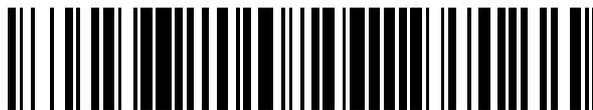


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 137**

21 Número de solicitud: 201500274

51 Int. Cl.:

A61K 31/4353 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

20.04.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

20.10.2016

88 Fecha de publicación diferida del informe sobre el estado de la técnica:

01.06.2017

Fecha de la concesión:

09.03.2018

45 Fecha de publicación de la concesión:

16.03.2018

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE
LA PRINCESA (75.0%)
C/ Diego de León 62
28006 Madrid (Madrid) ES;
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (16.0%) y
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(9.0%)**

72 Inventor/es:

**ABRIL COMESAÑA, Sheila;
GARCÍA LÓPEZ, Manuela;
RAMOS GARCÍA, Maria Teresa;
MENÉNDEZ RAMOS, José Carlos;
GARCIA GARCIA, Antonio;
LEÓN MARTÍNEZ, Rafael ;
GAMEIRO ROS, Isabel;
TENTI, Giammarco;
MICHALSKA, Patrycja y
BUENDÍA ABAITUA, Izaskun**

54 Título: **Uso de los compuestos derivados de 3-alquil-4-aril-1,4,6,7,8,9-hexahidropirazolo [4',3':5,6]pirano[2,3-b]quinolin-5-amina como inhibidores duales de GSK3B - AChE e inductores de Nrf2 para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas**

57 Resumen:

La presente invención se refiere al uso de derivados de 3 - alquil - 4 - aril - 1, 4, 6, 7, 8, 9- hexahidropirazolo[4',3':5,6]pirano [2,3-b] quinolin - 5 amina con actividad inhibidora dual de las enzimas glucogeno-sintasa-quinasa 3β y acetilcolinesterasa, capacidad inductora del factor de transcripción Nrf2, y capacidad neuroprotectora. Otro aspecto de la invención se refiere al uso de los derivados objeto de esta invención para el tratamiento de enfermedades en cuya patogénesis interviene la actividad anormal de estas enzimas en conjunto y/o el estrés oxidativo y/o enfermedades que cursen con desregulación de la actividad de genes de fase II activados por el factor Nrf2, como las enfermedades neurodegenerativas.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

ES 2 587 137 B1

DESCRIPCIÓN

**USO DE LOS COMPUESTOS DERIVADOS DE 3-ALQUIL-4-ARIL-1,4,6,7,8,9-
HEXAHIDROPIRAZOLO[4',3':5,6]PIRANO[2,3-B]QUINOLIN-5-AMINA
COMO INHIBIDORES DUALES DE GSK3 β - AChE E INDUCTORES DE
Nrf2 PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES
NEURODEGENERATIVAS**

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se encuadra principalmente en el sector farmacéutico con aplicaciones dirigidas a la prevención y/o tratamiento de enfermedades y cualquier tipo de afección o daño que implique una actividad anormal de la enzima glucógeno-sintasa-quinasa 3 β (GSK3 β) y la enzima acetilcolinesterasa (AChE) o que curse con altos niveles de estrés oxidativo y, en concreto, en la identificación de compuestos químicos útiles en el tratamiento preventivo y/o terapéutico de enfermedades neurodegenerativas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por un deterioro progresivo de la función colinérgica, producción y agregación de β -amiloide y formación de ovillos neurofibrilares, y representa la forma más común de demencia en personas adultas. Debido al progresivo envejecimiento de la población mundial, se estima que en el año 2050 esta enfermedad afectará a 115 millones de personas. Por tanto, la búsqueda de estrategias terapéuticas que prevengan o detengan el proceso de neurodegeneración es prioritaria.

Los principales signos clínicos de la EA son la pérdida gradual de memoria y un notable deterioro de las capacidades cognitivas, debido a la disminución progresiva del número de neuronas, sobre todo del sistema colinérgico (Francis y col., 1999, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 66: 137-47). Las características de la enfermedad a nivel histopatológico son: la formación de placas extracelulares del péptido β -amiloide (β A) (Vinters, 1987, *Stroke*, 18: 311-24) y de ovillos neurofibrilares intracelulares (NFTs), constituidos por acúmulos de la proteína tau hiperfosforilada (Lee y col.,

2001, *Annu Rev Neurosci*, 24: 1121-59). Otras alteraciones características son la disfunción mitocondrial, el aumento de los niveles de estrés oxidativo (Pratico, 2008, *Trends Pharmacol Sci*, 29: 609-15), y la neuroinflamación.

Se ha descrito que los ovillos neurofibrilares están formados por filamentos apareados en forma helicoidal (PHF) de proteína tau hiperfosforilada. En los enfermos de EA, el grado de fosforilación de Tau es mayor que en condiciones normales y parece existir una correlación clara entre la hiperfosforilación de esta proteína y la pérdida de capacidades cognitivas de estos pacientes (Grundke-Iqbal y col., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 83: 4913-7, Greenberg y col., 1992, *J. Biol. Chem.*, 267: 564-9). Como consecuencia de la hiperfosforilación de tau se produce la despolimerización de los microtúbulos (Moreno y col., 1995, *FEBS Lett.*, 372: 65-8), que lleva a la degeneración neuronal. Las principales quinasas en la hiperfosforilación de Tau son la GSK3 β y la quinasa dependiente de ciclina-5 (CDK5). Por tanto los inhibidores de la quinasa GSK3 β se presentan como nuevos agentes terapéuticos para la EA, capaces de evitar la formación de ovillos neurofibrilares y así evitar el daño neuronal que producen. Los ovillos neurofibrilares aparecen en las denominadas Taupatías que cursan con hiperfosforilación de Tau, tales como la EA, la esclerosis lateral amiotrófica, el parkinsonismo postencefálico, la parálisis supranuclear progresiva, la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, la enfermedad de Hallervorden-Spatz, la enfermedad Creutzfeldt-Jacob, el síndrome de Down, la enfermedad de Niemann-Pick y la enfermedad de Pick.

Por otro lado, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), o de radicales libres en general, aumenta progresivamente con la edad, siendo éste el mayor factor de riesgo en estas patologías. Las neuronas tienen diversos mecanismos que actúan como sensores redox para identificar e iniciar la respuesta antioxidante con objeto de evitar la acumulación o liberación excesiva de especies pro-oxidantes. El elemento de respuesta antioxidante (ARE) es una secuencia reguladora que se encuentra en la región adyacente a 5'- del ADN y precede a regiones que codifican un gran número de enzimas citoprotectoras, regulando la expresión de éstas en respuesta a la presencia de estrés oxidativo (Rushmore y col., 1991, *J Biol Chem*, 266: 11632-9, Joshi y col., 2012, *Recent Pat CNS Drug Discov*, 7: 218-29). En presencia de un

estímulo tóxico, o por activación química, el factor de transcripción Nrf2 (del inglés “nuclear factor (erythroid 2 related)-like 2”) se libera del co-represor Keap1, y se transloca al núcleo donde dimeriza con pequeñas proteínas Maf, para formar el complejo de activación-*trans* que se une a la secuencia ARE (Nguyen y col., **2004**, *Free Radic Biol Med*, 37: 433-41). En consecuencia, la activación-*trans* de ARE inducida por Nrf2 coordina la expresión de una gran cantidad de genes que combaten el estrés oxidativo y su toxicidad en un gran número de tejidos y tipos celulares (Ramos-Gomez y col., **2001**, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 3410-5, Enomoto y col., **2001**, *Toxicol Sci*, 59: 169-77, Gao y col., **2004**, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 10446-51, Lee y col., **2003**, *J Biol Chem*, 278: 37948-56).

La desregulación y/o la disfunción de la ruta Nrf2-ARE se ha correlacionado con la aparición y/o desarrollo de diversas patologías neurodegenerativas, entre las que se encuentran la EA, la enfermedad de Parkinson (EP) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), o aquellas que cursan con pérdida neuronal como el ictus. Por tanto, la *vía* Nrf2-ARE se ha convertido en una importante diana terapéutica para el tratamiento de éstas (Joshi y col., **2012**, *Recent Pat CNS Drug Discov*, 7: 218-29) y otras enfermedades.

La localización predominantemente citosólica de Nrf2 en neuronas en la EA depende, entre otros factores, de la acción de GSK3 β . De hecho, se ha demostrado que su inhibición con litio favorece la acumulación nuclear y el aumento de la actividad transcripcional de Nrf2 (Rojo y col., **2008**, *Mol Cell Neurosci*, 39: 125-32). Esta enzima es capaz de modular la actividad de Nrf2 a través de dos mecanismos, promoviendo en ambos casos su localización citosólica: 1) GSK3 β fosforila a Nrf2 (Rojo y col., **2008**, *J Neurochem*, 105: 192-202) para ser después degradado por el proteasoma; 2) GSK3 β promueve la exclusión de Nrf2 del núcleo a través de la tirosina quinasa Fyn (Jain y col., **2007**, *J Biol Chem*, 282: 16502-10) y en consecuencia Nrf2 es secretado de nuevo al citosol para ser degradado por el proteasoma. De esta forma, GSK3 β regula negativamente a Nrf2, favoreciendo la acumulación de ROS y, por tanto, incrementando los niveles de estrés oxidativo y muerte neuronal.

Por otra parte, los casos de EA familiar se deben a mutaciones, entre otras, en la proteína precursora de amiloide (APP), presenilina-1 y 2 (PS-1, PS-2), que afectan

negativamente al procesamiento de la proteína APP, incrementado la producción de placas de beta amiloide (β A) (Haass y col., **2012**, *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2: a006270). En particular, PS-1 está relacionada con GSK3 β , pues se ha demostrado que PS-1 inactiva GSK3 β a través de la vía de supervivencia PI3K/Akt (Baki y col.,
 5 **2004**, *Embo J*, 23: 2586-96). Por tanto, las mutaciones en PS-1 inhiben la señalización PI3K/Akt dependiente de PS-1, favoreciendo la actividad de GSK3 β y, con ello, la hiperfosforilación de tau y la regulación negativa de Nrf2.

