

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 683 021**

(51) Int. Cl.:

**A61K 31/215** (2006.01)  
**A61K 31/045** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)  
**A61K 31/231** (2006.01)  
**A61K 31/335** (2006.01)  
**A61K 31/23** (2006.01)  
**A61K 31/201** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.07.2009 PCT/US2009/051927**  
(87) Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2010 WO10014585**  
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2009 E 09790874 (3)**  
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 2328572**

---

(54) Título: **Compuestos activadores de la PKC para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas**

(30) Prioridad:

**28.07.2008 US 84172 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.09.2018**

(73) Titular/es:

**BLANCHETTE ROCKEFELLER NEUROSCIENCES  
INSTITUTE (100.0%)  
8 Medical Center Drive  
Morgantown, WV 26505-3409, US**

(72) Inventor/es:

**NELSON, THOMAS, J. y  
ALKON, DANIEL, L.**

(74) Agente/Representante:

**DURAN-CORRETJER, S.L.P**

**ES 2 683 021 T3**

---

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

## DESCRIPCIÓN

Compuestos activadores de la PKC para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas

5 **SECTOR DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se refiere a compuestos y composiciones para activar una isoforma de la proteína quinasa C (PKC). La presente divulgación también da a conocer procedimientos para reducir la neurodegeneración y para el tratamiento de enfermedades neurológicas, incluidas la enfermedad de Alzheimer y el accidente cerebrovascular, 10 que no están cubiertas por el alcance de las reivindicaciones.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

**Activadores de la PKC en la enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular y trastornos depresivos**

15 La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por la disminución progresiva de la memoria y las funciones cognitivas. La demencia asociada con la EA se conoce como demencia senil del tipo Alzheimer (DSTA) en uso con la enfermedad de Alzheimer. La EA se caracteriza clínicamente por la pérdida progresiva de la memoria, la cognición, el razonamiento, el juicio y la estabilidad emocional, que conduce gradualmente a un deterioro mental profundo y, en última instancia, a la muerte. Aunque existen muchas hipótesis para los posibles mecanismos de la EA, una teoría central es que la formación y acumulación excesiva de péptidos beta-amiloides (A $\beta$ ) tóxicos afecta directa o indirectamente a diversos eventos celulares y conduce a daño neuronal y muerte celular. Selkoe, *Neuron*. 1991;6(4):487–98 1991; Selkoe, *J Clin Invest*. 2002; 110(10):1375–81.

25 La EA es un trastorno progresivo con una duración media de alrededor de 8-15 años entre el inicio de los síntomas clínicos y la muerte. Se cree que la EA representa la séptima causa médica más común de muerte y afecta aproximadamente a 5 millones de personas en Estados Unidos. Se espera que la prevalencia alcance los 7,7 millones para el año 2030. Aproximadamente 1 de cada 8 personas mayores de 65 años, el 13% de esta población, 30 tienen EA (Alzheimer's Association 2008 Alzheimer's Disease Facts and Figures). La EA actualmente afecta a alrededor de 15 millones de personas en todo el mundo (incluyendo todas las razas y grupos étnicos) y, debido al aumento relativo de las personas mayores, en la población es probable que su prevalencia aumente en las próximas dos o tres décadas. La EA es actualmente incurable.

35 La proteína quinasa C (PKC) es una de las familias de genes más grandes de proteína quinasa. Varias isozimas de la PKC se expresan en el cerebro, incluidas PKC, PKC $\beta$ I, PKC $\beta$ II, PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$  y PKC $\gamma$ . La PKC es principalmente una proteína citosólica, pero con la estimulación se transloca a la membrana. Se ha demostrado que la PKC participa en numerosos procesos bioquímicos relevantes para la enfermedad de Alzheimer. La activación de la PKC también tiene un papel crucial en el aprendizaje y la mejora de la memoria y se ha demostrado que los activadores de la PKC aumentan la memoria y el aprendizaje. Sun y Alkon, *Eur J Pharmacol*. 2005;512:43–51; Alkon y otros, 40 *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:16432–16437. También se ha demostrado que la activación de la PKC induce sinaptogénesis en el hipocampo de rata, lo que sugiere el potencial de antiapoptosis y sinaptogénesis mediada por PKC durante las afecciones de neurodegeneración. Sun y Alkon, *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105(36): 13620–13625. El tratamiento postisquémico/hipóxico con briostatina-1, un activador de la PKC, rescató eficazmente 45 los déficits inducidos por la isquemia en la sinaptogénesis, la actividad neurotrófica y el aprendizaje espacial y la memoria. Sun y Alkon, *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008. Este efecto se acompaña de aumentos en los niveles de las proteínas sinápticas espinofilina y sinaptofisina y cambios estructurales en la morfología sináptica. Hongpaisan y Alkon, *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:19571–19576. La sinaptogénesis inducida por briostatina para la memoria asociativa a largo plazo también está regulada por la activación de la PKC. Hongpaisan y Alkon, *PNAS* 2007. La PKC también activa la producción de neurotrofinas. Las neurotrofinas, particularmente el factor neurotrófico derivado 50 del cerebro (BDNF) y el factor de crecimiento neural (NGF), son factores de crecimiento clave que inician la reparación y el recrecimiento de neuronas dañadas y sinapsis. La activación de algunas isoformas de la PKC, particularmente la PKC $\epsilon$  y la PKC $\eta$ , protege contra la lesión neurológica, muy probablemente regulando por aumento la producción de neurotrofinas. Weinreb y otros, *FASEB Journal*. 2004;18:1471–1473). También se ha notificado que 55 los activadores de la PKC inducen la expresión de la tiroxina hidroxilasa e inducen la supervivencia neuronal y el sobrecrecimiento de neuritas. Du y Iacovitti, *J. Neurochem*. 1997; 68:564–69; Hongpaisan y Alkon, *PNAS* 2007; Lallemand y otros, *J. Cell Sci*. 2005; 118: 4511–25.

60 La EA también se caracteriza por hiperfosforilación de tau. Tau se expresa principalmente en el cerebro, donde regula la orientación y la estabilidad de los microtúbulos en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. En la EA, la tau soluble normal se transforma en filamentos helicoidales apareados insolubles. Esto está relacionado con el cambio postraduccional en tau, principalmente la hiperfosforilación de tau por una serie de proteínas quinásas. Los estudios han demostrado que el A $\beta$  sintético promueve la fosforilación de tau a través de la activación de la glucógeno sintasa quinasa-3 GSK-3. Wang y otros, *Journal of Neurochemistry*. 2006; 98(4): 1167–1175. Se ha demostrado que la activación de la PKC protege a las neuronas del hipocampo primario de rata de la neurotoxicidad mediada por A $\beta$ , a 65 través de la inhibición de la GSK-3 $\beta$ . Garrido y otros, *FASEB J*. 2002: 1982.

- La PKC también activa la enzima convertidora de TNF-alfa (TACE, también conocida como ADAM17), que es una enzima que participa en la conversión proteolítica de la proteína precursora amiloide (APP) ligada a la membrana en su forma soluble no patógena, conocida como APP-alfa soluble o sAPP $\alpha$ . Alkon y otros, Trends in Pharmacological Sciences. 2007; 28(2): 51–60; Hurtado y otros, Neuropharmacology. 2001; 40(8): 1094–1102. Estas enzimas productoras de sAPP $\alpha$  se denominan genéricamente alfa-secretasas. La activación de TACE por la PKC también reduce los niveles celulares de A $\beta$  patogénico, que se produce por la escisión de la APP por la enzima beta-secretasa (BACE). Esto se debe, probablemente, al hecho de que el sitio de escisión de TACE está dentro del dominio A $\beta$  de la APP. Se ha demostrado que la sobreexpresión de PKC $\epsilon$  aumenta selectivamente la actividad de la enzima convertidora de endotelina (ECE), que degrada el A $\beta$ . Choi y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006; 103(21): 8215–8220. Además, se ha descubierto que las concentraciones subnanomolares de briostatina y un potente análogo sintético (picolog), ambos activadores de la PKC, causan la estimulación de vías no amiloidogénicas aumentando la TACE y, por lo tanto, disminuyendo la cantidad de A $\beta$  tóxico producido. Khan y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009; 34(2):332–9.
- La reducción de los niveles de A $\beta$  es un objetivo terapéutico principal en la enfermedad de Alzheimer. Se ha especulado que la inhibición de la formación de A $\beta$  por los activadores de la PKC puede estar producida por la competencia de TACE y BACE por su sustrato común, la APP.
- La estrategia de activación de  $\alpha$ -secretasas mediada por la PKC tiene la ventaja de tres consecuencias beneficiosas paralelas en la EA: aumentar la producción de sAPP- $\alpha$  y reducir el A $\beta$ , mejorar la memoria a través de la fosforilación mediada por PKC de los sustratos aguas abajo y disminuir la fosforilación de tau mediante la inhibición de GSK-3 $\beta$ .
- Los pacientes con EA ya tienen niveles reducidos de fosforilación mediada por PKC $\alpha/\epsilon$  de Erk1/2, un sustrato principal de la PKC aguas abajo. Khan y Alkon, Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103:13203–13207. Además, la aplicación de A $\beta$  a los fibroblastos normales reduce la actividad de PKC porque el A $\beta$  regula por disminución directamente la PKC  $\alpha/\epsilon$ . Los activadores de la PKC, especialmente los específicos para PKC  $\alpha/\epsilon$ , contrarrestarían el efecto de A $\beta$  y, de ese modo, invertirían o evitarían los cambios inducidos por el A $\beta$ .
- El accidente cerebrovascular es una de las principales causas de discapacidad y muerte en Estados Unidos, aunque existen opciones terapéuticas limitadas. Se ha demostrado que varias isoformas de la PKC tienen un papel central en la mediación del daño isquémico y de reperfusión después del accidente cerebrovascular. Los estudios con modelos experimentales de accidente cerebrovascular, genética de ratón e inhibidores y activadores peptídicos selectivos han demostrado que la PKC $\epsilon$  está implicada en la inducción de tolerancia isquémica y previene el daño, mientras que la PKC $\delta$  y  $\gamma$  están implicadas en la lesión. Takayoshi y otros, Stroke. 2007; 38(2):375–380; y Bright y otros, Stroke. 2005;36: 2781. Un posible mecanismo para el efecto isquémico protector de la PKC $\epsilon$  es que la PKC $\epsilon$  mantiene la función mitocondrial a través de la actividad de ERK y mediando los canales de potasio sensibles a ATP mitocondriales inducidos por adenosina. Otro mecanismo potencial es que la PKC $\epsilon$  provoca un efecto neuroprotector a través de la inducción de COX-2. Kim y otros, Neuroscience. 2007; 145(3): 931–941. La prostaglandina E2 (PGE2), producto de la actividad de la COX-2, conduce a la neuroprotección en la isquemia cerebral. Tal como se ha mencionado anteriormente, el tratamiento postisquémico/hipóxico con briostatina-1, un activador de la PKC, rescató eficazmente los déficits inducidos por la isquemia en la sinaptogénesis, la actividad neurotrófica y el aprendizaje espacial y la memoria. Sun y Alkon, Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105(36): 13620–13625.
- Se ha demostrado que la proteína A $\beta$  circulante está elevada en pacientes con accidente cerebrovascular isquémico agudo. El nivel de A $\beta$ -40 circulante estaba marcadamente elevado en pacientes con accidente cerebrovascular isquémico, en comparación con los controles. Lee y otros, Journal of Neural Transmission. 2005; 112(10): 1371–79. También se ha demostrado una fuerte asociación positiva entre el A $\beta$  vascular que se acumula progresivamente y los aumentos en los pacientes con EA del grosor de la pared de la arteriola y la corteza frontal, lo que sugiere que la angiopatía progresiva asociada con A $\beta$  a nivel arteriolar daña el aparato contráctil y la autorregulación del flujo sanguíneo cerebral, haciendo que los capilares aguas abajo sean vulnerables al daño. Stopa y otros, Stroke. 2008;39:814.
- Además, algunas formas de accidente cerebrovascular están causadas por el A $\beta$ , tales como las asociadas con la angiopatía amiloide cerebral, también conocida como angiopatía amiloide congofílica (AAC). Este trastorno es una forma de angiopatía en la que los mismos depósitos de A $\beta$  que se encuentran en la EA se acumulan en las paredes de las leptomeninges y los vasos sanguíneos corticales cerebrales superficiales del cerebro. La deposición de amiloide predispone al fallo de estos vasos sanguíneos, lo que aumenta el riesgo de un accidente cerebrovascular hemorrágico. La AAC también se asocia con ataques isquémicos transitorios, hemorragia subaracnoidea, síndrome de Down, necrosis posterior a la irradiación, esclerosis múltiple, leuкоencefalopatía, encefalopatía espongiforme y demencia pugilística.
- La evidencia sugiere que las PKC $\alpha$  y  $\epsilon$  son las isoformas de PKC más importantes para provocar los efectos beneficiosos antes mencionados en la EA, el accidente cerebrovascular y los trastornos depresivos. Se ha demostrado que la inhibición antisentido de la PKC $\alpha$  bloquea la secreción de sAPP $\alpha$ , mientras que la PKC $\epsilon$  es la isozima que más eficazmente suprime la producción de A $\beta$ . Racci y otros, Mol. Psychiatry. 2003; 8:209–216; y Zhu y otros, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001; 285: 997–1006. De este modo, los activadores de PKC específicos

de isoforma son altamente deseables como potenciales fármacos anti-Alzheimer. Los activadores específicos son preferentes con respecto a compuestos, tales como la briostatina, que muestran menos especificidad debido a que la activación no específica de PKC $\delta$  o  $\beta$  puede producir efectos secundarios indeseables.

- 5 Además, la PKC también se expresa a niveles muy bajos en todos los tejidos normales, excepto en el cerebro. Mischak y otros, J Biol. Chem. 1993; 268: 6090-6096; Van Kolen y otros, J Neurochem. 2008;104:1-13. La gran abundancia de PKC $\epsilon$  en las fibras nerviosas presinápticas sugiere un papel en el sobrecrecimiento de las neuritas o la liberación de neurotransmisores. Shirai y otros, FEBS J. 2008; 275: 3988-3994). Por lo tanto, los efectos de los activadores de PKC $\epsilon$  específicos estarán restringidos en gran medida al cerebro y es poco probable que produzcan efectos secundarios periféricos indeseados.
- 10

### **PUFA como activadores de la PKC**

15 Algunos PUFA, tales como el ácido araquidónico (véase la figura 1), se conocen desde hace muchos años como activadores naturales de la PKC. El  cido docosahexaenoico (DHA) también es un conocido activador de la PKC y recientemente se ha demostrado que ralentiza la acumulación de proteínas A $\beta$  y tau asociadas con las placas y ovillos que obstruyen el cerebro implicados en la EA. Sahlin y otros, Eur J Neurosci. 2007; 26(4):882-9.

