

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 720**

51 Int. Cl.:

A61K 31/145	(2006.01)	A61K 31/555	(2006.01)
A61K 31/315	(2006.01)		
A61P 31/00	(2006.01)		
A61K 31/28	(2006.01)		
A61P 9/00	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		
A61K 31/30	(2006.01)		
A61K 33/34	(2006.01)		
A61P 25/00	(2006.01)		
A61K 33/30	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2007** **E 14166833 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017** **EP 2813223**

54 Título: **Agentes de suministro de metales y usos terapéuticos de los mismos**

30 Prioridad:

20.11.2006 US 859921 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.01.2018

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF MELBOURNE (100.0%)
Grattan Street
Parkville, Victoria 3010, AU**

72 Inventor/es:

**BARNHAM, KEVIN JEFFREY;
DONNELLY, PAUL STEPHEN y
WHITE, ANTHONY ROBERT**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 650 720 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agentes de suministro de metales y usos terapéuticos de los mismos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de complejos metálicos como agentes farmacéuticos o veterinarios, en particular para el tratamiento de afecciones en las que el suministro de metal puede prevenir, aliviar o mejorar la afección. Existe una serie de afecciones clínicas provocadas por o que se asocian a niveles anormales de metales (normalmente niveles de metal bajos). Las afecciones en de este tipo incluyen el cáncer y afecciones caracterizadas por o asociadas al daño oxidativo, más específicamente afecciones neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Huntington.

Antecedentes de la invención

Se cree que la esperanza de vida está fijada biológicamente para cada especie y la duración de la esperanza de vida humana es incierta, pero puede ser de hasta 120 años. Puesto que la esperanza de vida ha aumentado significativamente en este siglo, los ancianos son un segmento creciente de nuestra población y sus necesidades de atención médica seguirán creciendo durante décadas.

Los iones metálicos biodisponibles desempeñan papeles cruciales en una serie de procesos biológicos importantes. Se estima que un tercio de todas las proteínas son metaloproteínas (proteínas que contienen un ion metálico fuertemente unido) y, por tanto, una serie de procesos biológicamente importantes se ve perjudicada si los niveles de metales biodisponibles son elevados o si se suprimen. Además, incluso si hay niveles adecuados de metales biodisponible en un sistema biológico es importante que su distribución en el sistema biológico sea de manera que los procesos biológicos que se basan en la presencia del metal funcionen adecuadamente.

Aunque existe una amplia gama de maneras en las que los metales biodisponibles repercuten en los sistemas biológicos, dos de las más conocidas serían el papel de los metales en los sistemas enzimáticos y el papel de los metales en los mecanismos de señalización dentro de los sistemas biológicos. Los ejemplos del papel de los metales en los procesos biológicos incluyen la importancia potencial del Zn en las placas β -amiloides de la enfermedad de Alzheimer; el efecto de la enzima superóxido dismutasa (Cu, Zn) en la mediación del daño por especies reactivas de oxígeno asociado a la esclerosis lateral amiotrófica; la participación de las enzimas con grupo hemo NO sintasa y guanilil ciclasa en la producción y detección, respectivamente, del óxido nítrico (NO), y el descubrimiento de un motivo "dedo de cinc" en el gen de susceptibilidad al cáncer de mama y ovario, BRCA1 simplemente modo de ejemplo. También se sabe que el Cu desempeña un papel en la actividad de XIAP que modula la actividad caspasa que a su vez controla la apoptosis. La apoptosis es un proceso de muerte celular controlada y se ha implicado a la desregulación de este proceso en muchas patologías.

Un gran porcentaje de enzimas y proteínas recién descubiertas también contienen iones metálicos en sus sitios activos y las variaciones en los niveles de metales puede interferir significativamente con el funcionamiento de estas enzimas y proteínas. Las metaloenzimas de este tipo están implicadas en una serie de procesos bio catalíticos importantes incluyendo la reducción de las especies de oxígeno en exceso. En consecuencia, cada vez que hay un nivel demasiado alto o demasiado bajo de metales presentes en un sistema biológico, los procesos biológicos normales se interrumpen en un nivel demasiado alto o demasiado bajo, conduciendo normalmente a consecuencias indeseables. Esto ocurre normalmente ya que muchos de los procesos enzimáticos cruciales que proporcionan protección en el sistema biológico se suprimen e inactivan conduciendo a consecuencias indeseables.

Como resultado de la importancia de los metales en el entorno biológico, las investigaciones realizadas en los papeles de los metales en los sistemas biológicos han identificado una serie de afecciones provocadas por o que se asocian a niveles anormales de metales en el medio ambiente biológico. Con respecto a estas afecciones, normalmente son todas aquellas en las que el suministro de metal puede prevenir, aliviar o mejorar la afección. Un ejemplo de una afección de este tipo es el estrés oxidativo que está relacionado con niveles de metales anormales ya que muchas de las enzimas protectoras responsables de aliviar el estrés oxidativo se desactivan si los niveles de metales biológicos son demasiado bajos.

Las investigaciones de las últimas décadas han identificado que existe una serie de afecciones provocadas por o que se asocian al estrés oxidativo situado en el cuerpo. Por ejemplo, se ha identificado una serie de afecciones cardiovasculares que son el resultado del estrés oxidativo (EO). Otras afecciones asociadas al EO incluyen el cáncer, las cataratas, los trastornos neurodegenerativos tales como la enfermedad de Alzheimer y las enfermedades cardíacas. Además, existe evidencia de que el EO desempeña un papel destacado en tres tipos de trastornos neuromusculares: la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la enfermedad mitocondrial/metabólica y la ataxia de Friedreich.

El efecto del EO no se limita a una sola parte del cuerpo humano, observándose ejemplos de los efectos negativos del EO en casi todos los órganos. Por ejemplo, el cerebro humano es un órgano que concentra iones metálicos y

pruebas recientes indican que una ruptura en la homeostasis de los metales desempeña un papel crítico en diversas enfermedades neurodegenerativas relacionados con la edad. Las características comunes de estas enfermedades incluyen la deposición de proteínas mal plegadas (cada enfermedad tiene su propia proteína amiloide específica) y el daño celular sustancial como resultado del EO. Datos significativos sugieren que el EO es la causa principal de

5 daño físico en una amplia gama de patologías, incluyendo trastornos neurológicos amiloidógenos tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), las enfermedades priónicas incluyendo la enfermedad de Creutzfeldt Jakob (ECJ), las encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET), las cataratas, los trastornos mitocondriales, la enfermedad de Menke, la enfermedad de Parkinson (EP) y la enfermedad de Huntington (EH). [Bush, 2000 (*Curr Opin Chem Biol.* Abril de 2000;(2): 4(2):184-91)].

10 En este sentido, es notable que se haya informado de la deficiencia de iones metálicos de cobre como una afección asociada a la EA. El cobre es un elemento esencial que se necesita para que muchas enzimas funcionen correctamente, en particular las enzimas que mantienen un equilibrio en la homeostasis antioxidante/pro-oxidante, tales como la superóxido dismutasa y la citocromo C oxidasa. Una consecuencia de la deficiencia de cobre es que

15 las enzimas protectoras responsables de la desintoxicación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) se cargan de forma inadecuada con el cobre y, por tanto, no realizan eficazmente la función enzimática normal. La carga inadecuada de dichas enzimas protectoras, por ejemplo, en el cerebro, conduce a un aumento general del EO (como se observa en la EA), que se refleja en el aumento de la oxidación de proteínas, tal como el aumento de carbonilos de proteínas.

20 Se ha desarrollado una serie de agentes terapéuticos en un intento de proporcionar soluciones terapéuticas a las afecciones provocadas por o asociadas al EO como se ha analizado anteriormente con resultados variados. En general, con el fin de disminuir los niveles de EO, se usan diversos antioxidantes. Los más comunes son la vitamina E y la vitamina C. Sin embargo, se descubrió que la vitamina E es ineficaz en la disminución del estrés oxidativo en la sustancia negra (*The Parkinson Study Group*, 1993, Offen et al., 1996) ya que este compuesto, aunque es capaz

25 de cruzar la barrera hematoencefálica, queda atrapado en la membrana celular y, por tanto, no alcanza el citoplasma donde se necesitan sus propiedades antioxidantes. La vitamina C tampoco cruza la barrera hematoencefálica y, por tanto, no puede usarse con eficacia para enfermedades neurodegenerativas de origen central.

30 Por tanto, existe todavía una necesidad de, y sería altamente ventajoso tener, compuestos antioxidantes novedosos y métodos para el uso de antioxidantes en el tratamiento de enfermedades asociadas al daño oxidativo y, en particular, de trastornos neurodegenerativos del sistema nervioso central, tales como la EP, la EA y la ECJ. El tratamiento es más deseable para y en el tratamiento de afecciones de los tejidos periféricos, tales como el

35 síndrome de dificultad respiratoria aguda, la ELA, la enfermedad cardiovascular aterosclerótica y la disfunción orgánica múltiple. Durante dicho tratamiento, los complejos pueden actuar como neutralizantes de oxígeno para reducir el EO dentro y en la proximidad de las células afectadas y este tratamiento, con el tiempo, detiene la muerte celular que se asocia al EO en el cerebro y/o los tejidos periféricos.

40 Por consiguiente, la presente invención se basa en el hallazgo de que ciertos complejos de metales son eficaces en el suministro de metal biodisponible y por tanto podrían utilizarse en el tratamiento de afecciones que pueden prevenirse, tratarse o mejorarse por suministro de metal. En ciertas afecciones, es deseable que el metal se libera en la célula de tal manera que después del suministro de metal el metal está presente en forma del catión libre y es el catión libre que conduce a la actividad biológica observada. Con respecto a las otras afecciones, es deseable que la estancia de metal en forma del complejo unido incluso después del suministro de metal y con estas afecciones, es

45 la forma unida del metal (el complejo de metal) que es biológicamente activa en la célula.

En particular se descubrió que estos complejos son eficaces en el suministro de metal a las células en una forma que conduce a que se observe un efecto antioxidante significativo en la célula. Por tanto, ciertos complejos metálicos demostraron una capacidad para mediar el EO.

50 No se admite que ninguna referencia constituya una técnica anterior. El análisis de las referencias indica lo que afirman sus autores y los solicitantes se reservan el derecho de cuestionar la exactitud y pertinencia de los documentos citados. Se entenderá claramente que, aunque se hace referencia a una serie de publicaciones de la técnica anterior en el presente documento, esta referencia no constituye una admisión de que ninguno de estos

55 documentos forme parte del conocimiento general común en la técnica, en Australia o en cualquier otro país.

Wada et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 17(5), 701-704 (1994), describe una evaluación de Cu-ATSM, un complejo de cobre similar a la superóxido dismutasa (SOD) accesible en el medio intracelular, en un modelo de lesión por isquemia-reperusión.

60 Saji et al., *S.T.P. Pharma Sciences*, 7(1) 92-97 (1997), describe un complejo de cinc permeable en el cerebro con acción neuroprotectora.

65 Bayer et al., *PNAS*, 100(24), 14187-14192 (2003), describe la estabilización por el cobre de la dieta de la actividad de la superóxido dismutasa 1 del cerebro y la reducción de la producción de amiloide A β en ratones transgénicos APP23.

Wada et al., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 310(1), 1-5 (1994), describe un complejo de cobre estable similar a la superóxido dismutasa con una alta permeabilidad de las membranas.

5 Kessler et al., *J. Neural Transm.*, 113, 1763-1769 (2006), describe marcadores de diagnóstico de líquido cefalorraquídeo que se correlacionan con cobre y ceruloplasmina plasmáticos más bajos en pacientes con enfermedad de Alzheimer.

10 Kubota et al., *Jpn. J. Pharmacol.* 84, 334-338 (2000), describe mecanismos de protección inducida por Zn-(ASTM₂) de neuronas del hipocampo cultivadas frente a la citotoxicidad del glutamato mediada por el receptor de N-metil-D-aspartato.

Hallett y Standaert, *Pharmacology & Therapeutics*, 102, 155-174 (2004), describe la justificación y el uso de antagonistas del receptor de NMDA en la enfermedad de Parkinson.

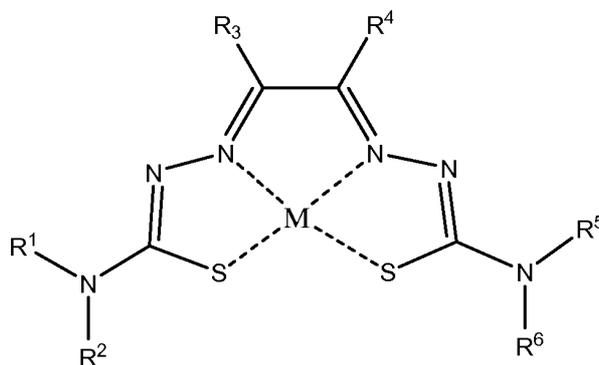
15 Ihara et al., *Journal of Neurological Sciences*, 170, 90-95 (1999), describe el radical hidroxilo y la superóxido dismutasa en la sangre de pacientes con enfermedad de Parkinson: relación con datos clínicos.

20 Pong, *Expert Opin. Biol. Ther.*, 3(1), 127-139 (2003), describe el estrés oxidativo en enfermedades neurodegenerativas: implicaciones terapéuticas para miméticos de superóxido dismutasa.

Ebadi et al., *Abstracts of the Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, 26(1-2), 579,1 (2000), describe isoformas de ubiquinona (coenzima Q10) y metalotioneína para proteger estirpes celulares dopaminérgicas de la apoptosis inducida por MPP+ y otros inhibidores del complejo mitocondrial I.

25 Sumario de la invención

En un aspecto la invención proporciona un complejo metálico de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson o la esclerosis lateral amiotrófica:



Fórmula (I)

30

donde:

35 el complejo es simétrico;
M es Cu;
R¹ y R⁵ son cada uno hidrógeno;
R² y R⁶ son cada uno metilo, etilo o fenilo; y R³ y R⁴ son cada uno metilo.

40 En una realización, R² y R⁶ son cada uno metilo.

En una realización, R² y R⁶ son cada uno etilo.

En una realización, R² y R⁶ son cada uno fenilo.

45 En una realización específica, el trastorno es la enfermedad de Parkinson. En una realización específica, el trastorno es esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

En general en el presente documento se describe un método de profilaxis o tratamiento del estrés oxidativo que incluye administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo metálico de fórmula (I) al sujeto.

50

En general en el presente documento se describe el uso de un complejo metálico de fórmula (I) en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis del EO.

5 En general en el presente documento se describe un método de protección de una célula frente al EO incluyendo el método exponer la célula a una cantidad eficaz de un complejo metálico de fórmula (I). En una realización, la célula es una célula en un sujeto y exponer la célula al complejo metálico incluye administrar el complejo metálico al sujeto.

10 En general en el presente documento se describe un método de profilaxis o tratamiento de un trastorno relacionado con tau incluyendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo metálico de fórmula (I) al sujeto. En una realización, el trastorno relacionado con tau es un trastorno neurodegenerativo.

En general en el presente documento se describe el uso de un complejo metálico de fórmula (I) en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de un trastorno relacionado con tau.

15 En general en el presente documento se describe un método de reducción o prevención de los efectos de Abeta sobre una célula incluyendo el método exponer la célula a una cantidad eficaz de un complejo metálico de fórmula (I). En una realización, la célula es una célula en un sujeto y exponer la célula al complejo metálico incluye administrar el complejo metálico al sujeto.

20 En general en el presente documento se describe un método de profilaxis o tratamiento de un trastorno relacionado con Abeta incluyendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo metálico de fórmula (I) al sujeto.

25 En general en el presente documento se describe un método de fosforilación de una cinasa en una célula, incluyendo el método exponer la célula a un complejo metálico de fórmula (I) como se ha descrito anteriormente. En una realización, la cinasa es una tirosina cinasa receptora. En una realización específica la tirosina cinasa receptora es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). En otra realización específica la cinasa se selecciona entre el grupo que consiste en ERK, PI3K, Akt, GSK3 y JNK.

30 Una característica común de los métodos y usos como se han esbozado anteriormente es el uso de un complejo metálico de fórmula (I). En una realización de los aspectos descritos anteriormente el complejo metálico es suficientemente estable de manera que tras la administración al sujeto el metal no se libera en el medio extracelular, sino que más bien se libera en las células del sujeto. Esto es preferible, ya que garantiza que el metal se entregue a las células del sujeto en lugar de que se libere antes del suministro a las células. En realizaciones en las que el metal se libera del complejo en la célula está, por tanto, presente en la célula como el catión libre y es el catión libre el que es responsable de la actividad biológica en el sujeto. En otra realización, el complejo metálico no libera el metal en la matriz extracelular ni libera el metal en la célula, más bien es el complejo metálico el que conduce a la actividad biológica observada. Pueden hacerse modificaciones en el complejo metálico, ya sea a través de cambios en la naturaleza del metal o cambios en la naturaleza del ligando para obtener el suministro deseado del metal a las células del sujeto.

En la invención descrita anteriormente el metal es el cobre.

45 En la invención descrita anteriormente el complejo es simétrico.

R¹ es H.

R² se selecciona entre el grupo que consiste en metilo, etilo y fenilo.

50 R³ es metilo.

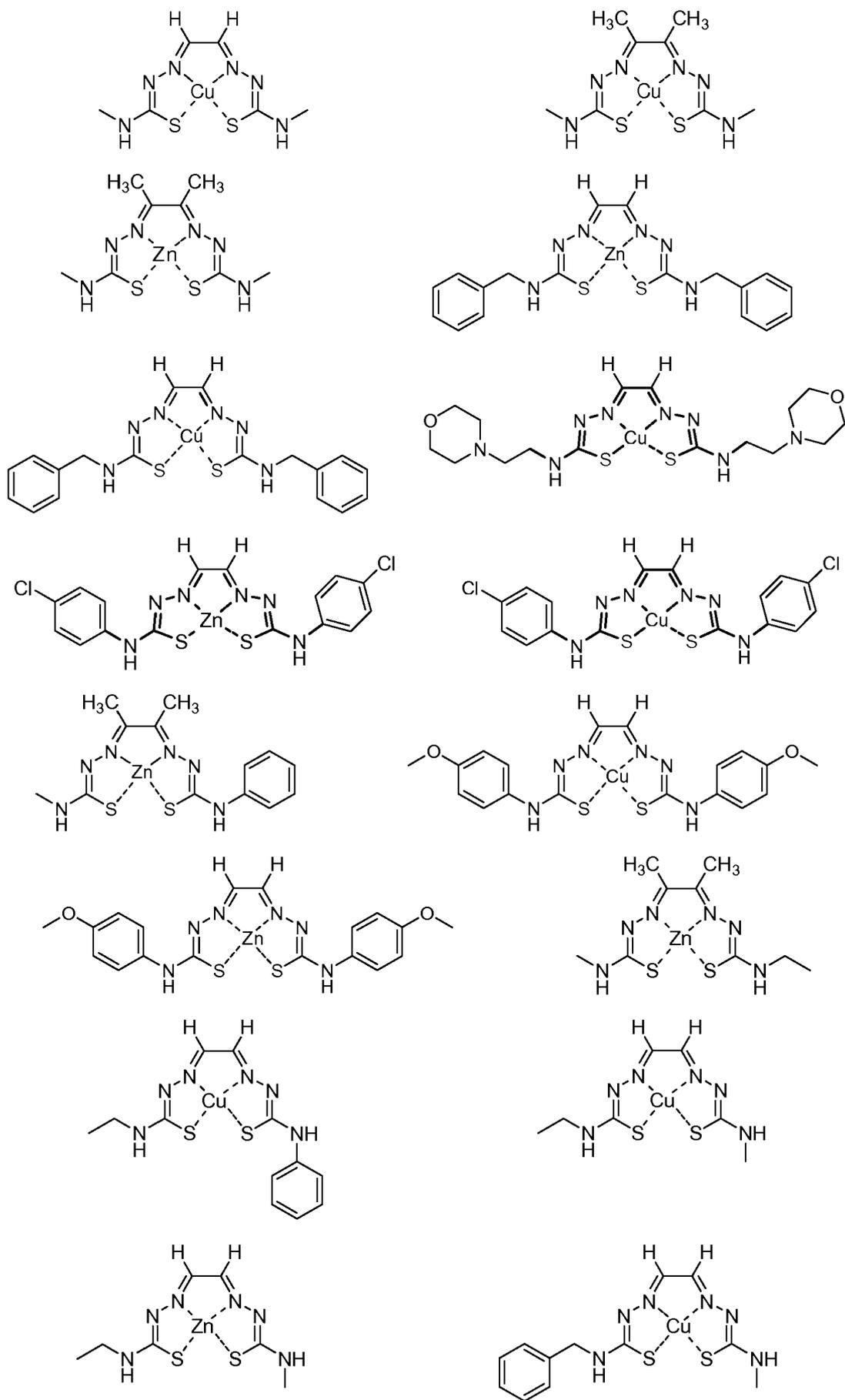
R⁴ es metilo.

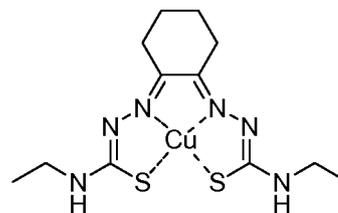
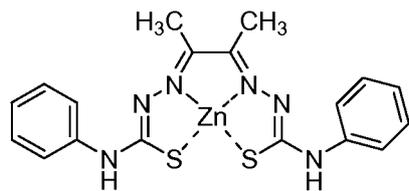
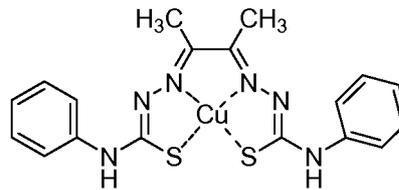
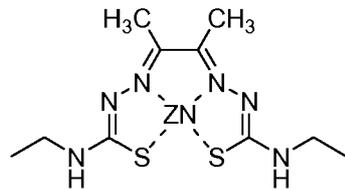
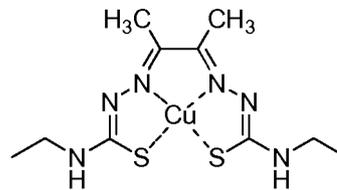
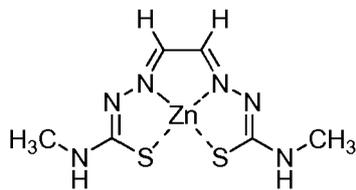
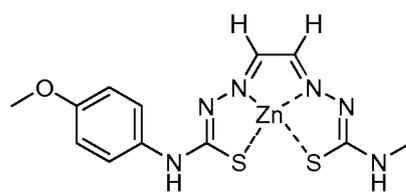
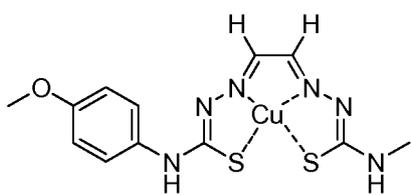
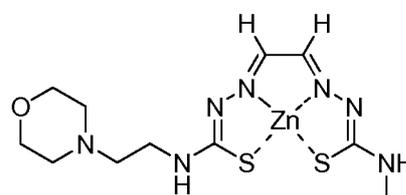
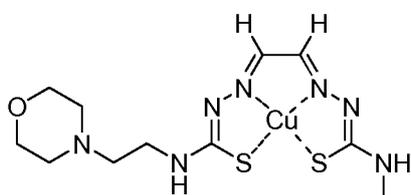
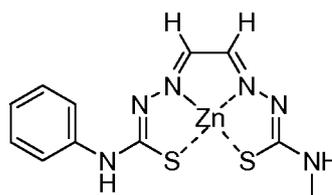
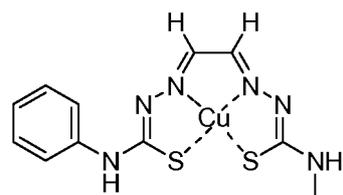
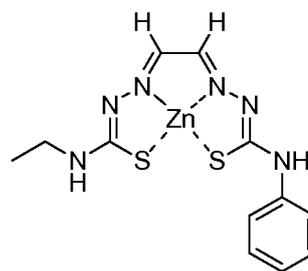
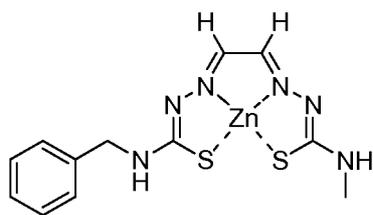
R⁵ es H.

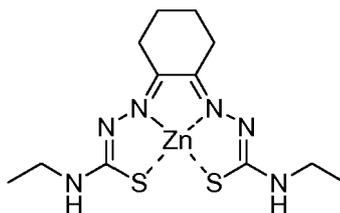
55 R⁶ se selecciona entre el grupo que consiste en metilo, etilo y fenilo.

60 En general en el presente documento se describe el uso de los complejos metálicos descritos en el presente documento para aumentar la actividad del fosfoinositol-3-cinasa (PI3K) -Akt en el sujeto. En otra realización preferida, el complejo metálico disminuye la actividad de la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3) en el sujeto. En otra realización preferida, el complejo metálico aumenta la actividad de la JNK en el sujeto. En otra realización, el complejo metálico conduce a la activación de una o más enzimas antioxidantes. En una realización, la enzima antioxidante es la superóxido dismutasa (SOD).

65 Los ejemplos específicos de complejos que se describen en general en el presente documento incluyen los siguientes:







Breve descripción de las figuras

- 5 **Figura 1:** ilustra los niveles de cobre celular cuando las células se trataron con diversos complejos de ligando libre y ligando de cobre.
- Figura 2:** ilustra los niveles de cinc celular cuando las células se trataron con diversos complejos de ligando libre y ligando de cinc.
- 10 **Figura 3:** ilustra el efecto diferente de Cu-GTSM frente a Cu-ATSM sobre los niveles de amiloide β extracelular.
- Figura 4:** ilustra el efecto de diversos complejos de cinc sobre los niveles de amiloide β extracelular.
- Figura 5:** ilustra cómo el cobre inhibe la captación de cinc en células tratadas con Zn-BSTC e inhibe el efecto de Zn-BTSC sobre el amiloide β .
- 15 **Figura 6:** ilustra el efecto de la temperatura sobre la captación de metal.
- Figura 7:** ilustra el efecto de la temperatura sobre BTSC - amiloide β y la captación de metal.
- Figura 8A:** ilustra que ZnBTSC induce la activación de la fosfoinositol-3-cinasa (fosforilación de Akt, p-Akt) y activa la JNK (dando como resultado la fosforilación de JNK, p-JNK).
- Figura 8B:** ilustra que ZnATSE inhibe la activación de GSK3 mediante la inducción de su fosforilación (p-GSK3).
- 20 **Figura 8C:** ilustra que Cu-GTSM induce la activación de la fosfoinositol-3-cinasa (fosforilación de Akt, p-Akt), la activación de la JNK (p-JNK) y la inhibición de la GSK3 (p-GSK3).
- Figura 8D:** ilustra que la inhibición de amiloide β en cultivos por Zn-BTSC depende de la activación de la JNK y la fosfoinositol-3-cinasa. La inhibición de la JNK por SP600125 evita la pérdida de amiloide β . La inhibición de la fosfoinositol-3-cinasa por LY294002 evita la pérdida de amiloide β . SB203580 (inhibidor de p38) no tiene ningún efecto).
- 25 **Figura 9:** ilustra los resultados del ensayo Oxyblot™ para la fracción de cerebro de ratón insoluble frente al control para el complejo A8.
- Figura 10:** ilustra los resultados del ensayo Oxyblot™ para la fracción de cerebro de ratón soluble frente al control para el complejo A8.
- 30 **Figura 11:** ilustra los resultados del ensayo Oxyblot™ para la fracción de cerebro de ratón insoluble frente al control para el complejo CuGTSM.
- Figura 12:** ilustra los resultados del ensayo Oxyblot™ para la fracción de cerebro de ratón soluble frente al control para el complejo CuGTSM.
- Figura 13:** ilustra los resultados de un ensayo de fosforilación de tau para la fracción de cerebro de ratón insoluble frente al control para el complejo CuGTSM.
- 35 **Figura 14:** ilustra los resultados de un ensayo de fosforilación de tau para la fracción de cerebro de ratón soluble frente al control para el complejo CuGTSM.
- Figura 15:** muestra los niveles de GSK3 β y GSK3 β fosforilado (p-GSK3 β) en las células M17 y N2a tratadas con CuGTSM o control de vehículo durante 24 horas. La GSK3 β se inhibe cuando está fosforilada, por tanto, se demuestra que el tratamiento con CuGTSM inhibe la actividad de la GSK3 β sobre las células M17 y N2a. La B-actina se muestra como control.
- 40 **Figura 16:** muestra el efecto de diversos BSTC sobre la muerte de la célula WT inducida por dopamina.
- Figura 17:** muestra el efecto de diversos BSTC sobre la muerte de la célula A30P inducida por dopamina.
- Figura 18:** ilustra gráficamente las rotaciones totales de ratones de control y ratones tratados con complejos metálicos en modelo de enfermedad de Parkinson.
- 45 **Figura 19:** muestra los recuentos de células en el examen post-mortem de los cerebros en los ratones utilizados en el ejemplo 27.
- Figura 20:** ilustra gráficamente el agotamiento químico de PrPC en células GT1-7 después del tratamiento de 6 horas con concentraciones crecientes de Cu(GTSM).
- 50 **Figura 21:** ilustra gráficamente el agotamiento químico de PrPC en células HeLa después del tratamiento de 6 horas con concentraciones crecientes de Cu(GTSM).
- Figura 22:** muestra los datos de rotarod que indican la eficacia de CuATSM en el tratamiento de ratones con ELA.
- Figura 23:** muestra el inicio de la parálisis de las extremidades posteriores en ratones con ELA tratados con CuATSM
- 55 **Figura 24A:** muestra la transferencia de Western de lisados celulares. EGFR (tyr1068) activado por CuGTSM (25 μ M) en células U87MG-EGFR en comparación con el control de vehículo. La adición de PD153035 a las células tratadas con CuGTSM inhibe la activación de EGFR (**A**).
- Figuras 24B a 24D:** muestran experimentos similares en cuanto a la figura 24A pero para JNK (B), GSK3 (C) y ERK (D), respectivamente.

Descripción detallada de la invención

En la presente memoria descriptiva, se usa una serie de términos que son bien conocidos para un experto. Sin embargo, con fines de claridad se define una serie de términos.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "no sustituido" significa que no hay ningún sustituyente o que los únicos sustituyentes son hidrógeno.

10 La expresión "opcionalmente sustituido" como se usa en toda la memoria descriptiva indica que el grupo puede o puede no estar sustituido o condensado adicionalmente (para formar un sistema policíclico condensado), con uno o más grupos sustituyentes. Preferentemente, los grupos sustituyentes son uno o más grupos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en halógeno, =O, =S, -CN, -NO₂, -CF₃, -OCF₃, alquilo, alquenilo, alquinilo, haloalquilo, haloalquenilo, haloalquinilo, heteroalquilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilalquilo, heteroarilalquilo, arilalquilo, cicloalquilalquenilo, heterocicloalquilalquenilo, arilalquenilo, heteroarilalquenilo, cicloalquilheteroalquilo, heterocicloalquilheteroalquilo, arilheteroalquilo, heteroarilheteroalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxi, alcoxialquilo, alcoxícicloalquilo, alcoxiheterocicloalquilo, alcoxiarilo, alcoxiheteroarilo, alcoxicarbonilo, alquilaminocarbonilo, alqueniloxi, alquiniloxi, cicloalquiloxi, cicloalqueniloxi, heterocicloalquiloxi, heterocicloalqueniloxi, ariloxi, fenoxi, benciloxi, heteroariloxi, arilalquiloxi, arilalquilo, heteroarilalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilalquilo, arilalquiloxi, amino, alquilamino, acilamino, aminoalquilo, arilamino, sulfonilamino, sulfinilamino, sulfonilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, aminosulfonilo, sulfínilo, alquilsulfínilo, arilsulfínilo, aminosulfínilaminoalquilo, -COOH, -COR⁹, -C(O)OR⁹, -CONHR⁹, -CSNHR⁹, -NHCOR⁹, -NHCOOR⁹, NHCONHR⁹, C(=NOH)R⁹-SH, -SR⁹, -OR⁹, acilo, un grupo de fórmula -NR⁹R¹⁰ o un grupo de fórmula -CONR⁹R¹⁰ o un grupo de fórmula -NHCONR⁹R¹⁰ en el que R¹⁰ es un resto de proteína, hormona, anticuerpo o hidrato de carbono.

25 "Alquilo" como grupo o parte de un grupo se refiere a un grupo hidrocarburo alifático lineal o ramificado, preferentemente un alquilo C₁-C₁₄, más preferentemente alquilo C₁-C₁₀, más preferentemente C₁-C₆ a menos que se indique lo contrario. Los ejemplos de sustituyentes alquilo C₁-C₆ lineales y ramificados adecuados incluyen metilo, etilo, n-propilo, 2-propilo, n-butilo, sec-butilo, t-butilo, hexilo y similares. Cuando se usa alquilo como un grupo de unión normalmente se denomina (pero no exclusivamente) alquilenilo. Una convención similar se aplica a otros grupos de unión.

35 "Acilo" significa un grupo alquil-CO- en el que el grupo alquilo es como se describe en el presente documento. Los ejemplos de acilo incluyen acetilo y benzoílo. El grupo alquilo es preferentemente un grupo alquilo C₁-C₆.

40 "Alquenilo" como un grupo o parte de un grupo indica un grupo hidrocarburo alifático que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono y que puede ser lineal o ramificado que tiene preferentemente 2-14 átomos de carbono, más preferentemente 2-12 átomos de carbono, mucho más preferentemente 2-6 átomos de carbono, en la cadena normal. El grupo puede contener una pluralidad de dobles enlaces en la cadena normal y la orientación alrededor de cada uno es independientemente E o Z. Los grupos alquenilo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, etenilo, propenilo, butenilo, pentenilo, hexenilo, heptenilo, octenilo y nonenilo.

45 "Alcoxi" se refiere a un grupo -O-alquilo en el que el alquilo se define en el presente documento. Preferentemente, el alcoxi es un alcoxi C₁-C₆. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, metoxi y etoxi.

50 "Alquinilo" como un grupo o parte de un grupo significa un grupo hidrocarburo alifático que contiene un triple enlace carbono-carbono y que puede ser lineal o ramificado que tiene preferentemente 2-14 átomos de carbono, más preferentemente 2-12 átomos de carbono, más preferentemente 2-6 átomos de carbono en la cadena normal. Las estructuras de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, etinilo y propinilo.

55 "Cicloalquilo" se refiere a un carbociclo monocíclico o policíclico condensado o espiro, saturado o parcialmente saturado, que contiene preferentemente de 3 a 9 átomos de carbono por anillo, tal como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y similares, a menos que se especifique lo contrario. Incluye sistemas monocíclicos tales como ciclopropilo y ciclohexilo, sistemas bicíclicos tales como decalina y sistemas policíclicos tales como adamantano.

60 "Heterocicloalquilo" se refiere a un anillo monocíclico, bicíclico o policíclico, saturado o parcialmente saturado, que contiene al menos un heteroátomo seleccionado entre nitrógeno, azufre, oxígeno, preferentemente de 1 a 3 heteroátomos en al menos un anillo. Cada anillo tiene preferentemente de 3 a 10 miembros, más preferentemente de 4 a 7 miembros. Los ejemplos de sustituyentes heterocicloalquilo adecuados incluyen pirrolidilo, tetrahidrofurilo, tetrahidrotiofuranilo, piperidilo, piperazilo, tetrahidropiranilo, morfolino, 1,3-diazapano, 1,4-diazapano, 1,4-oxazepano y 1,4-oxatiapano.

65 "Heteroalquilo" se refiere a un grupo alquilo lineal o de cadena ramificada que tiene preferentemente de 2 a 14 carbonos, más preferentemente de 2 a 10 átomos en la cadena, uno o más de los cuales es un heteroátomo seleccionado entre S, O y N. Los ejemplos de heteroalquilos incluyen éteres de alquilo, alquilaminas secundarias y

terciarias, sulfuros de alquilo y similares.

