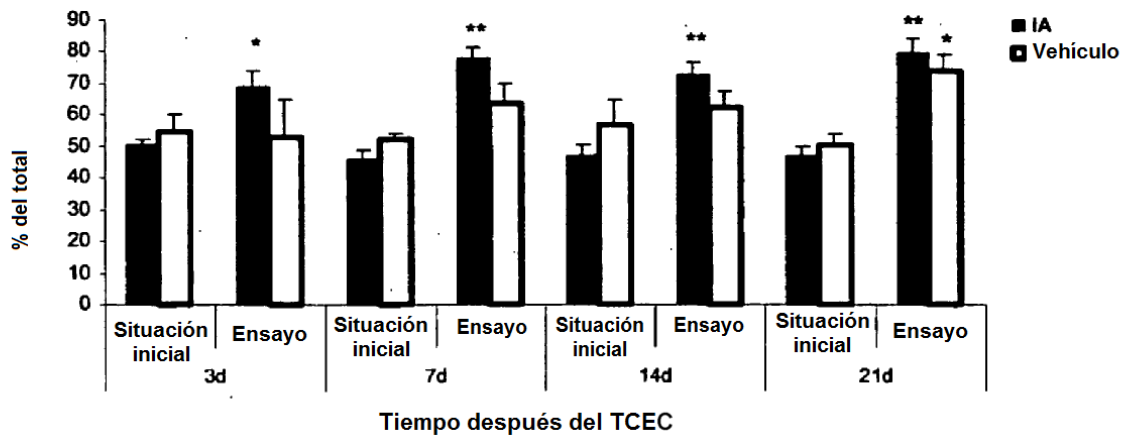


Figura 5B

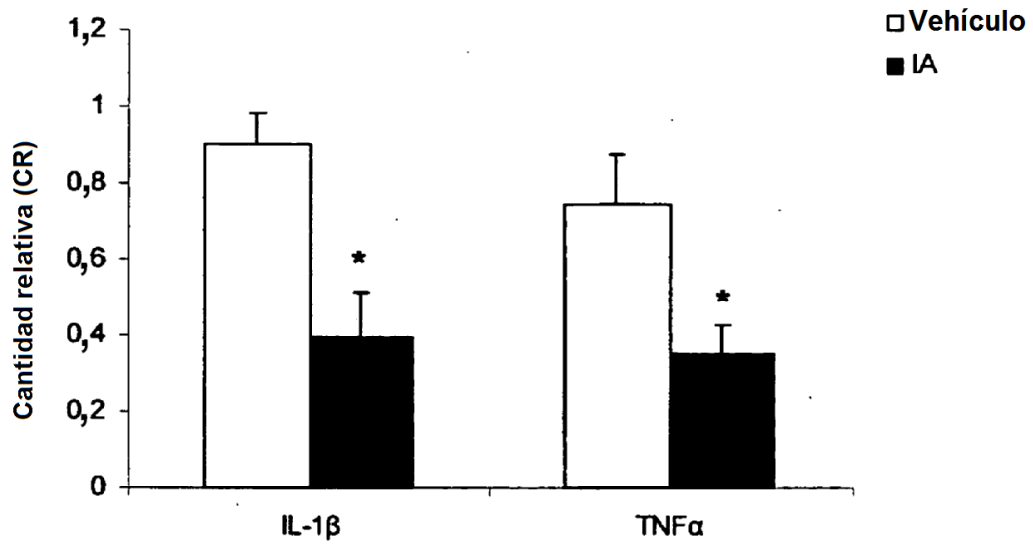


Figura 6

Proporción de tiempo invertido en brazos abiertos / cerrados

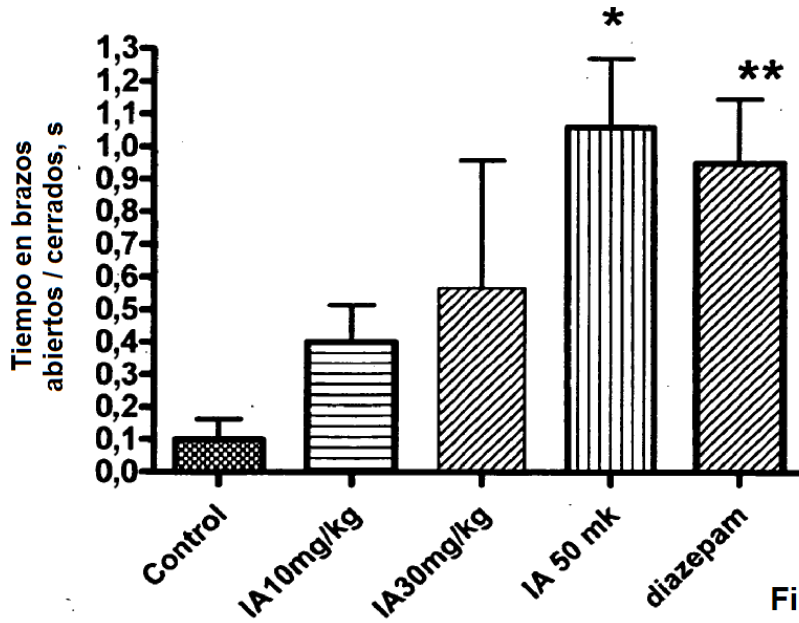


Figura 7

Prueba de natación de Porsolt para comprobar la actividad "antidepresiva"