20 Kanno y otros describieron el efecto del ácido 8-[2-(2-pentil-ciclopropilmetil)ciclopropil]-octanoico (DCP-LA), un derivado del ácido linoleico recién sintetizado con anillos de ciclopropano en lugar de dobles enlaces *cis*, en la actividad de la proteína quinasa C (PKC). Journal of Lipid Research. 2007; 47: 1146-1156. La PKC $\epsilon$  activada por DCP-LA, con una potencia superior a 7 veces sobre otras isozimas PKC. Esto indica que DCP-LA es altamente específico para PKC $\epsilon$ . Este compuesto también facilitó la transmisión sin ptica del hipocampo al potenciar la actividad de los receptores presinápticos de acetilcolina en las neuronas o terminales glutamatérgicos. Sin embargo, DCP-LA requiere concentraciones relativamente altas para producir su efecto máximo.

25

30 El documento WO 2002/50113 de Nishizaki y otros da a conocer compuestos de ácido carboxilico y sus correspondientes sales que tienen anillos de ciclopropano para la potenciación similar a LTP de la transmisión sin ptica o para su utilización como fármaco potenciador de la cognición o un fármaco para tratar la demencia. Sus ejemplos sintéticos dan a conocer la preparación de ésteres, pero sus resultados experimentales ense nan la utilización de ácidos libres. La razón es que el grupo de ácido carboxilico del material de partida de ácido graso reaccionaría con el dietilcinc utilizado en la reacción de Simmons-Smith. El éster met lico actúa como un grupo protector y se puede escindir por hidrólisis o dejar que permanezca, según sea necesario.

35 Los inconvenientes con el hallazgo de la técnica anterior incluyen la necesidad de administrar altas concentraciones para lograr los efectos anteriores, la activación no específica de isoformas de la PKC, o metabolismo rápido y secuestro de PUFA no modificados en tejidos grasos y otros órganos donde se incorporan a los triglicéridos y los quilomicrones. J Pharmacobiodyn. 1988;11(4):251-61. Además, la utilización de PUFA no modificados tendría una mir ada de efectos secundarios adversos. Por ejemplo, el ácido araquidónico es un precursor bioquímico de las prostaglandinas, los tromboxanos y los leucotrienos, que tienen potentes efectos proinflamatorios. Esto sería indeseable para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer donde la patología probablemente implica inflamación. Otros ácidos grasos esenciales también pueden poseer una multitud de otros efectos biológicos, incluida la potenciación de la señalización del óxido nítrico, los efectos antiinflamatorios y la inhibición de la HMG-CoA reductasa, que interferiría con la biosintesis del colesterol.

40

45 Debido a las limitadas opciones existentes para tratar tanto la EA como el accidente cerebrovascular, se necesitan nuevas terapias que puedan activar selectivamente solo las isoformas de la PKC que provocan neuroprotección.

### **PUFA y MUFA y enfermedad**

50 Un número creciente de estudios ha sugerido que los PUFA omega-3 pueden ser beneficiosos para otros trastornos de la alteración del estado de ánimo, tal como la depresión clínica, el trastorno bipolar, los trastornos de personalidad, la esquizofrenia y los trastornos por déficits de atención. Ross y otros, Lipids Health Dis. 2007; 18:6:21. Existe una gran cantidad de evidencia que relaciona los ácidos grasos omega-3, particularmente los ácidos docosahexaenoico y eicosapentaenoico, y un equilibrio saludable de ácidos grasos omega-3 a omega-6, para reducir el riesgo de depresión. Logan y otros. Lipids Health Dis. 2004; 3: 25. Se ha descubierto que los niveles de ácidos grasos omega-3 eran mensurablemente bajos y la proporción entre ácidos grasos omega-6 y ácidos grasos omega-3 era particularmente alta en un estudio clínico de pacientes hospitalizados por depresión. Un estudio reciente demostró que había un déficit selectivo de ácido docosahexaenoico en la corteza orbitofrontal de pacientes con trastorno depresivo mayor. McNamara y otros, Biol Psychiatry. 2007;62(1):17-24. Varios estudios también han demostrado que los sujetos con trastorno bipolar tienen niveles más bajos de ácidos grasos omega-3. En varios estudios recientes, se demostró que los ácidos grasos omega-3 son más eficaces que el placebo para la depresión tanto en adultos como en niños con depresión bipolar. Osher y Belmaker, CNS Neurosci Ther. 2009;15(2):128-33; Turnbull y otros Arch Psychiat Nurs. 2008;22(5):305-11.

65

Una amplia investigación también indica que los ácidos grasos omega-3 reducen la inflamación y ayudan a prevenir

los factores de riesgo asociados con enfermedades crónicas, tales como cardiopatía, cáncer, enfermedad inflamatoria intestinal y artritis reumatoide. Calder y otros, *Biofactors*. 2009;35(3):266-72; Psota y otros, *Am J Cardiol*. 2006;98(4A):3i-18i; Wendel y otros, *Anticancer Agents Med Chem*. 2009;9(4):457-70. La publicación recuperada de Internet en pubchem.ncbi.nlm.nih.gov "CID 554084" da a conocer el éster de ácido graso poliinsaturado *cis* 4-(2-((2-((2-pentilciclopropil)metil)ciclopropil)metil)ciclopropil)ciclopropilbutanoato de metilo.

También se ha demostrado que los ácidos grasos monoinsaturados son beneficiosos en los trastornos. Existe un buen respaldo científico para las dietas de MUFA como una alternativa a las dietas bajas en grasa para la terapia de nutrición médica en la diabetes de tipo 2. Ros, *American Journal of Clinical Nutrition*. 2003; 78(3): 617S-625S. High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations. Kris-Etherton y otros, *Am J Clin Nutr*. 1999 Dec;70(6):1009-15.

## DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

**Figura 1.** Figura 1. Estructuras de moléculas contempladas para su utilización de acuerdo con la presente invención (BR-101 a BR-118).

**Figura 2.** La figura 2 muestra los resultados de una activación de PKC $\epsilon$  *in vitro* por **BR-101** (DCP-LA) y dos derivados menos activos, BR-102 y BR-103.

**Figura 3.** La figura 3 muestra la activación de PKC $\epsilon$  con diversas concentraciones de **BR-111** (éster metílico de DHA-CP6); **BR-114** (éster metílico EPA-CP5); y **BR-115** (éster metílico AA-CP4).

**Figura 4.** La figura 4 muestra la activación de PKC $\epsilon$  con diversas concentraciones de otros ésteres metílicos de ácidos grasos ciclopropanados y epoxidados: alcohol linolénílico ciclopropanado (**BR-104**); alcohol linoleílico ciclopropanado (**BR-105**); ácido epoxiesteárico (**BR-116**); éster metílico del ácido vemólico (**BR-117**); y éster metílico del ácido vemólico ciclopropanado (**BR-109**).

**Figura 5.** La figura 5 muestra un transcurso de tiempo de activación de PKC mediante diversas concentraciones de briostatina en neuronas de hipocampo de rata H19-7/IGF-IR.

**Figura 6.** La figura 6 muestra un curso de tiempo de activación de PKC en neuronas primarias de hipocampo de rata por briostatina y DCP-LA.

**Figura 7.** La figura 7a y b representan niveles disminuidos de A $\beta$  intracelular (**7a**) o secretado (**7b**) en células neuro2a (N2a) expuestas a los activadores de la PKC briostatina, **BR-101** (DCP-LA), o **BR-111** (DHA-CP6).

**Figura 8.** La figura 8 muestra el efecto de **BR-111** (DHA-CP6) (0,1 a 10  $\mu$ M) en la degradación de A $\beta$  exógenamente aplicado en células de neuroblastoma SH-SY5Y.

**Figura 9.** Las figuras 9a-c representan los efectos de los activadores de PKC briostatina, **BR-101** (DCP-LA) y **BR-111** (DHA-CP6) sobre la actividad TACE en células de neuroblastoma N2a transfectadas con APPS/PSID humana (**9a**); los efectos de diversas concentraciones de briostatina en la actividad de TACE en neuronas primarias corticales de rata (**9b**) y los efectos de **BR-111** (DHA-CP6) sobre la actividad de TACE en neuronas primarias corticales de rata (**9c**).

**Figura 10.** La figura 10 muestra la activación de la enzima convertidora de endotelina (ECE) por los activadores de PKC briostatina (0,27 nM), **BR-101** (DCP-LA) (1  $\mu$ M), **BR-111** (DHA-CP6) (1  $\mu$ M) o etanol en células de neuroblastoma SH-SY5Y.

**Figura 11.** Las figuras 11a-b representan el efecto de **BR-101** (DCP-LA) y **BR-111** (DHA-CP6) (1-100  $\mu$ M) sobre la supervivencia celular y la proliferación celular, respectivamente, de células de neuroblastoma SH-SY5Y.

La presente invención da a conocer un compuesto que es un éster de ácidos grasos *cis*-poliinsaturados (PUFA) caracterizado por que, como mínimo, uno de los dobles enlaces en el compuesto se reemplaza por un anillo/grupo de ciclopropano para utilizar en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo o un trastorno del estado de ánimo o en la reducción de la neurodegeneración de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 10. Además, se dan a conocer, adicionalmente, compuestos seleccionados de éster metílico del ácido docosahexaenoico ciclopropanado (BR-111), éster metílico del ácido eicosapentaenoico (BR-114) o una combinación de los mismos según la reivindicación 18 y composiciones que comprenden tales compuestos según la reivindicación 8. Además, también se dan a conocer, composiciones para su utilización en neurodegeneración que comprenden un compuesto seleccionado de éster metílico de ácido docosahexaenoico ciclopropanado (BR-111), éster metílico de ácido eicosapentaenoico (BR-114), éster metílico de ácido araquidónico ciclopropanado (BR-115) o una combinación de los mismos de acuerdo con la reivindicación 9. Estos compuestos activan la PKC $\epsilon$  a concentraciones nanomolares, lo que los hace excelentes candidatos para el tratamiento de la EA, el accidente cerebrovascular y otras enfermedades neurológicas en las que la PKC $\epsilon$  es neuroprotectora.

## **Definiciones**

Un "ácido graso" es un ácido carboxílico con una cadena alifática no ramificada que contiene de aproximadamente 4 a 30 carbonos; la mayoría de los ácidos grasos de cadena larga contienen entre 10 y 24 carbonos. Los ácidos grasos pueden ser saturados o insaturados. Los ácidos grasos saturados no contienen dobles enlaces ni otros grupos funcionales a lo largo de la cadena. Los ácidos grasos insaturados contienen uno o más grupos funcionales alquenilo, es decir, dobles enlaces, a lo largo de la cadena. La expresión "ácido graso poliinsaturado" o "PUFA" significa un ácido graso que contiene más de un doble enlace. Hay tres clases de PUFA, PUFA omega-3, PUFA

omega-6 y PUFA omega-9. En los PUFA omega-3, el primer doble enlace se encuentra a 3 carbonos del último carbono de la cadena (el carbono omega). En los PUFA omega-6, el primer doble enlace se encuentra a 6 carbonos de la cadena y en los PUFA omega-9 el primer doble enlace está a 9 carbonos del carbono omega.

5 Los PUFA también se llaman "ácidos grasos polienicos". Tal como se utiliza en el presente documento, el término PUFA incluye ácidos grasos tanto naturales como sintéticos. Una fuente importante de PUFA proviene de peces marinos y aceites vegetales derivados de cultivos de semillas oleaginosas, aunque los PUFA encontrados en aceites vegetales comercialmente desarrollados se limitan, típicamente, a ácido linoleico y ácido linolénico (18:3 delta 9,12,15).

10 UN "cis-PUFA" es uno en el que los átomos de carbono adyacentes están en el mismo lado del doble enlace.

La abreviatura X:Y indica un grupo acilo que contiene X átomos de carbono e Y dobles enlaces. Por ejemplo, el ácido linoleico se abreviaría 18:2.

15 Un "polieno interrumpido por metileno" se refiere a un PUFA que tiene dos o más dobles enlaces cis separados entre sí por un solo grupo metileno.

20 Un "polieno no interrumpido con metileno" o "ácido graso interrumpido con polimetileno" se refiere a un PUFA que tiene dos o más dobles enlaces cis separados por más de un grupo metileno.

25 Un "ácido graso monoinsaturado" (MUFA) es un ácido graso que tiene un solo doble enlace en la cadena de ácido graso y todos los átomos de carbono restantes en la cadena son de enlace sencillo. Ejemplos de MUFA incluyen ácido oleico, ácido miristoleico y ácido palmitoleico.

30 Un "ácido graso monoinsaturado cis" significa que los átomos de hidrógeno adyacentes están en el mismo lado del doble enlace.

35 Los ácidos grasos conjugados, tales como ácido linoleico conjugado (*ácido 9-cis, 11-transoctadecadienoico*) poseen un dieno conjugado, es decir, dos enlaces dobles en carbonos adyacentes. Alguna evidencia sugiere que el ácido linoleico conjugado tiene actividad antitumoral.

40 Ejemplos de PUFA incluyen ácido linoleico (ácido 9,12-octadecadienoico); ácido  $\gamma$ -linolénico (ácido GLA, 6,9,12-octadecatrienoico); ácido  $\alpha$ -linolénico (ácido 9,12,15-octadecatrienoico); ácido araquidónico (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico); ácido eicosapentanoico (EPA; ácido 5,8,11,14,17-eicosapentanoico); ácido docosapentanoico (DPA; ácido 7,10,13,16,19-docosapentanoico); ácido docosahexaenoico (DHA; ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexanoico); y ácido estearidónico (ácido 6,9,12,15-octadecatetraenoico).

45 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "ciclopropano" se refiere a una molécula de cicloalcano con la fórmula molecular C3H6, que consiste en tres átomos de carbono unidos entre sí para formar un anillo, teniendo cada átomo de carbono dos átomos de hidrógeno.

50 Un "epóxido" se refiere a un éter cíclico con tres átomos en el anillo.

55 Tal como se utiliza en el presente documento, un "derivado de PUFA" se refiere a un PUFA, o alcohol o éster del mismo, en el que, como mínimo, uno de los dobles enlaces se ha ciclopantanado o epoxidado.

60 Tal como se utiliza en el presente documento, un "derivado de MUFA" se refiere a un MUFA, o alcohol o éster del mismo, en el que el doble enlace se ha ciclopantanado o epoxidado.