"Arilo" como grupo o parte de un grupo indica (i) un carbociclo aromático (estructura de anillo que tiene átomos de anillo que son todos de carbono) monocíclico o policíclico condensado, opcionalmente sustituido, que tiene preferentemente de 5 a 12 átomos por anillo. Los ejemplos de grupos arilo incluyen fenilo, naftilo y similares; (ii) un resto carbocíclico aromático bicíclico, parcialmente saturado, opcionalmente sustituido, en el que un fenilo y un grupo cicloalquilo C₅₋₇ o cicloalqueno C₅₋₇ están condensados entre sí para formar una estructura cíclica, tal como tetrahidronaftilo, indenilo o indanilo.

"Heteroarilo", ya sea solo o como parte de un grupo se refiere a grupos que contienen un anillo aromático (preferentemente un anillo aromático de 5 o 6 miembros) que tiene uno o más heteroátomos como átomos de anillo en el anillo aromático, siendo el resto de los átomos de anillo, átomos de carbono. Los heteroátomos adecuados incluyen nitrógeno, oxígeno y azufre. Los ejemplos de heteroarilo incluyen tiofeno, benzotiofeno, benzofurano, bencimidazol, benzoxazol, benzotiazol, benzisotiazol, nafto[2,3-b]tiofeno, furano, isoindolizina, xantoleno, fenoxatina, pirrol, imidazol, pirazol, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, indol, isoindol, 1H-indazol, purina, quinolina, isoquinolina, ftalazina, naftiridina, quinoxalina, cinolina, carbazol, fenantridina, acridina, fenazina, tiazol, isotiazol, fenotiazina, oxazol, isooxazol, furazano, fenoxazina, 2-, 3- o 4-piridilo, 2-, 3-, 4-, 5- o 8-quinolilo, 1-, 3-, 4- o 5-isoquinolinilo, 1-, 2- o 3-indolilo y 2- o 3-tienilo.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para efectuar resultados clínicos beneficiosos o deseados. Puede administrarse una cantidad eficaz en una o más administraciones. Una cantidad eficaz es normalmente suficiente para paliar, mejorar, estabilizar, invertir, ralentizar o retrasar la progresión de la patología.

En general, los términos "tratamiento" y "profilaxis" significan que afectan a un sujeto, tejido o célula para obtener un efecto farmacológico y/o efecto fisiológico deseado e incluyen: (a) prevenir la afección en un sujeto que pueda estar predispuesto a la afección, pero todavía no ha sido diagnosticado como que la tiene; (b) inhibir la afección, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar o mejorar los efectos de la afección, es decir, provocar la regresión de los efectos de la afección.

El término "sujeto" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier animal que tenga una enfermedad o afección que requiera tratamiento o profilaxis con un agente biológicamente activo. El sujeto puede ser un mamífero, normalmente un ser humano, o puede ser un primate no humano o no primate tales como los que se usan en los ensayos de modelo animal. Aunque se contempla en particular que los compuestos son adecuados para su uso en el tratamiento médico de seres humanos, también son aplicables al tratamiento veterinario, incluyendo el tratamiento de animales de compañía tales como perros y gatos, y animales domésticos tales como caballos, ponis, burros, mulas, llamas, alpacas, cerdos, vacas y ovejas, o animales de zoológico tales como primates, félidos, cánidos, bóvidos y ungulados.

EL ENFOQUE TERAPÉUTICO

La presente invención se basa en la observación de que el metal desempeña un papel importante en un amplio número de procesos biológicos y los niveles de metales adecuados son especialmente importantes en el funcionamiento eficiente de una amplia gama de enzimas biológicamente importantes y procesos de señalización celular. Las enzimas que implican la activación de metales incluyen muchas de las enzimas relacionadas con la oxidación en el nivel celular. En consecuencia, se consideró que el suministro selectivo de metal a sujetos con afecciones relacionadas con niveles anormales de metales podría proporcionar un resultado terapéutico útil para una serie de aplicaciones biológicas. En particular, se consideró que esto podría ser útil con respecto a afecciones provocadas por o asociadas al estrés oxidativo ya que éstas son afecciones en las que muchos de los mecanismos protectores o enzimas que protegen al cuerpo del estrés oxidativo implican la catálisis metálica y de este modo el suministro de metal biodisponible puede ser una terapia útil en el tratamiento de estas afecciones.

Como tales, las investigaciones se basan en la identificación de complejos metálicos apropiados que serían capaces de suministrar metal a los sitios en los que el metal se agota en un sujeto. Las investigaciones se basaron, en particular, en los complejos que serían capaces de suministrar metal a las células de un sujeto. Una cantidad importante de los procesos biológicos que están mediados por metal, tales como enzimas mediadas por metal, se producen en las células en lugar de en la matriz extracelular. Por tanto, los presentes solicitantes decidieron que era preferible que el metal se entregase en forma de complejo metálico permeable en las células con el fin de asegurar que el metal actúe en la célula en lugar de en el entorno extracelular. Además, se descubrió que con el fin de asegurar que el metal se entregase a la célula era preferible que el complejo metálico permeable en las células fuese lo suficientemente estable de manera que tras la administración a un sujeto el metal no se libere en el medio ambiente extracelular. Una ventaja adicional del uso de complejos metálicos por encima del ion metálico "desnudo" es que el suministro del metal puede dirigirse lo que reduce la posibilidad de que se observen efectos secundarios no deseados (por ejemplo, la toxicidad del cobre). Una serie de complejos metálicos satisface estos criterios.

Un grupo atractivo de complejos metálicos para su uso en los métodos de la presente invención son complejos

metálicos de ligandos de bis(tiosemicarbazona) (BTSC) que se han investigado como metalofármacos y han demostrado que tiene una amplia gama de actividades farmacológicas. En particular, el interés reciente se ha centrado en el uso de ligandos de BTSC como vehículos para el suministro selectivo de isótopos radiactivos de cobre a tejido hipóxico y leucocitos en el desarrollo de radiofármacos. Los complejos de cobre(II)-BTSC son complejos estables ($\log K = 10^{18}$) neutros, de bajo peso molecular, capaces de cruzar membranas celulares. En algunos casos, una vez dentro de las células el cobre(II) es reducido por reductores intracelulares a Cu(I) que posteriormente se disocia del ligando. Otros complejos de Cu(II)-BTSC son más resistentes a la reducción y la disociación, y solo quedan atrapados en células hipóxicas. Esta selectividad es, en particular, sensible a la cantidad de grupos alquilo unidos a la cadena principal de diimina del ligando. Por ejemplo, la cobre(II)diacetilbis(N(4)-metiltiosemicarbazona) [Cu(ATSM)] con dos sustituyentes metilo en la cadena principal, es selectiva para células hipóxicas mientras que el cobre de [Cu(GTSM)] queda atrapado en todas las células. La selectividad de las células hipóxicas se ha correlacionado con el potencial de reducción Cu(II)/Cu(I), [Cu(ATSM)] es 160 mV más difícil de reducir que [Cu(GTSM)], pero las diferencias en pKa y la estabilidad del estado reducido también puede ser importante.

Los complejos [Cinc(BTSC)] también son capaces de transportar cinc dentro de las células y un informe reciente usó la fluorescencia intrínseca de ciertos complejos [Zn(BTSC)] para investigar la distribución intracelular de los complejos a través de microscopía de fluorescencia en varias estirpes celulares de cáncer. La localización subcelular era una función sensible de los sustituyentes de nitrógeno terminales en los complejos y tipos celulares, variando de predominantemente nucleolar a lisosomal. El cinc es fundamental para una serie de vías de señalización celular incluyendo la modulación de la actividad del receptor de NMDA, la expresión de metalotieneína y la activación de las vías de transducción de señales mediadas por la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) y, por tanto, la captación de Zn-BTSC podría tener efectos complejos sobre la señalización celular corriente abajo mediada por metal.

Por tanto, se consideró que los complejos metálicos de BTSC de este tipo eran atractivos como potenciales complejos metálicos permeables en las células para su uso en los métodos de la invención. Los complejos de BTSC-metal tienen varias propiedades que los hacen dignos de investigación como agentes terapéuticos potenciales para el tratamiento de afecciones relacionadas con el estrés oxidativo, incluyendo trastornos neurodegenerativos tales como la enfermedad de Alzheimer. Los órganos y la distribución tisular de estos tipos de materiales están bien caracterizados, se sabe que varios complejos de BTSC son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica y no hay ninguna toxicidad de clase inherente con estos complejos. Es importante destacar que los ligandos pueden modificarse fácilmente mediante la variación de la naturaleza y el número de sustituyentes alquilo sobre el ligando y estas modificaciones pueden permitir el control sutil de la dirección subcelular y las propiedades de liberación/retención de metal.

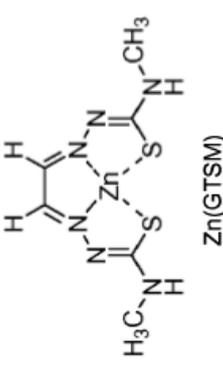
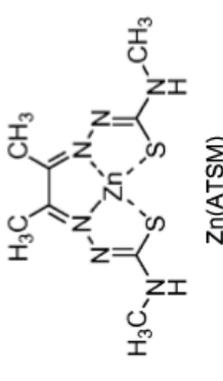
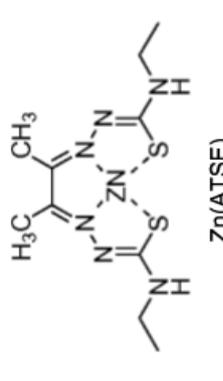
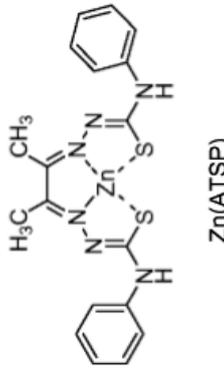
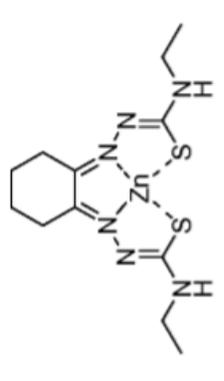
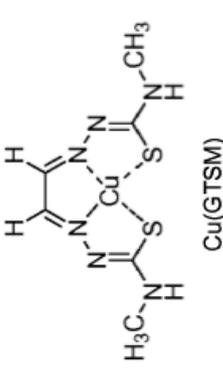
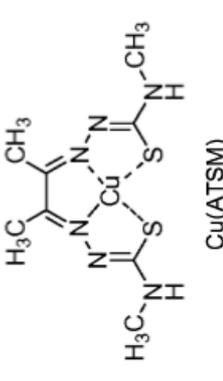
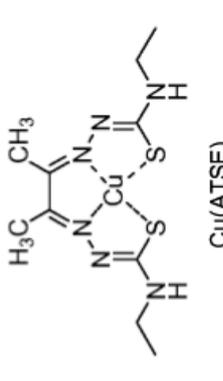
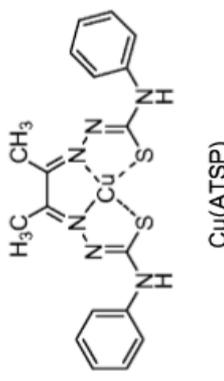
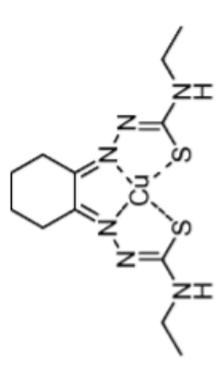
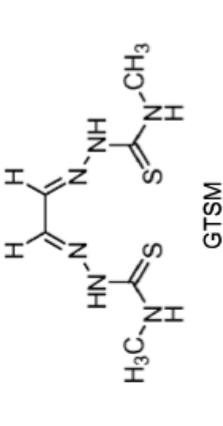
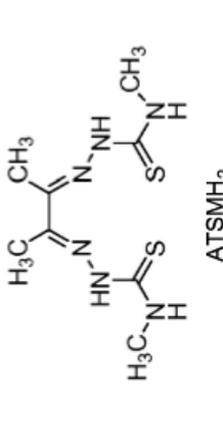
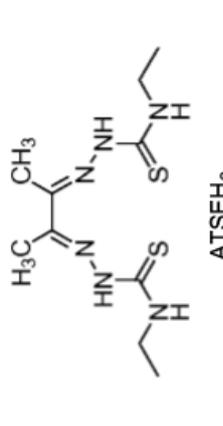
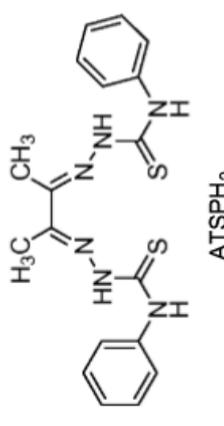
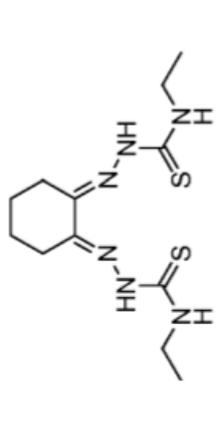
Además, los complejos son atractivos ya que diferentes complejos metálicos tienen diferentes modos de liberación de metal en la célula, abriendo potencialmente el camino para el uso selectivo de diferentes complejos metálicos para diferentes aplicaciones. Por ejemplo, los complejos de cinc y cobre aumentan el metal biodisponible a través de diferentes mecanismos.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se considera que en el caso de los complejos de cinc las constantes de asociaciones se han medido como del orden de 10^{7-8} . Como tales, estos complejos permeables en las células son lo suficientemente estables para entrar eficazmente en la célula ya que son suficientemente estables en la matriz extracelular. Una vez dentro de la célula se cree que el cinc se libera del ligando debido a una mayor competencia con ligandos intracelulares (y quizás el $[Zn^{2+}]$ disminuye). Esto, por tanto, en última instancia conduce a metal biodisponible en la célula.

Por el contrario, se considera que los complejos de cobre liberan su metal a través de un mecanismo diferente. Las constantes de estabilidad de complejos de BSTC de cobre se han medido como del orden de 10^{18} . Ambos [Cu(ATSM)] y [Cu(GTSM)] tienen constantes de estabilidad similares para el Cu(II). En lo que difieren es en sus potenciales de reducción. Para [Cu(ATSM)] $E_{1/2} = -0,59$ V mientras que para [Cu(GTSM)] $E_{1/2} = 0,43$ V, esto significa que es más fácil reducir Cu(II) a Cu(I) en [Cu(GTSM)]. Esto es resultado de la modificación de la cadena principal del ligando (R^3 y R^4). Los grupos metilo de ATSM son donadores de electrones y hacen más difícil reducir a Cu(I). Una vez que [Cu(GTSM)] entra en la célula se reduce a Cu(I) a través de agentes reductores de células. El complejo de Cu(I) es menos estable que el complejo de Cu(II) y el metal se disocia del ligando haciendo el cobre biodisponible como (Cu(I) o Cu(II)). En el caso de [Cu(II)ATSM] el cobre no se libera debido a su mayor resistencia a la reducción y a la transmetalación. Además, los complejos de este tipo eran atractivos ya que no solo tienen diferentes mecanismos de liberación del metal dependiendo del ion metálico elegido, algunos de los complejos son de manera que no liberan el metal en absoluto y por lo que pueden usarse en circunstancias en las no es deseable suministrar el metal en forma de un catión metálico, sino que es deseable suministrar el metal en forma de un metal unido todavía en complejo con el ligando.

Por tanto, inicialmente se sintetizó una serie de complejos metálicos de este tipo para examinar su comportamiento.

Los ligandos y complejos seleccionados para el estudio inicial fueron como se indican a continuación:

 <p>Zn(GTSM)</p>	 <p>Zn(ATSM)</p>	 <p>Zn(ATSE)</p>	 <p>Zn(ATSP)</p>	
 <p>Cu(GTSM)</p>	 <p>Cu(ATSM)</p>	 <p>Cu(ATSE)</p>	 <p>Cu(ATSP)</p>	
 <p>GTSM</p>	 <p>ATSMH₂</p>	 <p>ATSEH₂</p>	 <p>ATSPH₂</p>	

ChexTSEH ₂	Cu(ChexTSE)	Zn(ChexTSE)
-----------------------	-------------	-------------

ACTIVIDAD BIOLÓGICA**CAPTACIÓN DE METAL CELULAR**

5 Se descubrió que el tratamiento de células de ovario de hámster chino transfectadas con APP (APP-CHO) tanto con Cu (BTSC) como con Zn (BTSC) aumentó los niveles de metal celular demostrando la captación de los complejos de BTSC-metal. Esto apoya la teoría de que los complejos son suficientemente estables en la matriz extracelular para permitir que el metal se entregue a la célula. De este modo, fue posible demostrar que los complejos de este tipo
10 eran complejos candidatos que podrían usarse para suministrar metal a la célula sin el riesgo de liberar el metal del complejo en la matriz extracelular lo que conduce a los efectos adversos observados por otros que han enseñado que los metales tales como el cinc deberían reducirse en la matriz extracelular.

El tratamiento de células (APP-CHO) con una gama de complejos [(Cu BTSC) con cadenas principales de dialquilo a 1-50 μM durante 6 horas dio como resultado aumentos significativos en los niveles de cobre intracelulares cuando se
15 compara con el tratamiento con ligandos libres o cobre solo y los resultados se muestran en la **Figura 1**. Esto sugiere que el complejo es importante en el transporte del metal a través de la membrana celular. Los niveles de cobre más altos fueron inducidos por el tratamiento con [Cu(ATSM)], lo que dio como resultado un aumento de 177 ± 9 veces en los niveles de cobre celular en comparación con las células de control sin tratar. Esto corresponde a un nivel de cobre celular de 4,5 ng/mg de proteína y 796 ng/mg de proteína para las células de control y tratadas con [Cu(ATSM)], respectivamente. Los otros tres complejos [Cu(BTSC)] dieron como resultado aumentos de 90-115
20 veces en los niveles de cobre celular.

Los complejos de Zn-BTSC son menos estables que sus complejos de cobre (derivados relacionados que tienen constantes de asociación del orden de $\log K = 7$, pero aún son capaces de transportar Cinc eficazmente en la célula.
25 El tratamiento de células con complejos [Zn(BTSC)] dio como resultado aumentos significativos en los niveles intracelulares de cinc, según se mide por EM-PAI (Figura 2). [Zn(ATSM)] y [Zn(ATSE)] indujeron un aumento de $8,2 \pm 0,25$ y $9,8 \pm 0,9$ veces de los niveles de cinc celular respectivamente (**Figura 2**). Los datos obtenidos indicaron que los complejos eran capaces de suministrar metales a las células y de este modo la atención se volvió a la investigación de una serie de sistemas biológicos en los que se preveía que el suministro de metal podría ser útil.
30

REDUCCIÓN DE LOS NIVELES DE BETA AMILOIDE EXTRACELULAR

El tratamiento de las células APP-CHO con [Cu(GTSM)] dio como resultado un aumento en los niveles intracelulares de cobre como se esperaba del ligando de Cu permeable en las células. También hubo una reducción dependiente
35 de la dosis de los niveles extracelulares de A β 1-40 (amiloide β). La concentración de A β 1-40 fue de $0,70 \text{ ng ml}^{-1}$ en células sin tratar. El tratamiento con [Cu(GTSM)] $1 \mu\text{M}$ reduce esto a $0,43 \text{ ng ml}^{-1}$ (**Figura 3**). Los niveles de A β 1-40 se redujeron adicionalmente a niveles insignificantes después del tratamiento con [Cu(GTSM)] $50 \mu\text{M}$. La reducción muy pequeña en los niveles de A β 1-40 que eran evidentes después de la administración del ligando (GTSMH $_2$) a las células era más probable debido a la formación de [Cu(GTSM)] o [Zn(ATSM)] a partir de trazas de metales en el medio de cultivo.
40

La menor estabilidad de los complejos de Zn-BTSC significa que son más susceptibles a la transquelación intracelular que sus análogos de cobre y, por tanto, podrían elevar los niveles de cinc biodisponible dentro de las células. Los niveles elevados de cinc en las células tratadas con complejos [Zn(BTSC)] se correlacionaron con una
45 reducción de los niveles extracelulares de A β 1-40. La concentración de A β 1-40 en el medio de las células sin tratar era de $0,6-0,8 \text{ ng ml}^{-1}$ y se redujo a menos de $0,2 \text{ ng ml}^{-1}$ después del tratamiento con [Zn(BTSC)] $25 \mu\text{M}$. Los diferentes complejos [Zn(BTSC)] presentaron algunas diferencias detectables en la reducción dependiente de la dosis de A β 1-40. El tratamiento con [Zn(ATSE)] y [Zn(ChexTSE)] dio como resultado mayores reducciones en una dosis más baja ($1 \mu\text{M}$) en comparación con los otros dos complejos, [Zn(ATSM)] y [Zn(ATSP)] (**Figura 4**). Esto
50 podría reflejar diferentes afinidades de unión o una localización subcelular alternativa y, posteriormente, iniciar diferentes vías de señalización celular mediadas por metal. Los resultados demostraron claramente que los complejos de cinc fueron muy eficaces en la reducción de la concentración extracelular de amiloide β .

TRATAMIENTO DE CÉLULAS CON COMPLEJOS DE CINCO EN PRESENCIA DE COBRE

55 Se sabía que el cobre puede transmetalizar complejos [Zn(BTSC)]. Por tanto, si se administrasen complejos [Zn(BTSC)] al medio de cultivo en presencia de Cu^{2+} exógeno, se esperaría que se formasen complejos [Cu(BTSC)]. Para examinar esto, las células se expusieron a [Zn(ATSE)] o [Zn(ATSP)] $10 \mu\text{M}$ con o sin Cu^{2+} $5-50 \mu\text{M}$ durante 6 h. El tratamiento de células con [Zn(ATSE)] $10 \mu\text{M}$ solo dio como resultado un aumento de $9,7 \pm 0,7$ veces en los
60 niveles de cinc celular en comparación con los cultivos sin tratar (**Figura 5**). En comparación, el tratamiento con [Zn(ATSE)] $10 \mu\text{M}$ en presencia de Cu^{2+} $10 \mu\text{M}$ solo dio como resultado un aumento de $2,9 \pm 0,3$ veces en el cinc intracelular (**Figura 5**). Se observaron efectos similares para [Zn(ATSP)] en presencia de Cu^{2+} . Estos datos indican fuertemente que la transmetalación de una proporción de los complejos de cinc para proporcionar los complejos de Cu^{2+} análogos disminuyó la cantidad de cinc transportada en la célula.
65

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA CAPTACIÓN DE METAL.

Se realizó un estudio en el que las células se expusieron a diferentes concentraciones de uno de los complejos de la invención en una serie de concentraciones diversas y en cualquiera de 4 o 37 °C. Los resultados como se muestran en **las Figuras 6 y 7** que indican claramente que la captación celular depende de la temperatura y puede tener un efecto significativo sobre el nivel de amiloide β . El tratamiento de las células a 37 °C da como resultado un alto nivel de absorción de metales lo que da como resultado la pérdida de amiloide β extracelular. La incubación de las células a 4 °C da como resultado una captación sustancialmente menor de metales y, por tanto, efectos reducidos sobre el amiloide β extracelular. Los resultados indican que es probable que la captación de metales, por tanto, sea un proceso activo, en lugar de pasivo y podría proporcionar la oportunidad de dirigir receptores específicos de metal-BTSC para mejorar la eficacia de los complejos.

Como los complejos iniciales se mostraron prometedores, se sintetizó una serie de complejos adicionales con el fin de investigar la actividad de la familia de complejos. Estos complejos se sintetizaron y después se sometieron a ensayos de ratón in vivo para determinar una serie de propiedades biológicas de los complejos.

INVESTIGACIÓN DE VÍAS BIOLÓGICAS

Indicando los resultados claramente que no hubo captación de metal en las células, se realizó una investigación para determinar las vías pertinentes que condujeron al resultado observado. Se trataron células APP-CHO con complejos metal-BTSC 10 μ M durante 6 horas y se examinaron lisados celulares para determinar la activación de las vías de señalización PI3K y MAPK. CuATSP y CuATSE no indujeron la activación de PI3K (fosforilación de Akt) o JNK (**Figura 8A**). En contraste, [Zn(ATSE)] y [Zn(ATSM)] indujeron los dos Akt y JNK activados (**Figura 8A**). La activación de PI3K-Akt por [Zn(ATSE)] también indujo la fosforilación (desactivación) corriente abajo de GSK3, así como el aumento de la expresión de GSK3 (**Figura 8B**).

Curiosamente, [Zn(ATSP)] no indujo la activación de Akt o JNK (**Figura 8A**), aunque se observó un pequeño aumento en la expresión de GSK3 (**Figura 8B**).

MÉTODOS DE TRATAMIENTO, MEJORA Y/O PROFILAXIS

Los complejos de la invención han demostrado ser eficaces como agentes de entrega de metal, en particular agentes para el suministro de metal a las células. En consecuencia, los complejos descritos en el presente documento pueden usarse en el tratamiento o la profilaxis de una serie de afecciones en las que el suministro de metal puede prevenir, aliviar o mejorar la afección.

Existe una serie de afecciones de este tipo. Un ejemplo de afecciones de este tipo es una afección asociada a o provocada por el estrés oxidativo. Se sabe que muchos de los mecanismos antioxidantes biológicos protectores implican enzimas catalizadas por metal y, por tanto, el suministro de metal puede servir para estimular o reiniciar la actividad de los mecanismos antioxidantes biológicos lo que conduce a que se consiga un efecto global antioxidante. En una realización, la afección asociada a o provocada por el estrés oxidativo se selecciona entre el grupo que consiste en enfermedades cardiovasculares, cánceres, cataratas, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedades priónicas incluyendo la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) y enfermedades cardíacas, esclerosis amiotrófica lateral amiloidógena (ELA), encefalopatías espongiiformes transmisibles por priones (EET), cataratas, trastornos mitocondriales, enfermedad de Menke, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington.

En otra realización, el trastorno es un trastorno neuromuscular seleccionado entre el grupo que consiste en esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad mitocondrial/metabólica y ataxia de Friedreich.

En una realización, la afección es una afección neurológica o un trastorno neurodegenerativo.

La expresión "afección neurológica" se usa en el presente documento en su sentido más amplio y se refiere a afecciones en las que diversos tipos celulares del sistema nervioso están degenerados y/o se han dañado como resultado de trastornos neurodegenerativos o lesiones o exposiciones. En particular, pueden usarse complejos de fórmula (I) para el tratamiento de afecciones resultantes, en las que se ha producido daño a las células del sistema nervioso debido a intervenciones quirúrgicas, infecciones, exposición a agentes tóxicos, tumores, déficits nutricionales o trastornos metabólicos. Además, el complejo de fórmula (I) puede usarse para el tratamiento de las secuelas de trastornos neurodegenerativos, tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple, la esclerosis lateral amiotrófica, la epilepsia, el abuso de fármacos o la drogadicción (alcohol, cocaína, heroína, anfetamina o similar), trastornos de la médula espinal, distrofia o degeneración de la retina neural (retinopatías) y neuropatías periféricas, tales como la neuropatía diabética y/o las neuropatías periféricas inducidas por toxinas.

La expresión "trastorno neurodegenerativo" como se usa en el presente documento se refiere a una anomalía en la que la integridad neuronal está amenazada. La integridad neuronal puede estar amenazada cuando las células

neuronales presentan una disminución de la supervivencia o cuando las neuronas ya no pueden propagar una señal.

Las afecciones neurológicas que pueden tratarse con los complejos de la presente invención incluyen porfiria intermitente aguda; cardiomiopatía inducida por adriamicina; demencia del SIDA y neurotoxicidad inducida por VIH-1; EA; ELA; aterosclerosis; cataratas; isquemia cerebral; parálisis cerebral; tumor cerebral; daño de órganos inducido por quimioterapia; nefrotoxicidad inducida por cisplatino; cirugía de derivación de la arteria coronaria; ECJ y su nueva variante asociada a la enfermedad de las "vacas locas"; neuropatía diabética; síndrome de Down; ahogo; epilepsia y epilepsia post-traumática; ataxia de Friedrich; demencia frontotemporal; glaucoma; glomerulopatía; hemocromatosis; hemodiálisis; hemólisis; síndrome urémico hemolítico (enfermedad de Weil); enfermedad de Menke; ictus hemorrágico; enfermedad de Hallerboden-Spatz; ataque cardíaco y lesión por reperfusión; EH; enfermedad de los cuerpos de Lewy; claudicación intermitente; ictus isquémico; enfermedad inflamatoria intestinal; degeneración macular; malaria; toxicidad inducida por etanol; meningitis (aséptica y tuberculosa); enfermedad de las neuronas motoras; esclerosis múltiple; atrofia sistémica múltiple; isquemia miocárdica; neoplasia; enfermedad de Parkinson; asfixia perinatal; enfermedad de Pick; parálisis progresiva supranuclear; daño de órganos inducido por radioterapia; reestenosis tras angioplastia; retinopatía; demencia senil; esquizofrenia; septicemia; choque séptico; encefalopatías espongiiformes; hemorragia subaracnoidea/vasoespasmo cerebral; hematoma subdural; traumatismo quirúrgico, incluyendo neurocirugía; talasemia; ataque isquémico transitorio (AIT); trasplante; demencia vascular; meningitis vírica; y encefalitis vírica.

Adicionalmente, los complejos descritos en el presente documento también pueden usarse para potenciar los efectos de otros tratamientos, por ejemplo, para potenciar los efectos neuroprotectores del factor de crecimiento nervioso derivado del cerebro.

Los complejos descritos en el presente documento también pueden usarse para tratar la anemia, la neutropenia, la mielopatía por deficiencia de cobre, el síndrome de deficiencia de cobre y la hipercincemia.

Los tratamientos descritos en el presente documento se refieren en particular a afecciones que inducen daño oxidativo del sistema nervioso central, incluyendo trastornos neurológicos agudos y crónicos tales como, isquemia cerebral, ictus (isquémico y hemorrágico), hemorragia subaracnoidea/vasoespasmo cerebral, tumor cerebral, EA, ECJ y su nueva variante asociada a la enfermedad de las "vacas locas", DH, EP, ataxia de Friedrich, cataratas, demencia con formación de cuerpos de Lewy, atrofia sistémica múltiple, enfermedad de Hallerboden-Spatz, enfermedad de cuerpos de Lewy difusos, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de las neuronas motoras, esclerosis múltiple, insomnio familiar mortal, enfermedad de Gertsman Straussler Sheinker y hemorragia cerebral hereditaria de tipo amiloidosis-holandesa.

Más en particular, en el presente documento se describe en general el tratamiento de la amiloidosis neurodegenerativa. La amiloidosis neurodegenerativa puede ser cualquier afección en la que el daño neurológico da como resultado la deposición de amiloide. El amiloide puede formarse a partir de diversos precursores de proteína o polipéptido, incluyendo pero no limitado a A β , sinucleína, huntingtina o proteína priónica.

Por tanto, la afección en una realización se selecciona entre el grupo que consiste en EA esporádica o familiar, ELA, enfermedad de las neuronas motoras, cataratas, EP, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob y su nueva variante asociada a la enfermedad de las "vacas locas", DH, demencia con formación de cuerpos de Lewy, atrofia multisistémica, enfermedad de Hallerboden-Spatz y enfermedad de cuerpos de Lewy difusos.

En una realización específica, la amiloidosis neurodegenerativa es una afección relacionada con A β , tal como EA o la demencia asociada al síndrome de Down o una de varias formas de formas dominantes autosómicas de EA familiar (revisado en St George-Hyslop, 2000). Más preferentemente, la afección relacionada con A β es la EA.

En un aspecto específico, antes del tratamiento el sujeto tiene la función cognitiva moderada o gravemente deteriorada, como se evaluó mediante el ensayo de Escala de Evaluación de la EA (EEEA)-cog, por ejemplo un valor de EEEA-cog de 25 o mayor.

Además de ralentizar o detener el deterioro cognitivo de un sujeto, los métodos complejos y descritos en el presente documento también pueden ser adecuados para su uso en el tratamiento o la prevención de afecciones neurodegenerativas, o pueden ser adecuados para su uso en el alivio de los síntomas de afecciones neurodegenerativas. Si se administran a un sujeto que ha sido identificado como que tiene un mayor riesgo de predisposición a afecciones neurodegenerativas o a un sujeto que muestra manifestaciones preclínicas de deterioro cognitivo, tal como Deterioro Cognitivo Leve o deterioro cognitivo progresivo mínimo, estos métodos y compuestos pueden ser capaces de prevenir o retrasar la aparición de síntomas clínicos, además del efecto de retardar o reducir la tasa de deterioro cognitivo.

Actualmente la EA y otras demencias, por lo general, no se diagnostican hasta que han aparecido uno o más síntomas de advertencia. Estos síntomas constituyen un síndrome conocido como Deterioro Cognitivo Leve (DCL), que recientemente ha sido definido por la Academia Americana de Neurología y se refiere al estado clínico de los individuos que tienen alteraciones de la memoria, pero que por lo demás funcionan bien, y que no cumplen criterios

clínicos para la demencia (Petersen et al., 2001). Los síntomas del DCL incluyen:

- (1) Pérdida de memoria que afecta a las habilidades de trabajo
- (2) Dificultad para realizar tareas familiares
- 5 (3) Problemas con el lenguaje
- (4) Desorientación en cuanto a tiempo y lugar (perdersse)
- (5) Empobrecimiento o disminución del juicio
- (6) Problemas con el pensamiento abstracto
- (7) Perder cosas
- 10 (8) Cambios en el humor o el comportamiento
- (9) Cambios en la personalidad
- (10) Pérdida de iniciativa.

El DCL puede detectarse usando ensayos de detección cognitiva convencionales, tal como el Mini Examen del Estado Mental y el Estudio de Alteración de la Memoria y las baterías de detección neuropsicológica.

Otra afección que puede ser susceptible de ser tratada mediante el suministro de metal es el cáncer. El término "cáncer" describe cualquier conjunto de diferentes enfermedades vinculadas por múltiples mutaciones genéticas acumuladas, que dan como resultado la activación de oncogenes y/o la inactivación de genes supresores de tumores y/o vinculados por una proliferación celular incontrolada. La causa y el origen de estas mutaciones difieren entre los diferentes cánceres de órganos del cuerpo humano.

Métodos descritos en general en el presente documento se refieren en particular al cáncer cerebral, el cual incluye un tumor cerebral. Un cáncer o tumor cerebral puede ser un tumor cerebral glioma o no glioma. El término "cáncer" y "tumor" pueden usarse indistintamente en el presente documento. "Cáncer" puede incluir cualquiera de los siguientes estados: glioma, adenoma, blastoma, carcinoma, sarcoma e incluso uno cualquiera de meduloblastoma, ependimoma, astrocitoma, glioma del nervio óptico, glioma del tronco encefálico, oligodendroglioma, gangliogliomas, craneofaringioma o tumores de la región pineal. La referencia a un "glioma" incluye GMB, astrocitoma y astrocitoma anaplásico o cánceres cerebrales relacionadas.

