(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 575 684**

(51) Int. CI.:

C07D 207/04 (2006.01)
C07D 207/27 (2006.01)
A61K 38/06 (2006.01)
A61P 25/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2011 E 11788579 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 2611775**

(54) Título: **Agonistas de receptores de neurotrofinas y su uso como medicamentos**

(30) Prioridad:

31.08.2010 US 378823 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.06.2016

(73) Titular/es:

BIONURE FARMA, S.L. (33.3%)
Dalmases 27 Local 1
08017 Barcelona, ES;
INSTITUT D'INVESTIGACIONS BIOMÈDIQUES AUGUST PI I SUNYER (33.3%) y
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (33.3%)

(72) Inventor/es:

VILLOSLADA, PABLO y
MESSEGUER, ANGEL

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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

Agonistas de receptores de neurotrofinas y su uso como medicamentos

Antecedentes de la invención

La presente solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación anterior de la Solicitud Provisional de los EE.UU. N.º: 61/378.823, presentada el 31 de agosto, 2010.

Campo de la invención

La presente invención se aplica al área de productos terapéuticos para trastornos neurológicos, psiquiátricos y el envejecimiento. En particular, se refiere al efecto neuroprotector de agonistas de molécula pequeña de receptores de neurotrofinas (factor de crecimiento nervioso (NGF) o factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)) y al uso de esos agonistas como medicamentos.

Técnica antecedente

Trastornos del envejecimiento, neurológicos y psiquiátricos causan muerte y daño a células nerviosas. El daño frecuente y relevante al sistema nervioso puede ser el resultado de degeneración neuronal, isquemia, inflamación, respuestas inmunes, traumatismo y cáncer, entre otras cosas. Como consecuencia de estos, las células nerviosas pueden morir en minutos u horas o sobrevivir a este daño inicial en un estado alterado que activa neurodegeneración, terminando igualmente en la muerte celular.

Dada la importancia del sistema nervioso en permitir habilidades motoras básicas y en percepción, existe un interés en encontrar armas terapéuticas para proteger el sistema nervioso.

La neuroprotección se centra en la preservación, recuperación, cura, o regeneración del sistema nervioso, sus células, su estructura y su función (Vajda et al., 2002). Un objetivo de neuroprotección es evitar o minimizar los efectos de un daño original sobre el sistema nervioso, o evitar o minimizar las consecuencias de procesos nocivos endógenos o exógenos que causan daño a axones, neuronas, sinapsis y dendritas.

Las estrategias de tratamiento en general con frecuencia se basan en la modulación de un único factor de lesión propuesto. Aunque tales tratamientos pueden mostrar ser beneficiosos en modelos animales altamente restringidos, es menos probable que resulten eficaces en el trastorno humano más complejo que implica grados más variables de gravedad de la lesión en una población genéticamente diversa (Faden y Stoica, 2007). De forma importante, puesto que los mecanismos supuestos de muerte neuronal son tanto complejos como variados, tales como estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, agregación de proteínas, apoptosis e inflamación (Youdim et al., 2005), son deseables compuestos individuales que tengan efectos multipotenciales sobre mecanismos de lesión múltiples.

Varios fármacos neuroprotectores están sometidos a investigación incluyendo las siguientes clases: agentes antiinflamatorios, antagonistas de N-metil D-aspartato (NMDA), antagonistas de ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA), dexanabinol, bloqueantes de los canales de sodio, hormona liberadora de tirotropina (TRH), factores de crecimiento, glucocorticoides, cafeinol, antagonistas opioides, inhibidores de la apoptosis, atrapadores/neutralizadores de radicales libres , eritropoyetina, bloqueantes de canales de calcio, sulfato de magnesio y estatinas.

La capacidad de estos agentes farmacológicos para limitar el daño bioquímico secundario y la muerte celular ha sido decepcionante (Faden y Stoica, 2007).

Las neurotrofinas son factores de crecimiento que regulan el desarrollo y el mantenimiento de los sistemas nerviosos periférico y central (Lewin y Barde, 1996). El factor de crecimiento nervioso (NGF) es el primer miembro descubierto y el mejor caracterizado de la familia de las neurotrofinas, que incluye otras proteínas relacionadas estructuralmente, tales como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). El factor de crecimiento nervioso (NGF) es una proteína homodimérica de la familia de las neurotrofinas que desempeña un papel crucial en la supervivencia neuronal, la diferenciación neuronal y el crecimiento neuronal (Levi-Montalcini, 1987) y une dos receptores celulares distintos: el receptor de tirosina cinasa TrkA y el receptor p75 (Chao, 2003). La unión de NGF-TrkA activa la tirosina cinasa intrínseca del receptor, causando fosforilación de tirosina de TrkA y compañeros de señalización asociados y activando por lo tanto la promoción de la supervivencia celular o la diferenciación celular (Kaplan y Miller, 2000). El receptor p75 es un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral. Dependiendo del entorno celular y del tipo de ligando, p75 puede actuar como un transductor de señales pro-supervivencia, pro-apoptóticas, o pro-diferenciación (Barker, 1998; Rabizadeh et al.., 1999; Zaccaro et al., 2001; Saragovi y Zaccaro, 2002). En consecuencia, dependiendo de la vía metabólica, la unión bien a receptores TrkA o bien a receptores p75 puede desencadenar señales, dependiendo del tipo celular considerado, ligadas a, indistintamente, la diferenciación y/o la supervivencia celular. Las neurotrofinas actúan a través de dos rutas de señalización principales: la ruta de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)-AKT y la ruta de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) -MEK (ambas rutas están implicadas en la inhibición de la apoptosis). Se sabe que los factores neurotróficos actúan también en neuronas maduras y en particular en células dañadas y degenerativas (Lindvall et al. 1994; Tuszynski y Gage 1995; Lykissas et

al. 2007; Song et al. 2.009).

Se ha indicado el potencial de NGF como un agente terapéutico para varias enfermedades por varios investigadores. Tales enfermedades incluyen trastornos neurodegenerativos, inflamación de los nervios y determinados tipos de cánceres, esclerosis múltiple, neuromielitis óptica, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, ataxia de Friedreich, enfermedad de Huntington, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia muscular espinal, trastorno depresivo mayor, esquizofrenia, glaucoma o neuropatías periféricas (neuropatía diabética o neuropatía del SIDA) (Longo et al., 2007; Schulte-Herbruggen, 2007; Shi, 2007; Hellveg, 2008; Shoval, 2005; Apfel, 2002; Anand, 2004). NGF tiene propiedades inmunorreguladoras significativas durante la inflamación en el SNC para contribuir al mantenimiento del privilegio del SNC (Villoslada y Genain, 2004). Durante la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) en titi, NGF pudo inhibir el desarrollo de los síntomas clínicos cuando se administró intracerebroventricularmente por infusión continua aparentemente debido a su capacidad para inducir un microentorno inmunosupresor en el SNC lo que da lugar a infiltración en el SNC decrecida (Villoslada et al., 2000). El hallazgo de que NGF induce inmunosupresión durante desmielinización autoinmune además de sus propiedades neuroprotectoras en neuronas y oligodendrocitos hace que sea un muy buen candidato para el tratamiento de enfermedades inflamatorias en el SNC como EM. Sin embargo, NGF no es el candidato a fármaco ideal debido a su incapacidad para cruzar la barrera hematoencefálica (BBB) (Poduslo y Curran, 1996), su corta semivida y sus efectos secundarios (Apfel, 2002). Se ha hecho un gran esfuerzo en la búsqueda de moléculas pequeñas con actividad agonista de NGF, con mejores farmacocinéticas y menos efectos secundarios. Para lograr este objetivo, se han intentado enfoques diferentes (Poduslo y Curran, 1996; Longo et al., 1997; Maliartchouk et al., 2000a; Maliartchouk et al., 2000b; Peleshok y Saragovi, 2006). El documento EP 1338604 describe trímeros de N-alquilglicina capaces de proteger las neuronas contra agresiones excitotoxicas, útiles como neuroprotectores y su uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos mediados por la excitotoxicidad.

Como tal, existe una necesidad creciente para proporcionar fármacos, en particular NGF-miméticos, con propiedades neuroprotectoras, que tengan preferentemente efectos multipotenciales, pero sin las desventajas de NGF. Los autores de la presente invención han desarrollado una familia de compuestos distintos de los divulgados en la técnica. La familia de los compuestos de la invención son peptidomiméticos de neurotrofinas (NGF, BDNF) y agonistas para receptores específicos TrkA, TrkB y p75. Algunos de los compuestos de la invención promueven, a modo de ejemplo, la supervivencia celular en un grado incluso mayor que NGF por sí mismo. Los compuestos de la invención se consideran peptidomiméticos de neurotrofinas y todos ellos comparten una estructura de trímeros de N-alquilglicina.

Sumario de la invención

La presente divulgación describe el uso de compuestos peptoides de las Fórmulas I-V, a continuación y las sales farmacéuticamente aceptables, como agonistas de receptores de neurotrofinas y específicamente receptores de factor de crecimiento nervioso (NGF) y receptores de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).

Los compuestos útiles en la presente invención no se han comunicado hasta el momento. Así, un aspecto de la presente invención se refiere a compuestos novedosos de Fórmula II o a una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la que R_1 es fenilo sustituido con halógeno o trifluorometilo y además opcionalmente sustituidos con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, alquilo C_{1-6} alcoxi (C_{1-6}) y haloalquilo (C_{1-6}); y R_2 es 2-oxo-pirrolidin-1-ilmetilo o sulfamoilfenilo, así como sus sales farmacéuticamente aceptables.

Otro aspecto de la invención se refiere a compuestos de Fórmula II y sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso como agonistas de receptores NGF. Otro aspecto de la invención se refiere a compuestos de Fórmula II y sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso como agonistas de receptores de BDNF.

Un aspecto adicional de la invención también proporciona un compuesto de Fórmula II, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como un medicamento. En un aspecto de la invención, el medicamento es para su uso en evitar o tratar muerte o daño de células nerviosas. En un aspecto de la invención, el medicamento es para su uso en neuroprotección. En un aspecto de la invención, el medicamento es para su uso en la regeneración de las células nerviosas. En un aspecto de la invención, el medicamento es para su uso en mejora neuronal. En un aspecto, el medicamento es para su uso en evitar o tratar de una enfermedad neurológica o psiquiátrica. En un aspecto de la invención, el medicamento es para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en una enfermedad neurológica, un trastorno preferencialmente neurodegenerativo (tal como esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, ataxia de Friedreich, enfermedad de Huntington, demencia con cuerpos de Lewy y atrofia muscular espinal), inflamación de los nervios (tal como esclerosis múltiple y neuromielitis óptica), trastorno depresivo principal, esquizofrenia, glaucoma, neuropatía periférica (tal como diabética o neuropatía asociada al SIDA) y cáncer (tal como glioblastoma, astrocitoma, meduloblastoma, neurinoma, neuroblastoma, meningioma, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de próstata, leucemia, leucemia linfocítica aguda, osteosarcoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma ovárico, adenocarcinoma pulmonar y carcinoma esofágico).

Un aspecto adicional de la invención es proporcionar un compuesto de Fórmula II, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como un medicamento para el tratamiento de esclerosis múltiple.

Un aspecto adicional de la invención es proporcionar un compuesto de Fórmula II, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como un medicamento, en el que el medicamento es un fármaco neurorregenerador.

Un aspecto adicional de la invención es proporcionar un compuesto de Fórmula II, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como un medicamento, en el que el medicamento es un fármaco inmunomodulador.

Un aspecto adicional de la invención es proporcionar un compuesto de Fórmula II, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como un medicamento, en el que el medicamento tiene una combinación de efectos neuroprotectores e inmunomoduladores.

Un aspecto adicional de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto de Fórmula II, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un aspecto adicional de la invención es proporcionar el uso de un compuesto de Fórmula II, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la elaboración de un medicamento para evitar o tratar muerte o daño de células nerviosas.

Un aspecto adicional de la invención es proporcionar el uso de un compuesto de Fórmula II, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la elaboración de un medicamento para proporcionar neuroprotección.

Un aspecto adicional de la invención es proporcionar el uso de un compuesto de Fórmula II, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la elaboración de un medicamento para la regeneración de células nerviosas.

Un aspecto adicional de la invención es proporcionar el uso de un compuesto de Fórmula II, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la elaboración de un medicamento para evitar o tratar una enfermedad neurológica o una enfermedad psiquiátrica.

Un aspecto adicional de la invención es proporcionar el uso de un compuesto de Fórmula II, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la elaboración de un medicamento para evitar o tratar una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en una enfermedad neurológica, un trastorno preferencialmente neurodegenerativo (tal como esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, ataxia de Friedreich, enfermedad de Huntington, demencia con cuerpos de Lewy y atrofia muscular espinal), inflamación de los nervios (tal como esclerosis múltiple y neuromielitis óptica), trastorno depresivo principal, esquizofrenia, glaucoma, neuropatía periférica (tal como neuropatía diabética o neuropatía asociada al SIDA) y cáncer (tal como glioblastoma, astrocitoma, meduloblastoma, neurinoma, neuroblastoma, meningioma, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de próstata, leucemia, leucemia linfocítica aguda, osteosarcoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma ovárico, adenocarcinoma pulmonar y carcinoma esofágico).

Un aspecto adicional de la invención es proporcionar el uso de un compuesto de Fórmula II, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la elaboración de un medicamento para evitar o tratar esclerosis múltiple.

Un aspecto adicional de la invención es proporcionar el uso de un compuesto de Fórmula II, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la elaboración de un fármaco neurorregenerativo.

Un aspecto adicional de la invención es proporcionar el uso de un compuesto de Fórmula II, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la elaboración de un inmunomodulador.

Un aspecto adicional de la invención es proporcionar el uso de un compuesto de Fórmula II, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la elaboración de un medicamento que tiene una combinación de efectos neuroprotectores e inmunomoduladores.

Un aspecto adicional de la invención es proporcionar el uso de un compuesto de Fórmula II, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la elaboración de un fármaco de mejora neuronal.

En el presente documento se describe un procedimiento para evitar o tratar muerte o daño de células nerviosas, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-V, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-V, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La divulgación también describe un procedimiento para proporcionar neuroprotección, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-V, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-V, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

También se describe un procedimiento para proporcionar inmunomodulación, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-V, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un compuesto de

cualquiera de las Fórmulas I-V, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La divulgación también describe un procedimiento para regenerar células nerviosas, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-V, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-V, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

También se divulga un procedimiento para evitar o tratar una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en una enfermedad neurológica, un trastorno neurodegenerativo preferencialmente (tal como esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, ataxia de Friedreich, enfermedad de Huntington, demencia con cuerpos de Lewy y atrofia muscular espinal), inflamación de los nervios (tal como la esclerosis múltiple y la neuromielitis óptica), trastorno depresivo principal, esquizofrenia, glaucoma, neuropatía periférica (tal como neuropatía diabética o neuropatía asociada al SIDA) y cáncer (tal como glioblastoma, astrocitoma, meduloblastoma, neurinoma, neuroblastoma, meningioma, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de próstata, leucemia, leucemia linfocítica aguda, osteosarcoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma ovárico, adenocarcinoma pulmonar y carcinoma esofágico), que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-V, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-V, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La divulgación describe un procedimiento para evitar o tratar esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, o glaucoma, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-V, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-V, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La divulgación también describe un procedimiento de tratamiento de una enfermedad que responde a la estimulación de la actividad de neurotrofinas, o de un receptor de neurotrofinas, en un mamífero que padece ausencia de estimulación del mismo, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-V, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un aspecto adicional de la invención es proporcionar un compuesto de Fórmula II, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en estimular la actividad de neurotrofinas, o de un receptor de neurotrofinas.

La divulgación describe un procedimiento para estimular actividad de receptores de neurotrofinas en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-V, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al sujeto. En un modo de realización, el receptor de neurotrofinas es receptor TrkA, receptor TrkB, o receptor p75.

La divulgación describe un procedimiento de tratamiento de una enfermedad que responde a la estimulación de la actividad del factor de crecimiento nervioso, o de un receptor del factor de crecimiento nervioso, en un mamífero que sufre de ausencia de estimulación del mismo, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-V, o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo.

Un aspecto adicional de la invención es proporcionar un compuesto de Fórmula II, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en estimular la actividad del factor de crecimiento nervioso, o de un receptor del factor de crecimiento nervioso.

La divulgación describe un procedimiento para estimular actividad del receptor del factor de crecimiento nervioso en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar un compuesto de cualquiera de las fórmulas I-V, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al sujeto. En un modo de realización, el receptor del factor de crecimiento nervioso es receptor TrkA o receptor p75.

La divulgación describe un procedimiento para tratar una enfermedad que responde a la estimulación de la actividad de factor neurotrófico derivado del cerebro, o de un receptor de factor neurotrófico derivado del cerebro, en un mamífero que sufre de ausencia de estimulación del mismo, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-V, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un aspecto adicional de la invención es proporcionar un compuesto de Fórmula II, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en estimular la actividad del factor neurotrófico derivado del cerebro, o de un receptor del factor neurotrófico derivado del cerebro.

También se describe un procedimiento para estimular la actividad receptora del factor neurotrófico derivado del cerebro en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-V, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al sujeto. En un modo de realización, el receptor del factor de crecimiento nervioso es receptor TrkB o receptor p75.

La divulgación describe un procedimiento para preparar una composición farmacéutica, que comprende mezclar una

cantidad eficaz de un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-V, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Modos de realización adicionales y ventajas de la invención se expondrán en parte en la descripción siguiente y se derivarán de la descripción, o se pueden aprender por la práctica de la invención. Los objetivos y ventajas de la invención se pondrán en práctica y se conseguirán por medio de los elementos y combinaciones señalados en particular en las reivindicaciones adjuntas.

Debe entenderse que tanto el sumario anterior como la siguiente descripción detallada son únicamente ejemplares y explicativos y no son restrictivos de la invención según se reivindica.

Breve descripción de los dibujos/figuras

FIG. 1 representa los resultados del Ejemplo 2 sobre G79, G80 y G81 en el ensayo de diferenciación de respuesta a dosis en la línea celular PC 12. FIG. 1A representa imágenes de células PC 12 diferenciadas en presencia de G79. FIG. 1B representa imágenes de células PC 12 diferenciadas en presencia de G80. FIG. 1C representa imágenes de células PC 12 diferenciadas en presencia de G81. FIG. 1D muestra el número de células diferenciadas en el ensayo de diferenciación de respuesta a dosis. FIG. 1E muestra el porcentaje de células diferenciadas calculado en relación a diferenciación inducida por NGF. Los datos son la media ± EEM de al menos tres experimentos, cada uno por duplicado.

FIG. 2 muestra efectos de G79, G80 y G81 en la promoción de supervivencia celular de RN22. Están representadas las medias ± E.E. de tres experimentos, cada uno por duplicado. *p < 0,05, **p < 0,01 (ANOVA) respecto al control de estrés.

FIG. 3 representa los efectos de G79, G80 y G81 en un ensayo de actividad de secretagogos (FIG. 3A), en un ensayo de actividad sinérgico (FIG. 3B), en un ensayo de activación de TrkA (FIG. 3C), en un ensayo de inhibición de señalización en presencia de LY294002 (FIG. 3D) y en un ensayo de inhibición de señalización en presencia de PD98059 (FIG. 3E). FIG. 3F-3J muestran los efectos representados en la FIG. 3A-3E, respectivamente, como porcentajes de células diferenciadas calculados con relación a diferenciación inducida por NGF.

FIG. 4 representa los resultados de G79 en un modelo de glaucoma. FIG. 4A muestra el recuento de las células ganglionares retinianas para el control, el placebo, 200 µg/ml de NGF, 200 µg/ml de G79 y 400 µg/ml de G79. FIG. 4B muestra secciones de la retina después del tratamiento con control, placebo, 200 µg/ml de NGF, 200 µg/ml de G79 y 400 µg/ml de G79. FIG. 4C muestra el recuento de las células ganglionares retinianas para el control, el placebo, 200 µg/ml de G79, timolol y 200 µg/ml de G79 y timolol.

FIG. 5 representa los resultados de G79, G80 y G81 en el modelo de la enfermedad de Parkinson (FIG. 5A) y en el modelo de estrés oxidativo (FIG. 5B).

FIG. 6 representa las imágenes fluorofóricas de los resultados del análisis de transferencias de western de células PC12 tratadas con 100 ng/ml de G79.

FIG. 7 muestra la ruta intracelular activada por la fosforilación del receptor de tirosina cinasa (RTK). FIG. 8 representa los efectos de G79 y BDNF sobre los niveles de activación de las fosfoproteínas ATF-2, HSP-27, JNK y STAT-1 probados por tecnología Luminex.

FIG. 9 representa los efectos de G79 en el ensayo de unión de citometría del Ejemplo 13. FIG. 9A muestra la fluorescencia de los canales promedio (MCF) en el ensayo de competición en PC12 (NGF/G79-FITC). FIG. 9B muestra la MCF en el ensayo de competición en PC12 (NGF/G79-FITC) con anticuerpo anti-TrkA. FIG. 9C muestra la MCF en el ensayo de competición en PC12 (NGF/G79-FITC) con anticuerpo anti-p76. FIG. 9D muestra la MCF en el ensayo de competición en SH-SY5Y (BDNF/G79- FITC).

FIG. 10 representa los resultados de G79, G80 y G81 en el modelo *in vitro* de esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

FIG. 11 muestra los resultados de G79, amida gambógica y xaliprodeno en la aplicación preventiva en el modelo *in vivo* de EM después de la administración i.p. de G79 o amida gambógica (FIG. 11A) y después de la administración oral de xaliprodeno (FIG. 11B).

FIG. 12 muestra los resultados de G79, amida gambógica y xaliprodeno en la aplicación curativa en el modelo *in vivo* de EM después de la administración oral.

FIG. 13 representa los resultados del efecto de G79 en la inducción de la enzima iNOS durante 48 horas.

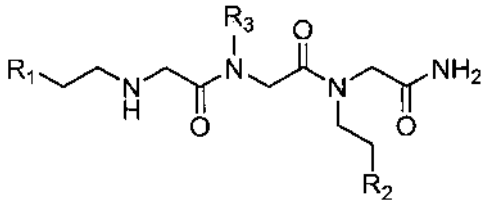
FIG. 14 representa los resultados de G79 en el modelo *in vitro* para neuroinflamación. FIG. 14A muestra la producción de TNFα en cultivo organotípico cerebeloso y la FIG. 14B muestra la producción de IL-1β en cultivo organotípico cerebeloso.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación se basa en el uso de los compuestos de las Fórmulas I-V y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, como los agonistas de receptores de neurotrofinas y en especial como los agonistas de receptores de factor de crecimiento nervioso (NGF) y de receptores de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). En vista de esta propiedad, compuestos de las Fórmulas I-V y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son útiles para evitar o tratar enfermedades que responden a la estimulación de receptores de neurotrofinas y en especial el factor de crecimiento nervioso o un receptor del factor de crecimiento nervioso, o el factor neurotrófico derivado del cerebro o un receptor del factor neurotrófico derivado del cerebro.

Compuestos de cualquiera de las Fórmulas I-V muestran una actividad similar a NGF buena "in vitro" induciendo diferenciación de células PC12 y promoviendo la supervivencia celular de células RN22 y por lo tanto, tienen propiedades neuroprotectoras. La presente invención se refiere a una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la que R_1 es fenilo sustituido con halógeno o trifluorometilo y además opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, alquilo C_{1-6}, alcoxi (C_{1-6}) y haloalquilo (C_{1-6}) y R_2 es 2-oxo-pirrolidin-1-ilmetilo o sulfamoilfenilo.

La divulgación describe compuestos representados por la Fórmula I:



I

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la que

R_1 es fenilo sustituido con halógeno o trifluorometilo y además opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, alquilo C_{1-6}, alcoxi (C_{1-6}) y haloalquilo (C_{1-6}); o R_1 es pirrolidin-1-ilo;

R_2 es 2-oxo-pirrolidin-1-ilmetilo o sulfamoilfenilo; y

R_3 se elige de propilo, 1-metiletilo, butilo, 2-metilpropilo, pentilo, 1-metilbutilo, 2-metilbutilo, hexilo, 4-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-metilpentilo y 1-metilpentilo.

Los compuestos descritos en el presente documento incluyen compuestos de Fórmula I, en los que R_1 es fluorofenilo. En un modo de realización, el grupo fluorofenilo es 2-fluorofenilo, 3-fluorofenilo o 4-fluorofenilo. Preferentemente, R_1 es 2-fluorofenilo. En un modo de realización, el grupo fluorofenilo está sustituido adicionalmente con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, alquilo C_{1-6}, alcoxi (C_{1-6}) y haloalquilo (C_{1-6})alquilo; preferentemente uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, alquilo C_{1-4}, alcoxi (C_{1-4}) y haloalquilo (C_{1-4}); más preferentemente uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, metilo, etilo, propilo, isopropilo, metoxi, etoxi, fluorometilo y trifluorometilo.

Los compuestos descritos en el presente documento incluyen compuestos de Fórmula I, en la que R_1 es clorofenilo. En un modo de realización, el grupo clorofenilo es 2-clorofenilo, 3-clorofenilo o 4-clorofenilo. En un modo de realización, R_1 es 2-clorofenilo. En un modo de realización, el grupo clorofenilo está adicionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, alquilo C_{1-6}, alcoxi (C_{1-6}) y haloalquilo (C_{1-6}); preferentemente uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, alquilo C_{1-4}, alcoxi (C_{1-4}) y haloalquilo (C_{1-4}); más preferentemente uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, metilo, etilo, propilo, isopropilo, metoxi, etoxi, fluorometilo y trifluorometilo.

Los compuestos descritos en el presente documento incluyen compuestos de Fórmula I, en la que R_1 es bromofenilo. En un modo de realización, el grupo bromofenilo es 2-bromofenilo, 3-bromofenilo o 4-bromofenilo. En un modo de realización, R_1 es 2-bromofenilo. En un modo de realización, el grupo bromofenilo está adicionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, alquilo C_{1-6}, alcoxi (C_{1-6}) y haloalquilo (C_{1-6}); preferentemente uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, alquilo C_{1-4}, alcoxi (C_{1-4}) y haloalquilo (C_{1-4}); más preferentemente uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, metilo, etilo, propilo, isopropilo, metoxi, etoxi, fluorometilo y trifluorometilo.

Los compuestos descritos en el presente documento incluyen compuestos de Fórmula I, en los que R_1 es yodofenilo. En un modo de realización, el grupo yodofenilo es 2-yodofenilo, 3-yodofenilo o 4-yodofenilo. En un modo de realización, R_1 es 2-yodofenilo. En un modo de realización, el grupo yodofenilo está adicionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, alquilo C_{1-6}, alcoxi (C_{1-6}) y haloalquilo (C_{1-6}); preferentemente uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, alquilo C_{1-4}, alcoxi (C_{1-4}) y haloalquilo (C_{1-4}); más preferentemente uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, metilo, etilo, propilo, isopropilo, metoxi, etoxi, fluorometilo y trifluorometilo.

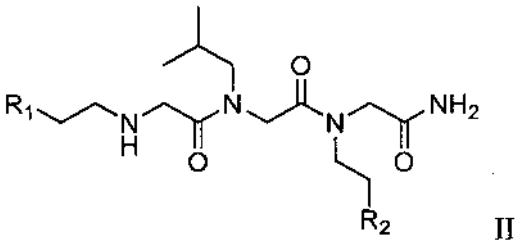
Los compuestos descritos en el presente documento incluyen compuestos de Fórmula I, en la que R_1 es trifluorometilfenilo. En un modo de realización, el grupo trifluorometilfenilo es 2-trifluorometilfenilo, 3-trifluorometilfenilo o 4-trifluorometilfenilo. Compuestos útiles incluyen aquellos en los que R_1 es 2-trifluorometilfenilo. En un modo de realización, el grupo trifluorometilfenilo está adicionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, alquilo C_{1-6}, alcoxi (C_{1-6}) y haloalquilo (C_{1-6}); preferentemente uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, alquilo C_{1-4}, alcoxi (C_{1-4}) y haloalquilo (C_{1-4}); más preferentemente uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, metilo, etilo, propilo, isopropilo, metoxi, etoxi, fluorometilo y trifluorometilo.

Los compuestos descritos en el presente documento incluyen compuestos de Fórmula I, en los que R_1 es pirrolidin-1-ilo.

Los compuestos descritos en el presente documento incluyen compuestos de Fórmula 1, en los que R_2 es 2-oxo-pirrolidin-1il-metilo.

Los compuestos descritos en el presente documento incluyen compuestos de Fórmula I, en los que R_2 es sulfamoilfenilo. En un modo de realización, el grupo sulfamoilfenilo es 2-sulfamoilfenilo, 3-sulfamoilfenilo, o 4-sulfamoilfenilo. Preferentemente, R_2 es 4-sulfamoiletilo.