Por otro lado, como ya se ha mencionado, una de las principales características de la EA y la responsable de sus síntomas más notables, es la disminución de la
 10 actividad colinérgica. En este sentido, se ha observado que la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), responsable de la degradación de acetilcolina (ACh), está aumentada en el cerebro de pacientes de EA (Francis y col., **1999**, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 66: 137-47), y que además co-localiza con las placas de β A (Moran y col., **1993**, *Acta Neuropathol*, 85: 362-9). En 1996, Inestrosa y colaboradores demostraron
 15 que la AChE es capaz de acelerar la agregación de β A, favoreciendo la formación de oligómeros y de placas seniles, en un proceso que implica el sitio periférico, conocido como sitio aniónico periférico (PAS) (Inestrosa y col., **1996**, *Neuron*, 16: 881-91). Por tanto, la inhibición de AChE en su sitio periférico se ha postulado como diana para evitar la agregación de los péptidos de β A, evitando así su toxicidad. Este mecanismo
 20 de acción se ha demostrado para donepezilo (Bartolini y col., **2003**, *Biochem Pharmacol*, 65: 407-16), uno de los fármacos que actualmente constituyen la primera línea para el tratamiento de la EA. Este fármaco es capaz de interactuar a la vez con el sitio catalítico y el periférico de AChE, evitando la agregación de β A catalizada por esta enzima.

Además de las interrelaciones ya mencionadas, han sido descritas numerosas
 25 interrelaciones entre los distintos procesos fisiopatológicos que tienen lugar en la EA. En este sentido, β A y el estrés oxidativo están estrechamente relacionados. Se ha demostrado que los compuestos derivados de la peroxidación lipídica (4-hidroxinonenal) causada por estrés oxidativo aumentan la expresión de β -secretasa en
 30 neuronas (Tamagno y col., **2002**, *Neurobiol Dis*, 10: 279-88), aumentando así la concentración de β A. En la misma línea, se ha descrito que el estrés oxidativo produce un aumento de los niveles de β A en células de neuroblastoma humano (Misonou y

col., 2000, *Biochemistry*, 39: 6951-9). Por otro lado, estudios *in vitro* han demostrado que el β A es capaz de coordinar Fe^{3+} y Cu^{2+} y generar ROS vía química de Fenton (Huang y col., 1999, *Biochemistry*, 38: 7609-16). Además, se ha visto que la sobreexpresión de Nrf2 *in vitro* protege frente a la neurotoxicidad inducida por β A (Frautschy y col., 2001, *Neurobiol Aging*, 22: 993-1005). Estos hechos ponen de manifiesto la existencia de un bucle etiopatogénico entre β A y el estrés oxidativo en la EA.

Por otro lado, se ha demostrado que el tratamiento de neuronas corticales con β A induce hiperfosforilación de tau y que ésta es revertida por litio, implicando a GSK3 β en la toxicidad inducida por β A (Alvarez y col., 1999, *FEBS Lett*, 453: 260-4). Posteriormente, se demostró que los oligómeros de β A inhiben la vía de supervivencia PI3K/Akt, y por tanto incrementan la actividad de GSK3 β y la hiperfosforilación de tau (Jimenez y col., 2011, *J Biol Chem*, 286: 18414-25). Estas evidencias conectan directamente la hiperfosforilación de tau con la neurotoxicidad inducida por β A. Además, Ryder y colaboradores demostraron que la hiperactividad de GSK3 β daña el procesamiento de la proteína APP, incrementando la producción de β A, aunque el mecanismo concreto aún no ha sido elucidado (Ryder y col., 2003, *Biochem Biophys Res Commun*, 312: 922-9).

En los documentos de patente WO2014059383, WO2012050517, EP2321295, WO2009156859, US2015031897, WO2011124712, WO0007600 (A1), WO2011/156889, WO2012/116362, WO2012/145420, WO2012/149478, WO2013/067036, WO2013/132124, P2013/00667 se proponen distintas opciones de tratamiento de enfermedades neurodegenerativas basadas en uno o varios compuestos químicos y/o productos naturales cuya diana terapéutica es la inhibición de la enzima GSK3 β o la inhibición de la enzima AChE, o la inducción y/o modulación de la ruta Nrf2-ARE como estrategia neuroprotectora.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere al uso de compuestos con estructura 4-aril-1,4,6,7,8,9-hexahidropirazolo[4',3':5,6]pirano[2,3-*b*]quinolin-5-amina con capacidad inhibidora

dual de las enzimas GSK3 β y AChE, y/o con capacidad inductora de la ruta Nrf2-ARE con los efectos antioxidantes, anti-inflamatorios y neuroprotectores que esto conlleva. En la presente invención se describe, por primera vez, la inclusión de la capacidad inhibidora dual de las enzimas GSK3 β y AChE en una única molécula, además de incluir la capacidad inductora del factor de transcripción Nrf2 gracias a las modificaciones estructurales realizadas, para dar lugar a un nuevo compuesto que incluye estas actividades. Los compuestos objeto de la presente invención poseen capacidad inductora de Nrf2, por lo que pueden ser potencialmente útiles en el tratamiento preventivo y/o terapéutico de enfermedades neurodegenerativas. Más específicamente, el objeto de la presente invención consiste en proporcionar nuevos compuestos útiles como ingredientes activos de un medicamento, que permitan la prevención y/o tratamiento de enfermedades tales como la EA.

Por lo tanto, en un aspecto, la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) (definido más adelante), sus sales, profármacos o solvatos. Dicho compuesto de fórmula (I) puede ser utilizado en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y/o enfermedades que estén relacionadas con una disfunción de la proteína tau causando su agregación como es el caso de las denominadas taupatías tales como la EA, la esclerosis lateral amiotrófica, el parkinsonismo postencefálico, la parálisis supranuclear progresiva, la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, la enfermedad de Hallervorden-Spatz, la enfermedad Creutzfeldt-Jacob, el síndrome de Down, la enfermedad de Niemann-Pick y la enfermedad de Pick.

En un aspecto, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o una sal, un profármaco o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

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

En otro aspecto, la invención protege el uso de dicho compuesto de fórmula (I), o sus sales, profármacos o solvatos, farmacéuticamente aceptables, en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, o en enfermedades isquémico-cerebrales.

En el contexto de la presente invención, los siguientes términos tienen el significado detallado a continuación:

5 Cuando se usa el término “seleccionados independientemente”, los sustituyentes a los que se refiere (e.j. grupos R, como los grupos R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ o X o Y o Z o variables como “n”) los grupos pueden ser idénticos o diferentes, o en su caso cuando sea especificado.

10 El término “alquilo” se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada lineal o ramificado consistente solamente en átomos de carbono e hidrógeno que no contienen insaturaciones, teniendo de uno a ocho átomos de carbono y que está unido al resto de la molécula por un enlace sencillo. Preferiblemente, se refiere a un radical de cadena alifática lineal o ramificada que tiene entre 1 y 6, preferiblemente entre 1 y 3 (“alquiloC₁₋₃”) átomos de carbono, y que está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo. Este término incluye, por ejemplo y en un sentido no limitativo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, n-pentilo, etc. Los radicales
15 alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes independientemente seleccionados del grupo consistente en halógenos, hidroxilo, alcóxidos, carboxi, ciano, carbonil, acil, alcoxicarbonil, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

20 El término “alcoxilo” se refiere a un grupo –O-alquilo, donde alquilo es como se ha definido previamente. Preferiblemente alcoxilo es metoxilo.

El término “halógeno” se refiere a bromo, cloro, yodo o flúor. Preferiblemente, halógeno es flúor o cloro o bromo.

25 El término “haloalquil” se refiere a un radical alquilo, como ha sido definido previamente, que está sustituido por uno o más halógenos, como también han sido definidos previamente, incluyendo por ejemplo, y en un sentido no limitativo, trifluorometil, triclorometil, 2,2,2,-trifluoroetil, 1-fluorometil-2-fluoroetil, etc.

El término “alcoxicarbonil” se refiere a un radical de fórmula –C(O)OR donde R es un radical alquilo como se ha descrito previamente. Los radicales alcoxicarbonil pueden incluir por ejemplo, y en un sentido no limitativo, metoxi, etoxi, propoxi, etc.

30 El término “cicloalquilo” se refiere a un grupo alifático mono o policíclico saturado o parcialmente saturado, que tiene entre 3 y 10, preferiblemente entre 3 y 6 átomos de carbono que está unido al resto de la molécula por medio de un enlace

sencillo, incluyendo por ejemplo, y en un sentido no limitativo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclohexilo, ciclopentilo, etc.

El término “amino” se refiere a un radical de fórmula -NH_2 .

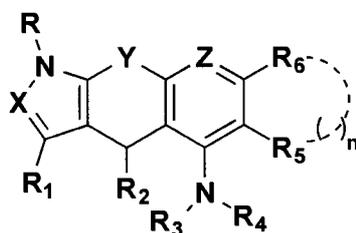
El término “arilo” se refiere a un grupo aromático que tiene entre 6 y 18, preferiblemente entre 6 y 10 átomos de carbono, que comprende 1, 2 ó 3 núcleos aromáticos, unidos por medio de un enlace carbono-carbono o condensados, incluyendo por ejemplo y en un sentido no limitativo fenilo, naftilo, difenilo, indenilo, fenantrilo, etc.

El término “heterociclo” se refiere a un radical de anillo de 3 a 10 miembros estable, preferiblemente un anillo de 5 ó 6 miembros, que consiste en átomos de carbono y desde uno hasta cinco heteroátomos seleccionados del grupo formado por nitrógeno, oxígeno y azufre, y que puede estar parcial o totalmente saturado, o puede ser aromático (“heteroarilo”). Para los fines de esta invención, el heterociclo puede ser un sistema de anillo monocíclico, bicíclico o tricíclico, que puede incluir sistemas de anillos condensados. Los ejemplos de tales heterociclos incluyen, pero no se limitan a, pirrolidina, piperidina, piperazina, morfolina, tetrahidrofurano, bencimidazol, benzotiazol, furano, pirrol, piridina, pirimidina, isotiazol, imidazol, indol, purina, quinolina, tiadizol.