Los complejos descritos en el presente documento también pueden ser susceptibles de utilizarse para tratar trastornos relacionados con tau. La proteína Tau es una proteína importante ya que es la proteína expresada en el sistema nervioso central y desempeña un papel crítico en la arquitectura neuronal estabilizando la red de microtúbulos intracelulares. En consecuencia, cualquier deterioro del papel fisiológico de la proteína tau, ya sea por truncamiento, hiperfosforilación o por perturbación del equilibrio entre las seis isoformas de tau de origen natural es perjudicial para el sujeto y conduce a la formación de ovillos neurofibrilares (ONF), neuritas distróficas y hebras de neuropilo. La principal subunidad proteínica de estas estructuras es la proteína tau asociada a microtúbulos. La cantidad de ONF descubiertos en autopsias de pacientes con EA se correlaciona con los síntomas clínicos incluyendo el deterioro intelectual. En consecuencia, la proteína tau desempeña un papel crítico en las características anatomopatológicas de la EA. El reciente descubrimiento de la cosegregación de mutaciones específicas en el gen tau con la enfermedad de demencia frontotemporal con Parkinsonismo vinculado al cromosoma 17 (FTDP-17) ha confirmado que ciertas anomalías en la proteína tau pueden ser una causa principal de neurodegeneración y demencia en los individuos afectados.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna se considera que la actividad de los complejos descritos en el presente documento para reducir los niveles de fosforilación de tau es resultado de su capacidad para suministrar metal a las células y, por tanto, de su actividad antioxidante. Se considera que la capacidad de los complejos para actuar como antioxidantes significa que proporcionan protección frente al EO que es deseable ya que el EO puede conducir a la hiper-fosforilación de tau y la disfunción celular. Como consecuencia, la capacidad de estos complejos para suministrar metales biológicamente importantes a las células les permite actuar como antioxidantes (especialmente cuando el estrés oxidativo es causado por la deficiencia de metales) lo que a su vez significa que los complejos metálicos pueden tener la capacidad de evitar (o tratar) tau-opatías.

Existe una serie de trastornos o afecciones que se reconocen como trastornos de tau o, más coloquialmente, Tauopatías. Los trastornos de este tipo incluyen el síndrome de Richardson, la parálisis supranuclear progresiva, la enfermedad de grano agrirófilo, la degeneración corticobasal, la enfermedad de Pick, la demencia frontotemporal vinculada con parkinsonismo vinculado al cromosoma 17 (FTDP-17), el parkinsonismo postencefalítico (PPE), la demencia pugilística, el síndrome de Down, la enfermedad de Alzheimer, la demencia familiar británica, la demencia familiar danesa, la enfermedad de Parkinson, el complejo de la enfermedad de Parkinson de Guam (CEP), la distrofia miotónica, la enfermedad de Hallevorden-Spatz y el Niemann-Pick de tipo C.

Los complejos también pueden usarse en el tratamiento de un trastorno relacionado con Abeta. Se conoce una serie de trastornos de Abeta incluyendo trastornos seleccionados entre el grupo que consiste en la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple, neuropatías, la enfermedad de Huntington, la enfermedad priónica, la enfermedad de las neuronas motoras, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la enfermedad de Menke y la amiloidosis.

Como también se ha demostrado que los complejos de la invención son capaces de suministrar metal a las células, tienen la capacidad de influir en las metaloproteinasas de matriz (MPM). Las metaloproteinasas de matriz (MPM) son una familia de endopeptidasas, secretadas o ancladas a la membrana, dependientes de cinc y calcio, que desempeñan una serie de funciones biológicas importantes. Las MPM están implicadas en muchos procesos fisiológicos, pero también participan en los mecanismos fisiopatológicos responsables de una amplia gama de enfermedades. La expresión patológica y la activación de MPM se asocian al cáncer, la aterosclerosis, el ictus, la artritis, la enfermedad periodontal, la esclerosis múltiple y la fibrosis hepática. En consecuencia, los complejos descritos en el presente documento tienen el potencial de influir en estas afecciones.

10 ADMINISTRACIÓN DE COMPLEJOS

La administración de complejos dentro de la Fórmula (I) a seres humanos puede ser por cualquiera de los modos de administración aceptados bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden administrarse mediante administración enteral, tal como oral o rectal, o por administración parenteral tal como subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica. La inyección puede ser en bolo o mediante infusión constante o intermitente. El complejo activo normalmente está incluido en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y en una cantidad suficiente para administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz.

En el uso de los complejos de la invención pueden administrarse en cualquier forma o modo que haga al complejo biodisponible. Un experto en la materia de preparar formulaciones puede seleccionar fácilmente la forma y el modo de administración dependiendo de las características particulares del complejo seleccionado, la afección que se trata, la etapa de la afección que se trata y otras circunstancias relevantes. Se refiere al lector a *Remingtons Pharmaceutical Sciences*, 19ª edición, Mach Publishing Co. (1995) para más información.

Los complejos de la presente invención pueden administrarse solos o en forma de una composición farmacéutica en combinación con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los complejos, sin embargo, normalmente se usan en forma de composiciones farmacéuticas que se formulan dependiendo del modo de administración deseado. Como tal, en una realización adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que incluye un complejo de Fórmula (I) y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones se preparan de maneras bien conocidas en la técnica.

La invención, en otras realizaciones, proporciona un paquete o kit farmacéutico que incluye uno o más recipientes rellenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. En un paquete o kit de este tipo puede encontrarse un recipiente que tenga una unidad de dosificación del agente o agentes. Los kits pueden incluir una composición que incluya un agente eficaz ya sea como concentrados (incluyendo composiciones liofilizadas), que pueden diluirse adicionalmente antes de su uso o que pueden proporcionarse a la concentración de uso, donde los viales pueden incluir una o más dosis. Convenientemente, en los kits, pueden proporcionarse dosis individuales en viales estériles de modo que el médico pueda emplear los viales directamente, donde los viales tendrán la cantidad y la concentración deseadas del agente o agentes. Asociados a dicho recipiente o recipientes puede haber diversos materiales escritos tales como instrucciones de uso, o un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, aviso que refleje la aprobación por la agencia de fabricación, el uso o la venta para la administración en seres humanos.

Los complejos de la invención pueden usarse o administrarse en combinación con uno o más fármacos que son útiles para el tratamiento de la enfermedad/enfermedades mencionadas. Los componentes pueden administrarse en la misma formulación o en formulaciones separadas. Si se administran en formulaciones separadas, los complejos de la invención pueden administrarse secuencialmente o simultáneamente con el otro fármaco o fármacos.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención para inyección parenteral comprenden soluciones estériles acuosas o no acuosas, dispersiones, suspensiones o emulsiones farmacéuticamente aceptables, así como polvos estériles para su reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso. Los ejemplos de excipientes, diluyentes, disolventes o vehículos, acuosos y no acuosos, adecuados, incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tales como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos puede asegurarse mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos tales como azúcares, cloruro de sodio y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede provocarse mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Si se desea, y para una distribución más eficaz, los complejos pueden incorporarse en sistemas de entrega de liberación lenta o dirigidos, tales como matrices poliméricas, liposomas y microesferas.

5 Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias o mediante la incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril justo antes de su uso.

10 Las formas de dosificación sólidas para la administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas de dosificación sólidas, el complejo activo se mezcla con al menos un excipiente o vehículo inerte farmacéuticamente aceptable tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o a) cargas o diluyentes tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábica, c) humectantes tales como glicerol, d) agentes disgregantes tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio, e) agentes retardantes de la disolución tales como parafina, f) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, h) absorbentes tal como caolín y arcilla de bentonita e i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio y mezclas de los mismos. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación también puede comprender agentes tamponantes.

20 También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

25 Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y cubiertas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. Pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y también pueden ser de una composición de manera que liberen el principio o principios activos solamente, o preferentemente, en una parte determinada del tracto intestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Los ejemplos de composiciones de
30 inclusión que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras.

Si se desea, y para una distribución más eficaz, los complejos pueden incorporarse en sistemas de entrega de liberación lenta o dirigidos, tales como matrices poliméricas, liposomas y microesferas.

35 Los complejos activos pueden estar también en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes mencionados anteriormente.

40 Las formas de dosificación líquidas para la administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los complejos activos, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes utilizados habitualmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfúrico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano y mezclas de los mismos.

45 Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes.

50 Las suspensiones, además de los complejos activos, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

55 Son composiciones para la administración rectal o vaginal, preferentemente, los supositorios que pueden prepararse mezclando los complejos de la presente invención con excipientes o vehículos no irritantes adecuados tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorio que son sólidos a temperatura ambiente, pero líquidos a la temperatura corporal y, por tanto, funden en el recto o la cavidad vaginal y liberan el complejo activo.

60 Las formas de dosificación para la administración tópica de un complejo de la presente invención incluyen polvos, parches, aerosoles, pomadas e inhalantes. El complejo activo se mezcla en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y cualquier conservante, tampón o propulsor que pueda necesitarse.

65 La cantidad de complejo administrado preferentemente va a tratar y reducir o aliviar la afección. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede determinarse fácilmente por un médico especialista mediante el uso de técnicas convencionales y observando los resultados obtenidos en circunstancias análogas. En la determinación de la cantidad terapéuticamente eficaz debe considerarse una serie de factores incluyendo, pero no limitados a, la especie de animal, su tamaño, edad y salud general, la afección específica implicada, la gravedad de la afección, la

respuesta del sujeto al tratamiento, el complejo particular administrado, el modo de administración, la biodisponibilidad de la preparación administrada, el régimen de dosis seleccionado, el uso de otros medicamentos y otras circunstancias relevantes.

- 5 Una dosificación preferida será un intervalo de aproximadamente 0,01 a 300 mg por kilogramo de peso corporal por día. Una dosificación más preferida estará en el intervalo de 0,1 a 100 mg por kilogramo de peso corporal por día, más preferentemente de 0,2 a 80 mg por kilogramo de peso corporal por día, incluso más preferentemente de 0,2 a 50 mg por kilogramo de peso corporal por día. Una dosis adecuada puede administrarse en múltiples subdosis por día.

10

SÍNTESIS

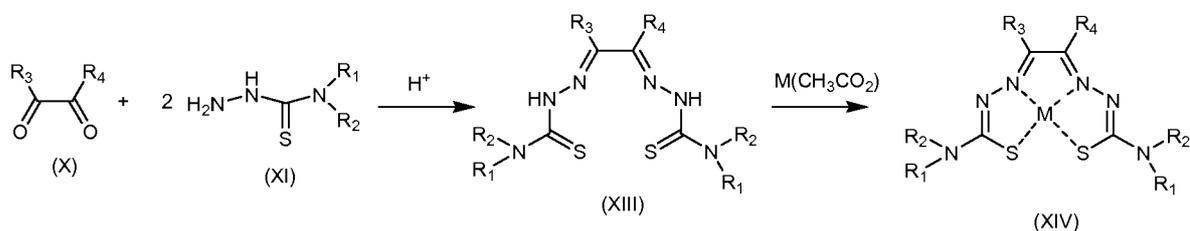
Los complejos de las diversas realizaciones pueden prepararse usando las vías de reacción y esquemas de síntesis como se describen a continuación, empleando las técnicas disponibles en la técnica para cada una de las etapas/reacciones individuales y usando materiales de partida que están fácilmente disponibles. La preparación de complejos particulares de las realizaciones se describe en detalle en los siguientes ejemplos, pero el experto reconocerá que las reacciones químicas descritas pueden adaptarse fácilmente para preparar una serie de otros agentes de las diversas realizaciones. Por ejemplo, la síntesis de complejos no ejemplificados puede realizarse satisfactoriamente mediante modificaciones evidentes para los expertos en la materia, por ejemplo, protegiendo adecuadamente los grupos que interfieren, cambiando a otros reactivos adecuados conocidos en la técnica o haciendo modificaciones habituales de las condiciones de reacción. Una lista de grupos protectores adecuados en la síntesis orgánica puede encontrarse en *Protective Groups in Organic Synthesis* de T.W. Greene, John Wiley & Sons, 1981. Como alternativa, se reconocerá que otras reacciones desveladas en el presente documento o conocidas en la técnica tienen aplicabilidad para preparar otros complejos de las diversas realizaciones.

25

Un esquema adecuado para la producción de algunos de los complejos de la invención se muestra a continuación en el Esquema 1.

Esquema 1 Formación de bis(tiosemicarbazonas) simétricas.

30

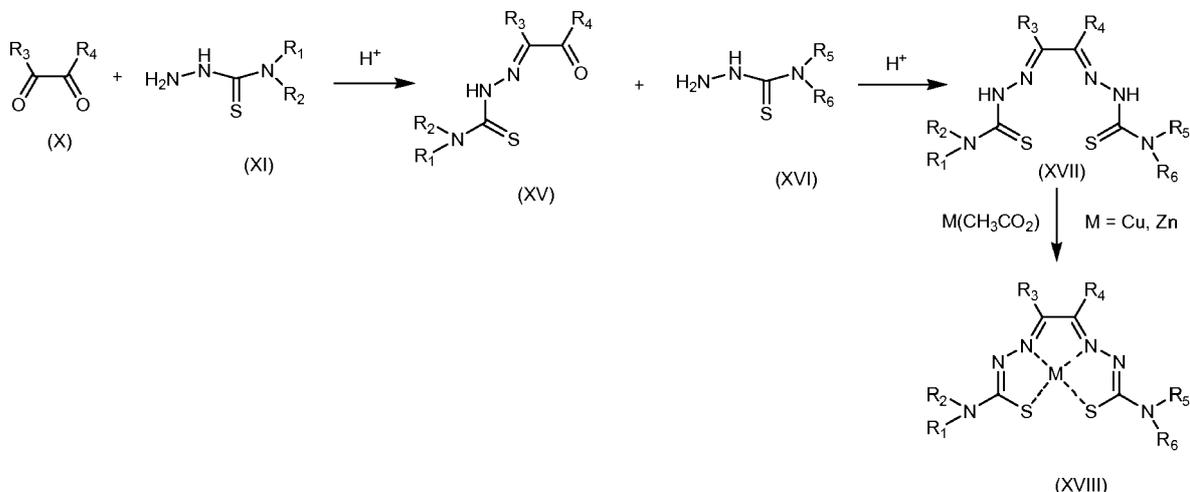


De este modo, la condensación de la diona (X) con dos equivalentes de una tio semicarbazida adecuadamente funcionalizada (XI) en condiciones ácidas conduce a la formación de la bis (tiosemicarbazona) (XIII). Usando el esquema de reacción esbozado la semi carbazida (XIII) resultante será simétrica ya que la mismas tio semicarbazida se condensará con ambos restos aldehído. La bis(tiosemicarbazona) puede hacerse reaccionar con una sal metálica adecuada, tal como el acetato de metal para producir el complejo de metal (XIV) deseado y ácido acético. Puede producirse una amplia diversidad de tiosemicarbazonas mediante la variación de los sustituyentes ya sea en el resto aldehído o en la semicarbazida.

40

Un procedimiento alternativo que es en particular aplicable a (bis semicarbazonas) no simétricas se muestra en el Esquema 2.

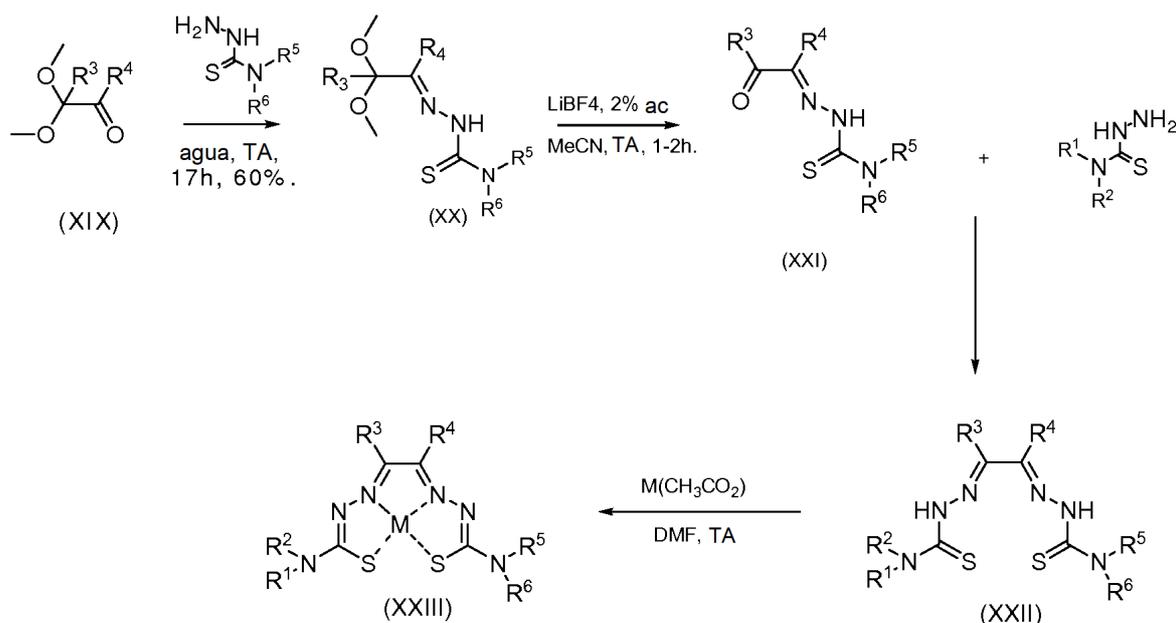
Esquema 2 Formación de bis(tiosemicarbazonas) asimétricas.



- 5 De este modo, como antes, la reacción de un diona (X) con un equivalente de tio semi-carbazona (XI) en condiciones ácidas conduce a la formación del derivado mono tio semicarbazona (XV). Esta, después, puede someterse a condensación con un segundo resto de tiosemicarbazida (XVI) para producir una bis (tiosemicarbazona) (XVII) que de nuevo puede hacerse reaccionar con una sal de metal tal como el acetato de metal para producir el complejo asimétrico (XVIII) deseado. Una vez más, mediante la elección acertada de los materiales de partida (X), (XI) y (XVI)
- 10 puede sintetizarse una amplia diversidad de materiales.

Con ciertas bis tiosemicarbazonas es difícil detener la reacción de formación en la etapa de mono-adición conduciendo a la formación del bis aducto así como material de partida. Si bien esto se desea cuando el producto final es un aducto simétrico, no es deseable en circunstancias en las que se desea un aducto asimétrico. Si bien esto no era un problema con todas las cadenas principales, se observó ciertamente con una serie de los productos que se deseaban producir y, de este modo, se desarrolló un procedimiento alternativo para aductos de este tipo. Por tanto, se desarrolló un procedimiento alternativo que evitaba la formación de este bis aducto en una sola etapa y se muestra en el esquema 3.

Esquema 3 Formación alternativa de bis(tiosemicarbazonas) asimétricas.



- 25 De este modo, la molécula (XIX) se hizo reaccionar con un tiosemicarbazonas para proporcionar el mono-aducto, acetal (XX). El acetal puede escindirse oxidativamente para proporcionar el aldehído (XXI) usando tetrafluoroboracetato de litio, un ácido de Lewis suave. La reacción del aldehído (XXI) con una tiosemicarbazona diferente, proporcionó el ligando asimétrico deseado (XXII), que después se pudo convertir en el complejo metálico

(XXIII) usando las condiciones convencionales.

Ejemplos

- 5 Pueden obtenerse o prepararse reactivos útiles para sintetizar compuestos de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica.

En los ejemplos que se describen a continuación, a menos que se indique lo contrario, todas las temperaturas en la siguiente descripción están en grados Celsius y todas las partes y porcentajes son en peso, a menos que se indique lo contrario.

Se adquirieron diversos materiales de partida y otros reactivos de proveedores comerciales, tales como Aldrich Chemical Company o Lancaster Synthesis Ltd. y se usaron sin purificación adicional, a menos que se indique lo contrario. Se adquirieron tetrahidrofurano (THF) y N,N-dimetilformamida (DMF) de Aldrich en botellas Sureseal y se usaron como se recibieron. Todos los disolventes se purificaron usando métodos convencionales en la técnica, a menos que se indique lo contrario.

Se obtuvieron espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) con un espectrómetro Varian de 400 MHz (^1H a 400 MHz) o un Varian Inova 500NMR (^1H a 500 MHz). Todos los desplazamientos químicos se referenciaron a picos de disolvente residual y se expresaron en ppm con respecto a TMS. Todos los espectros se registraron en d_6 -DMSO. Los espectros de masas se registraron usando el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo VG BioQ de la técnica de electronebulización (ion positivo). Todos los reactivos y otros disolventes se obtuvieron de fuentes comerciales convencionales y se usaron tal como se recibieron. ATSMH_2 , $[\text{Cu}(\text{ATSM})]$, $[\text{Zn}(\text{ATSM})]$, ATSPH_2 , $[\text{Cu}(\text{ATSP})]$, $[\text{Zn}(\text{ATSP})]$, ATSEH_2 , $[\text{Cu}(\text{ATSE})]$, GTSMH_2 y $[\text{Cu}(\text{GTSM})]$ se prepararon mediante variaciones de los procedimientos notificados, véase: 1) P. J. Blower, T. C. Castle, A. R. Cowley, J. R. Dilworth, P. S. Donnelly, E. Labisbal, F. E. Sowrey, S. J. Teat y M. J. Went, *Dalton Trans.*, 2003, 4416-4425 y las referencias en el mismo; 2) J. L. J. Dearling, J. S. Lewis, G. D. Mullen, M. J. Welch y P. J. Blower, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2002, 7, 249 y las referencias en el mismo; 3) P. McQuade, K. E. Martin, T. C. Castle, M. J. Went, P. J. Blower, M. J. Welch y J. S. Lewis, *Nucl. Med. Biol.*, 2005, 32, 147. Todos los espectros de ^1H RMN y EN EM fueron como se esperaba.

Ejemplo 1 Síntesis de $[\text{Zn}(\text{ATSEH}_2)]$

Se añadieron ATSEH_2 (0,134 g, 0,46 mmol) y $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,102 g, 0,46 mmol) a etanol (5 ml) La mezcla se calentó a reflujo durante 2 horas en una atmósfera de nitrógeno y después se dejó enfriar a temperatura ambiente. El sólido de color amarillo brillante que se formó se recogió por filtración y se lavó con etanol y éter dietílico para proporcionar $[\text{Zn}(\text{ATSE})]$ en forma de un polvo de color amarillo (0,122 g, 0,35 mmol, 76 %). RMN ^1H (400 MHz): δ 1,08, 6H, t, $^3J_{\text{HH}} = 7$ Hz, CH_2CH_3 ; 2,18 ppm, 6H, s, 2 x CH_3 ; 3,30, 4H, m parcialmente oscurecido por el pico de H-DO del disolvente, CH_2CH_3 . EN EM (ion positivo): $m/z = 351 = [\text{Zn}(\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{S}_2) + \text{H}^+]^+$.

Ejemplo 2 Síntesis de ChexTSE

Se añadió 1,2-ciclohexanodiona (0,439 g, 3,92 mmol) a etanol (25 ml) seguido de N4-etil-3-tiosemicarbazida (0,933 g, 7,83 mmol) y unas pocas gotas de H_2SO_4 (conc). La mezcla se calentó a reflujo en una atmósfera de nitrógeno durante 3 horas y después se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se formó un precipitado de color amarillo que se recogió por filtración y se lavó con etanol y éter dietílico para proporcionar ChexTSE en forma de un sólido de color amarillo (0,945 g, 3,00 mmol, 76 %). RMN ^1H (400 MHz): δ 1,09, 3H, t, $^3J_{\text{HH}} = 7$ Hz, CH_2CH_3 ; 1,13, 3H, t, $^3J_{\text{HH}} = 7$ Hz, CH_2CH_3 ; 1,66, 4H, m, 2 x CH_2 ciclohexilo; 2,56, 4H, m, 2 x CH_2 ciclohexilo; 3,54, 4H, m, 2 x NHCH_2CH_3 ; 8,18, 1H, s ancho, NH; 8,61, s a, NH; 10,44, 1H, s ancho, NH; 12,25, 1H, s ancho, NH. EN EM (ion positivo): $m/z = 315 = [\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{S}_2 + \text{H}^+]^+$.

Ejemplo 3 Síntesis de $[\text{Zn}(\text{Chextsc})]$

Se añadió ChexTSE (0,190 g, 0,60 mmol) a etanol (10 ml) seguido de $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,133 g, 0,60 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo en una atmósfera de nitrógeno durante 3 horas. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y precipitó un sólido de color amarillo. El sólido se recogió por filtración y se lavó con etanol y éter dietílico para proporcionar $[\text{Zn}(\text{Chextsc})]$ en forma de un sólido de color amarillo (0,157 g, 0,42 mmol, 70 %). RMN ^1H (400 MHz): δ 1,07, 6H, t, $^3J_{\text{HH}} = 7$ Hz, 2 x CH_2CH_3 ; 1,64, 4H, m, 2 x CH_2 ciclohexilo; 2,58, 4H, m, 2 x CH_2 ciclohexilo; 3,32, 4H, m, oscurecido por la señal de H-DO en disolvente, 2 x NHCH_2CH_3 . ENEM (ion positivo) $m/z = 378 = [\text{Zn}(\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{S}_2 \text{H}^+)]^+$.

Ejemplo 4 Síntesis de $[\text{Cu}(\text{Chextsc})]$

Se añadieron ChexTSC (0,202 g, 0,64 mmol) y $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,202 g, 0,64 mmol) a etanol (10 ml). La mezcla se calentó a reflujo en una atmósfera de nitrógeno durante 3 horas y después se dejó enfriar a temperatura ambiente. El sólido de color marrón rojizo que precipitó se recogió por filtración y se lavó con etanol y éter dietílico para proporcionar $[\text{Cu}(\text{ChexTSC})]$ en forma de un polvo de color rojo-marrón (0,166 g, 0,44 mmol, 69 %). EN EM

(ion positivo) $m/z = 377 = [\text{Cu}(\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{S}_2 + \text{H}^+)^+]$.

Ejemplo 5 Síntesis de ligando de GTS simétrico (3): derivado de (4-clorofenilo)

- 5 Se agitó 4-(4-clorofenil)-3-tiosemicarbazida (0,60 g, 2,50 mmol) en agua (2 ml) y ácido acético (2 ml). Se añadió 1,4-dioxano (2 ml) hasta que la solución se volvió transparente. Se añadió una solución acuosa al 40 % de glioxal (136 μl , 1,19 mmol) gota a gota a la solución que se agitó en una atmósfera de argón durante 2 h. En este tiempo fue evidente un precipitado de color blanco en la solución de reacción. La reacción se concentró ligeramente, se filtró y el residuo se lavó secuencialmente con agua (2 ml), etanol caliente (2 ml) y éter (2 ml) para proporcionar el ligando
- 10 en forma de un sólido de color amarillo pálido (0,360 g, 0,85 mmol, 71 %). RMN ^1H (400 MHz): δ 7,39, 4H, d, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, 4 x Ar-H; 7,58, 4H, d, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, 4 x Ar-H; 7,88, 2H, s, 2 x CH = N; 10,27, 2H, s, 2 x NH-Ar; 12,23, 2H, s, 2 x NH-N=N. ENEM (ion negativo): $m/z = 424 = [(\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{S}_2 - \text{H}^+)]^-$.

Ejemplo 6 Síntesis de complejo de cobre de GTS simétrico (A8): derivado de (4-clorofenilo).

- 15 Se añadió monohidrato de acetato de cobre (II) (0,04 g, 0,18 mmol) a una solución agitada del ligando (3) (0,08 g, 0,18 mmol) disuelto en DMF mínima (1 ml). Se produjo un cambio a color morado inmediatamente. La reacción se agitó en una atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 1 h y después se concentró a un sólido de color morado. El sólido se sometió a ultrasonidos en etanol (2 ml), se retiró por filtración y se lavó con etanol caliente
- 20 (1 ml, 2 veces), éter (2 ml) y se secó al aire para proporcionar el complejo de cobre en forma de un sólido de color morado (0,07 g, 0,13 mmol, 71 %). EN EM (ion negativo): $m/z = 485 = [\text{Cu}(\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{S}_2 - \text{H}^+)]^-$.

Ejemplo 7 Síntesis de complejo de cinc de GTS simétrico (A7): derivado de (4-clorofenilo).

- 25 Se añadió dihidrato de acetato de cinc(II) (0,03 g, 0,14 mmol) a una solución agitada del ligando (3) (0,06 g, 0,14 mmol) disuelto en DMF mínima (1 ml). Se produjo un cambio a color naranja inmediatamente. La reacción se agitó en una atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 1 h y después se concentró a una goma de color naranja. La goma se sometió a ultrasonidos en etanol (2 ml) lo que provocó que un sólido de color naranja brillante precipitara fuera de la solución. El sólido se retiró y se lavó con etanol caliente (2 veces, 1 ml), éter (2 ml) y se secó
- 30 al aire para proporcionar el complejo de cinc en forma de un sólido de color naranja (0,04 g, 0,08 mmol, 62 %) RMN ^1H (400 MHz): δ 7,29, 4H, d, $^3J_{\text{HH}} = 8,8$ Hz, 2 x Ar-H; 7,78, 4H, d, $^3J_{\text{HH}} = 8,8$ Hz, 2 x Ar-H; 7,84, 2H, s, 2 x CH=N; 9,84, 2H, s ancho, 2 x NHAr EN EM (ion positivo): $m/z = 489 = [\text{Zn}(\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{S}_2 + \text{H}^+)^+]$.

Ejemplo 8 Síntesis de ligando de GTS asimétrico (10): derivado de metil/fenil-semicarbazida.

- 35 Etapa 1: ligando mono sustituido protegido con acetal (metiltiosemicarbazida) (XX).

Una solución acuosa al 40 % de dimetoxiacetaldehído (0,65 ml, 4,28 mmol) se añadió a una suspensión agitada de 4-metil-3-tiosemicarbazida (0,50 g, 4,75 mmol) en metanol (15 ml). La reacción se agitó en una atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 17 h. El metanol se retiró a presión reducida y la solución acuosa se extrajo con diclorometano (2 veces, 20 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (2 veces, 10 ml) y se secaron (Na_2SO_4). La concentración proporcionó un sólido de color blanco (0,46 g, 2,40 mmol, 56 %). RMN ^1H (400 MHz): δ 2,93, 3H, d, $^3J_{\text{HH}} = 4,4$ Hz, NH-CH₃; 3,29, 3H, s, CH₃; 3,32, 3H, s, CH₃; 4,69, 1H, d, $^3J_{\text{HH}} = 5,6$ Hz, CH-(OCH₃)₂; 7,25, 1H, d, $^3J_{\text{HH}} = 5,6$ Hz, CH=C; 8,27, 1H, d ancho, $^3J_{\text{HH}} = 3,6$ Hz, NH-CH₃; 11,31, 1H, s, NH-N=C.

45 Etapa 2: Formación del aldehído (XXI).

Una solución 1,0 M de tetrafluoroborato de litio en acetonitrilo (1,44 ml, 1,05 mmol) se añadió directamente al acetal derivado de metil tiosemicarbazida (XX) (0,10 g, 5,23 mmol) y se agitaron durante unos pocos minutos. La mezcla se diluyó con una solución acuosa al 2 % de acetonitrilo (20 ml) y se agitó en una atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 17 h. La reacción se inactivó con una solución de salmuera acuosa saturada (10 ml), la capa orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con éter (2 veces, 10 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron a presión reducida para proporcionar el aldehído deseado en forma de un sólido gomoso de color naranja (0,04 g, 0,03 mmol), 58 %). El producto se usó directamente en la siguiente etapa.

55 RMN ^1H (400 MHz): δ 3,00, 3H, d, $^3J_{\text{HH}} = 4,8$ Hz, NH-CH₃; 7,43, 1H, d, $^3J_{\text{HH}} = 8,0$ Hz, CH=C; 9,01, 1H, s ancho, NH-CH₃; 9,45 1H, d, $^3J_{\text{HH}} = 8,0$ Hz, CH=O; 12,47, 1H, s, NH-N=C.

Etapa 3: Reacción con formación de segundas tiosemicarbazidas–ligando asimétrico (XXII).

- 60 A una solución del aldehído (0,04 g, 0,31 mmol) disuelto en DMF (3 ml) que contenía tamices moleculares de 4 Å activados, se le añadió 4-fenil-3-tiosemicarbazida (0,06 g, 0,34 mmol). La reacción se agitó durante 5 h en una atmósfera de argón a 60 °C. La reacción se filtró, los tamices se lavaron con un poco de DMF y la solución se concentró para proporcionar una goma de color amarillo. La goma se sometió a ultrasonidos en etanol (2 ml) y el sólido se retiró por filtración. El residuo se lavó con etanol caliente (2 veces, 2 ml) y después éter (2 veces, 2 ml)
- 65 para proporcionar un sólido de color crema (0,04 g, 0,12 mmol, 40 %). RMN ^1H (400 MHz): δ 2,96, 3H, d, $^3J_{\text{HH}} = 4,4$ Hz, NH-CH₃; 7,17, 1H, m, 1 x Ar-H; 7,33, 2H, m, 2 x Ar-H; 7,52, 2H, m, 2 x Ar-H; 7,79, 2H, ABq, $^3J_{\text{HH}} = 8,8$,

11,6 Hz, 2 x $CH=N$; 8,55, 1H, d ancho, $^3J_{HH} = 4,0$ Hz, $NH-CH_3$; 10,16, 1H, $NH-Ph$; 11,83, 1H, s, $NH-N=C$, 12,09, 1H, $NH-Ph$; 11,83, 1H, s, $NH-N=C$.

Etapa 4: Formación de complejo de cobre de GTS asimétrico (XXIII). A19

5 Se añadió monohidrato de acetato de cobre(II) (0,06 g, 0,29 mmol) a una solución agitada del ligando (XXII) (0,09 g, 0,29 mmol) disuelto en DMF mínima (1 ml). Se produjo un cambio a color morado inmediatamente. La reacción se agitó en una atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 1 h y después se concentró a un sólido de color morado. El sólido se sometió a ultrasonidos en etanol (2 ml), se retiró por filtración y se lavó con etanol caliente
10 (1 ml, 2 veces), éter (2 ml) y se secó al aire para proporcionar el complejo de cobre en forma de un sólido de color morado (0,07 g, 0,20 mmol, 64 %). EN EM (ion positivo) $m/z = 371 = [Cu(C_{12}H_{14}N_6S_2 + H^+)]^+$.

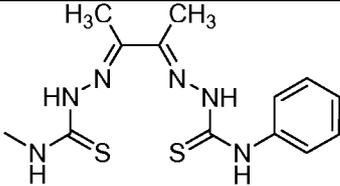
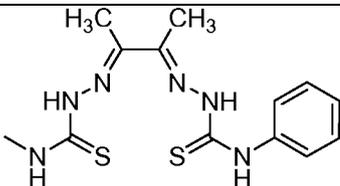
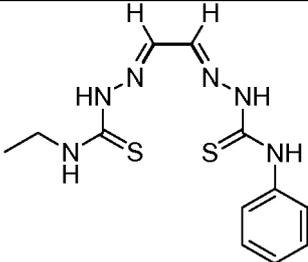
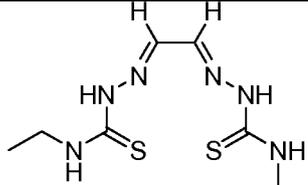
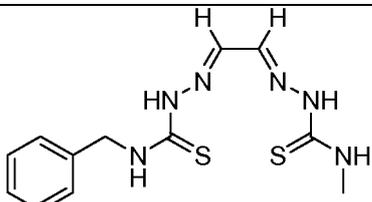
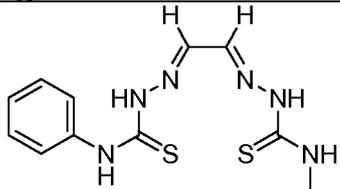
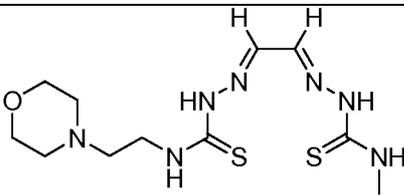
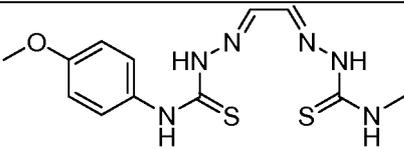
Etapa 5: Formación de complejo de cinc de GTS asimétrico (XXIII). A9

15 Se añadió dihidrato de acetato de Cinc(II) (0,05 g, 0,24 mmol) a una solución agitada del ligando (12) (0,07 g, 0,24 mmol) disuelto en DMF mínima (1 ml). Se produjo un cambio a color naranja inmediatamente. La reacción se agitó en una atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 1 h y después se concentró a una goma de color naranja. La goma se sometió a ultrasonidos en etanol (1 ml) y el sólido se retiró y se lavó con éter (1 ml) y se secó al
20 aire para proporcionar el complejo de cinc en forma de un sólido de color naranja (0,04 g, 0,11 mmol, 47 %) RMN 1H (400 MHz): δ 2,96, 3H, s ancho, $NH-CH_3$; 6,91, 1H, s ancho, $Ar-H$; 7,22, 2H, s ancho, $Ar-H$; 7,54, 1H, s ancho, $NH-CH_3$; 9,53, 1H, s ancho, $NH-Ar$. EN EM (ion positivo): $m/z = 359 = [Zn(C_{11}H_{12}N_6S_2 + H^+)]^+$.