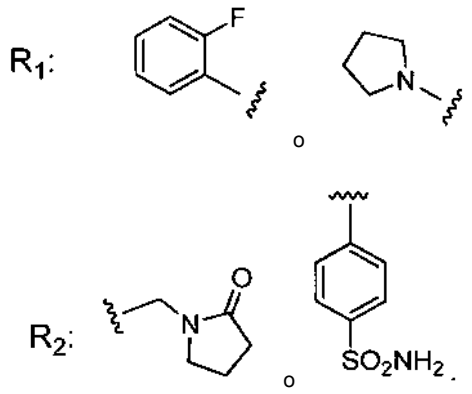
En un modo de realización, los compuestos útiles en la presente invención son compuestos de Fórmula I, donde R_3 es 2- metilpropilo, que tiene la Fórmula II:



II

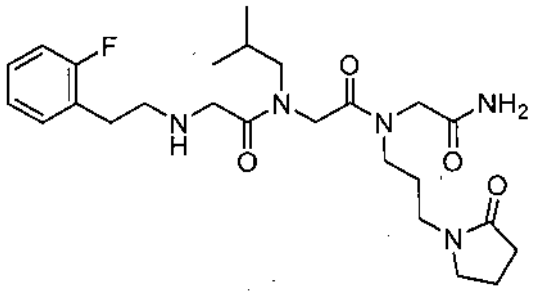
y sales farmacéuticamente aceptables, en la que R_1 es fenilo sustituido con halógeno o trifluorometilo y además opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, alquilo C_{1-6}, alcoxi (C_{1-6}) y haloalquilo (C_{1-6}) y R_2 es 2-oxo-pirrolidin-1-ilmetilo o sulfamoilfenilo.

La divulgación describe compuestos de las Fórmulas I-II y sales farmacéuticamente aceptables, en las que R_1 es 2-fluorofenil o pirrolidin-1-ilo y R_2 es 2-oxo-pirrolidin-1-ilmetilo o 4-sulfamoilfenilo como sigue:



Los compuestos preferidos son los compuestos de Fórmula I, representados por cualquiera de las siguientes Fórmulas III-V y sus sales farmacéuticamente aceptables:

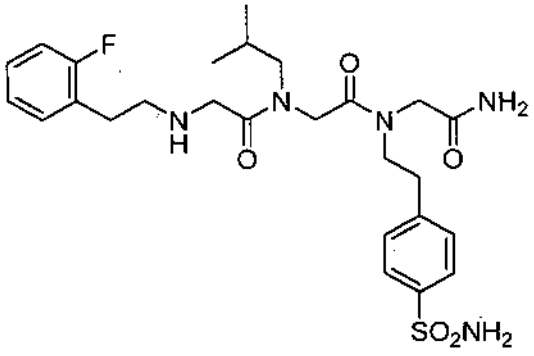
Fórmula III:



III

[N-(2-(2'-fluorofenil)etil)glicil]-[N-(2-metilpropil)glicil]-N-[3-(2'-oxopirrolidinil)propil]glicinamida (G79);

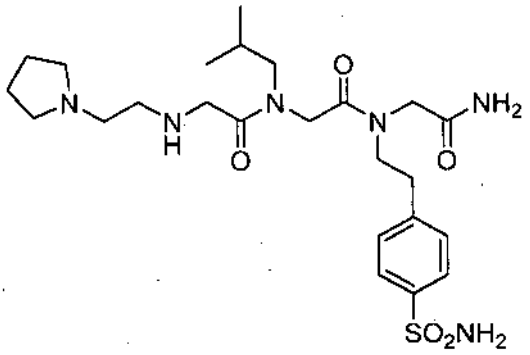
Fórmula IV:



VI

[N-(2-(2'-fluorofenil)etil)glicil]-[N-(2-metilpropil)glicil]-N-[2-(4'-sulfamoilfenil)etil]glicinamida (G80) ; y

Fórmula (V):



V

[N-(2-(1-pirrolidinil)etil)glicil]-[N-(2-metilpropil)glicil]-N-[2-(4'-sulfamoilfenil)etil]glicinamida (G81) y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En un modo de realización, el compuesto de Fórmula I es el compuesto de Fórmula III, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En un modo de realización, el compuesto de Fórmula I es el compuesto de Fórmula IV, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En un modo de realización, el compuesto de Fórmula I es el compuesto de Fórmula V, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Grupos halógeno útiles incluyen flúor, cloro, bromo y yodo.

Grupos alquilo útiles se seleccionan de grupos alquilo C_{1-6} de cadena lineal y ramificada y más preferentemente grupos alquilo C_{1-4} y grupos de cadena ramificada C_{1-4}. Los ejemplos de grupos alquilo C_{1-6} típicos incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, terc-butilo, iso-butilo, 3-pentilo, hexilo, entre otros.

Grupos haloalquilo (C_{1-6}) útiles incluyen cualesquiera de los grupos alquilo C_{1-6} mencionados anteriormente sustituidos

con uno o más átomos de flúor, cloro, bromo o yodo (por ejemplo, grupos fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, pentafluoroetilo, 1,1-difluoroetilo y triclorometilo). Preferentemente, el grupo haloalquilo (C_{1-6}) es trifluorometilo.

Grupos alcoxi C_{1-6} útiles incluyen oxígeno sustituido con uno de los grupos alquilo C_{1-6} mencionados anteriormente (por ejemplo, metoxi, etoxi, propoxi, iso-propoxi, butoxi, terc-butoxi, iso-butoxi, sec-butoxi y pentiloxi).

Se ha descubierto que los compuestos de Fórmula III-V inducen la diferenciación en células PC 12 y la supervivencia de células RN22 después de la inducción de estrés. El mecanismo de acción de los compuestos de las Fórmulas III-V se ha investigado. En consecuencia, el efecto de los compuestos de las Fórmulas III-V junto con NGF en cultivo se sometió a prueba. Si los compuestos funcionan como ligandos o interfieren en la ruta inducida por NGF, pueden inhibir la actividad de NGF. En caso contrario si los compuestos producen un efecto aditivo, pueden funcionar a través de mecanismos paralelos. Como resultado, se ha descubierto que G79, G80 y G81 no producen un efecto aditivo en combinación con NGF. No existe una diferencia grande en el número de células diferenciadas en el tratamiento solo con el compuesto en comparación con el tratamiento de combinación. Esto significa que los compuestos de las Fórmulas III-V actúan en la misma ruta de NGF. La reducción en la respuesta neurotrófica de NGF biotinilada corresponde a un perfil de un agonista parcial de NGF.

Para entender mejor la unión de los compuestos de las Fórmulas III-V a la superficie de la célula, se trataron las células PC 12 con NGF o los compuestos en la presencia del anticuerpo anti-TrkA que bloquea el sitio de unión de TrkA para NGF en el dominio extracelular. Por lo tanto, si los peptidomiméticos ejercen su actividad activando el sitio de unión, la presencia de este anticuerpo impedirá su actividad. De otro modo, si la actividad sobre la ruta NGF se mantiene, ello indicará que los peptidomiméticos de neurotrofina ejercen su actividad activando TrkA en otro punto de la molécula diferente del sitio de unión de TrkA. Los resultados muestran que mientras que la actividad neurotrófica de NGF se redujo añadiendo en el cultivo el anticuerpo anti-TrkA, el porcentaje de la diferenciación entre el tratamiento con los compuestos solos o los compuestos en combinación con el anticuerpo no fue muy diferente. Ello puede sugerir que la actividad de los compuestos no está mediada por la unión a la porción extracelular del receptor TrkA. Sin embargo, este resultado no excluye que los compuestos de las Fórmulas III-V se unan bien a la parte intracelular del TrkA o bien a otros miembros de la ruta de señalización intracelular. También se descubrió que G79 compite con NGF y BDNF para la unión a receptores de neurotrofinas. Este efecto puede deberse a la competición sobre el receptor p75, que se expresa de forma mucho más elevada sobre la superficie celular de líneas celulares que se usaron en los experimentos.

Se consideró también la posibilidad de que los compuestos de las Fórmulas III-V puedan actuar como secretagogos, induciendo sus efectos a través de la regulación por incremento de la síntesis de NGF. Se descubrió que aunque el tratamiento de NGF junto con el anticuerpo anti-NGF induce una reducción en la diferenciación de células PC 12, no existe ninguna diferencia en el porcentaje de diferenciación inducida por G79, G80 y G81 en presencia del mismo anticuerpo en comparación con el tratamiento con los compuestos solos. Por este motivo, G79, G80 y G81 no actúan como secretagogos.

Para estudiar el mecanismo de acción de los compuestos de las Fórmulas III-V, se investigó si la actividad neurotrófica de las moléculas depende de activación de AKT y ERK, las dos rutas principales de señalización de TrkA. Se descubrió que a medida que el tratamiento con NGF en combinación con los inhibidores LY294002 o PD98059 reduce el porcentaje de la diferenciación en células PC 12 en comparación con el tratamiento con solo NGF, también el porcentaje de diferenciación con G79, G80 y G81 en combinación con los inhibidores se reduce en comparación con el tratamiento con los compuestos solos.

Como conclusión, las moléculas pequeñas similares a NGF de la presente invención inducen diferenciación sin activar la síntesis de NGF. También actúan a través de la activación de rutas de PI3K/AKT y de MAPK/ERK sin la unión a la parte extracelular de TrkA.

La capacidad de los compuestos de Fórmula III-V para activar las rutas de neurotrofinas se puso a prueba en los ensayos de diferenciación en presencia de inhibidores de Pi3K y de MAPcinasa conjuntamente con ensayos de Luminex. De acuerdo con los resultados, los compuestos G79, G80 y G81 activan la ruta de neurotrofinas. Por ejemplo, las proteínas de golpe de calor tales como HSP-27, se pueden activar por agentes diferentes y factores neurotróficos (Liu H. et al., J Neurochem., 86, 1553-1563, 2003; Yuan Y et al., Eur. J. Pharmacol. 586, 100-105, 2008; O'Reilly AM et al., Mol Neurobiol, 42, 124-132, 2010). Las pruebas que se llevaron a cabo mostraron que HSP-27 se activa significativamente después de estimulación *in vitro*, de forma similar a NGF.

El efecto de los compuestos de Fórmula III-V sobre los modelos *in vivo* e *in vitro* de enfermedad neurodegenerativa también se puso a prueba. Se muestra el efecto neuroprotector de G79 en los modelos *in vitro* de PD, ELA y neuroinflamación. Además, G79 mostraron efectos beneficiosos *in vivo* en los modelos animales tanto de EM como de glaucoma mejorando la puntuación clínica de los animales afectados por EAE y reduciendo la muerte celular de RGC en ojos glaucomatosos. La penetración a través de la barrera hematoencefálica (BBB) de los compuestos de Fórmula III-V también se puso a prueba. De acuerdo con los resultados, G79 muestra una mejor penetración a través de la BBB por transporte activo, que explica su perfil mejor que G80 y G81. Esta forma de transporte garantiza una administración más específica del fármaco y permanencia dentro del cerebro, en comparación con el transporte pasivo.

En conclusión, los resultados muestran que moléculas similares a neurotrofinas pueden proporcionar una buena estrategia terapéutica para superar el problema de la administración de neurotrofinas en el cerebro, preservando e incluso potenciando, los efectos beneficiosos de las neurotrofinas por sí mismas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

El término "profármaco", como se usa en el presente documento, incluye cualquier compuesto derivado de los compuestos de cualquiera de las Fórmulas I-V, por ejemplo, el éster, amida, fosfato, etc., que, tras su administración a un individuo, es capaz de proporcionar los compuestos de cualquiera de las Fórmulas I-V o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, directa o indirectamente, a dicho individuo. Preferentemente, dicho derivado es un compuesto que incrementa la biodisponibilidad de los compuestos de cualquiera de las Fórmulas I-V cuando se administra a un individuo o que promueve la liberación de los compuestos de cualquiera de las Fórmulas I-V en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica, siempre que se pueda administrar a un individuo y que proporcione los compuestos de cualquiera de las Fórmulas I-V en un compartimento biológico de un individuo. La preparación de dicho profármaco se puede llevar a cabo por procedimientos convencionales conocido por los expertos en la técnica. Los procedimientos convencionales para la selección y la preparación de derivados de profármaco adecuados se describen, por ejemplo, en "Design of Prodrugs", ed. H. Bundgaard, Elsevier (1985). Un ejemplo de profármaco de los compuestos de cualquiera de las Fórmulas I-V puede ser su encapsulación en liposomas. Por este procedimiento, el peptoide se trata con el precursor de liposomas apropiado (combinación de un fosfolípido como lecitina, colesterol y agua) con el fin de encapsularse. Dependiendo de la lipofilicidad del peptoide, el compuesto estará retenido en la parte lipófila del liposoma o en la parte interna acuosa. En lo que respecta al polímero terapéutico, el peptoide se podría unir al polímero por enlaces covalentes creados después de la hidrólisis regioselectiva de la carboxamida terminal. Esta hidrólisis deja un ácido carboxílico libre que pueden estar condensado con un grupo activado amino o hidroxilo del polímero.

El término "farmacéuticamente aceptable" quiere decir que un compuesto o una combinación de compuestos es suficientemente compatible con los otros ingredientes de una formulación y no perjudicial para el paciente hasta los niveles aceptables por los estándares de la industria.

Para su uso terapéutico, las sales de los compuestos de cualquiera de las Fórmulas I-V son aquellas en las que el contraión es farmacéuticamente aceptable.

El término "sal" como se menciona en el presente documento se pretende que comprenda cualesquiera sales estables, que los compuestos de cualquiera de las fórmulas I-V sean capaces de formar. Se prefieren las sales farmacéuticamente aceptables. Las sales que no son farmacéuticamente aceptables también están abarcadas en el ámbito de la presente invención, puesto que se refieren a intermedios que pueden ser útiles en la preparación de los compuestos con actividad farmacológica.

Las sales se pueden obtener convenientemente tratando la forma base de los compuestos de cualquiera de las Fórmulas I-V con ácidos apropiados tales como ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico o ácido bromhídrico, ácidos sulfúrico, nítrico, fosfórico y similares; o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácidos acético, propanoico, hidroxiacético, láctico, pirúvico, oxálico (es decir, etanodioico), malónico, succínico (es decir, ácido butanodioico), maleico, fumárico, málico (es decir, ácido hidroxibutanedioico), tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, p-toluenosulfónico, ciclámico, salicílico, p-aminosalicílico, pamoico y similares.

Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden obtener tratando la forma base de los compuestos de cualquiera de las Fórmulas I-V con tales ácidos farmacéuticamente aceptables apropiados como ácidos inorgánicos, por ejemplo, incluyendo ácidos clorhídrico, bromhídrico y similares; ácido sulfúrico; ácido nítrico; ácido fosfórico y similares; o ácidos orgánicos, por ejemplo, ácidos acético, propanoico, hidroxiacético, 2-hidroxipropanoico, 2-oxopropanoico, oxálico, malónico, succínico, maleico, fumárico, málico, tartárico, 2-hidroxi-1,2,3-propano-tricarboxílico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, 4-metilbenceno-sulfónico, ciclohexanosulfámico, 2-hidroxibenzoico, 4-amino-2-hidroxibenzoico y ácidos similares.

A la inversa la forma de sal se puede convertir por tratamiento con álcali en la forma de base libre.

El término "composición farmacéutica" significa para el propósito de la presente invención cualquier composición que comprenda como un compuesto activo, a que se atribuya, totalmente o en parte, el efecto terapéutico (por ejemplo farmacéutico), al menos uno de los compuestos de la invención o combinaciones de los mismos y que opcionalmente puede comprender además al menos un ingrediente no activo farmacéuticamente aceptable, como un excipiente, vehículo o similar.

El término "evitar" se refiere a guardar de que ocurra, exista, o de forma alternativa retrasar la aparición de o la recurrencia de enfermedad, trastorno, o afección al que se aplique tal término, o de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno, o afección. El término "prevención" se refiere al acto de evitar, según se define "evitar" justo anteriormente.

Tal como se usa en el presente documento, el término “tratar” se refiere a invertir, aliviar, o inhibir la progresión del trastorno o afección al que se aplica tal término, o a evitar uno o más síntomas de tal trastorno o afección. El término "tratamiento" se refiere al acto de “tratar”, según se define "tratar" justo anteriormente.

El término "sujeto" quiere decir animales, en particular mamíferos tales como perros, gatos, vacas, caballos, ovejas, gansos y seres humanos. De forma particularmente preferida los sujetos son mamíferos, incluyendo seres humanos de ambos sexos.

Un "cantidad eficaz" de los compuestos de cualquiera de las Fórmulas I-V y sales farmacéuticamente aceptables o profármacos de las mismas, puede estar en el intervalo de 0,01 mg a 50 g por día, de 0,02 mg a 40 g al día, de 0,05 mg a 30 g al día, de 0,1 mg a 20 g al día, de 0,2 mg a 10 g al día, de 0,5 mg a 5 g al día, de 1 mg a 3 g al día, de 2 mg a 2 g al día, de 5 mg a 1,5 g al día, de 10 mg a 1 g al día, de 10 mg a 500 mg al día.

Las células nerviosas incluyen aquellas células de cualquier región del cerebro, médula espinal, nervio óptico, retina y ganglios periféricos. Las neuronas incluyen aquellas en tejido neuronal embrionario, fetal, o adulto, incluyendo tejido del hipocampo, cerebelo, médula espinal, corteza (por ejemplo, corteza motora o somatosensorial), cuerpo estriado, prosencéfalo basal (neuronas colinérgicas), mesencéfalo ventral (células de la sustancia negra) y el locus cerúleo (células de neuroadrenalina del sistema nervioso central).

La divulgación también describe el uso de los compuestos de cualquiera de las Fórmulas I-V y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, como principios activos en la fabricación de medicamentos para la prevención o el tratamiento de la muerte o daño de células nerviosas. En otras palabras, la presente divulgación se refiere a los compuestos de cualquiera de las Fórmulas I-V y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, para su uso en la prevención o el tratamiento de la muerte o daño de células nerviosas. De forma similar, la presente divulgación se refiere a un procedimiento de neuroprotección que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-V, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En un modo de realización de la presente divulgación, los compuestos de cualquiera de las Fórmulas I-V y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se pueden usar para la prevención o el tratamiento de una o más, preferentemente de dos o más, afecciones patológicas o perjudiciales relacionadas con muerte o daño de células nerviosas seleccionados de, pero sin estar limitados a, sustancias químicas tales como condiciones de estrés oxidativo, sustancias tóxicas, organismos infecciosos, radiación, lesión traumática, hipoxia, isquemia, proteínas mal plegadas anormales, excitotoxinas, radicales libres, estresores del retículo endoplásmico, estresores mitocondriales incluyendo pero sin limitarse a inhibidores de la cadena de transporte de electrones, antagonistas del aparato de Golgi, daño o pérdida axonal, desmielinización, inflamación, estallido neuronal patológico (convulsiones). También preferentemente, los usos y procedimientos de la presente divulgación se refieren a evitar o tratar muerte o daño de células nerviosas, independientemente de la causa.

Los términos "neuroprotección", "neuroprotector", o "efecto neuroprotector" se refieren a la capacidad de evitar o reducir la muerte o el daño en las células nerviosas, incluyendo las neuronas y la glía, o de rescatar, reanimar o restablecer las células nerviosas, por ejemplo, siguiendo a afecciones patológicas o dañinas al cerebro, sistema nervioso central o sistema nervioso periférico. Por tanto, este efecto neuroprotector comprende la capacidad conferida de las células neuronales para mantener o recuperar sus funciones neuronales. Ello estabiliza la membrana celular de una célula neuronal o ayuda en la normalización de las funciones de origen neuronal. Ello evita la pérdida de la viabilidad o de funciones de las células neuronales. Ello comprende la inhibición de un deterioro progresivo de las neuronas que da lugar a la muerte celular. Ello se refiere a cualquier protección detectable de las neuronas contra el estrés. La neuroprotección incluye la regeneración de las células nerviosas, es decir, el re-crecimiento de una población de células nerviosas después de enfermedad o traumatismo.

En la actualidad la mayoría de las enfermedades neurológicas y trastornos psiquiátricos carece de tratamientos específicos dirigidos a detener o mejorar la evolución de la enfermedad, lo que se denomina "fármacos modificadores de enfermedad". Esto contrasta con las terapias sintomáticas que son comunes para tales enfermedades pero no cambian la evolución de la enfermedad. Un neuroprotector es un Fármaco Modificador de Enfermedad (DMD) para el tratamiento de enfermedades del cerebro.

Como tal, en un modo de realización, la presente divulgación se refiere al uso de los compuestos de cualquiera de las Fórmulas I-V y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, como principios activos en la fabricación de un medicamento para la regeneración de las células nerviosas. En otras palabras, la presente divulgación se refiere a los compuestos de cualquiera de las Fórmulas I-V y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, para su uso para la regeneración de las células nerviosas. De forma similar, la presente divulgación se refiere a un procedimiento de regenerar células nerviosas, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-V, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La neuroprotección se puede determinar directamente por, por ejemplo, medir el retraso o la prevención de muerte neuronal, tal como, por ejemplo, a través de una reducción en el número de neuronas apoptóticas en cultivos cerebrocorticales después de un estrés. La neuroprotección también se puede determinar directamente, por ejemplo, midiendo la gravedad o la extensión del daño a, o la pérdida funcional por, un tejido u órgano del sistema nervioso después de un estrés tal, como, por ejemplo, midiendo una disminución en el tamaño de infartos cerebrales después de la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) o la lesión por reperfusión. Además, se puede identificar neuroprotección por la formación de imágenes por resonancia magnética (midiendo volumen cerebral, tractografía,

niveles de N-acetil-aspartato por espectroscopía, tomografía de coherencia óptica). De forma alternativa, la neuroprotección se puede determinar indirectamente detectando la activación de uno o más mecanismos biológicos para proteger las neuronas, incluyendo, pero sin limitarse a, detectar la activación de la ruta Keap1/Nrf2 o la inducción de una o más enzimas de fase 2, incluyendo pero sin limitarse a hemoxigenasa-1 (HO-1). Los procedimientos de detección y medición de protección neuronal se proporcionan en los ejemplos que figuran a continuación y otros procedimientos tales se conocen en la técnica.

Los diversos usos y procedimientos que emplean los compuestos de cualquiera de las Fórmulas I-V y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la presente divulgación comprenden una administración aguda, es decir que se produce desde dentro de varios minutos hasta aproximadamente dentro de varias horas a partir de la lesión, o administración crónica, adecuada para enfermedades crónicas neurológicas o trastornos psiquiátricos.

En un modo de realización de la presente divulgación, en los diversos usos y procedimientos de neuroprotección o de prevención o tratamiento de la muerte o daño de las células nerviosas, los compuestos de cualquiera de las Fórmulas I-V y sales farmacéuticamente aceptables, se administran a un sujeto con una enfermedad neurológica o psiquiátrica.

Las enfermedades neurológicas son los trastornos del sistema nervioso central y periférico, incluyendo trastornos del cerebro, médula espinal, nervios craneales, nervios periféricos, nervios raíz, sistema nervioso autónomo, unión neuromuscular y músculo.

Las enfermedades del sistema nervioso central y periférico, que se pueden someter de prevención y/o tratamiento de acuerdo con la presente invención incluyen, sin estar limitadas a, según avanza el conocimiento en manifestaciones clínicas, ausencia del septum pellucidum, enfermedad de la lipasa ácida, deficiencia en maltasa ácida, afasia epileptiforme adquirida, encefalomielitis diseminada aguda, pupila de Adie, síndrome de Adie, adrenoleucodistrofia, agenesia del cuerpo calloso, agnosia, síndrome de Aicardi, síndrome de Aicardi-Goutieres, complicaciones neurológicas del SIDA, enfermedad de Alexander, enfermedad de Alpers, hemiplejia alternante, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, anencefalia, aneurisma, síndrome de Angelman, angiomatosis, anoxia, síndrome antifosfolípido, afasia, apraxia, quistes aracnoideos, aracnoiditis, malformación de Arnold-Chiari, malformación arteriovenosa, síndrome de Asperger, ataxia, ataxia telangiectasia, ataxias y degeneración cerebelosa o espinocerebelosa, fibrilación auricular y apoplejía, trastorno de hiperactividad con déficit de atención (ADHD), autismo, disfunción autonómica, dolor de espalda, síndrome de Barth, síndrome de Batten, miotonía de Becker, enfermedad de Behcet, parálisis de Bell, blefarospasmo esencial benigno, amiotrofia focal benigna, hipertensión intracraneal benigna, síndrome de Bernhardt-Roth, enfermedad de Binswanger, blefarospasmo, síndrome de Bloch-Sulzberger, lesiones en el plexo braquial asociadas al nacimiento, lesiones en el plexo braquial, síndrome de Bradbury-Eggleston, tumores cerebrales y espinales, aneurisma cerebral, infarto cerebral, isquemia cerebral, lesión cerebral, síndrome de Brown-Sequard, atrofia muscular bulboespinal, arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencéfalopatía, enfermedad de Canavan, síndrome del túnel carpiano, causalgia, cavernomas, angioma cavernoso, malformación cavernosa, síndrome de columna cervical central, síndrome de columna central, síndrome de dolor central, mielinolisis central pontina, trastornos cefálicos, deficiencia en ceramidasa, degeneración cerebelosa, hipoplasia cerebelosa, aneurisma cerebral, aterosclerosis cerebral, atrofia cerebral, beriberi cerebral, malformación cavernosa cerebral, gigantismo cerebral, hipoxia cerebral, parálisis cerebral, síndrome cerebro-oculo-facio-esquelético, síndrome de Charcot-Marie, malformación de Chiari, enfermedad por almacenamiento de ésteres de colesterol, corea, coreoacantocitosis, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), intolerancia ortostática crónica, dolor crónico, síndrome de Cockayne de Tipo II, síndrome de Coffin Lowry, cerebro-oculo-facio-esquelético, colpocefalia, coma, síndrome de dolor regional complejo, diplejia facial congénita, miastenia congénita, miopatía congénita, malformaciones cavernosas vasculares congénitas, degeneración corticobasal, arteritis craneal, craniosinostosis, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, trastornos de trauma acumulativos, síndrome de Cushing, enfermedad citomegálica de cuerpos de inclusión, infección con citomegalovirus, síndrome de opsoclonía-mioclonía, síndrome de Dandy-Walker, enfermedad de Dawson, enfermedad de De Morsier, estimulación cerebral profunda para la enfermedad de Parkinson, parálisis de Dejerine-Klumpke, demencia, demencia multiinfarto, demencia semántica, demencia subcortical, demencia con cuerpos de Lewy, ataxia cerebelosa dentada, atrofia dentatorubral, dermatomiositis, dispraxia del desarrollo, síndrome de Devic, neuropatía diabética, esclerosis difusa, síndrome de Dravet, disautonomía, disgrafía, dislexia, disfagia, dispraxia, disinergia cerebelosa mioclonica, disinergia cerebelosa progresiva, distonías, encefalopatía epiléptica infantil temprana, síndrome de la silla vacía, encefalitis, encefalitis letárgica, encefaloceles, encefalopatía, encefalopatía familiar infantil, con calcificación intracraneal y linfocitosis crónica de líquido cefalorraquídeo; encefalitis de Cree; síndrome de pseudo-Torch, síndrome de pseudotoxoplasmosis, angiomatosis encefalotrigeminal, epilepsia, hemiplejía epiléptica, parálisis de Erb-Duchenne y parálisis de Dejerine- Klumpke, parálisis de Erb, temblor esencial, mielinolisis extrapontina, enfermedad de Fabry, síndrome de Fahr, desvanecimiento, disautonomía familiar, hemangioma familiar, calcificación idiopática familiar de los ganglios básales, parálisis periódica familiar, parálisis espástica familiar, enfermedad de Farber, ataques febriles, displasia fibromuscular, síndrome de Fisher, síndrome infantil de los párpados flexibles, gota del pie, ataxia de Friedreich, demencia frontotemporal, gangliosidosis, enfermedad de Gaucher, síndrome de Gerstmann, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, neuropatía axonal gigante, arteritis de células gigantes, enfermedad de inclusión de células gigantes, leucodistrofia de células globoides, neuralgia glosofaríngea, enfermedad de almacenamiento de glucógeno, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hallervorden-Spatz, traumatismo craneal, dolor de cabeza, hemicrania continua, espasmo hemifacial, hemiplejías alternas, neuropatías hereditarias, paraplejia espástica hereditaria, heredopatía atáctica polineuritiforme, herpes zóster, herpes zóster Oticus, síndrome de Hirayama,