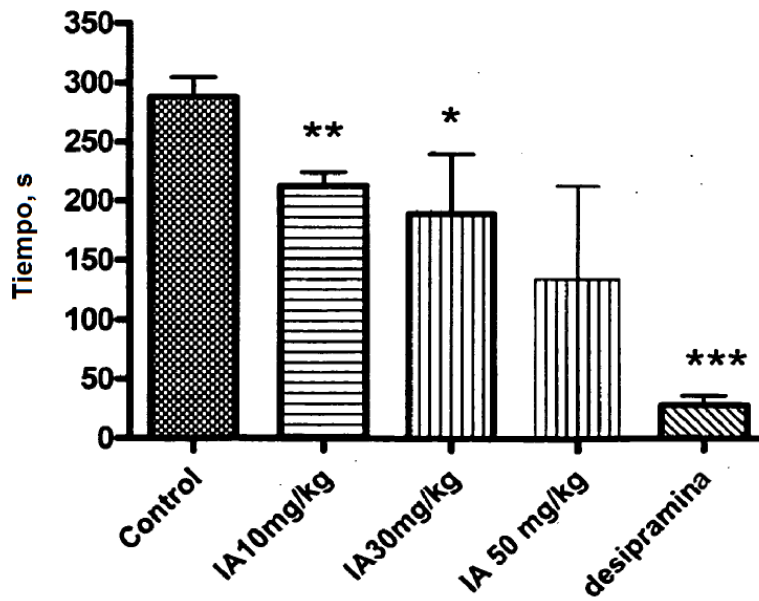


Figura 8

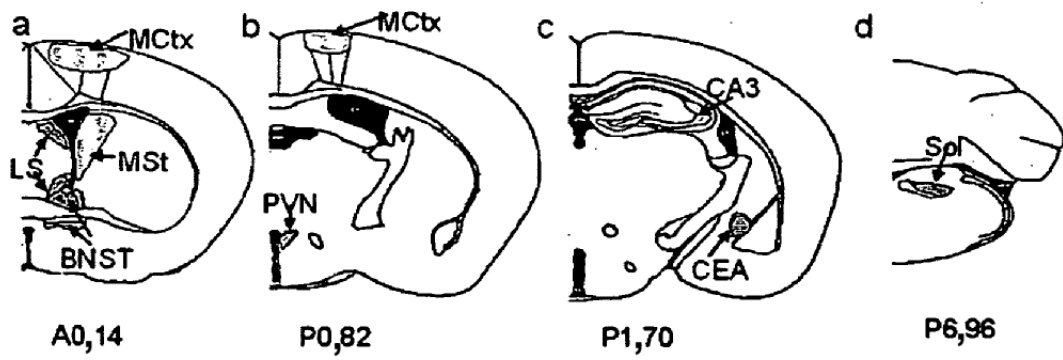


Figura 9A

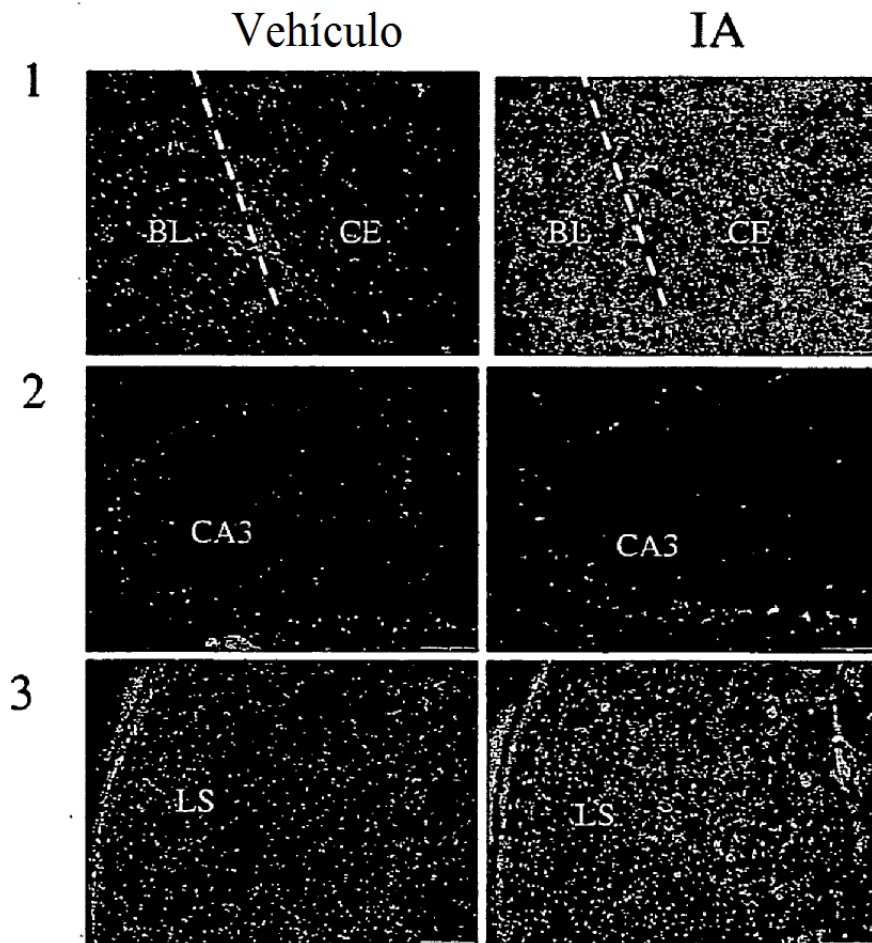


Figura 9B

Región	Subregión / núcleo	Vehículo (n = 4)		IA (n = 5)		Valor de t	df	P
		Media	DT	Media	DT			
Corteza	Cuerpo calloso	29,875	16,265	38,2	20,825	-0,653	7	0,5346
	Motor	12,125	5,36	3,7	3,2711	2,9258	7	<u>0,0222</u>
	Somático-sensorial	2,875	4,0078	1,5	1,4142	0,7235	7	0,4928
	Auditiva	11,875	5,5434	45,7	47,228	-1,4051	7	0,2028
	Olfatoria	20,625	10,291	17	7,6076	0,6101	7	0,5611
	Perirrinal	11,25	8,2614	17,9	9,3167	-1,1164	7	0,3011
	Dorsal endopiriforme	19,5	7,8951	22,1	12,803	-0,3532	7	0,7343
Hipocampo	CA1 2	1,375	0,75	0,6	0,8216	1,4593	7	0,1879