65 La "activación selectiva" de PKC $\epsilon$  significa que el compuesto derivado de PUFA de la presente invención activa PKC $\epsilon$  en una extensión detectable mayor que cualquier otra isozima de PKC. En realizaciones específicas, el derivado de PUFA activa la PKC $\epsilon$ , como mínimo, 1, 2 o 5 sobre las otras isozimas de PKC, tal como se mide utilizando, por ejemplo, el ensayo de activación de la PKC descrito en el presente documento. Tras la activación, las enzimas proteína quinasa C son translocadas a la membrana plasmática por las proteínas RACK (receptor unido a membrana para proteínas de proteínas quinasa C activadas). En general, tras la activación, las enzimas RACK translocan las enzimas proteína quinasa C a la membrana plasmática. Otros indicios de activación de la PKC incluyen la fosforilación en residuos de serina/treonina C-terminales específicos por la quinasa dependiente de fosfatidilinositol-trifosfato (PDK1), con, como mínimo, dos fosforilaciones adicionales y/o autofosforilaciones de secuencias bien conservadas en cada enzima de la familia de PKC. La activación de PKC se describe en Sun y Alkon, Recent Patents CNS Drug Discov. 2006; 1(2): 147-56.

70 "Neurodegeneración" se refiere a la pérdida progresiva de la estructura o la función de las neuronas, incluyendo la muerte de las neuronas.

75 Para los fines de la presente invención, una "enfermedad neurológica" se refiere a cualquier enfermedad del sistema

nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) que está asociada con el procesamiento  $\beta$ -amiloidogénico de la APP. Esto puede dar como resultado defectos en las neuronas o en las células gliales, incluyendo, pero sin limitaciones, pérdida neuronal, degeneración neuronal, desmielinización neuronal, gliosis (es decir, astrogliosis), o acumulación neuronal o extraneuronal de proteínas aberrantes o toxinas (por ejemplo, A $\beta$ ).

- 5 Una enfermedad neurológica de ejemplo es la EA. Otra enfermedad neurológica de ejemplo es la angiopatía congénita (AAC), también denominada angiopatía amiloide cerebral.
- 10 La expresión "enfermedad de Alzheimer" o "EA" se refiere a cualquier afección en la que la deposición de A $\beta$  terminará llegando a las células del sistema nervioso central. En una realización no limitante, el péptido A $\beta$ , particularmente A $\beta$ 1-42, se forma a partir del metabolismo  $\beta$ -amiloidogénico de la APP. La EA puede ser heredable en una manifestación familiar, o puede ser esporádica. En el presente documento, la EA incluye factores familiares, esporádicos, así como intermedios y subgrupos de los mismos en función de las manifestaciones fenotípicas
- 15 Otra enfermedad neurológica es el síndrome de Down (SD). Los sujetos con SD invariablemente desarrollan (en su tercera o cuarta década) placas de amiloide cerebral (A $\beta$ ) y ovillos neurofibrilares (NFT), las lesiones características de la EA. Estudios recientes han demostrado que el A $\beta$ 42 es la forma más temprana de esta proteína depositada en los cerebros de síndrome de Down y puede verse en sujetos de tan solo 12 años de edad, y que el A $\beta$  soluble se puede detectar en los cerebros de sujetos con SD ya a las 21 semanas de edad gestacional, mucho antes de la formación de placas de AP. Gyure y otros, Archives of Pathology and Laboratory Medicine. 2000; 125: 489-492.

20 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" incluye un mamífero.

25 La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y normalmente no producen reacciones adversas cuando se administran a un sujeto. Preferentemente, tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para utilización en animales y, más particularmente, en seres humanos. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa una composición química con la que se puede combinar el ingrediente activo y que, después de la combinación, puede utilizarse para administrar el principio activo a un sujeto y puede hacer referencia a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el cual se administra el compuesto.

30 Las expresiones "dosis terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" se refieren a una cantidad de un agente terapéutico que da como resultado una respuesta terapéutica medible. Una respuesta terapéutica puede ser cualquier respuesta que un usuario (por ejemplo, un médico) reconocerá como una respuesta eficaz a la terapia, incluyendo la mejoría de los síntomas y de los marcadores clínicos indirectos. Por lo tanto, una respuesta terapéutica generalmente será una mejora o inhibición de uno o más síntomas de una enfermedad o afección, por ejemplo, EA. Una respuesta terapéutica medible también incluye un hallazgo de que un síntoma o enfermedad se previene o tiene un inicio retardado o es atenuada de otra manera por el agente terapéutico.

35 40 Los términos "alrededor de" y "aproximadamente" generalmente significarán un grado de error aceptable para la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las mediciones. Normalmente, los grados de error de ejemplo están dentro del 20 por ciento (%), preferentemente dentro del 10%, y, más preferentemente, dentro del 5% de un valor o intervalo de valores dado. Como alternativa y, particularmente, en sistemas biológicos, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" pueden significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferentemente dentro de 5 veces y, más preferentemente, dentro de 2 veces de un valor dado. Las cantidades numéricas dadas en el presente documento son aproximadas a menos que se indique lo contrario, lo que significa que el término "alrededor de" o "aproximadamente" puede deducirse cuando no se indica expresamente.

45 50 La presente invención se refiere a compuestos que son éster de ácido graso cis-poliinsaturado para su utilización en la reducción de la neurodegeneración y en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo o un trastorno del estado de ánimo según las reivindicaciones 1 y 10, caracterizado por que, como mínimo, uno de los dobles enlaces en el compuesto es reemplazado por un anillo/grupo de ciclopropano. Además, la presente invención se refiere a compuestos de éster metílico de ácido docosahexaenoico ciclopropano (BR-111), éster metílico del ácido eicosapentaenoico ciclopropano (BR-114), según la reivindicación 18, y composiciones que comprenden dichos compuestos, según la reivindicación 8. Además, se dan a conocer, adicionalmente, composiciones para su utilización en neurodegeneración que comprende un compuesto seleccionado de éster metílico de ácido docosahexaenoico ciclopropanado (BR-111), éster metílico de ácido eicosapentaenoico (BR-114), éster metílico de ácido araquidónico ciclopropanado (BR-115) o una combinación de los mismos según la reivindicación 9. La presente divulgación incluye la utilización de derivados ciclopropanados de PUFA de la invención y otros derivados ciclopropanados de MUFA y derivados epoxidados de PUFA o MUFA que no están cubiertos por el alcance de las reivindicaciones, en las que uno, algunos o todos los dobles enlaces son reemplazados por un grupo ciclopropano o un grupo epóxido. La función terminal puede ser un ácido carboxílico libre o un éster metílico, éster etílico, o algún otro éster alquílico con un alcohol alifático o aromático. Este alcohol específicamente también puede incluir glicerol y derivados del mismo. Los derivados de glicerol son biológicamente importantes porque los ácidos grasos se

encuentran con mayor frecuencia conjugados con glicerol en forma de fosfatidilcolina, fosfatidilserina o ácidos fosfatídicos. Por ejemplo, los triacilgliceroles son compuestos en los que los grupos carboxilo de los ácidos grasos se esterifican a los hidroxilos de los tres carbonos que se encuentran en el glicerol se denominan triacilgliceroles o triglicéridos.

- 5 El objetivo de esterificar el ácido carboxílico es facilitar el transporte a través de la barrera hematoencefálica eliminando la carga negativa. El objetivo de un grupo de alcohol es también facilitar el transporte a través de la barrera hematoencefálica.
- 10 En una realización, el ácido graso que forma la base para los compuestos utilizados en la presente invención es un ácido graso poliinsaturado que tiene la siguiente estructura:



- 15 en la que X está entre 2 y 6, e Y está entre 2 y 6, e incluye polienos interrumpidos con metileno o polimetileno. Ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados incluyen ácido linoleico,  $\gamma$ -linoleico, ácido araquidónico y ácido adrénico que tienen las siguientes estructuras:

Linoleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
$\gamma$ -Linoleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$
Araquidónico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
Adrénico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$

- 20 Estos son PUFA omega-6.

En otra realización, el ácido graso que forma la base para los compuestos utilizados en la presente invención es un ácido graso poliinsaturado que tiene la siguiente estructura:



en la que X está entre 2 y 6, e Y está entre 2 y 6, e incluye polienos interrumpidos con metileno o polimetileno. Ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados incluyen ácido  $\alpha$ -lineoleico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico, ácido eicosatetraenoico que tiene las siguientes estructuras:

Alfa-linolénico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
Eicosatetraenoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$
Eicosapentaenoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_5(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
Docosahexaenoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_6(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$

Estos se conocen como PUFA omega-3.

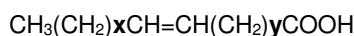
- 35 En una realización específica, el compuesto de la presente invención es un éster de un *cis*-PUFA, en el que el grupo hidroxilo está reemplazado por un grupo alcoxi, y en el que, como mínimo, uno de los dobles enlaces se ha ciclopantanado. El material de partida para esta realización tiene las siguientes estructuras:



- 40 en la que R es el grupo alquilo de un alcohol que incluye alcoholes monohídricos y alcoholes polihídricos, incluyendo, entre otros, metanol, etanol, propanol, butanol, pentanol, glicerol, manitol y sorbitol.

En una realización adicional, el compuesto contiene, como mínimo, tres dobles enlaces ciclopantanados.

- 45 El ácido graso adicional que forma la base para los compuestos que no están cubiertos por el alcance de las reivindicaciones es un ácido monoinsaturado que tiene la siguiente estructura:



- 50 en el que X e Y son números impares entre 3 y 11.

Ejemplos de ácidos grasos monoinsaturados que pueden ser la base de los compuestos incluyen ácidos grasos *cis* y trans-monoinsaturados, tales como ácido oleico, ácido elaidico, ácido obtusílico, ácido caproleico, ácido lauroleico, ácido linderico, ácido miristoleico, ácido palmitoleico, ácido vaccénico, ácido gadoleico, ácido erúcico y ácido petroselínico.

Un éster de acuerdo con la presente invención, significa un monoéster o un poliéster. Los ésteres de ácidos grasos incluyen ésteres de metilo, propilo y butilo, y también ésteres resultantes de alcoholes más complejos, tales como

propilenglicol. En realizaciones no limitantes, R' es lineal o ramificado e incluye metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, secbutilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, y tetradecilo. También se puede formar un éster a partir de un ácido graso unido a un alcohol graso en un enlace éster.

- 5 El éster puede ser un éster de alcohol, incluyendo, pero sin limitaciones al mismo, un éster de alcohol alifático. En una realización, el éster de alcohol es un éster de glicerol. Los ésteres de glicerol de ácidos grasos incluyen éster de ácido graso de glicerol, éster de ácido graso de ácido acético de glicerol, éster de ácido graso de ácido láctico de glicerol, éster de ácido graso de ácido cítrico de glicerol, éster de ácido graso de ácido succínico de glicerol, éster de ácido graso de ácido diacetiltartárico de glicerol, éster de ácido acético de glicerol, éster de ácido graso de poliglicerol y éster de ácido ricinoleico condensado con poliglicerol.

10 En otra realización específica, el compuesto es un alcohol de un *cis*-PUFA en el que, como mínimo, uno de los enlaces dobles se ha ciclopropanado. En una realización adicional, el compuesto es un alcohol de un *cis*-PUFA que contiene, como mínimo, tres enlaces dobles ciclopropanados. Estos compuestos incluyen, pero no se limitan a los mismos, alcohol linoleico diciclopropano (**BR-105**) o alcohol linolénico triciclopropano (**BR-104**). En esta realización, R' puede ser un alcohol de cadena normal o ramificada o un alcohol fenólico.

15 Se da a conocer adicionalmente un compuesto que es un ácido graso *cis*-poliinsaturado, o derivado del mismo, en el que, como mínimo, uno de los dobles enlaces se reemplaza por un grupo epoxilo. El compuesto contiene, como mínimo, tres dobles enlaces epoxidados.

20 El compuesto es un éster epoxidado de un *cis*-PUFA, incluyendo, pero sin limitaciones al mismo, un éster de alcohol graso. Los ésteres pueden ser los mismos ésteres que los descritos anteriormente para los PUFA ciclopropanados. El alcohol puede ser un éster de alcohol alifático, tal como glicerol.

25 Se da a conocer, adicionalmente, un compuesto que es un alcohol graso *cis*-poliinsaturado epoxidado, tal como alcohol linoleico diciclopropano o alcohol linolénico triciclopropano. Los alcoholes pueden ser los mismos que los descritos anteriormente para los PUFA ciclopropanados.

30 En otra realización, el compuesto incluye lípidos ciclopropanados o epoxidados derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados (ácidos *cis*-monoenoicos), tales como ácido oleico, ácido eládico, alcohol eládico, alcohol oleico y 1-monolinoleil rac-glicerol. Los compuestos de ejemplo incluyen alcohol eliádico ciclopropano (**BR-106**), ácido eliádico ciclopropano (**BR-107**) y alcohol oleílico ciclopropano (**BR-108**).

35 Una realización adicional incluye lípidos ciclopropanados derivados de ácidos grasos *cis*-monoinsaturados o ácidos grasos insaturados, ésteres de ácidos grasos o alcoholes de ácidos grasos, que contienen uno o más residuos de epóxido, tal como éster metílico del ácido vernólico ciclopropano (por ejemplo, **BR-109**).

40 En realizaciones específicas, los PUFA que forman la base de los compuestos ciclopropanados utilizados en la presente invención incluyen, pero sin limitaciones a los mismos, ácido araquidónico (AA), ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido eicosapentaenoico (EPA). Los compuestos de ejemplo para su utilización en el procedimiento de la presente invención incluyen el éster metílico de ácido docahexaenoico hexaciclopropano (**BR-111**); éster metílico de ácido eicosapentaenoico pentaciclopropano (**BR-114**); y éster metílico de ácido araquidónico tetraciclopropano (**BR-115**).

45 En una realización específica adicional, el compuesto es un derivado de PUFA ciclopropanado de ácido docosahexaenoico que tiene la siguiente estructura:



50 en la que R es H o un grupo alquilo. En una realización específica, R es CH<sub>3</sub> (**BR-111** o éster metílico de DHA-CP6 o 3-(2-((2-((2-((2-((2-ethylciclopropil)metil)ciclopropil)metil)ciclopropil)metil)ciclopropil)metil)ciclopropil)metil)ciclopropil)propanoato de metilo.

55 En otra realización específica, el derivado de PUFA tiene la siguiente estructura:



60 Este compuesto es **BR-114** (**EPA-CP5**) o éster metílico de 4-(2((2-((2-ethylciclopropil)metil)ciclopropil)metil)ciclopropil)metil)ciclopropil)metil)ciclopropil)metil)-ciclopropil)butanoato de metilo).

En aún otra realización específica, el derivado de PUFA tiene la siguiente estructura:



Este compuesto es BR-115 (AA-CP4 o éster metílico de 4-(2((2-((2-pentilciclopropil)metil)ciclopropil)metil)ciclopropil)metil)ciclopropilbutanoato de metilo).

En todavía otra realización específica, el derivado de PUFA tiene la siguiente estructura:



en la que R es H o un éster de alquilo. En una realización específica, R es CH3.

Los MUFA ciclopropanados o epoxidados de forma natural o derivados éster o alcohol de los mismos incluyen ácido malvénico, ácido vernólico y ácido estercúlico. Un compuesto de ejemplo es éster metílico del ácido vernólico (BR-117).