síndrome de Holmes-Adie holoprosencefalia, mielopatía asociada a HTLV-1, síndrome de Hughes, enfermedad de Huntington, hidranencefalia, hidrocéfalo, hidrocéfalo de presión normal, hidromielia, hipercortisolismo, hipersomnio, hipertonía, hipotonia, hipoxia, encefalomielitis mediada por el sistema inmune, miositis por cuerpos de inclusión, incontinencia pigmentaria, hipotonía infantil, distrofia neuroaxonal infantil, enfermedad de almacenamiento de ácido fitánico infantil, enfermedad de Refsum infantil, espasmos infantiles, miopatías inflamatorias, iniencefalia, lipodistrofia intestinal, quistes intracraneales, hipertensión intracraneal, síndrome de Isaac, síndrome de Joubert, síndrome de Kearns-Sayre, enfermedad de Kennedy, síndrome de Kinsbourne, síndrome de Kleine-Levin, síndrome de Klippel-Feil, síndrome de Klippel-Trenaunay (KTS), síndrome de Klüver-Bucy, síndrome annésico de Korsakoff, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Kugelberg-Welander, kuru, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, síndrome de Landau-Kleffher, compresión del nervio cutáneo femoral lateral, síndrome medular lateral, discapacidades de aprendizaje, enfermedad de Leigh, síndrome de Lennox-Gastaut, síndrome de Lesch-Nyhan, leucodistrofia, síndrome de Levine-Critchley, demencia con cuerpos de Lewy, enfermedades del almacenamiento de lípidos, proteinosis lipoide, lisencefalia, síndrome Locked-In, enfermedad de Lou Gehrig, secuelas neurológicas de lupus, complicaciones neurológicas de enfermedad de Lyme, enfermedad de Machado-Joseph, macroencefalia, megaloencefalia, síndrome de Melkersson-Rosenthal, meningitis, meningitis y encefalitis, enfermedad de Menkes, meralgia parestética, leucodistrofia metacromática, microcefalia, migraña, síndrome de Miller Fisher, deterioro cognitivo leve, mini-apoplejías, miopatías mitocondriales, síndrome de Moebius, amiotrofia monomélica, enfermedades de las neuronas motoras, enfermedad de Moyamoya, mucolipidosis, mucopolisacaridosis, neuropatía motora multifocal, demencia multi-infarto, esclerosis múltiple, atrofia multisistémica, atrofia multisistémica con hipotensión ortostática, distrofia muscular, miastenia congénita, miastenia gravis, esclerosis mielinoclástica difusa, encefalopatía mioclónica infantil, mioclonus, miopatía, miopatía congénita, miopatía tirotóxica, miotonia, miotonia congénita, narcolepsia, neuroacantocitosis, neurodegeneración con acumulación de hierro en el cerebro, neurofibromatosis, síndrome neuroléptico maligno, complicaciones neurológicas del SIDA, complicaciones neurológicas de la enfermedad de Lyme, consecuencias neurológicas de la infección de citomegalovirus, manifestaciones neurológicas de la Enfermedad de Pompe, secuelas neurológicas de lupus, neuromielitis óptica, neuromiotonía, lipofuscinosis neuronal ceroidea, trastornos de migración neuronal, neuropatía hereditaria, neurosarcoidosis, neurotoxicidad, nevus cavernosus, enfermedad de Niemann-Pick, hidrocéfalo de presión normal, neuralgia occipital, síndrome de Ohtahara, atrofia olivopontocerebelosa, opsoclonus mioclonus, hipotensión ortostática, síndrome de O'Sullivan-McLeod, síndrome de uso excesivo, dolor crónico, neurodegeneración asociada a pantotenato cinasa, síndromes paraneoplásicos, parestesia, enfermedad de Parkinson, coreoatetosis paroxística, hemicránea paroxística, Parry-Romberg, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, síndrome de Pena Shokeir II, quistes perineurales, parálisis periódicas, neuropatía periférica, leucomalacia periventricular, estado vegetativo persistente, trastorno generalizado del desarrollo, enfermedad del almacenamiento de ácido fitánico, enfermedad de Pick, pinzamiento, síndrome piriforme, tumores pituitarios, polimiositis, enfermedad de Pompe, porencefalia, neuralgia postherpética, encefalomielitis postinfecciosa, síndrome post-polio, hipotensión postural, síndrome de taquicardia ortostática postural, síndrome de taquicardia postural, atrofia primaria dentatum, esclerosis primaria lateral, afasia primaria progresiva, enfermedades por priones, atrofia hemifacial progresiva, ataxia locomotora progresiva, leucoencefalopatía multifocal progresiva, poliodistrofia esclerosante progresiva, parálisis supranuclear progresiva, prosopagnosia, seudotumor cerebral, síndrome de Ramsay Hunt I (anteriormente conocido como disinergia cerebelosa mioclónica, disinergia cerebelosa progresiva, degeneración dentatorubral, o síndrome cerebeloso de Ramsay Hunt), síndrome de Ramsay Hunt II (anteriormente conocido como herpes zóster ótico), encefalitis de Rasmussen, síndrome de distrofia simpático refleja, enfermedad de Refsum, enfermedad de Refsum infantil, trastornos por movimientos repetitivos, lesiones por estrés repetitivo, síndrome de las piernas inquietas, mielopatía asociada a retrovirus, síndrome de Rette, síndrome de Reye, encefalitis reumática, síndrome de Riley-Day, quistes de raíz del nervio sacro, baile de San Vito, enfermedad de las glándulas salivares, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Schilder, esquizoencefalia, enfermedad de Seitelberger, trastorno convulsivo, demencia semántica, displasia septo-óptica, epilepsia mioclónica grave de la infancia (SMEI, síndrome del bebé sacudido, culebrilla, síndrome de Shy-Drager, síndrome de Sjõgren, apnea del sueño, enfermedad del sueño, síndrome de Sotos, espasticidad, espina bífida, infarto de la médula espinal, lesión de la médula espinal, tumores de la médula espinal, atrofia muscular espinal, atrofia espinocerebelosa, degeneración espinocerebelosa, síndrome de Steele-Richardson-Olszewski, síndrome de Stiff-Person, degeneración estriatonigral, apoplejía, síndrome de Sturge-Weber, panencefalitis esclerosante subaguda, encefalopatía arteriosclerótica subcortical, dolor de cabeza SUNCT, trastornos de la deglución, corea de Sydenham, síncope, esclerosis espinal sifilítica, siringohidromielia, siringomielia, lupus eritematoso sistémico, tabes dorsal, discinesia tardía, quistes de Tarlov, enfermedad de Tay-Sachs, arteritis temporal, síndrome de la médula espinal anclada, miotonía de Thomsen, síndrome de la salida torácica, miopatía tirotóxica, tic doloroso, parálisis de Todd, síndrome de Tourette, ataque isquémico transitorio, encefalopatías espongiformes transmisibles, mielitis transversa, lesión cerebral traumática, temblor, neuralgia trigeminal, paraparesia espástica tropical, síndrome de Troyer, esclerosis tuberosa, tumor vascular eréctil, síndromes de vasculitis de los sistemas nerviosos central y periférico, enfermedad de Von Economo, enfermedad de Von Hippel-Lindau (VHL), enfermedad de von Recklinghausen, síndrome de Wallenberg, enfermedad de Werdnig-Hoffman, síndrome de Wernicke-Korsakoff, síndrome de West, latigazo cervical, enfermedad de Whipple, síndrome de Williams, enfermedad de Wilson, enfermedad de Wolman, atrofia muscular bulboespinal ligada al X, síndrome de Zellweger, neuritis óptica, síndrome de fatiga crónica, fibromialgia, enfermedades psiquiátricas tales como trastornos del humor, depresión mayor, síndrome bipolar, psicosis, esquizofrenia, síndrome obsesivo-compulsivo, etc., enfermedades de abuso de productos tóxicos o drogas tales como alcoholismo y abuso de drogas, encefalopatía tipo encefalopatía hepática.

Los trastornos psiquiátricos, que puede ser el objeto de prevención y/o tratamiento de acuerdo con la presente invención incluyen los que se enumeran en el Diagnostic y Statistical Manual of Mental Disorders, cuarta edición (DSM-IV) publicado por la American Psychiatric Association y cubren todos los trastornos mentales tanto para niños como para adultos. En particular, los trastornos psiquiátricos incluyen un trastorno seleccionado entre trastorno de estrés agudo; trastorno de adaptación no especificado; trastorno de adaptación con ansiedad; trastorno de adaptación con humor depresivo; trastorno de adaptación con alteración de la conducta; trastorno de adaptación mixto con ansiedad y humor depresivo; trastorno de adaptación mixto con alteración de emociones y conducta; agorafobia sin historial de trastorno del pánico; anorexia nerviosa; trastorno de personalidad antisocial; trastorno de ansiedad debido a una afección médica; trastorno de ansiedad, NOS; trastorno de personalidad evitadora; trastorno bipolar NOS; trastorno bipolar I, episodio depresivo más reciente, en remisión total; trastorno bipolar I, episodio depresivo más reciente, en remisión parcial; trastorno bipolar I, episodio depresivo más reciente, leve; trastorno bipolar I, episodio depresivo más reciente, moderado; trastorno bipolar I, episodio depresivo más reciente, grave con características psicóticas; trastorno bipolar I, episodio depresivo más reciente, grave sin características psicóticas; trastorno bipolar I, episodio depresivo más reciente, no especificado; trastorno bipolar I, episodio maníaco más reciente, en remisión total; trastorno bipolar I, episodio maníaco más reciente, en remisión parcial; trastorno bipolar I, episodio maníaco más reciente, leve; trastorno bipolar I episodio maníaco más reciente, moderado; trastorno bipolar I, episodio maníaco más reciente, grave con características psicóticas; trastorno bipolar I, episodio maníaco más reciente, grave sin características psicóticas; trastorno bipolar I, episodio maníaco más reciente, no especificado; trastorno bipolar I, episodio mixto más reciente, en remisión total; trastorno bipolar I, episodio mixto más reciente, en remisión parcial; trastorno bipolar I, episodio mixto más reciente, leve; trastorno bipolar I, episodio mixto más reciente, moderado; trastorno bipolar I, episodio mixto más reciente, grave con características psicóticas; trastorno bipolar I, episodio mixto más reciente, grave sin características psicóticas; trastorno bipolar I, episodio mixto más reciente, no especificado; trastorno bipolar I, episodio más reciente no especificado; trastorno bipolar I, episodio más reciente hipomaníaco; trastorno bipolar I, único episodio maniaco, en remisión total; trastorno bipolar I, único episodio maniaco, en remisión parcial; trastorno bipolar I, único episodio maniaco, leve; trastorno bipolar I, único episodio maniaco, moderado; trastorno bipolar I, único episodio maniaco, grave con características psicóticas; trastorno bipolar I, único episodio maniaco, grave sin características psicóticas; trastorno bipolar I, único episodio maniaco, no especificado; trastorno bipolar II; trastorno dismórfico corporal; trastorno límite de la personalidad; trastorno del sueño relacionado con la respiración; trastorno psicótico breve; bulimia nerviosa; trastorno del sueño del ritmo circadiano; trastorno de conversión; trastorno ciclotímico; trastorno delirante; trastorno de personalidad dependiente; trastorno de despersonalización; trastorno depresivo NOS; amnesia disociativa; trastorno disociativo NOS; fuga disociativa; trastorno de la identidad disociativo; dispareunia; disomnia NOS; disomnia relacionada con otro trastorno; trastorno distímico; trastorno alimentario NOS; exhibicionismo; dispareunia femenina debido a una afección médica; trastorno del deseo sexual hipoactivo femenino trastorno debido a una afección médica; trastorno orgásmico femenino; trastorno de la excitación sexual femenina; fetichismo; frotteurismo; trastorno en la identidad de género en adolescentes o adultos; trastorno en la identidad de género en niños; trastorno en la identidad de género NOS; trastorno de la ansiedad generalizado; trastorno histriónico de la personalidad; trastorno del deseo sexual hipoactivo; hipocondriasis; trastorno del control de los impulsos NOS; insomnio relacionado con otro trastorno; trastorno explosivo intermitente; cleptomanía; trastorno depresivo mayor, recurrente, en remisión total; trastorno depresivo mayor, recurrente, en remisión parcial; trastorno depresivo mayor, recurrente, leve; trastorno depresivo mayor, recurrente, moderado; trastorno depresivo mayor, recurrente, grave con características psicóticas; trastorno depresivo mayor, recurrente, grave sin características psicóticas; trastorno depresivo mayor, recurrente, no especificado; trastorno depresivo mayor, episodio único, en remisión total; trastorno depresivo mayor, episodio único, en remisión parcial; trastorno depresivo mayor, episodio único, leve; trastorno depresivo mayor, episodio único, moderado; trastorno depresivo mayor, episodio único, grave con características psicóticas; trastorno depresivo mayor, episodio único, grave sin características psicóticas; trastorno depresivo mayor, episodio único, no especificado; dispareunia masculina debida a una afección médica; trastorno eréctil masculino; trastorno eréctil masculino debido a una afección médica; trastorno del deseo sexual hipoactivo masculino debido a una afección médica; trastorno orgásmico masculino; trastorno del humor debido a una afección médica; trastorno de personalidad narcisista; narcolepsia; trastorno de la pesadilla; trastorno obsesivo compulsivo; trastorno de la personalidad obsesivo-compulsivo; otra disfunción sexual femenina debida a afección médica; otra disfunción sexual masculina debido a afección médica; trastorno del dolor asociado tanto con factores psicológicos como con afecciones médicas; trastorno del dolor asociado con características psicológicas; trastorno del pánico con agorafobia; trastorno del pánico sin agorafobia; trastorno paranoide de la personalidad; parafilia, NOS; parasomnia NOS; ludopatía; pedofilia; trastorno de la personalidad NOS; trastorno de estrés posttraumático; eyaculación precoz; hipersomnio primario; insomnio primario; trastorno psicótico debido a una afección médica, con delirios; trastorno psicótico debido a una afección médica, con alucinaciones; trastorno psicótico, NOS; piromanía; trastorno esquizoafectivo; trastorno de la personalidad esquizoide; esquizofrenia, tipo catatónica; esquizofrenia, tipo desorganizada; esquizofrenia, tipo paranoide; esquizofrenia, tipo residual; esquizofrenia, tipo no diferenciada; trastorno esquizofreniforme; trastorno esquizotípico de la personalidad; trastorno de aversión sexual; trastorno sexual NOS; disfunción sexual NOS; masoquismo sexual; sadismo sexual; trastorno psicótico compartido; trastorno del sueño debido a una afección médica, tipo hipersomnia; trastorno del sueño debido a una afección médica, tipo insomnio; trastorno del sueño debido a una afección médica, tipo mixto; trastorno del sueño debido a una afección médica, tipo parasomnia; trastorno de terror nocturno; trastorno de sonambulismo; fobia social; trastorno de somatización; trastorno somatoforme NOS; fobia específica; fetichismo transvéstico; tricotilomanía; trastorno somatoforme no diferenciado; vaginismo; y voyerismo.

Preferentemente, los compuestos de cualquiera de las Fórmulas I-V y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se pueden usar en el tratamiento de enfermedades en las que NGF u otras neurotrofinas han demostrado eficacia en el estado de la técnica, ni in vivo o in vitro, debido a sus efectos mejorados sobre la diferenciación celular y la supervivencia celular, a través de cualesquiera rutas TrkA, TrkB y/o p75. Por lo tanto, los compuestos abarcados en la presente divulgación se pueden usar en el tratamiento de enfermedades neurológicas seleccionadas de entre: trastornos neurodegenerativos, tales como esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, ataxia de Friedreich, enfermedad de Huntington, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia muscular espinal; inflamación nerviosa, tal como esclerosis múltiple y neuromielitis óptica; trastorno depresivo mayor; esquizofrenia; glaucoma; o neuropatías periféricas, tales como neuropatía diabéticas o neuropatía del SIDA. Además, los compuestos de la invención también pueden estar indicados para el tratamiento de cáncer, modulando diferenciación de células por NGF y deteniendo la proliferación celular. Entre los tipos de cáncer en los que NGF ha demostrado eficacia en el estado de la técnica, bien in vivo o bien in vitro, debido a efectos de mejora sobre la diferenciación celular y la supervivencia celular, a través de bien ruta de TrkA y/o bien ruta de p75, se pueden citar los siguientes: glioblastoma, astrocitoma, meduloblastoma, neurinoma, neuroblastoma, meningioma, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de próstata, leucemia linfocítica aguda, osteosarcoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma ovárico, adenocarcinoma de pulmón o carcinoma esofágico.

En un modo de realización de la presente divulgación, en los diversos usos y procedimientos de neuroprotección o de prevención o tratamiento de la muerte celular o daño de las células nerviosas, los compuestos de cualquiera de las Fórmulas I-V y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se administran a un sujeto sano, preferentemente un sujeto sano mayor de 18 años de edad, más preferentemente un sujeto sano mayor de 45 años de edad, incluso más preferentemente un sujeto sano mayor de 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 años de edad.

El término "sujeto sano" se pretende que comprenda su significado manifiesto así como aquellos individuos que pueden sufrir de una o más afecciones patológicas distintas de una enfermedad neurológica o psiquiátrica.

Las propiedades neuroprotectoras de los compuestos de cualquiera de las Fórmulas I-V y farmacéuticamente aceptables de los mismos, tienen como consecuencia la prevención parcial o completa o el tratamiento parcial o completo de los diversos trastornos en las funciones del sistema nervioso causados por la muerte o el daño de las células nerviosas. Por lo tanto, la presente invención se refiere además al uso de los compuestos de cualquiera de las Fórmulas I-V y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, como principios activos en la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de una enfermedad neurológica o psiquiátrica. En otras palabras, la presente divulgación también se refiere a los compuestos de cualquiera de las Fórmulas I-V y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad neurológica o psiquiátrica. De forma similar, la presente divulgación también se refiere a un procedimiento de prevención o tratamiento de una enfermedad neurológica o psiquiátrica que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz del compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-V, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La enfermedad neurológica o psiquiátrica puede ser una cualquiera de las enumeradas anteriormente.

Preferentemente, la enfermedad neurológica o psiquiátrica se selecciona de trastornos neurodegenerativos, inflamación y determinados tipos de cánceres, esclerosis múltiple, neuromielitis óptica, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, ataxia de Friedreich, enfermedad de Huntington, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia espinal muscular, trastorno depresivo mayor, esquizofrenia, glaucoma o neuropatías periféricas (neuropatía diabética o neuropatía de SIDA).

Otro objetivo de la presente divulgación es el uso de los compuestos de cualquiera de las Fórmulas I-V y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, como fármacos neuropotenciadores o el uso para fabricar fármacos neuropotenciadores.

Los fármacos neuropotenciadores incluyen los que mejoran el aprendizaje y la memoria, la atención, el estado de ánimo, las capacidades comunicativas y la actividad sexual. Ejemplos de fármacos neuropotenciadores son aquellos que se dirigen a potenciación sináptica a largo plazo (LTP) o a depresión a largo plazo (LTD), a modulación de los canales de calcio, o a la proteína elemento de unión de respuesta de AMPc (CREB). AMPc es el acrónimo para adenosín monofosfato cíclico. Los ejemplos particulares de fármacos neuropotenciadores son inhibidores de la fosfodiesterasa como rolipram; donepezilo; agonistas del receptor de glutamato NMDA como D-cicloserina ; ampakinas; modafinilo; metilfenidato.

Una composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por cualquier medio que consiga su fin deseado. Por ejemplo, la administración puede ser vía oral, parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperinoneal, transdérmica, intranasal, transmucosal, rectal, o bucal. En un modo de realización, la composición farmacéutica se administra oralmente.

Los compuestos de cualquiera de las Fórmulas I-V y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se pueden formular en diversas formas farmacéuticas para fines de administración. Como composiciones apropiadas se pueden citar todas las composiciones empleadas normalmente para fármacos administrados sistémicamente, por ejemplo, cualquier composición sólida (por ejemplo comprimidos, cápsulas, gránulos, etc.) o composición líquida (por ejemplo soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.). Para preparar las composiciones farmacéuticas de los compuestos de

cualquiera de las fórmulas I-V, una cantidad eficaz del compuesto de cualquiera de las fórmulas I-V, opcionalmente en una forma salina, como el principio activo se combina en mezcla íntima con un vehículo farmacéuticamente aceptable, vehículo que puede tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para su administración. Estas composiciones farmacéuticas son deseables en una forma de dosificación farmacéutica unitaria adecuada, en particular, para su administración por vía oral, por vía rectal, por vía percutánea, intratecal, intravenosa o por inyección parenteral. Por ejemplo, en la preparación de las composiciones en forma de dosificación oral, se puede emplear cualquiera de los medios farmacéuticos usuales tal como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares en el caso de preparaciones líquidas orales tales como suspensiones, jarabes, elixires, emulsiones y soluciones; o vehículos sólidos tales como almidones, azúcares, caolín, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares en el caso de polvos, píldoras, cápsulas y comprimidos. Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan las formas unitarias de dosificación oral más ventajosas, caso en el que se emplean obviamente vehículos farmacéuticos sólidos. Para composiciones parenterales, normalmente el vehículo comprende agua estéril, al menos en gran parte, aunque otros ingredientes, por ejemplo, para favorecer la solubilidad, se pueden incluir. Se pueden preparar soluciones inyectables, por ejemplo, en las que el vehículo comprende solución salina, solución de glucosa o una mezcla de solución salina y de glucosa. También se pueden preparar suspensiones inyectables, caso en el que se pueden emplear vehículos líquidos apropiados, agentes de suspensión y similares. También se incluyen preparaciones en forma sólida, que están destinadas a convertirse, poco antes de su uso, en preparaciones en forma líquida. En las composiciones adecuadas para administración percutánea, el vehículo opcionalmente comprende un agente de potenciación de la penetración o un agente humectante adecuado, o ambos, opcionalmente combinados con aditivos adecuados de cualquier naturaleza en proporciones menores, aditivos que no introducen ningún efecto perjudicial significativo en la piel. Una revisión de las diferentes formas farmacéuticas para la administración de fármacos y su preparación se pueden encontrar en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 10ª edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente en forma de dosificación unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma de dosificación unitaria como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas como dosificaciones unitarias, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de principio activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con el vehículo farmacéutico requerido. Los ejemplos de dichas formas de dosificación unitaria son comprimidos (incluyendo comprimidos marcados o revestidos), cápsulas, píldoras, supositorios, paquetes de polvos, obleas, soluciones inyectables o suspensiones y similares,y múltiples segregados de los mismos.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención, incluyendo formas de dosificación unitaria, pueden contener el principio activo en una cantidad que está en el intervalo de aproximadamente el 0,1 % al 70 %, o aproximadamente el 0,5 % al 50 %, o aproximadamente el 1 % al 25 %, o aproximadamente el 5 % al 20 %, comprendiendo el resto el vehículo, en el que los anteriores porcentajes son p/p frente al peso total de la composición o la forma de dosificación.

La dosis del compuesto de cualquiera de las Fórmulas I-V, su sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a administrarse depende del caso individual y como de costumbre, se debe adaptar a las condiciones del caso individual para un efecto óptimo. Por lo tanto ello depende, por supuesto, de la frecuencia de administración y de la potencia y la duración de la acción del compuesto empleado en cada caso para el tratamiento o profilaxis, pero también de la naturaleza y la gravedad de la enfermedad y síntomas y del sexo, la edad, el peso, la medicación concomitante y el grado de respuesta del sujeto que se va a tratar y de si el tratamiento es agudo o profiláctico. Las dosis se pueden adaptar en función del peso y para aplicaciones pediátricas. Las dosis diarias se pueden administrar cada día o en múltiples cantidades tales como dos veces al día, tres veces al día o cuatro veces al día.

Síntesis de compuestos

Los compuestos de la presente invención se pueden preparar usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica en vista de esta divulgación. Por ejemplo, los compuestos de la presente invención se pueden preparar como se describe en Masip, *et al.,* 2005.

Prueba de compuestos

Además de las pruebas descritas en los ejemplos, los compuestos de la presente invención se pueden someter a prueba para modelo *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer como sigue: La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y se usa para estudiar el efecto neuroprotector del compuesto sometido a prueba en enfermedad de Alzheimer. Las células se pre-tratan durante 3 horas con el compuesto sometido a prueba a concentraciones diferentes (20 ng/ml, 100 ng/ml, 2 µg/ml, 20 µg/ml y 50 µg/ml) con el compuesto sometido a prueba (100 ng/ml). A continuación se añaden las fibrillas de beta amiloides (100 µM) y se incuban durante 24 h. El número de células supervivientes se determina el día después por ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).

La inducción de TrkA, kBα y fosforilación SAPK/JNK por los compuestos de la presente invención se pueden someter a prueba como sigue. La activación de TrkA es el primer episodio en la cascada de señalización que da lugar a la diferenciación y a la supervivencia de neuronas que responden a NGF y a células PC 12 (Greene y Tischler, 1976; Chao, 2003; Huang y Reichardt, 2003). Para evaluar si la actividad neurotrófica de peptoides similares a NGF está

mediada por la interacción con receptor TrkA, se analiza su capacidad para inducir fosforilación de TrkA en células PC 12. La actividad de peptoides se pueden someter a prueba en el intervalo de concentraciones que fueron eficaces en diferenciación de células PC 12.

Análisis de transferencias de western. Las células aubconfluentes se hacen crecer durante toda una noche en medio que contenía FBS al 2 % y HS al 1 % y se estimulan con 100 ng/ml de NGF o con los productos químicos pequeños similares a NGF para los puntos temporales indicados. A continuación se lavan las células con solución salina tamponada con fosfato (PBS) fría y brevemente se someten a sonicación en tampón de muestra de SDS (que contiene β-mercaptoetanol y PMSF 2 mM). Los lisados (200 µgde proteínas totales) se separan en SDS-PAGE y se transfieren a la nitrocelulosa (Whatman, Dassel, Alemania). Después de bloquear con leche descremada en tampón de TBST al 5 % (Tris 10 mM (pH 7,5; NaCl 150 mM/Tween 20 al 0,2 %), las transferencias se sondean durante la noche a 4 ºC con anticuerpo anti-p-TrkA (Tyr 490 (1:1000), anticuerpo anti TrkA (1:1000), anticuerpo de ratón anti-p-kBα (Ser 32/36)(5A5) (1/ 1000), anticuerpo de ratón anti kBα (L35A5) (1:1000), anticuerpo anti-p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (1:1000) o anticuerpo anti-SAPK/JNK (1/1000) (todos ellos de Cell Signaling), seguido por incubación con IgG conjugada con HRP (Jackson ImmunoResearch) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). La detección de especies fosforiladas se realiza usando el sistema de quimioluminiscencia potenciada (ECL) (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ).

Para investigar si los compuestos de la presente invención activan p75, se puede analizar la activación de la RUTA DE NF-κB (Bonizzi G, Karin M. 2004) y la ruta SAPK/JNK (muerte celular) en las líneas celulares PC 12 y RN22. Las células RN22 expresan niveles altos del mensaje del receptor p75 y de la proteína p75, mientras que la expresión de TrkA es indetectable (Gentry et al., 2000). NF-κB funcionalmente activo es como un regulador transcripcional en una forma dimérica que consiste en homo- o heterodímeros, el dímero NF-κB prototípico consiste en las subunidades p65 y p50. La activación de NF-κB tiene lugar principalmente a través de la degradación de las proteínas IκB, una familia de proteínas inhibidoras unida a los dímeros NF-κB. En respuesta a los estímulos activadores, las proteínas inhibidoras se fosforilan, lo que los marca como objetivos para la ubiquitinación y la posterior degradación. Un miembro de la familia inhibidora, IkBα, se degrada en respuesta a la mayoría de los activadores NF-κB (Ghosh et al., 1998). Para examinar activación de NF-κB en respuesta a NGF y los diferentes peptoides seleccionados, las transferencias de western del total de los extractos celulares de células RN22 y PC 12 tratadas con NGF y los peptoides a tiempos variantes se sondearon con un anticuerpo anti-fosfo-kBα.

En varios sistemas neuronales, la activación de JNK se ha vinculado causalmente con la inducción de muerte celular programada (Bhakar et al., 2003). En cultivo, la señalización de NGF a través de p75 dio lugar a la activación tanto de NF-kB como de JNK, dando como resultado finalmente la muerte celular programada (Yoon et al., 1998). Para examinar la actividad de JNK en células RN22 se pueden hacer transferencias de western con anticuerpo anti-fosfo-SAPK/JNK para evaluar la activación de la ruta.

El efecto de los peptidomiméticos de neurotrofinas (por ejemplo, peptoides NGF-miméticos) en encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) se puede evaluar como sigue:

Animales, inducción de encefalomielitis autoinmune experimental y tratamiento. Los ensayos están aprobados por el Comité de Cuidado Animal de la Universidad de Barcelona. Se inmunizan subcutáneamente ratones C57BL/6 hembra de Harlan (8-12 semanas de edad) por vía subcutánea en ambas almohadillas traseras con 300 µg de péptido 35-55 de glucoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG) (Spikem, Firenze) emulsionados con 50 µg de *Mycobacterium tuberculosis* (cepa H37Ra; Difco, Detroit, MI) en coadyuvante de Freund incompleto (IFA) como se describe previamente (Palacios et al. 2.007). Los ratones se inyectaron por vía intraperitoneal con *toxina pertúsica* (Sigma)(500 ng) en el momento de la inmunización y 2 días después. Los animales se pesan y se inspeccionan en busca de signos clínicos de la enfermedad diariamente por un observador ciego. La gravedad de la enfermedad de EAE se evalúa de acuerdo con la siguiente escala: 0 = normal; 0,5 = flojedad de rabo leve; 1 = flojedad de rabo; 2 = parapesia leve de los miembros traseros, marcha inestable; 3 = parapesia moderada, movimientos voluntarios aún posibles; 4 = paraplejia o tetraparesia; 5 = estado moribundo Los datos mostrados durante los ensayos clínicos son representativos de dos experimentos independientes realizados con el número indicado de animales (Moreno et al., 2006).