Tal como se entiende en esta área técnica, puede haber un cierto grado de sustitución en los radicales definidos anteriormente. Las referencias del presente documento con respecto a los grupos sustituidos, indican que el radical especificado puede estar sustituido en una o más posiciones disponibles con uno o más sustituyentes. Dichos sustituyentes incluyen, por ejemplo, y en un sentido no limitativo, alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , cicloalquilo, arilo, heterociclo, halógeno, CN , NO_2 , CF_3 , $\text{-N(R}_a\text{)(R}_b\text{)}$, -OR_c , -SR_d , -C(O)R_e , -C(O)OR_f , $\text{-C(O)N(R}_g\text{)(R}_h\text{)}$, -OC(O)R_i ; en los que R_a , R_b , R_c , R_d , R_e , R_f , R_g , R_h y R_i se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo, $\text{C}_1\text{-C}_6$, arilo, heterociclo y trifluorometilo.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I):

30



(I)

donde

- 5 R y R₁ se seleccionan del grupo consistente en:
- Un átomo de hidrógeno;
 - Alquilo opcionalmente sustituido por uno, dos, o tres átomos de halógeno seleccionado entre flúor, cloro y bromo; cicloalquilo(C₃-C₆); alcoxilo(C₁-C₆); cicloalcoxilo(C₃-C₆); ciano y nitro; o bien dos grupos pueden formar conjuntamente un grupo -O(CH₂)_mO-, -(CH₂)_p-, o -CH=CH-CH=CH-; y/o
 - 10 - fenilo opcionalmente sustituido por uno, dos o tres grupos seleccionados independientemente entre flúor; cloro; bromo; alquilo opcionalmente sustituido por uno, dos, o tres átomos de halógeno seleccionado entre flúor, cloro y bromo; cicloalquilo(C₃-C₆); alcoxilo(C₁-C₆); cicloalcoxilo(C₃-C₆); ciano y nitro; o bien dos grupos pueden formar conjuntamente un grupo -O(CH₂)_mO-, -(CH₂)_p-, o -CH=CH-CH=CH-; o
 - 15 - un grupo heteroarilo seleccionado entre 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 3-piridazinilo, 4-piridazinilo, 2-pirimidinilo, 4-pirimidinilo, 5-pirimidinilo, 2-pirazinilo, 3-pirazinilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 3-isotiazolilo, 4-isotiazolilo, 5-isotiazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, 3-pirazolilo, 4-pirazolilo, 1,2,3-oxadiazol-4-ilo, 1,2,3-oxadiazol-5-ilo, 1,2,4-oxadiazol-3-ilo, 1,2,4-oxadiazol-5-ilo, 1,2,5-oxadiazol-3-ilo, 1,3,4-oxadiazol-2-ilo, 1,2,3-tiadiazol-4-ilo, 1,2,3-tiadiazol-5-ilo, 1,2,4-tiadiazol-3-ilo, 1,2,4-tiadiazol-5-ilo, 1,2,5-tiadiazol-3-ilo, 1,3,4-tiadiazol-2-ilo, 1,2,3-triazol-4-ilo, 1,2,4-triazol-3-ilo y 5-tetrazolilo, estando el grupo heteroarilo
 - 20
 - 25 opcionalmente sustituido por uno, dos o tres grupos seleccionados

independientemente entre flúor, cloro, bromo, alquilo, cicloalquilo(C₃-C₆),
alcoxilo(C₁-C₆), cicloalcoxilo(C₃-C₆), ciano y nitro;

R₂ se selecciona del grupo consistente en hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo
o heteroarilo, opcionalmente sustituido por uno, dos o tres grupos seleccionados
5 independientemente entre flúor, cloro, bromo, alquilo, alcoxilo, cicloalquilo(C₃-C₆),
cicloalcoxilo(C₃-C₆), ciano, nitro y carboxilato o bien dos grupos pueden formar
conjuntamente un grupo -O(CH₂)_qO-, -(CH₂)_r-, o -CH=CH-CH=CH-;

R₃ y R₄ se seleccionan del grupo consistente en hidrógeno, alquilo(C₁-C₆),
cicloalquilo(C₃-C₆) y fenilo, opcionalmente sustituido por uno, dos o tres grupos
10 seleccionados independientemente entre flúor, cloro, bromo, alquilo(C₁-C₆),
alcoxilo(C₁-C₆), cicloalquilo(C₃-C₆), cicloalcoxilo(C₃-C₆), ciano, nitro y carboxilato;

R₅ y R₆ se seleccionan del grupo consistente en hidrógeno, alquilo,
cicloalquilo(C₃-C₆), acetilo, fenilo o heteroarilo, opcionalmente sustituido por uno,
dos o tres grupos seleccionados independientemente entre flúor, cloro, bromo,
15 alquilo(C₁-C₆), alcoxilo(C₁-C₆), cicloalquilo(C₃-C₆), cicloalcoxilo(C₃-C₆), ciano y
nitro o bien dos grupos pueden formar conjuntamente un grupo cicloalquilo(C₃-C₆) o
-(CH₂)_s-, o -CH=CH-CH=CH-;

X se selecciona entre un átomo de carbono o un átomo de nitrógeno;

Y se selecciona entre un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno o un átomo
20 de azufre, -SO- o SO₂;

Z se selecciona entre un átomo de carbono o un átomo de nitrógeno,

n es un número entero seleccionado entre 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

y sus sales, preferiblemente sales farmacéuticamente aceptables, profármacos o
solvatos.

25 El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere, preferiblemente, a
composiciones y entidades moleculares que son fisiológicamente tolerables y no
producen, normalmente, una reacción alérgica o una reacción no favorable similar, tal
como trastornos gástricos, mareo y similares, cuando se administra a un ser humano o
animal. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que está aprobado por
30 una agencia reguladora como la agencia europea del medicamento o la agencia
reguladora de EEUU, o que está incluido en la Farmacopea Estadounidense u otra

farmacopea reconocida de modo general para su uso en animales y, de manera más particular, en seres humanos.

El término “sales” tal como aquí se utiliza se refiere a cualquier sal del compuesto de fórmula (I) que, cuando se administra a un sujeto, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) dicho compuesto de fórmula (I). El término “sujeto” incluye a cualquier animal, por ejemplo, un mamífero, incluyendo a los seres humanos. La preparación de dichas sales puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. A modo ilustrativo, una sal de un compuesto de fórmula (I) puede sintetizarse mediante métodos convencionales a partir de un compuesto de fórmula (I) que contiene un resto básico. Generalmente, tales sales se preparan, por ejemplo, haciendo reaccionar las formas de base libre de los compuestos de fórmula (I) con una cantidad estequiométrica del ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de agua y un disolvente orgánico. En general, se prefieren medios no acuosos tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo.

En una realización particular, dichas sales del compuesto de fórmula (I) son sales farmacéuticamente aceptables, es decir, sales que pueden ser administradas a un sujeto y proporcionan un compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico de dicho individuo. Entre dichas sales farmacéuticamente aceptables se incluyen las sales de adición de ácido, por ejemplo, las sales formadas a partir de ácidos orgánicos e inorgánicos, tales como bromhídrico, clorhídrico, fosfórico, nítrico, sulfúrico, acético, adípico, aspártico, bencenosulfónico, benzoico, cítrico, etanosulfónico, fórmico, fumárico, glutámico, láctico, maleico, málico, malónico, mandélico, metanosulfónico, 1,5-naftalenodisulfónico, oxálico, piválico, propiónico, *p*-toluenosulfónico, succínico, tartárico y similares, así como las sales metálicas, estando seleccionado el metal entre sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, zinc, aluminio y similares, o las sales amónicas, o una sal formada a partir de bases orgánicas, como 2-amino-1-butanol, 2-amino-2-etil-1,3-propanodiol, 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol, benzatina, bencildimetilamina, cloroprocaína, colina, dibencilmetilamina, dietanolamina, diisopropanolamina, etilendiamina, dimetilestearamina, meglumina, 2-metil-2-amino-1-propanol, un monoamino-glicol, monoetanolamina, monoisopropanolamina, morfolina, N,N-dibenciletilendiamina, N,N-dimetil-2-amino-2-metil-1-propanol, N,N-dimetilanilina,

procaína, piridina, quinolina, t-butil-dimetilamina, trietanolamina, trietilamina, trihidroximetilaminometano, trisopropanolamina, trimetilamina y similares, y sales con aminoácidos tales como glicina, lisina, arginina, taurina, histidina, alanina, valina, cisteína y similares.

5 En otra realización particular, algunos grupos sustituyentes pueden añadirse a los compuestos objeto de la invención, para hacerlos susceptibles de formación de sales. Por ejemplo, grupos funcionales ácidos que pueden formar sales estables con cationes y grupos funcionales básicos que forman sales estables con ácidos. Generalmente, debe existir una diferencia de al menos tres unidades en los valores de

10 pK_a del compuesto que se usa como fármaco y el contraión. Para compuestos derivados que son bases muy débiles, la elección para formar sales es preferiblemente un ácido fuerte, como el ácido clorhídrico ($pK_a = -6,1$), sulfúrico ($pK_{a1} = -3,0$, $pK_{a2} = -1,96$), o metanosulfónico ($pK_a = -1,2$) para asegurar la protonación del compuesto. Los compuestos que son más básicos pueden formar sales con ácidos débiles, como el

15 ácido fosfórico ($pK_{a1} = 2,15$, $pK_{a2} = 7,2$, $pK_{a3} = 12,38$), tartárico ($pK_a = 2,93$), acético ($pK_a = 4,76$), y benzoico ($pK_a = 4,2$). Para compuestos que sean ácidos muy débiles, se prefieren cationes fuertemente básicos, como sodio ($pK_a = 14,8$), potasio ($pK_a = 16,0$) o calcio ($pK_a = 12,9$), para asegurar la desprotonación del compuesto. Compuestos que son más ácidos pueden formar sales con cationes más débiles, como

20 zinc ($pK_a = 8,96$), colina ($pK_a = 18,9$) y dietanolamina ($pK_a = 9,65$). Grupos funcionales representativos para la formación de sales estables listadas en función del valor relativo de su fuerza ácido/base incluyen, pero no limitan, ácido sulfónico ($pK_{a1} = -1,2$, $pK_{a2} = -0,7$), ácido carboxílico ($pK_a = -4,7$) e imida ($pK_a = 8,2$).

En otra realización particular, dichas sales del compuesto de fórmula (I) son

25 sales farmacéuticamente no aceptables, las cuales pueden ser útiles en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de fórmula (I), o de sus profármacos o solvatos.

El término “profármaco” se emplea, en esta descripción, en el sentido más amplio, e incluye a cualquier compuesto derivado de un compuesto de fórmula (I)

30 que, cuando se administra a un sujeto, es capaz de proporcionar, directa o indirectamente, un compuesto de fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en dicho sujeto. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que

aumenta la biodisponibilidad del compuesto de fórmula (I) cuando se administra a un sujeto (por ejemplo, haciendo que un compuesto de fórmula (I) administrado por vía oral se absorba más fácilmente por la sangre), o que potencia la liberación de un compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico (por ejemplo, el cerebro o el sistema linfático) con relación al compuesto original (sin derivatizar). La naturaleza de dicho derivado no es crítica, siempre y cuando pueda ser administrado a un sujeto y proporcione un compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico de dicho sujeto. Tales derivados serán evidentes para los técnicos en la materia, e incluyen, dependiendo de los grupos funcionales presentes en la molécula y sin limitación, los siguientes derivados de los compuestos presentes: ésteres, ésteres de aminoácido, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, carbamatos y amidas.