### Procedimientos de síntesis

Los ácidos grasos, y ésteres y alcoholes de los mismos, pueden obtenerse o prepararse a partir de la purificación a partir de fuentes naturales, por ejemplo, aceite de pescado, aceite de linaza, soja, aceite de colza o algas, o sintetizarse utilizando una combinación de síntesis enzimática microbiana y síntesis química. Como ejemplo, los ésteres metílicos de ácidos grasos se pueden producir mediante la transesterificación de triglicéridos de aceites de tipo refinado/comestible utilizando metanol y un catalizador alcalino homogéneo.

Los procedimientos de ciclopropanación de dobles enlaces en hidrocarburos son bien conocidos. Como ejemplo, la reacción modificada de Simmons-Smith es un procedimiento estándar para convertir enlaces dobles en ciclopropanos. Tanaka y Nishizaki, *Bioorg. Med. Chem. Let.* 2003; 13: 1037–1040; Kawabata y Nishimura, *J Tetrahedron*. 1967; 24: 53–58; y Denmark y Edwards, *J Org Chem.* 1991; 56: 6974. En esta reacción, el tratamiento de alquenos con carbenoides metálicos, por ejemplo, yoduro de metileno y dietilcinc, da como resultado la ciclopropanación del alqueno. Véase también, Ita y otros, *Organic Syntheses*. 1988; 6:327. La ciclopropanación de ésteres metílicos también se efectuó utilizando diazometano en presencia de acetato de paladio (II) como catalizador. Gangadhar y otros, *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1988; 65(4): 601–606.

Los procedimientos de epoxidación también son bien conocidos y normalmente implican la reacción de dioxiranos de ácidos grasos en disolventes orgánicos. Sonnet y otros, *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1995; 72(2):199–204. Como ejemplo, se puede lograr la epoxidación de dobles enlaces de PUFA utilizando dimetildioxirano (DMD) como agente epoxidante. Grabovskiy y otros, *Helvetica Chimica Acta*. 2006; 89(10): 2243-53.

### Procedimientos de tratamiento

La presente divulgación contempla el tratamiento de enfermedades neurológicas asociadas con A $\beta$  patogénico, tal como EA y accidente cerebrovascular, utilizando los derivados de PUFA dados a conocer en el presente documento. La presente divulgación también contempla la prevención de enfermedades neurológicas asociadas con A $\beta$  patogénico utilizando los derivados de PUFA dados a conocer en el presente documento. Sin estar limitado a ningún mecanismo particular, la activación selectiva de PKC $\epsilon$  puede dar como resultado una activación incrementada de TACE, con una disminución concomitante en la producción de A $\beta$ . Sin embargo, esto parece ocurrir principalmente en células no neuronales, tales como fibroblastos. La activación de PKC $\epsilon$  también puede reducir la hiperfosforilación de la proteína tau patogénica en la EA. La activación de PKC $\epsilon$  también puede inducir sinaptogénesis o prevenir la apoptosis en la EA o después de un accidente cerebrovascular. La activación de PKC $\epsilon$  también puede proteger las neuronas de rata de la neurotoxicidad mediada por A $\beta$  a través de la inhibición de GSK-3 $\beta$ . Los activadores de PKC $\epsilon$  también pueden contrarrestar el efecto del A $\beta$  sobre la regulación por disminución de la PKC  $\alpha/\epsilon$ , y de ese modo invertir o prevenir los cambios inducidos por A $\beta$ . Otro posible mecanismo de acción es la activación de enzimas de degradación de A $\beta$ , tales como la enzima convertidora de endotelina. Los resultados de los experimentos presentados en los ejemplos sugieren que este puede ser el mecanismo de acción.

Otro mecanismo más puede ser mediante la estimulación de receptores muscarínicos M1 y M3 acoplados a PKC, que se ha notificado que aumenta el procesamiento de APP no amiloidogénico por TACE. Rossner y otros, *Prog. Neurobiol.* 1998; 56: 541–569. Los agonistas muscarínicos rescatan ratones con EA transgénicos 3x de déficits cognitivos y reducen las patologías de A $\beta$  y tau, en parte mediante la activación de la ruta no amiloidogénica de

TACE/ADAM17. Caccamo y otros, *Neuron*. 2006; 49:671–682. La señalización del receptor muscarínico está estrechamente relacionada con la PKC. El ARNm del receptor muscarínico está regulado por la PKC y la diferenciación neuronal producida por la activación del receptor muscarínico M1 está mediada por la PKC. Barnes y otros, *Life Sci*. 1997; 60:1015–1021; Vandemark y otros, *J Pharmacol. Exp. Ther.* 2009; 329(2): 532–42.

5 Otros trastornos contemplados para el tratamiento mediante los procedimientos de la presente descripción incluyen trastornos del estado de ánimo, tales como trastornos depresivos y trastorno bipolar, esquizofrenia, artritis reumatoide, cáncer, enfermedad cardiovascular, diabetes de tipo 2 y cualquier otro trastorno en el que se haya demostrado que los PUFA o MUFA son beneficiosos, incluidos, pero sin limitaciones a los mismos, los mencionados en segundo plano.

### Formulación y administración

15 Los derivados de PUFA se pueden producir en unidades de dosificación útiles para administración por cualquier vía que les permita cruzar la barrera hematoencefálica. Se ha demostrado que los PUFA del plasma pueden atravesar y llegar al cerebro. Rapoport y otros, *J Lipid Res.* 2001. 42: 678–685. Las vías de ejemplo incluyen las vías oral, parenteral, transmucosa, intranasal, inhalación o transdérmica. Las vías parenterales incluyen la administración intravenosa, intraarteriolar, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular, intratecal e intracraneal.

20 20 Los compuestos de la presente invención se pueden formular de acuerdo con métodos convencionales. Los compuestos derivados de PUFA se pueden dar a conocer a un sujeto en formulaciones estándar y pueden incluir cualquier aditivo farmacéuticamente aceptable, tal como excipientes, lubricantes, diluyentes, aromatizantes, colorantes, tampones y disgregantes. Las formulaciones estándar son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 20<sup>a</sup> edición, Mack Publishing Company, 2000.

30 30 En una realización, el compuesto se formula en una forma de dosificación oral sólida. Para la administración oral, por ejemplo, para PUFA, la composición farmacéutica puede tomar la forma de un comprimido o cápsula preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactasa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato cálcico); lubricantes (tales como estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de maíz o glicolato de almidón sódico); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato sódico). Los comprimidos pueden recubrirse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco para reconstituir con agua u otro vehículo adecuado antes de utilizar. Dichas preparaciones líquidas se pueden preparar mediante medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de suspensión (p. ej., jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas hidrogenadas comestibles); agentes emulsionantes (p. ej., lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sónico). Las preparaciones pueden también contener sales tampones, aromatizantes, colorantes y edulcorantes, según sea adecuado.

40 40 Como un ejemplo, el fármaco Omacor® contiene combinaciones concentradas de ésteres etílicos de un PUFA omega-3. Cada cápsula de 1 g contiene, como mínimo, 900 mg de ésteres etílicos de ácidos grasos omega-3, principalmente EPA (465 mg) y DHA (375 mg), de acuerdo con el prospecto del fármaco. Omacor® se administra hasta 4 veces al día en forma de cápsulas de gelatina blanda transparentes de 1 gramo llenas de aceite amarillo claro. Se puede utilizar una composición similar para administrar los compuestos de PUFA de la presente invención, aunque la presente invención contempla la utilización de una dosis inferior de los derivados de PUFA. También se han descrito formulaciones estables de cera-éster de PUFA mediante transesterificación de cantidades estequiométricas de ésteres etílicos enriquecidos con PUFA n-3 y alcoholes de cadena larga (18-22 átomos de carbono) mediante transesterificación de cantidades estequiométricas de ésteres etílicos enriquecidos con PUFA n-3 y alcoholes de cadena larga (18-22 átomos de carbono). Goretta y otros, *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 2002; 35(5):458–65.

55 55 En otra realización, el compuesto de PUFA se formula para administración parenteral. El compuesto se puede formular para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en monodosis en, por ejemplo, ampollas o envases con múltiples dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas, tales como suspensiones, soluciones, dispersiones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

60 60 Los derivados de PUFA de la presente invención se pueden administrar con un vehículo hidrófobo. Los vehículos hidrófobos incluyen complejos de inclusión, dispersiones (tales como micelas, microemulsiones y emulsiones) y liposomas. Ejemplos de vehículos hidrófobos son complejos de inclusión, micelas y liposomas. Estas formulaciones son conocidas en la técnica Remington: ciencia y práctica de la farmacia ("Remington's: The Science and Practice of Pharmacy" 20<sup>a</sup> ed., ed. Gennaro, Lippincott: Philadelphia, PA 2003). Los derivados de PUFA de la presente

invención se pueden incorporar en vehículos hidrófobos, por ejemplo, como mínimo, el 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90% del peso total del vehículo en peso. Además, se pueden incluir otros compuestos en el soporte hidrófobo o la solución, por ejemplo, para estabilizar la formulación.

5 Además de las formulaciones descritas anteriormente, el derivado de PUFA también pueden formularse como una preparación de liberación lenta. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, los compuestos se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo en forma de una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o en forma de derivados escasamente solubles, por ejemplo en forma de una sal escasamente soluble.

10 En otra realización, el derivado de PUFA puede administrarse en una vesícula, particularmente una micela, un liposoma o una partícula de LDL artificial, tal como se describe en la solicitud de Patente de Estados Unidos No. de serie 11/648,808 de Alkon y otros,

15 Las dosis para administración pueden prepararse adecuadamente para administrar de 1 mg a 10 g, preferentemente de 10 mg a 1 g, y, muy preferentemente, de 250 mg a 500 mg del compuesto al día. Cuando se preparan para administración tópica o formulaciones parenterales, se pueden preparar en fórmulas que contienen del 0,01% al 60% en peso de la formulación final, preferentemente del 0,1% al 30% en peso, y, muy preferentemente, del 1% al 20% en peso. La dosis diaria óptima se determinará mediante métodos conocidos en la técnica y se verá influenciada por factores tales como la edad del paciente y otros factores clínicamente relevantes.

### Terapia farmacológica combinada

25 El compuesto PUFA puede utilizarse para tratar pacientes con EA u otros trastornos neurológicos asociados con A $\beta$  en combinación con otros fármacos que también se utilizan para tratar el trastorno. Los ejemplos de agentes farmacológicos no limitantes aprobados en Estados Unidos para el tratamiento de la EA incluyen inhibidores de la colinesterasa, tales como Aricept® (donepezilo), Exelon® (rivastigmina), Reminyl® (galantamina) y antagonistas del receptor de NMDA, tal como Namenda® (memantina). Otros posibles agentes terapéuticos incluyen inhibidores de la 30 proteasa (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos No. 5.863.902; 5.872.101; inhibidores de la producción de A $\beta$ , tal como se describe en las Patentes de Estados Unidos No. 7.011.901; 6.495.540; 6.610.734; 6.632.812; 6.713.476; y 6.737.420; moduladores de la agregación de A $\beta$ , descritos en 6.303.567; 6.689.752; e inhibidores de BACE, tal como se da a conocer en las Patentes de Estados Unidos No. 6.982.264; 7.034.182; 7.030.239. Los fármacos de ejemplo utilizados para el tratamiento del accidente cerebrovascular incluyen aspirina, 35 medicamentos antiagregantes plaquetarios, tales como el activador del plasminógeno tisular u otros anticoagulantes.

40 La presente divulgación contempla la terapia de combinación con otros activadores de la PKC, incluyendo, pero sin limitaciones, lactonas macrocíclicas de benzolactama. La briostatina-1 es una lactona macrocíclica que se ha demostrado que modula la PKC y da como resultado un aumento en la escisión de la APP mediante TACE en la ruta 45 no amiloidogénica. La briostatina pudo aumentar la duración de la retención de memoria de la babosa marina *Hermissenda crassicornis* en más del 500%, y pudo aumentar drásticamente la velocidad de aprendizaje en ratas. Véase la solicitud de Patente de Estados Unidos 10/919.110; Kurzirian y otros, Biological Bulletin, 2006; 210(3): 201-14; Sun y Alkon, European Journal of Pharmacology, 2005;512(1): 43-51. Otros activadores de la PKC no limitantes se describen en la solicitud de Patente de Estados Unidos con número de serie 12/068.742 de Alkon y otros,

50 Las combinaciones con fármacos que aumentan indirectamente la TACE, tal como mediante la inhibición de los inhibidores de TACE endógenos o el aumento de los activadores de TACE endógenos. Un enfoque alternativo para activar la PKC directamente es aumentar los niveles del activador endógeno, el diacilglicerol. Los inhibidores de la diacilglicerol quinasa, tales como 6-(2-(4-[(4-fluorofenil)fenilmetileno]-1-piperidinil)etil)-7-metil-5H-tiazolo[3,2-a]pirimidin-5-ona (R59022) y [3-[2-[4-(bis-(4-fluorofenil)metileno]piperidin-1-il)etil]-2,3-dihidro-2-tioxo-4-(1H)-quinazolinona (R59949) aumentar los niveles del ligando endógeno diacilglicerol, produciendo de este modo la activación de la PKC. Meinhardt y otros, (2002) Anti-Cancer Drugs 13: 725.

55 Adicionalmente se da a conocer la terapia de combinación con inhibidores de BACE. Los inhibidores de BACE se conocen e incluyen CTS-21166, propiedad de CoMentis Inc., que ha mostrado resultados positivos en un ensayo clínico en humanos. Otros inhibidores de BACE se describen en la solicitud de PCT internacional publicada WO2007/019080 y en Baxter y otros, Med. Chem. 2007;50(18): 4261-4264.

60 Los compuestos utilizados en la terapia de combinación pueden administrarse en la misma formulación que el compuesto de PUFA de la presente invención, cuando sea compatible, o se pueden administrar en formulaciones separadas.

### Evaluación del tratamiento

65 La evaluación del tratamiento con los derivados de PUFA de la presente invención puede realizarse mediante la

evaluación de la mejora de los síntomas o los marcadores clínicos indirectos de la enfermedad. Por ejemplo, la mejora en la memoria o las habilidades cognitivas en un sujeto con EA tratado puede sugerir que hay una reducción de la acumulación de A $\beta$  patogénico. Los ejemplos de fenotipos cognitivos incluyen, pero no se limitan a los mismos, amnesia, afasia, apraxia y agnosia. Los ejemplos de síntomas psiquiátricos incluyen, pero no se limitan a los mismos, cambios de personalidad, depresión, alucinaciones y delirios. Como un ejemplo no limitante, el Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, ("Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders") 4<sup>a</sup> edición (DSM-IV-TR) (publicado por la Asociación Americana de Psiquiatría) contiene criterios para la demencia del tipo Alzheimer.