El uso de variaciones en los procedimientos esbozados anteriormente y los mecanismos de reacción esbozados en los esquemas 1 a 3, los ligandos que se muestran en la Tabla 1 se sintetizaron además de los ligandos iniciales
25 desvelados en las páginas 21 y 22.

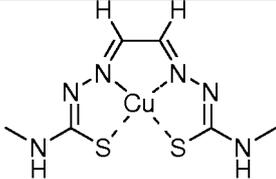
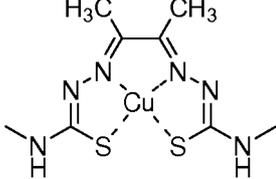
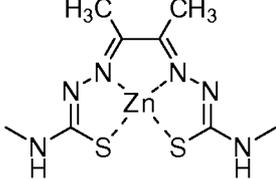
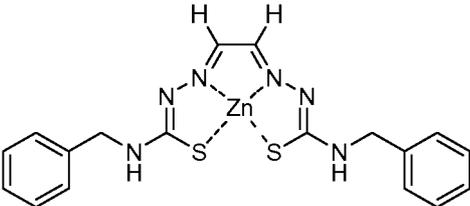
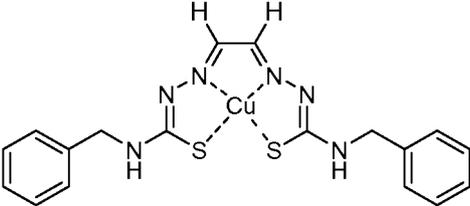
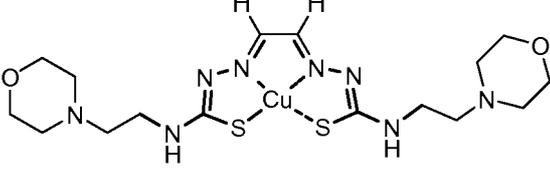
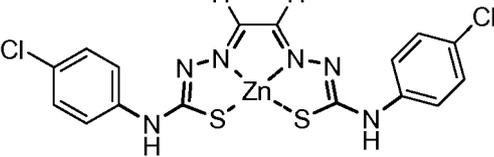
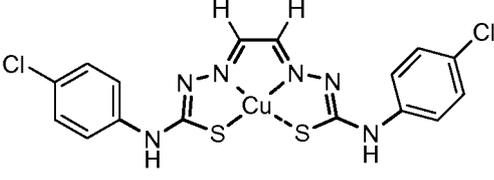
Tabla 1

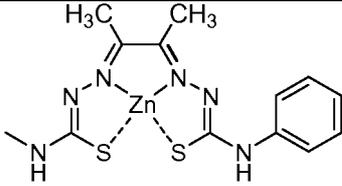
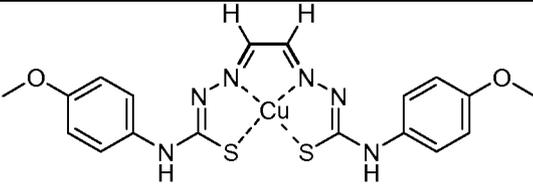
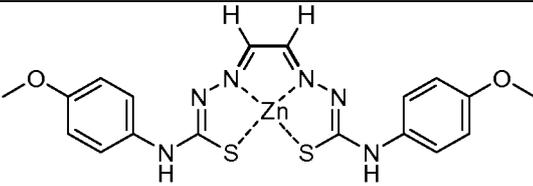
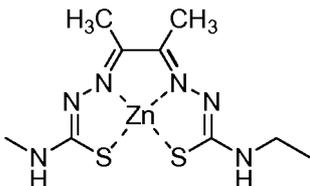
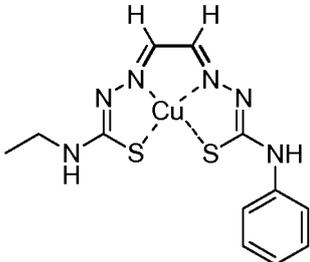
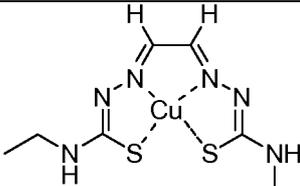
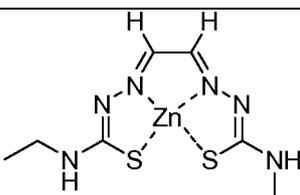
Número de ligando	Estructura
1	
2	
3	
4	

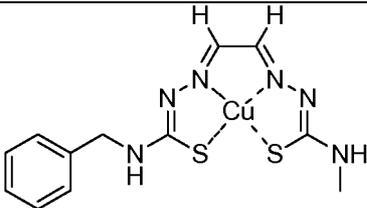
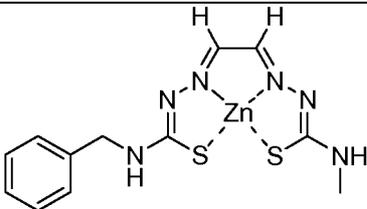
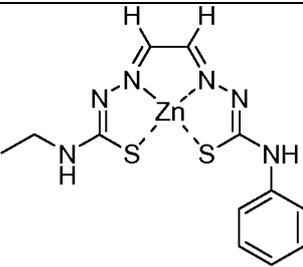
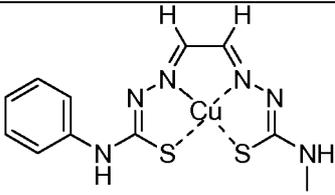
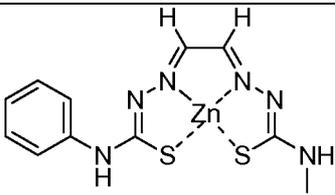
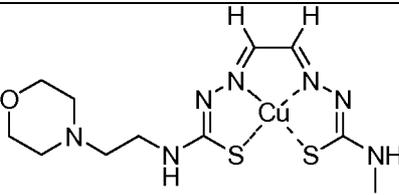
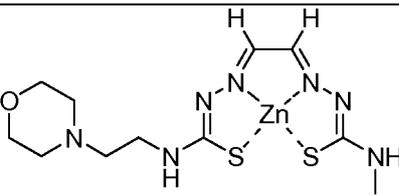
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	

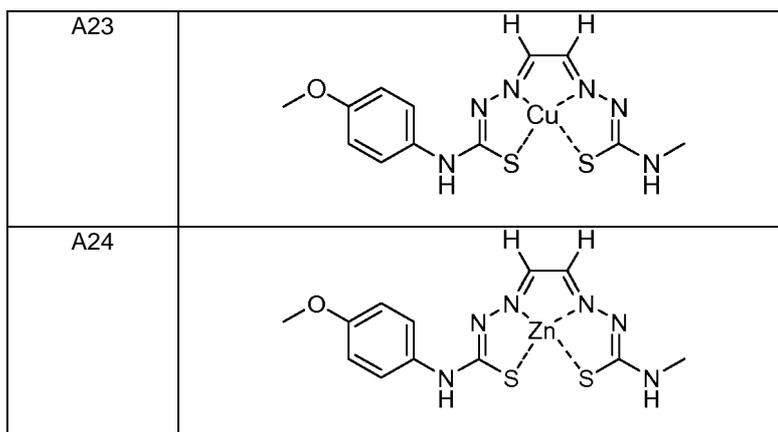
Mediante el uso de los ligandos de la Tabla 1 y los procedimientos de formación de complejos metálicos analizados anteriormente se hizo una serie de complejos metálicos como se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Complejo N.º	Estructura
A1	
A2	
A3	
A4	
A5	
A6	
A7	
A8	

A9	
A10	
A11	
A12	
A13	
A14	
A15	

A16	
A17	
A18	
A19	
A20	
A21	
A22	



CAPTACIÓN CELULAR DE COMPLEJOS DE BTSC

Ejemplo 9 Cu-BTSC

5 Se trataron células de ovario de hámster chino (APP-CHO) transfectadas con APP con una gama de complejos [Cu(BTSC)] con cadenas principales de dialquilo a 1-50 mM durante 6 h en medio de cultivo sin suero. Las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y las células se rasparon en PBS fresco y se sedimentaron a 10.000 rpm en una microcentrífuga durante 5 min. El sobrenadante se desechó y los sedimentos
10 celulares se congelaron a -70 °C hasta que se determinaron los niveles de metal por espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (EM-PAI) en el Departamento de Patología, Universidad de Melbourne.

Ejemplo 10 Zn-BTSC

15 Los complejos de Zn-BTSC son menos estables que sus complejos de cobre (derivados relacionados que tienen constantes de asociación del orden de $\log K = 7$, pero que aún son capaces de transportar eficazmente Zn dentro de la célula. El tratamiento de las células con complejos [Zn(BTSC)] dio como resultado incrementos significativos en los niveles intracelulares de Zn medidos por EM-PAI. [Zn(ATSM)] y [Zn(ATSE)] indujeron aumentos de $8,2 \pm 0,25$ y $9,8 \pm 0,9$ veces en los niveles celulares de Zn respectivamente (Figura 2). Se trataron células CHO transfectadas con APP
20 con complejos [Zn(BTSC)] a 1-50 μM durante 6 horas en medio de cultivo libre de suero. Las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y las células se rasparon en PBS fresco y se sedimentaron a 10.000 rpm en una microcentrífuga durante 5 min. El sobrenadante se desechó y los sedimentos celulares se congelaron a -70 °C hasta que se determinaron los niveles de metal por espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (EM-PAI) en el Departamento de Patología, Universidad de Melbourne. El tratamiento de
25 las células con complejos [Zn(BTSC)] dio como resultado aumentos significativos en los niveles intracelulares de Zn medidos por EM-PAI. [Zn(ATSM)] y [Zn(ATSE)] indujeron aumentos de $8,2 \pm 0,25$ y $9,8 \pm 0,9$ veces en los niveles de Zn celular, respectivamente, en comparación con los controles sin tratar (Figura 2).

REDUCCIÓN EN LOS NIVELES DE BETA AMILOIDE EXTRACELULAR.

Ejemplo 11 [Cu(GTSM)]

30 El tratamiento de células APP-CHO con [Cu(GTSM)] dio como resultado un aumento en los niveles de cobre intracelulares como se esperaba del ligando de Cu permeable en las células. Se usaron cinco pautas de tratamiento, a saber, un control, 1 μM , 5 μM , 10 μM , 25 μM y 50 μM (Figura 3). Se trataron células CHO transfectadas con APP
35 con cada una de las dosis de [Cu(GTSM)] durante 6 h en medio sin suero y después se recogió el medio acondicionado y se sometió a ensayo para determinar el péptido A β 1-40 mediante ELISA de A β habitual. [Cu(GTSM)] inhibió significativamente los niveles de A β 1-40 en el medio a todas las concentraciones sometidas a ensayo, en comparación con GTSM sim complejo.

Ejemplo 12 Complejos de Zn-BTSC

40 El tratamiento de las células APP-CHO con una serie de complejos de cinc dio como resultado un incremento en los niveles intracelulares de cinc como se esperaba del ligando de Zn permeable en las células. Se usaron cinco pautas de tratamiento, a saber, un control, 1 μM , 5 μM , 10 μM , 25 μM y 50 μM (Figura 4). Se trataron células CHO
45 transfectadas con APP con cada una de las dosis de [Zn(BTSC)] durante 6 h en medio sin suero y después se recogió el medio acondicionado y se sometió a ensayo para determinar el péptido A β 1-40 mediante ELISA de A β habitual. Todo el Zn-BTSC inhibió significativamente los niveles de A β 1-40 en el medio a 10-50 μM . Zn-Chex TSE y Zn-ATSE también inhibieron A β a 1 μM .

50

Ejemplo 13 El Cu inhibe la captación de Zn y la pérdida de A β secretado inducida por [Zn(BTSC)]

Para examinar esto, las células se expusieron a [Zn(ATSE)] o [Zn(ATSP)] 10 μ M con o sin Cu²⁺ 5-50 μ M durante 6 h. El cotratamiento de las células con Cu y los complejos de Zn-BTSC redujo el nivel de captación de Zn en comparación con Zn-BTSC solo (Figura 5). Esto indica que el Cu es capaz de desplazar la unión de Zn más débil para formar complejos de Cu-BTSC y reducir la captación de Zn-BTSC y los resultados después del análisis se muestran en la Figura 5.

Ejemplo 14 Efecto de la temperatura sobre la captación de metal.

Se realizó un estudio en el que las células se expusieron a diferentes concentraciones de uno de los complejos de la invención en una serie de diversas concentraciones y ya sea a 4 o 37 °C. Las células se trataron con los complejos, ya sea a 37 °C o 4 °C durante 6 h y los niveles de metal se determinaron por EM-PAI y el A β 1-40 se midió por ELISA. Los resultados, como se muestran en la Figura 6, indican claramente que la captación celular depende de la temperatura. El tratamiento de las células a 37 °C da como resultado un alto nivel de captación de metal que da como resultado una pérdida de A β extracelular. La incubación de las células a 4 °C da como resultado una captación de metal sustancialmente más baja y, por tanto, efectos reducidos sobre el A β extracelular. Los resultados indican que es probable que la captación de metal, por tanto, sea un proceso activo, en lugar de pasivo y podrían proporcionar la oportunidad de dirigir a receptores de BTSC específicos de metal para mejorar la eficacia de los complejos.

Ejemplo 15 Reducción de Abeta celular**Generación de ovario de hámster chino (CHO) transfectado con APP**

Se generaron células APP-CHO mediante la expresión del ADNc de APP de 695 aminoácidos en el vector de expresión pRESpuo2 (Clontech, Mountain View, California, EE.UU.). Las células se transfectaron usando Lipofectamina 2000 y se cultivaron en medio RPMI-1640 complementado con glutamina 1 mM y suero bovino fetal al 10 % (todos de Invitrogen, Mount Waverley, Victoria, Australia). Se seleccionaron las células transfectadas y se mantuvieron usando puromicina 7,5 μ g/ml (Sigma-Aldrich).

Tratamiento de las células con Complejos

Se hicieron pases de células APP-CHO en una relación de 1:5 y se cultivaron en placas de 6 pocillos durante 3 días antes de los experimentos. Los compuestos se prepararon como una solución madre 10 mM en DMSO y se añadieron a medio RPMI sin suero complementado con puromicina. El medio se mezcló brevemente mediante aspiración antes de la adición a las células. Los cultivos de control se trataron con vehículo (DMSO) solo. Los cultivos se incubaron durante 6 horas y se tomaron medios acondicionados para la medición de los niveles de A β 1-40 mediante ELISA.

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de captura de doble anticuerpo para la detección de A

Los niveles de A β se determinaron en medio de cultivo usando el protocolo de ELISA de A β 1-40 de 384 pocillos. Se recubrieron placas de 384 pocillos con anticuerpo monoclonal (mAb) G2-10 en tampón de recubrimiento de carbonato-bicarbonato (pH 9,6) para la detección de A β 1-40. Las placas se dejaron incubar durante la noche a 4 °C con balanceo. Después, las placas se lavaron tres veces con PBST a TA con balanceo y la solución se desechó después de cada lavado. Después, se añadieron 100 μ l de caseína hidrolizada al 0,5 % (p/v) en PBS (pH 7,4) a cada pocillo y se dejaron incubar durante 2 horas a 37 °C para evitar la unión no específica. Después, las placas se lavaron tres veces con PBST a TA con balanceo. Se añadieron 20 ng de mAb WO2 biotinilado (epítipo en A β 5-8) a cada pocillo de las placas (10 μ l/pocillo a 2 ng/ μ l). Se añadieron 50 μ l/pocillo de muestras de péptido patrón A β 1-40 (MHRI, Melbourne, Australia), muestras de medio de cultivo celular y blancos. Las placas se dejaron incubar durante la noche a 4 °C con balanceo. Las placas se lavaron nueve veces con PBST a TA con balanceo. Se añadieron 25 μ l de europio marcado con estreptavidina a una dilución de 1:1000. Después, las placas se lavaron diez veces con PBST, donde el 9° y el 10° lavado se dejaron durante 5 min antes de desecharlos. Para desarrollar las placas se añadieron 80 μ l de solución de potenciación a cada pocillo y las placas se leyeron en un lector de placas WALLAC Victor² con excitación (Ex) a 340 nm y emisión (Em) a 613 nm. Los patrones de péptido A β 1-40 y las muestras se sometieron a ensayo por triplicado. Los valores obtenidos de los pocillos por triplicado se usaron para calcular la concentración de A β (expresada como ng/ml) basándose en la curva patrón generada en cada placa y se proporcionan en la Tabla 3.

Tabla 3

Compuesto de ensayo	Abeta como porcentaje del Control
Control (DMSO)	100
A4	84
A5	13

A7	36
A8	56
A10	53
A13	42
A14	3
A16	30
A17	95
A18	35
A19	38
A20	86
A21	50
A23	47
A24	56

Ejemplo 16 Ensayo de ionóforo

5 Se sembraron en placa células de neuroblastoma humano M17 en placas de 6 pocillos y dejaron durante la noche. Se añadieron suficientes células para proporcionar aproximadamente un 70 % de confluencia el día siguiente del experimento.

10 Las células de ensayo se incubaron en 1 ml de medio y mezcla de compuestos durante 5 horas a 37 °C. Al final de la incubación se retiró el medio con un aspirador de vacío y se añadió 1 ml de PBS para desalojar las células. Después las células se ponen en tubos Eppendorf y se sedimentan. El PBS se retira y los sedimentos celulares restantes se congelan a -20 °C.

15 Los sedimentos celulares de niveles similares se colocan en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml. A cada tubo se le añadieron 50 µl de ácido nítrico concentrado (Aristar, BDH) a cada sedimento celular y se dejó que cada sedimento celular se digiriera durante la noche. Las muestras se calentaron durante 20 min a 90 °C para completar la digestión. El volumen de cada muestra se redujo a ~45 µl después de la digestión. A cada uno se le añadió 1 ml del diluyente ácido nítrico al 1 %. Las mediciones se realizaron usando un instrumento Varian UltraMass ICPMS en condiciones de funcionamiento adecuadas para el análisis de múltiples elementos habitual.

20 El instrumento se calibró usando blanco, 10, 50 y 100 ppb de una solución patrón de ICPMS de múltiples elementos certificada (ICP-MS-CA12-1, Accustandard) para Fe, Cu y Zn en ácido nítrico a 1 %. Se usó una solución de patrón interno certificada que contenía 100 ppb de itrio (Y 89) como control interno (ICP-MS-IS-MIX1-1, Accustandard).

25 Los datos se notificaron frente a nivel de un control interno conocido (Clioquinol) y se muestran en la Tabla 4. Los datos de la Tabla 4 demuestran que los complejos de la invención son eficaces en el suministro del metal a la célula.

Ejemplo 17 Ensayos de citotoxicidad - Células de neuroblastoma M17

Día 1.

30 Las células de ensayo se cultivaron a 37 °C/CO₂ al 5 % hasta casi confluencia en un matraz de 75 cm². El medio se retiró y las células se incubaron con 5 ml de PBS durante aproximadamente 5 minutos para desalojar las células de la superficie de plástico. Se usó una pipeta para volver a suspender las células y se añadieron 5 ml de medio de crecimiento. La suspensión celular se retiró y se añadió a un tubo Falcon de 15 ml. La suspensión se mezcló bien por inversión y se transfirieron aproximadamente 100 µl a un Eppendorf.

40 Un ensayo normal que evalúa 15 compuestos usa cinco placas de 48 pocillos. Los 24 pocillos interiores son los únicos que se usan para reducir la cantidad de evaporación durante 48 horas. Se añadieron 200 µl de medio a cada uno de los 24 pocillos interiores. Las suspensiones celulares se mezclaron por inversión y se añadió el número deseado de células a cada pocillo. La adición de células continuó en cada placa y la suspensión celular se mezcló en el tubo Falcon por inversión entre cada placa. A las placas se les proporcionó una agitación menor y se devolvieron a una incubadora a 37 °C. Las placas se dejaron durante la noche para que las células se depositaran en los pocillos.

Día 2.

50 Se seleccionaron los compuestos que se iban a someter a ensayo para el ensayo. Se calculó, a partir del peso molecular y los mg de compuesto en el Eppendorf, el número de ml de DMSO que se debían añadir a preparar una solución madre de 10 mM. En el caso de CQ (clioquinol) se requiere una solución madre 1 mM debido a la precipitación de una solución más concentrada cuando se diluye en medio.

Se añadió DMSO a los Eppendorf (normalmente 200-500 μ l), se agitaron con formación de vórtice hasta que se disolvió y se incubaron con los compuestos a 37 °C durante 60 minutos para ayudar a la solubilización. Los compuestos se retiraron y se agitaron con formación de vórtice de nuevo y se comprobó cualquier compuesto no disuelto.

5 Después, las soluciones madre 10 μ M, deben diluirse 1:10 para hacer una concentración final de 1 μ M. Se añadieron 180 μ l de DMSO al tubo de ensayo y se añadieron 20 μ l de cada una de las soluciones de compuesto a cada uno de los tubos de ensayo para crear las soluciones de ensayo que después se agitaron con formación de vórtice de nuevo para garantizar la homogeneización completa de la mezcla de ensayo. Después, cada compuesto se diluyó hasta concentraciones finales de 10 μ M y 1 μ M.

15 Se añadió la cantidad deseada de la solución de ensayo y la muestra de control a las placas que después se devolvieron a la incubadora durante un periodo de 48 horas a 37 °C. A la finalización del periodo de 48 horas las placas se retiraron de la incubadora y se usó un aspirador para retirar el medio de la primera placa. Después se añadieron 220 μ l de solución MTT/medio a cada pocillo. Después, las placas se devolvieron a 37 °C y se incubaron durante 1 hora. Después de 1 hora las placas se retiraron de la incubadora y la solución medio/MTT se retiró usando la bomba de vacío aspiradora.

20 Se añadieron 200 μ l de DMSO a cada pocillo y la placa se agitó suavemente para que el DMSO disolviese los cristales de MTT y los restos de células restantes. Después de aproximadamente 10 minutos el DMSO ahora morado en los pocillos debería ser transparente. MTT es una sal de tetrazolio que se convierte de amarillo a morado por las mitocondrias activas. Cuantas más células presentes y, por tanto, más mitocondrias, da como resultado un color púrpura más intenso. Las placas ahora pueden leerse en un lector de placas a 570 nm. Los resultados se proporcionan en la Tabla 4.

25 **Ejemplo 18 Ensayos de citotoxicidad - cultivos neuronales primarios**

Se prepararon cultivos corticales neuronales primarios en condiciones estériles. Se retiraron cortezas de ratón C57Bl/6 el día embrionario 14, se disecaron sin meninges y se disociaron en tripsina al 0,025 % (Sigma) en tampón Krebs (p/v). Las células disociadas se trituraron usando una punta de pipeta fina conectada a un filtro, se sedimentaron, se resuspendieron en medio de siembra (medio mínimo de Eagle, suero de ternero fetal al 10 %, suero de caballo al 5 %) y se contaron. Se sembraron células neuronales corticales en placas de 48 pocillos recubiertos con poli-D-lisina a una densidad de 150.000 células/pocillo en 250 μ l de medio de siembra. Todos los cultivos se mantuvieron en una incubadora a 37 °C con CO₂ al 5 %. Después de 2 h el medio de recubrimiento se reemplazó por medio neurobasal recién preparado que contenía complementos B27 (que contenían antioxidantes), geneticina y glutamina (todos los reactivos de cultivo tisular se adquirieron de InVitrogen a menos que se indique lo contrario). Este método dio como resultado cultivos altamente enriquecidos para neuronas (pureza del > 95 %) con contaminación de astrocitos y microglia mínima como se determina por inmunotinción de las preparaciones de cultivo usando anticuerpos marcadores específicos.

40 *Ensayos de citotoxicidad*

Se dejó que las células neuronales maduraran durante 6 días en cultivo antes de comenzar el tratamiento con medio de cultivo modificado recién preparado (medio neurobasal más complementos B27 (menos antioxidantes), geneticina y β -D-arabinofuranósido de citosina (Sigma)). Para el tratamiento de los cultivos neuronales, las soluciones madre de compuesto de ensayo recién preparadas se diluyeron hasta la concentración final (como se esboza a continuación) en 200 μ l de medio de cultivo modificado. Después, las mezclas se añadieron a las células neuronales durante un máximo de 4 días. La salud de las células se controló periódicamente por microscopía de contraste de fases y la viabilidad celular se cuantificó usando el ensayo de MTS (Promega, Madison, WI). El medio experimental se reemplazó por medio de cultivo modificado recién preparado que contenía MTS al 10 % v/v. Las placas se devolvieron a la 37 °C, se incubaron con CO₂ al 5 % durante 3 h. Después, se transfirió una alícuota de 150 μ l de cada pocillo a pocillos separados de una placa de 96 pocillos. El cambio de color de cada pocillo se determinó midiendo la absorbancia a 490 nm y se restaron l de cada valor as lecturas de fondo de MTS incubado en medio sin células antes de los cálculos. Los datos se normalizaron y se calcularon como un porcentaje de los valores del control de vehículo sin tratar. Los datos se muestran como media \pm E.T. Todas las muestras se sometieron a ensayo por triplicado y había presentes células tratadas con vehículo no tratado en cada placa de ensayo.

60 **Preparación de compuestos de ensayo y "placa de fármaco"**

Los compuestos de ensayo se disolvieron inicialmente en DMSO al 100 % (Sigma) a una concentración de 5 mM. Una solución madre 5 mM se diluyó para proporcionar concentraciones de trabajo de 1 mM y 0,1 mM. Los compuestos de ensayo no se añadieron directamente a las células, sino que se añadieron a una "placa de fármaco" estéril de 48 pocillos, después se diluyeron con medio de cultivo modificado. Después de la adición del medio de cultivo modificado a la placa de fármaco, el medio se mezcló suavemente y se añadieron alícuotas de 200 μ l (por triplicado) a las placas que contenían las neuronas.

Tabla 4

Complejo N.º	Ionóforo ¹	Citotox ²			
		PN 1 µM	PN 10 µM	M17 1 µM	M1710 µM
A1	701	11,2	10,8	2,5	0
A2	157,1	NE	NE	NE	NE
A3	NE	NE	NE	NE	NE
A4	129	99	104,6	37,9	44,4
A5	1163	30,5	-20,6	1,8	0,6
A6	699	2,7	-2,8	9,2	-0,5
A7	126	185	164,5	76,1	43,6
A8	95	96,5	73,8	73,0	48,2
A9	217	114,4	1,3	47,2	57,3
A10	133	99,1	69,0	43,2	52,9
A11	142	132,8	140,5	49,1	52,5
A12	166	116,8	5,3	86,8	53,9
A13	645	0,2	-1,5	-0,8	-0,5
A14	287	-5,0	-6,2	-2,6	-3,4
A15	100	103,6	106,4	43,2	19,1
A16	394	-4,5	-5,7	-2,8	-3,3
A17	124	100,6	106,5	53,1	42,0
A18	159	79,9	64,3	96,5	86,5
A19	536	19,4	-5,4	-2,7	-2,9
A20	114	44,9	84,4	56,8	51,9
A21	395	-31,3	-31,7	-2,8	-3,5
A22	125	-7,5	-11,6	41,4	20,1
A23	559	1,8	1,9	24,9	-2,2
A24	130	101	96,6	97,3	93,7

¹. (% de captación de metal a 10 µm)
². (% viable)
 NE = No sometido a ensayo
 A1 = CuGTSM
 A2 = CuATSM
 A3 = ZnATSM

Ejemplo 19 Complejo de actividad antioxidante A8

5 con el fin de determinar la capacidad de los complejos de la invención para actuar como antioxidantes un complejo representativo (A8) se sometió a un ensayo Oxyblot™. Este ensayo detecta grupos carbonilo (aldehídos y cetonas) en proteínas producidos por la oxidación catalizada por metal. Las proteínas se obtienen de cortes de cerebro de ratones Tg que se han sometido a los compuestos de ensayo. Se cree que los grupos carbonilo para son una 'evidencia del estado de oxidación de las proteínas'. Los grupos carbonilo en las cadenas laterales de las proteínas se derivatizan a la 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP-hidrazona) por reacción con diisocianato de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Las muestras pueden someterse a electroforesis en gel o directamente se pueden poner en una inmunotransferencia por puntos. El anticuerpo primario detecta el resto expuesto a DNP de las proteínas, usando un patrón proporcionado para leer concentraciones particulares de DNP que se encuentran en las proteínas.

Procedimiento

Tampones

20 Todos los tampones eran frescos antes del ensayo, excepto la solución de derivatización DNPH. La solución madre de DNPH y la solución de control de derivatización negativa se obtuvieron en el mercado y necesitaron una dilución 1:10 en dH2O. Se tomó la solución de neutralización y se aplicó directamente desde el kit de ensayo.

- 1 X PBS-T (1 l)
- 10 X PBS 100 ml
- Tween 20 0,5 ml
- dH2O 899,5 ml

Dilución/tampón de bloqueo (1 l)

1 X PBS-T	1000 ml
BSA	10 g
Ajustar el pH a	~ 7,4

El ensayo se realizó como se indica a continuación:

5 Se apartaron 5 µl de la muestra (dos alícuotas por muestra, como se requiere por duplicado, una para la reacción de derivatización, la otra para el control negativo) a partir de alícuotas de 20 µl diluidas previamente de (A8) y muestras de control para el ensayo de carbonilo (diluido para producir una concentración de proteína de 4 mg/ml tanto para SN como para el sedimento).

10 Se prepararon concentraciones patrón de acuerdo con la concentración de dinitrofenilo (DNP) de banda de albúmina de suero bovino (BSA) proporcionada (2,5 µl de solución patrón de kit = 100 fM de DNP de la banda de BSA). Se hicieron los siguientes patrones basados en la información anterior: 200, 150, 100, 50, 25, 12,5 fM DNP, PBS (0 fM)

15 patrón 200 fM = 5 µl de solución madre patrón proporcionada en el kit
 patrón de 150 fM = solución madre de patrón 3,75 + 1,25 µl PBS de (pH 7,4)
 patrón de 100 fM = 2,5 µl de solución madre patrón + 2,5 µl de PBS

20 Todos los demás patrones se hicieron por dilución en serie 1:1 de una solución 100 fM (5 µl) con PBS. Se prepararon patrones de forma idéntica a las muestras derivatizadas (no se empleó control negativo para los patrones).

Se añadieron las siguientes soluciones a la muestra/control, en el siguiente orden:

- 25
- 5 µl de SDS al 12 % (diluido en dH2O)
 - Ya sea: 10 µl de DNPH (dinitrofenilhidrazina; mezcla de reacción) O 10 µl de solución de Derivatización-Control (control negativo)
 - 7,5 µl de solución de Neutralización

30 Total = 27,5 µl de mezcla por muestra.

35 Se añadió SDS al 12 % a las muestras en hielo, después de lo cual las muestras se trataron todas a temperatura ambiente. Se añadió DNPH, las muestras se incubaron durante 15 min después se añadió solución de Neutralización. Las muestras que contenían DNPH se volvieron de un color naranja tras la adición de la solución de Neutralización, mientras que las muestras de Derivatización-Control permanecieron transparentes.

Se añadieron 50 µl adicionales de PBS a cada muestra para disminuir la viscosidad.

40 El dispositivo de inmunotransferencia por puntos tenía una placa de 96 pocillos instalada para recoger la muestra en la parte inferior y estaba equipado con una membrana de nitrocelulosa (14 cm X 9 cm) preempapada (PBS), y se selló entre la capa delgada de plástico blando y la capa de plástico duro superior. Los patrones y las muestras se cargaron en la placa de inmunotransferencia por puntos antes de encender la bomba de succión a potencia máxima (~19,3).

45 La membrana se colocó en tampón de bloqueo (40 ml) durante 1 hora, se aclaró dos veces brevemente con PBS-T. Después, la transferencia se incubó con el anticuerpo primario del kit (anti-DNP de conejo; dilución 1:150 en PBS-T, 134 µl de anticuerpo en ~20 µl de PBS-T) durante una hora, después se lavó dos veces inmediatamente, seguido de lavados 2 veces, 15 min y 2 veces, 5 min con PBS-T. Además, se incubó con anticuerpo secundario 1:300, 67 µl en 20 µl (IgG anti-conejo de cabra-HRP), después, se aclaró de nuevo como se ha descrito para la etapa de anticuerpo post-primario. La transferencia se desarrolló por incubación en reactivo de detección de quimioluminiscencia (GE) 4 ml de reactivo 1:4 ml de reactivo 2 durante 2 min.

55 La membrana se capturó usando el sistema de captura de imagen "LAS-3000" (Fujifilm) en un tiempo de captura de 4 min en el ajuste alto (exposición automática). Usando el programa de software Multi Gauge V2.3, se calculó la DOI (densidad óptica) de la inmunotransferencia por puntos. Se usó la muestra de DNP PBS derivatizada como fondo. Se realizaron estadísticas comparando la simulación frente a un grupo de tratamiento usando "Ensayo t: Dos muestras suponiendo varianzas desiguales" para los valores de DOI. Los resultados del ensayo de oxidación como se ha analizado anteriormente se muestran en las Figuras 4 y 5 y en la Tabla 4. Hubo una disminución significativa en DNP (carbonilos) en ambas fracciones cerebrales insolubles y solubles de los ratones tratados con A8 en comparación con el grupo de control (p = 0,001 y p <0,001, respectivamente). Los resultados se proporcionan en la Tabla 5 y en las Figuras 9 y 10.

Tabla 5

Ej. N.º	Edad de inicio dd mm aa	Edad de finalización dd mm aa	Identificación	DOI de la fracción insoluble 4 min	DOI de la fracción soluble 4 min
1	21- 01- 01	23- 03- 01	Control	2928819,1	3658003
2	21- 01- 01	23- 03- 01	Control	2565788,1	1718086
3	21- 01- 01	23- 03- 01	Control	1504266,1	1732442
4	15- 01- 01	18- 03- 01	Control	1007009,1	1694023
5	15- 01- 01	17- 03- 01	Control	1730518,1	3,193,021
6	22- 01- 01	17- 03- 01	Control	5105383,1	4081782
7	22- 01- 01	01-03- 22	Control	1690190,1	1569152
8	22- 01- 01	22- 03- 01	Control	1942335,1	2043031
9	22- 01- 01	22- 03- 01	Control	2905421,1	1457786
10	19- 01- 01	22- 03- 01	Control	3282780,1	2118132
11	03- 01- 01	03- 03- 01	Control	1912386,1	2438337
12	16- 01- 01	03- 03- 01	Control	2463515,1	3470839
13	21- 01- 01	23- 03- 01	A8	1419393,1	909877,1
14	21- 01- 01	23- 03- 01	A8	357259,11	924649,1
15	21- 01- 01	23- 03- 01	A8	1555864,1	513723,1
16	21- 01- 01	23- 03- 01	A8	1115150,1	1214351
17	15- 01- 01	17- 03- 01	A8	1203704,1	469925,1
18	06- 01- 01	08- 03- 01	A8	737727,11	989478,1
19	06- 01- 01	08- 03- 01	A8	960960,11	177146,1
20	14- 01- 01	16- 03- 01	A8	2152486,1	13833,11
21	06- 01- 01	08- 03- 01	A8	278327,11	878736,1
22	21- 01- 01	23- 03- 01	A8	241186,11	928334,1

El análisis estadístico de los datos en bruto proporcionados en la Tabla 5 se proporciona en la Tabla 6.