La preparación de dichos profármacos puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. Dichos métodos se elegirán en función de la derivatización a introducir en el compuesto de fórmula (I). Ejemplos ilustrativos de algunos métodos para producir profármacos de compuestos activos pueden encontrarse, por ejemplo, en Krogsgaard-Larsen *et al.* "Textbook of Drug design and Discovery" Taylor & Francis (April 2002). En una realización particular, dicho profármaco es una amida y su obtención se lleva a cabo por métodos convencionales de formación de amidas, por ejemplo, haciendo reaccionar el compuesto de fórmula (I) como base libre con un ácido orgánico o con un derivado de ácido orgánico apropiado, por ejemplo, con un ácido orgánico farmacéuticamente aceptable tal como acético, adípico, aspártico, bencenosulfónico, benzoico, cítrico, etanosulfónico, fórmico, fumárico, glutámico, láctico, maleico, málico, malónico, mandélico, metanosulfónico, 1,5-naftalenodisulfónico, oxálico, piválico, propiónico, p-toluenosulfónico, succínico, tartárico y similares.

Los compuestos de fórmula (I), o sus sales, pueden estar en forma cristalina bien como compuestos libres o bien como solvatos, estando ambas formas incluidas dentro del ámbito de la presente invención. El término "solvato" tal como aquí se utiliza incluye cualquier compuesto formado por combinación de moléculas de un disolvente con moléculas o iones de un compuesto de fórmula (I) o de una sal del mismo; dicho disolvente puede ser un disolvente orgánico, por ejemplo, un alcohol, o

un disolvente acuoso, por ejemplo, agua, en cuyo caso el solvato se denomina "hidrato".

5 En una realización particular, dicho solvato es un solvato farmacéuticamente aceptable, es decir, que puede ser administrado a un sujeto y proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo. En otra realización particular, dicho solvato no es farmacéuticamente aceptable pero puede utilizarse en la preparación de solvatos farmacéuticamente aceptables del compuesto de fórmula (I) o de sus sales.

10 La preparación de dichos solvatos puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia, poniendo en contacto el compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo con el disolvente apropiado.

15 En una realización particular, los compuestos de fórmula (I) o sus sales, profármacos o solvatos, estarán, preferentemente, en una forma pura o farmacéuticamente aceptable. Una forma farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo materiales considerados tóxicos a los niveles normales de dosificación. El nivel de pureza de los compuestos será preferentemente superior al 50%, más preferentemente igual o superior al 70%, aún más preferentemente igual o superior al 90%. En una realización preferida, la pureza del compuesto de fórmula (I), o sus sales, profármacos o solvatos, será superior al 95%.

20 Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I) descrita anteriormente pueden incluir enantiómeros dependiendo de la presencia de centros quirales o isómeros geométricos, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo Z, E). Los isómeros geométricos, enantiómeros o diastereoisómeros de los compuestos de fórmula (I) y mezclas de los mismos se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

25 En otra realización particular, los compuestos sujetos a esta invención dan composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden los compuestos de fórmula I con un portador farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, composición farmacéutica que incluye uno o más compuestos de fórmula I, solos o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales como una mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables.

El término “excipiente farmacéuticamente aceptable” significa uno o más sólidos, o líquidos compatibles, diluyentes o sustancias de encapsulación que sean susceptibles de ser administradas a un sujeto.

En una realización particular preferida, la invención se refiere a compuestos de fórmula (I) en los que:

R es hidrógeno;

R₁ se selecciona del grupo que comprende un alquilo opcionalmente sustituido por uno o dos grupos seleccionados independientemente entre flúor, cloro, y bromo; alcoxilo(C₁-C₆), nitro y amino. Preferentemente R es metilo;

R₂ se selecciona del grupo que comprende un anillo aromático fenilo opcionalmente sustituido por uno, dos o tres grupos seleccionados independientemente entre flúor, cloro, alquilo(C₁-C₆), opcionalmente sustituido por uno, dos, o tres átomos de halógeno seleccionado entre flúor, cloro y bromo; alcoxilo(C₁-C₆), ciano y nitro; o un heterociclo opcionalmente sustituido por uno, dos o tres grupos seleccionados independientemente entre flúor, cloro, alquilo(C₁-C₆), alcoxilo y nitro;

R₃ es hidrógeno;

R₄ es hidrógeno;

R₅ y R₆ forman conjuntamente un grupo-(CH₂)_n;

n es un entero seleccionado entre 1, 2, 3, 4, 5 y 6, preferentemente n = 4;

X es nitrógeno;

Y es oxígeno;

Z es nitrógeno;

y sus sales, profármacos o solvatos, preferentemente, sus sales farmacéuticamente aceptables.

Compuestos de fórmula (I) particularmente preferidos de la presente invención son los siguientes:

- 3-metil-4-fenil-1,4,6,7,8,9-hexahidropirazolo[4',3':5,6]pirano[2,3-*b*]quinolin-5-amina.
- 3-metil-4-(4-metoxifenil)-1,4,6,7,8,9-hexahidropirazolo[4',3':5,6]pirano[2,3-*b*]quinolin-5-amina.

- 3-metil-4-(2-metoxifenil)-1,4,6,7,8,9-hexahidropirazolo[4',3':5,6]pirano[2,3-*b*]quinolin-5-amina.
- 3-metil-4-(4-nitrofenil)-1,4,6,7,8,9-hexahidropirazolo[4',3':5,6]pirano[2,3-*b*]quinolin-5-amina.
- 5 • 3-metil-4-(2-nitrofenil)-1,4,6,7,8,9-hexahidropirazolo[4',3':5,6]pirano[2,3-*b*]quinolin-5-amina.

Los compuestos de fórmula (I) de la presente invención presentan actividad inhibidora de la enzima GSK3 β , a la vez que actividad inhibidora selectiva de AChE y actividad inductora del factor Nrf2, por lo que pueden ser utilizados en la prevención o terapia de enfermedades neurodegenerativas, ej., la EA, la esclerosis lateral amiotrófica, el parkinsonismo postencefálico, la parálisis supranuclear progresiva, la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, la enfermedad de Hallervorden-Spatz, la enfermedad Creutzfeldt-Jacob, el síndrome de Down, la enfermedad de Niemann-Pick y la enfermedad de Pick y/o en el tratamiento de otras enfermedades neurodegenerativas en las que se produce pérdida de neuronas, como es el caso del accidente cerebrovascular (ictus).

Para su administración a un sujeto en necesidad de tratamiento, los compuestos de fórmula (I) de la presente invención se administran convenientemente formulados con los excipientes adecuados para su administración por cualquier vía apropiada, por ejemplo, por vía oral, parenteral, subcutánea, intramuscular, intravascular o rectal, preferentemente por vía oral.

Por tanto, en otros aspectos, la invención incluye una composición farmacéutica, en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención se presenta en una forma farmacéutica de administración por vía oral, bien en forma sólida o líquida. Ejemplos ilustrativos de formas farmacéuticas de administración por vía oral incluyen comprimidos, cápsulas, granulados, soluciones, suspensiones, etc., para lo cual incluirán los excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados, tales

como aglutinantes, diluyentes, desintegrantes, lubricantes, humectantes, etc., y pueden ser preparadas por métodos convencionales. La composición farmacéutica de la invención también puede ser adaptada para su administración parenteral (ej., vía intramuscular, intravenosa, etc.), en forma de, por ejemplo, soluciones, suspensiones o productos liofilizados, estériles, en la forma de dosificación apropiada; en este caso, dichas composiciones farmacéuticas incluirán los excipientes adecuados, tales como tampones, tensioactivos, etc. La composición farmacéutica de la invención también puede ser adaptada para su administración subcutánea en forma de, por ejemplo, soluciones o suspensiones estériles, en la forma de dosificación apropiada; en este caso, dichas composiciones farmacéuticas incluirán los excipientes adecuados, tales como tampones, tensioactivos, etc. Asimismo, la composición farmacéutica de la invención puede ser adaptada para su administración por vía rectal para lo cual incluirá los excipientes adecuados compatibles con los compuestos de fórmula (I) de la invención. Las formulaciones se pueden preparar según métodos convencionales tales como los que se describen en las farmacopeas Española, Europea o de Estados Unidos de América, o en textos de referencia similares, por ejemplo “Tratado de Farmacia Galénica”, de C. Faulí i Trillo, 10 Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

El compuesto de fórmula (I) de la invención se administrará en una cantidad terapéuticamente efectiva que generalmente dependerá de la eficacia del compuesto de fórmula (I) elegido, de la gravedad de la patología a tratar, etc. No obstante, típicamente se administrará a dosis diarias comprendidas entre 0,1 y 100 mg de compuesto de fórmula (I) por kg de peso corporal, más preferentemente las dosis diarias estarán comprendidas entre 2 y 5 mg/kg peso corporal.

En otro aspecto, la invención protege el uso de un compuesto de fórmula (I), sus sales, profármacos o solvatos, farmacéuticamente aceptables, en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, tal como la EA, y/o de una enfermedad isquémico-cerebral (ictus).

Las enfermedades neurodegenerativas son aquellas, a menudo de causa desconocida, en las que tiene lugar la degeneración progresiva del sistema nervioso en alguna de sus partes o en su totalidad. Para una descripción detallada de las mismas véase, por ejemplo, la monografía “Enfermedades Neurodegenerativas”

Coordinadores José M^a Segovia de Arana y Francisco Mora Teruel, editada por Serie Científica Farmaindustria, Madrid, Julio 2002.

Las enfermedades isquémico-cerebrales constituyen una patología aguda, que tiene lugar como consecuencia de la interrupción del suministro de sangre a una parte del cerebro, o cuando sucede la rotura de un vaso sanguíneo con la consiguiente hemorragia cerebral. Aunque estas enfermedades no están incluidas en el grupo de enfermedades neurodegenerativas, hay que tener en cuenta que, secundariamente a un accidente isquémico-cerebral, también se produce la neurodegeneración en aquellas áreas afectadas. De aquí la utilidad del tratamiento de estas enfermedades con los compuestos de la invención.