Se preparan los compuestos de prueba en agua con DMSO al 5 %. Los animales se tratan con el compuesto de prueba (25, 50 y 100 mg/kg) o con placebo (agua + DMSO al 5 %) a través de inyección intraperitoneal diaria comenzando después de la inmunización. Al final del estudio, los ratones se anestesiaron y se perfundieron intracardialmente con el 4 % de paraformaldehído en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,6). Los cerebros, las médulas espinales y los bazos se diseccionan y bien se fijan o bien se congelan hasta su uso. El suero se obtiene a partir de todos los animales incluidos en el estudio y se miden los niveles de transaminasas.

Con el fin de evaluar los efectos de los peptidomiméticos de neurotrofina (por ejemplo, los peptoides similares a NGF) "in vivo", se puede estudiar el efecto de los peptidomiméticos de neurotrofinas (por ejemplo, los peptoides miméticos de NGF) en el modelo animal de EM. Ratones C57BL/6 inmunizados con péptido MOG35-55 se tratan diariamente con un compuesto de prueba por vía intraperitoneal desde el día 0 hasta el día 25 a diferentes concentraciones del compuesto. El efecto de los compuestos de la presente invención en SNC y la inflamación periférica se puede someter a prueba como sigue.

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real. Cerebros y médulas espinales de ratones obtenidos en el momento de la muerte se homogeneizan en tampón de lisis de ARN. Se extrae el ARN total usando el sistema de aislamiento Mini Kit RNeasy (Qiagen, Chatwworth, CA), que incluye tratamiento de ADNasa usando el conjunto de ADNasa libre de ARNasa I(Quiagen). El ARN total (35 mg) se somete a transcripción inversa usando el Sistema de Transcripción Inversa (kit de archivo de ADNc de capacidad alta, Applied Biosystems, Foster City, CA). La reacción a tiempo real se lleva a cabo a 25 ºC durante 10 minutos, seguida de a 37 ºC durante 2 horas y finalmente se almacenó a 4 ºC. Los cebadores y sondas de TaqMan marcados con fluorescencia específica de diana pueden adquirirse de Applied Biosystems (ensayos de expresión génica de TaqMan). Por ejemplo, se puede usar la mezcla maestra universal TaqMan (Applied Biosystems). Se lleva a cabo amplificación de ADN complementario en un sistema en tiempo real DNA Engine Opticon 2 (MJ Research, Watertown, MA) usando 0,9 µM para cada cebador y 0,25 µM para la sonda y 20 ng de ADN complementario. Las condiciones de reacción son 2 minutos iniciales a 50 ºC, seguidos de 10 minutos a 95 ºC y 40 ciclos de 15 segundos a 95 ºC y 1 minuto a 60 ºC. Cada muestra se somete a ello por triplicado y en cada placa la diana y el control endógeno se amplifican en diferentes pocillos. La expresión del gen sometido a prueba se cuantifica en relación al nivel del gen constitutivo 18rRNA (Palacios et al., 2008).

Inmunohistoquímica. Se realiza la evaluación histológica en secciones de cerebro y de médula espinal fijadas en paraformaldehído, incluidas en parafina. Se tiñeron secciones 10 µm de grosor con hematoxilina y Luxol Fast Blue para evaluar la inflamación y la desmielinización. Se realiza evaluación histológica semicuantitativa para inflamación y desmielinización y se puntúa a ciegas usando la siguiente escala: 0 = normal; 1 = 1 a 3 manguitos perivasculares/sección con desmielinización mínima; 2 = 3 a 10 manguitos perivasculares/sección acompañados de desmielinización moderada; 3 = formación de manguitos perivasculares generalizada, desmielinización extensa con lesiones confluentes grandes (Villoslada et al., 2001).

Se llevan a cabo procedimientos inmunohistoquímicos en secciones incluidas en parafina de 10 µm de cerebro y médula espinal como se describe previamente (Villoslada et al., 2001). Se añaden anticuerpos primarios a las concentraciones de 1/1000 para MCA500 (de rata anti-CD3·de ratón de Serotec) y de 1/500 para MCA1107 (de rata anti-CD4 de ratón de Serotec). La especificidad de las inmunorreacciones se determina incubando secciones sin los anticuerpos primarios o sin usar los controles isotípicos correspondientes que no proporcionaron ninguna inmunorreactividad.

Ensayo de proliferación. Los esplenocitos de ratones C57BL/6 sin tratamiento anterior, no inmunizados se obtienen para valoración in vitro del efecto del compuesto de prueba en la proliferación celular. El ensayo para la proliferación de esplenocitos se realiza como se describe previamente (Martínez-Forero et al., 2008).

Para evaluar el efecto del compuesto de prueba en la respuesta inmunitaria periférica, se evalúan la respuesta proliferativa contra el antígeno inmunizante (MOG) en esplenocitos de animales sin tratamiento anterior y el perfil de citocinas en células del bazo de animales de placebo y de animales tratados. La expresión génica de interleucina 2 (IL2), interferón γ (IFNγ), factor de necrosis tumoral a (TNFα), sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) e interleucina 10 (IL10) puede ser investigada mediante PCR con transcriptasa inversa cuantitativa al final del experimento en esplenocitos de animales de placebo y de animales tratados.

Análisis estadístico. Se pueden realizar análisis estadísticos con la prueba U de Mann-Whitney de dos colas para comparar puntuaciones EAE, prueba chi 2 para comparar incidencia de enfermedad y curvas de Kaplan-Meier para las diferencias en el día de la aparición de EAE. Los valores de p menores de 0,05 se considera que indican una diferencia significativa. La evaluación estadística se lleva a cabo usando el programa estadístico SPSS 16.0 (SPSS, Chicago, IL).

Los siguientes ejemplos son ilustrativos, pero no limitantes, de los compuestos, composiciones y procedimientos de la presente divulgación. Modificaciones y adaptaciones adecuadas de la diversidad de condiciones y parámetros, que se encuentran normalmente en terapia clínica, son obvias para los expertos en la técnica a la vista de esta divulgación.

Ejemplos

Ejemplo 1

Diseño de agonistas de NGF por química combinatoria

General. Disolventes, aminas y otros reactivos se adquirieron de proveedores comerciales y se usaron sin purificación adicional. Las reacciones realizadas en condiciones de irradiación de microondas se llevaron a cabo en un matraz de fondo redondo de 100 ml equipado con un condensador de Dimroth. Se introdujo el matraz en la cavidad monomodo de un aparato CEM Model Discover. Se registraron los espectros de RMN en un aparato Varian Inova 500 (RMN de ^{1}H, 500 MHz; RMN de ^{13}C, 125 MHz) y en un aparato Unity 300 (RMN de ^{1}H, 300 MHz; RMN de ^{13}C, 75 MHz). Cuando sea necesario, la asignación de picos de RMN de ^{1}H y de ^{13}C para los compuestos se confirmó por experimentos de gDQCOSY y gHSQC. La aparición de confórmeros diferentes dio lugar a espectros altamente complejos; las absorciones dadas a continuación se refieren al confórmero principal presente en la muestra. Los análisis de RP-HPLC se realizaron con un sistema modulat Hewlett Packard Series 1100 (detector de UV 1315A) usando una columna Kromasil 100 C8 en fase reversa (25 x 0,46 cm, 5 µm), con mezclas CH_3CN-tampón formiato de amonio (20 mM, pH = 5,0) a 1 ml/min como fase móvil y monitorizando a 220 nm. La RP-HPLC semi-preparativa se realizó con un sistema Waters (Milford, MA, EE.UU.). Espectros de masas de alta resolución (HREM-FAB) se llevaron a cabo en el IQAC -

Instituto de Química Avanzada de Cataluña - (España).

Síntesis de peptoides individuales. La síntesis de peptoides individuales G79, G80 y G81 para los ensayos in vitro e vivo se llevó a cabo tras el procedimiento de subestructura comunicado por el grupo de Zuckermann con algunas modificaciones (Zuckermann et al., 1992)

La síntesis se llevó a cabo en una resina de poliestireno reticulado al 1 % que lleva el engarce de amida de Rink protegido con fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) AM RAM (0,79 mmol/g, Rapp Polymer; Alemania). Una suspensión de 4 g de resina en 50 ml de DMF se dispuso en un matraz de fondo redondo de 100 ml provisto de un agitador magnético. Se agitó la suspensión durante 5 minutos a 20 ºC, el disolvente se retiró por filtración a través de una jeringa de polipropileno de 60 ml provista de una placa porosa de polietileno. A continuación, la resina se transfirió de nuevo al matraz de reacción.

1. Desprotección de Fmoc. Se añadió una solución de 60 ml de piperidina al 20 % en DMF al matraz de fondo redondo que contiene la resina. Se dejó reaccionar a la mezcla sometida a la activación de microondas durante 5 minutos a 60 ºC y 150 W. La resina se drenó sobre la jeringa de 60 ml y se lavó con 40 ml de DMF. El tratamiento se realizó por duplicado. A continuación, la resina se filtró y se lavó con DMF (3 x 40 ml), iPrOH (3 x 40 ml) y CH_2Cl_2 (3 x 40 ml). Finalmente, se extrajo durante 2 minutos y se transfirió al matraz de reacción. La desprotección se monitorizó usando la prueba de TNBS (color rojo como positivo).

2. Primera acilación. La resina se trató con una solución de 5 equivalentes de ácido bromoacético (2,2 g, 15,8 mmol) y 5 equivalentes de N, N-diisopropilcarbodiimida (2,5 ml, 15,8 mmol) en 50 ml de DMF. La acilación se llevó a cabo en condiciones de irradiación de microondas (5 min, 60 ºC, 150 W). A continuación, la resina se filtró usando la jeringa y se lavó con 40 ml de DMF. Se llevó a cabo la reacción por duplicado. Después de esto, la resina se filtró y se lavó con DMF (3 x 40 ml), iPrOH (3 x 40 ml) y CH_2Cl_2 (4 x 10 ml). A continuación, se extrajo durante 2 min y la ausencia de amina primaria se evaluó por prueba de TNBS.

3. *Primer acoplamiento de aminación.* Una suspensión de la resina acilada en 50 ml de DMF se trató con la amina primaria adecuada de acuerdo con el compuesto final: 5 equivalentes (2,2 ml, 15,8 mmol) de 2,2 ml 1-(3-aminopropil)-2- pirrolidinona, o 5 equivalentes (3,2 g, 15,8 mmol) de 4-(2-aminoetil)bencenosulfonamida. La reacción se llevó a cabo en condiciones de irradiación de microondas (7 min, 80 °C, 150 W). Se llevó a cabo la reacción por duplicado, lavando y escurriendo la resina a través de la jeringa entre los tratamientos. Finalmente, la resina se drenó durante 2 minutos y se transfirió al matraz. La incorporación de la amina se confirmó por la prueba de cloranilo (color verde para aminas secundarias).

4. *Segunda y tercera etapas de acilación.* Se llevaron a cabo de forma similar a la primera etapa de acilación. En este caso, dos tratamientos de acilación fueron suficientes para completar la reacción.

5. *Etapas de acoplamiento de aminación segunda y tercera.* Se llevaron a cabo de forma similar a la primera etapa de aminación, usando las aminas primarias correspondientes. Por tanto, se usaron 5 equivalentes (1,8 ml, 15,8 mmol) de 2-metil-1-propanamina para el segundo acoplamiento de aminación. Para la tercera aminación, se usaron 5 equivalentes (2,0 ml, 15,8 mmol) de 2-(2-fluorofenil)etanamina o 5 equivalentes (2,0 ml, 15,8 mmol) de 2-(1-pirrolidinil)etanamina de acuerdo con la composición del peptoide correspondiente.

6. *Escisión.* Después de drenar la resina, se dividió en 4 alícuotas y cada una se trató con 20 ml del cóctel de escisión ($FA/CH_2Cl_2/H_2O$ 60:40:2 (v/v/v)). Las mezclas se agitaron durante 30 min a 20 ºC y se filtraron a través de jeringas de polipropìleno de 10 ml provistas de una placa porosa de polietileno. Los filtrados se recogieron en un matraz de 250 ml y los disolventes se retiraron a presión reducida. Finalmente, el residuo de aceite amarillo que se obtiene para el caso de cada peptoide se redisolvió en mezcla de H_2O/ACN y se liofilizó para dar 1,25-1,80 g del peptoide en bruto esperado en purezas más altas del 85 % por HPLC.

7. *Purificación y caracterización química.* Los compuestos se purificaron por el sistema de HPLC semipreparativa usando una columna Waters PrePack®-C_{18} (47 x 300 mm, 15-20 µm), eluyendo con mezclas CH_3CN/H_2O que contienen TFA al 0,1 % como fases móviles y un caudal de al 60 ml/min. Se obtuvieron compuestos finales en purezas más altas del 98 % por HPLC. Las cantidades obtenidas fueron: 10,64 mg de G79 (pureza al 99 %; HPLC), 7,55 mg de G80 (pureza al 99 %; HPLC) y 12,68 mg de G81 (pureza del 99 %; HPLC).

[N-(2-(2'-fluorofenil)etil)glicil]-[N-(2-metilpropil)glicil]-N-[3-(2'-oxopirrolidinil)propil]glicinamida (G79). Fórmula química: $C_{25}H_{38}FN_5O_4$; P.M.: 491.5987.

[N-(2-(2'-fluorofenil)etil)glicil]-[N-(2-metilpropil)glicil]-N-[2-(4'-sulfamoilfenil)etil]glicinamida (G80). Fórmula química: $C_{26}H_{36}FN_5O_5S$; P.M.: 549.658.

[N-(2-(1-pirrolidinil)etil)glicil]-[N-(2-metilpropil)glicil]-N-[2-(4'-sulfamoilfenil)etil]glicinamida (G80). Fórmula química: $C_{24}H_{40}N_6O_5S$; P.M.: 524.6766.

Ejemplo 2

Ensayo de diferenciación de respuesta a dosis en la línea celular de PC12

Cultivo celular: Se mantuvo reserva de los cultivos de PC12 en medio de Ham F12 suplementado con suero bovino fetal al 2,5 % (FBS), 15 % de suero de caballo (SH) y penicilina/estreptomicina al 1 %. El cultivo celular se mantuvo en CO_2 al 5 % a 37 ºC.

Se evaluó diferenciación de células PC12 tratando las células con todos los compuestos de prueba (G79, G80 y G81) a concentraciones de realización de pruebas diferentes (2-20-100 ng/ml y 2-20-50 µg/ml). Las células se plaquearon primero en placas de 24 pocillos revestidos de colágeno con FBS al 2,5 % en el medio para des-diferenciarse. Después de 72 horas, se añadieron compuestos de prueba y NGF (Sigma Aldrich; 100 ng/ml) como control positivo de la diferenciación. El número de células diferenciadas, con procesos de neuritas mayores de dos cuerpos celulares de longitud, se cuenta después de 3 días de tratamiento. El recuento celular se realiza en tres campos seleccionados al azar con 100 células.

Los compuestos G79, G80 y G81 inducen la diferenciación de células PC12 (FIG. 1A-1D). El control positivo de NGF induce una diferenciación de 16,1 ± 1,9 células en un campo de 100 células. G79 induce diferenciación significativa, en comparación con las células control PC12 no tratadas, en una manera dependiente de la dosis (2-20-100 ng/ml y 2-20 µg/ml). La mejor concentración de trabajo es 20 µg/ml (número de células: 11,3 ± 2,68). A 50 µg/ml el número de células diferenciadas disminuye.

G80 induce buena diferenciación con neuritas muy largas en células PC12. La mejor concentración de trabajo es 20 ng/ml. G81 induce diferenciación significativa, en comparación con las células no tratadas PC12 control, en una manera dependiente de dosis hasta 100 ng/ml, que es la mejor concentración de trabajo (número de células: 9,2 ± 3,9). Para concentración más alta el número de células diferenciadas disminuye. El porcentaje de células diferenciadas se calcula según está relacionado con diferenciación inducida de NGF (FIG. 1E).

Ejemplo 3

Ensayos de supervivencia

Peptidomiméticos de neurotrofinas G79, G80 y G81 promueven la supervivencia celular

Cultivo celular. La línea celular rata de schwannoma de rata RN22 se cultivó en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con FBS al 10 % y penicilina/estreptomicina al 1 %. El cultivo celular se mantiene en CO_2 al 5 % a 37 ºC.

Las RN22 se plaquearon en placas de 24 pocillos a la concentración de 30000 células/pocillo en medio sin suero. Después de 24 horas, los compuestos de prueba G79, G80 y G81 se añadieron a diferentes concentraciones (1-10-50 ng/ml y 1-10 µg/ml) y NGF se usó como control positivo de supervivencia. Las células se incubaron así durante 2 horas. Se indujo estrés oxidativo con sulfato de cobre (CuSO4) a la concentración final de 150 µg/ml. Después de incubación durante toda una noche la viabilidad celular se determinó leyendo la absorbancia después de añadir MTT (Sigma Aldrich).

El porcentaje de las células supervivientes se calculó en relación a diferenciación inducida por NGF (FIG. 2). G79 incrementó la viabilidad celular a todas las concentraciones que se sometieron a prueba (1-10-50 ng/ml y 1-10 µg/ml) con una mejor concentración de trabajo a 10 ng/ml (98,11 % de la viabilidad celular, como % en relación al control sin estrés). G80 incrementó la viabilidad celular a todas las concentraciones que se sometieron a prueba (1-10-50 ng/ml y 1-10 µg/ml) con una mejor concentración de trabajo a 50 ng/ml (viabilidad celular al 99,86 %, como % en relación al control sin estrés). G80 incrementó la viabilidad celular a todas las concentraciones que se sometieron a prueba (1-10-50 ng/ml y 1-10 µg/ml) con una mejor concentración de trabajo a 50 ng/ml (viabilidad celular al 101,86 %, como % en relación al control sin estrés).

Ejemplo 4

Ensayo de actividad de secretagogos;

G79, G80 y G81 no inducen la secreción de NGF.

Para evaluar si los compuestos sometidos a prueba, G79, G80 y G81, actúan como secretagogos, induciendo actividad neurotrófica a través de la síntesis de NGF, las células PC12 se plaquean en placas de 24 pocillos con FBS solamente al 2,5 % y después de 72 horas se trataron las células con los compuestos sometidos a prueba (cada uno en 100 ng/ml) junto con anticuerpo anti-NGF (1 µg/ml, AbCam). Después de tres días de tratamiento, la diferenciación se evaluó. El recuento celular se realizó en tres campos seleccionados al azar con 100 células.

El tratamiento con G79, G80 o G81 junto con anticuerpo anti-NGF indujo diferenciación de PC 12 de forma similar a la diferenciación inducida por los compuestos sometidos a pruebas solos (FIG. 3A). Aunque el número de células diferenciadas por NGF disminuye añadiendo anticuerpo anti-NGF (12,8 ± 6,3 frente a 20,7 ± 7,1), el número de células diferenciadas resulta ser bastante similar comparando el tratamiento con los compuestos sometidos a prueba solo con el tratamiento con estos compuestos y anticuerpo anti-NGF. El tratamiento de G79/anti-NGF obtenido un número de células diferenciadas para cada campo resultó ser 18,8 ± 4,9 frente a 11,5 ± 2,8 para el tratamiento solamente con

G79; para G80/anti-NGF es 14,1 ± 1,8 frente a 15,1 ± 6,3 para el tratamiento solamente con G80; para G81/anti-NGF es 15,5 ± 4,1 frente a 14,1 ± 3,3. El porcentaje de células diferenciadas se calcula como con relación a diferenciación inducida por NGF (FIG. 3F).

Ejemplo 5

Ensayo de actividad sinérgica; G79, G80 y G81 no tienen una actividad sinérgica con NGF.

Para evaluar si las moléculas pequeñas G79, G80 y G81 interfieren con la actividad máxima de NGF o dan lugar a efectos aditivos, las células PC 12 se plaquearon en placas de 24 pocillos revestidos con colágeno con FBS al 2,5 % y se trataron después de 72 horas con los productos químicos pequeños (cada uno a 100 ng/ml) en combinación con NGF a la concentración de 100 ng/ml. En el mismo experimento las células PC12 se trataron con las moléculas pequeñas o NGF solo, como controles. El número de células diferenciadas se evaluó después de tres días de tratamiento. El recuento celular se realizó en tres campos seleccionados al azar con 100 células.

Los resultados se muestran en la figura 3B. El tratamiento con moléculas G79, G80 o G81 junto con NGF disminuyó la actividad de NGF, lo que da como resultado una disminución en el número de células diferenciadas en el tratamiento de combinación NGF/G79- G80-G81. Aunque el número de células diferenciadas de NGF en este experimento da como resultado 20 ± 7,1, el número de células diferenciadas obtenidas por el tratamiento NGF/G79 da como resultado 11,3 ± 2,6. Con el tratamiento NGF/G80 el número de células diferenciadas obtenido es 13 ± 5,9. Con el tratamiento NGF/G81 el número de células diferenciadas obtenido es 13,3 ± 3,8. En conjunto, estos resultados descartaron que G79, G80 o G81 puedan tener efectos aditivos, sinérgicos o antagonistas con NGF. El porcentaje de células diferenciadas se calcula como con relación a diferenciación inducida por NGF (FIG. 3G).

Ejemplo 6

Ensayo de activación de los receptores

La hipótesis de que G79, G80 y G81 pueden actuar a través de la unión a la porción extracelular de TrkA (sitio de unión) y activar los receptores de tirosina cinasas se probó tratando las células PC 12 con los productos químicos pequeños en combinación con el anticuerpo anti-TrkA o el K252a, un inhibidor de tirosina cinasa. Para este propósito las células PC 12 se plaquearon en placas de 24 pocillos revestidos con colágeno con FBS al 2,5 % y después se incubaron 72 horas con las moléculas pequeñas solas o en combinación con el anticuerpo anti-TrkA (AbCam, 1:2000) o K252a. NGF (100 ng/ml) se usó como control y se añadió solo o en combinación con anticuerpo anti-TrkA o con K252a. El número de células diferenciadas se evaluó después de tres días de tratamiento. El recuento celular se realizó en tres campos seleccionados al azar con 100 células. Los resultados se muestran en la figura 3C.

El tratamiento con G79, G80 y G81 moléculas conjuntamente con anticuerpo anti-TrkA no inhibió la diferenciación de células PC 12. Aunque el número de células diferenciadas por NGF se disminuye añadiendo anticuerpo antiTrkA (12,8 ± 6,3 frente a 20,7 ± 7,1), el número de células diferenciadas resultó ser similar. El tratamiento de G79/antiTrkA indujo la diferenciación de células PC12: 19,6 ± 8,1 frente a 11,5 ± 2,8 para el tratamiento solamente con G79; para G80/antiTrkA es 14,6 ± 4,1; 15,1 ± 6,3 para el tratamiento solo con G80; para G81/antiTrkA es 16,5 ± 5,9 frente a 14,1 ± 3,3. El porcentaje de células diferenciadas se calcula como con relación a diferenciación inducida por NGF (FIG. 3H).

Ejemplo 7

Ensayos de G79, G80 y G81 de inhibición de señalización de ruta de diferenciación activada por NGF.

Para evaluar si la ruta de transducción inducida por G79, G80 y G81 implica activación de AKT y ERK, se trataron células PC 12 con los compuestos de prueba en presencia de LY294002, un inhibidor de PI3K (un activador corriente arriba de AKT) y PD98059, un inhibidor de MAPK cinasa (un activador corriente arriba de ERK). Para este propósito, las células PC12 se plaquearon en placas de 24 pocillos revestidos con colágeno con FBS al 2,5 % y después de 72 h se trataron las células con las moléculas pequeñas en combinación con LY294002 (Sigma Aldrich, 10 μM) o PD98059 (Sigma Aldrich, 50 μM). NGF (100 ng/ml) se usó como control y se añadió solo o en combinación con los inhibidores.

Con el fin de evaluar si G79, G80 o G81 modulan ruta de señalización de TrkA, se usaron inhibidores de ruta de AKT y ERK. El tratamiento con NGF más LY294002 (FIG. 3D) disminuyó el número de células diferenciadas en comparación con NGF solo (6,8 ± 2,7 frente a 20,7 ± 7,1). De la misma manera, el tratamiento con G79 más LY294002 disminuyó el número de células diferenciadas en comparación con G79 solo (5,28 ± 2,54 frente a 11,5 ± 2,8). El tratamiento con G80 más LY294002 disminuyó el número de células diferenciadas en comparación con G80 solo (8,5 ± 2,6 frente a 15,1 ± 6,3). El tratamiento con G81 más LY294002 disminuyó el número de células diferenciadas en comparación con G81 solo (6,6 ± 4,02 frente a 14,1 ± 3,3). El porcentaje de células diferenciadas se calcula como con relación a diferenciación inducida por NGF (FIG. 3I).

El tratamiento con NGF más PD98059 (FIG. 3E) disminuyó el número de células diferenciadas en comparación con NGF solo (2,1 ± 1,9 frente a 20,7 ± 7.1). De la misma manera el tratamiento con G79 más PD98059 disminuyó el número de células diferenciadas en comparación con G79 solo (3,1 ± 1,06 frente a 11,5 ± 2,8). El tratamiento con G80 más PD98059 disminuyó el número de células diferenciadas en comparación con G80 solo (4 ± 2,3 frente a 15,1 ± 6,3).

El tratamiento con G81 más PD98059 disminuyó el número de células diferenciadas en comparación con G81 solo (1,6 ± 1,1 frente a 14,1 ± 3,3). El porcentaje de células diferenciadas se calcula como con relación a diferenciación inducida por NGF (FIG. 3J).

Ejemplo 8

Ensayo de unión

La unión de los compuestos de prueba, G79, G80 y G81, a través de la TrkA o del receptor p75 se puede poner a prueba por un ELISA competitivo basado en células. En primer lugar se sembraron células PC 12 en placas de 96 pocillos (Fisher Scientific) y se incubaron hasta 85 %-90 % de confluencia. Para someter a prueba la unión de los compuestos de prueba a receptor TrkA, el receptor p75 expresado en la superficie de PC 12 se inhibe por la unión de un anticuerpo de bloqueo anti-p75 (AbCam) que se une al dominio extracelular del receptor. Se incuban las células durante 45' con NGF a diferentes concentraciones crecientes (0,01-0,1-1 nM) con o sin cada una de las moléculas pequeñas como competidores a una concentración constante. Después de un lavado en PBS frío las células se fijaron durante 15' con 4 % de PFA. A continuación, las células se lavan con PBS y se incuban con anticuerpo anti-NGF (1 µg/ml) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se aclararon dos veces con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-NGF durante 1 hora a temperatura ambiente (1:500; anticuerpo conjugado con DyLight 488, Jackson ImmunoResearch). Las células se lavaron y la fluorescencia se lee por un espectrofluorímetro a 488 nm.

Ejemplo 9

El modelo de glaucoma G79 evita la muerte neuronal en un modelo animal para glaucoma.

12 ratas Sprague Dawley (4 meses de edad) se anestesiaron con isobutano y se sometieron a inyección de solución solución salina hipertónica en la vena epiescleral del ojo derecho. La presión intraocular (IOP) se midió antes de la operación y se monitorizó una vez a la semana usando un TonoLab durante 7 semanas. El tratamiento con G79 se comenzó a una semana después de la inducción de glaucoma por su aplicación tópica al conjuntivo. Se llevaron a cabo dos experimentos diferentes.

En el primer experimento, G79 se disolvió en solución fisiológica y se usó a dos concentraciones diferentes (200 µg/ml y 400 µg/ml). NGF se usó como control positivo (200 µg/ml) y la solución fisiológica, usada para disolver todas las moléculas, se suministró como placebo. Los animales se dividieron en 4 grupos (3 animales en cada grupo) : glaucoma-G79 200µg/ml; glaucoma-G79 400 µg/ml; glaucoma-NGF; glaucoma-placebo. El ojo izquierdo se usó como el control sin glaucoma. En ambos experimentos, siete semanas después de la inducción de glaucoma, los animales se sacrificaron por sobredosis de anestésico y sus ojos se tomaron y se fijaron en 4 % de PFA. Los ojos se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones de 20 µm que se van a usar para estudios histológicos (tinción hematoxilina-eosina). El recuento celular del número de células glanglionares retinianas (RGC) se realizó al azar en diez campos diferentes por cada ojo.

Las ratas se inyectaron con una solución hipertónica en el ojo que indujo alta presión intraocular durante cinco semanas. Los animales se trataron con colirio de NGF (200 µM/ml), de G79 (200-400 µM/ml) o de placebo cada día durante cinco semanas. Los animales con glaucoma y tratados con placebo (solución salina) tienen un decrecimiento significativo en el número de células ganglionares retinianas en comparación con el control. Por el contrario, los animales tratados con gotas de NGF así como los animales tratados con G79 tienen una protección significativa de las células ganglionares (FIG. 4A). Los resultados sugieren que el tratamiento de G79 ejerce neuroprotección sobre células ganglionares retinianas (RGC).