5

Tabla 6

Fracción insoluble			Fracción soluble		
Parámetro	Control	A8 (30 mg/kg)	Parámetro	Control	A8 (30 mg/kg)
Media	1537800,07	972585,67	Media	1609229,32	310756,97
Varianza	3,4959 E+11	3,6544E + 11	Varianza	7,72868E + 11	1,799E + 10
Observaciones	10	10	Observaciones	12	10
Diferencia de la media hipotética	0		Diferencia de la media hipotética	0	
df	18		df	12	
Estadístico t	2,11372856		Estadístico t	5,046473186	
P(T<=t) de una cola	0,02437979		P(T<=t) de una cola	0,000143098	
t Crítico de dos colas	1,73406359		t Crítico de dos colas	1,782287548	
P(T<=t) de una cola	0,04875957		P(T<=t) de una cola	0,000286197	
t Crítico de dos colas	2,10092204		t Crítico de dos colas	2,178812827	

Ejemplo 20 Actividad antioxidante de Cu GTSM

Se siguió el procedimiento del ejemplo 18 usándose Cu GTSM como compuesto de ensayo. Con respecto a todo lo demás, el procedimiento de ensayo fue igual. Los resultados se proporcionan en la Tabla 7 y las Figuras 11 y 12.

10

Ej. N.º	Edad de inicio dd mm aa	Edad de finalización dd mm aa	Identificación	DOI de la fracción insoluble 4 min	DOI de la fracción soluble 4 min
1	02- 03- 00	01- 05- 00	Control	175,69	173,72
2	25- 04- 00	24- 06- 00	Control	143,35	155,74
3	29- 03- 00	28- 05- 00	Control	183,76	97,63
4	28- 03- 00	27- 05- 00	Control	197,60	58,68
5	10- 03- 00	09- 05- 00	Control	152,17	146,56

ES 2 650 720 T3

6	03- 03- 00	02- 05- 00	Control	130,44	167,19
7	01- 03- 00	30- 04- 00	Control	157,60	172,96
8	30- 04- 00	13- 06- 00	Control	136,15	61,15
9	30- 04- 00	13- 06- 00	Control	58,45	50,82
10	30- 04- 00	13- 06- 00	Control	57,01	54,07
11	30- 04- 00	13- 06- 00	Control	46,83	58,9
12	30- 04- 00	13- 06- 00	Control		
13	03- 05- 00	16- 06- 00	Control	49,55	67,00
14	30- 04- 00	13- 06- 00	Control	72,96	64,12
15	03- 05- 00	16- 06- 00	Control		
16	03- 05- 00	16- 06- 00	Control		
17	08- 04- 00	26- 06- 00	Cu-GTSM	74,21	24,86
18	08- 04- 00	26- 06- 00	Cu-GTSM	32,85	21,33
19	08- 04- 00	26- 06- 00	Cu-GTSM	60,29	22,48
20	29- 03- 00	16- 06- 00	Cu-GTSM		
21	29- 03- 00	16- 06- 00	Cu-GTSM	51,64	19,83
22	29- 03- 00	16- 06- 00	Cu-GTSM	33,49	21,43
23	12- 03- 00	30- 05- 00	Cu-GTSM	47,76	22,72
24	12- 03- 00	30- 05- 00	Cu-GTSM		
25	06- 04- 00	24- 06- 00	Cu-GTSM	44,95	20,49
26	06- 04- 00	24- 06- 00	Cu-GTSM	67,91	28,42
27	06- 04- 00	24- 06- 00	Cu-GTSM	43,57	24,15
28	06- 04- 00	24- 06- 00	Cu-GTSM	52,85	26,42
29	29- 03- 00	16- 06- 00	Cu-GTSM	77,9	20,8

Se proporciona el análisis estadístico de los datos proporcionados en la Tabla 7 en la Tabla 8.

Tabla 8

Fracción insoluble			Fracción soluble		
Parámetro	Control	Cu-GTSM (10 mg/kg)	Parámetro	Control	Cu-GTSM (10 mg/kg)
Media	120,12	53,4018182	Media	102,1953846	22,993636
Varianza	3069,82913	231,326996	Varianza	2691,710377	7,2646055
Observaciones	13	11	Observaciones	13	11
Diferencia de la media hipotética	0		Diferencia de la media hipotética	0	
df	14		df	12	
Estadístico t	4,16038659		Estadístico t	5,495418509	
P(T<=t) de una cola	0,00048095		P(T<=t) de una cola	6,86308E-05	
t Crítico de dos colas	1,76131012		t Crítico de dos colas	1,782287548	
P(T<=t) de una cola	0,0009619		P(T<=t) de una cola	0,000137262	
t Crítico de dos colas	2.14478668		t Crítico de dos colas	2.178812827	

5

Ejemplo 21 Efecto de los compuestos sobre la fosforilación de tau

Para comparar, los niveles de fosfo-Tau (p-396) soluble (SN) e insoluble (sedimento) del grupo de tratamiento con Cu-GTSM (10 mg/kg) en comparación con el grupo de control como se muestran en la Tabla 9. Estos son ratones APP/PS1 dobles transgénicos, machos y hembras.

10

Sumario de la preparación de SN y sedimento:**Tabla 9**

Grupo de tratamiento	AN n.º	N.º de ratones en el ensayo	Nº de ratones que completaron el ensayo	N.º de ratones que murieron	Tasa de supervivencia en %	Edad de finalización media dd mm aa
Control	n/a	9	9	0	100 %	14- 06- 00
Cu(GTSM)	n/a	14	13	1	93 %	18- 06- 00

5 En la finalización del ensayo se recogió el lado izquierdo del cerebro incluyendo el cerebelo, se registró el peso húmedo y se colocó en un tubo de ultracentrífuga Beckman etiquetado. Esta muestra de cerebro se utiliza para someter a ensayo los niveles de Abeta y de metal en el homogeneizado de sobrenadante (SN) y sedimento.

Preparación de homogeneizado de SN y sedimento de Cerebro para CuGTSM y Control

10 Brevemente, se añadió 1 ml de PBS con el pH ajustado a 7,4 (sin Ca ni Mg, Sigma D-8537, que contiene un comprimido de inhibidor de proteasa sin EDTA Complete® por 50 ml de PBS) y 10 ul de solución madre 0,5 M de hidroxitolueno butilado en acetonitrilo a cada muestra, se sometieron a ultrasonidos a una intensidad del 40 % para ráfagas de 2 veces, 10 s o hasta que se homogeneizaran. Las muestras estuvieron en hielo en todo momento. Se transfirió 1 ml del homogeneizado a un tubo nuevo y se ultracentrifugó a ~ 100.000, por tanto, 47K rpm en el Optimax usando el rotor TLA55 durante 30 min a 4 °C. Se recogió el sobrenadante (SN) (solo se usaron puntas transparentes ART en todo momento), se resuspendió el sedimento en 1 ml adicional de PBS y 10 ul de BHT (0,5 M) y se sometieron a ultrasonidos hasta que se obtuvo una mezcla homogénea. El resto del homogeneizado (<50 ul) se congeló a -20 °C.

20 Alícuotas para el sedimento:

350 µl - ICPMS; 20 µl - ensayo de BCA; 20 µl - ensayo de transferencia de Western; 2x alícuotas de 20 µl para el ensayo Oxyblot de carbonilo.

25 Alícuotas para SN:

500 µl - ICPMS; 20 µl - ensayo de BCA; 20 µl - ensayo de transferencia de Western; 2x alícuotas de 20 µl para el ensayo Oxyblot de carbonilo.

Determinación de los niveles de proteína para todas las muestras:

35 Se usó el kit de ensayo de BCA (Pierce) para determinar la concentración de proteína de las muestras de sedimento y SN.

40 Una alícuota de 20 ul de sedimento y SN se diluyó 1:10, es decir, se añadieron 180 µl de PBS. Se determinó la concentración de proteína en cuanto al método de ensayo de BCA. Los niveles de absorbancia fueron de aproximadamente los 0,3-0,9 Abs. Usando el programa Excel se determinó el volumen de PBS necesario para hacer una solución madre de: 3 µg/µl de proteína de SN y 0,2 µg/µl de proteína de sedimento usando las alícuotas de 20 µl.

Preparación de muestras para la transferencia de Western:

45 En resumen, se comparó el grupo de tratamiento CuGTSM con respecto al control tanto para las muestras solubles (SN) y como insolubles (sedimento). En total se prepararon 2 geles Biorad Criterion de Bis-Tris al 4-12 % de 26 pocillos.

50 Una vez que el contenido de proteína de cada muestra se había determinado mediante el ensayo BCA un se prepararon 3 µg de muestra de proteína/µl de muestra de SN y 0,2 µg de proteína/muestra de sedimento. Se tomó una alícuota de 15 µl de la solución madre 3 µg/ul del SN y la solución madre 0,2 µg/ul del sedimento para hacer una muestra de 45 y 3 µg de proteína/calle, respectivamente. Se añadieron 5 µl de SBx4 que contenía mercaptoetanol al 10 % a cada muestra de 15 µl. (Para sedimentos, n = 24 muestras, para SN, n = 22 muestras).

55 Se calentaron las muestras durante 5 minutos a 90 °C. Se centrifugaron las muestras a pulsos durante ~10 s. Las muestras se cargaron en geles de Bis-Tris al 4-12 %, de 26 pocillos (Criterion Gel, BioRad). Los geles se desarrollaron a 110 V durante 75 min, después, a 130 V durante 50 min, temp ambiente. Los geles se transfirieron a 40 V durante 60 min, a 4 °C. La membrana se calentó durante 5 minutos en 1 x PBS (precalentado) en el microondas. La membrana se bloqueó durante 1 hora en leche desnatada al 5 % en TBST a temperatura ambiente.

60 Se sondeó con anticuerpo primario durante la noche: anti-fosfo-Tau de conejo (BioSource; 1:1000, 30 ul/30 ml, 15 ml

ES 2 650 720 T3

por transferencia) en TBST a 4 °C. Después de días, se lavaron las transferencias ~6 x 10 min con TBST. Se sondaron con anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente: anti HRP de conejo (DAKO) 1:5000 diluido en TBST (8 ul/40 ml, 20 ml por transferencia).

- 5 Se lavaron las transferencias durante 6 x 10 min con TBST. Se usó reactivo ECL (Amersham) para desarrollar las transferencias (8 ml por blot, relación 1:1 de reactivo A y B). Se incubaron las transferencias en ECL durante 2 min.

10 Todas las membranas se capturaron usando el sistema de captura de imágenes "LAS-3000" (Fujifilm) a un tiempo de captura de 2 min en el ajuste alto para la transferencia 1 (sedimento) y 8 s para el gel 2 (SN; también se expuso una vez manualmente durante 3 min, ajuste alto). Las bandas triméricas (combinadas), que aparecen entre -49 y 62 kDa, se cuantificaron usando el programa de software Multi Gauge V2.3. Las imágenes se han almacenado en el archivo para referencias futuras y se preparó una copia impresa en el archivo de PowerPoint "Imágenes de Western de Fosfo-Tau 06-11-14). Se usó la DOI (densidad óptica) para comparar los grupos tratados y de control para determinar los niveles relativos de fosfo-Tau presentes".

15 Se realizaron estadísticas comparando la simulación frente a un grupo de tratamiento usando "Ensayo t: Dos muestras suponiendo varianzas desiguales" para los valores de DOI las muestras tanto de sedimento como de SN. Los resultados se muestran en la Tabla 10 y en las Figuras 13 y 14

20

Tabla 10

Ej. N.º	Edad de inicio dd mm aa	Edad de finalización dd mm aa	Identificación	DOI de la fracción insoluble 4 min	DOI de la fracción soluble 4 min
1	00- 03-02	01- 05- 00	Control	10831328,61	69853169,82
2	25- 04- 00	24- 06- 00	Control	8353024,09	100136407,8
3	29- 03- 00	28- 05- 00	Control	11024896,87	92012735,29
4	28- 03- 00	27- 05- 00	Control	9164050,65	94323290,82
5	10- 03- 00	09- 05- 00	Control	16508335,65	80946528,29
6	03- 03- 00	02- 05- 00	Control	8289077,87	73140488,21
7	01- 03- 00	30- 04- 00	Control	12013744,43	68189827,36
8	30- 04- 00	13- 06- 00	Control	8912742,37	128130770,3
9	30- 04- 00	13- 06- 00	Control	4701385,34	107130713,2
10	30- 04- 00	13- 06- 00	Control	4562458,65	
11	30- 04- 00	13- 06- 00	Control	5697896,21	
12	03- 05- 00	16- 06- 00	Control	5599566,21	102959537,7
13	30- 04- 00	13- 06- 00	Control	3643456,95	123262249,3
14	08- 04- 00	26- 06- 00	Cu-GTSM	1477928,37	74533337,44
15	08- 04- 00	26- 06- 00	Cu-GTSM	1065622,78	68679994,36
16	08- 04- 00	26- 06- 00	Cu- GTSM	1856749,43	36374522,21
17	29- 03- 00	16- 06- 00	Cu-GTSM	no Tg	no Tg
18	29- 03- 00	16- 06- 00	Cu-GTSM	1202317,09	36602406,27
19	29- 03- 00	16- 06- 00	Cu- GTSM	1891529,65	33773474,29
20	12- 03- 00	30- 05- 00	Cu-GTSM	1082151,43	51807875,36
21	12- 03- 00	30- 05- 00	Cu-GTSM	no Tg	no Tg
22	06- 04- 00	24- 06- 00	Cu- GTSM	1687976,43	81127942,21
23	06- 04- 00	24- 06- 00	Cu-GTSM	1433094,43	53916728,13
24	06- 04- 00	24- 06- 00	Cu-GTSM	1237435,43	3 8578309,13
25	06- 04- 00	24- 06- 00	Cu-GTSM	1453283,71	71563860,21
26	29- 03- 00	16- 06- 00	Cu-GTSM	1470088,65	89976911,06

Un análisis estadístico de los datos proporcionados en la Tabla 10 se proporciona en la Tabla 11.

Tabla 11

Parámetro	Insoluble Fracción		Parámetro	Fracción Soluble	
	Control	Cu-GTSM (10 mg/kg)		Control	Cu-GTSM (10 mg/kg)
Media	6879494,38	3085357,57	Media	94553247	57903214,61
Varianza	1,4055E + 13 2,0847E + 13		Varianza	4,17E + 14 4,07337E + 14	
Observaciones	13	11	Observaciones	11	11

Diferencia de la media hipotética	0	Diferencia de la media hipotética	0
df	19	df	20
Estadístico t	2,19923513	Estadístico t	4,234461
P(T<=t) de una cola	0,02022171	P(T<=t) de una cola	0,000203
t Crítico de dos colas	1,72913279	t Crítico de dos colas	1,724718
P(T<=t) de una cola	0,04044342	P(T<=t) de una cola	0,000407
t Crítico de dos colas	2,09302405	t Crítico de dos colas	2,085963

Ejemplo 22 Datos de biodisponibilidad

5 Se seleccionaron ratones hembra jóvenes de 12-14 meses de edad, no transgénicos (no Tg) (BL/6XSJL) Tg APP2576 (-) para el ensayo de biodisponibilidad. Para cada fármaco, a cuatro ratones se les administraron por vía oral 5 o 30 mg/kg. En el último día (día 7 para los compuestos de Cu) los ratones recibieron la dosis normal de fármaco con adiciones de Cu-64 radiomarcado o análogo Zn-65. Los compuestos radiomarcados se prepararon mediante protocolos convencionales (P. S. Donnelly, O. Golovko, J. M. Heslop, P. Burke, J. C. Clark, J. R. Dilworth, F. I. Aigbirhio, *J. Label. Compd. Radiopharm.*, 2005, **48**, S163).

10 La biodisponibilidad del fármaco se proporcionó mediante la medición de la radiactividad de muestras de tejido. Duración: Los compuestos se administraron por vía oral mediante sonda nasogástrica durante 7 u 8 días consecutivos
Vehículo: SSV pH 6,3

15 Preparación del fármaco: volumen de dosificación fijado a 100 ~l para un ratón de 25 g o 4 veces el peso del ratón. La dosis del fármaco es de 5 mg/kg. Los resultados del estudio de biodisponibilidad se proporcionan en la Tabla 12 proporcionándose un sumario de los resultados en la Tabla 13.

Tabla 12

Ratón	Comp.	Sangre (CPM)	Hígado (CPM)	(Cerebro CPM)	Sangre (Vol)	Hígado (g)	Cerebro (g)
1	A8	7925	38985	516	1,0	0,27	0,45
2	A8	6932	46158	486	1,0	0,37	0,30
3	A8	34644	170 710	1998	1,0	0,43	0,22
4	A8	11363	78729	952	1,0	0,29	0,40
5	A16	4626	122 655	966	1,0	0,38	0,49
6	A16	356	2892	162	1,0	0,21	0,37
7	A16	5908	81 209	627	1,0	0,24	0,37
8	A16	5664	84 918	773	1,0	0,20	0,42
9	A23	5643	99 907	1084	1,0	0,21	0,37
10	A23	5242	56 261	7667	1,0	0,30	0,42
11	A23	5298	30 958	427	1,0	0,19	0,41
12	A23	115	1,341	36	1,0	0,20	0,36

20 Patrones

A8 = 2397203 cpm
A16 = 2794850 cpm
25 A23 = 1901062 cpm

Tabla 13

	Sangre (% de ID)	Hígado (% de ID)	Cerebro (% de ID)
Ratón 1	0,33	6,14	0,05
Ratón 2	0,29	5,20	0,07
Ratón 3	1,45	16,72	0,38
Ratón 4	0,47	11,36	0,10
Media para A8	0,63	9,86	0,15
Ratón 5	0,17	11,61	0,07
Ratón 6	0,01	0,50	0,02
Ratón 7	0,21	11,96	0,06
Ratón 8	0,20	14,97	0,07
Media para A16	0,19	12,84	0,07

Ratón 9	0,30	24,79	0,15
Ratón 10	0,28	9,74	0,96
Ratón 11	0,28	8,80	0,05
Ratón 12	0,01	0,35	0,01
Media para A23	0,28	14,44	0,39

Ejemplo 23 Los complejos de BTSC-metal activan las vías dependientes de JNK y PI3K dando como resultado una degradación aumentada del A β 1-40 secretado.

- 5 Se trataron células APP-CHO con complejos de metal-BTSC 10 μ M durante 6 h. Las células se extrajeron en tampón de lisis Phosphosafe (Novagen) y las proteínas se separaron por electroforesis en gel en geles de Tris al 12 %-glicina. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF y se bloquearon con leche en polvo durante 1 h. Las transferencias después se sondaron para determinar las formas totales y fosforiladas de Akt, JNK y GSK3 usando anticuerpos de Cell Signaling Technologies. Después de la detección con antisuero secundario (marcado con HRP), se analizaron las transferencias de señales usando análisis de quimioluminiscencia en un detector de imágenes GeneGnome. La activación de PI3K se demuestra por el aumento de los niveles de Akt fosforilada (p-Akt). El JNK activado se demuestra por el aumento de p-JNK. El aumento de los niveles de GSK3 desactivado se demuestra por el aumento de p-GSK3.
- 10
- 15 Se trataron células APP-CHO con [Zn(ATSE)] 10 μ M con o sin inhibidores específicos de PI3K (LY294002), JNK (SP600125) o p38 (SB203580) (25 μ M de cada uno) durante 6 horas y el medio acondicionado se analizó para determinar los niveles de A β 1-40 por ELISA normal. La inhibición de JNK por SP600125 impide la pérdida de A β por [Zn(ATSE)]. La inhibición de PI3K por LY294002 impide la pérdida de A β por [Zn(ATSE)].

20 **Ejemplo 24 Datos conductuales mediante laberinto Y**

Con el fin de someter a ensayo la eficacia de los complejos metálicos se realizó un ensayo conductual en el laberinto Y en ratones APP/PS1 dobles transgénicos. El procedimiento utilizado fue como se indica a continuación:

25 *Preparación*

Se preparó un laberinto Y con los brazos etiquetados. El suelo del laberinto se cubrió con serrín de manera uniforme en los 3 brazos (se usó serrín para ratones negros y fibra-ciclo para ratones agouti. A cada ratón que se iba a usar en el ensayo después se le asignó aleatoriamente un brazo de partida y uno bloqueado.

30

Ensayo

En el inicio de cada experimento se colocaron etiquetas al lado del laberinto indicando el número de ID del ratón y la fecha. Después, el brazo cerrado del laberinto se bloqueó usando el inserto de pared designado y comenzó la grabación en vídeo. El ratón se colocó en su brazo de partida frente a la pared asegurándose de que el brazo requerido estuviese bloqueado y se le dejó explorar el laberinto durante 10 minutos. Después, el ratón se retiró del laberinto durante un periodo de 60 minutos, tiempo durante el cual se retiró el inserto de pared para desbloquear el brazo bloqueado del laberinto. Al completarse el periodo de espera de 60 minutos se colocó de nuevo al ratón en el laberinto frente a la pared, de vuelta en el mismo brazo de partida, sin embargo, esta vez sin ningún brazo bloqueado. Al ratón se le permitió explorar durante 5 minutos y después se retiró. Entre cada inserción del ratón el serrín se mezcló dentro del laberinto.

35

40

Análisis

- 45 Después, se analizaron los datos de vídeo por ordenador para determinar el periodo que cada ratón pasó en cada brazo del laberinto en la primera incursión y en la segunda incursión.

Se dividieron 24 ratones APP/PS1 dobles transgénicos aleatoriamente en dos grupos de 12 ratones en cada grupo. El primer grupo se sometió a una dosis de control o tratamiento simulado, mientras que el segundo grupo se trató con CuGTSM a una dosis de 10 mg/kg. Los resultados se muestran en la Tabla 14.

50

Tabla 14 Datos del laberinto Y

Tratamiento	% de Visita al brazo novedoso	% de Visita al brazo de partida	% de Visita al otro brazo
Control	33,2	30,7	36,1
CuGTSM/10 mg/kg.	47,9	29,7	22,4

- 55 En los ratones normales la respuesta normal es que al tras volverse a someter a ensayo (es decir, con el brazo novedoso sin bloquear) los ratones pasarán una proporción significativamente mayor de tiempo en el brazo novedoso en comparación con el brazo de partida y el otro brazo. Por tanto, normalmente los ratones pasarán su

tiempo un 50 %, 25 %, 25 %. Por el contrario, si el porcentaje de tiempo o el número de visitas es aproximadamente igual, los resultados se interpretan como que los ratones no tenían memoria de la experiencia inicial y, por tanto, no reconocieron el brazo novedoso como tal. Los resultados anteriores indican por tanto, claramente, que los ratones tratados con CuGTSM tuvieron una mejoría significativa de la memoria en comparación con el ratón de control.

5

Ejemplo 25 Inhibición por CuGTSM de GSK3 β

Con el fin de demostrar claramente que los complejos metálicos descritos inhiben GSK3 β se sembraron dos conjuntos de muestras celulares de células de neuroblastoma M17 (humanas) o N2a (murinas) a una relación de pase de 1:4 a partir de un matraz de células confluente al 90 % y se cultivaron hasta un 80-90 % de confluencia. El medio se reemplazó por OptiMem sin suero recién preparado y las células se expusieron a CuGTSM 1 o 100 nM (de solución madre 10 mM en DMSO) durante 18 h (durante la noche). El medio se retiró y las células se extrajeron en tampón de extracción Phosphosafe (Invitrogen) y se congelaron a -80 °C. Se realizaron transferencias de Western en lisados celulares para el GSK3 β y el fosfo-GSK3 α/β totales (Cell Signaling Technology). Las transferencias revelaron que GSK3 α/β se fosforilaba robustamente por tratamiento con CuGTSM en comparación con las células de control tratadas con vehículo (DMSO) solo. La fosforilación de GSK3 α/β induce la inhibición de la actividad de GSK3. Como se sabe que GSK3 induce la fosforilación de tau (un marcador patológico importante en la EA), se esperaba que la inhibición de la actividad de GSK3 por CuGTSM inhiba la fosforilación de tau. Los resultados se muestran en la Figura 15.

20

Ejemplo 26 Efecto de complejos metálicos tales como CuGTSM como antioxidantes en un modelo de enfermedad de Parkinson.

Se realizó una serie de ensayos en los que el efecto de CuGTSM sobre la inhibición de la muerte celular inducida por dopamina se realizaron en células WT y células A30P. El protocolo utilizado fue como se indica a continuación.

25

Cultivo celular

La estirpe celular se mantuvo en OPTI-MEM (Gibco) complementado con suero de ternera fetal (FCS) al 10 %, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio y Pen/Estrep. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada de un 95 % de aire y un 5 % de CO₂. Se sembraron las células de ensayo en placas de cultivo de 48 pocillos a 4 x 10⁴ células por pocillo. Las células se dejaron sedimentar durante la noche después se incubaron con fármacos durante 24 h antes de ser sometidas a ensayos de MTT para determinar la viabilidad celular.

35

Ensayo de MTT para la determinación de la viabilidad de las células M17

Se evaluó la viabilidad de las células usando un ensayo de MTT. Las mitocondrias activas convierten la sal de tetrazolio MTT de color amarillo en formazán de color morado que puede medirse mediante un espectrofotómetro como se ha descrito en los métodos anteriormente (Mossman, 1983). La mezcla de medios y reactivos, por ejemplo, la dopamina, se retiró por aspiración y se añadió medio que contenía MTT 5 mg/ml y la placa se incubó durante 1 h a 37 °C. La solución medio/MTT restante se aspiró y después las células se solubilizaron con DMSO. La placa de 48 pocillos después se leyó a 595 nm en un lector de placas.

40

En esencia se trató una serie de células WT y células A30P fueron tratados con un control, dopamina, CuGTSM, CuATSM y combinaciones de dopamina y CuGTSM y dopamina y CuATSM a diversas concentraciones para determinar la capacidad del compuesto para actuar como un antioxidante y mediar en la muerte celular.

45

Los resultados se muestran en la Tabla 15 (células WT) y la Tabla 16 (células A30P)

50

Tabla 15 Células WT

Tratamiento	% de Recuperación
Dopamina 500 μ M + CuGTSM 0,1 μ M	-34,57
Dopamina 500 μ M + CuGTSM 0,01 μ M	36,03
Dopamina 500 μ M + CuATSM 0,1 μ M	103,13
Dopamina 500 μ M + CuATSM 0,01 μ M	64,28

Tabla 16 Células A30P

Tratamiento	% de Recuperación
Dopamina 500 μ M + CuGTSM 0,1 μ M	54,19
Dopamina 500 μ M + CuGTSM 0,01 μ M	97,85
Dopamina 500 μ M + CuATSM 0,1 μ M	97,77
Dopamina 500 μ M + CuATSM 0,01 μ M	105,90

Los resultados demuestran claramente la capacidad de los complejos para actuar como antioxidantes y para conducir a la recuperación celular. Los resultados se muestran gráficamente en las Figuras 16 y la Figura 17.

Ejemplo 27 Capacidad de los complejos para el tratamiento de ratones con enfermedad de Parkinson inducida. Lesión con toxina 6-OHDA

Se produjo una lesión parcial de la SNpc en los ratones mediante la inyección de la neurotoxina 6-OHDA en la SNpc derecha. Al ratón se le inyectó atropina (0,5 mg/kg) para reducir las secreciones de las vías respiratorias, junto con xilazina (10 mg/kg) para producir la sedación (inyección intramuscular con una aguja de calibre 27, 60 microlitros). Los ratones se anestesiaron con hidrato de cloral al 4 % en PBS (10 ml/kg, intraperitoneal) y las cabezas se aseguraron en un marco estereotáxico para la cabeza con la barra de mordedura 3 mm por encima de la horizontal. Una solución 1,65 mg/ml de 6-OHDA se preparó con ácido ascórbico (0,2 mg/ml) y se mantuvo en hielo hasta el momento de la inyección. Una jeringa Hamilton de 10 ml (con una aguja de calibre 26) montada en una bomba de jeringa (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL) se insertó en la SNpc derecha a través de un pequeño agujero perforado a través de la parte superior del cráneo. Se realizó una sola inyección (2,5 mg) de 6-OHDA (Sigma) en la SNpc derecha (anteroposterior, 3,0 mm; lateral, 1,05 mm; dorsoventral, 4,7 mm, con respecto a lambda) (Franklin y Paxinos, 1997). Al finalizar la inyección, la aguja se deja en su lugar durante 5 min y después se retira lentamente a una velocidad de 1 mm/min. Después de la cirugía, la piel se suturó, se aplicó antiséptico (yodo al 1 % p/p, Betadine; Faulding and Company, Salisbury, Australia del Sur) a la herida y los ratones se dejaron en una jaula calentada para recuperarse. Se administró paracetamol (100 mg/kg) en el agua potable como analgésico después de la cirugía.

Alimentación con fármacos

Los fármacos de ensayo se suspendieron en vehículo de suspensión patrón (SSV; NaCl al 0,9 % p/v, Na-CMC al 0,05 % p/v, alcohol bencílico al 0,05 % v/v, Tween 80 al 0,04 % v/v) y se suministraron por vía sonda oral a una dosis diaria de 10 o 30 mg/kg durante 7 días antes de la lesión y después durante un periodo de 14 días consecutivos después de la lesión (Cherny *et al.*, 2001); los controles recibieron SSV solo.

Rotación inducida por comportamiento-anfetamina

Rotación - Este ensayo solo es aplicable a los ratones y las ratas que reciben una inyección unilateral de 6-OHDA para producir una lesión parcial de las neuronas de la sustancia negra. El roedor lesionado se coloca en un recipiente y se graba en vídeo durante una hora, después se le inyectan 5 mg de anfetamina/kg. Catorce días después de la lesión el ratón estaba conectado al sistema Rotacount automatizado (Columbus Instruments, Columbus, OH, EE.UU.). Éste registra las rotaciones ipsilaterales y contralaterales. El ratón está unido de manera que cualquier movimiento en sentido horario o en sentido antihorario es registrado por un sensor que después se controla y se recuenta por un ordenador (software). Una vez conectado se establecen los niveles de movimiento basales por dejando el roedor durante 30 minutos. Después, los ratones son inyectados a través de una inyección intraperitoneal de anfetamina 5 mg/kg (Sigma) y después el movimiento se registra durante una hora más. Después, los datos de los sensores se representan gráficamente y se analizan.

histología y tinción con TH

Los animales se sacrificaron mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (Lethobarb; 0,35 mg/gm) y se perfundieron con 30 ml de PBS 0,1 M calentado (37 °C), pH 7,4, con heparina (1 µml), seguido de 30 ml de paraformaldehído al 4 % enfriado (Sigma, San Luis, MO) y ácido pícrico al 0,2 % en tampón fosfato 0,1 M (4 °C), pH 7,4. Después, los cerebros se retiraron y se dejaron a 4 °C durante la noche en sacarosa al 30 % en PBS.

Las secciones se fijaron en etanol al 100 % durante 15 min a 4 °C. Las secciones se secaron al aire y se aclararon con PBS 0,1 M antes de ser incubadas en solución de bloqueo (NGS al 3 %, Triton al 0,3 % (v/v), PBS 0,1 M) durante 15 min a TA. Después de 3 lavados de 5 min con PBS 0,1 M, las secciones se incubaron durante la noche a TA con anticuerpo anti-TH de conejo (1:800 Chemicon) en NGS al 1 %/Triton al 0,3 %/PBS 0,1 M. A esto le siguió una etapa de lavado adicional e incubación de IgG anti-conejo de cabra (1:300 SOURCE) en NGS al 1 %/Triton al 0,3 %/PBS al 0,1 M durante 2 h a TA. La reacción se visualizó con tetraclorhidrato de 3,3-diaminobenzidina (DAB) durante 15 min y después DAB con peróxido de hidrógeno durante 5 min. Las secciones se lavan tres veces en PBS 0,1 M durante 10 min y después se contratiñen con rojo neutro (50 s).

Estimación del tamaño de la lesión.

Estimaciones estereológicas del número de células

El número total de neuronas DA en el SN se estimó usando un diseño de muestreo fraccionador [referencias Finkelstein *et al.* 2000, Stanic *et al.* 2004 y West y Gundersen 1990]. Ratones: los cerebros se seccionan en una serie 1:3 a 40 µm y se realiza una inmunohistoquímica para las secciones teñidas con Nissl. Los recuentos se hacen a intervalos regulares predeterminados (x 140 um, y 140 um). Las muestras sistemáticas de la zona ocupada por los núcleos se hacen a partir de un punto de partida aleatorio. Un marco de recuento imparcial de área conocida (45 um

x 35 um) se superpone sobre la imagen de las secciones de tejido.

Los resultados se muestran claramente en la figura 18 y demuestran que, en comparación con el control, los ratones tratados estaban significativamente menos desorientados. Por tanto, los datos de comportamiento muestran que los ratones tratados ya sea con Cu(ATSM) o Cu(GTSM) rindieron mejor (es decir, menos movimiento en forma circular) que el grupo de control. El movimiento circular en respuesta a un estímulo con anfetamina es el resultado de la muerte de las células de la sustancia negra, como consecuencia de la lesión por la 6-hidroxi dopamina. Que los animales tratados tuviesen un mejor rendimiento es coherente con los fármacos que tienen un efecto protector sobre las células de la sustancia negra lesionada. Esto se confirmó mediante los recuentos de células en el examen post-mortem de los animales, cuyos resultados se muestran en la Figura 19.

Ejemplo 28 Agotamiento químico de PrPc usando complejos metálicos

Se realizó un experimento en el que se trataron células GT1-7 y células HeLa con un complejo metálico para determinar el efecto del complejo sobre el agotamiento de PrPc. Esto es significativo ya que se cree que la infectividad priónica y la toxicidad están mediadas por una interacción entre la forma PrPsc infecciosa y la forma endógena normal celular para PrPc. Si se inactiva PrPc entonces el PrPsc tóxico/infeccioso no tiene nada con lo que interactuar y, por tanto, puede no provocar una respuesta tóxica ni transmitir la infección. El protocolo utilizado fue como se indica a continuación:

Células GT1-7

Las células se sembraron en una placa de 6 pocillos y se cultivaron hasta un ~70 % de confluencia (máximo) antes del tratamiento. Después, el medio OptiMEM se retiró de las células y se reemplazó por diversas concentraciones de Cu(GTSM), 1 ml para cada pocillo. Las células se tratan durante 6 horas a 37 °C y después del tratamiento de 6 horas, las células se recogieron para el análisis por transferencia de Western usando un protocolo de lisis celular.

Células HeLa

Las células se sembraron en una placa de 6 pocillos y se cultivaron hasta un ~90 % de confluencia antes del tratamiento. El medio DMEM se retiró de las células y se reemplazó con diversas concentraciones de Cu(GTSM), 1 ml para cada pocillo. Las células se tratan durante 6 horas a 37 °C. Después del tratamiento de 6 horas, las células se recogieron y se prepararon lisados de proteínas usando un protocolo de lisis celular.

Los resultados se muestran en las figuras 20 y 21. Como puede observarse, hubo una reducción significativa de PrPc en las células tratadas con un complejo metálico.

Ejemplo 29 Efecto de los complejos metálicos sobre ratones G93A SOD1 con ELA.

Se realizó un experimento en el que se determinó el efecto del complejo metálico sobre ratones G93A-SOD1. Los ratones de esta composición genética son un modelo útil para la ELA y se usan como modelo de ratón para determinar la eficacia del tratamiento para esta afección. Se preparó una solución de complejo metálico (CuGTSM) como se indica a continuación:

Componentes del vehículo de suspensión patrón (SSV, del inglés *Standard Suspension Vehicle*)

- Na-carboximetilcelulosa (Na-CMC; viscosidad media; n.º de Sigma C-4888)
- Alcohol bencílico
- Tween 80® (monooleato de polioxietilensorbitano; n.º de Sigma P-8074)
- Cloruro de sodio (NaCl)

Los componentes relativos de la composición fueron como se indica a continuación:

Tabla 17

Composición	Conc.	1 l	500 ml
NaCl	0,9 % (p/v)	9,0 g	4,5 g
Na-CMC	0,5 % (p/v)	5,0 g	2,5 g
Alcohol bencílico	0,5 % (v/v)	5,0 ml	2,5 ml
Tween 80	0,4 % (v/v)	4,0 ml	2,0 ml

Cu-ATSM

Se proporcionó CuATSM a los ratones en dosis de 30 mg/kg a través de sonda oral. Se almacena a -20 °C y se descongela el día de la administración.