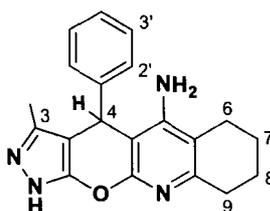
La administración de los compuestos de fórmula (I) de la invención, sus sales, profármacos o solvatos, farmacéuticamente aceptables, se puede llevar a cabo en solitario o en combinación con fármacos adicionales, tales como fármacos útiles para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa o de una enfermedad isquémico-cerebral, para proporcionar una terapia combinada; dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica de la invención que comprende el compuesto de fórmula (I) y/o sus sales, profármacos o solvatos farmacéuticamente aceptables, o no, en cuyo caso, se administrarán de forma simultánea o secuencial a la administración de la composición farmacéutica de la invención. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos fármacos adicionales que pueden emplearse para proporcionar una terapia de combinación incluyen agentes tales como la memantina (un bloqueante del receptor de glutamato tipo NMDA aprobado para su uso en las fases avanzadas de la enfermedad de Alzheimer), vitaminas, antiinflamatorios o antidepresivos.

MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

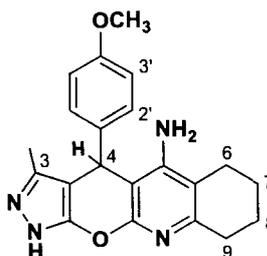
Los compuestos cuya actividad biológica es objeto de la presente invención se sintetizaron siguiendo los siguientes procedimientos en síntesis orgánica (Khoobi y col., 2015, *Eur J Med Chem*, 89: 296-303).

5 **Ejemplo 1: 3-metil-4-fenil-1,4,6,7,8,9-hexahidropirazolo[4',3':5,6]pirano[2,3-b]quinolin-5-amina (Compuesto 1)**



10 Siguiendo el procedimiento descrito, 6-amino-3-metil-4-fenil-1,4-dihidropirano[2,3-*c*]pirazol-5-carbonitrilo (106 mg, 0,42 mmol), AlCl₃ (55,5 mg, 0,42 mmol), ciclohexanona (52,6 mg, 0,53 mmol) en 1,2-DCE (10 mL). Tiempo de reacción: 24 h. Cromatografía flash DCM/MeOH (0-4 %), para obtener el **compuesto 1** como un sólido blanco (139,5 mg, 94,2 %). Rf: 0,23 (DCM-MeOH 10 %). IR (KBr) ν 3493, 3416, 3209, 3165, 3132, 3096, 3056, 2939, 2862, 1622, 1593, 1582, 1499, 1438, 1421, 1302, 1224, 1102, 851, 768, 729, 702 cm⁻¹. RMN de ¹H (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ_{H} 11,83 (1H, s_{br}, NH), 7,26-7,09 (5H, m, Ph), 5,30 (2H, s_{br}, NH₂), 5,17 (1H, s, 4-H), 2,62-2,53 (2H, m, 6-H ó 9-H), 2,35-2,13 (2H, m, 6-H ó 9-H), 1,98 (3H, s, CH₃), 1,77-1,63 (4H, m, 7-H, 8-H). RMN de ¹³C (DMSO-*d*₆, 75 MHz) 156,4, 155,7, 152,3, 152,0, 145,0, 134,7, 128,3, 127,3, 126,2, 111,9, 99,8, 98,4, 34,2, 32,0, 22,9, 22,3, 22,1, 9,8. EM (API-ES+) m/z: cal. para C₂₀H₂₀N₄O: 332,1637; encontrada: [(M+H)⁺] 333,1725. Anal. Cal. para C₂₀H₂₀N₄O: C: 72,27 %; H: 6,06 %; N: 16,86 %; encontrado: C: 72,35 %; H: 6,21 %; N: 16,80 %.

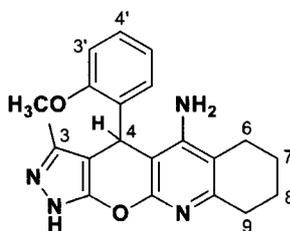
20 **Ejemplo 2: 4-(4-metoxifenil)-3-metil-1,4,6,7,8,9-hexahidropirazolo[4',3':5,6]pirano[2,3-b]quinolin-5-amina (Compuesto 2)**



Siguiendo el procedimiento descrito, 6-amino-4-(4-metoxifenil)-3-metil-1,4-dihidropirano[2,3-*c*]pirazol-5-carbonitrilo (100 mg, 0,35 mmol), AlCl₃ (56,9 mg, 0,43 mmol), ciclohexanona (52,5 mg, 0,53 mmol) en 1,2-DCE (10 mL). Tiempo de reacción: 24 h. Cromatografía flash DCM/MeOH (0-4,5 %), para obtener el

5 **compuesto 2** como un sólido blanco (74,0 mg, 57,7 %). Rf: 0,41 (DCM-MeOH 10 %) (Khoobi y col., **2015**, *Eur J Med Chem*, 89: 296-303). Anal. Cal. para C₂₁H₂₂N₄O₂: C: 69,59 %; H: 6,12 %; N: 15,46 %; encontrado: C: 69,46 %; H: 5,91 %; N: 15,12 %.

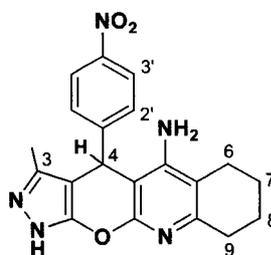
Ejemplo 3: **4-(2-metoxifenil)-3-metil-1,4,6,7,8,9-hexahidropirazolo[4',3':5,6]pirano[2,3-*b*]quinolin-5-amina (Compuesto 3)**



Siguiendo el procedimiento descrito, 6-amino-4-(2-metoxifenil)-3-metil-1,4-dihidropirano[2,3-*c*]pirazol-5-carbonitrilo (100 mg, 0,35 mmol), AlCl₃ (56,9 mg, 0,43 mmol), ciclohexanona (52,5 mg, 0,53 mmol) en 1,2-DCE (10 mL). Tiempo de reacción: 24 h. Cromatografía flash DCM/MeOH (0-4,5 %), para obtener el

15 **compuesto 3** como un sólido blanco (71,3 mg, 55,6 %) (Khoobi y col., **2015**, *Eur J Med Chem*, 89: 296-303). Anal. Cal. para C₂₁H₂₂N₄O₂: C: 69,59 %; H: 6,12 %; N: 15,46 %; encontrado: C: 69,50 %; H: 6,16 %; N: 15,29 %.

Ejemplo 4: **3-metil-4-(4-nitrofenil)-1,4,6,7,8,9-hexahidropirazolo[4',3':5,6]pirano[2,3-*b*]quinolin-5-amina (Compuesto 4)**

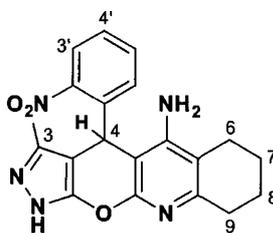


Siguiendo el procedimiento descrito, 6-amino-3-metil-4-(4-nitrofenil)-1,4-dihidropirano[2,3-*c*]pirazol-5-carbonitrilo (100 mg, 0,34 mmol), AlCl₃ (54,0 mg, 0,41 mmol), ciclohexanona (49,8 mg, 0,51 mmol) en 1,2-DCE (10 mL). Tiempo de

20

reacción: 24 h. Cromatografía flash DCM/MeOH (0-4,5 %), para obtener el **compuesto 4** como un sólido amarillo pálido (114,0 mg, 89,9 %). Rf: 0,21 (DCM-MeOH 10 %). IR (KBr) ν 3504, 3413, 3212, 3166, 3135, 3101, 3008, 2937, 2836, 1624, 1594, 1583, 1519, 1499, 1441, 1433, 1434, 1417, 1377, 1346, 1301, 1227, 1102, 837, 829, 732 cm^{-1} . RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ_{H} 11,94 (1H, s_{br}, NH), 8,13-8,11 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, 3'-H, 5'-H), 7,50 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, 2'-H, 6'-H), 5,48 (2H, s_{br}, NH₂), 5,44 (1H, s, 4-H), 2,61-2,53 (2H, m, 6-H ó 9-H), 2,38-2,10 (2H, m, 6-H ó 9-H), 2,00 (3H, s, CH₃), 1,74-1,63 (4H, m, 7-H, 8-H). RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz) 156,3, 155,5, 152,7, 152,6, 152,1, 145,9, 135,0, 128,5, 123,7, 112,6, 98,6, 97,5, 33,8, 32,0, 22,9, 22,3, 22,0, 9,7. EM (API-ES+) m/z: cal. para C₂₀H₁₉N₅O₃: 377,1488; encontrada: [(M+H)⁺] 378,1578. Anal. Cal. para C₂₀H₁₉N₅O₃: C: 63,65 %; H: 5,07 %; N: 18,56 %; encontrado: C: 63,50 %; H: 5,16 %; N: 18,29 %.

Ejemplo 5: 3-metil-4-(2-nitrofenil)-1,4,6,7,8,9-hexahidropirazolo[4',3':5,6]pirano[2,3-b]quinolin-5-amina (Compuesto 5)



15 Siguiendo el procedimiento descrito, 6-amino-3-metil-4-(2-nitrofenil)-1,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrilo (200 mg, 0,67 mmol), AlCl₃ (108 mg, 0,81 mmol), ciclohexanona (99,4 mg, 1,01 mmol) en 1,2-DCE (12 mL). Tiempo de reacción: 24 h. Cromatografía flash DCM/MeOH (0-4,5 %), para obtener el **compuesto 5** como un sólido amarillo pálido (175,9 mg, 69,3 %). Rf: 0,31 (DCM-MeOH 10 %). IR (KBr) ν 3474, 3387, 3251, 3212, 3168, 3099, 2931, 2862, 1643, 1592, 1578, 1524, 1500, 1444, 1380, 1303, 1228, 1105, 864, 785, 731 cm^{-1} . RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ_{H} 11,97 (1H, s_{br}, NH), 7,88 (1H, d, $J = 8,1$ Hz, 3'-H), 7,57 (1H, t, $J = 7,6$ Hz, 5'-H), 7,43 (1H, t, $J = 7,7$ Hz, 4'-H), 7,12 (1H, d, $J = 7,9$ Hz, 6'-H), 5,59 (1H, s, 4-H), 5,52 (2H, s_{br}, NH₂), 2,63-2,57 (2H, m, 6-H ó 9-H), 2,39-2,15 (2H, m, 6-H ó 9-H), 1,82 (3H, s, CH₃), 1,75-1,66 (4H, m, 7-H, 8-H). RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz) 155,9, 155,7, 153,1, 152,1, 148,4, 138,1, 135,1, 134,2, 130,7, 128,1,

123,7, 112,2, 98,4, 96,7, 32,0, 29,6, 22,8, 22,2, 22,0, 9,2. EM (API-ES+) m/z: cal. para $C_{20}H_{19}N_5O_3$: 377,1488; encontrada: $[(M+H)^+]$ 378,1522. Anal. Cal. para $C_{20}H_{19}N_5O_3$: C: 63,65 %; H: 5,07 %; N: 18,56 %; encontrado: C: 63,28 %; H: 4,99 %; N: 18,13 %.