	CA3	13,5	2,4833	4,7	3,2133	4,4882	7	<u>0,0028</u>
	Circunvolución fasciolada	12,5	2,4495	17	10,84	-0,8034	7	0,4481
	Subículo	0,75	0,9574	0,3	0,6708	0,8321	7	0,4328
Amígdala	Núcleo central	17,5	10,4	52,1	15,433	-3,8185	7	<u>0,0066</u>
	Núcleo basolateral	35,5	16,176	33,8	22,298	0,1273	7	0,9023
	Núcleo corticomedia	31,5	19,188	41,3	20,216	-0,7385	7	0,4842
Núcleo del lecho de la estría terminal	Dorsal	8,5	1,0607	20,1	13,081	-2,1012	7	0,07
	Ventral	19	19,092	39,4	31,466	-1,7	7	0,1245
Septo	Lateral	41,875	24,216	85,2	25,871	-2,5654	7	<u>0,0373</u>
Cuerpo estriado	Lateral	1,25	1,6583	1,2	1,9558	0,0406	7	0,9687
	Medial	14,125	4,0285	5,2	3,5812	3,5203	7	<u>0,0097</u>
Tálamo	Paraventricular	24,5	2,9721	35,4	11,459	-1,8303	7	0,1099
	Intermediadorsal	7,75	10,836	10,9	6,5326	-0,5433	7	0,6038
	Geniculado lateral	18,875	5,3131	21,4	14,762	-0,322	7	0,7568
Hipotálamo	Lateral	34,125	4,8541	41,6	24,605	-0,5905	7	0,5734
	Ventromedial	10,625	7,1458	15,5	2,6693	-1,4264	7	0,1968
	Paraventricular	16,625	11,884	45,4	26,409	-2,0021	7	<u>0,0854</u>
	Anterior	20,75	10,603	26	15,096	-0,586	7	0,5763
	Mediodorsal	44,375	8,0039	38,1	11,589	0,9164	7	0,3899
Tronco del encéfalo	Central gray	12,5	7,6267	17,4	4,6422	-1,1969	7	0,2703
	Edinger Westphal	2,25	3,0687	3,8	4,1473	-0,6205	7	0,5546
	Núcleo solitario	18,875	20,738	78	12,247	-4,9098	6	<u>0,0027</u>

Figura 9C

Figura 10A

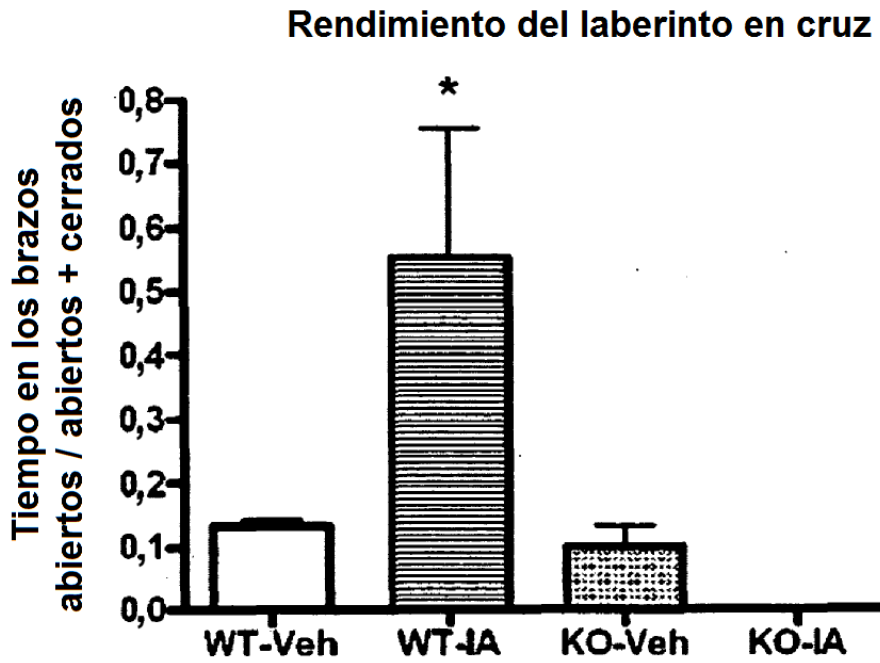
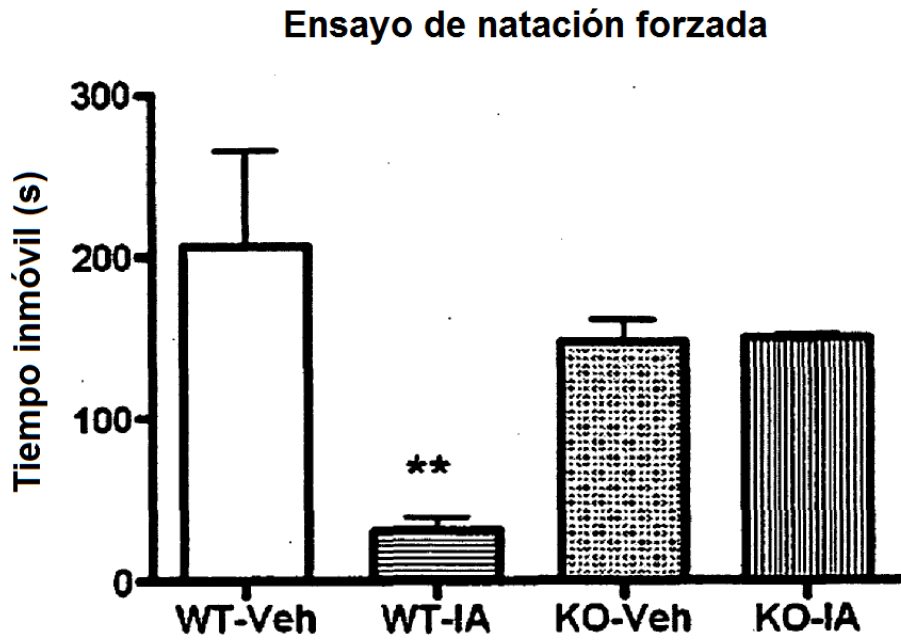