La mezcla se sometió a ultrasonidos con sonda, ráfagas de 2 X 15 s.

Dosis dada a los ratones = 4X peso del ratón. (por ejemplo, un ratón de 25 g recibió 100 µl de suspensión).

- 5 Mezclar brevemente el fármaco por agitación/perturbación antes de cada administración (se produce una ligera sedimentación a pesar de los ultrasonidos).

10 El Cu-ATSM se administró una vez al día (5 días/semana) a ratones TgSOD1 G93A hasta que alcanzan la etapa final (pérdida de peso corporal del 15-20 %, parálisis de una extremidad posterior y pérdida de la función motora parcial). El animal se sacrifica en este punto y se representa el tiempo de supervivencia. Los resultados se muestran en la figura 22.

15 Durante el análisis del estudio también se estudió la aparición de la parálisis de la pata trasera. Los resultados que se muestran en la figura 23 muestran claramente que CuATSM retrasa significativamente la aparición de la parálisis en ratones con ELA.

20 Además, un estudio de los presentes resultados en comparación con la bibliografía demuestra claramente que los complejos metálicos tales como Cu ATSM proporcionan la mayor esperanza de vida para los ratones G93A-SOD1 en comparación con otros tratamientos farmacológicos notificados. Los tratamientos notificados se muestran en la tabla 18 a continuación.

Tabla 18

Tratamiento farmacológico	Aumento de la esperanza de vida
CuATSM	31-33 días
zVAD-fink	27 días
Creatina	20 días
AEOL 10150	20 días
Ro 28-2653	13 días
Minociclina	11-21 días
Riluzol	10-15 días
Ceftriaxona	10 días
Antibiótico β-lactámico Ginseng SOD1	7 días
Gabapentina	Sin efecto
Vitamina E	Sin efecto
Acetilsalicilato de lisina	Sin efecto

Ejemplo 30 Efecto de los complejos metálicos sobre el EGFR

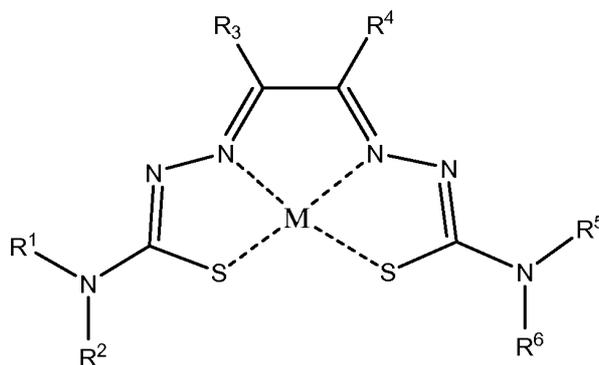
25 Se trataron células U87MG-EGFR transfectadas con CuGTSM 25 µM o DMSO como control de vehículo durante 5 h y se determinó la fosforilación de EGFR (tyr1068) por transferencia de Western. Se usaron antisueros para EGFRtyr1068 sistemáticamente ya este es uno de los residuos de tirosina críticos implicados en la activación de EGFR y la señalización corriente abajo. También se notifica sistemáticamente en la bibliografía acerca de la
30 activación de EGFR. La Figura 24A muestra que la fosforilación de EGFR y, por tanto, la activación, se produjeron en el tratamiento con CuGTSM en comparación con el control de vehículo.

Ejemplo 31 Efecto de la activación del EGFR por CuGTSM sobre la fosforilación corriente abajo de ERK, GSK3 y JNK

35 Se realizó un estudio para determinar si las vías de cinasas moduladas por CuGTSM estaban mediadas por la activación del EGFR. Esto se realizó mediante el tratamiento de células U87MG-EGFR con DMSO 25 µM, CuGTSM, CuGTSM más PD153035 10 µM (inhibidor de EGFR) o PD153035 10 µM solo. Después, se determinó la activación de ERK, GSK3 y JNK por transferencia de Western. La Figura 23 demuestra que hubo una disminución en la
40 fosforilación inducida por CuGTSM de JNK, GSK3 y ERK en presencia de PD153035, aunque la activación de estas cinasas no fue eliminada completamente por el inhibidor de EGFR. Esto indica que, aunque la activación de EGFR reguló la activación de estas cinasas corriente abajo en cierto grado, su regulación también está potencialmente controlada por otras vías de receptores no examinadas en este estudio. Las transferencias de Western se muestran en las figuras 24A a 24 D

45 Las siguientes cláusulas numeradas representan parte de la descripción.

- 50 1. Un método de tratamiento o profilaxis de una afección en un sujeto en el que el suministro de metal puede prevenir, aliviar o mejorar la afección, incluyendo el método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo metálico de Fórmula (I).



Fórmula (I)

en la que M es un metal divalente;

5

R¹ y R² se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en: H, alquilo, alqueno, alquino, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxi, -N=R⁷, -NH(R⁷), -N(R⁷)₂, -COOH, -COR⁷, -COOR⁷, -CONHR⁷, -CSNHR⁷, -S(O)R⁷, -S(O)₂R⁷, -C(O)N(R⁷)₂, -SO₂N(R⁷)₂, -(CH₂)_mR⁸ y acilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido; o

10

R¹ y R² cuando se toman juntos con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un grupo heterocicloalquilo o heteroarilo opcionalmente sustituido;

15

R³ y R⁴ se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en: H, alquilo, alqueno, alquino, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido;

20

o R³ y R⁴ cuando se toman junto con los átomos de carbono a los que están unidos forman un grupo cicloalquilo opcionalmente sustituido;

25

R⁵ y R⁶ se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en: H, alquilo, alqueno, alquino, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxi, -N=R⁷, -NH(R⁷), -N(R⁷)₂, -COOH, -COR⁷, -COOR⁷, -CONHR⁷, -CSNHR⁷, -S(O)R⁷, -S(O)₂R⁷, -C(O)N(R⁷)₂, -SO₂N(R⁷)₂, -(CH₂)_mR⁸ y acilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido; o

30

R⁵ y R⁶ cuando se toman juntos con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un grupo heterocicloalquilo o heteroarilo opcionalmente sustituido;

35

cada R⁷ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo, alqueno, alquino, haloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilalquilo, arilalquilo, heteroarilalquilo y acilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido;

40

cada R⁸ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido;

m es un número entero seleccionado entre el grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

45

2. Un método de acuerdo con la cláusula 1 en el que la afección se selecciona entre el grupo que consiste en trastornos relacionados con tau, trastornos provocados por o asociados al estrés oxidativo y trastornos relacionados con Abeta.

50

3. Un método de acuerdo con la cláusula 1 o 2 en el que la afección es provocada por o se asocia al estrés oxidativo en el sujeto.

4. Un método de acuerdo con la cláusula 1 o 2 en el que la afección es un trastorno relacionado con tau.

5. Un método de acuerdo con la cláusula 1 o 2 en el que el trastorno es un trastorno relacionado con Abeta.

55

6. Un método de acuerdo con la cláusula 1 o 2 en el que la afección se selecciona entre el grupo que consiste en

enfermedad cardiovascular, trastornos del sistema nervioso central, cánceres y trastornos neurológicos.

- 5 7. Un método de acuerdo con la cláusula de 1,2 o 6 en el que la afección se selecciona entre el grupo que consiste en porfiria intermitente aguda; cardiomiopatía inducida por adriamicina; demencia del SIDA y neurotoxicidad inducida por VIH-1; enfermedad de Alzheimer; esclerosis lateral amiotrófica; aterosclerosis; cataratas; isquemia cerebral; parálisis cerebral; tumor cerebral; daño de órganos inducido por quimioterapia; nefrotoxicidad inducida por cisplatino; cirugía de derivación de la arteria coronaria; enfermedad de Creutzfeldt-Jacob y su nueva variante asociada a la enfermedad de las "vacas locas"; neuropatía diabética; síndrome de Down; ahogo; epilepsia y epilepsia post-traumática; ataxia de Friedrich; demencia frontotemporal; glaucoma; glomerulopatía; hemocromatosis; hemodiálisis; hemólisis; síndrome urémico hemolítico (enfermedad de Weil); enfermedad de Menke; ictus hemorrágico; enfermedad de Hallerboden-Spatz; ataque cardíaco y lesión por reperfusión; enfermedad de Huntington; enfermedad de los cuerpos de Lewy; claudicación intermitente; ictus isquémico; enfermedad inflamatoria intestinal; degeneración macular; malaria; toxicidad inducida por etanol; meningitis (aséptica y tuberculosa); enfermedad de las neuronas motoras; esclerosis múltiple; atrofia sistémica múltiple; isquemia miocárdica; neoplasia; enfermedad de Parkinson; asfixia perinatal; enfermedad de Pick; parálisis progresiva supranuclear; daño de órganos inducido por radioterapia; reestenosis tras angioplastia; retinopatía; demencia senil; esquizofrenia; septicemia; choque séptico; encefalopatías espongiiformes; hemorragia subaracnoidea/vasoespasmio cerebral; hematoma subdural; traumatismo quirúrgico, incluyendo neurocirugía; talasemia; ataque isquémico transitorio (AIT); trasplante; demencia vascular; meningitis vírica; y 20 encefalitis vírica.
8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 7 en el que la afección es un trastorno neurológico.
- 25 9. Un método de acuerdo con la cláusula 8 en el que el trastorno neurológico se selecciona entre el grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, neuropatías, enfermedad de Huntington, enfermedad priónica, enfermedad de las neuronas motoras, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y enfermedad de Menke.
- 30 10. Un método de acuerdo con la cláusula 9 en el que el trastorno es la enfermedad de Alzheimer.
11. Un método de acuerdo con la cláusula 9 en el que el trastorno es la enfermedad de Parkinson.
- 35 12. Un método de acuerdo con la cláusula 9 en el que el trastorno es la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).
13. Un método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 12 en el que el metal es cobre.
14. Un método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 13 en el que el complejo es simétrico.
- 40 15. Un método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 13 en el que el complejo es asimétrico.
16. Un método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 15 en el que R^3 se selecciona entre el grupo que consiste en H, metilo, etilo y fenilo.
- 45 17. Un método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 16 en el que R^4 se selecciona entre el grupo que consiste en H, metilo, etilo y fenilo.
- 50 18. Un método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 17 en el que R^3 y R^4 cuando se toman junto con los átomos de carbono a los que están unidos forman un grupo ciclohexilo.
19. Un método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 18 en el que R^1 se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo y arilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido.
- 55 20. Un método de acuerdo con la cláusula 19 en el que R^1 es H.
21. Un método de acuerdo con las cláusulas 1 a 20 en el que R^2 se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo, arilo y $-(CH_2)_mR^8$, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido.
- 60 22. Un método de acuerdo con la cláusula 21 en el que m es 1 o 2.
23. Un método de acuerdo con la cláusula 21 o 22 en el que R^8 es arilo o heterocicloalquilo.
24. Un método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 21 a 23 en el que R^8 es fenilo o morfolin-4-ilo.
- 65 25. Un método de acuerdo con la cláusula 21 en el que R^2 se selecciona entre el grupo que consiste en H, metilo, etilo, fenil-metilo, 2-morfolin-4-il-etilo, fenilo, 4-cloro-fenilo y 4-metoxi-fenilo.

26. Un método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 25 en el que R⁵ se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo y arilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido.

27. Un método de acuerdo con la cláusula 26 en el que R⁵ es H.

28. Un método de acuerdo con las cláusulas 1 a 27 en el que R⁶ se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo, arilo y -(CH₂)_mR⁸, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido.

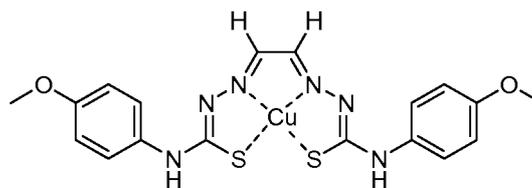
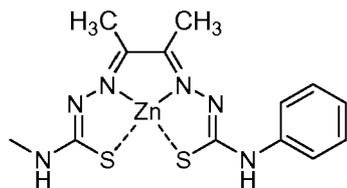
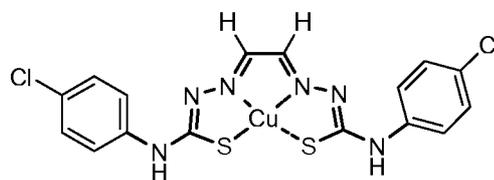
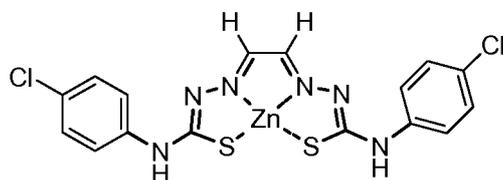
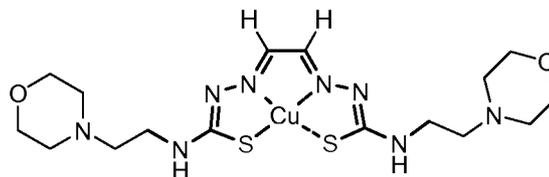
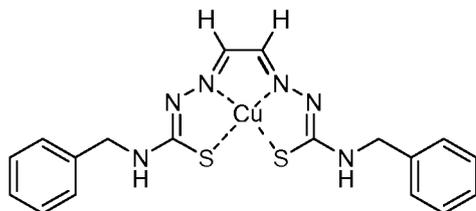
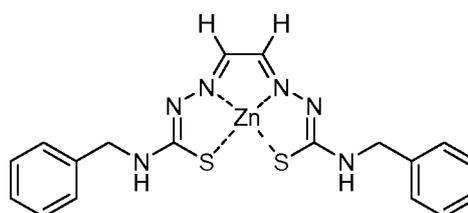
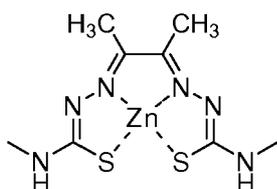
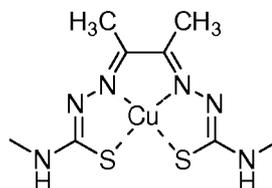
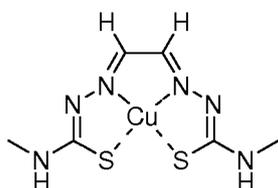
29. Un método de acuerdo con la cláusula 28 en el que m es 1 o 2.

30. Un método de acuerdo con la cláusula 28 o 29 en el que R⁸ es arilo o heterocicloalquilo.

31. Un método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 28 a 30 en el que R⁸ es fenilo o morfolin-4-ilo.

32. Un método de acuerdo con la cláusula 28 en el que R⁶ se selecciona entre el grupo que consiste en H, metilo, etilo, fenil-metilo, 2-morfolin-4-il-etilo, fenilo, 4-cloro-fenilo y 4-metoxi-fenilo.

33. Un método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 12 en el que el complejo se selecciona entre el grupo que consiste en



5

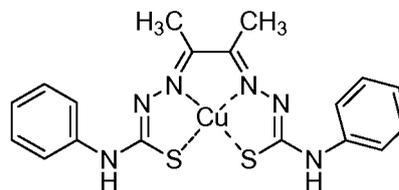
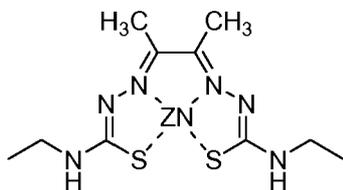
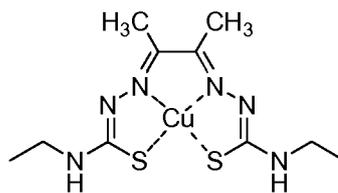
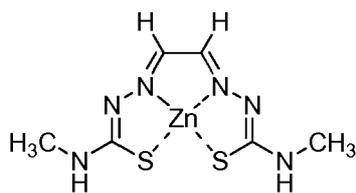
10

15

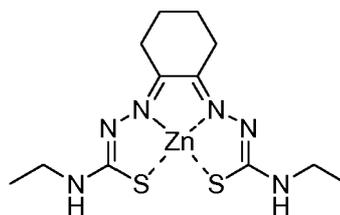
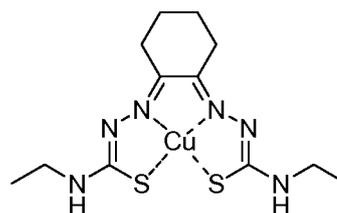
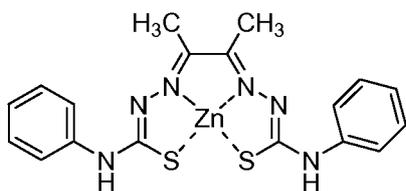
20

25

30

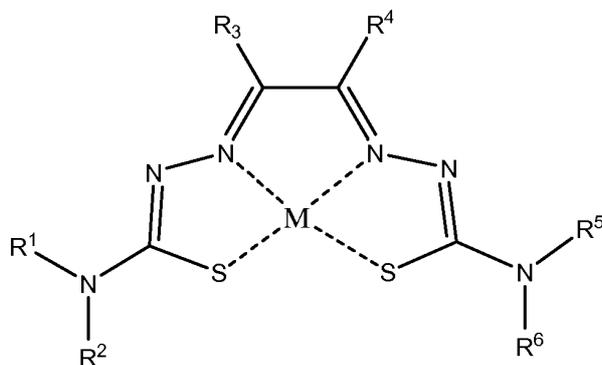


5



10

34. El uso de un complejo metálico de Fórmula (I).



Fórmula (I)

en la que M es un metal divalente;

15

R¹ y R² se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en: H, alquilo, alquenoilo, alquinoilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxi, -N=R⁷, -NH(R⁷), -N(R⁷)₂, -COOH, -COR⁷, -COOR⁷, -CONHR⁷, -CSNHR⁷, -S(O)R⁷, -S(O)₂R⁷, -C(O)N(R⁷)₂, -SO₂N(R⁷)₂, -(CH₂)_mR⁸ y acilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido; o

20

R¹ y R² cuando se toman juntos con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un grupo heterocicloalquilo o heteroarilo opcionalmente sustituido;

25

R³ y R⁴ se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en: H, alquilo, alquenoilo, alquinoilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido;

o R^3 y R^4 cuando se toman junto con los átomos de carbono a los que están unidos forman un grupo cicloalquilo opcionalmente sustituido;

5 R^5 y R^6 se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en: H, alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxi, $-N=R^7$, $-NH(R^7)$, $-N(R^7)_2$, $-COOH$, $-COR^7$, $-COOR^7$, $-CONHR^7$, $-CSNHR^7$, $-S(O)R^7$, $-S(O)_2R^7$, $-C(O)N(R^7)_2$, $-SO_2N(R^7)_2$, $-(CH_2)_mR^8$ y acilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido; o

10 R^5 y R^6 cuando se toman juntos con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un grupo heterocicloalquilo o heteroarilo opcionalmente sustituido;

15 cada R^7 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo, alquenilo, alquinilo, haloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilalquilo, arilalquilo, heteroarilalquilo y acilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido;

20 cada R^8 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido;

m es un número entero seleccionado entre el grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5 y 6;

en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una afección en un sujeto en el que el suministro de metal puede prevenir, aliviar o mejorar la afección.

25 35. Un uso de acuerdo con la cláusula 34 en el que la afección se selecciona entre el grupo que consiste en trastornos relacionados con tau, trastornos provocados por o asociados al estrés oxidativo y trastornos relacionados con Abeta.

30 36. Un uso de acuerdo con la cláusula 34 o 35 en el que la afección es causada por o se asocia al estrés en el sujeto.

37. Un uso de acuerdo con la cláusula 34 o 35 en el que la afección es un trastorno relacionado con tau.

35 38. Un uso de acuerdo con la cláusula 34 o 35 en el que el trastorno es un trastorno relacionado con Abeta.

39. Un uso de acuerdo con la cláusula 34 o 35 en el que la afección se selecciona entre el grupo que consiste en enfermedad cardiovascular, trastornos del sistema nervioso central, cánceres y trastornos neurológicos.

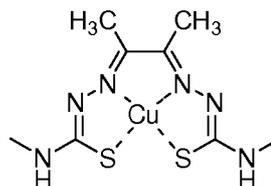
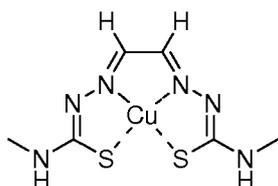
40 40. Un uso de acuerdo con la cláusula 34 o 35 en el que la afección se selecciona entre el grupo que consiste en porfiria intermitente aguda; cardiomiopatía inducida por adriamicina; demencia del SIDA y neurotoxicidad inducida por VIH-1; enfermedad de Alzheimer; esclerosis lateral amiotrófica; aterosclerosis; cataratas; isquemia cerebral; parálisis cerebral; tumor cerebral; daño de órganos inducido por quimioterapia; nefrotoxicidad inducida por cisplatino; cirugía de derivación de la arteria coronaria; enfermedad de Creutzfeldt-Jacob y su nueva variante asociada a la enfermedad de las "vacas locas"; neuropatía diabética; síndrome de Down; ahogo; epilepsia y epilepsia post-traumática; ataxia de Friedrich; demencia frontotemporal; glaucoma; glomerulopatía; hemocromatosis; hemodiálisis; hemólisis; síndrome urémico hemolítico (enfermedad de Weil); enfermedad de Menke; ictus hemorrágico; enfermedad de Hallerboden-Spatz; ataque cardíaco y lesión por reperfusión; enfermedad de Huntington; enfermedad de los cuerpos de Lewy; claudicación intermitente; ictus isquémico; enfermedad inflamatoria intestinal; degeneración macular; malaria; toxicidad inducida por etanol; meningitis (aséptica y tuberculosa); enfermedad de las neuronas motoras; esclerosis múltiple; atrofia sistémica múltiple; isquemia miocárdica; neoplasia; enfermedad de Parkinson; asfixia perinatal; enfermedad de Pick; parálisis progresiva supranuclear; daño de órganos inducido por radioterapia; reestenosis tras angioplastia; retinopatía; demencia senil; esquizofrenia; septicemia; choque séptico; encefalopatías espongiiformes; hemorragia subaracnoidea/vasoespasma cerebral; hematoma subdural; traumatismo quirúrgico, incluyendo neurocirugía; talasemia; ataque isquémico transitorio (AIT); trasplante; demencia vascular; meningitis vírica; y encefalitis vírica.

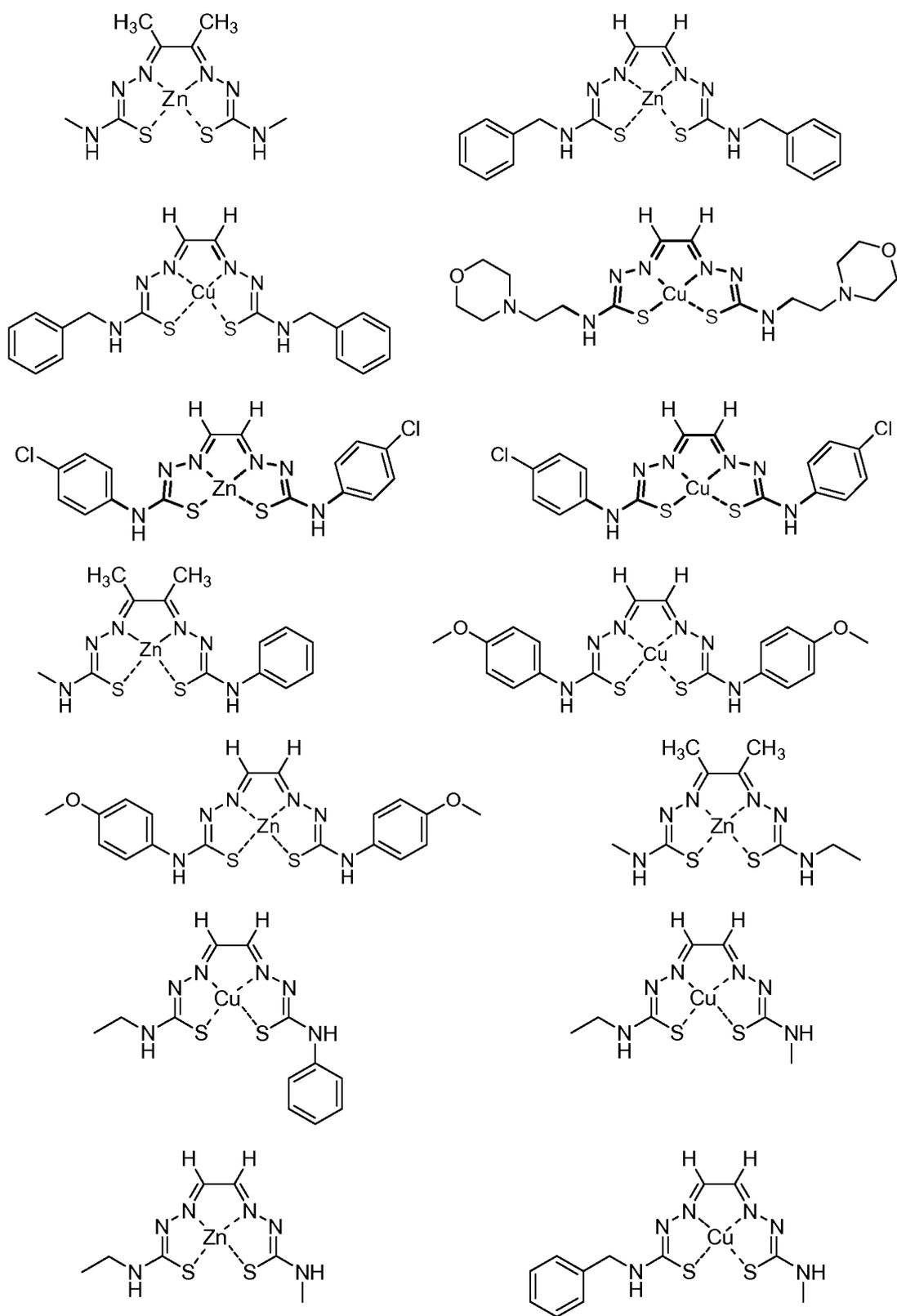
41 Un uso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 34 a 40 en el que la afección es un trastorno neurológico.

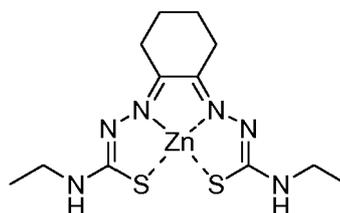
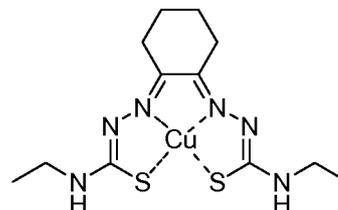
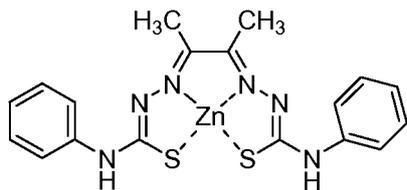
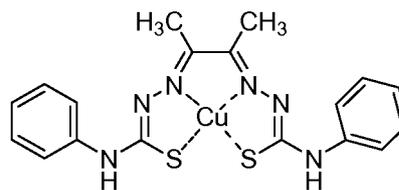
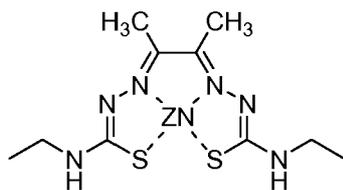
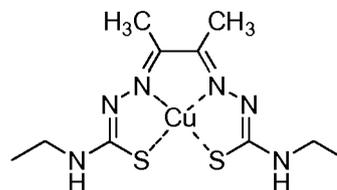
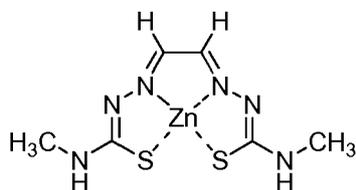
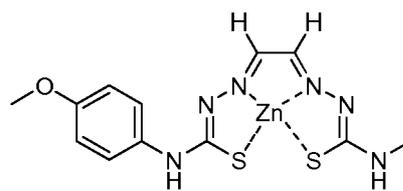
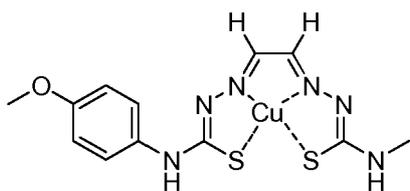
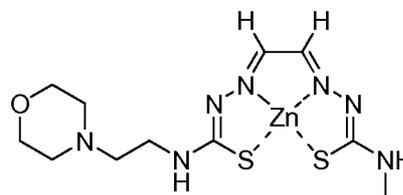
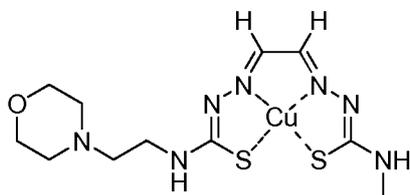
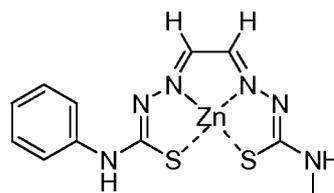
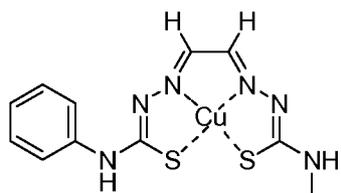
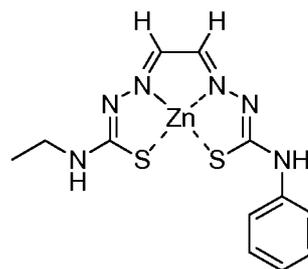
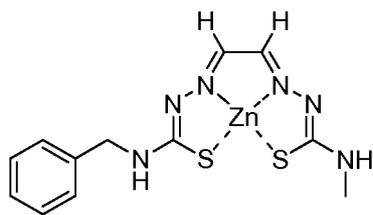
60 42. Un uso de acuerdo con la cláusula 41 en el que el trastorno neurológico se selecciona entre el grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, neuropatías, enfermedad de Huntington, enfermedad priónica, enfermedad de las neuronas motoras, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y enfermedad de Menk.

65 43. Un uso de acuerdo con la cláusula 42 en el que el trastorno es la enfermedad de Alzheimer.

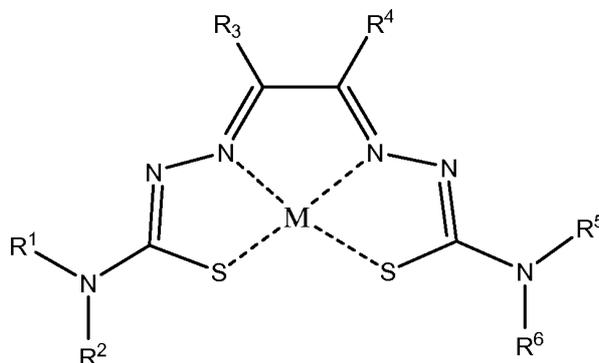
44. Un uso de acuerdo con la cláusula 42 en el que el trastorno es la enfermedad de Parkinson.
45. Un uso de acuerdo con la cláusula 42 en el que el trastorno es la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).
- 5 46. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 34 a 45 en el que el metal es cobre.
47. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 34 a 46 en el que el complejo es simétrico.
- 10 48. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas de 34 a 46 en el que el complejo es asimétrico.
49. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas de las cláusulas 34 a 48 en el que R^3 se selecciona entre el grupo que consiste en H, metilo, etilo y fenilo.
- 15 50. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 34 a 49 en el que R^4 se selecciona entre el grupo que consiste en H, metilo, etilo y fenilo.
51. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 34 a 51 en el que R^3 y R^4 cuando se toman junto con los átomos de carbono a los que están unidos forman un grupo ciclohexilo.
- 20 52. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 34 a 51 en el que R^1 se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo y arilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido.
53. Un uso de acuerdo con la cláusula 51 en el que R^1 es H.
- 25 54. Un uso de acuerdo con las cláusulas 34 a 53 en el que R^2 se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo, arilo y $-(CH_2)_mR^8$, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido.
55. Un uso de acuerdo con la cláusula 54 en el que m es 1 o 2.
- 30 56. Un uso de acuerdo con la cláusula 54 o 55 en el que R^8 es arilo o heterocicloalquilo.
57. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 54 a 56 en el que R^8 es fenilo o morfolin-4-ilo.
- 35 58. Un uso de acuerdo con la cláusula 54 en el que R^2 se selecciona entre el grupo que consiste en H, metilo, etilo, fenil-metilo, 2-morfolin-4-il-etilo, fenilo, 4-cloro-fenilo y 4-metoxi-fenilo.
59. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 34 a 58 en el que R^5 se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo y arilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido.
- 40 60. Un uso de acuerdo con la cláusula 59 en el que R^5 es H.
61. Un uso de acuerdo con las cláusulas 34 a 60 en el que R^6 se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo, arilo y $-(CH_2)_mR^8$, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido.
- 45 62. Un uso de acuerdo con la cláusula 61 en el que m es 1 o 2.
63. Un uso de acuerdo con la cláusula 61 o 62 en el que R^8 es arilo o heterocicloalquilo.
- 50 64. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 61 a 63 en el que R^8 es fenilo o morfolin-4-ilo.
65. Un uso de acuerdo con la cláusula 61 en el que R^6 se selecciona entre el grupo que consiste en H, metilo, etilo, fenil-metilo, 2-morfolin-4-il-etilo, fenilo, 4-cloro-fenilo y 4-metoxi-fenilo.
- 55 66. Un uso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 34 a 45 en el que el complejo se selecciona entre el grupo que consiste en







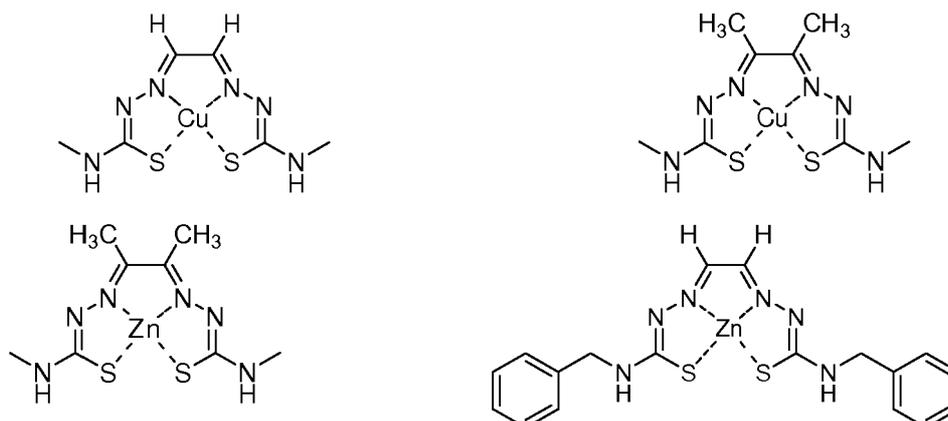
67. Un método de fosforilación de una cinasa en una célula, incluyendo el método exponer la célula a un complejo metálico de Fórmula (I).