5

1. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS ESTUDIADAS EN LOS COMPUESTOS DE LA INVENCIÓN.

Ejemplo 6

Medida de la actividad inhibitoria de la enzima GSK3 β

10

La capacidad inhibidora de GSK3 β de los compuestos se determinó con el método de luminiscencia ADP-GloTM. Los compuestos se estudiaron a cuatro concentraciones (0,1, 1, 3 y 10 μ M) para obtener curvas de inhibición y calcular sus valores de CI_{50} . Como compuesto de referencia se empleó el inhibidor de GSK3 β SB216763. Los productos se disolvieron en tampón Tris (40 mM, pH 7,5) suplementado con MgCl₂ (20 mM), BSA (0,1 mg/mL) y ditioneitol (DTT, 50 μ M). En cada placa se incluyó un blanco y un control, correspondiente a la actividad de la enzima en ausencia de inhibidor.

15

Tabla 1

20

Inhibición de la enzima GSK3 β por los compuestos de la invención, y el compuesto de referencia SB216763. Los datos se muestran como la media \pm E.E. de al menos tres experimentos por duplicado a cuatro concentraciones distintas.

Compuesto	R ₂	CI ₅₀ (μ M)
SB216763	-	0,09 \pm 0,01
1	Ph	2,49 \pm 0,2
2	<i>p</i> -OMe-Ph	7,72 \pm 0,3
3	<i>o</i> -OMe-Ph	6,35 \pm 0,2
4	<i>p</i> -NO ₂ -Ph	5,65 \pm 0,3
5	<i>o</i> -NO ₂ -Ph	4,84 \pm 0,4

25

En cada pocillo se añadieron 10 μ L de GSK3 β (1,25 ng/ μ L) y 5 μ L de compuesto a la concentración deseada. Transcurridos 30 min, se adicionaron 5 μ L del sustrato peptídico de GSK3 β (1 ng/ μ L), y 5 μ L de ATP (125 μ M). Tras 1 hora, se midió la cantidad de ADP producido siguiendo las instrucciones del kit de medida. La

actividad enzimática se calculó refiriendo la luminiscencia medida a la detectada en ausencia de inhibidor. La concentración de compuesto que produce el 50 % de inhibición de la actividad GSK3 β (CI₅₀) fue calculada por extrapolación de la curva de actividad. Los resultados de la inhibición de GSK3 β (CI₅₀, μ M) se muestran en la

5 tabla 1.

Ejemplo 7

Medida de la actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa (AChE y BuChE)

10 Para estudiar la capacidad inhibidora de las enzimas AChE y BuChE de los compuestos objeto de la invención se empleó el método de Ellman (Ellman y col., 1961, *Biochem Pharmacol*, 7: 88-95). Los compuestos fueron estudiados a seis (0,1, 0,3, 1, 3, 10 y 30 μ M) y cinco (3, 10, 30, 100 300 μ M) concentraciones para AChE y

15 BuChE, respectivamente, para obtener curvas de inhibición que permitieran calcular sus valores de CI₅₀. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente, con los compuestos disueltos en tampón PBS (0,1 M, pH 8). En cada placa se incluyó un blanco y una variable control positivo (tacrina). Los compuestos fueron incubados a cada una de las concentraciones deseadas con la enzima correspondiente (0,09 U/mL)

20 y con el ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB, 0,35 mM) durante 10 min. Transcurrido ese tiempo, se añadió el sustrato correspondiente de la enzima, yoduro de acetiltiocolina (AThChI, 0,35 mM) o yoduro de butiriltiocolina (BuThChI, 0,35 mM), con un volumen final de 1 mL, y se incubó durante 15 min. La absorbancia fue medida mediante el lector multipocillo FluoStar Optima (BMG Labtech) a 420 nM. A

25 partir de las actividades enzimáticas encontradas para cada una de las concentraciones de compuesto, se calcularon sus valores de CI₅₀ para AChE y BuChE, mediante un ajuste no lineal. Los resultados de inhibición de ambas enzimas se muestran en la

30 tabla 2.

Tabla 2

Inhibición de las enzimas AChE y BuChE por los compuestos de la invención, y el compuesto de referencia tacrina. Los datos se muestran como la media \pm E.E. de al menos tres experimentos por triplicado a seis (AChE) y cinco (BuChE) concentraciones distintas.

5

Compuesto	R ₂	AChE, CI ₅₀ (μ M)	BuChE, CI ₅₀ (μ M)	BuChE/AChE
Tacrina	-	0,18	0,04	0,20
1	Ph	0,7 \pm 0,1	80,4 \pm 23,2	20
2	<i>p</i> -OMe-Ph	0,5 \pm 0,1	>300	>600
3	<i>o</i> -OMe-Ph	8,1 \pm 0,9	>300	>37
4	<i>p</i> -NO ₂ -Ph	1,2 \pm 0,1	60,0 \pm 10,2	50,8
5	<i>o</i> -NO ₂ -Ph	1,5 \pm 0,1	68,7 \pm 14,6	45,2

Ejemplo 8

10 Medida de la inducción de la vía Nrf2-ARE mediante la medida de la actividad Luciferasa en células MCF7 transfectadas de forma estable con el plásmido ARE-LUC (AREc32).

15 Para el estudio de inducción del factor de transcripción Nrf2 se utilizó la línea celular AREc32 que está transfectada de forma estable con el gen reportero luciferasa unido a la secuencia ARE. En presencia de electrófilos o estrés oxidativo, el factor Nrf2 se transloca al núcleo y se une a las secuencias ARE, activando la expresión de luciferasa, formándose una cantidad proporcional de la misma. Las células AREc32 se cultivaron en medio DMEM con glutamax, suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SBF), 1% de penicilina-estreptomicina y 1,6 % de geneticina (G418)

20 (reactivos de GIBCO, Madrid, España). Las células se cultivaron en frascos de 75 cm² con 11 mL del medio específico, se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ y se hicieron pases 1:4 cada 4-6 días cuando las células llegaron al 80% de confluencia. Para los experimentos, las células se cultivaron en placas de 96 pocillos con fondo transparente, a una densidad de 60x10⁴ células/pocillo con 100 μ L/pocillo. Tras 24 h

25 de cultivo, las células se trataron con los compuestos objeto de la invención a las concentraciones deseadas (1, 10, 30 y 60 μ M) durante 24 h y se incubaron a 37°C y 5% CO₂. En cada placa se incluyó una variable basal, una variable con tert-butil

hidroquinona (TBHQ, 10 μ M, control positivo) y las variables problema, en un volumen final de 100 μ L. Tras 24 h de incubación con los compuestos objeto de estudio, se midió la actividad de luciferasa mediante un ensayo de bioluminiscencia, para lo que se usó el kit “Luciferase assay system” (Promega E1500). Tras el periodo de incubación, los tratamientos fueron retirados y las células se lavaron con 100 μ L de PBS 0,1 M. Una vez retirado el lavado, se añadieron 20 μ L del reactivo “lysis buffer” a cada uno de los pocillos. Tras 10 min, la placa se introdujo en un lector multipocillo de luminiscencia, FluoStar optima (BMG Labtech).

5

Tabla 3

Inducción del factor de transcripción Nrf2 por los compuestos de la invención, y el compuesto de referencia TBHQ. Los datos se muestran como la media \pm E.E. de al menos tres experimentos por duplicado a cuatro concentraciones distintas.

Compuesto	R ₂	Actividad de Luciferasa relativa (respuesta respecto a basal)				
		Concentraciones	1 μ M	3 μ M	6 μ M	8 μ M
TBHQ			2,19 \pm 0,1**	3,83 \pm 0,3***	6,10 \pm 0,1***	
		Concentraciones	1 μ M	10 μ M	30 μ M	60 μ M
1	Ph		1,11 \pm 0,05	1,25 \pm 0,06	1,58 \pm 0,10***	2,35 \pm 0,13***
2	<i>p</i> -MeO-Ph		1,03 \pm 0,05	1,14 \pm 0,07	1,46 \pm 0,11**	1,60 \pm 0,15***
3	<i>o</i> -MeO-Ph		1,12 \pm 0,04	1,11 \pm 0,03	1,21 \pm 0,04*	1,50 \pm 0,10***
4	<i>p</i> -NO ₂ -Ph		1,00 \pm 0,05	1,27 \pm 0,03	2,51 \pm 0,39***	3,26 \pm 0,41***
5	<i>o</i> -NO ₂ -Ph		1,06 \pm 0,06	1,10 \pm 0,07	1,18 \pm 0,06	1,36 \pm 0,13*

15

La medida de luminiscencia en unidades arbitrarias es directamente proporcional a la cantidad de luciferasa en cada uno de los pocillos y ésta, directamente proporcional a la inducción del factor Nrf2 por cada uno de los productos objeto de estudio a la concentración establecida. Las medidas se realizaron por duplicado y los valores fueron normalizados respecto a la luminiscencia de la basal tomando su valor de expresión de luciferasa como 1.

20

Los resultados de inducción del factor Nrf2 obtenidos para los compuestos objeto de la invención descritos como ejemplos 1 a 5 se muestran en la Tabla 3,

expresados como inducción, tomando como valor 1 los valores de las células no tratadas.

5

Ejemplo 9

Estudio de la capacidad neuroprotectora de los compuestos objeto de la invención frente a modelos de toxicidad inducida por estrés oxidativo

Cultivo de células de neuroblastoma SH-SY5Y

10

Las células SH-SY5Y [ECACC 94030304], procedentes de pases entre el 5 y el 16 tras su descongelación, se mantuvieron en un medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) conteniendo 15 aminoácidos no esenciales y suplementado con suero bovino fetal al 10%, glutamina 1 mM, 50 unidades/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina (reactivos de GIBCO, Madrid, España). Las células se sembraron en recipientes que contenían medio suplementado y se mantuvieron en un incubador a 37°C en atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ haciendo pases 1:4 dos veces por semana. Para los experimentos, las células se cultivaron en placas de 48 pocillos a una densidad de 1x10⁵ células/pocillo. Para los experimentos de citotoxicidad las células se trataron con los fármacos antes de llegar a confluencia, en DMEM con 1% de suero fetal bovino.