- 5 Las manifestaciones fenotípicas de la EA también pueden ser físicas, tal como mediante la detección directa (por imagen) o indirecta (bioquímica) de las placas de A $\beta$ . La obtención de imágenes in vivo de A $\beta$  puede realizarse utilizando derivados de flavona radioyodados como agentes de formación de imágenes (Ono y otros, *J Med Chem.* 2005;48(23):7253-60) y con colorantes de unión al amiloide, tales como putrescina conjugada a un péptido A radioyodado de 40 residuos (que produce 1251-PUT-A 1-40), que se demostró que cruzaba la barrera hematoencefálica y se unía a las placas de A $\beta$ . Wengenack y otros, *Nature Biotechnology*, 2000;18(8): 868-72. Las imágenes de A $\beta$  también se mostraron utilizando estilbeno [11C]SB-13 y el benzotiazol [11C]6-OH-BTA-1 (también conocido como [11C]PIB). Verhoeff y otros, *Am J Geriatr Psychiatry*. 2004; 12:584-595.
- 10 La cuantificación de A $\beta$  (1-40) en la sangre periférica se ha demostrado utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada con espectrometría de masas en tandem en una trampa de iones lineales. Du y otros, *J Biomol Tech.* 2005;16(4):356-63. También se ha descrito la detección de agregados de proteína A $\beta$  individuales en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con Alzheimer mediante espectroscopia de correlación de fluorescencia. Pitschke y otros, *Nature Medicin*, 1998; 4: 832-834. La Patente de Estados Unidos 5.593.846 da a conocer un procedimiento para detectar A $\beta$  soluble. También se ha descrito la detección indirecta del péptido A $\beta$  y el receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE) utilizando anticuerpos. Por último, la detección bioquímica del aumento de la actividad de BACE-1 en el líquido cefalorraquídeo utilizando sustratos cromogénicos también se ha postulado como un indicador de diagnóstico o pronóstico de EA. Verheijen y otros, *Clin Chem.* 2006; 52:1168-1174.
- 15 20 25 30 35
- Las medidas actuales para la evaluación de la EA incluyen la observación de un núcleo clínico de pérdida de memoria episódica temprana, progresiva y significativa más uno o más biomarcadores anormales (indicadores biológicos) característicos de la EA, incluyendo atrofia (degeneración) del lóbulo temporal, tal como se muestra en la RMI; concentraciones anormales de proteína A $\beta$  en el líquido cefalorraquídeo; un patrón específico que muestra un metabolismo reducido de la glucosa en las exploraciones PET del cerebro; y una mutación genética asociada con dentro de la familia inmediata.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1: Síntesis de ésteres metílicos de ácidos grasos y ésteres metílicos de ácidos grasos ciclopropanados.

- 40 Síntesis de ácidos grasos ciclopropanados. Los ésteres metílicos de ácidos grasos poliinsaturados se ciclopropanaron utilizando la reacción modificada de Simmons-Smith utilizando cloroyodometano y dietilcinc (Tanaka y otros, *Bioorg. Med. Chem. Let.* 2003; 13: 1037-40; Furukawa y otros, *Tetrahedron*. 1967; 53-58; Denmark y otros, *J Org. Chem.* 1991; 56:6974-81). Todos los aparatos se cocieron a 60°C durante 1 hora y se secaron utilizando una llama con nitrógeno seco. Un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 100 ml con una barra de agitación y una sonda de temperatura se rodeó con una mezcla de hielo y hielo seco y se cargó con 1,25 g (4,24 mmol) de éster metílico de ácido linoleico o éster metílico de ácido docosahexaenoico en 25 ml de diclorometano y se introdujeron burbujas de N<sub>2</sub>. Se añadió anaeróbicamente una solución 1M de dietilcinc (51 ml, 54,94 mmol) en hexano utilizando una aguja de calibre 20 de 24 pulgadas de largo y la solución se enfrió a -5°C. Se añadió diyodometano (8,2 ml, 101,88 mmol) o cloroyodometano (CICH<sub>2</sub> I) gota a gota, una gota por segundo, con agitación constante. Se redujo la velocidad de adición en caso necesario para mantener la mezcla de reacción por debajo de 2°C. La mezcla de reacción se volvió turbia durante la reacción y se liberó un producto de cinc de color blanco insoluble. El matraz se selló y la mezcla se dejó reaccionar durante 1 hora y, después, se dejó que alcanzara la temperatura ambiente gradualmente durante 2 horas.
- 45 50 55 60
- Para evitar la formación de un residuo explosivo en la campana, el dietilcinc no se evaporó. La mezcla se vertió lentamente en 100 ml de agua en agitación para descomponer cualquier exceso de dietilcinc. Se desprendió etano. La mezcla se centrifugó a 5.000 rpm en tubos de centrífuga de vidrio y se desecharó la capa acuosa superior. El precipitado blanco se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se combinó con la fase orgánica. La fase orgánica se lavó con agua y se centrifugó. El producto se analizó mediante TLC en gel de sílice G utilizando hexano más el 1% de acetato de etilo y se purificó por cromatografía sobre gel de sílice utilizando concentraciones crecientes del 1-10% de acetato de etilo en n-hexano y se evaporó en nitrógeno, dejando el éster metílico como un aceite incoloro.
- 65 La reacción de Simmons-Smith conserva la estereoquímica de los materiales de partida. Furukawa y otros, *Tetrahedron*. 1967; 53-58. El éster metílico de ácido docosahexaenoico se convirtió en DHA-CP6 con un rendimiento del 90-95%. El producto fue un aceite incoloro con un máximo de absorbancia único a 202 nm en etanol

5 y sin reacción con  $I_2$ . El espectro IR mostró la absorción del anillo de ciclopropano a 3.070 y 1.450  $cm^{-1}$ . En las mismas condiciones, el éster metílico de ácido eicosapentaenoico se convirtió en EPA-CP5 y el éster metílico de ácido araquidónico se convirtió en AA-CP4. El éster metílico de ácido linoleico se convirtió en éster metílico de DCP-LA, que era idéntico a una muestra conocida.

10 **Hidrólisis de éster metílico.** El éster metílico (0,15 g) se disolvió en 1 ml de LiOH 1N y 1 ml de dioxano. Se añadieron dioxano y metanol hasta que se volvió homogéneo y la solución se agitó a 60°C durante la noche. El producto fue extraído en  $CH_2Cl_2$  y se centrifugó. La capa acuosa y la interfaz blanca se volvieron a extraer con agua y se lavaron hasta que ya no se formó la capa blanca. El producto se evaporó en  $N_2$  y se purificó por cromatografía sobre gel de sílice. El producto, un aceite incoloro, se eluyó en EtOAc al 20% en n-hexano. Se verificó su pureza mediante TLC en EtOAc al 10%/hexano y mediante C18 RP-HPLC utilizando detección de UV a 205 nm.

15 Los grupos epóxido se pueden introducir por medios convencionales, por ejemplo, por oxidación del alqueno apropiado con ácido m-cloroperbenzoico o hidroperóxido de t-butilo.

20 Otros compuestos sintetizados incluyen los representados en la figura 1 (**BR-101** a **BR-118**).

#### **Ejemplo 2: Activación de la PKC Épsilon purificada utilizando ácido docosahexanoico**

25 **Ensayo de proteína quinasa C.** Se mezcló PKC recombinante (1 ng de la isoforma alfa o épsilon) con el **BR-101** (DCP-LA) en presencia de histonas 10 micromolar,  $CaCl_2$  5 mM, 1,2  $\mu$ g/ $\mu$ l de fosfatidil-L-serina, 0,18  $\mu$ g/ $\mu$ l de 1,2-dioctanoil-sn-glicerol (DAG),  $MgCl_2$  10 mM, HEPES 20 mM (pH 7,4), EDTA 0,8 mM, EGTA 4 mM, glicerol al 4%, 8  $\mu$ g/ml de aprotinina, 8  $\mu$ g/ml de leupeptina y se añadió benzamidina 2 mM, [ $^{32}P$ ]ATP 0,5 micro Ci. La mezcla de incubación se incubó durante 15 minutos a 37 grados en un volumen total de 10 microlitros. La reacción se detuvo pasando las mezclas de reacción en tiras de 1x2 cm de papel de fosfato de celulosa (Whatman P81) e inmediatamente lavando dos veces durante 1 hora en  $H_3PO_4$  al 0,5%. Las tiras de fosfato de celulosa se contaron en un contador de centelleo. En algunos experimentos, se retiraron fosfatidilserina, diacilglicerol y/o calcio.

30 El éster metílico de DHA se adquirió de Cayman Chemical (Ann Arbor, ME). Las isoenzimas de PKC eran de Calbiochem (San Diego, CA). La PKC $\epsilon$  purificada se adquirió en Calbiochem.

#### **Resultados**

35 Las mediciones de PKC utilizando PKC $\epsilon$  purificada mostraron que, a la concentración más baja probada (10 nM), el compuesto **BR-101** produjo una activación de las PKC por 2,75 veces (figura 2). La PKC $\alpha$  no se vio afectada (datos no mostrados). El compuesto **BR-102** también indujo selectivamente la activación de PKC $\epsilon$  a aproximadamente 1,75 veces sobre la PKC $\epsilon$  inactivada. La eficacia de estos compuestos en la activación de PKC $\epsilon$  a concentraciones bajas sugiere que serán buenos candidatos terapéuticos.

#### **Ejemplo 3: Activación de PKC epsilon purificada o celular utilizando otros activadores de PKC**

40 **Materiales.** Los medios de cultivo se obtuvieron de K-D Medical (Columbia, MD) o Invitrogen (Carlsbad, CA). A $\beta$ 1-42 se adquirió en Anaspec (San Jose, CA). Los ésteres metílicos de ácidos grasos poliinsaturados se obtuvieron de Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI. Otros productos químicos se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). Las isoenzimas de PKC eran de Calbiochem (San Diego, CA). La PKC $\epsilon$  purificada se adquirió en Calbiochem.

45 **Cultivo celular.** Se sembraron en placas células H19-7/IGF-IR de hipocampo de rata (ATCC, Manassas, VA) sobre placas revestidas con poli-L-lisina y se cultivaron a 35°C en DMEM/FCS al 10% durante varios días hasta que se obtuvo una cobertura de aproximadamente el 50%. A continuación, se indujo la diferenciación de las células en un fenotipo neuronal reemplazando el medio con 5 ml de medio  $N_2$  que contenía 10 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico a 39°C y se cultivaron en matraces T-75 a 37°C. Se cultivaron células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC) en F12K al 45%/MEM al 45% /FCS al 10%. Se cultivaron células de neuroblastoma de ratón N2A en DMEM/FCS al 10% sin glutamina.

50 Se sembraron en placas neuronas del hipocampo de rata de cerebros embrionarios de ratas Sprague Dawley de 18 días de edad en placas de 12 o 96 pocillos revestidas con poli-D-lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en medio neurobasal B-27 que contenía glutamina 0,5 mM y glutamato 25  $\mu$ M (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se cultivaron durante tres días en el medio sin glutamato. Las células neuronales se cultivaron con  $CO_2$  al 5% en una incubadora mantenida a 37°C durante 14 días.

55 Todos los experimentos en células cultivadas se llevaron a cabo por triplicado a menos que se indique lo contrario. Todos los puntos de datos se muestran como media  $\pm$  SE. **BR-101** (DCP-LA) se utilizó como su ácido libre en todos los experimentos, mientras que **BR-111** (DHA-CP6), **BR-114** (EPA-CP5), y **BR-116** (AA-CP4) se utilizaron como sus ésteres metílicos.

5 Ensayo de proteína quinasa C. Se cultivaron células de hipocampo de rata y se rasparon en 0,2 ml de tampón de homogeneización (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaF 50 mM, leupeptina 1 µg/ml y PMSF 0,1 mM) y se homogeneizaron mediante ultrasonidos en un sonificador de microondas de Marsonix (5 sec, 10W). Para medir la PKC, se incubaron 10 µl de homogeneizado celular o isozima de PKC purificada (adquirida de Calbiochem) durante 15 minutos a 37°C en presencia de histonas 10 µM, CaCl<sub>2</sub> 4,89 mM, 1,2 µg/µl de fosfatidil-L-serina, 0,18 µg/µl de 1,2-dioctanoil-sn-glicerol, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, HEPES 20 mM (pH 7,4), EDTA 0,8 mM, EGTA 4 mM, glicerol al 4%, 8 µg/ml de aprotinina, 8 µg/ml de leupeptina y benzamidina 2 mM. Se añadió [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP 0,5 µCi y la formación de <sup>32</sup>P-fosfoproteína se midió por adsorción sobre fosfocelulosa, tal como se ha descrito previamente. Nelson y Alkon, J Neurochemistry. 1995; 65: 2350–57. Para las mediciones de activación por **BR-101** (DCP-LA) y compuestos similares, la actividad de PKC se midió en ausencia de diacilglicerol y fosfatidilserina, tal como describen Kanno y otros, y las midieron PKC  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  y  $\mu$  se midieron en ausencia de EGTA y CaCl<sub>2</sub> añadidos, tal como describen Kanno y otros, J Lipid Res. 2006; 47: 1146–50. Se utilizan concentraciones bajas de Ca<sup>2+</sup> porque niveles altos de Ca<sup>2+</sup> interaccionan con el sitio de unión de la fosfatidilserina a PKC e impide la activación. Para las mediciones de la activación de la briostatina, se omitió el 1,2-diacilglicerol, a menos que se indique lo contrario.

## 15 Resultados y discusión

20 Para determinar su especificidad de isozima PKC, los nuevos compuestos se preincubaron con PKC purificada durante cinco minutos y la actividad de PKC se midió radiométricamente. Tal como se muestra para el ejemplo 2, anteriormente, **BR-101** (DCP-LA) fue un activador eficaz de PKC $\epsilon$  a 10 µM, pero tuvo efectos relativamente pequeños sobre las otras isoformas de la PKC (datos no mostrados). A concentraciones más altas, **BR-101** (DCP-LA) inhibió parcialmente la PKC $\delta$  (aproximadamente 1-100 µM) y activo PKC $\gamma$  (50-100 µM) (datos no mostrados).

25 **BR-111** (DHA-CP6), **BR-114** (EPA-CP5) y **BR-115** (AA-CP4), que son derivados ciclopropanados de ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico y ácido araquidónico, respectivamente, activaron la PKC $\epsilon$  purificada en un grado similar (figura 3). La concentración necesaria para activar la PKC fue aproximadamente 100 veces menor que para **BR-101** (DCPLA), lo que sugiere una mayor afinidad. Los alcoholes linolénílico y linoleílico ciclopropanados (**BR-104** y **BR-105**), ácido epoxiesteárico (**BR-116**) y éster metílico de ácido vernólico (**BR-117**) tuvieron poco o ningón efecto sobre la PKC (figura 4). El éster metílico del ácido vernólico ciclopropanado (**BR-109**) inhibió la PKC $\epsilon$  a concentraciones superiores a 1 µM (figura 4).