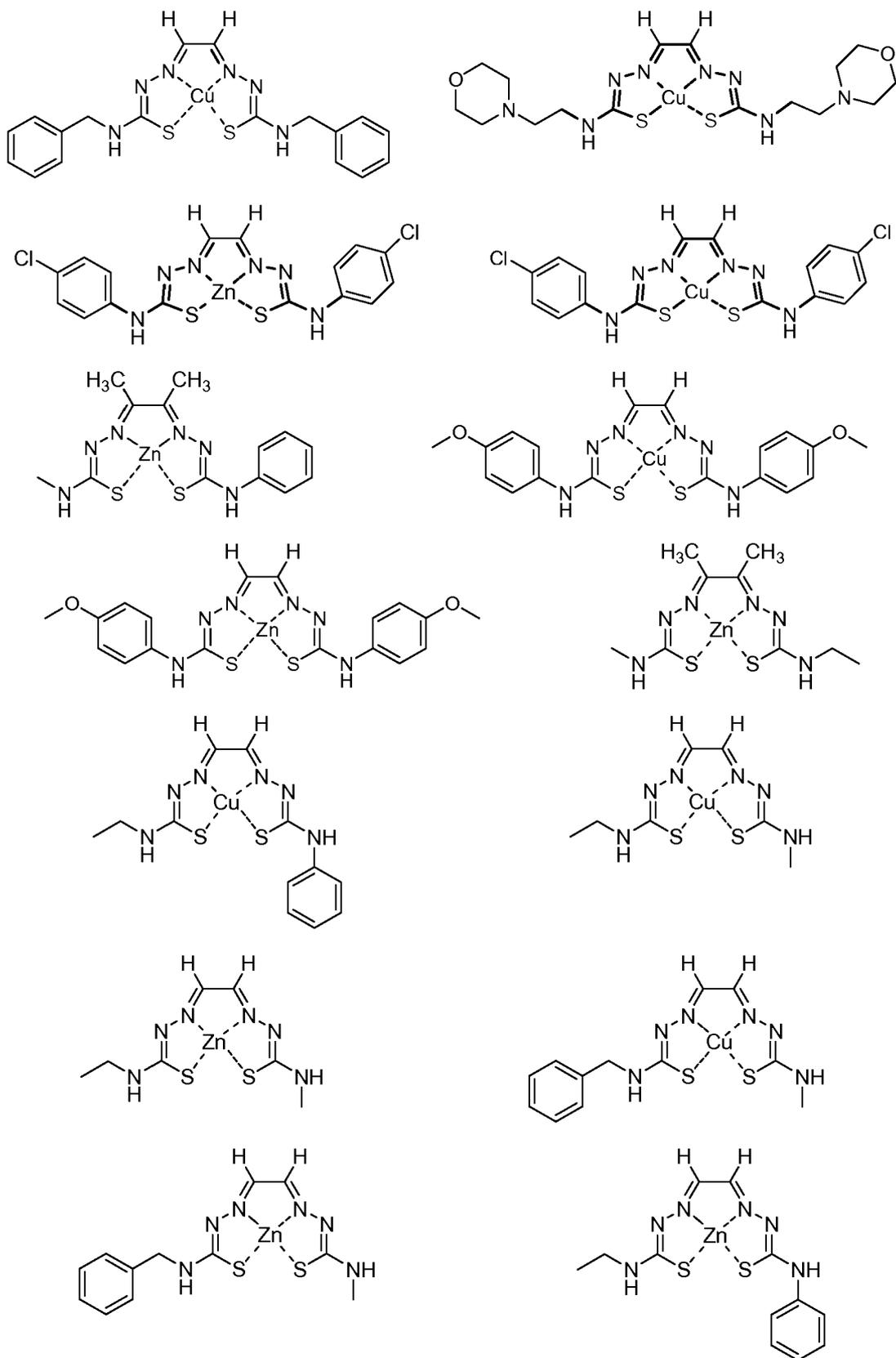


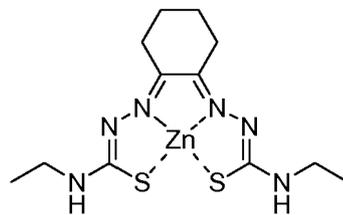
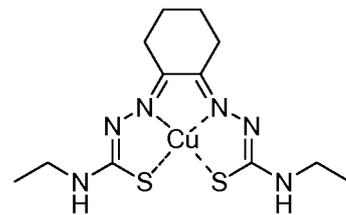
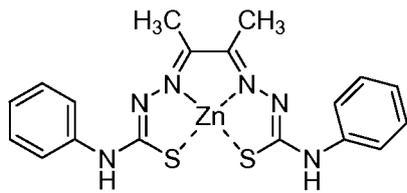
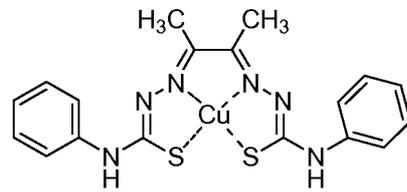
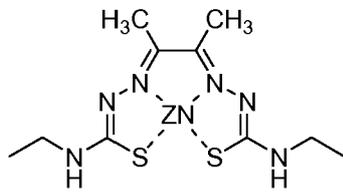
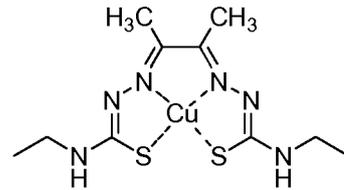
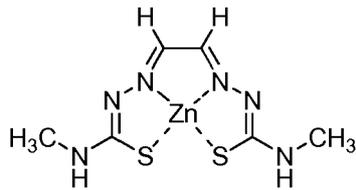
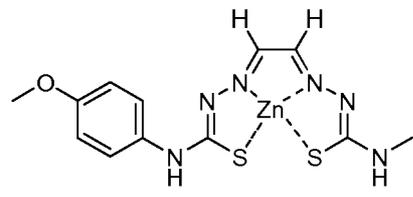
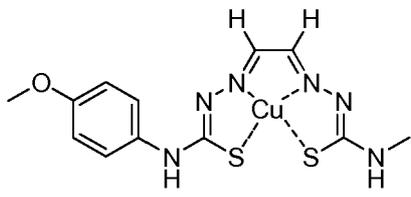
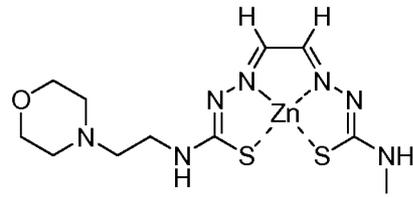
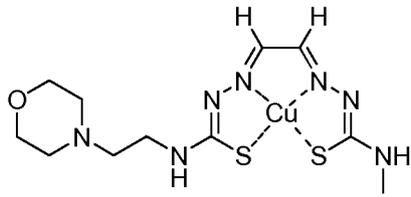
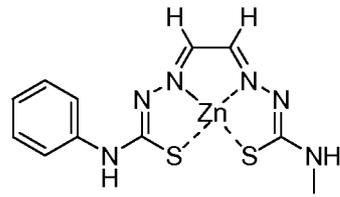
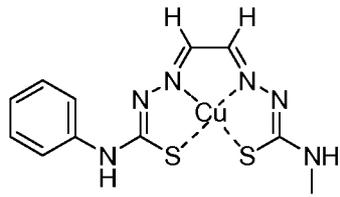
Fórmula (I)

- 5 en la que M es un metal divalente;
- 10 R¹ y R² se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en: H, alquilo, alqueniilo, alquinilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxi, -N=R⁷, -NH(R⁷), -N(R⁷)₂, -COOH, -COR⁷, -COOR⁷, -CONHR⁷, -CSNHR⁷, -S(O)R⁷, -S(O)₂R⁷, -C(O)N(R⁷)₂, -SO₂N(R⁷)₂, -(CH₂)_mR⁸ y acilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido; o
- 15 R¹ y R² cuando se toman juntos con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un grupo heterocicloalquilo o heteroarilo opcionalmente sustituido;
- 20 R³ y R⁴ se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en: H, alquilo, alqueniilo, alquinilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido;
- o R³ y R⁴ cuando se toman junto con los átomos de carbono a los que están unidos forman un grupo cicloalquilo opcionalmente sustituido;
- 25 R⁵ y R⁶ se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en: H, alquilo, alqueniilo, alquinilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxi, -N=R⁷, -NH(R⁷), -N(R⁷)₂, -COOH, -COR⁷, -COOR⁷, -CONHR⁷, -CSNHR⁷, -S(O)R⁷, -S(O)₂R⁷, -C(O)N(R⁷)₂, -SO₂N(R⁷)₂, -(CH₂)_mR⁸ y acilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido; o
- 30 R⁵ y R⁶ cuando se toman juntos con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un grupo heterocicloalquilo o heteroarilo opcionalmente sustituido;
- 35 cada R⁷ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo, alqueniilo, alquinilo, haloalquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilalquilo, arilalquilo, heteroarilalquilo y acilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido;
- 40 cada R⁸ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido;
- m es un número entero seleccionado entre el grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5 y 6.
68. Un método de acuerdo con la cláusula 67 en el que la cinasa es una tirosina cinasa receptora.
69. Un método de acuerdo con la cláusula 1 en el que la tirosina cinasa receptora es el receptor del factor de crecimiento epidérmico.
70. Un método de acuerdo con la cláusula 67 en el que la cinasa se selecciona entre el grupo que consiste de ERK, PI3K, Akt, GSK3 y JNK.
71. Un método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 67 a 70 en el que el metal es cobre.

72. Un método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 67 a 71 en el que el complejo es simétrico.
73. Un método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 67 a 71 en el que el complejo es asimétrico.
- 5 74. Un método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 67 a 73 en el que R^3 se selecciona entre el grupo que consiste en H, metilo, etilo y fenilo.
75. Un método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 67 a 74 en el que R^4 se selecciona entre el grupo que consiste en H, metilo, etilo y fenilo.
- 10 76. Un método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 67 a 75 en el que R^3 y R^4 cuando se toman junto con los átomos de carbono a los que están unidos forman un grupo ciclohexilo.
- 15 77. Un método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 67 a 76 en el que R^1 se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo y arilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido.
78. Un método de acuerdo con la cláusula 77 en el que R^1 es H.
- 20 79. Un método de acuerdo con las cláusulas 67 a 78 en el que R^2 se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo, arilo y $-(CH_2)_mR^8$, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido.
80. Un método de acuerdo con la cláusula 79 en el que m es 1 o 2.
- 25 81. Un método de acuerdo con la cláusula 79 o 80 en el que R^8 es arilo o heterocicloalquilo.
82. Un método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 21 a 23 en el que R^8 es fenilo o morfolin-4-ilo.
83. Un método de acuerdo con la cláusula 79 en el que R^2 se selecciona entre el grupo que consiste en H, metilo, etilo, fenil-metilo, 2-morfolin-4-il-etilo, fenilo, 4-cloro-fenilo y 4-metoxi-fenilo.
- 30 84. Un método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 67 a 83 en el que R^5 se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo y arilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido.
- 35 85. Un método de acuerdo con la cláusula 84 en el que R^5 es H.
86. Un método de acuerdo con las cláusulas 67 a 85 en el que R^6 se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo, arilo y $-(CH_2)_mR^8$, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido.
- 40 87. Un método de acuerdo con la cláusula 86 en el que m es 1 o 2.
88. Un método de acuerdo con la cláusula 86 o 87 en el que R^8 es arilo o heterocicloalquilo.
89. Un método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 86 a 88 en el que R^8 es fenilo o morfolin-4-ilo.
- 45 90. Un método de acuerdo con la cláusula 86 en el que R^6 se selecciona entre el grupo que consiste en H, metilo, etilo, fenil-metilo, 2-morfolin-4-il-etilo, fenilo, 4-cloro-fenilo y 4-metoxi-fenilo.
- 50 91. Un método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 67 a 90 en el que el complejo se selecciona entre el grupo que consiste en



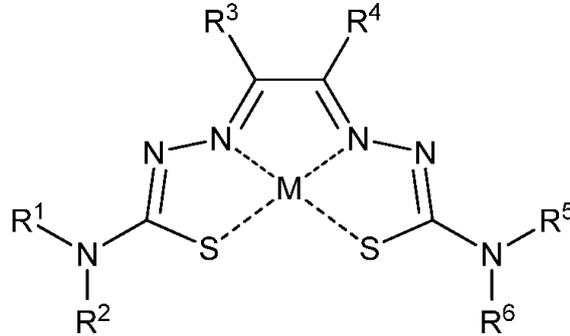




REIVINDICACIONES

1. Un complejo metálico de Fórmula (I) para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson o la esclerosis amiotrófica,

5



Fórmula (I)

en la que:

- 10 el complejo es simétrico;
 M es Cu;
 R¹ y R⁵ son cada uno hidrógeno;
 R² y R⁶ son cada uno metilo, etilo o fenilo; y
 R³ y R⁴ son cada uno metilo.
- 15
2. El complejo de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.
3. El complejo de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica.
- 20 4. El complejo para su uso en el tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R² y R⁶ son cada uno metilo.
5. El complejo para su uso en el tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R² y R⁶ son cada uno etilo.
- 25 6. El complejo para su uso en el tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R² y R⁶ son cada uno fenilo.