15

20

Medida de la viabilidad celular: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, MTT

25

El parámetro que se usó para medir la viabilidad celular fue la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT). La técnica MTT consiste en una medida indirecta de la viabilidad celular. Este proceso es realizado por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de células metabólicamente activas, la cual transforma al MTT de un compuesto hidrofílico de color amarillo (sal de tetrazolio) a un compuesto violáceo, hidrofóbico (sal de formazán). La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán formada (Mosmann, 1983, *J Immunol Methods*, 65: 55-63). Las células apoptóticas tienen sus mitocondrias dañadas y no realizarán el proceso. Por lo tanto, este método permite medir supervivencia y proliferación celular, así como determinar la citotoxicidad de potenciales agentes terapéuticos. Para determinar la viabilidad celular

30

en células SH-SY5Y, se añaden 30 μ l/pocillo de MTT (5 mg/mL) y, tras 2 h, el medio es retirado sin perder los cristales de formazán, que se disuelven en 300 μ L de DMSO. Posteriormente, las muestras son transferidas a una placa de 96 pocillos para medir la absorbancia de las muestras a 570 nm. Todos los ensayos de MTT se realizaron por triplicado. Se cuantifica espectrofotométricamente con el lector de absorbancia/fluorescencia FluoStar optima[®]. Los valores de absorbancia obtenidos con el tóxico solo y con cada compuesto en presencia del tóxico se restaron del valor de absorbancia obtenido en condiciones basales, sin tratamiento. El valor obtenido de la resta de los valores de absorbancia basal menos tóxico sólo, se consideró el 100 % de muerte y los valores obtenidos con los compuestos en presencia de tóxico se normalizaron como porcentajes de dicho valor. Para calcular el porcentaje de supervivencia, se restaron estos valores a 100.

Neuroprotección ejercida por los compuestos objeto de esta invención 1-5: La inhibición de la enzima GSK3 β combinada con la inhibición de la enzima AChE y la activación de la *vía* Nrf2-ARE por los compuestos ejerce un efecto neuroprotector frente a modelos de estrés oxidativo, debido a la expresión de diversos genes citoprotectores. Por tanto, estudiamos la capacidad neuroprotectora de los compuestos objeto de esta patente en modelos *in vitro* de citotoxicidad inducida por estrés oxidativo. Se evaluó el efecto neuroprotector de los compuestos en células de neuroblastoma humano, frente a estrés oxidativo producido por rotenona y oligomicina A, bloqueantes de la cadena respiratoria de la mitocondria según se describe en Halliwell y col. 1992 (Halliwell, 1992, *J Neurochem*, 59: 1609-23, Newhouse y col., 2004, *Toxicol Sci*, 79: 137-46), realizando dos protocolos diferenciados:

Neuroprotección frente a estrés oxidativo inducido por la combinación de rotenona (30 μ M) y oligomicina A (10 μ M):

30

a. **Ejemplo 9a:** Protocolo de Pre-incubación:

Este diseño se plantea para estudiar en detalle el potencial efecto inductor de Nrf2 de los compuestos durante el periodo de pre-incubación. En este protocolo, las células fueron pre-incubadas con cada uno de los derivados estudiados a la concentración 1 μM durante 24 h. Tras el periodo de pre-incubación, el medio se retiró y fue sustituido por medio de cultivo con la mezcla de tóxicos rotenona/oligomicina-A, a las concentraciones de 30 μM y 10 μM respectivamente.

En todos los ensayos farmacológicos se utilizó un control positivo con fines comparativos y para evaluar la bondad del método empleado. Para ello se utilizó melatonina (1 μM) que ha demostrado capacidad neuroprotectora en diversos modelos de estrés oxidativo, incluido el modelo de rotenona/oligomicina A.

Los resultados obtenidos para los compuestos descritos como compuestos 1 a 5 se muestran en la Tabla 4, y vienen expresados en porcentaje de supervivencia celular y en porcentaje de la actividad neuroprotectora.

Tabla 4
Porcentaje de protección neuronal producido por los compuestos de la invención y melatonina, a la concentración de 1 μM . Los datos se expresan como la media \pm E.E. de al menos tres experimentos por triplicado, realizados con tres lotes distintos de células.

Compuesto	R ₂	Rot/Olig (30/10) Pre-incubación	
		% Supervivencia	% Protección
Basal		100	
Rote/Olig		53,14 \pm 1,49	
Melatonina		64,23 \pm 1,79	23,67 \pm 2,73**
1	Ph	67,44 \pm 1,89	21,70 \pm 1,62**
2	<i>p</i> -MeO-Ph	68,33 \pm 1,95	23,81 \pm 1,99**
3	<i>o</i> -MeO-Ph	70,26 \pm 2,66	29,74 \pm 3,57***
4	<i>p</i> -NO ₂ -Ph	72,23 \pm 2,3	34,23 \pm 3,12***
5	<i>o</i> -NO ₂ -Ph	68,48 \pm 2,79	24,70 \pm 4,39**

b. **Ejemplo 9b:** Protocolo de Pre- y Co-incubación:

En este modelo, se realizó una pre-incubación de 24 h con los compuestos sintetizados a una concentración de 1 μ M y una co-incubación de 24 h de éstos en presencia rotenona/oligomicina A (30 μ M/10 μ M). Transcurridas 24h, la viabilidad celular fue evaluada por el método de la reducción de MTT. Con este protocolo se obtiene información sobre todas las potenciales actividades biológicas presentes en la estructura objeto de estudio.

Tabla 5

Porcentaje de protección neuronal producido por los compuestos de la invención y melatonina, a la concentración de 1 μ M. Los datos se expresan como la media \pm E.E. de al menos tres experimentos por triplicado, realizados con tres lotes distintos de células.

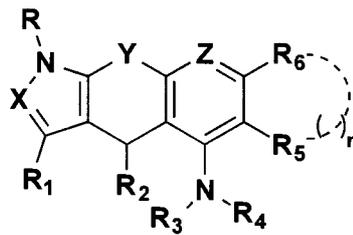
Compuesto	R	Rot/Olig (30/10) Pre y co-incubación	
		% Supervivencia	% Protección
Basal		100	
Rote/Olig		59,39 \pm 1,33	
Melatonina		69,88 \pm 1,75	27,41 \pm 3,21 ^{***}
1	Ph	72,39 \pm 2,26	34,81 \pm 2,90 ^{***}
2	<i>p</i> -MeO-Ph	68,28 \pm 2,55	25,40 \pm 2,57 ^{**}
3	<i>o</i> -MeO-Ph	68,17 \pm 1,99	24,33 \pm 1,90 ^{**}
4	<i>p</i> -NO ₂ -Ph	69,49 \pm 2,02	26,48 \pm 3,49 ^{***}
5	<i>o</i> -NO ₂ -Ph	71,98 \pm 2,28	30,76 \pm 1,67 ^{***}

En este protocolo, al estar presente el compuesto durante las 24 horas previas a la incubación del tóxico, el compuesto es capaz de mostrar su capacidad inductora del factor Nrf2 favoreciendo así la supervivencia celular. Además, también está presente a la vez que exponemos las células al estímulo tóxico, la mezcla de rotenona/oligomicina A que provoca la aparición de una gran cantidad de radicales libres en el interior celular. Estos radicales dañan la célula e inducen la apoptosis celular. Los porcentajes de supervivencia y protección se resumen en la Tabla 5.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula (I) con los sustituyentes especificados como inhibidor dual de las enzimas GSK3 β y AChE

5



(I)

donde

10

R y R₁ se selecciona del grupo consistente en:

- Un átomo de hidrógeno;
- Alquilo opcionalmente sustituido por uno, dos, o tres átomos de halógeno seleccionado entre flúor, cloro y bromo; cicloalquilo(C₃-C₆); alcoxilo(C₁-C₆); cicloalcoxilo(C₃-C₆); ciano y nitro; o bien dos grupos pueden formar conjuntamente un grupo -O(CH₂)_mO-, -(CH₂)_p-, o -CH=CH-CH=CH-;
- fenilo opcionalmente sustituido por uno, dos o tres grupos seleccionados independientemente entre flúor; cloro; bromo; alquilo opcionalmente sustituido por uno, dos, o tres átomos de halógeno seleccionado entre flúor, cloro y bromo; cicloalquilo(C₃-C₆); alcoxilo(C₁-C₆); cicloalcoxilo(C₃-C₆); ciano y nitro; o bien dos grupos pueden formar conjuntamente un grupo -O(CH₂)_mO-, -(CH₂)_p-, o -CH=CH-CH=CH-; y/o
- un grupo heteroarilo seleccionado entre 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 3-piridazinilo, 4-piridazinilo, 2-pirimidinilo, 4-pirimidinilo, 5-pirimidinilo, 2-pirazinilo, 3-pirazinilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 3-isotiazolilo, 4-isotiazolilo, 5-isotiazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, 3-pirazolilo, 4-pirazolilo, 1,2,3-oxadiazol-4-ilo, 1,2,3-oxadiazol-5-ilo, 1,2,4-oxadiazol-3-

25

ilo, 1,2,4-oxadiazol-5-ilo, 1,2,5-oxadiazol-3-ilo, 1,3,4-oxadiazol-2-ilo, 1,2,3-tiadiazol-4-ilo, 1,2,3-tiadiazol-5-ilo, 1,2,4-tiadiazol-3-ilo, 1,2,4-tiadiazol-5-ilo, 1,2,5-tiadiazol-3-ilo, 1,3,4-tiadiazol-2-ilo, 1,2,3-triazol-4-ilo, 1,2,4-triazol-3-ilo y 5-tetrazolilo, estando el grupo heteroarilo
 5 opcionalmente sustituido por uno, dos o tres grupos seleccionados independientemente entre flúor, cloro, bromo, alquilo, cicloalquilo(C₃-C₆), alcoxilo(C₁-C₆), cicloalcoxilo(C₃-C₆), ciano y nitro;

R₂ se selecciona del grupo consistente en hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo, opcionalmente sustituido por uno, dos o tres grupos seleccionados
 10 independientemente entre flúor, cloro, bromo, alquilo, alcoxilo, cicloalquilo(C₃-C₆), cicloalcoxilo(C₃-C₆), ciano, nitro y carboxilato o bien dos grupos pueden formar conjuntamente un grupo -O(CH₂)_qO-, -(CH₂)_r-, o -CH=CH-CH=CH-;

R₃ y R₄ se seleccionan del grupo consistente en hidrógeno, alquilo(C₁-C₆), cicloalquilo(C₃-C₆) y fenilo, opcionalmente sustituido por uno, dos o tres grupos
 15 seleccionados independientemente entre flúor, cloro, bromo, alquilo(C₁-C₆), alcoxilo(C₁-C₆), cicloalquilo(C₃-C₆), cicloalcoxilo(C₃-C₆), ciano, nitro y carboxilato;

R₅ y R₆ se selecciona del grupo consistente en hidrógeno, alquilo, cicloalquilo(C₃-C₆), acetilo, fenilo o heteroarilo, opcionalmente sustituido por uno, dos o tres grupos seleccionados independientemente entre flúor, cloro, bromo,
 20 alquilo(C₁-C₆), alcoxilo(C₁-C₆), cicloalquilo(C₃-C₆), cicloalcoxilo(C₃-C₆), ciano y nitro o bien dos grupos pueden formar conjuntamente un grupo cicloalquilo(C₃-C₆) o -(CH₂)_s-, o -CH=CH-CH=CH-;

X se selecciona entre un átomo de carbono o un átomo de nitrógeno;

Y se selecciona entre un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno o un átomo
 25 de azufre, -SO- o SO₂;

Z se selecciona entre un átomo de carbono o un átomo de nitrógeno;

n es un número entero seleccionado entre 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

y sus sales, preferiblemente sales farmacéuticamente aceptables, profármacos o solvatos.