30 Los activadores de la PKC que se unen al sitio de unión a diacilglicerol, incluidos briostatina, gnidimacrina y los ésteres de forbol, producen una activación transitoria de la actividad de PKC, seguida de una regulación por disminución prolongada. Nelson y otros, Trends in Biochem. Sci. 2009; 34: 136–45. Esto se confirmó en células cultivadas de hipocampo de rata. La incubación de células H19-7/IGF-IR de rata con briostatina (0,04 nM y 0,2 nM) produjo una activación multiplicada por 2 que duró 30 minutos, seguido de una regulación por disminución del 20% que retornó al valor basal en 24 horas (datos no mostrados). Por el contrario, la PKC expuesta a DCP-LA permaneció elevada durante, como mínimo, cuatro horas (figura 5). Esta activación sostenida solo se observó en las neuronas primarias.

35 Aunque la briostatina tiene una mayor afinidad por la PKC que el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (CE<sub>50</sub> = 1,35 nM frente a 10 nM), la briostatina fue mucho menos eficaz que los PMA a la regulación por disminución de la PKC. La actividad PKC está fuertemente regulada por disminución por el éster de forbol a las 8 horas, mientras que la PKC en células tratadas con briostatina está en o cerca del valor basal (datos no mostrados). Esta diferencia puede explicar los aumentos de A $\beta$  producidos por PdBu notificados por Cruz e Silva y otros. J Neurochem. 2009; 108: 319–30. Estos investigadores aplicaron PdBu 1 µM a células COS cultivadas durante 8 horas y observaron un aumento en A $\beta$ . Este aumento se atribuyó a la regulación por disminución de la PKC por el éster de forbol, que es consistente con estos resultados. La regulación por disminución no se pudo medir para DCP-LA y compuestos relacionados.

## 40 **Ejemplo 4: Efectos de los activadores de PKC en la producción y degradación de A $\beta$**

45 Cultivo celular. El cultivo celular se realizó, tal como se ha descrito anteriormente para el ejemplo 3.

50 Ensayo de medición de A $\beta$  y viabilidad celular. Se midió el A $\beta$  utilizando un kit ELISA fluorimétrico humano de A $\beta$  1-42 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados se midieron en un lector de microplacas Biotek Synergy HT. AlamarBlue y CyQuant NF (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

## 60 Resultados y discusión

65 Para medir los efectos de la activación de PKC $\epsilon$  en la producción de A $\beta$ , se utilizaron células de neuroblastoma neuro2a (N2a) de ratón transfectadas con APPSwe/PS1D humanas, que producen grandes cantidades de A $\beta$ . Petanceska y otros, J Neurochem. 1996; 74: 1878–84. La incubación de estas células durante 24 horas con diversas concentraciones de activadores de PKC, la briostatina, **BR-101** (DCPLA) y **BR-111** (DHA-CP6) redujo notablemente

los niveles de A $\beta$  tanto intracelular (figura 7a) como secretado (figura 7b). Con la briostatina, que activa la PKC al unirse al sitio de unión a diacilglicerol, la inhibición fue bifásica, con concentraciones de 20 nM o superiores que no producían ningún efecto neto. Esto se puede explicar por la capacidad de esta clase de activadores de PKC para regular por disminución la PKC cuando se utilizó a altas concentraciones. Por el contrario, **BR-101** (DCP-LA) y **BR-111** (DHA-CP6), que se unen al sitio de la fosfatidilsersina de la PKC, mostraron una inhibición monótonamente creciente a concentraciones de hasta 10 a 100  $\mu$ M, sin evidencia de regulación por disminución a concentraciones más altas.

Para determinar si los niveles reducidos de A $\beta$  causados por los activadores de PKC se debían a la inhibición de la síntesis de A $\beta$  o a la activación de la degradación de A $\beta$ , se aplicó **BR-111** (DHACP6) (0,01 a 10  $\mu$ M) y concentraciones bajas (100 nM) de A $\beta$ -42 monomérico exógeno a células SH-SY5Y cultivadas. Esta concentración de A $\beta$  es demasiado baja para producir toxicidad medible o muerte celular. Dado que las células SH-SY5Y producen solo cantidades mínimas de A $\beta$ , este experimento fue una prueba eficaz de la capacidad de los activadores de PKC para mejorar la degradación de A $\beta$ . A las 24 horas, la mayoría del A $\beta$  había sido captado por las células y la concentración de A $\beta$  en el medio de cultivo era indetectable. La adición de 0,01 a 10  $\mu$ M de DHA-CP6 a las células redujo los niveles celulares de A $\beta$  en un 45-63%, lo que indica que el activador de PKC $\epsilon$  aumentó la velocidad de degradación del A $\beta$  exógeno (figura 8).

DHA-CP6, briostatina y DCP-LA no tuvieron ningún efecto sobre la supervivencia celular o sobre la proliferación medida por tinción con Azul de Alamar y CyQuant (figuras 11a y b), indicando que la reducción en la producción de A $\beta$  no era consecuencia de la proliferación celular o cambio en la supervivencia celular.

#### **Ejemplo 5: Efectos de los activadores de PKC en la actividad de TACE**

**Ensayo TACE.** La TACE se midió incubando 5  $\mu$ l de homogeneizado celular, 3  $\mu$ l de tampón (Tris-HCl 50 mM 7,4 más NaCl 25 mM más glicerol al 4%) y 1  $\mu$ l de sustrato IV de TACE 100  $\mu$ M (A $\beta$ z-LAQAVRSSR-DPa) (Calbiochem) durante 20 minutos a 37°C en tubos de centrífuga de polipropileno de 1,5 ml (Jin y otros, Anal. Biochem. 2002; 302: 269-75). La reacción se detuvo por enfriamiento a 4°C. Las muestras se diluyeron a 1 ml y la fluorescencia se midió rápidamente (ex = 320 nm, em = 420 nm) en un espectrofluorómetro Spex Fluorolog 2.

#### **Resultados y discusión**

Investigadores previos han notificado que los activadores de la PKC, tales como forbol 12-miristato 13-acetato, producen grandes aumentos en la actividad de TACE que se correlacionan con un aumento de sAPP $\alpha$  y una disminución de A $\beta$ , lo que sugiere que TACE y BACE1 compiten por la disponibilidad de sustrato de APP y que los activadores PKC cambian la competencia en favor de TACE. Buxbaum y otros, J. Biol. Chem. 1998; 273: 27765-67; Etcheberrigaray y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006; 103:8215-20. Sin embargo, muchos de estos estudios anteriores se llevaron a cabo en fibroblastos y otros tipos de células no neuronales, que parecen responder de manera diferente a los activadores de PKC que a las neuronas. Por ejemplo, Etcheberrigaray y otros descubrieron que la activación de PKC en fibroblastos humanos por briostatina de 10 pM a 100 pM multiplicó la tasa inicial de actividad de  $\alpha$ -secretasa por 16 y por 132, respectivamente (Etcheberrigaray y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006). Sin embargo, en células de neuroblastoma SH-SY5Y humanas, células de neuroblastoma de ratón N2a (figura 9a) y neuronas primarias de hipocampo de rata (figuras 9b, c), los activadores de la PKC, briostatina, **BR-101** (DCP-LA) y/o **BR-111** (DHA-CP6) solo produjeron pequeños incrementos en la actividad de TACE. Esto sugiere que cualquier reducción de los niveles de A $\beta$  en las neuronas por los activadores de PKC debe ser causada por algún otro mecanismo además de la activación de TACE.

#### **Ejemplo 6: Efectos de los activadores de PKC en la actividad enzimática convertidora de endotelina**

**Ensayo ECE.** Las células de neuroblastoma SH-S757 se incubaron con briostatina (0,27 nM), **BR-101** (DCP-LA) (1  $\mu$ M), y **BR-111** (DHA-CP6) (1  $\mu$ M). La enzima convertidora de endotelina (ECE) se midió fluorimétricamente utilizando el método de Johnson y Ahn, Anal. Biochem. 2000; 286: 112-118. Una muestra de homogeneizado celular (20  $\mu$ l) se incubó en MES-KOH 50 mM, pH 6,0, C12E10 al 0,01% (éter de polioxietileno-10-laurilo) y McaBK2 15  $\mu$ M (7-metoxicoumarin-4-acetilo [sal de trifluoroacetato de Ala7-(2, 4-dinitrofenil)Lys9] bradiquinina) (Sigma-Aldrich). Despues de 60 minutos a 37°C, la reacción se detuvo añadiendo ácido trifluoroacético al 0,5%. La muestra se diluyó a 1,4 ml con agua y la fluorescencia se midió a ex = 334 nm, em = 398 nm.

#### **Resultados y discusión**

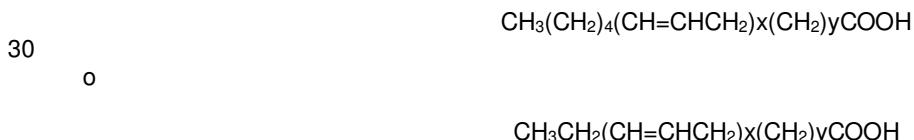
A $\beta$  puede degradarse *en vivo* mediante varias enzimas, incluida la enzima de degradación de insulina (insulisina), neprilisina y ECE. Debido a que la sobreexpresión de PKC $\epsilon$  se ha notificado que activa la ECE (Choi y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006; 103: 8215-20), los presentes inventores examinaron el efecto de los activadores de PKC en ECE. La briostatina, **BR-101** (DCP-LA) y **BR-111** (DHA-CP6) produjeron un aumento sostenido de la actividad de ECE (figura 10). Dado que ECE no posee un dominio C1 de unión a diacilglicerol, esto sugiere que la activación por briostatina no se debió a la activación directa de ECE, sino que debe ser el resultado de la fosforilación de ECE o de algún intermedio activador de ECE por PKC. Este resultado también sugiere que la

activación indirecta de ECE por activadores de PKC podría ser un medio útil para reducir los niveles de A $\beta$  en pacientes.

- 5 Una ventaja de compuestos tales como los derivados de PUFA de la presente invención que activan específicamente PKC $\epsilon$  es que producen menos regulación por disminución que los ésteres de forbol y análogos de 1,2-diacilglicerol (DAG) similares. La respuesta bifásica de los activadores basados en PKC a DAG significa que un activador de PKC puede reducir los niveles de A $\beta$  en un punto de tiempo y aumentarlos en otro. Da Cruz e Silva y otros, *J Neurochem.* 2009; 108: 319–330. Se requerirá una dosificación y un control cuidadosos de los pacientes para evitar efectos opuestos a los previstos. Debido a la relativa incapacidad de esta nueva clase de activadores de PKC para regular por disminución la PKC, este problema puede evitarse.
- 10

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto que es un éster de ácido graso cis-poliinsaturado para su utilización en la reducción de la neurodegeneración, **caracterizado por que**, como mínimo, uno de los dobles enlaces en el compuesto se reemplaza por un anillo/grupo de ciclopropano, y se da a conocer en una cantidad eficaz.
- 5 2. Compuesto, para su utilización según la reivindicación 1, en el que la concentración del compuesto está entre 5 nanomolar y 10 micromolar.
- 10 3. Compuesto, para su utilización según reivindicación 1, en el que el compuesto activa la isoforma épsilon de proteína quinasa C, como mínimo, 2 veces sobre la isoforma alfa de proteína quinasa C o en comparación con la actividad de una isoforma épsilon de proteína quinasa C que no ha estado en contacto con el compuesto.
- 15 4. Compuesto, para su utilización según la reivindicación 1, en el que todos los enlaces dobles están reemplazados por un anillo/grupo de ciclopropano.
- 20 5. Compuesto, para su utilización según la reivindicación 1, en el que el ácido graso cis-poliinsaturado del que se deriva el éster de ácido graso ciclopropanado se elige de ácido araquidónico, ácido docosapentaenoico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico, ácido linoleico, ácido v-linoleico, ácido  $\alpha$ -linolénico, ácido eicosatetraenoico o ácido adrénico.
- 25 6. Compuesto, para su utilización según la reivindicación 1, en el que el compuesto es éster metílico de ácido docosahexaenoico ciclopropanado (BR-111), éster metílico de ácido eicosapentaenoico (BR-114) o éster metílico de ácido araquidónico ciclopropanado (BR-115).
7. Compuesto, para su utilización según la reivindicación 1, en el que el ácido graso cis-poliinsaturado del que se deriva el éster de ácido graso ciclopropanado tiene una estructura de



35 en la que X está entre 2 y 6, e Y está entre 2 y 6.

8. Composición que comprende:

40 un compuesto elegido DE éster metílico de ácido docosahexaenoico ciclopropanado (BR-111), éster metílico de ácido eicosapentaenoico (BR-114), o combinaciones de los mismos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 9. Composición para su utilización en la reducción de la neurodegeneración, **caracterizado por que** la composición comprende:

50 un compuesto elegido DE éster metílico de ácido docosahexaenoico ciclopropanado (BR-111), éster metílico de ácido eicosapentaenoico (BR-114), éster metílico de ácido araquidónico ciclopropanado (BR-115) o combinaciones de los mismos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 10. Compuesto que es un éster de ácido graso cis-poliinsaturado para su utilización en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo o trastorno del estado de ánimo, **caracterizado por que**, como mínimo, uno de los dobles enlaces en el compuesto se reemplaza por un anillo/grupo de ciclopropano.

55 11. Compuesto, para su utilización según la reivindicación 10, en el que el trastorno se elige de enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular y depresión.

60 12. Compuesto, para utilización según cualquiera de las reivindicaciones 10-11, en el que el compuesto es éster metílico de ácido docosahexaenoico ciclopropano (BR-111), éster metílico de ácido eicosapentaenoico ciclopropano (BR-114), o éster metílico de ácido araquidónico ciclopropano (BR-115).

65 13. Compuesto, para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en el que la concentración del compuesto está entre 5 nanomolar y 10 micromolar.

65 14. Compuesto, para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en el que el compuesto activa la isoforma épsilon de proteína quinasa C, como mínimo, 2 veces sobre la isoforma alfa de proteína quinasa C o en

comparación con la actividad de una isoforma épsilon de proteína quinasa C que no ha estado en contacto con el compuesto.

5 15. Compuesto, para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 10-11, en el que todos los enlaces dobles están reemplazados por un anillo/grupo de ciclopropano.

10 16. Compuesto, para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 10-11, en el que el ácido graso cis-polinsaturado del que se deriva el éster de ácido graso ciclopropanado se elige de ácido araquidónico, ácido docosapentaenoico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico, ácido linoleico, ácido v-linoleico, ácido  $\alpha$ -linolénico, ácido eicosatetraenoico o ácido adrénico.