Figura 1

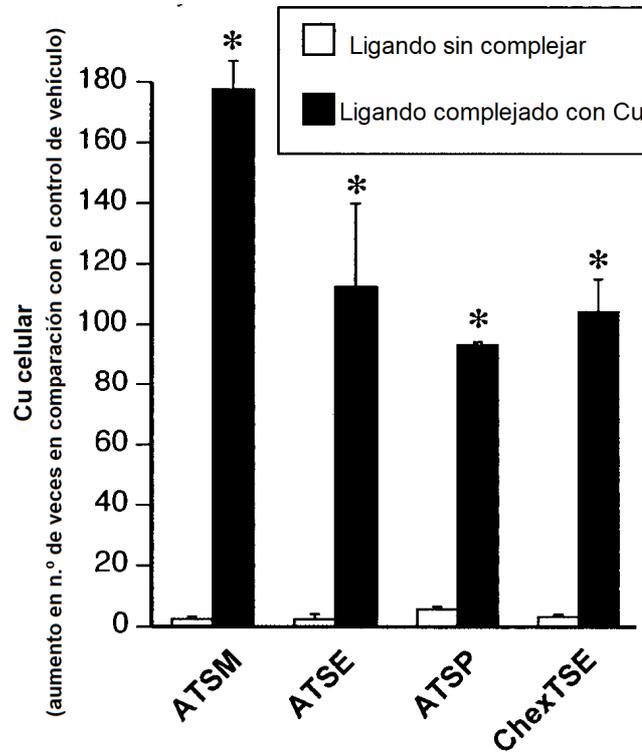


Figura 2

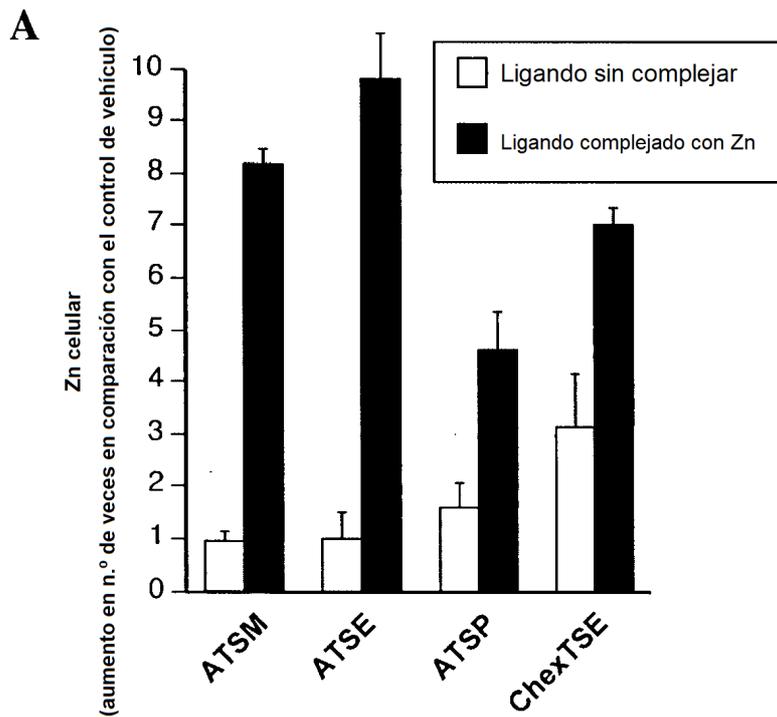


Figura 3

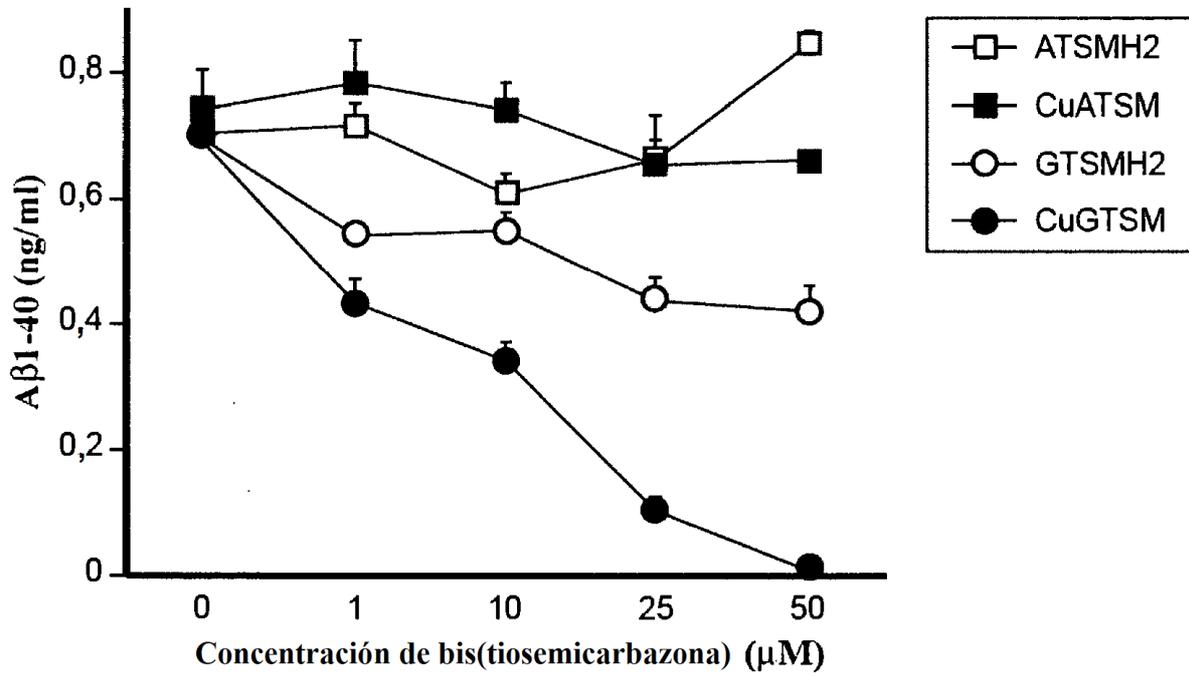


Figura 4

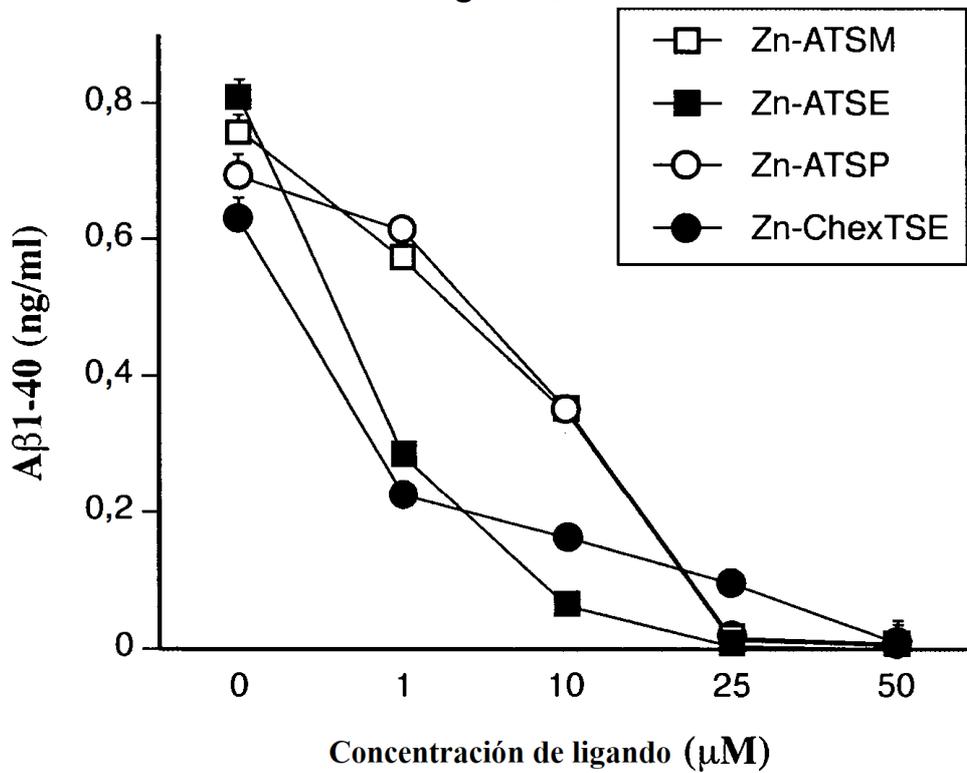


Figura 5

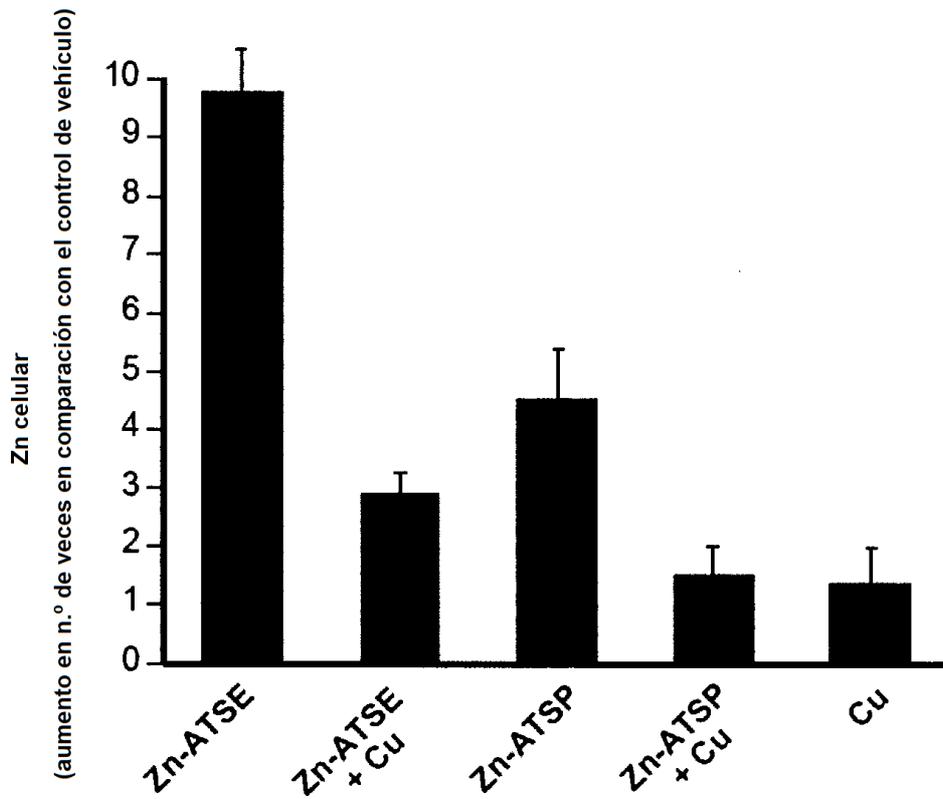


Figura 6

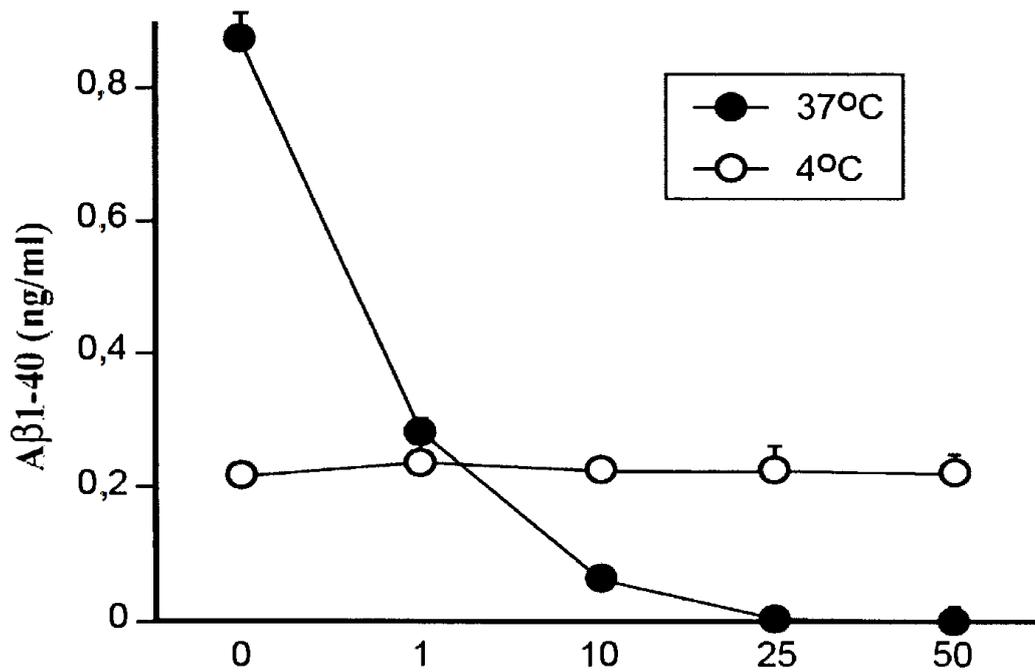


Figura 7

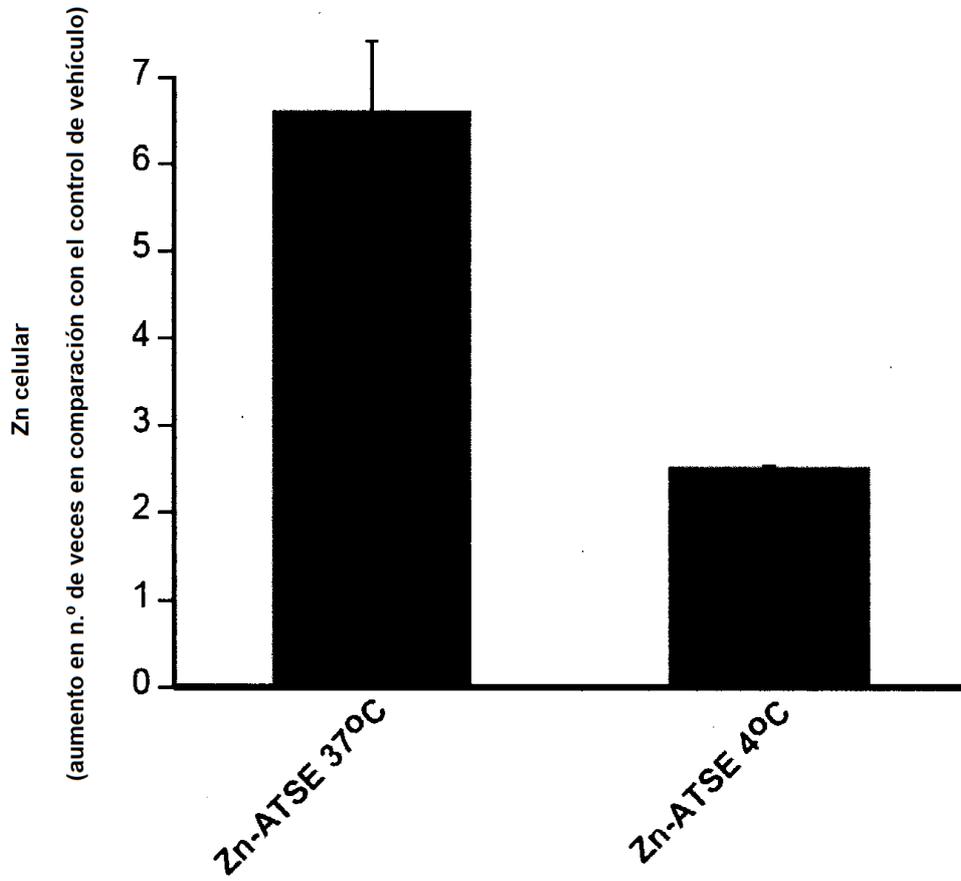


Figura 8A

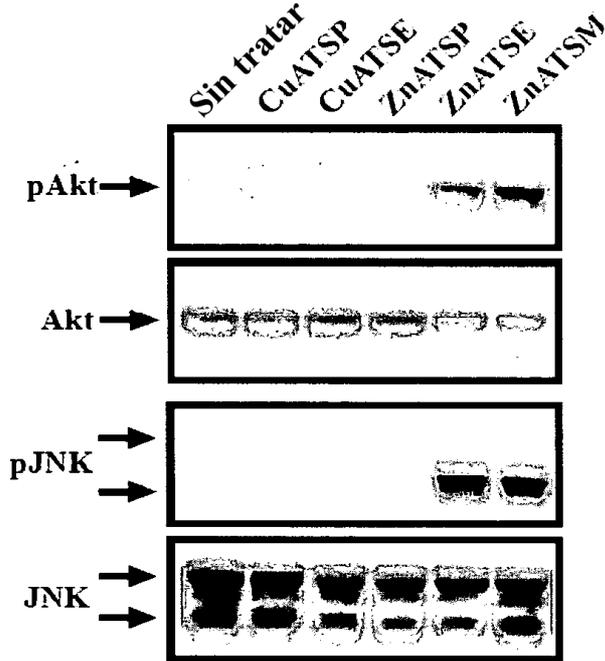


Figura 8B

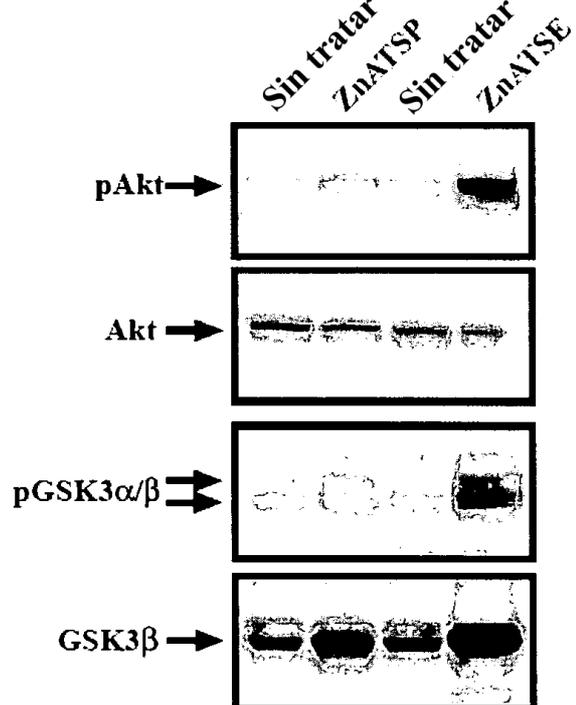


Figura 8C

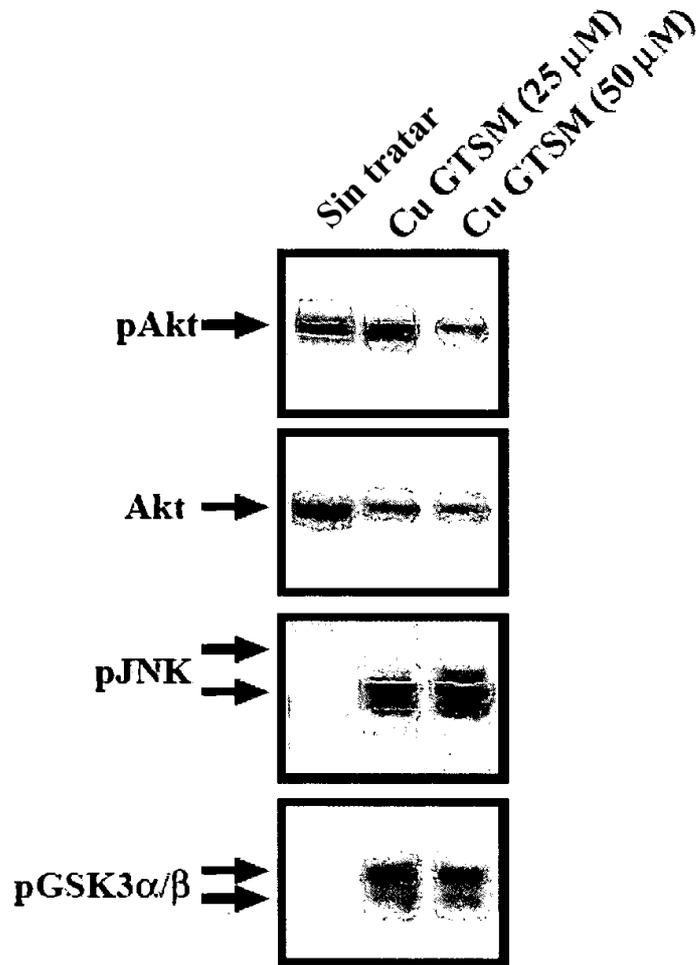


Figura 8D

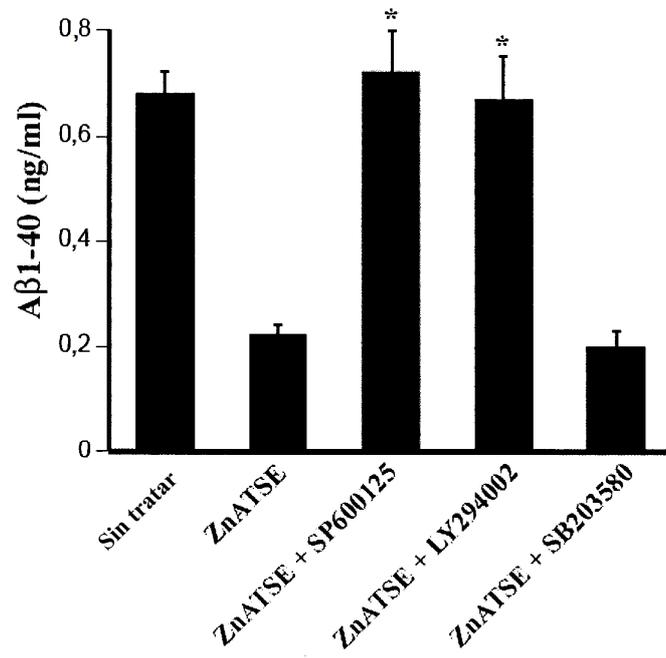


Figura 9

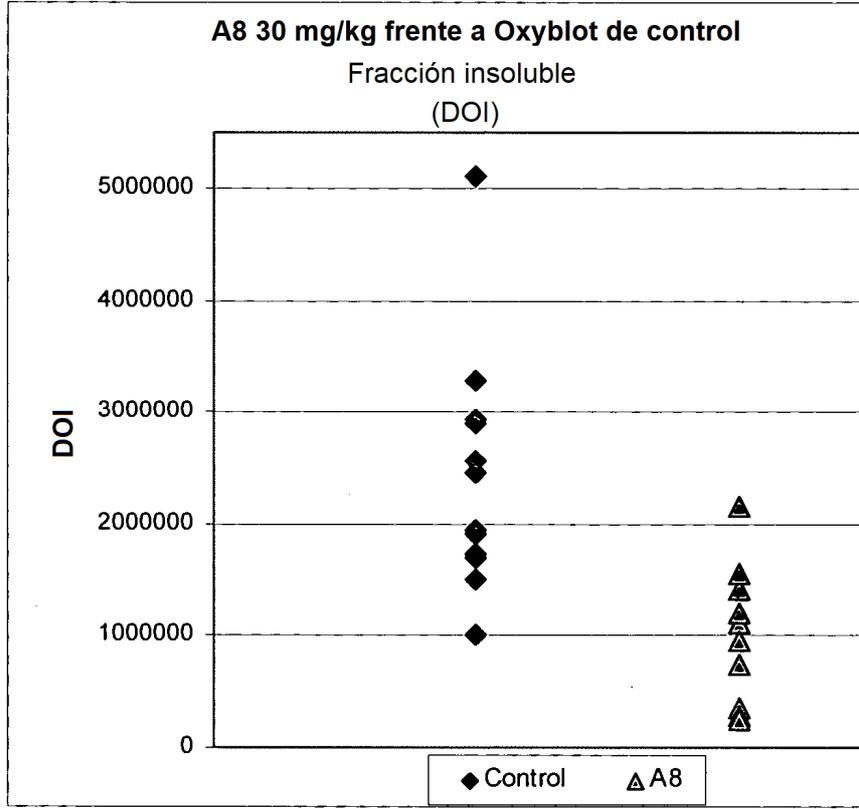


Figura 10

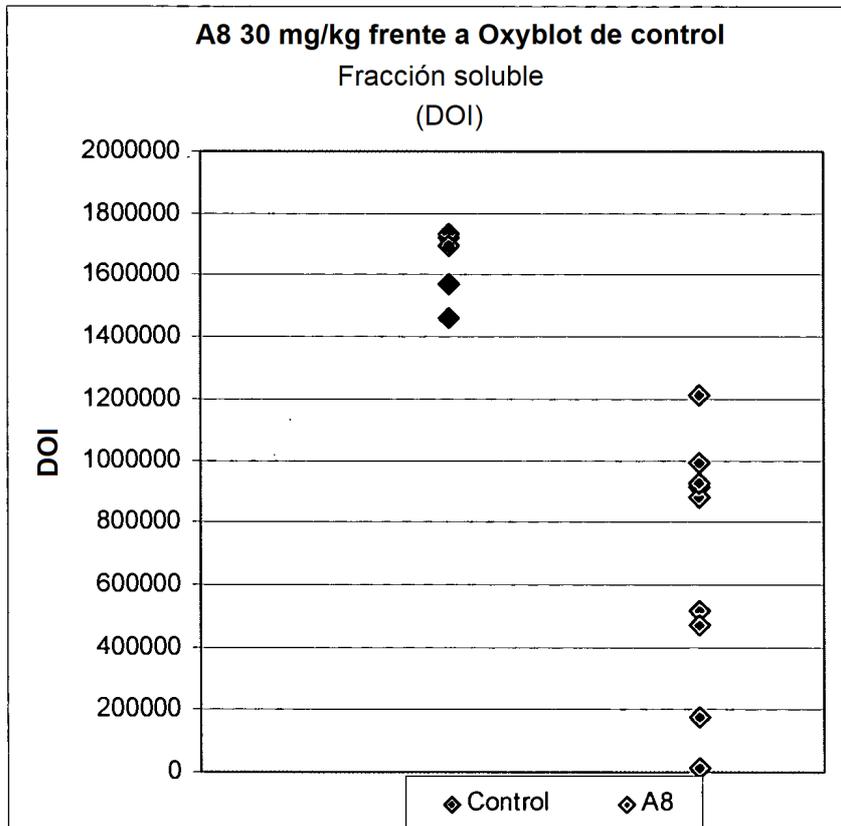


Figura 11

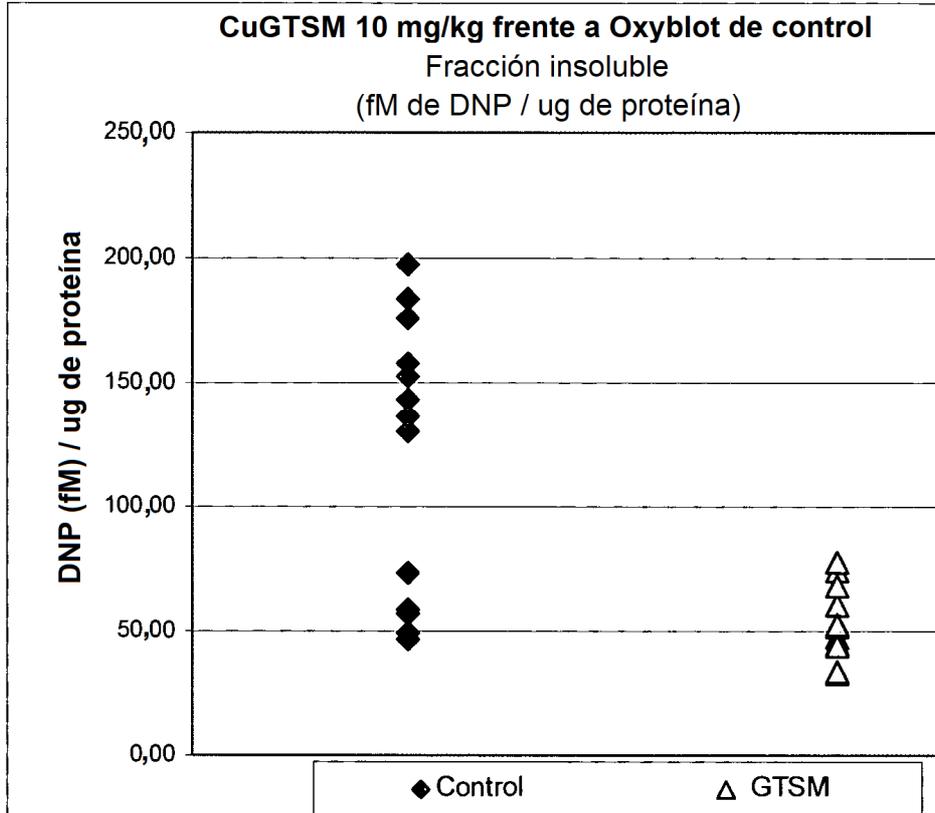


Figura 12

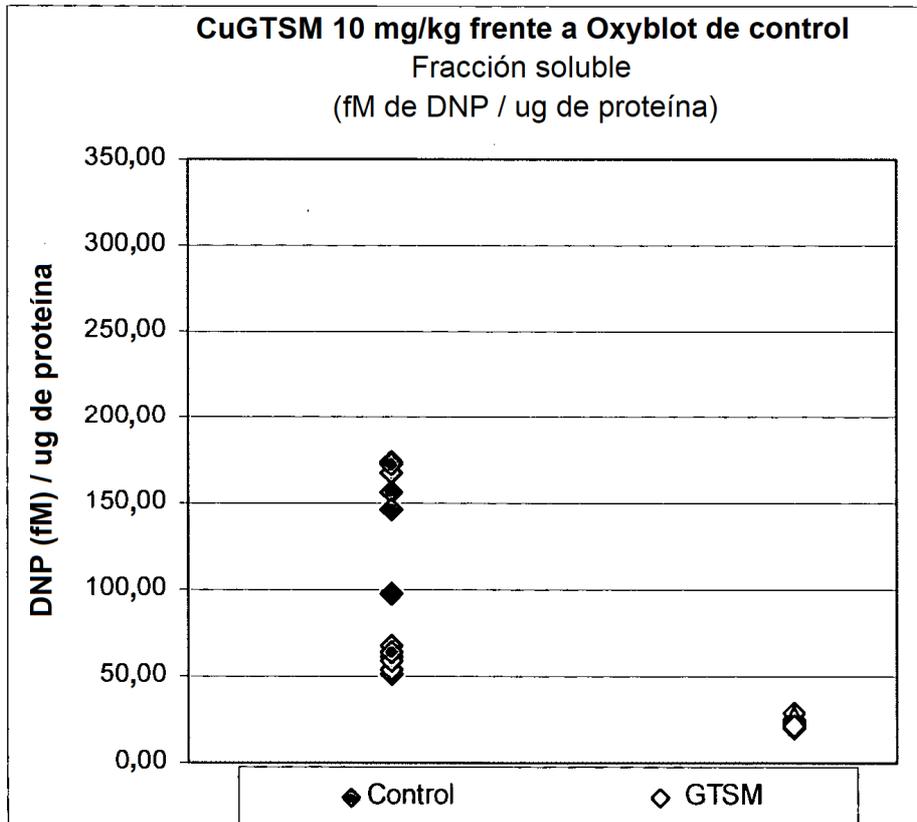


Figura 13

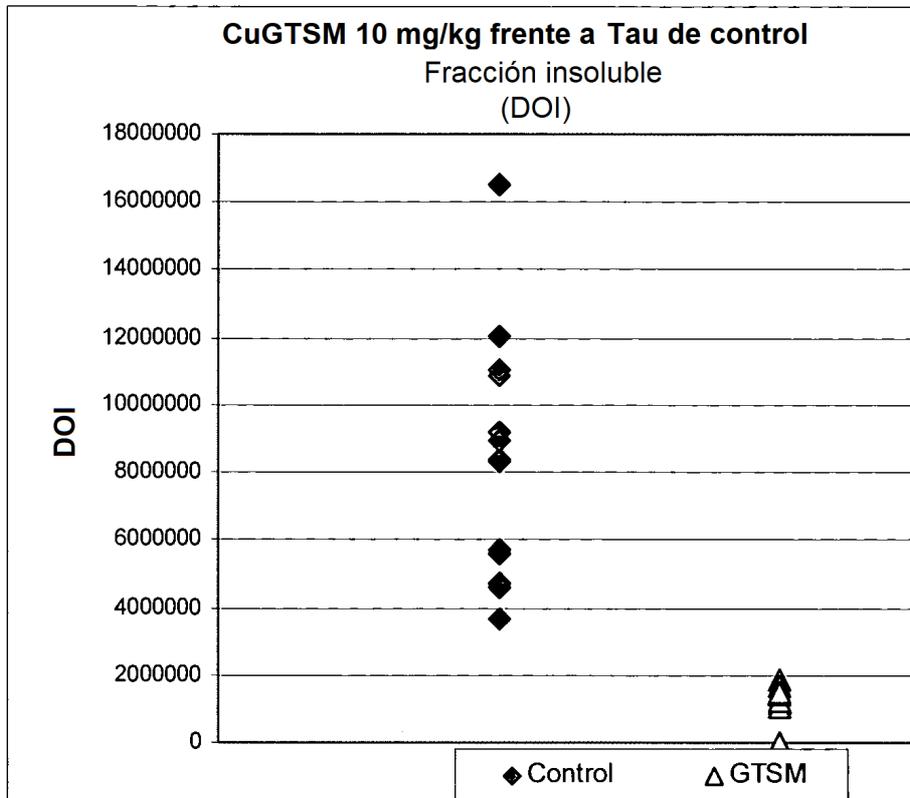


Figura 14

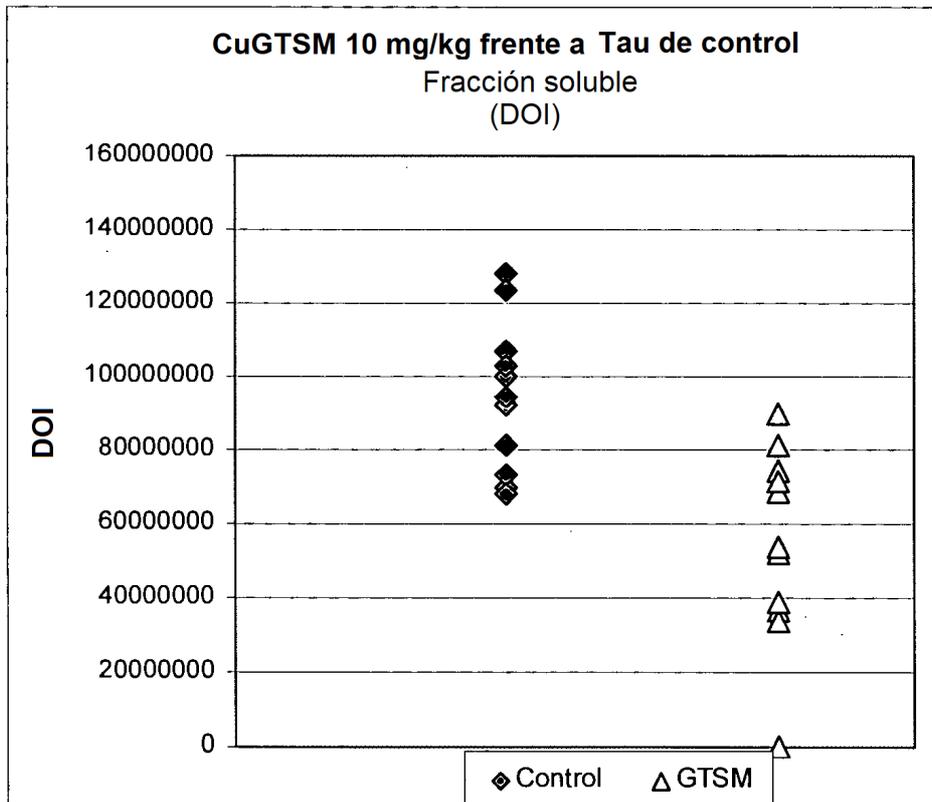


Figura 15

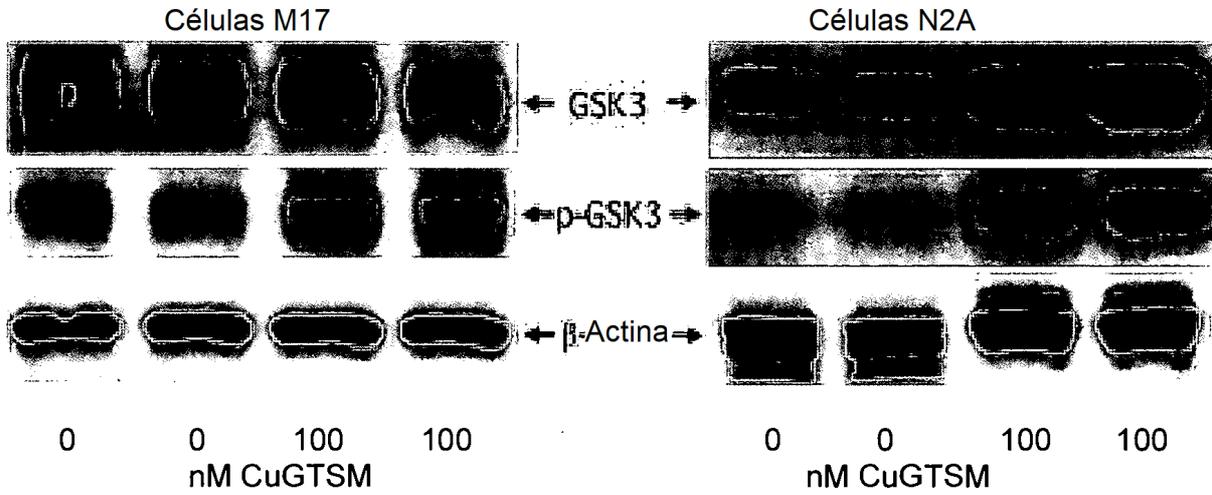


Figura 16

Efecto de BTSC sobre la muerte de células WT inducida por DA

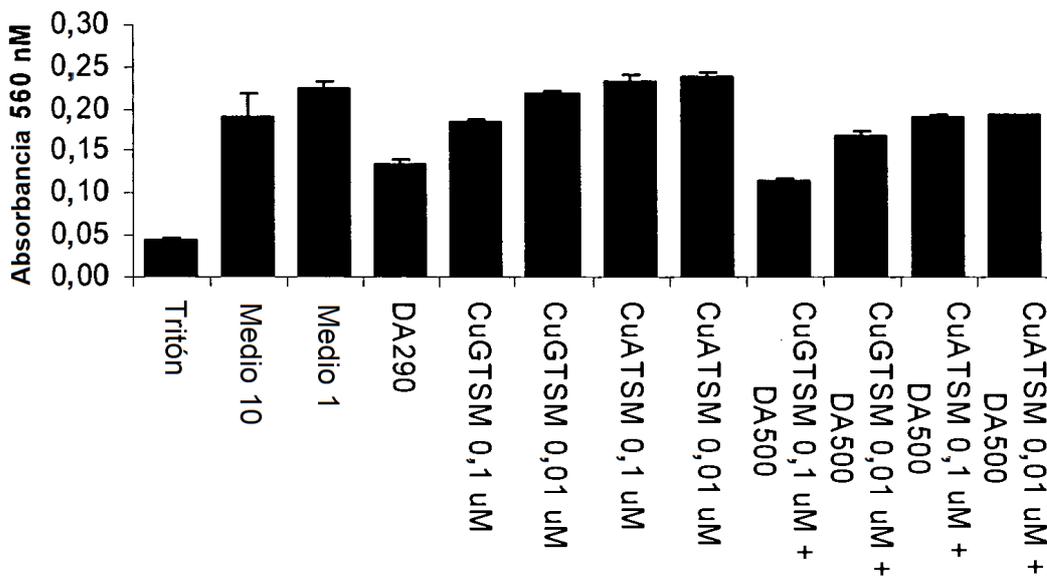


Figura 17

Efecto de BTSC sobre la muerte de células A30P inducida por DA

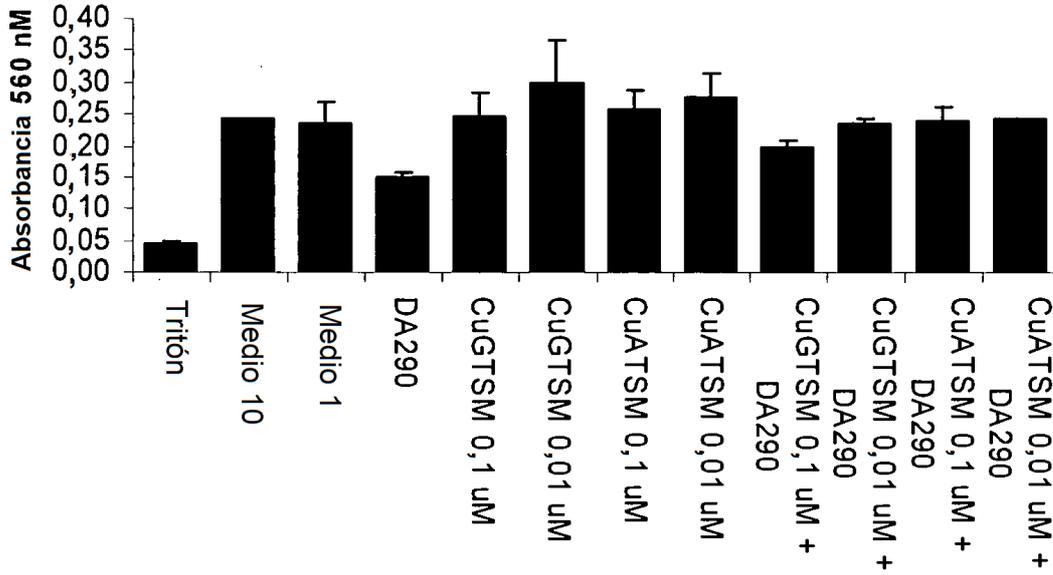


Figura 18

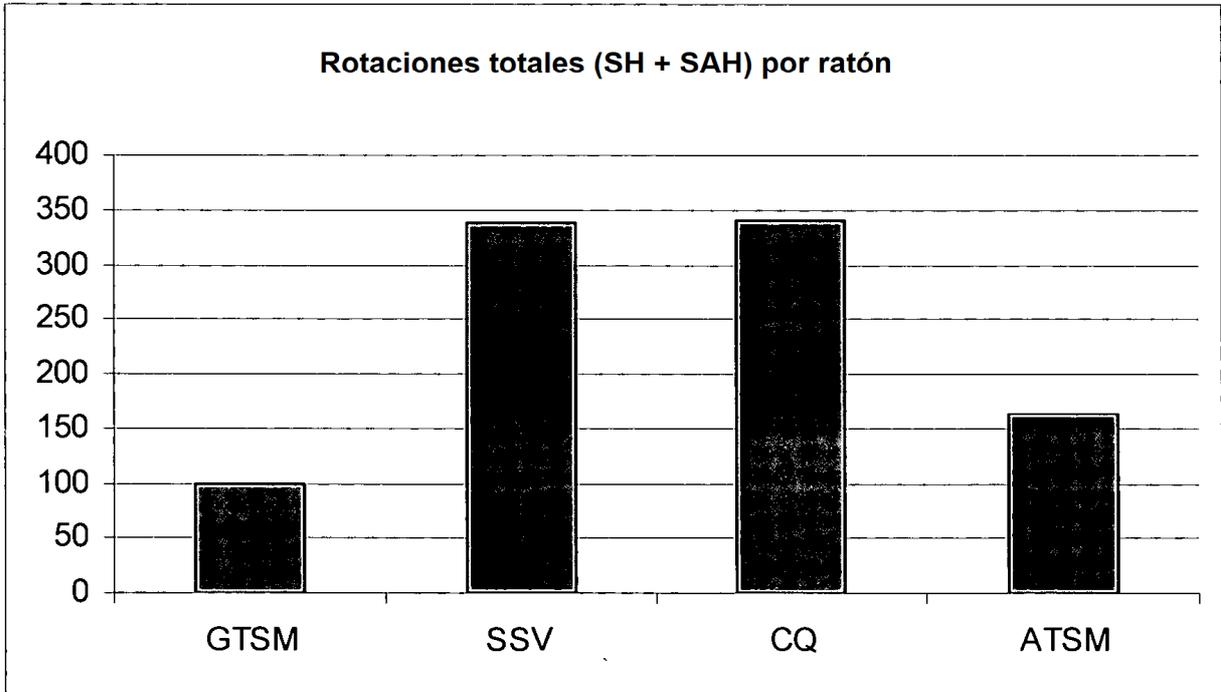


Figura 19

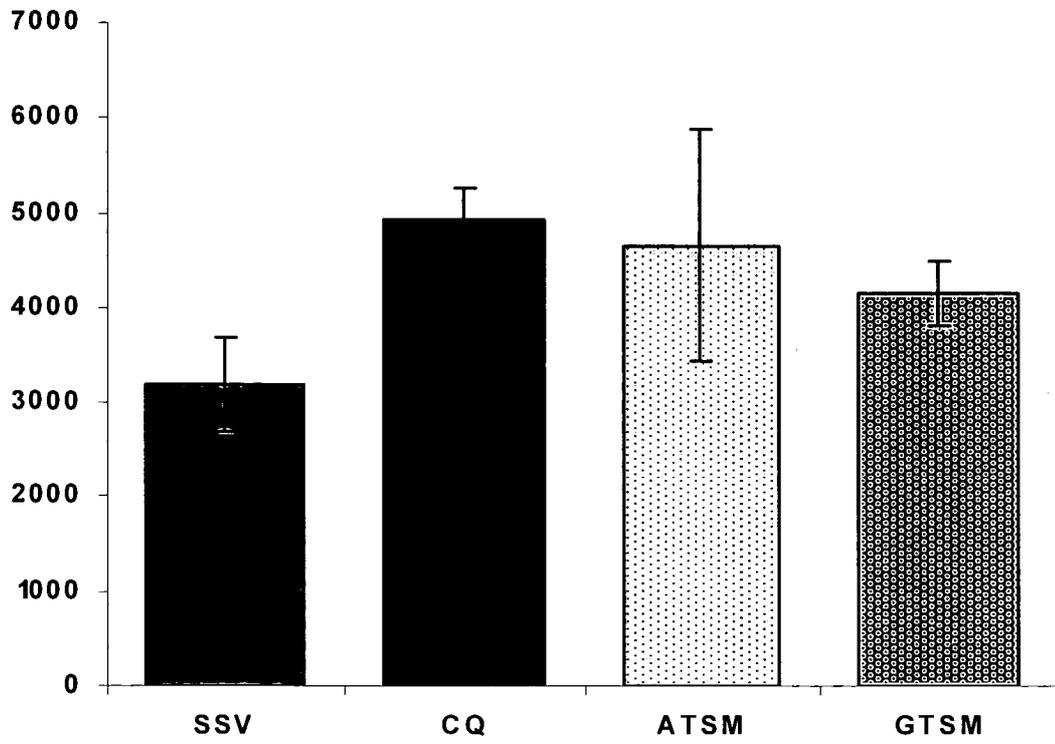


Figura 20

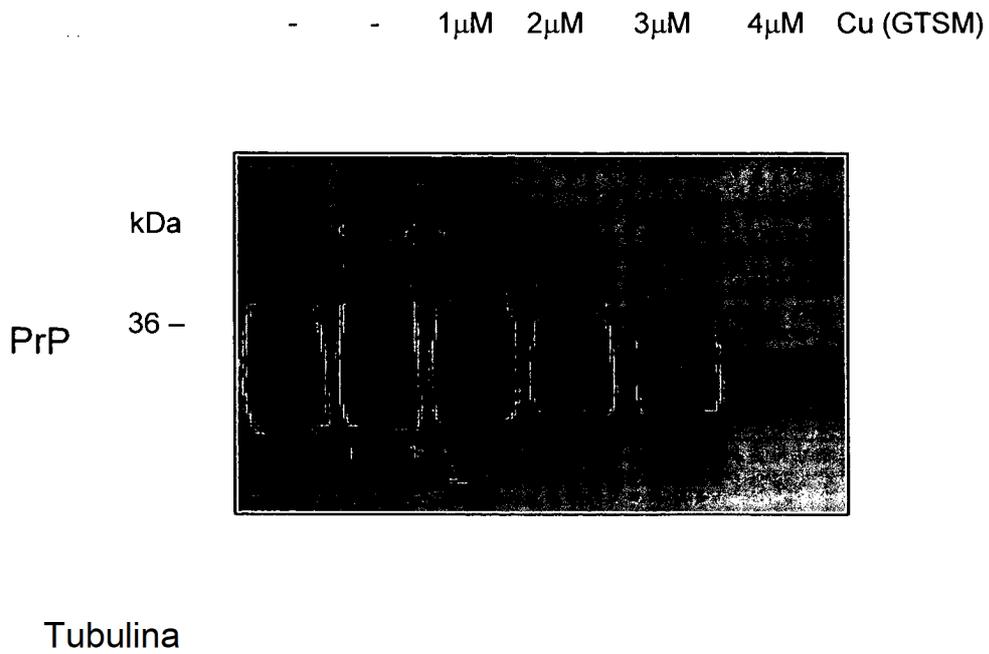


Figura 21

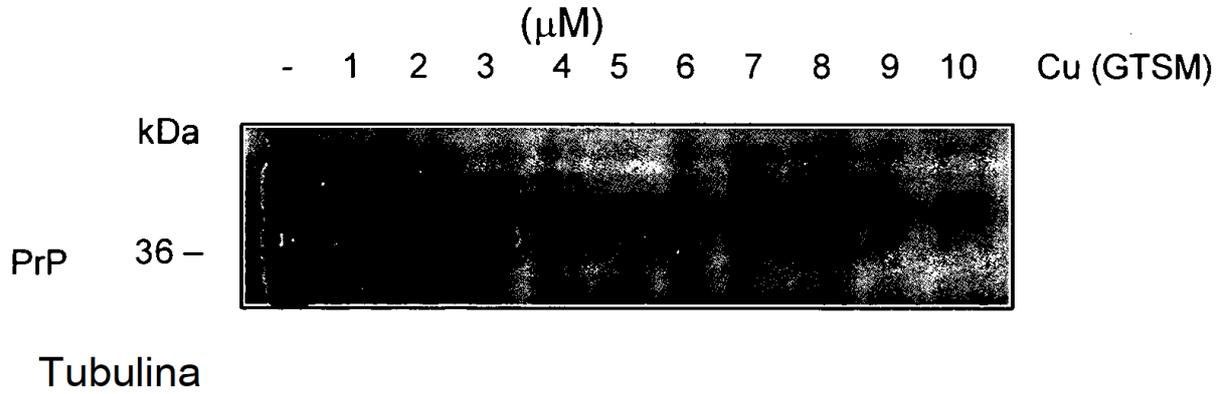


Figura 22

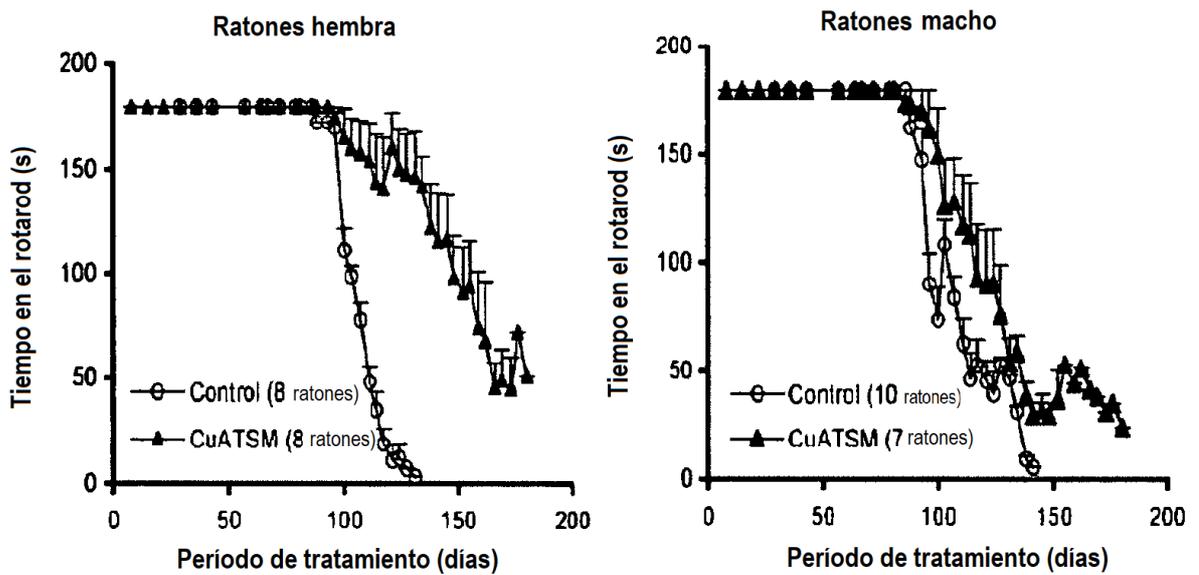
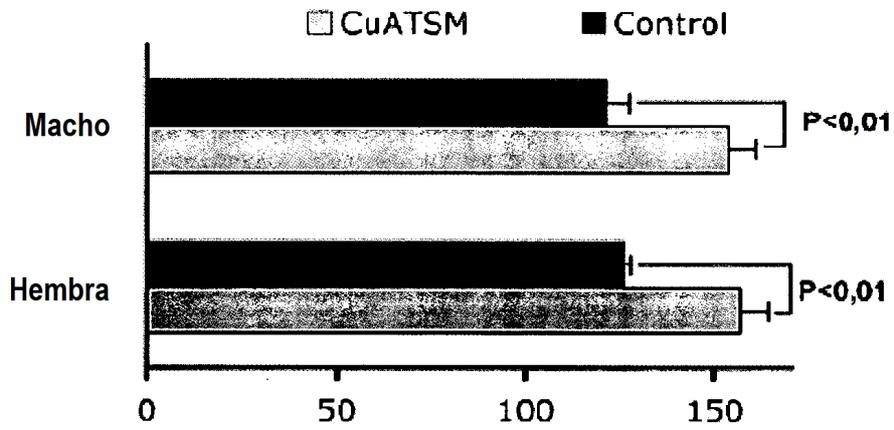


Figura 23



Aparición de la parálisis de la extremidad posterior después de que comenzara el tratamiento (días)

Figura 24A

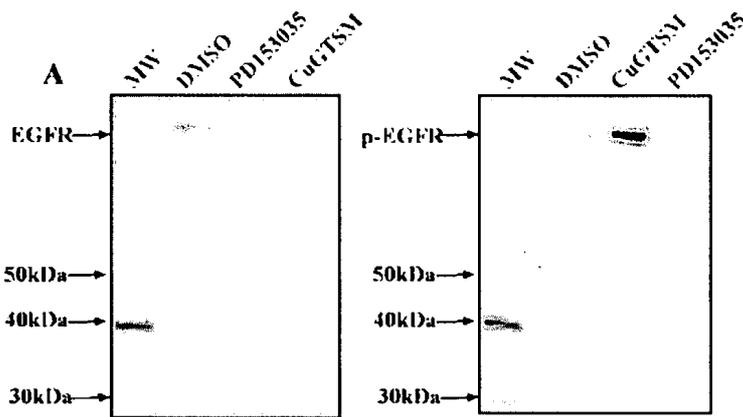


Figura 24B

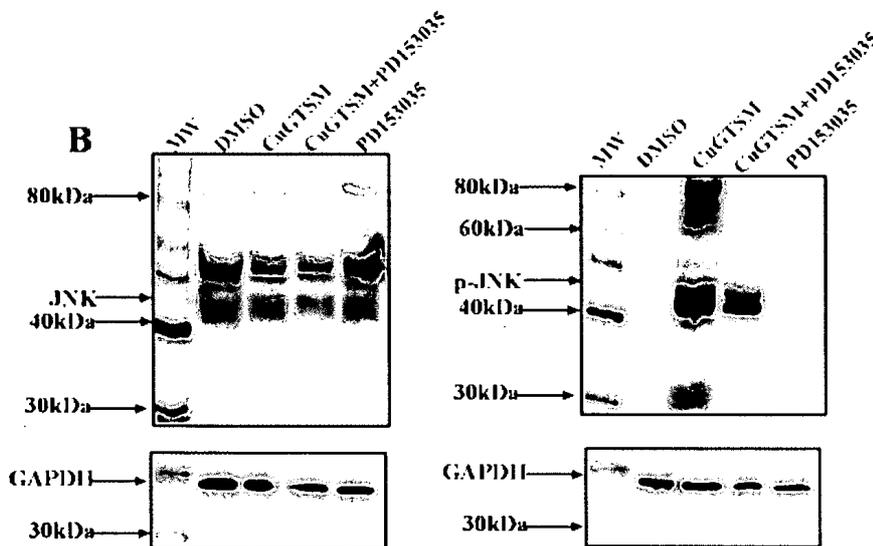


Figura 24C

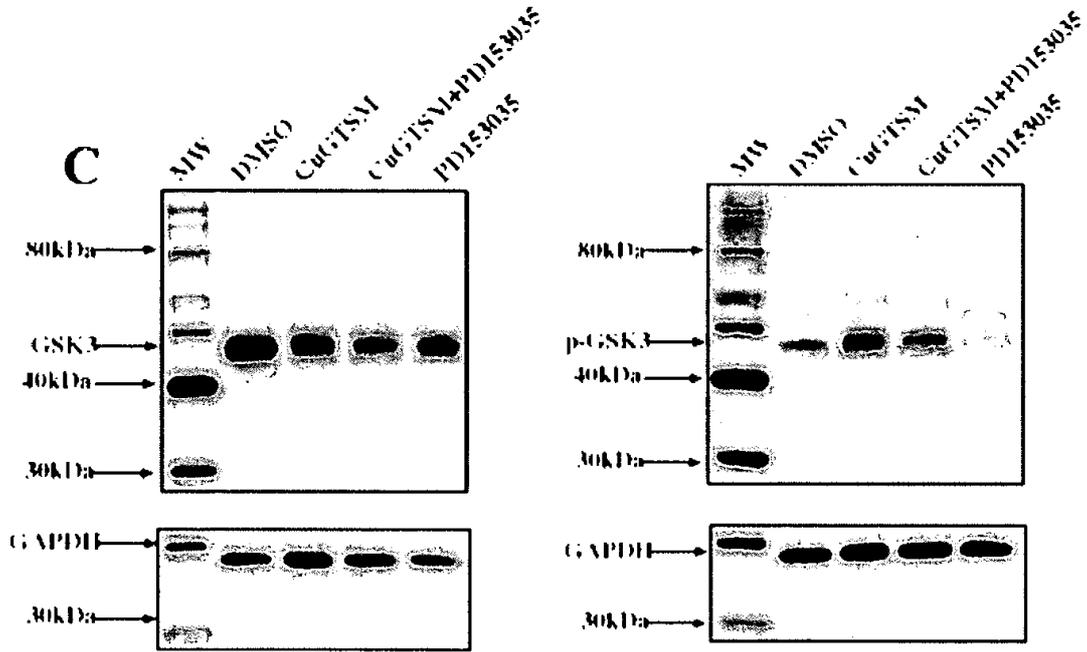


Figura 24D