En el segundo experimento, se usó G79 a la concentración de 200 µg/ml. El objetivo de este segundo experimento era comparar la eficiencia de G79 con timolol, la terapia más común para glaucoma que funciona disminuyendo la presión intraocular. También en este experimento, se realizó un tratamiento combinatorio con G79 y timolol. Los animales se dividieron en 4 grupos que tenían 4 animales en cada grupo: glaucoma-G79 (200 µg/ml) (n = 4) ; glaucoma-timolol (n = 4) ; glaucoma-G79/timolol (n = 4) ; glaucoma-placebo (n = 4). El ojo izquierdo se usó como el control sin glaucoma. Los resultados se muestran en la figura 4C, donde G79 se comparó con la terapia actual para IOP en glaucoma, es decir, timolol. La inducción de IOP redujo significativamente el número de RGC y esta reducción fue significativa en comparación con los ojos control (C) ($p < 0,0001$) y a todos los tipos de tratamiento sometido a prueba ($p < 0,0001$). El tratamiento de combinación no ejerce efecto aditivo en la protección de RGC (**GL/timolol + G79 frente a Ctr $p = 0,02$; § GL/timolol frente a GL/timolol + G79 $p = 0,003$).

Ejemplo 10

Modelo in vitro de enfermedad de Parkinson (estrés de MPP); G79, G80 y G81 evitan la muerte neuronal en un modelo in vitro de enfermedad de Parkinson.

Cultivo celular: La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y se mantuvo en un cultivo con un 50 % de medio F12 de Ham y un medio EMEM al 50 %, suplementado con FBS al 10 %, L-glutamina 2 nM y penicilina/estreptomicina al 1 %. El cultivo celular se mantiene en una atmósfera humidificada de aire al 95 % y CO_2 a 37 ºC.

La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y se usó para estudiar el efecto neuroprotector de las moléculas pequeñas en la enfermedad de Parkinson. Las células SH-SY5Y tras la diferenciación a fenotipo neuronal con ácido retinoico, se pretrataron durante 3 horas con los compuestos de prueba a concentraciones diferentes (20 ng/ml, 100 ng/ml, 2 µg/ml, 20 µg/ml y 50 µg/ml) o con BDNF (20 ng/ml) como control positivo. A continuación, se añadió 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (100 µM) y se incubó durante 24 h. El número de las células supervivientes se determinó el día después por ensayo de 3-(4,5-dimetiltiazol- bromuro 2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).

La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y se expuso a MPTP, que dañó las neuronas por estrés oxidativo. Las células se trataron con BDNF, G79, G80, G81 o placebo cada día durante cinco semanas. Las células tratadas con placebo (solución salina) tienen una pérdida significativa de células en comparación con el control. Por el contrario, las células pretratadas con BDNF así como con G79 tienen una protección significativa de células neuronales (FIG. 5A).

Ejemplo 11

Estrés oxidativo en la línea celular humana SH-SY5Y

La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y se usó para estudiar el efecto neuroprotector de los compuestos de prueba G79, G80 y G81 en estrés oxidativo. Se pretrataron las células durante 3 horas con los compuestos de prueba a concentraciones diferentes (20 ng/ml, 100 ng/ml, 2 µg/ml, 20 µg/ml y 50 µg/ml) o con BDNF (20 ng/ml) como un control positivo. A continuación se añadió H_2O_2 (100 µM) y se incubó durante 24 h. El número de las células supervivientes se determinó por ensayo MTT. Se observó un efecto protector de G79, G80 y G81 cuando se usó H_2O_2 para inducir estrés oxidativo en la línea celular neuronal SH-SY5Y, con un efecto antioxidativo más sólido de G79 que de BDNF (FIG. 5B). En la FIG. 5B, la viabilidad celular de BDNF se ha considerado como el 100 %. El estrés por H_2O_2 indujo un decrecimiento en el porcentaje de la viabilidad celular (Ctr sin estrés frente a estrés por H_2O_2 = 100 ± 2 % frente a 95,9 ± 0,5 %). G79, en comparación con G80 y G81, es la que ejerce mejor protección, a la concentración de 20 ng/ml (BDNF frente a G79 = 100 ± 2,6 frente a 107,4 ± 5,8).

Ejemplo 12

Análisis de transferencias de western y ensayo de señalización de Luminex; G79 activa la ruta de neurotrofina

Análisis de transferencias de western: La activación (fosforilación) de los receptores de neurotrofina TrkA y TrkB se evaluó por transferencias de western como sigue: se trataron células PC12 creciendo en placas de 24 pocillos con medio de suero bajo (FBS al 0,5 %) para reducir el nivel basal de fosforilación. Después de 24 horas, las células PC12 se trataron con G79 (100 ng/ml), a continuación se recuperaron y se lisaron en 300 µl de tampón de lisis helado (Sigma Aldrich) a 5-15-30-60 min. Después de sonicación, los restos celulares se retiraron por centrifugación (14000 rpm durante 10 min) y se cargó cantidad igual de sobrenadante (30-35 µg/pocillo) y se separaron después por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % (PAGE) y a continuación se electrotransfirieron sobre membranas de PVDF. Se bloquearon las membranas por leche descremada al 5 % y a continuación se incubaron secuencialmente con los anticuerpos primarios [fosfo-TrkA, Tyr490 (Cell Signaling) o fosfo-TrkB, Tyr515 (NovusBiological)] 1:1000 durante toda una noche y con los anticuerpos secundarios 1:2000, durante 1 hora a temperatura ambiente. Las transferencias se procesaron de otro modo para la visualización por sistema de quimioluminiscencia (Amersham) y se expusieron a película Kodak para visualizar la imagen fluorográfica. Como se muestra en la FIG. 6, ambos receptores se fosforilaron ya después de 5 min.

Ensayo de señalización Luminex : La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y se usó para realizar ensayos de señalización Luminex usando el Kit de Señalización 10-Plex MAPK/SAPK-Fosfoproteína (Millipore). Esta línea celular expresa el receptor TrkB y la ruta de señalización MAPK/SAPK, típicamente se activa por los receptores de tirosina cinasas. Los anticuerpos de fosfoproteínas incluidos en el kit son los siguientes: ERK/MAP cinasa (Thr185/Tyr187); STAT-1 (Tyr701); JNK (Thr183/Tyr185); MEK-1 (Ser212); ATF-2 (Thr69/71); p53 (Ser15); HSP27 (Ser78); ruta enzimática c-Jun (Ser73); p38 (Thr180/Tyr182), cinasa p70 S6 (Thr412) ; IkBα (Ser32) (adquirido de Millipore).

Las células se propagaron y a continuación se sembraron en placas de 24 pocillos (30000 células/pocillo). Después de 24 horas, se trataron las células con dos concentraciones diferentes de agonista G79 de receptor de NGF: 100 ng/ml y 20 µg/ml. Después de añadir G79 en el medio, se recogieron las células en el tampón de lisis del kit en los siguientes puntos temporales: 30 minutos, 1 hora, 2 horas y 6 horas. El ensayo se realizó de esta forma para evaluar tanto los efectos del tiempo como los de las dosis comparando las muestras tratadas con las células no tratadas usadas como controles negativos (células SH-SY5Y no estimuladas). BDNF se usó como control positivo a la concentración de 20 ng/ml, que es la mejor concentración de trabajo conocida en la bibliografía. En la placa Luminex, cada muestra se añadió en un pocillo por duplicado. Después de añadir todas las muestras, se añadieron los controles positivo y negativo de fosforilación, incluidos en el kit de Luminex. El tampón de ensayo también se añadió por duplicado, como un control de fondo.

FIG. 7 muestra la ruta intracelular activada por la fosforilación del receptor de tirosina cinasa (RTK). En los círculos están los factores activados, mientras que en los círculos grises están los factores sometidos a prueba. Sus efectos de la línea celular SY-SY5Y en la fosforilación de varias rutas se evaluaron usando ensayo xMAP de Luminex. FIG. 8 muestra los niveles de activación de las fosfoproteínas sometidas a prueba por tecnología Luminex. Los niveles de

activación se expresan como intensidad de fluorescencia media (MFI). Según se sometió a prueba por tecnología Luminex, ATF-2, HSP-27, JNK y STAT-1 dieron como resultado modularse y fosfoactivarse significativamente en comparación con el control no estimulado. FIG. 8 muestra los gráficos del MFI para tratamientos tanto de G79 y como de BDNF, a diferentes puntos temporales.

ATF-2 se activó significativamente a 6 horas después del tratamiento de G79 (20 µg/ml), en comparación con control no estimulado (* $p < 0,05$). El control de BDNF muestra activación de ATF-2 significativa a las 2 horas después del tratamiento (§ $p < 0,05$). HSP-27 se activó significativamente a 1 hora después del tratamiento con G79 (tanto a 20 mg/ml como a 100 ng/ml), en comparación con control no estimulado (* $p < 0,05$). El BDNF no activa HSP-27. JNK se activa significativamente 6 horas después del tratamiento con G79 (tanto a 20 µg/ml como a 100 ng/ml), en comparación con control no estimulado (* y § $p < 0,05$). El control de BDNF mostró activación de JNK significativa a las 2 horas después del tratamiento (‘ $p < 0,05$). STAT-1 se activó significativamente a 6 horas después del tratamiento de G79 (20 mg/ml), en comparación con control no estimulado (* $p < 0,05$). El BDNF no activa STAT-1.

Ejemplo 13

Ensayo de unión de citometría; G79 compite con NGF y BDNF para la unión a receptores de neurotrofinas

Con el fin de evaluar la unión de G79 a los receptores TrkA (células PC 12) y TrkB (SH-SY5Y), los autores de la invención realizaron ensayos de unión competitiva por citometría de flujo. Con el fin de evaluar la competición de unión entre p75 y TrkA, las células PC 12 que expresan tanto receptores TrkA como receptores p75 se cultivaron en medio de crecimiento normal. Después de separar células con solución de tripsina, se añadieron 200.000 células/pocillo a tubos para las incubaciones siguientes. Un tubo contiene células control no tratadas. En los otros tubos, las células se preincubaron durante 45 minutos con diferentes concentraciones de NGF (0-10-20-50-100 ng/ml), que se pueden unir directamente tanto a receptores TrkA como a receptores p75, bloqueando la posible unión de G79 si compiten por los mismos receptores. A continuación, sin lavar las células, se añadió G79 conjugada con fluorescencia de FITC (100 ng/ml) y se incubaron las células así durante 1 hora. Se leen las muestras en un citómetro (FCAScan).

Para detectar la unión por separado en ambos receptores, se hizo una incubación anterior de células (antes de incubación con NGF) con anticuerpos de bloqueo. Las células se preincubaron durante 1 hora con anticuerpo de bloqueo anti-p75 (1:100; Chemicon Int.), para detectar la unión sobre TrkA, o con anticuerpo de bloqueo anti-TrkA (1:200; AbCam) para detectar la unión sobre p75. El mismo protocolo experimental se repitió con línea celular SH-SY5Y para detectar la unión con TrkB y p75 sobre estas células. En este caso BDNF se usó como un competidor para la unión sobre TrkB y p75. Todos los resultados se expresan como fluorescencia de canal promedio (MCF), que es una medida de la fluorescencia de superficie celular producida por unión G79-FITC.

FIG. 9A muestra que la señal (MCF) decrece en presencia de concentración creciente de NGF, lo que quiere decir que G79 compite por la unión sobre los mismos receptores de NGF. Con el fin de evaluar la unión sobre p75, las células se preincubaron con anticuerpo anti-TrkA, en el que se descubrió que la señal (MCF) aún disminuye, lo que indica que G79 se podría unir sobre el receptor p75 (FIG. 9B). Con el fin de evaluar la unión sobre TrkA, la preincubación con el anticuerpo anti-p75 no alteró la señal (MCF), lo que quiere decir que G79 aparentemente no compite con NGF para la unión sobre TrkA (FIG. 9C). Sin embargo, este resultado podría estar afectado por la presencia de cantidades muy pequeñas de TrkA sobre la superficie de la célula, en comparación la presencia mucho más alta de p75 (~ 75000 receptores por célula). De forma similar, la unión de G79 a TrkB se evaluó usando la línea celular SH-SY5Y (FIG. 9D). En este caso, la señal (MCF) disminuyó en presencia de concentraciones crecientes de BDNF, lo que indica que G79 compite con BDNF para uno de sus receptores.

Ejemplo 14

Modelo in vitro de esclerosis lateral amiotrófica (ELA); G79, G80 y G81 son neuroprotectoras en el modelo in vitro de ELA

Cultivo celular: células similares a neuronas motoras de ratón NCS-34 se cultivaron en DMEM (Gibco) suplementado con FBS inactivado con calor al 10 % y penicilina/estreptomicina al 1 %. El cultivo celular se mantiene en una atmósfera humidificada de aire al 95 % y CO_2 a 37 ºC.

El estrés por deprivación nutricional en neuronas motoras se llevó a cabo como se describe previamente en Masahito T. et al., J. Neuropathol. Exp. Neurol. 65(8):816-825 (2006). Para evaluar el efecto de la condición de estrés trófico en ELA, se investigó la presencia de apoptosis usando deprivación sérica. Las células NSC-34 se sembraron en placas con poli-lisina de 24 pocillos a 30.000 células/pocillo y se preincubaron durante 24 horas en DMEM más FBS al 10 % con diversas dosis de G79, G80 y G81 (20 ng/ml, 100 ng/ml, 2 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml) y de G-CSF (2 µg/ml) o BDNF (20 ng/ml) que se usaron ambos como controles positivos (Masahito T. *et al.,* ibid.; Elliot J.L., Neurobiology de Enfermedad 6: 310-320 (1999)). A continuación, se retiró el medio y se reemplazó con DMEM recién preparado sin FBS. Después de 48 horas, la viabilidad celular se sometió a ensayo por ensayo MTT, como se describe previamente.

Como se muestra en la FIG. 10, G79, G80 y G81 ejercieron neuroprotección sobre neuronas motoras expuestas a privación de suero. La viabilidad celular se expresa como el porcentaje relativo al control sin estrés. G79 mostró el mejor efecto neuroprotector a la concentración de 100 ng/ml, con un incremento significativo en la viabilidad celular en

comparación con estrés-Ctr (98,11 ± 6,14 % frente a 69,64 ± 10,12 %; aplicabilidad). También G79 mostró viabilidad celular incrementada en comparación con ambos controles positivos, G-CSF y BDNF, incluso si no es significativa (viabilidad celular de G-CSF: 76,50 ± 8,3 %; viabilidad celular de BDNF: 80,62 ± 5,2).

Ejemplo 15

Modelo de encefalomielitis autoinmune experimental (EAE); G79 mejora el modelo animal de esclerosis múltiple (EM)

El efecto de G79 se sometió a prueba en el modelo animal de EM, la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), realizando un ensayo preventivo (en el que la terapia comienza en el momento de la inducción de la enfermedad) y un ensayo curativo (en el que la terapia comienza cuando los animales están ya sufriendo la enfermedad). Se inmunizaron ratones C57BL/6 hembra de Harlan (8-12 semanas de edad) por vía subcutánea en ambas almohadillas traseras con 300 µg del péptido glucoproteico oligodendrocítico de mielina (MOG) 35-55 (Spikem, Firenze) emulsionado con 50 µg de *Mycobacterium tuberculosis* (cepa H37Ra; Difco, Detroit, MI) en coadyuvante de Freund incompleto (IFA) como se describe previamente en Palacios *et al.,* 2007. A los ratones se les inyectó por vía intraperitoneal con *toxina pertúsica* (Sigma) (500 ng) en el momento de la inmunización y 2 días después. Los animales se pesaron y se inspeccionaron en busca de signos clínicos de enfermedad diariamente por un observador ciego. La gravedad de la enfermedad EAE se evaluó durante 30 días de acuerdo con la siguiente escala: 0 = normal; 0,5 = flojedad de rabo leve; 1 = flojedad de rabo; 2 = paraparesia leve de los miembros traseros, marcha inestable; 3 = paraparesia moderada, movimientos voluntarios aún posibles; 4 = paraplejia o tetraparesia; 5 = estado moribundo Al final del estudio, los ratones se anestesiaron y se perfundieron intracardialmente con 4 % de paraformaldehído en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,6). Los cerebros, las médulas espinales y los bazos se diseccionaron y bien se fijaron o bien se congelaron hasta su uso. Además se obtuvo suero de todos los animales incluidos en el estudio. Este procedimiento se aprobó por el Comité de Cuidado Animal de la Universidad de Barcelona.

Dos experimentos diferentes se realizaron para evaluar tanto el efecto preventivo como el efecto curativo de G79, en comparación con otros fármacos que tienen como objetivo ruta neurotrofínica (amida gambógica y xaliprodeno) o con uno de la terapia de primera línea para el tratamiento de EM, es decir, acetato de glatirámero.

Para el ensayo preventivo, 10 animales se trataron con inyección intraperitoneal de G79 a la concentración de 40 mg/kg, 10 animales se trataron con inyección intraperitoneal de G79 a la concentración de 100 mg/kg, 10 animales se trataron con inyección intraperitoneal de amida gambógica a la concentración de 2 mg/kg, 10 animales se trataron con la administración oral de xaliprodeno a la concentración de 10 mg/kg. Como tanto amida gambógica como xaliprodeno se diluyeron con diferentes porcentajes de DMSO, 5 animales se trataron con inyección intraperitoneal de placebo (solución fisiológica más DMSO al 1 %) y otros 5 animales se trataron con placebo oral (solución fisiológica más DMSO al 2,5 %), respectivamente.

Se realizaron los tratamientos diariamente, comenzando después del día de la inmunización.

Para el ensayo curativo, para reducir la discrepancia entre la administración oral y la inyección intraperitoneal, como el estrés puede afectar profundamente el desarrollo de las lesiones clínicas en animales, todos los tratamientos se llevaron a cabo por inyecciones intraperitoneales. Para este estudio, se trataron 8 animales con G79 a la concentración de 40 mg/kg, 8 animales se trataron con G79 a la concentración de 100 mg/kg, 8 animales se trataron con amida gambógica a la concentración de 2 mg/kg, 8 animales se trataron con xaliprodeno a la concentración de 10 mg/kg, 8 animales se trataron con acetato de glatirámero a la concentración de 5 mg/kg, 8 animales se trataron con placebo (solución fisiológica más DMSO al 2,5 %). Se realizaron los tratamientos diariamente comenzando después del aumento de la puntuación clínica a puntuación 2 (después del segundo día a esta puntuación).

FIG. 11A y FIG. 11B muestran los resultados de la aplicación preventiva de G79 en el modelo *in vivo* de EM (terapia de aparición en el mismo día de la inducción de enfermedad). Los gráficos muestran la puntuación clínica de los ratones afectados por EAE y tratados con diferentes fármacos desde el día de la inmunización. En la FIG. 11A, los animales tratados con G79 muestran un retraso en la presencia de la enfermedad, aunque no significativo. En particular, la concentración de 100 mg/kg fue más eficaz en retrasar la enfermedad. Además, la puntuación clínica final, en el día 30º, de los animales tratados con 100 mg/kg de G79 fue más baja en comparación con animales tratados con placebo.

FIG. 12 muestra los resultados del ensayo curativo. G79 a la dosis de 100 mg/kg, muestra el mejor efecto terapéutico en mejorar la puntuación clínica. En particular G79 , en comparación con placebo, disminuyó la puntuación clínica significativamente, entre el día 16º y 23º (16º día: puntuación de G79 2,8 ± 1,2 frente a puntuación de placebo 4 ± 0,7, p= 0,01; día 19º: puntuación de G79 1,75 ± 1 frente a puntuación de placebo 3,3 ± 0,5, p = 0,003; puntuación de G79 1,6 ± 0,8 frente a puntuación de placebo 2,8 ± 0,8). También 100 mg/kg de G79 ejercieron un mejor efecto terapéutico en comparación con los otros tratamientos sometidos a prueba (amida gambógica, xaliprodeno, acetato de glatirámero).

Ejemplo 16

Modelos de neuroinflamación in vitro; G79 reduce neuroinflamación en un modelo in vitro de neuroinflamación

La inflamación cerebral es un procedimiento común en muchas enfermedades neurológicas y es prominente en el caso de EM. Con el fin de evaluar el efecto de G79 en la inflamación cerebral, su efecto se sometió a prueba en un modelo in vitro de neuroinflamación usando cultivos cerebelosos organotípicos puestos a prueba con endotoxina. En primer lugar, el efecto de G79 se sometió a prueba en la inducción de la enzima iNOS, que producen el óxido nítrico y promueve la inflamación. Como se muestra en la FIG. 13, G79 disminuyó la expresión de iNOS. Las muestras pretratadas con G79 mostraron una disminución en la expresión de iNOS 24 horas después de la exposición con LPS, en comparación con las muestras pretratadas con placebo.

Con respecto al efecto de G79 en la liberación de citocinas proinflamatorias, los niveles de TNFα y IL-1 se sometieron a prueba en los sobrenadantes de cultivos cerebelosos organotípicos puestos a prueba con LPS. FIG. 14A muestra la producción de TNFα en cultivos cerebelosos organotípicos. La producción de TNFα se redujo a 6 y 12 horas en cultivo organotípico pretratado con G79 en comparación con placebo. FIG. 14B muestra la producción de IL-1β en cultivo organotípico cerebeloso. El pretratamiento con G79 no afectó a la liberación de IL-1β.

Modelo in vitro de neuroinflamación en cultivo de cortes organotípicos cerebelosos: se decapitaron ratones neonatos (día 8 después del nacimiento (P8)) después de inyección IP anestésica y los cerebros completos se retiraron de forma aséptica. El cerebelo se separó del resto del cerebro y se dispuso en una placa de vibratomo metálica. Una vez que el cerebelo se une a la superficie de la placa, se cortaron secciones sagitales de 400 µm usando el vibratomo. Los cortes se transfirieron después con una pipeta Pasteur de plástico a una placa de cultivo celular que contiene un medio de cultivo organotípico (CO_2 al 5 % en medio basal al 50 % con sal de Earle, solución de sal tamponada de Hank al 25 %, suero de caballo inactivo al 25 %, 5 mg/ml de glucosa, L-glutamina 0,25 mM y 25 µg/ml de penicilina/estreptomicina). Después de separar y aislar cada corte, los cortes cerebelosos se transfirieron a continuación a placas de 6 pocillos (3 cortes para cada pocillo) que contenían un inserto de placas de cultivo de 30 mm con poros de 0,4 µm (Millipore) y 1 ml de medio de cultivo completo, preacondicionado por incubación durante al menos 2 horas a 37 °C y se añadió CO_2 al 5 % en cada pocillo a continuación del inserto. Se mantuvieron las placas de seis pocillos a 37 ºC y en CO_2 al 5 % y la mitad del medio se reemplazó cada 2 días. Todos los experimentos se realizaron después de 1 semana de cultivo en tales condiciones.

Después de una semana de cultivos cerebelosos organotípicos, el medio de cada pocillo se reemplazó con medio recién preparado y G79 (100 ng/ml) o se añadió placebo (solución fisiológica) a los pocillos y se mantuvieron en incubación durante 1 hora. A continuación se añadió lipopolisacárido (LPS) (15 µg/ml) y se mantuvo en incubación. Se recuperaron cortes y medio de cultivo organotípico en diferentes puntos temporales: 0 horas, 1 hora, 3 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas y 48 horas. Para cada punto temporal, se obtuvieron cortes de control no tratado, cortes tratados con LPS/placebo y cortes tratados con LPS/G79. Se recogieron cortes en tres experimentos diferentes para extracción de ARN. Para este propósito, se recuperaron cortes directamente en tampón de lisis de ARN (Qiagen) y se congelaron a -20 º en el mismo tampón. En los otros tres experimentos diferentes, se recuperaron cortes para inmunofluorescencia y se fijaron en paraformaldehído al 4 % (PFA) durante 45 minutos a temperatura ambiente. En todos los experimentos, se recogió el medio de cultivo organotípico y se almacenó a -20 º para ensayo de ELISA.

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real: Cortes organotípicos recogidos del experimento de estimulación de LPS se homogeneizaron en tampón de lisis de ARN. Se extrajo el ARN total usando el sistema de aislamiento Mini Kit RNeasy (Qiagen, Chatwworth, CA), que incluye tratamiento de ADNasas usando el conjunto de ADNasas libre de ARNasas (Quiagen). El ARN total (35 µg) se sometió a transcripción reversa usando el sistema de transcripción reversa (kit de archivo de ADNc de capacidad alta; Applied Biosystems, Foster City, CA). La reacción a tiempo real se llevó a cabo a 25 ºC durante 10 minutos, seguida de a 37 ºC durante 2 horas y finalmente se almacenó a 4 ºC. Los cebadores y sondas de TaqMan marcadas con fluorescencia específicos de objetivo pueden adquirirse de Applied Biosystems (ensayos de expresión génica de TaqMan). El cebador se usó para el gen de iNOS. Se usó la mezcla maestra TaqMan Universal (Applied Biosystems). Se realizó amplificación de ADN complementario en un sistema en tiempo real DNA Engine Opticon 2 (MJ Research, Watertown, MA) usando 0,9 µM para cada cebador y 0,25 µM para la sonda y 20 ng de ADN complementario. Las condiciones de reacción fueron como sigue: 2 minutos iniciales a 50 ºC, seguidos de 10 minutos a 95 ºC y 40 ciclos de 15 segundos a 95 ºC y 1 minuto a 60 ºC. Cada muestra se sometió a ello por triplicado y en cada placa el objetivo y el control endógeno se amplificaron en el mismo pocillo. También se cuantificó la expresión del gen sometido a prueba en relación al nivel del gen constitutivo GAPDH.

Ensayo de ELISA: Los sobrenadantes de medios de cultivo organotípico cerebelosos se usaron para someter a ensayo la producción de citocinas tales como IL-1-β y TNF-α por ELISA. Para IL-1-β, se usó kit de Quantikine Immunoassay IL-1-β (R&D System) y para TNF-α se usó el kit de Desarrollo de ELISA para TNF-α de ratón (Peprotec). Todos los ensayos de ELISA se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 17

Transporte a través de la barrera hematoencefálica (BBB)

La capacidad de los compuestos G79, G80 y G81 para atravesar la barrera hematoencefálica se sometió a prueba usando dos modelos *in vitro*. El transporte pasivo se sometió a prueba usando el modelo de PAMPA (Ensayo de Permeabilidad de Membrana Artificial Paralelo) y el transporte activo se sometió a prueba usando un modelo *in vitro* de la BBB por co-cultivo de BBEC y de astrocitos. Como resultado, se descubrió que G79 era incapaz de cruzar la BBB en

el modelo de PAMPA en comparación con otros fármacos con una buena capacidad para cruzar en el modelo de PAMPA, tales como propanolol y carbamazepina (permeabilidad eficaz (pe) de propanolol = 11,5; pe de carbamazepina = 10,3; pe de G79 = 0 x 10^{-6} cm/s). Por el contrario, en el modelo de células in vitro de la BBB, las tres moléculas presentaron cruce de medio a alto de la BBB por transporte activo (pe G79 = 4,1; pe G80 = 2,8; pe G81 = 2,1 x 0^{-6} cm/s).

Ensayo de permeabilidad de membrana artificial paralela (PAMPA): PAMPA se usa como un modelo *in vitro* de permeabilidad de BBB pasiva. Una membrana artificial inmovilizada sobre un filtro se sitúa entre un compartimento donante y un compartimento aceptor. En el comienzo de la prueba, un fármaco se introduce en el compartimento donante. Después del periodo de permeación, la concentración del fármaco en los compartimentos donante y aceptor se mide usando espectroscopía de UV. Por lo tanto la permeabilidad de cualquier compuesto con un cromóforo UV se puede determinar por este procedimiento.

Las soluciones de reserva del compuesto sometido a prueba se diluyeron 200 veces en tampón universal a pH 7,4 y se añadieron a los pocillos de donante. El filtro de membrana se revistió con PBL en dodecano y el pocillo de aceptor se cargó con tampón de pH 7,4. La placa de filtro aceptora se puso cuidadosamente sobre la placa donante para formar un 'emparedado' (que consiste en el donante acuoso con realización de prueba del compuesto en la parte inferior, una membrana lipídica artificial en la mitad y un aceptor acuoso en la parte superior). El compuesto de prueba difundió desde el pocillo de donante a través de la membrana lipídica y dentro del pocillo aceptor. El 'emparedado' se dejó reposar durante 18 horas mientras tuvo lugar la permeación. La concentración del compuesto de prueba en el aceptor, el donante y los pocillos de referencia se determinó usando el lector de placas de UV. La permeabilidad efectiva (Pe) de cada compuesto se calculó usando el programa informático pION PSR4p. Se analizaron las muestras por triplicado y se comunicó el promedio de los tres funcionamientos. Los estándares de control de calidad se realizaron con cada conjunto de muestras para monitorizar la consistencia del conjunto de análisis.