15 17. Compuesto, para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 10-11, en el que el ácido graso cis-polinsaturado del que se deriva el éster de ácido graso ciclopropanado tiene una estructura de



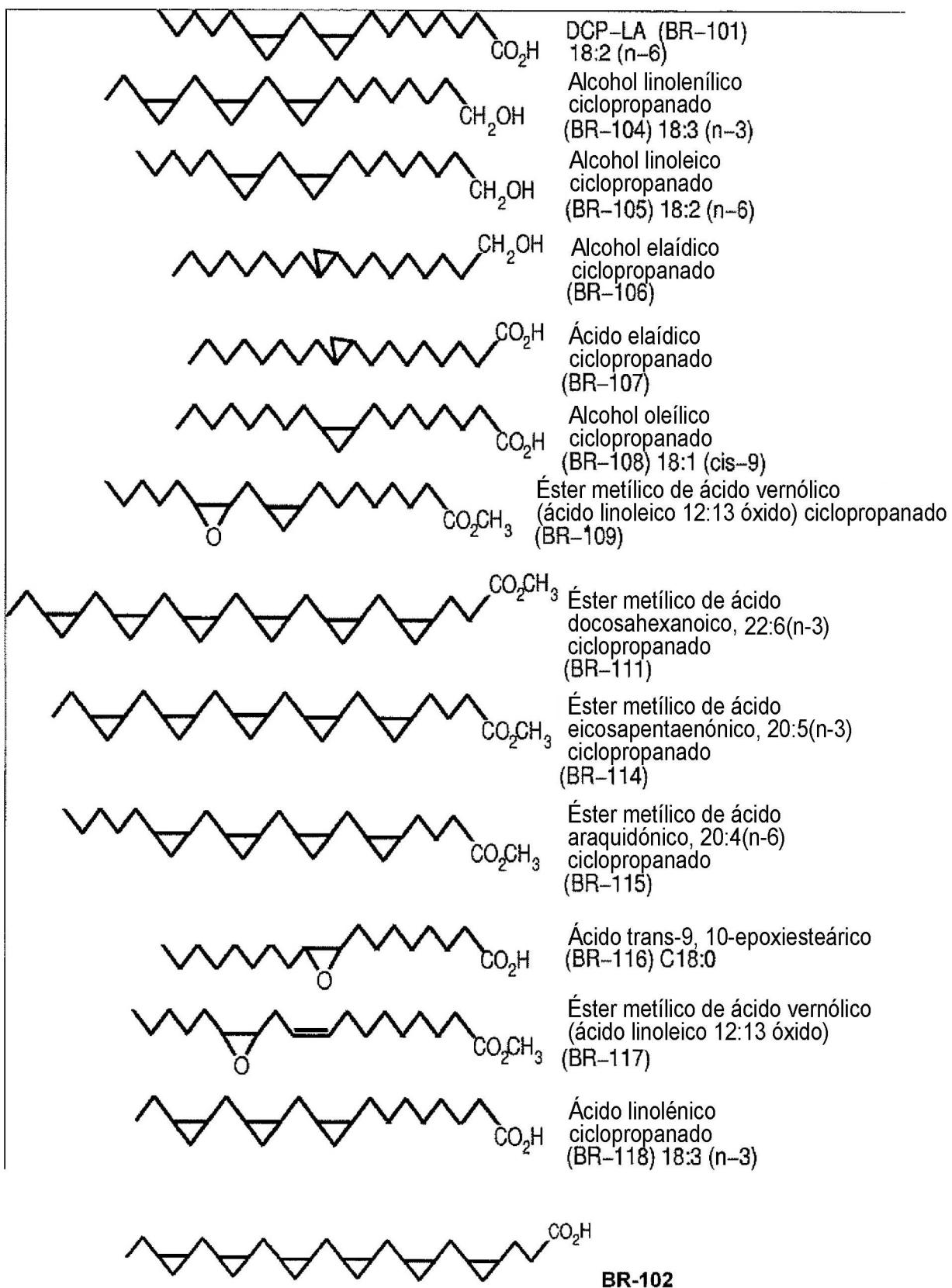
o

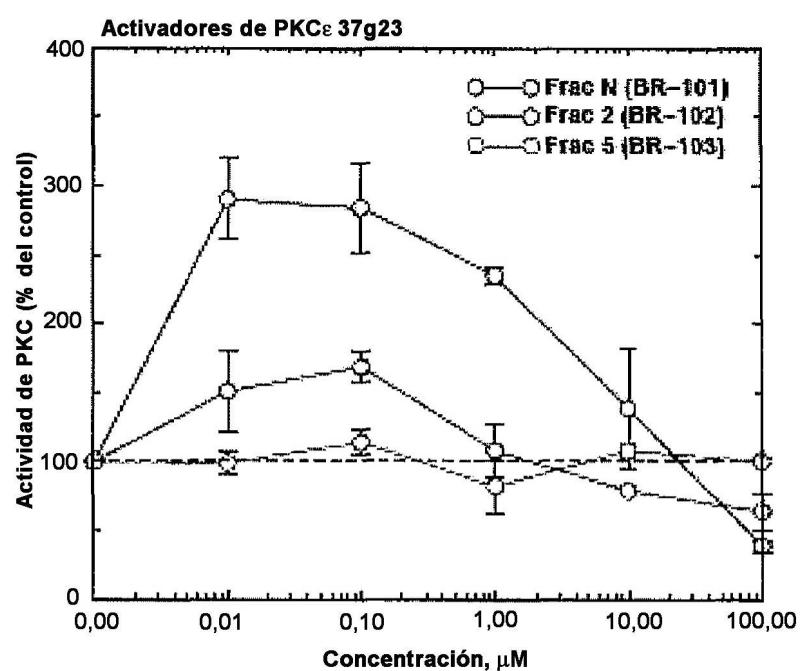


en la que X está entre 2 y 6, e Y está entre 2 y 6.

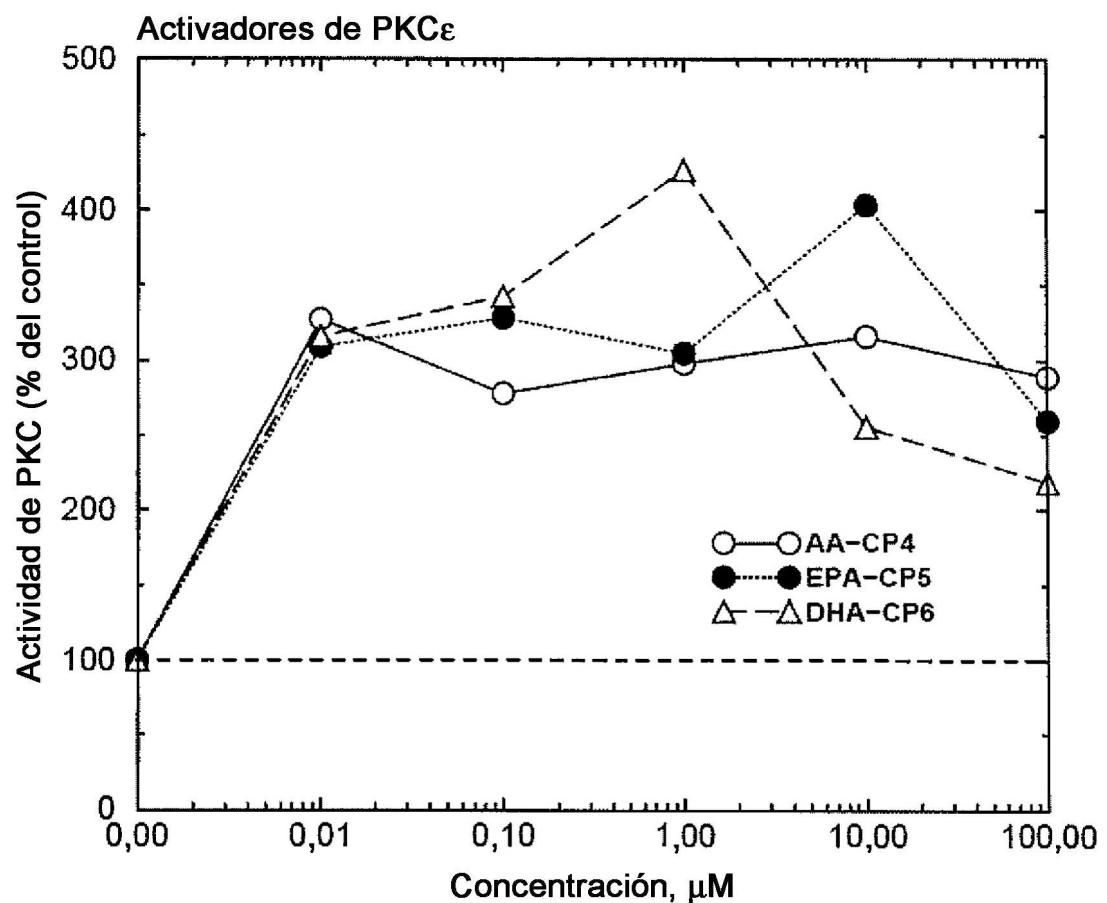
25 18. Compuesto seleccionado de éster metílico de ácido docosahexaenoico ciclopropanado (BR-111), éster metílico de ácido eicosapentaenoico (BR-114), o combinaciones de los mismos.