Figura 10B



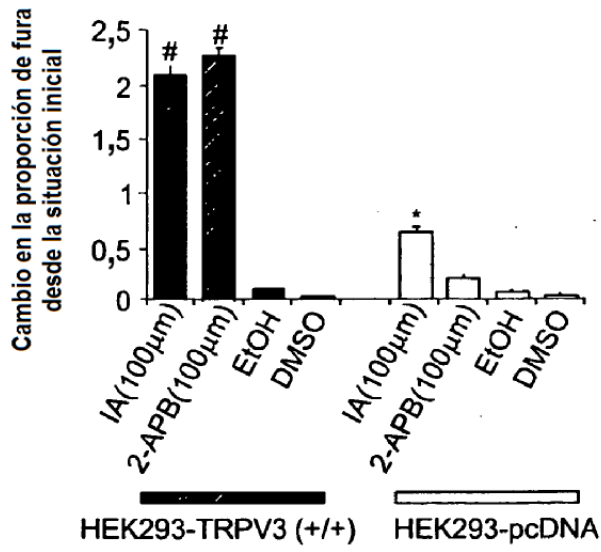


Figura 12A

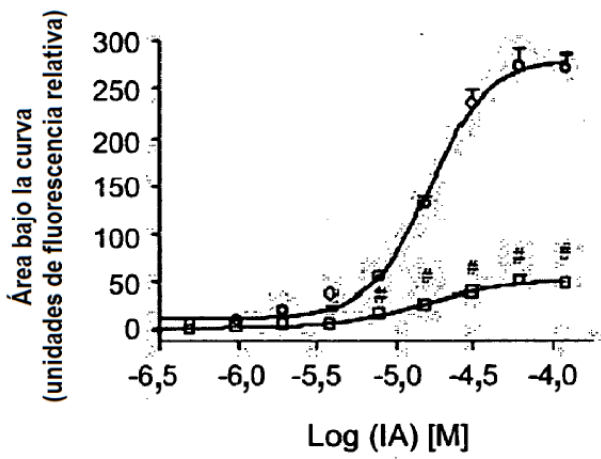


Figura 12B

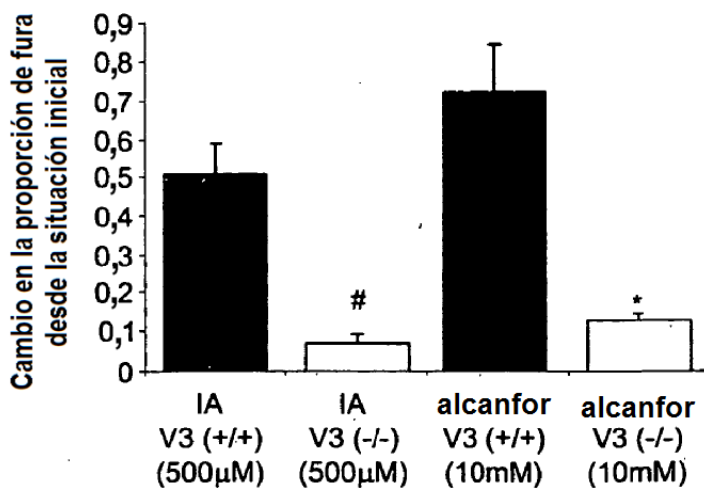