Modelo celular *in vitro* de transporte a través de la barrera hematoencefálica (BBB): el modelo celular in vitro se estableció usando un cocultivo de células endoteliales de la barrera hematoencefálica (BBEC) y de astrocitos de ratas recién nacidas. En resumen, antes del cocultivo de células (placas Transwell de 24 pocillos de policarbonato con un área de superficie de 0,33 cm^2 y un tamaño de poro de 0,4 µm, Corning Costar), la superficie superior de los insertos de placa se revistió con colágeno tipo IV y fibronectina. A continuación, los insertos se colocaron boca abajo en una placa de Petri grande y se colocaron 40 µl de una suspensión (que contiene aproximadamente 45,000 astrocitos) sobre el fondo de cada filtro. La placa de Petri se colocó en un incubador durante 1 hora y se añadieron 40 µl de DMEM + S recién preparado a la parte inferior de cada filtro cada 15 minutos. Las inserciones se transfirieron después de nuevo dentro de la placa y se incubaron a 37 ºC, CO_2 al 5 % durante tres días. Después de este tiempo, 2 horas antes de sembrar las BBEC, se reemplazó el medio por DMEM + S suplementado con 125 µg/ml de heparina. Dos horas después, las células se sembraron en las inserciones (45.000 células por filtro). La placa se mantuvo en la incubadora a 37 ºC, CO_2 al 5 % durante tres días más. Después de tres días de cocultivo, el medio se reemplazó por DMEM + S suplementado con AMPc y RO-20-1724 y se mantuvo a 37 ºC y CO_2 al 5 %. En el día 8 de cocultivo, las medidas de resistencia eléctrica transendotelial (TEER) mostraron que el sistema estaba preparado para estudios de transporte. Para validar la madurez del modelo, el mismo día del experimento, se realizaron ensayos de permeabilidad en paralelo con amarillo Lucifer (LY) como marcador de la integridad de la barrera *in vitro*. Durante el ensayo de permeabilidad, las muestras se co-incubaron con LY a una concentración de 20 µM para evaluar la integridad de la monocapa celular durante el ensayo.

La TEER se determinó usando un sistema Millicell ERS de ohmímetro (MERS 000 01, Millipore). Las medidas de TEER confirman la formación de una BBB *in vitro* funcionalmente intacta en el día 8 de cocultivo. Los valores de TEER representan la tensión o integridad de la BBB *in vitro*. El valor de TEER (media ± D.E.) para todos los pocillos era 141 ± 5,7 ohmios/cm^2.

$$Papp = (dQ/dt) * (1/A) * (1/C_0) \text{ (cm/s)} \qquad (1)$$

En la ecuación (1) anterior, (dQ/dt) es la cantidad del compuesto presente en el compartimento aceptor en función del tiempo (nmol/s), *A* es el área del inserto (cm^2) y *Co* es la concentración inicial del compuesto aplicada al compartimento donante (nmol/ml).

Durante los estudios de transporte, los compuestos se co-incubaron con LY (20 µM) con el fin de garantizar la integridad de la membrana celular durante el ensayo de transporte.

Habiendo descrito completamente ahora esta invención, se entenderá por aquellos expertos en la técnica que la misma se puede llevar a cabo dentro de un intervalo amplio y equivalente de condiciones, formulaciones y otros parámetros sin afectar el ámbito de la invención o cualquier modo de realización de la misma.

Otros modos de realización de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la consideración de la memoria descriptiva y de la práctica de la invención divulgada en el presente documento. Se pretende que la memoria descriptiva y los ejemplos se consideren como ejemplares únicamente, con un verdadero alcance de la invención que está indicado en las siguientes reivindicaciones.

Referencias

Aloe L, Calza L (2004) Progress in brain research. Vol. 146, NGF and related molecules in health and diseases. Amsterdam: Elsevier.

Anand P. Neurotrophic factors and their receptors in human sensory neuropathies. Prog Lipid Res. 2004;146: 477-92. Apfel S (2002) Nerve growth factor for the treatment of diabetic neuropathy: what went wrong, what went right, and what does the future hold? Int Rev Neurobiol 50: 393-413. Barker P (1998) p75NTR: A study in contrasts. Cell Death Differ 5: 346-356.

Bhakar A, Howell J, Paul C, Salehi A, Becker E, Said F, Bonni A, Barker P (2003) Apoptosis induced by p75NTR overexpression requires Jun kinase-dependent phosphorylation of Bad. J Neurosci 23: 11373-11381. Chao M (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. Nat Rev Neurosci 4: 299-309.

Faden AI, Stoica B. Neuroprotection: challenges and opportunities. Arch Neurol. 2007; junio; 64(6): 794-800. Foehr E, Lin X, O'Mahony A, Geleziunas R, Bradshaw R, Greene W (2000) NF-kappa B signaling promotes both cell survival and neurite process formation in nerve growth factor-stimulated PC12 cells. J Neurosci 20: 7556-7563. Frade J (2005) Nuclear translocation of the p75 neurotrophin receptor cytoplasmic domain in response to neurotrophin binding. J Neurosci 25: 1407-1411.

Gentry J, Casaccia-Bonnefil P, Carter B (2000) Nerve growth factor activation of nuclear factor kappaB through its p75 receptor is an anti-apoptotic signal in RN22 schwannoma cells. J Biol Chem 275: 7558-7565. Ghosh S, May M, Kopp E (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. Annu Rev Immunol 16: 225-260.

Greene L, Tischler A (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Proc Natl Acad Sci EE.UU. 73: 2424-2428.

Hellweg R, Ziegenhorn A, Heuser I, Deuschle M. Serum concentrations of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in depressed patients before and after antidepressant treatment. Pharmacopsychiatry. 2008 Mar; 41(2):66-71.

Huang E, Reichardt L (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. Annu Rev Biochem 72: 609-642. Epub marzo de 2003 2027.

Kaplan D, Miller F (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. Curr Opin Neurobiol 10: 381-391.

Levi-Montalcini R (1987) The nerve growth factor 35 years later. Science 237: 1154-1162.

Lewin G, Barde Y (1996) Physiology of the neurotrophins. Annu Rev Neurosci 19: 289-317.

Longo F, Manthorpe M, Xie Y, Varon S (1997) Synthetic NGF peptide derivatives prevent neuronal death via a p75

receptor-dependent mechanism. J Neurosci Res 48: 1-17.

Longo FM, Yang T, Knowles JK, Xie Y, Moore LA, Massa SM. Small molecule neurotrophin receptor ligands: novel strategies for targeting Alzheimer's disease mechanisms. Curr Alzheimer Res. diciembre de 2007; 4(5): 503-6. Maliartchouk S, Debeir T, Beglova N, Cuello A, Gehring K, Saragovi H (2000a) Genuine monovalent ligands of TrkA

nerve growth factor receptors reveal a novel pharmacological mechanism of action. J Biol Chem 275: 9946-9956. Maliartchouk S, Feng Y, Ivanisevic L, Debeir T, Cuello A, Burgess K, Saragovi H (2000b) A designed peptidomimetic agonistic ligand of TrkA nerve growth factor receptors. Mol Pharmacol 57: 385-391.

Martínez-Forero I, García-Muñoz R, Martínez-Pasamar S, Inoges S, López-Díaz de Cerio A, Palacios R, Sepulcre J, Moreno B, González Z, Fernández-Diez B, Melero I, Bendandi M, Villoslada P (2008) IL-10 suppressor activity and ex vivo Tr1 cell function are impaired in múltiple sclerosis. Eur J Immunol 38: 576-586. Masip, I.; Cortes, N.; Abad, M.; Guardiola, M.; Pérez-Paya, E.; Ferragut, J.; Ferrer-Montiel, A.; Messeguer, A. (2005). Design and synthesis of an optimized positional scanning library of peptoids: identification of novel multidrug resistance reversal agents. Bioorg. Med. Chem. 13, 1923-1929.

Miller S, Simon R, NG S, Zuckermann R, Kerr J, Moos W (1994) Bioorg Med Chem Letter 4: 2657-2662. Moreno B, Hevia H, Santamaría M, Sepulcre J, Muñoz J, García-Trevijano E, Berasain C, Corrales F, Ávila M, Villoslada P (2006) Methylthioadenosine reverses brain autoimmune disease. Ann. Neurol 60: 323-334. Palacios, et al., PloSONE 2007; 2(11) : e1222.

Palacios R, Comas D, Elorza J, Villoslada P (2008) Genomic regulation of CTLA4 and múltiple sclerosis. J Neuroimmunol 203: 108-115.

Peleshok J, Saragovi H (2006) Functional mimetics of neurotrophins and their receptors. Biochem. Soc Trans 34:

612-617.

Poduslo J, Curran G (1996) Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. Brain Res Mol Brain Res 36: 280-286.

Price RD, Milne SA, Sharkey J, Matsuoka N. Advances in small molecules promoting neurotrophic function. Pharmacol Ther. Agosto de 2007; 115(2): 292-306.

Rabizadeh S, Ye X, Wang J, Bredesen D (1999) Neurotrophin dependence mediated by p75NTR: contrast between rescue by BDNF and NGF. Cell Death Differ 6: 1222-1227.

Saragovi H, Zaccaro M (2002) Small molecule peptidomimetic ligands of neurotrophin receptors, identifying binding sites, activation sites and regulatory sites. Curr Pharm Des 8: 2201-2216.

Schulte-Herbruggen O, Braun A, Rochlitzer S, Jockers-Scherubl MC, Hellweg R. Neurotrophic factors--a tool for therapeutic strategies in neurological, neuropsychiatric and neuroimmunological diseases? Curr Med Chem. 2007; 14 (22): 2318-29.

Sen, S., Roach, S. A convenient Two-step procedure for the Synthesis of Substituted Allylic amines from Allylic Alcohols. Synthesis, 1995, 756-758).

Shi Z, Birman E, Saragovi HU. Neurotrophic rationale in glaucoma: a TrkA agonist, but not NGF or a p75 antagonist, protects retinal ganglion cells in vivo. Dev Neurobiol. Junio 2007; 67(7): 884-94.

Shoval G, Weizman A. The possible role of neurotrophins in the pathogenesis and therapy of schizophrenia. Eur Neuropsychopharmacol. mayo de 2005; 15 (3): 319-29.

Vajda FJ. Neuroprotection and neurodegenerative disease. J Clin Neurosci. Enero de 2002; 9(1): 4-8.

Villoslada P, Genain C (2004) Role of nerve growth factor and other trophic factors in brain inflammation. Prog Brain Res 146: 403-414.

Villoslada P, Abel K, Heald N, Goertsches R, Hauser S, Genain C (2001) Frequency, heterogeneity and encephalitogenicity of T cells specific for myelin oligodendrocyte glycoprotein in naive outbred primates. Eur J Immunol 31: 2942-2950.

Villoslada P, Hauser S, Bartke I, Unger J, Heald N, Rosenberg D, Cheung S, Mobley W, Fisher S, Genain C (2000) Human nerve growth factor protects common marmosets against autoimmune encephalomyelitis by switching the balance of T helper cell type 1 and 2 cytokines within the central nervous system. J Exp Med 191, 1799-1806. Williams B, Eriksdotter-Jonhagen M, Granholm A (2006) Nerve growth factor in treatment and pathogenesis of Alzheimer's disease. Prog Neurobiol 80: 114-128. Epug noviembre de 2006 2002.

Youdim MB, Buccafusco JJ. Multi-functional drugs for various CNS targets in the treatment of neurodegenerative disorders. Trends Pharmacol Sci. Enero de 2005; 26(1): 27-35.

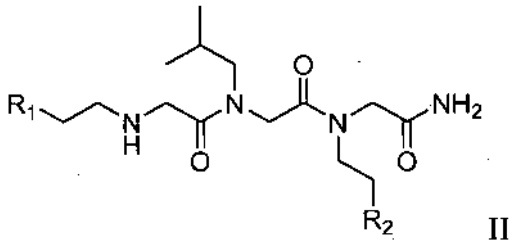
Yoon S, Casaccia-Bonnefil P, Carter B, Chao M (1998) Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. J Neurosci 18: 3273-3281.

Zaccaro M, Ivanisevic L, Pérez P, Meakin S, Saragovi H (2001) p75 Co-receptors regulate ligand-dependent and ligand-independent Trk receptor activation, in part by altering Trk docking subdomains. J Biol Chem 276: 31023-31029.

Zuckermann, R.N., Kerr, J.M., Kent, SBH, Moos, W.H. (1992). Efficient method for the preparation of peptoids [oligo(N-substituted glycines)] by submonomer solid phase synthesis. J. Am. Chem. Soc. 114, 10646-10647.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la Fórmula II:



II

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que

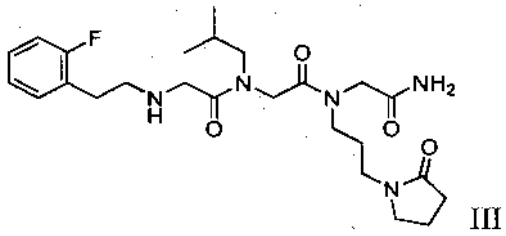
R_1 es fenilo sustituido con halógeno o trifluorometilo y además opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, alquilo C_{1-6}, alcoxi (C_{1-6}) y haloalquilo (C_{1-6}); y

R_2 es 2-oxo-pirrolidin-1-ilmetilo o sulfamoilfenilo.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R_1 es fluorofenilo y R_2 es según se define en la reivindicación 1, preferentemente en el que R_1 es 2-fluorofenilo.

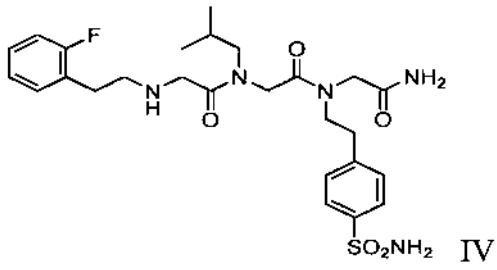
3. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que R_2 es 4-sulfamoilfenilo.

4. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene la Fórmula III:



III

o la Fórmula IV:



IV

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o una sal farmacéuticamente aceptable, para su uso como un medicamento.

6. Una composición farmacéutica, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

7. El compuesto de la reivindicación 5 o una composición farmacéutica de la reivindicación 6 para su uso como un medicamento útil en la prevención o el tratamiento de la muerte o del daño de células nerviosas; la regeneración de las células nerviosas o en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurológica o psiquiátrica.

8. El compuesto para el uso de la reivindicación 5, en el que el medicamento es un fármaco neuroprotector o un fármaco neuropotenciador; o un fármaco neurorregenerador o un inmunomodulador.

9. El compuesto para el uso de la reivindicación 5 o una composición farmacéutica de la reivindicación 6, en el que el

medicamento o composición farmacéutica es útil en la prevención o tratamiento de una enfermedad seleccionada de: enfermedades neurológicas, preferentemente trastornos neurodegenerativos, tales como esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, ataxia de Friedreich, enfermedad de Huntington, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia muscular espinal; inflamación nerviosa, tal como esclerosis múltiple o neuromielitis óptica; trastorno depresivo principal, esquizofrenia, glaucoma, neuropatía periférica, tal como neuropatía diabética o neuropatía asociada al SIDA; y cáncer, tal como glioblastoma, astrocitoma, meduloblastoma, neurinoma, neuroblastoma, meningioma, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de próstata, leucemia, leucemia linfocítica aguda, osteosarcoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma ovárico, adenocarcinoma pulmonar y carcinoma esofágico.

10. El compuesto para el uso de la reivindicación 5 o una composición farmacéutica de la reivindicación 6, en el que el medicamento o composición farmacéutica tiene una combinación de efectos neuroprotectores e inmunomoduladores.

11. Uso del compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 como un principio activo en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de la muerte o el daño de células nerviosas, o un medicamento neuroprotector; o un medicamento para la regeneración de las células nerviosas; o un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurológica o psiquiátrica; o un fármaco neurorregenerativo; o un inmunomodulador; o un medicamento que tiene una combinación de efectos neuroprotectores e inmunomoduladores; o un fármaco neuropotenciador.

12. Uso del compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 como un principio activo en la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de una enfermedad seleccionada de: enfermedades neurológicas, preferentemente trastornos neurodegenerativos, tales como esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, ataxia de Friedreich, enfermedad de Huntington, demencia con cuerpos de Lewy y atrofia muscular espinal; inflamación nerviosa, tal como esclerosis múltiple o neuromielitis óptica; trastorno depresivo principal, esquizofrenia, glaucoma, neuropatía periférica, tal como neuropatía diabética o neuropatía asociada al SIDA; y cáncer, tal como glioblastoma, astrocitoma, meduloblastoma, neurinoma, neuroblastoma, meningioma, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de próstata, leucemia, leucemia linfocítica aguda, osteosarcoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma ovárico, adenocarcinoma pulmonar y carcinoma esofágico.

13. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un procedimiento para estimular la actividad del factor de crecimiento nervioso, o de un receptor del factor de crecimiento nervioso, o en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad que responde a la estimulación de la actividad del factor de crecimiento nervioso, o de un receptor del factor de crecimiento nervioso, en un mamífero que padece ausencia de estimulación del mismo.

14. El compuesto para el uso de la reivindicación 13, en el que el receptor del factor de crecimiento nervioso es receptor TrkA o receptor p75.

15. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un procedimiento para estimular la actividad del factor neurotrofina, o de un receptor del factor neurotrofina, o en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad que responde a la estimulación de la actividad del factor neurotrofina, o de un receptor del factor neurotrofina, en un mamífero que padece ausencia de estimulación del mismo.

16. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un procedimiento para estimular la actividad del factor neurotrófico derivado del cerebro, o de un receptor del factor neurotrófico derivado del cerebro, o en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad que responde a la estimulación de la actividad del factor neurotrófico derivado del cerebro, o de un receptor del factor neurotrófico derivado del cerebro, en un mamífero que padece ausencia de estimulación del mismo.

17. El compuesto para el uso de la reivindicación 16, en el que el receptor del factor neurotrófico derivado del cerebro es receptor TrkB o receptor p75.

18. Un procedimiento para preparar una composición farmacéutica, que comprende mezclar una cantidad eficaz de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

A:G79

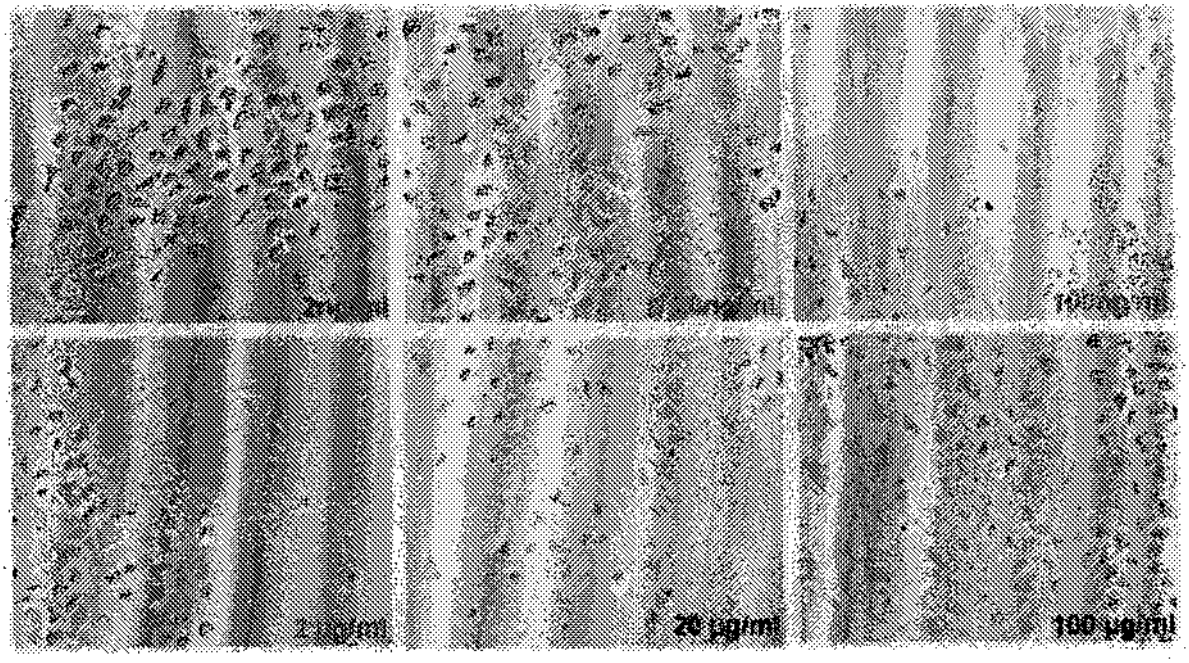


FIG. 1A

B:G80

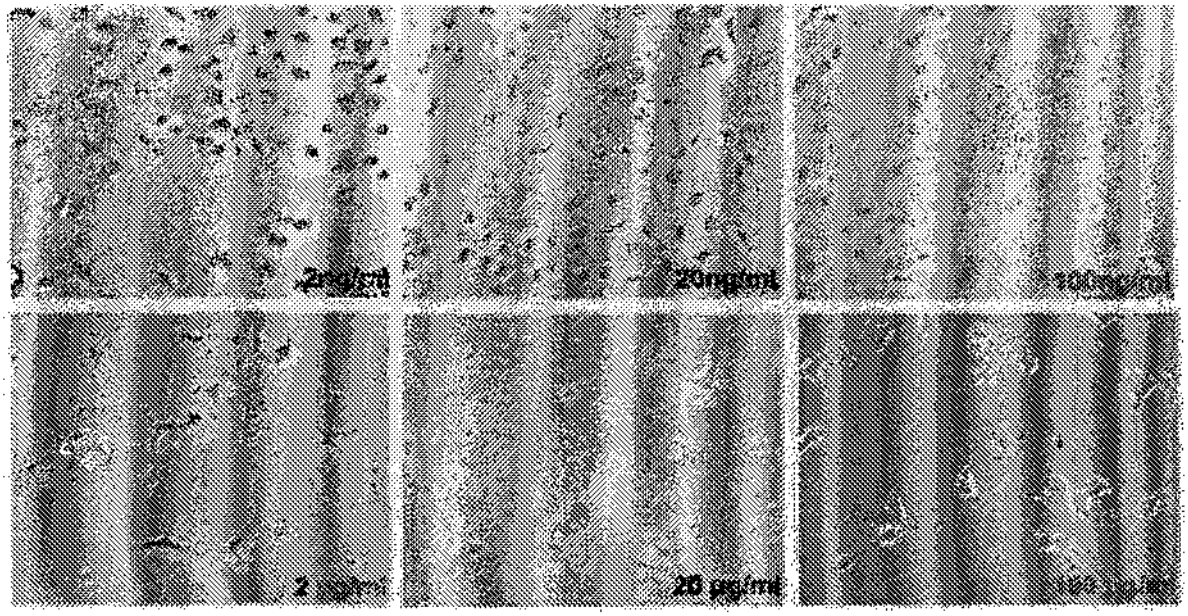


FIG. 1B

C:G81

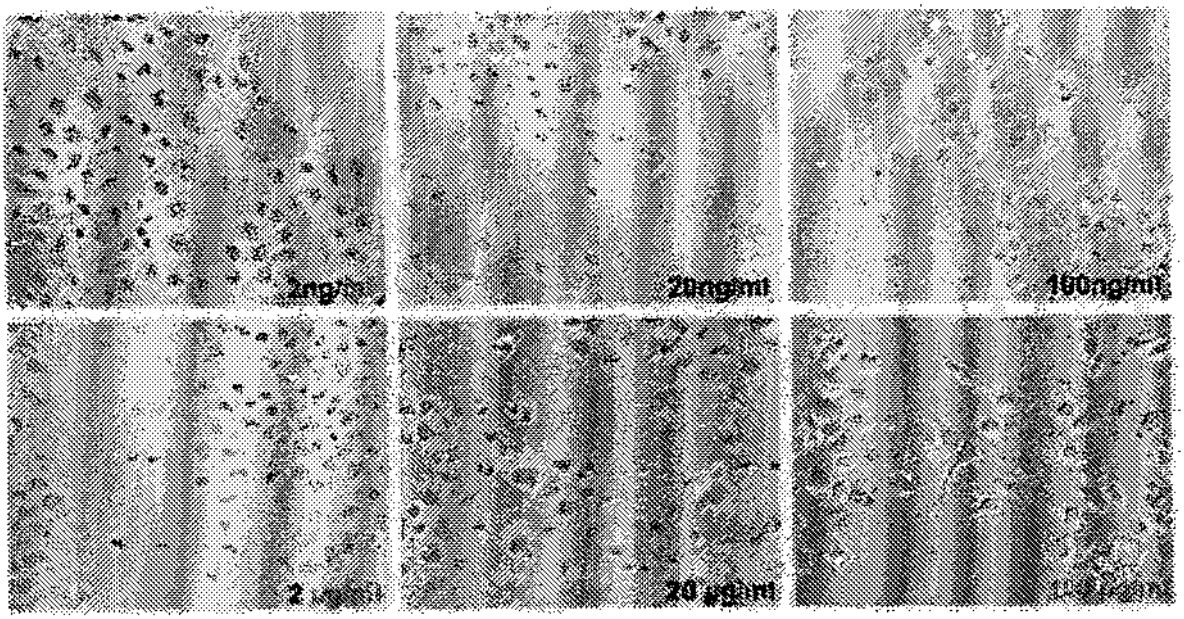


FIG. 1C

D

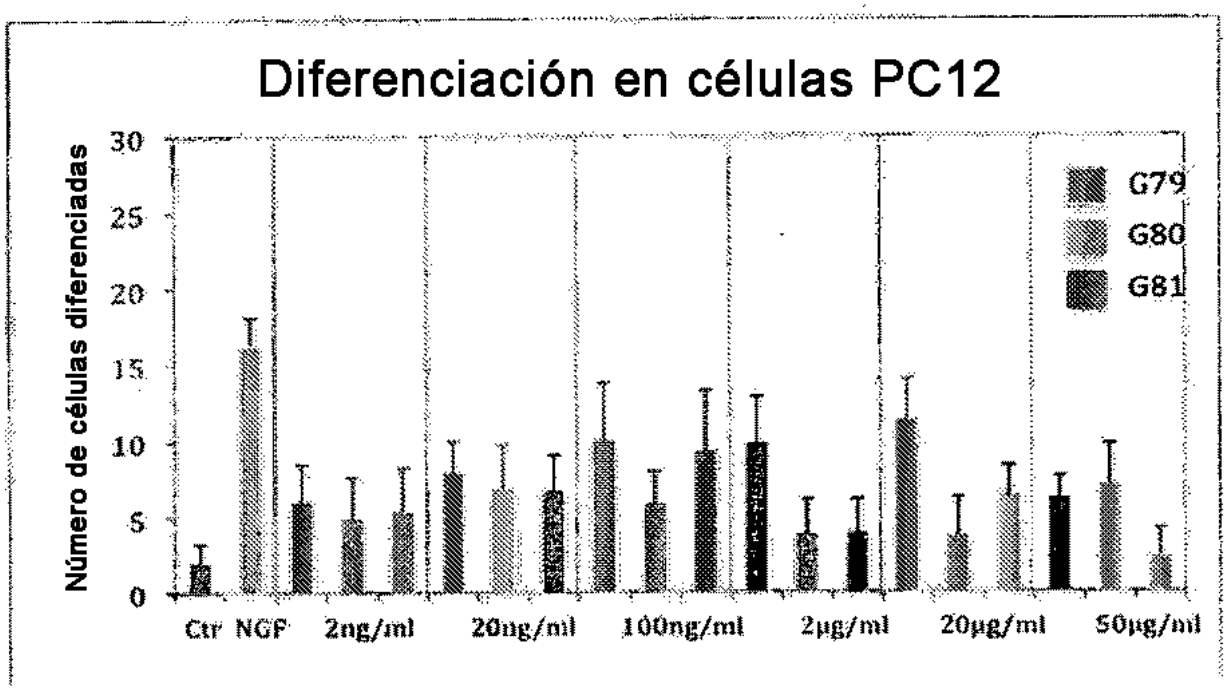


FIG. 1D

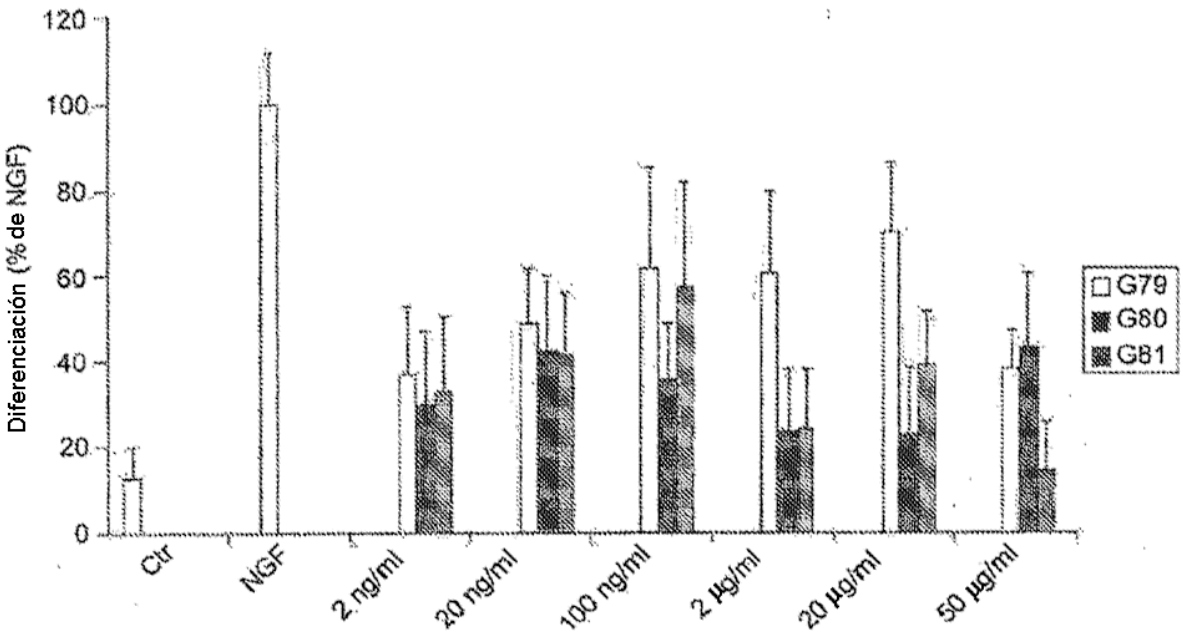

Diferenciación (% de NGF)
120
100
80
60
40
20
0
Ctr
NGF
2 ng/ml
20 ng/ml
100 ng/ml
2 µg/ml
20 µg/ml
50 µg/ml
G79
G80
G81