30

2. Uso de un compuesto según la reivindicación 1, en el que

R es hidrógeno;

R₁ se selecciona del grupo que comprende un alquilo opcionalmente sustituido por uno o dos grupos seleccionados independientemente entre flúor, cloro, y bromo; alcoxilo(C₁-C₆), nitro y amino. Preferentemente R₁ es metilo;

5 R₂ se selecciona del grupo que comprende un anillo aromático fenilo opcionalmente sustituido por uno, dos o tres grupos seleccionados independientemente entre flúor, cloro, alquilo(C₁-C₆), opcionalmente sustituido por uno, dos, o tres átomos de halógeno seleccionado entre flúor, cloro y bromo; alcoxilo(C₁-C₆), ciano y nitro; o un heterociclo

10 opcionalmente sustituido por uno, dos o tres grupos seleccionados independientemente entre flúor, cloro, alquilo(C₁-C₆), alcoxilo y nitro; R₃ es hidrógeno; R₄ es hidrógeno; R₅ y R₆ forman conjuntamente un grupo-(CH₂)_n-;

15 n es un entero seleccionado entre 1, 2, 3, 4, 5 y 6, preferentemente n = 4; X es nitrógeno; Y es oxígeno; Z es nitrógeno;

20 y sus sales, profármacos o solvatos, preferentemente, sus sales farmacéuticamente aceptables.

3. Uso de un compuesto según la reivindicación 2 como inhibidor dual de GSK3β y AChE, seleccionado entre:

- 25
- 3-metil-4-fenil-1,4,6,7,8,9-hexahidropirazolo[4',3':5,6]pirano[2,3-*b*]quinolin-5-amina.
 - 3-metil-4-(4-metoxifenil)-1,4,6,7,8,9-hexahidropirazolo[4',3':5,6]pirano [2,3-*b*]quinolin-5-amina.
 - 30 • 3-metil-4-(2-metoxifenil)-1,4,6,7,8,9-hexahidropirazolo[4',3':5,6]pirano [2,3-*b*]quinolin-5-amina.

- 3-metil-4-(4-nitrofenil)-1,4,6,7,8,9-hexahidropirazolo[4',3':5,6]pirano[2,3-*b*]quinolin-5-amina.
- 3-metil-4-(2-nitrofenil)-1,4,6,7,8,9-hexahidropirazolo[4',3':5,6]pirano[2,3-*b*]quinolin-5-amina.

5

4. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una sal, profármaco o solvato, farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10

5. Uso de un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o de una sal, profármaco o solvato, farmacéuticamente aceptable del mismo, en la elaboración de una composición farmacéutica con efecto inhibidor dual de GSK3 β y AChE, y/o efecto inductor de Nrf2 y/o neuroprotector.

15

6. Uso de un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o de una sal, profármaco o solvato, farmacéuticamente aceptable del mismo, en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa central y/o periférica o de una enfermedad isquémico-cerebral (ictus).

20

7. Uso según la reivindicación 6, en el que dicha enfermedad neurodegenerativa sea la enfermedad de Alzheimer.

25

8. Uso según la reivindicación 6, en el que dicha enfermedad neurodegenerativa sea la esclerosis lateral amiotrófica.

30

9. Uso según la reivindicación 6, en el que dicha enfermedad neurodegenerativa sea el parkinsonismo postencefálico.

10. Uso según la reivindicación 6, en el que dicha enfermedad neurodegenerativa sea la parálisis supranuclear progresiva.
- 5 11. Uso según la reivindicación 6, en el que dicha enfermedad neurodegenerativa sea la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker.
12. Uso según la reivindicación 6, en el que dicha enfermedad neurodegenerativa sea la enfermedad de Hallervorden-Spatz.
- 10 13. Uso según la reivindicación 6, en el que dicha enfermedad neurodegenerativa sea la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob.
14. Uso según la reivindicación 6, en el que dicha enfermedad neurodegenerativa sea el Síndrome de Down.
- 15 15. Uso según la reivindicación 6, en el que dicha enfermedad neurodegenerativa sea la enfermedad de Niemann-Pick.
16. Uso según la reivindicación 6, en el que dicha enfermedad neurodegenerativa sea el enfermedad de Pick.
- 20 17. Uso según la reivindicación 6, en el que dicha enfermedad neurodegenerativa sea el ictus cerebral.
- 25 18. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 17, en el que un compuesto de fórmula (I), o una sal, profármaco o solvato, farmacéuticamente aceptable del mismo se use para la fabricación de un medicamento para su administración por vía oral, parenteral, subcutánea, intramuscular, intravascular o rectal.
- 30 19. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 17, en el que dicho compuesto de fórmula (I), o una sal, profármaco o solvato, farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra en una dosis diaria comprendida entre 0,1 y 100 mg/kg peso corporal.

20. Uso según la reivindicación 19, en el que dicho compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra en una dosis diaria comprendida entre 2 y 5 mg/kg peso corporal.

5

10

15

20

25

30

35

40



21 N.º solicitud: 201500274

22 Fecha de presentación de la solicitud: 20.04.2015

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: **A61K31/4353** (2006.01)
A61P25/28 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	Khoobi Mehdi et al.. NEW TETRACYCLIC TACRINE ANALOGS CONTAINING PYRANO[2,3-C]PYRAZOLE: EFFICIENT SYNTHESIS, BIOLOGICAL ASSESSMENT AND DOCKING SIMULATION STUDY. European Journal of Medicinal Chemistry 18/10/2014, Vol. 89, Páginas 296 - 303 [en línea] [recuperado el 25/04/2017]. ISSN 0223-5234, <DOI: doi:10.1016/j.ejmech.2014.10.049>. Figura 1, tabla 1, compuestos 7a-l, página 299, conclusión, Figura 1, tabla 1, compuestos 7a-l, página 299, conclusión,	1-20
A	US 2005209297 A1 (SANNER MARK A et al.) 22/09/2005, Página 16, apartado 500, reivindicaciones 12,17 y 18.	1-20

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
18.05.2017

Examinador
H. Aylagas Cancio

Página
1/4

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

A61K, A61P

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

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, MEDLINE, NPL, BIOSIS, XPESP, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 18.05.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-20	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-20	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Khoobi Mehdi et al.. NEW TETRACYCLIC TACRINE ANALOGS CONTAINING PYRANO[2,3-C]PYRAZOLE: EFFICIENT SYNTHESIS,BIOLOGICAL ASSESSMENT AND DOCKING SIMULATION STUDY. European Journal of Medicinal Chemistry, 20141018 EDITIONS SCIENTIFIQUE ELSEVIER, PARIS, FR. Lasmezas Corinne, Vol. 89, Páginas 296 - 303 [en línea][recuperado el 25/04/2017]. ISSN 0223-5234, <DOI: doi:10.1016/j.ejmech.2014.10.049>	18.10.2014
D02	US 2005209297 A1 (SANNER MARK A et al.)	22.09.2005

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

La presente solicitud se refiere al uso de compuestos de fórmula I como inhibidores duales de las enzimas GSK3 β (glucógeno sintasa quinasa 3 β) y AChE (acetil colinesterasa E). Se utilizan en la elaboración de composiciones farmacéuticas para la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa central y/o periférica o de una enfermedad isquémico-cerebral (ictus). Entre las enfermedades neurodegenerativas citadas se encuentran Alzheimer, ELA, parkinsonismo postencefálico, Niemann-Pick, síndrome de Down, etcSe reivindican asimismo las composiciones farmacéuticas que comprenden a dichos compuestos.

El documento D1 se refiere a compuestos análogos de tacrina en los que se sustituye el anillo de benceno por aril - dihidropirano (2,3-c) pirazol. Entre los compuestos citados (ver Figura 1 y tabla 1, compuestos 7a-l) se encuentran los reivindicados en la presente solicitud. Se describe que modificando las sustituciones en el grupo fenil unido al dihidropirano se consigue modular los efectos sobre la inhibición de la AChE/BuChE (acetilcolinesterasa/butirilcolinesterasa). Se refieren asimismo sus efectos neuroprotectores y su uso en la terapia de la enfermedad de Alzheimer.

Por lo tanto, las reivindicaciones 1- 20 de la presente solicitud, carecen de novedad ya que la aplicación terapéutica que se reivindica es la misma que la citada en el documento D1, es decir utilización en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. A pesar de que la reivindicación 1 se refiere a un mecanismo dual de inhibición de AChE y un segundo mecanismo de acción de los compuestos de fórmula I que consiste en la inhibición de la enzima GSK3 β , el hecho de que se haya descubierto algo nuevo sobre un mecanismo de acción no constituye una característica técnica que puede conferir novedad al uso terapéutico reivindicado.

En consecuencia, en base al documento D1, las reivindicaciones 1-20 carecen de novedad según el artículo 6.1 de la L.P.

Además, el uso de compuestos derivados del pirazol como inhibidores de GSK3 β es conocido en el estado de la técnica, por ejemplo el documento D2 divulga su utilización en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y su uso combinado con inhibidores de la acetilcolinesterasa para tratar desórdenes como el Alzheimer (ver resumen y página 16, apartado 0500).

Por lo tanto, a la vista del estado de la técnica, la materia correspondiente a las reivindicaciones 1-20 de la presente solicitud, no reúne los requisitos de patentabilidad de acuerdo con los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.