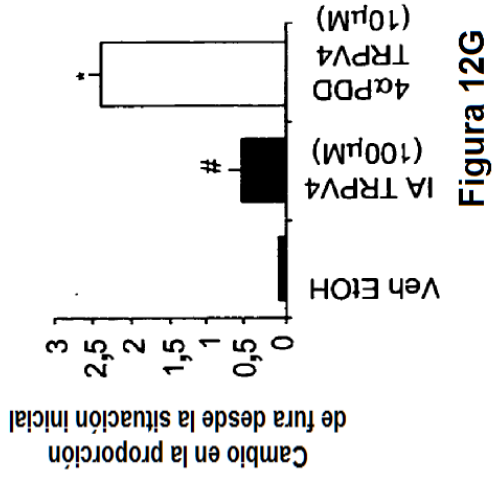
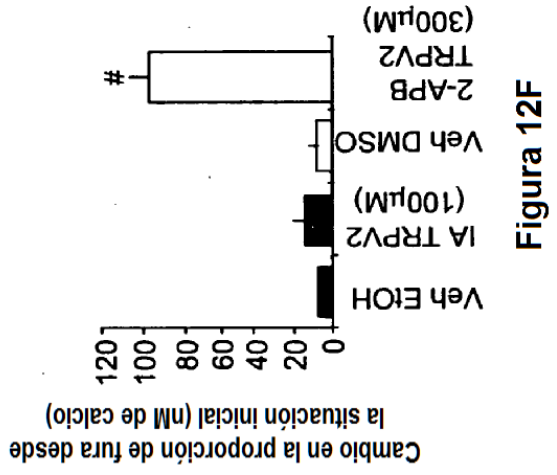
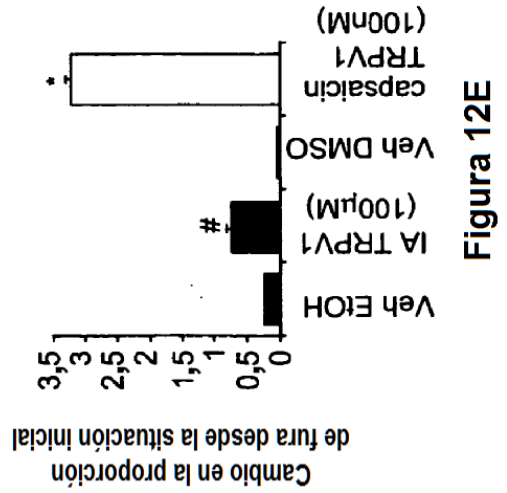
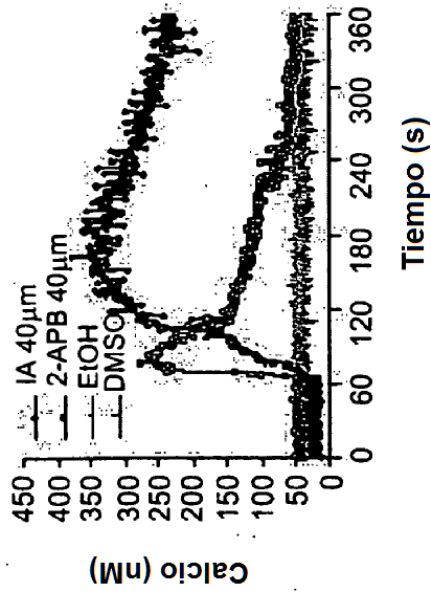