FIG. 1E

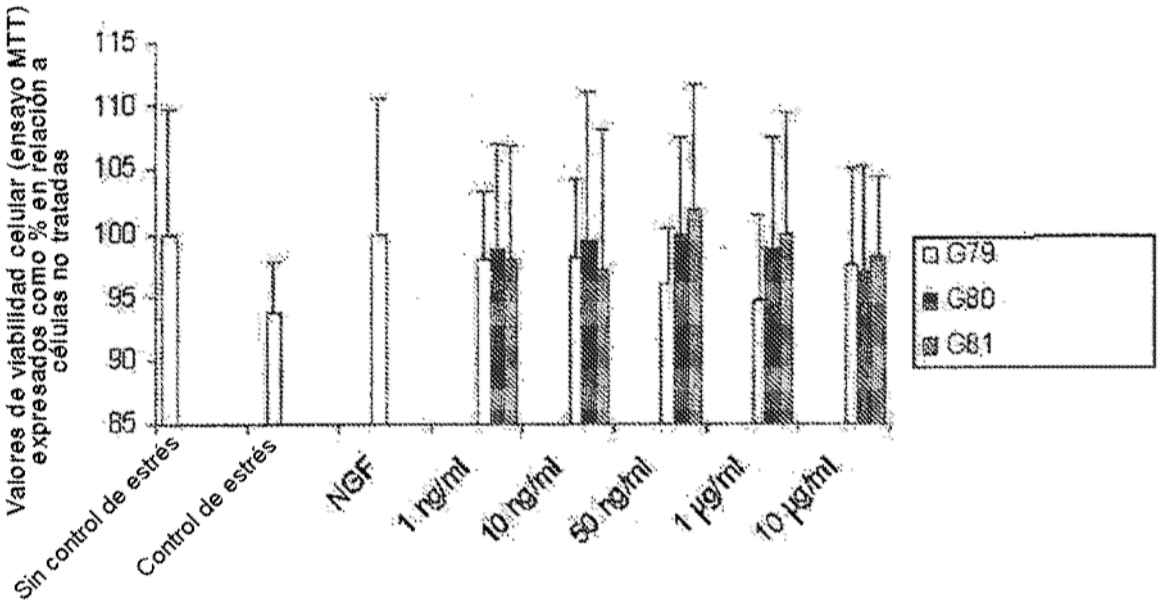

Valores de viabilidad celular (ensayo MTT) expresados como % en relación a células no tratadas
115
110
105
100
95
90
85
Sin control de estrés
Control de estrés
NGF
1 ng/ml
10 ng/ml
50 ng/ml
1 µg/ml
10 µg/ml
G79
G80
G81

FIG. 2

A

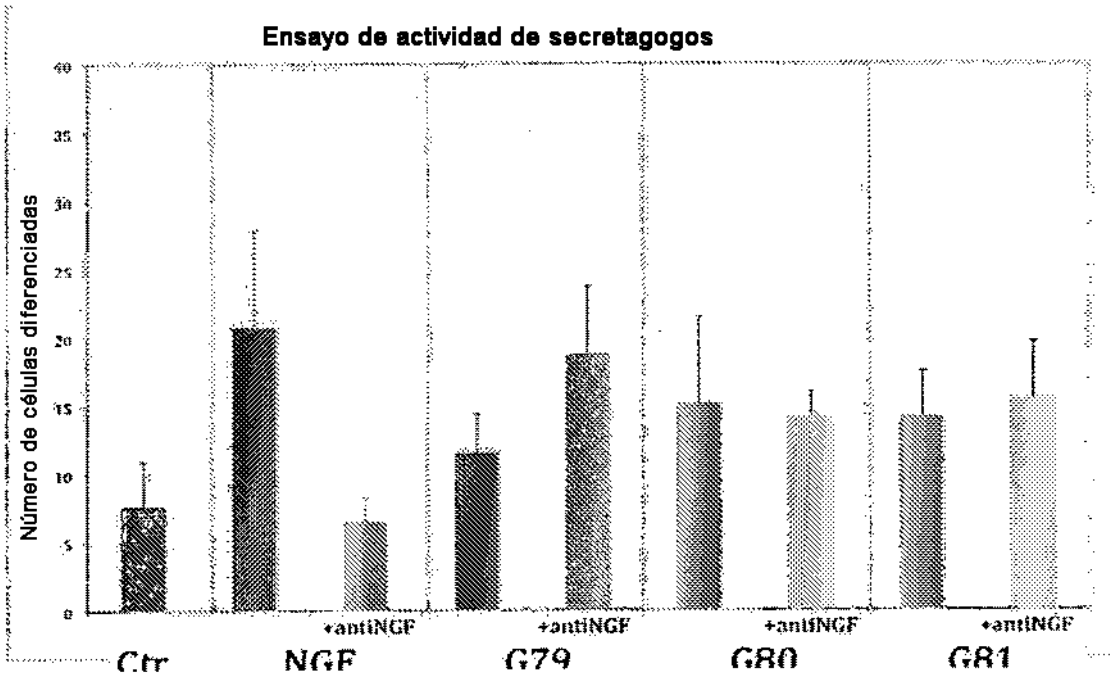


FIG. 3A

B

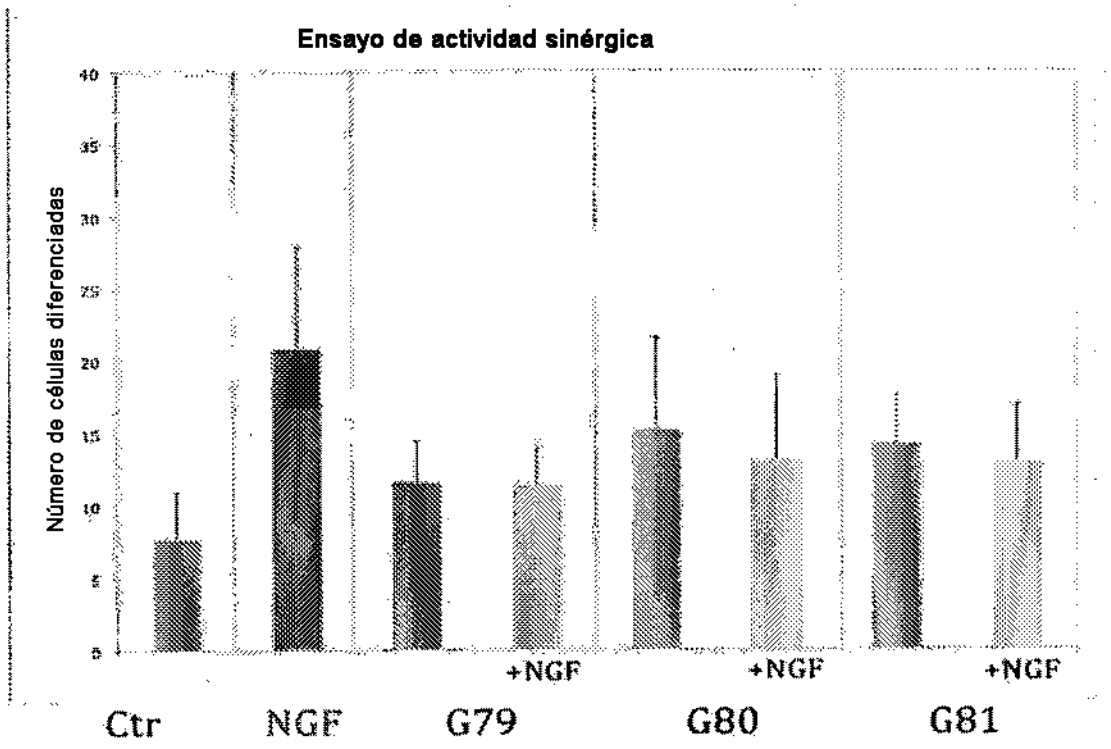


FIG. 3B

C

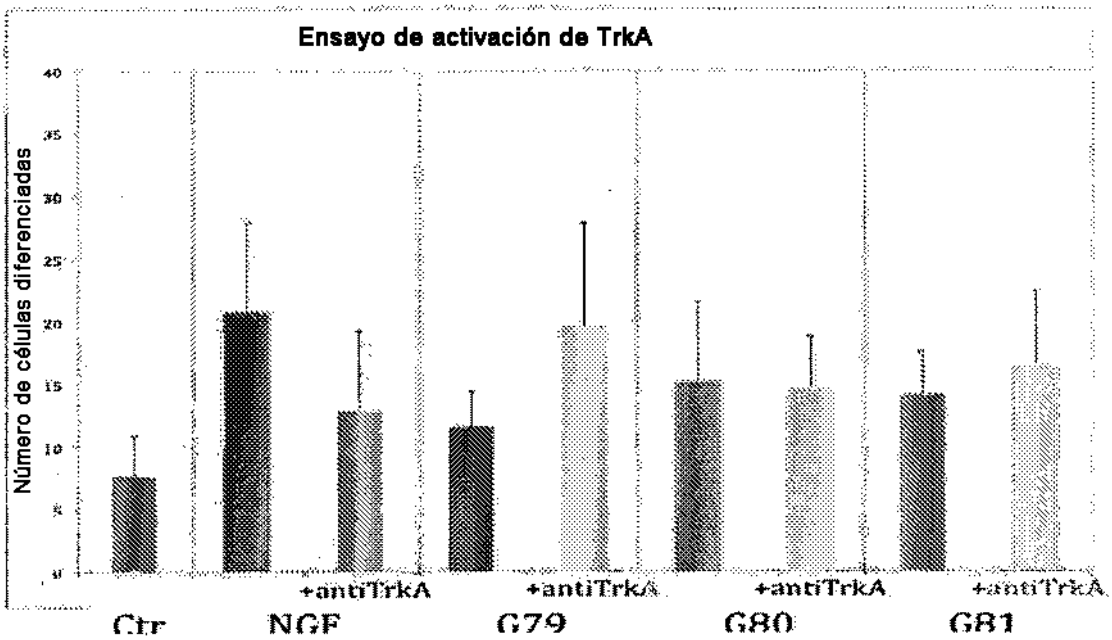


FIG. 3C

D

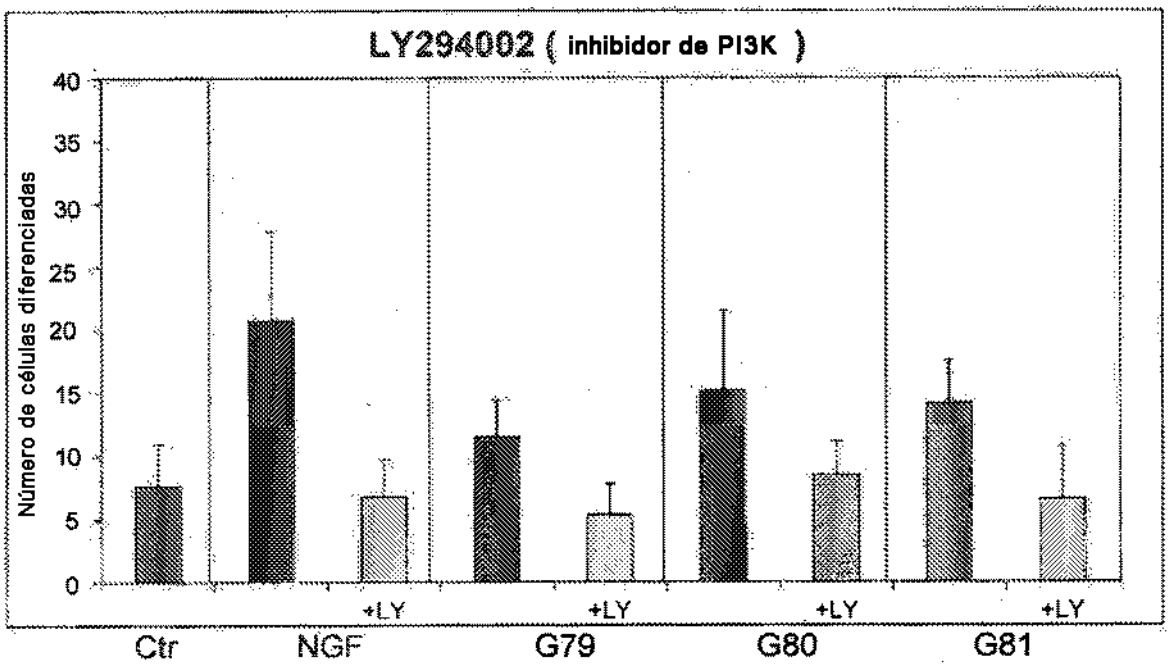


FIG. 3D

E

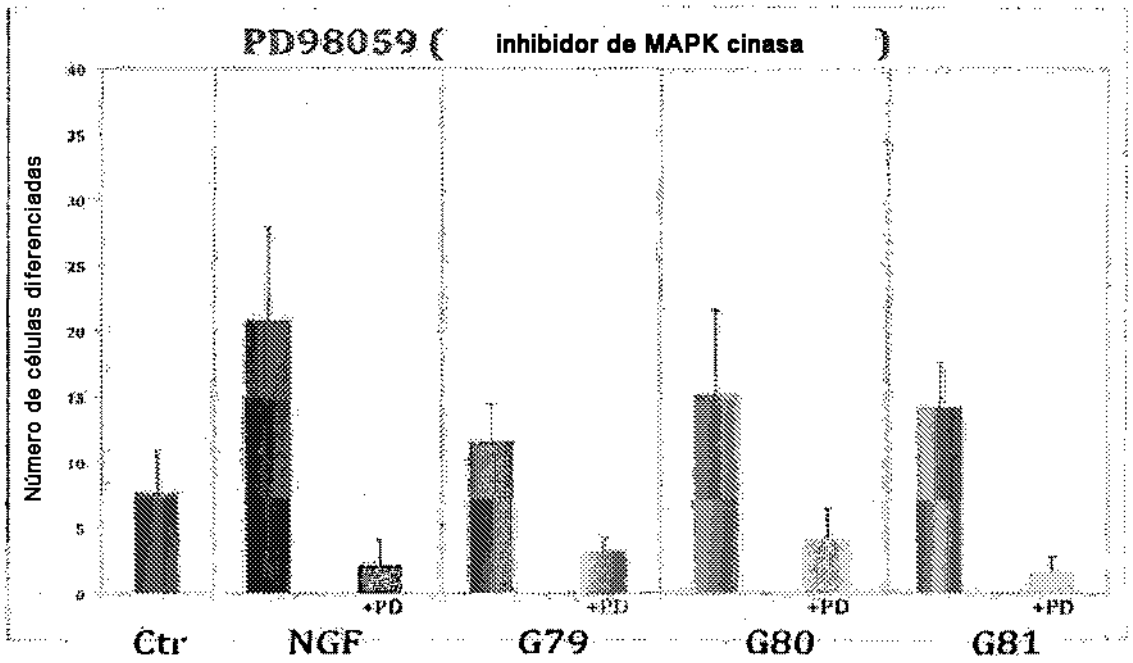

PD98059 (inhibidor de MAPK cinasa)
Número de células diferenciadas
40
35
30
25
20
15
10
5
0
+PD
+PD
+PD
+PD
Ctr
NGF
G79
G80
G81

FIG. 3E

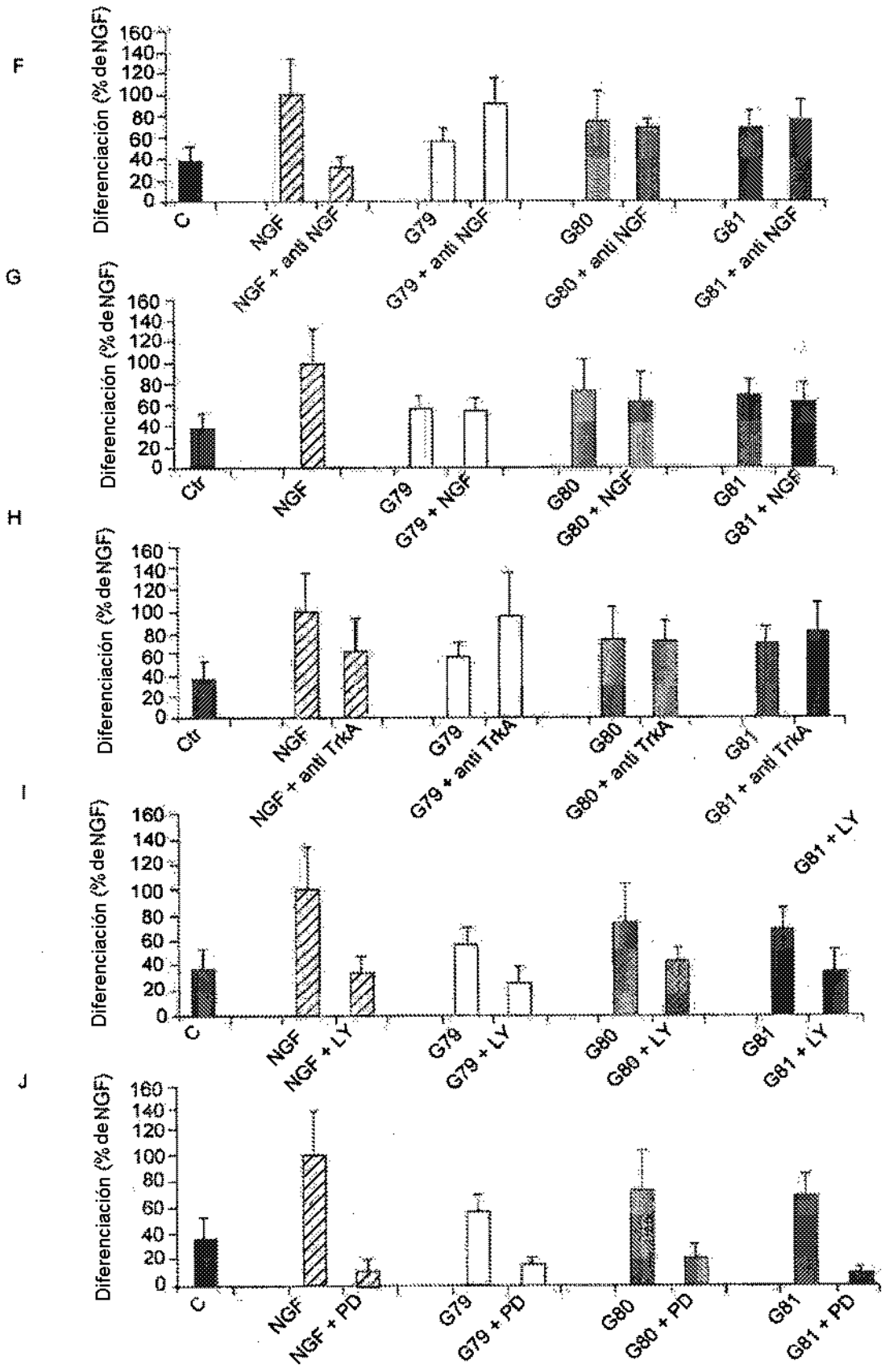
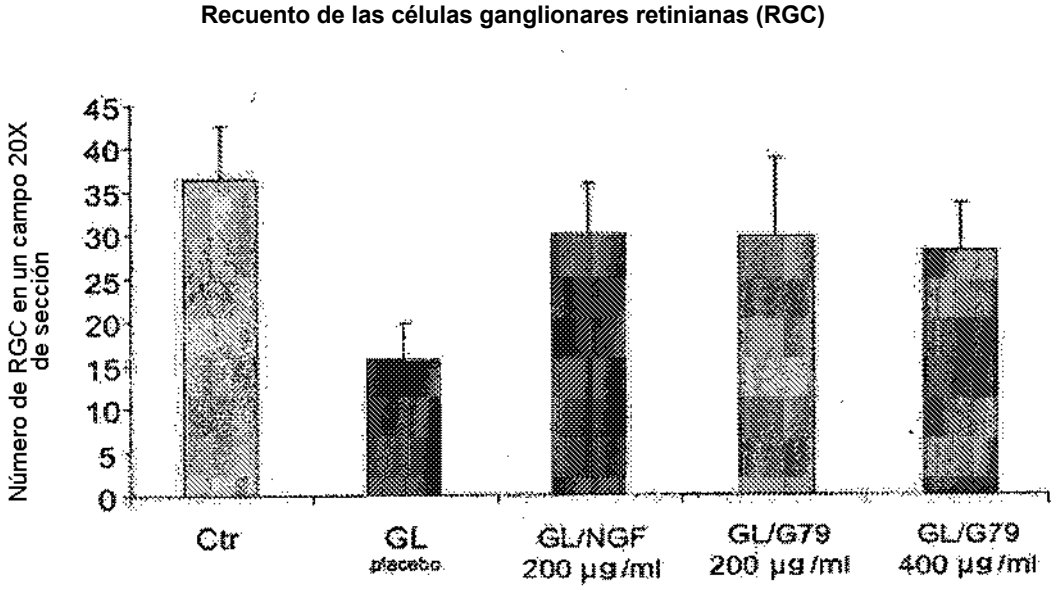

F
Diferenciación (% de NGF)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
C
NGF
NGF + anti NGF
G79
G79 + anti NGF
G80
G80 + anti NGF
G81
G81 + anti NGF
G
Diferenciación (% de NGF)
Ctr
NGF
G79
G79 + NGF
G80
G80 + NGF
G81
G81 + NGF
H
Diferenciación (% de NGF)
Ctr
NGF
NGF + anti TrkA
G79
G79 + anti TrkA
G80
G80 + anti TrkA
G81
G81 + anti TrkA
I
Diferenciación (% de NGF)
C
NGF
NGF + LY
G79
G79 + LY
G80
G80 + LY
G81
G81 + LY
J
Diferenciación (% de NGF)
C
NGF
NGF + PD
G79
G79 + PD
G80
G80 + PD
G81
G81 + PD

FIG. 3F-3J

A


Recuento de las células ganglionares retinianas (RGC)
Número de RGC en un campo 20X de sección
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Ctr
GL placebo
GL/NGF 200 µg/ml
GL/G79 200 µg/ml
GL/G79 400 µg/ml

B

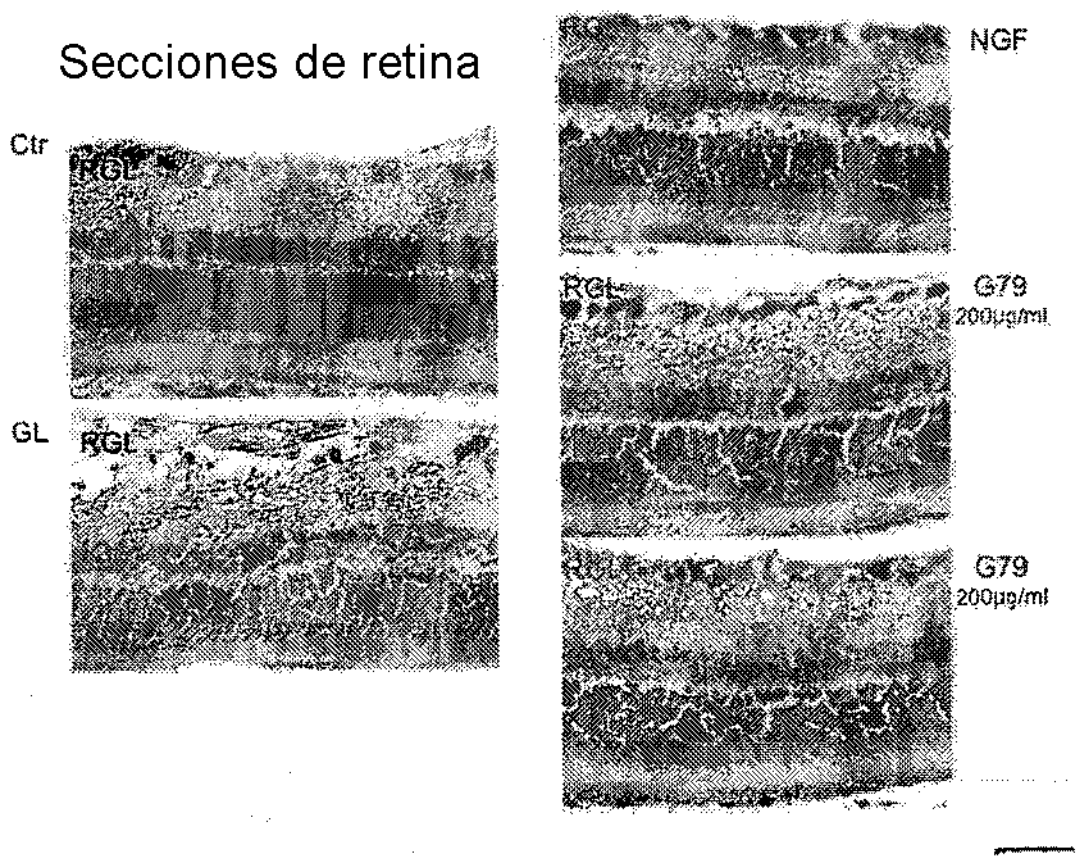

Secciones de retina
Ctr
RGL
GL
RGL
RGL
NGF
RGL
G79 200µg/ml
RGL
G79 200µg/ml

FIG. 4

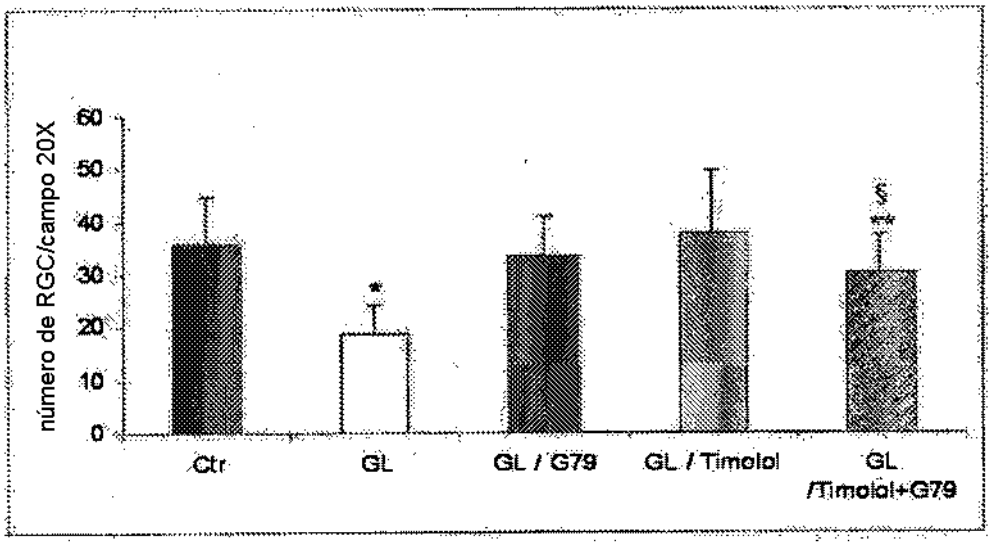
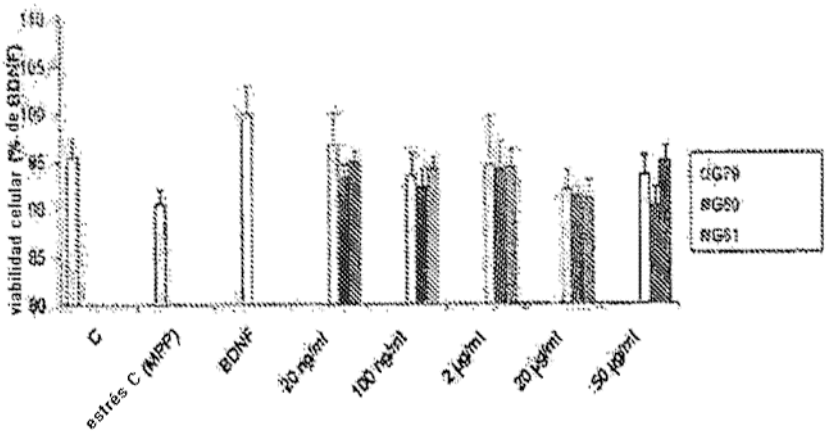

número de RGC/campo 20X
60
50
40
30
20
10
0
*
§
**
Ctr
GL
GL / G79
GL / Timolol
GL /Timolol+G79