Figura 12C





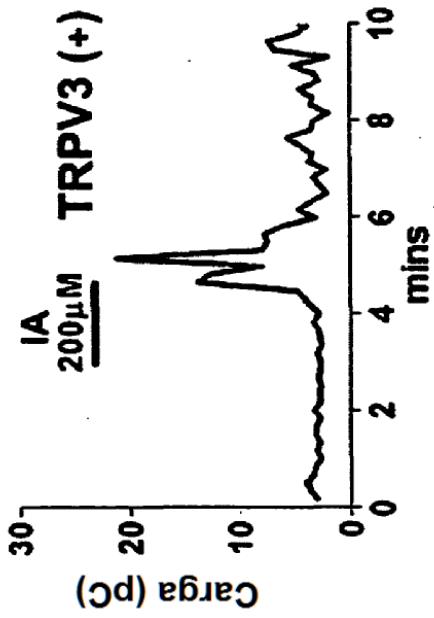


Figura 13A

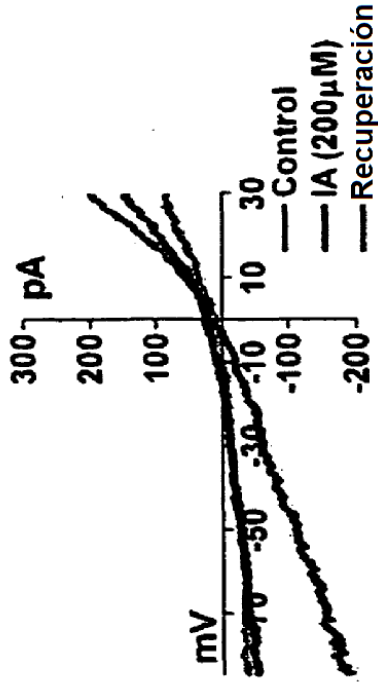


Figura 13B

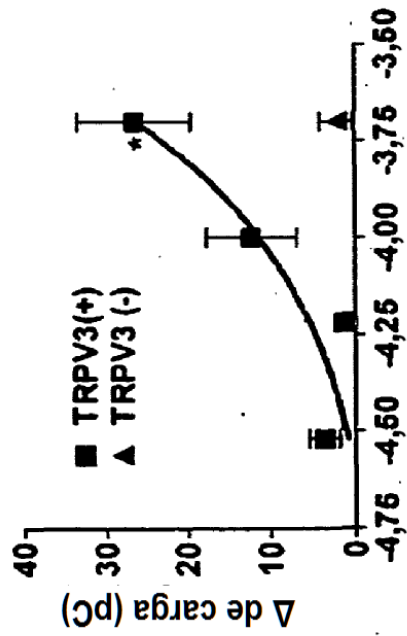


Figura 13C

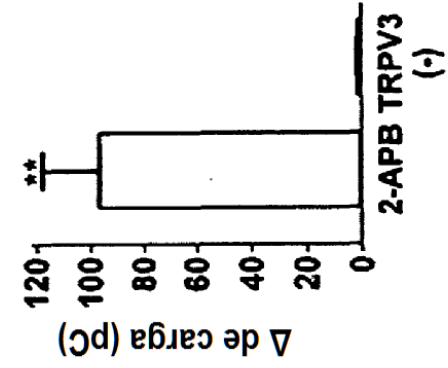


Figura 13D

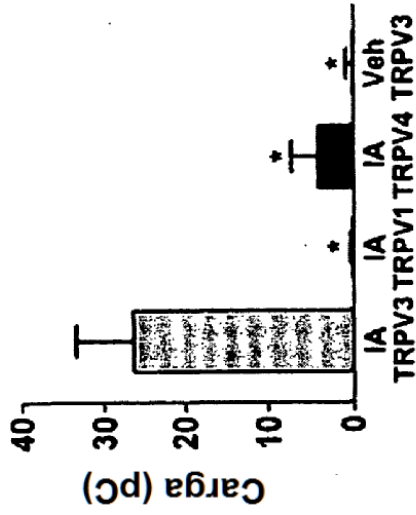


Figura 13E