FIG. 4C

A


viabilidad celular (% de BDNF)
C
estrés C (MPP)
BDNF
20 ng/ml
100 ng/ml
2 µg/ml
20 µg/ml
50 µg/ml
BG79
BG80
BG81

B

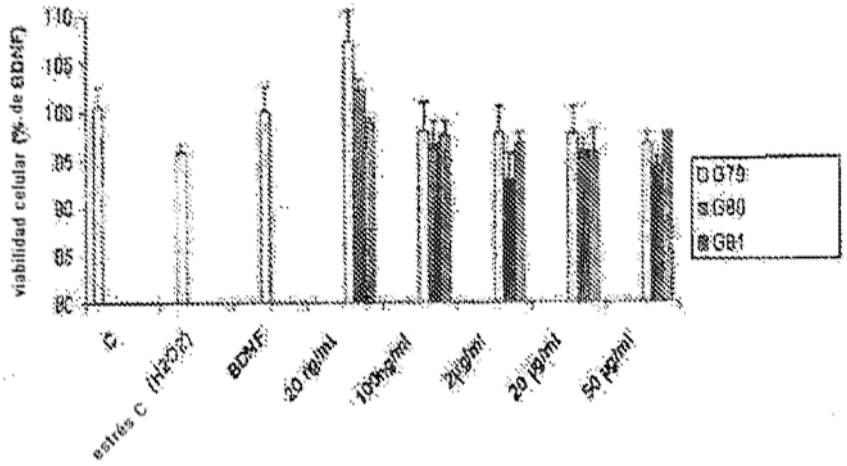

viabilidad celular (% de BDNF)
C
estrés C (H2O2)
BDNF
20 ng/ml
100 ng/ml
2 µg/ml
20 µg/ml
50 µg/ml
BG79
BG80
BG81

FIG. 5

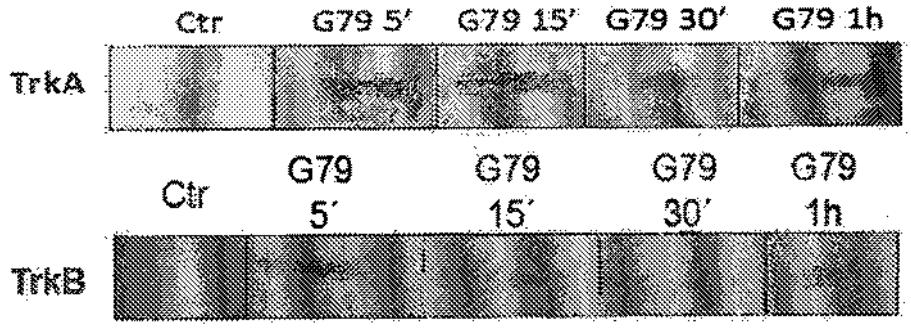

Ctr
G79 5'
G79 15'
G79 30'
G79 1h
TrkA
Ctr
G79 5'
G79 15'
G79 30'
G79 1h
TrkB

FIG. 6

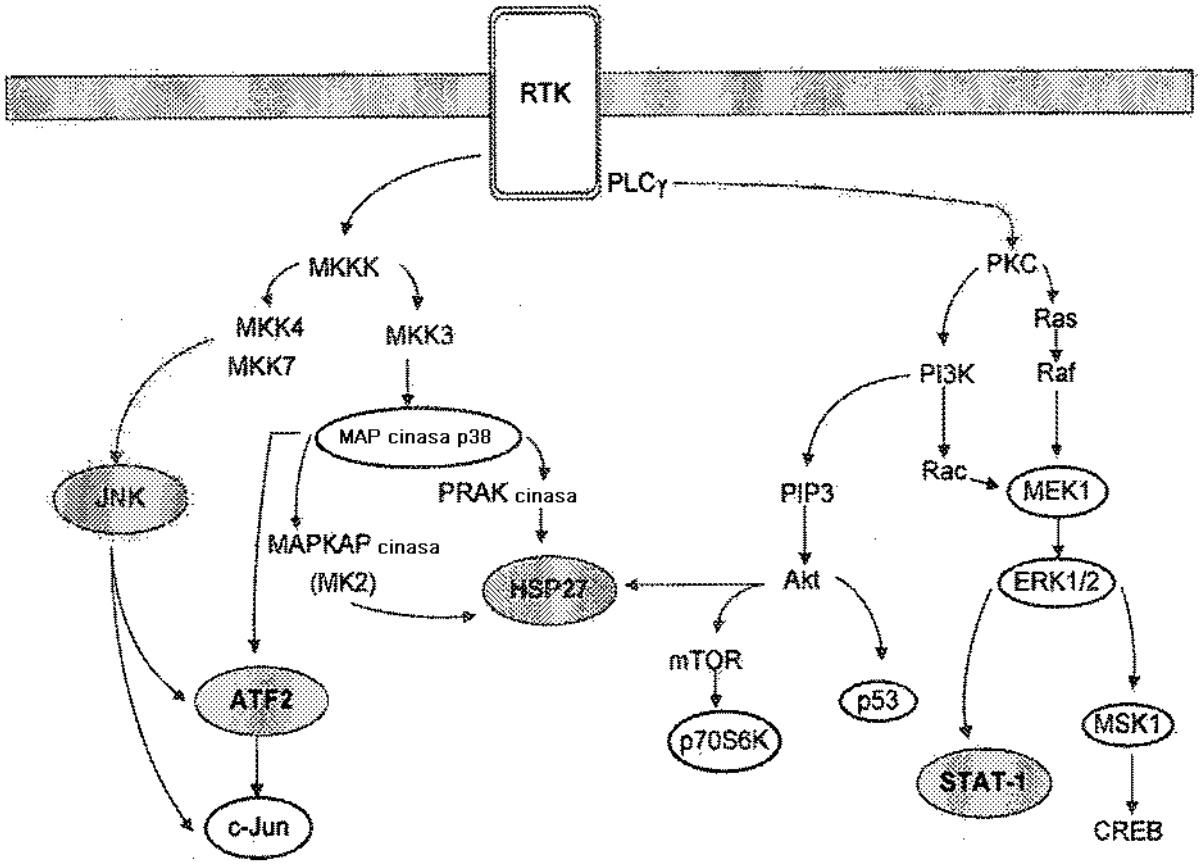

RTK
PLCγ
MKKK
MKK4
MKK7
MKK3
MAP cinasa p38
JNK
PRAK cinasa
MAPKAP cinasa
(MK2)
HSP27
ATF2
c-Jun
PKC
Ras
PI3K
Raf
Rac
MEK1
PIP3
Akt
ERK1/2
mTOR
p53
p70S6K
MSK1
STAT-1
CREB

FIG. 7

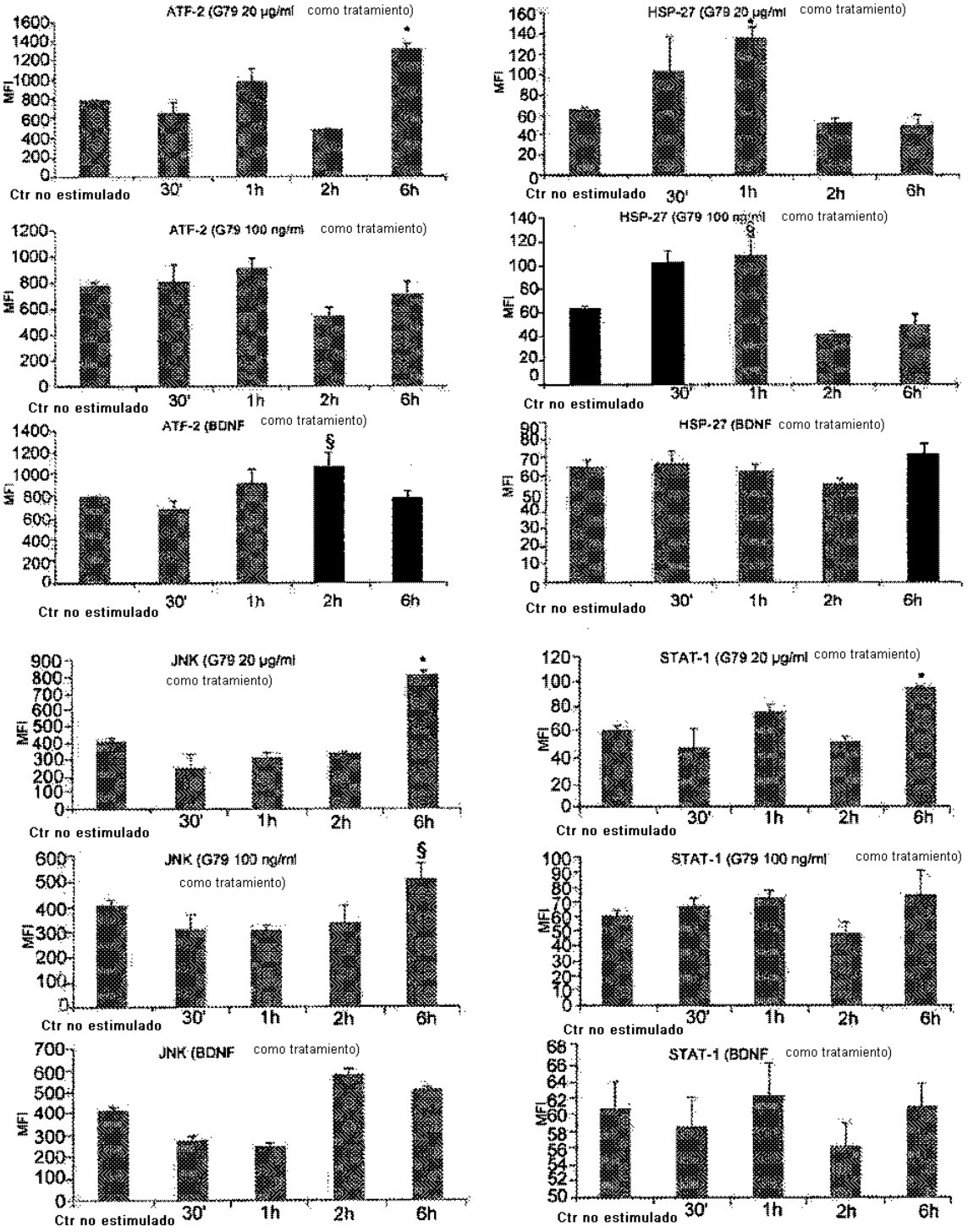

ATF-2 (G79 20 µg/ml como tratamiento)
HSP-27 (G79 20 µg/ml como tratamiento)
ATF-2 (G79 100 ng/ml como tratamiento)
HSP-27 (G79 100 ng/ml como tratamiento)
ATF-2 (BDNF como tratamiento)
HSP-27 (BDNF como tratamiento)
JNK (G79 20 µg/ml como tratamiento)
STAT-1 (G79 20 µg/ml como tratamiento)
JNK (G79 100 ng/ml como tratamiento)
STAT-1 (G79 100 ng/ml como tratamiento)
JNK (BDNF como tratamiento)
STAT-1 (BDNF como tratamiento)
MFI
Ctr no estimulado
30'
1h
2h
6h

FIG. 8

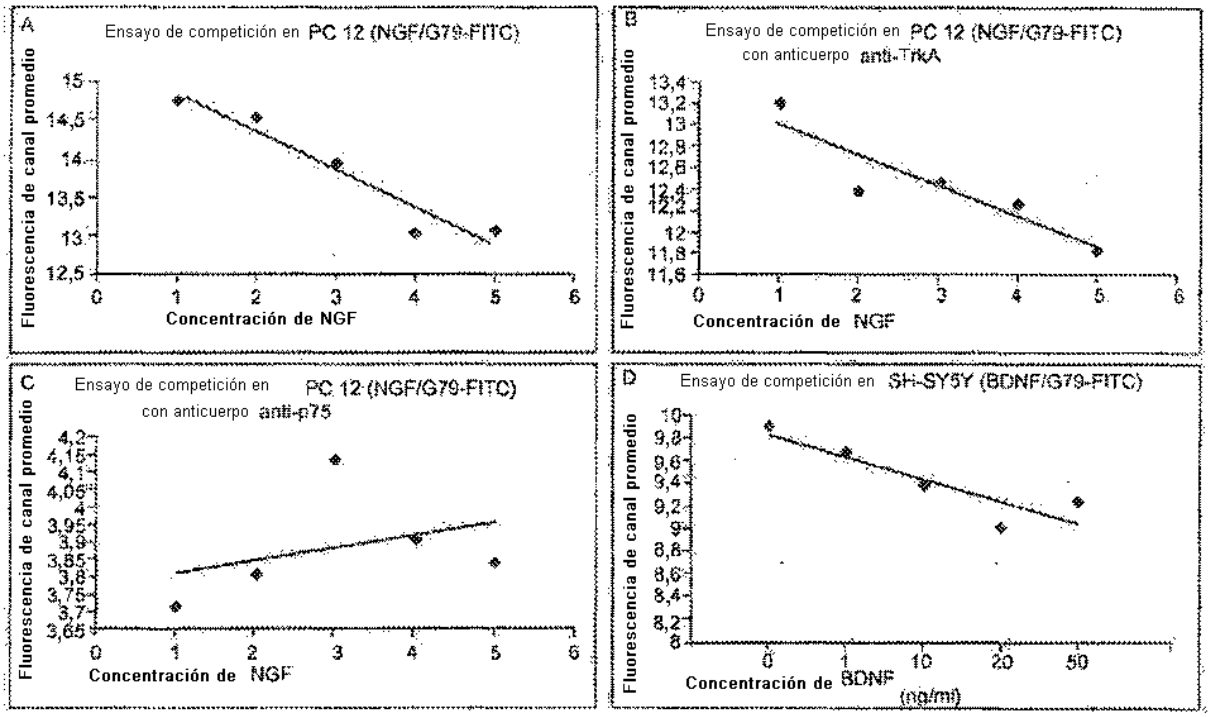

A
Ensayo de competición en PC 12 (NGF/G79-FITC)
Fluorescencia de canal promedio
Concentración de NGF
B
Ensayo de competición en PC 12 (NGF/G79-FITC)
con anticuerpo anti-TrkA
Fluorescencia de canal promedio
Concentración de NGF
C
Ensayo de competición en PC 12 (NGF/G79-FITC)
con anticuerpo anti-p75
Fluorescencia de canal promedio
Concentración de NGF
D
Ensayo de competición en SH-SY5Y (BDNF/G79-FITC)
Fluorescencia de canal promedio
Concentración de BDNF
(ng/ml)

FIG. 9

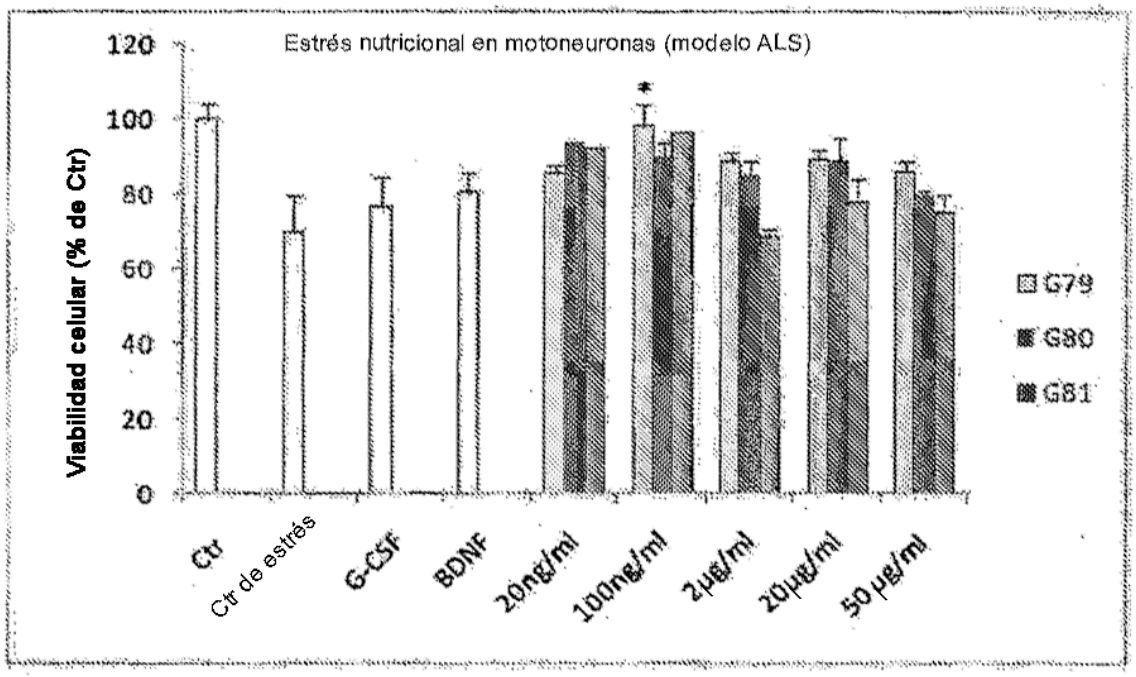

Estrés nutricional en motoneuronas (modelo ALS)
Viabilidad celular (% de Ctr)
120
100
80
60
40
20
0
Ctr
Ctr de estrés
G-CSF
BDNF
20ng/ml
100ng/ml
2µg/ml
20µg/ml
50 µg/ml
G79
G80
G81

FIG. 10

puntuación clínica en EAE (tratamiento i.p.)

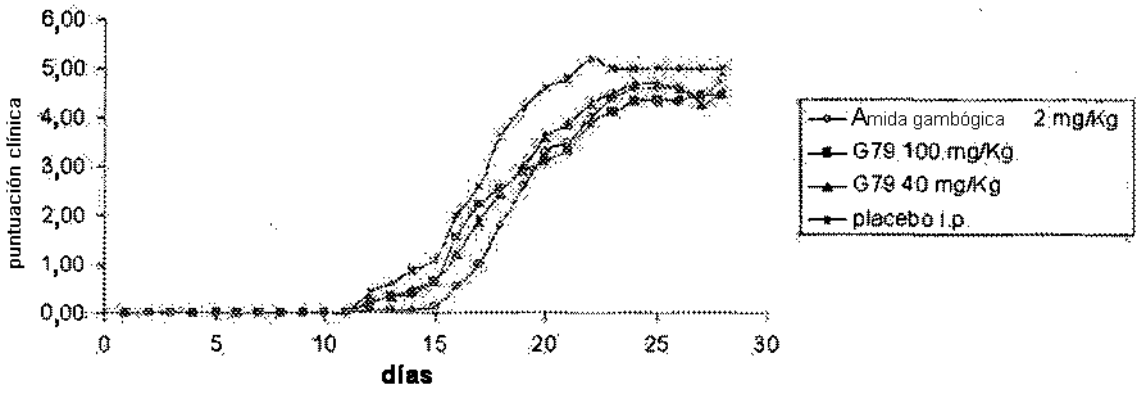


FIG. 11A:

puntuación clínica en EAE (tratamiento oral)

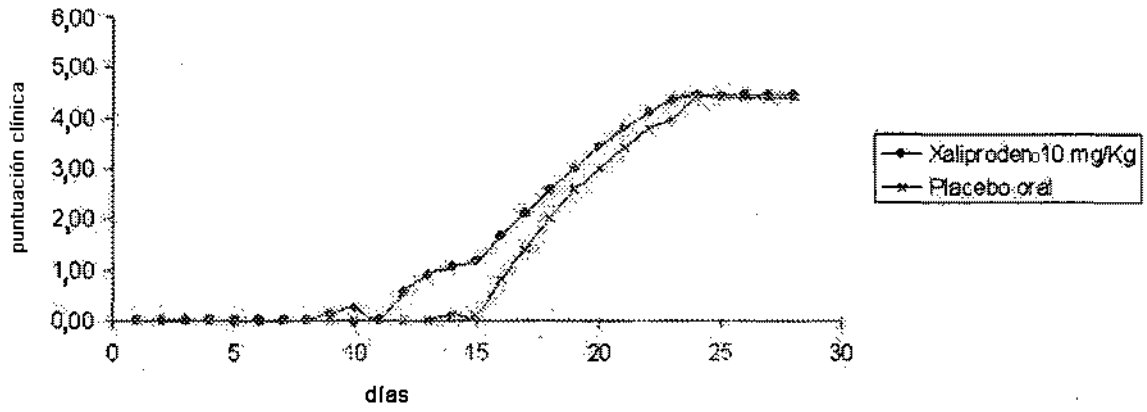


FIG. 11B

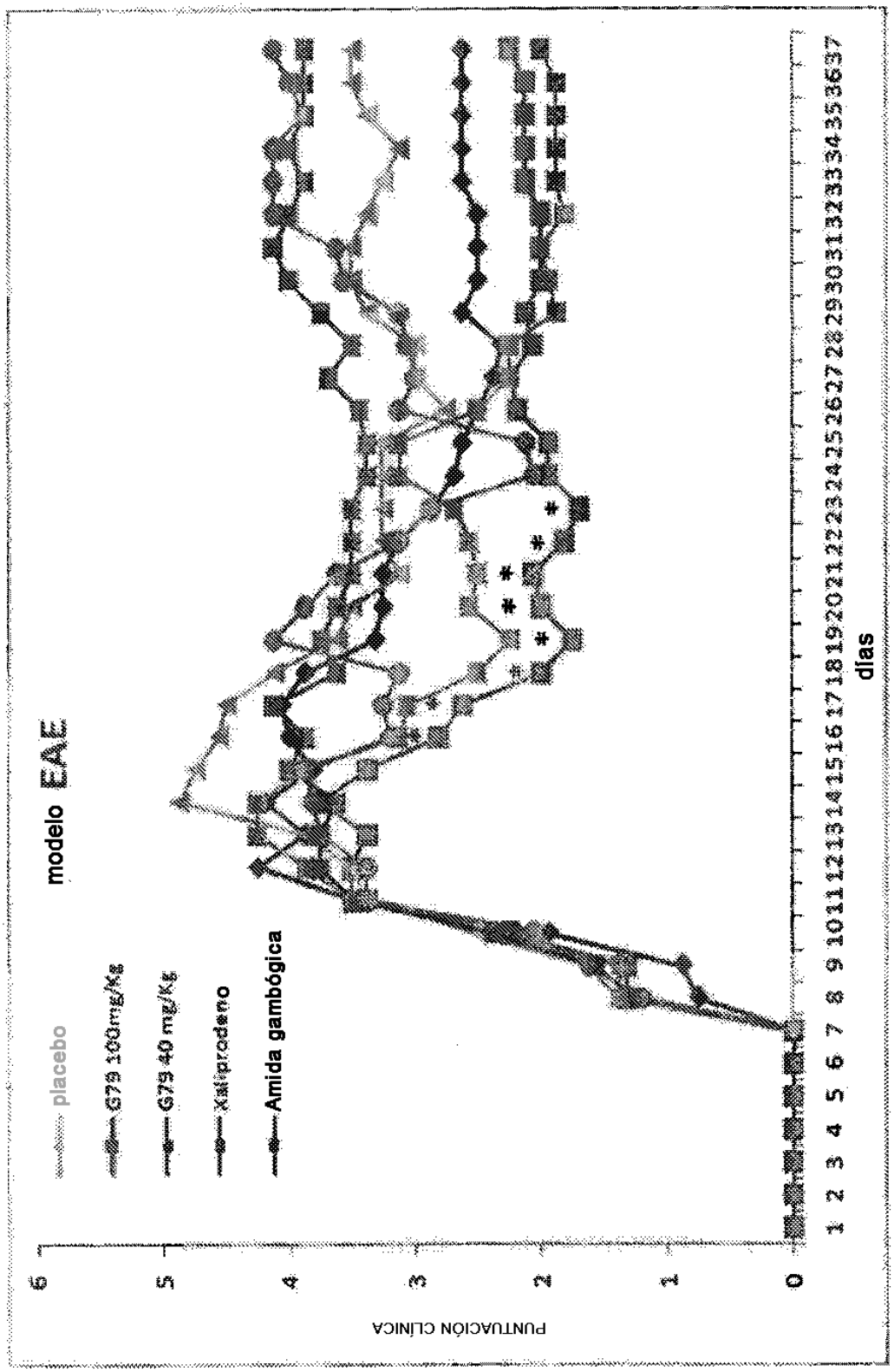

modelo EAE
placebo
G79 100mg/Kg
G79 40 mg/Kg
Xaliprodeno
Amida gambógica
PUNTUACIÓN CLÍNICA
0
1
2
3
4
5
6
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37
días

FIG. 12

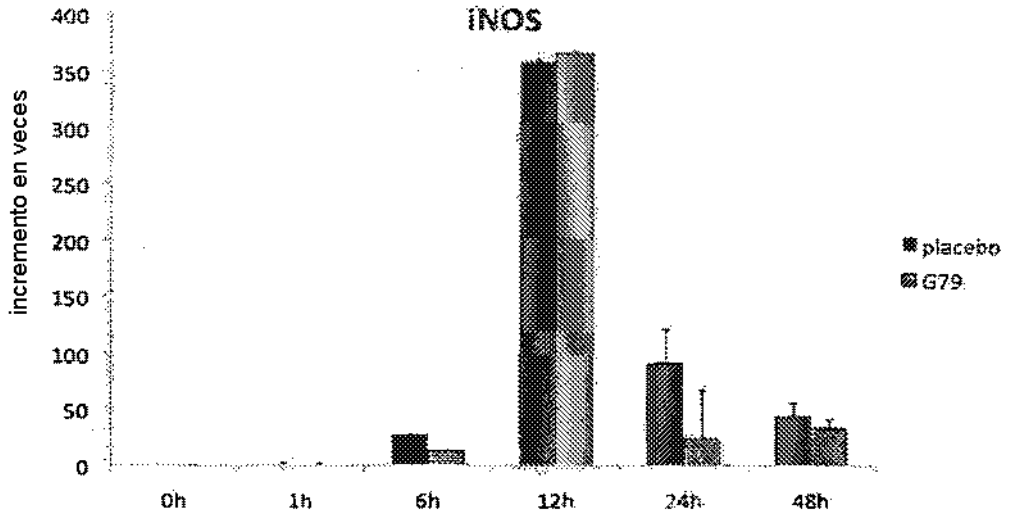

iNOS
incremento en veces
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0h
1h
6h
12h
24h
48h
placebo
G79

FIG. 13

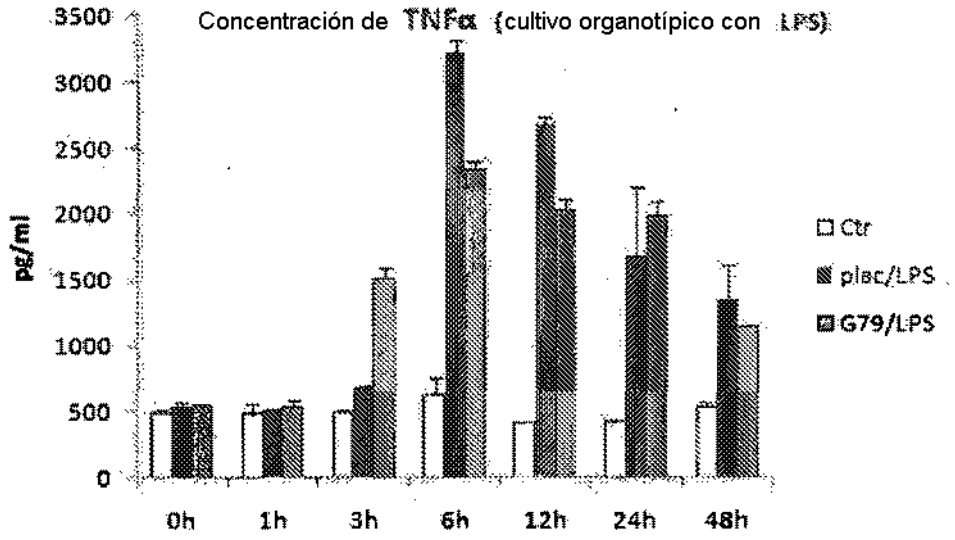


FIG. 14A

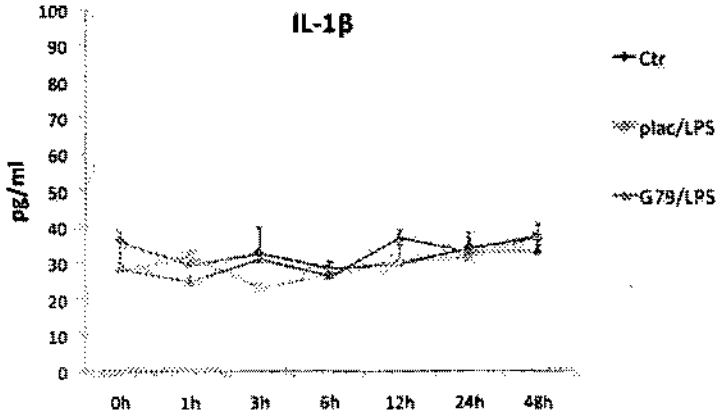


FIG. 14B