Figura 1





**Figura 2**

**Figura 3**

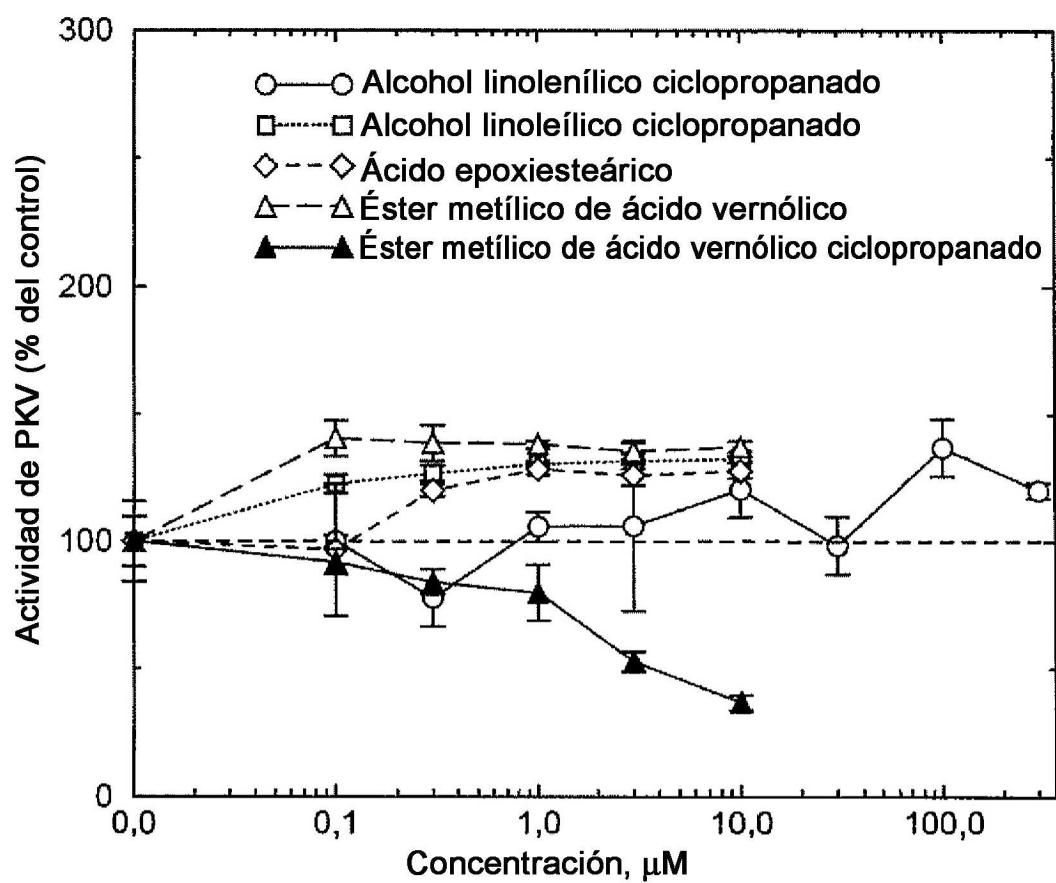
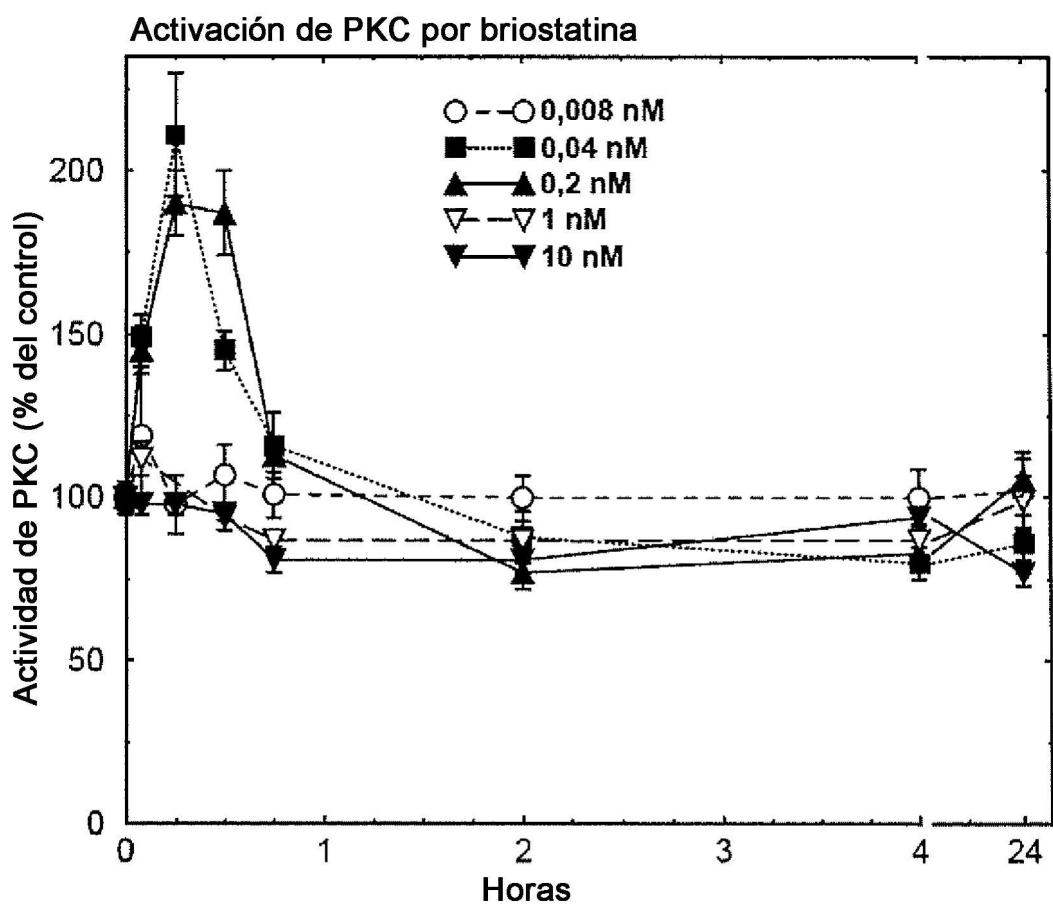
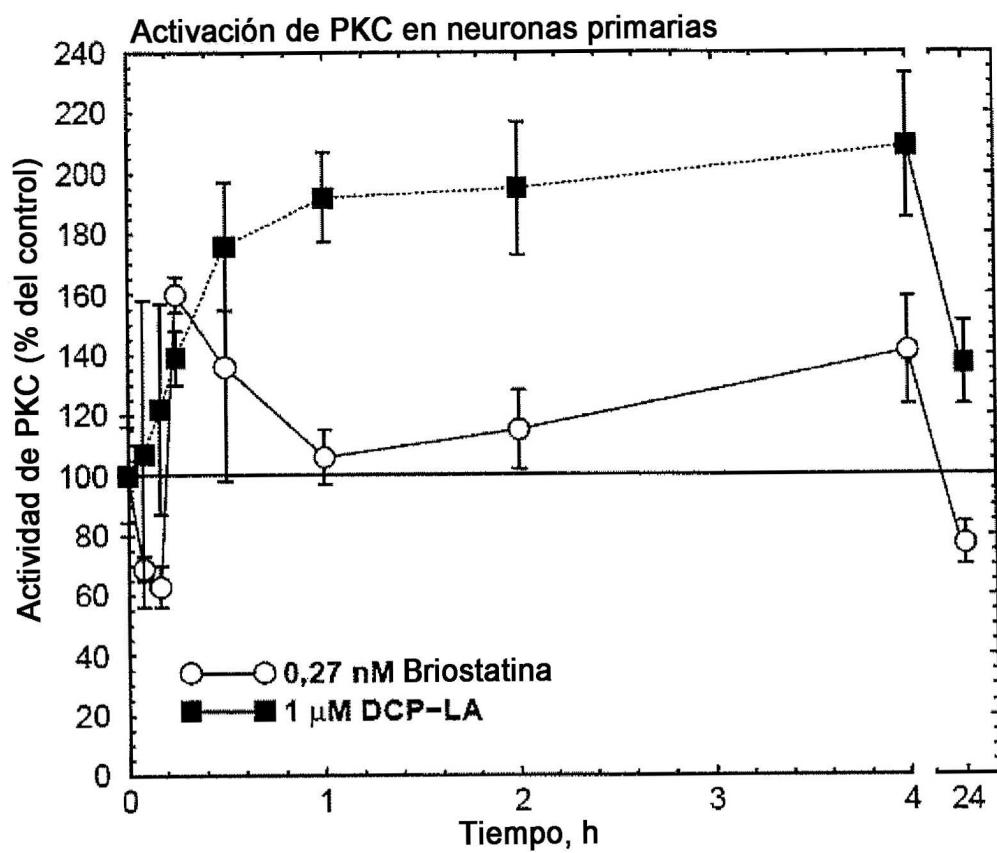
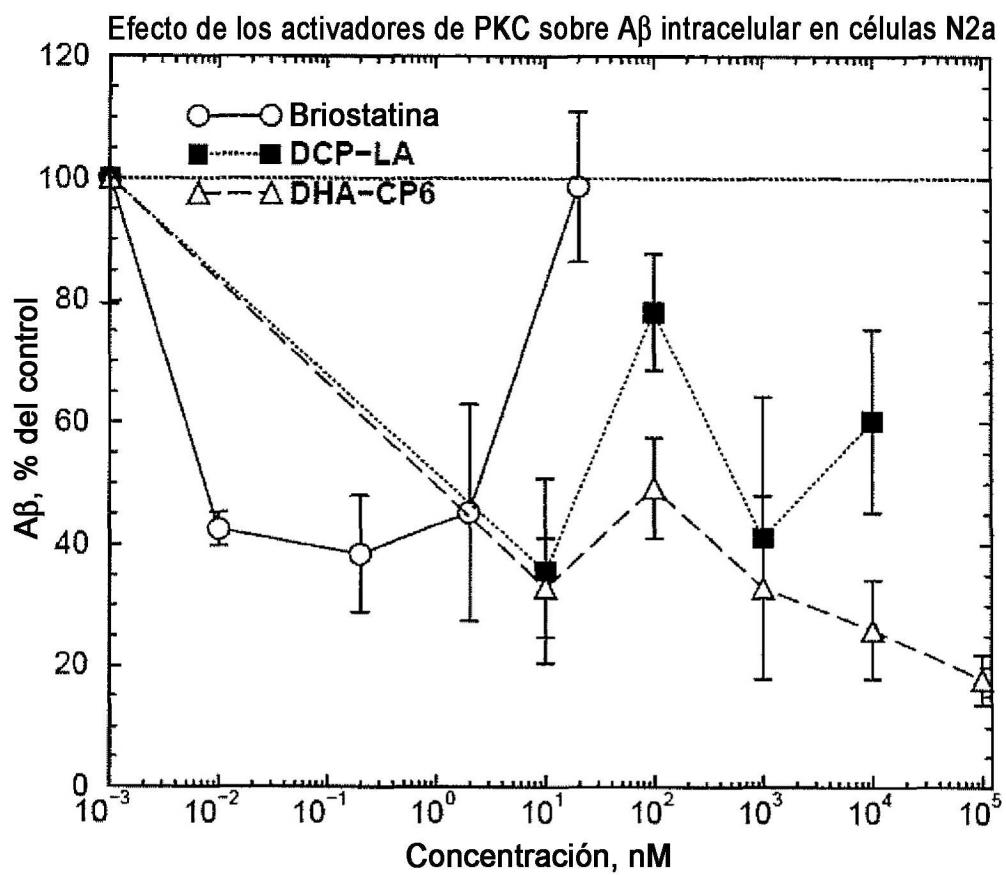
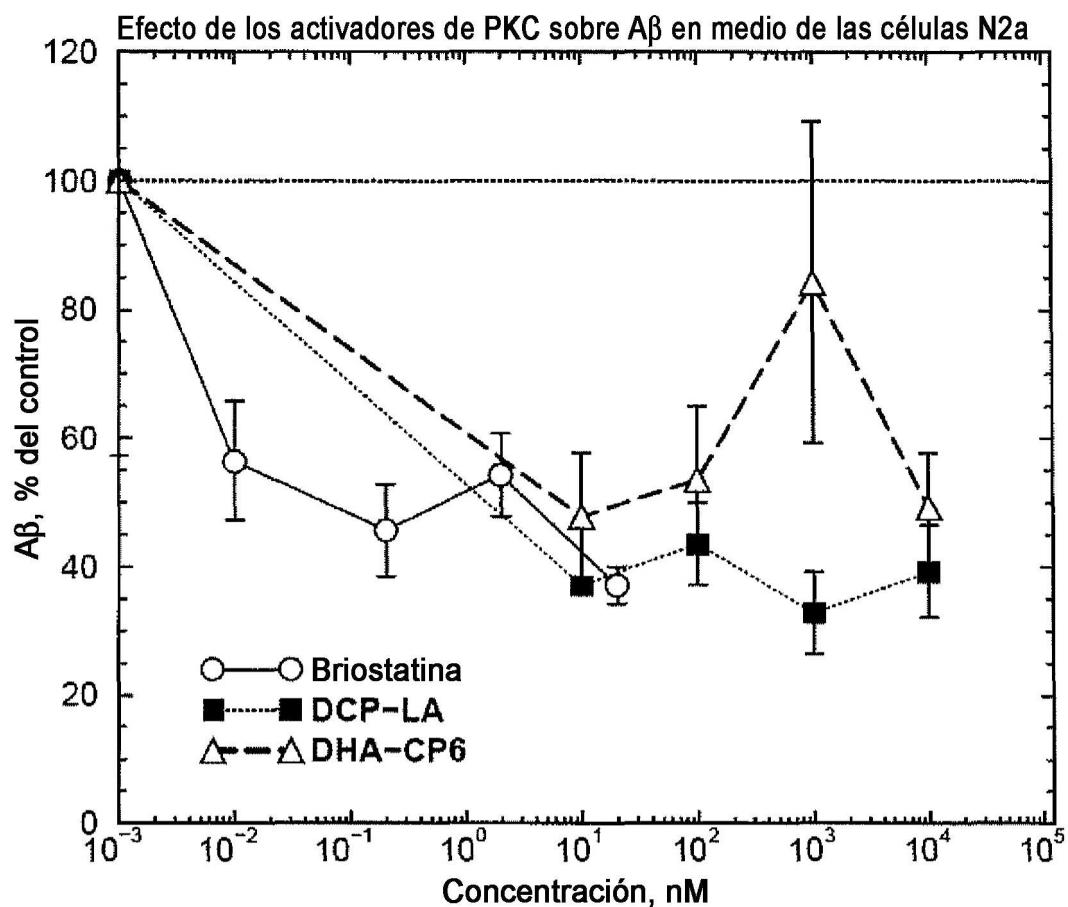


Figura 4

**Figura 5**

**Figura 6**

**Figura 7a**

**Figura 7b**

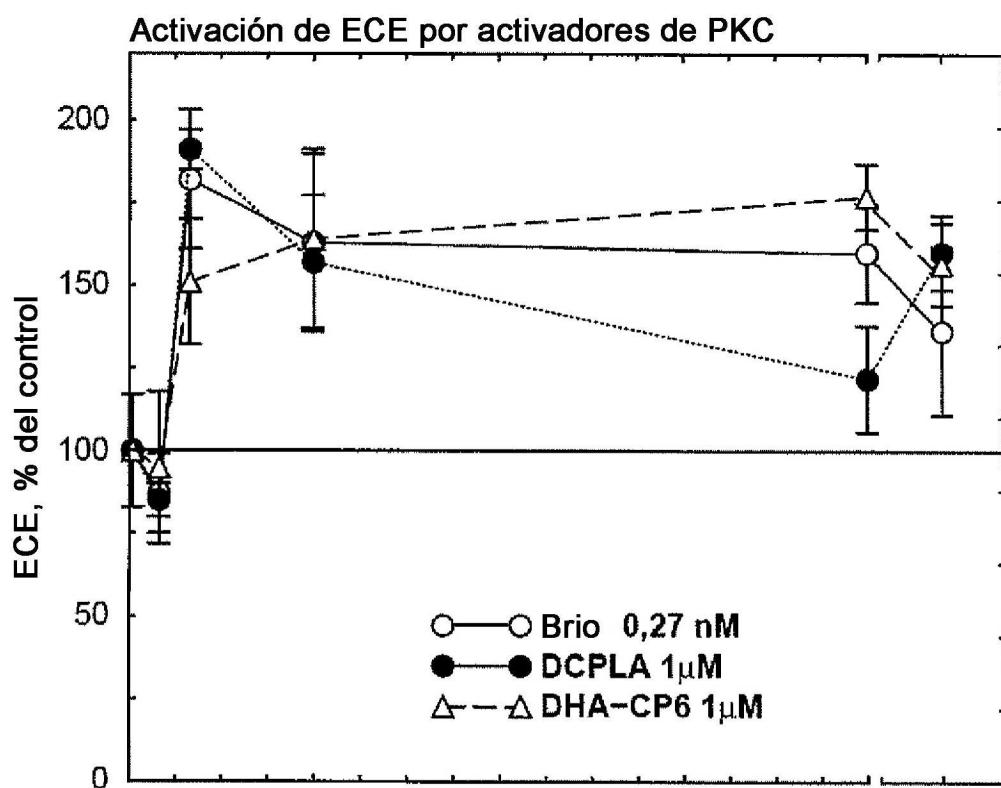
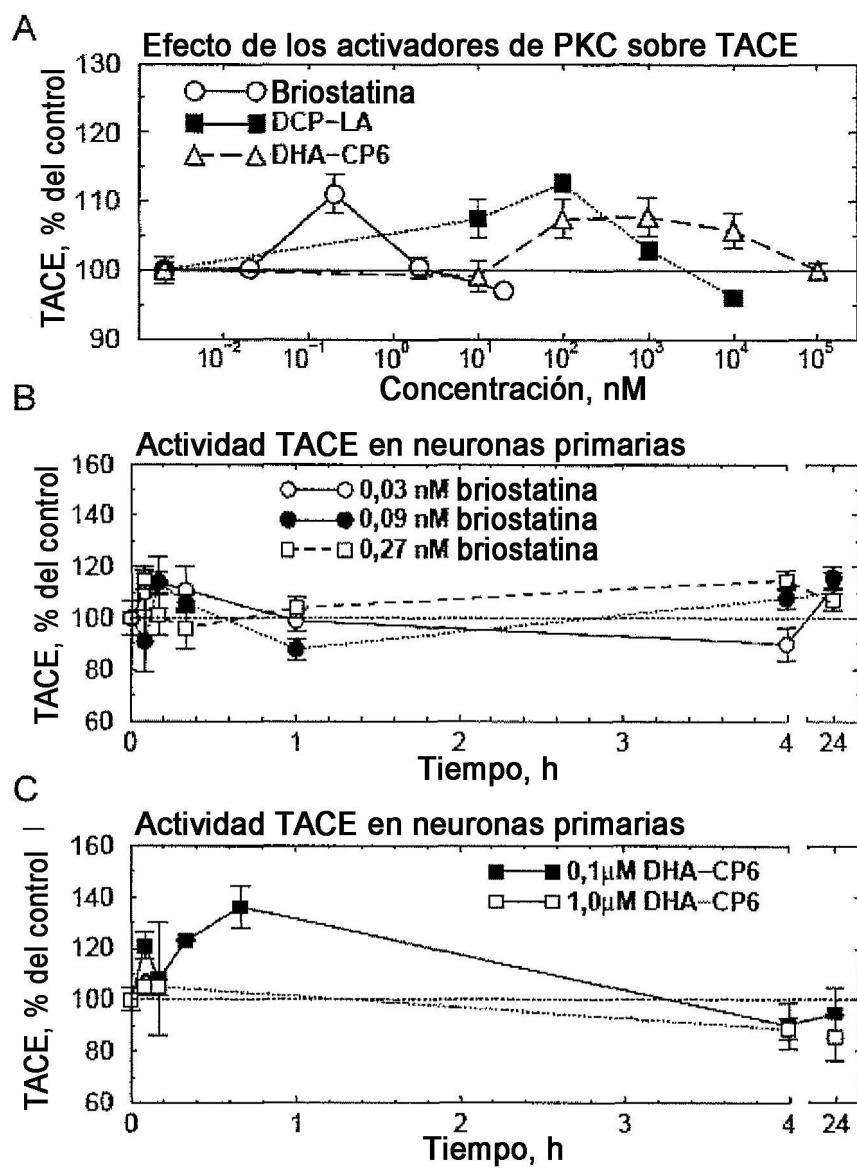
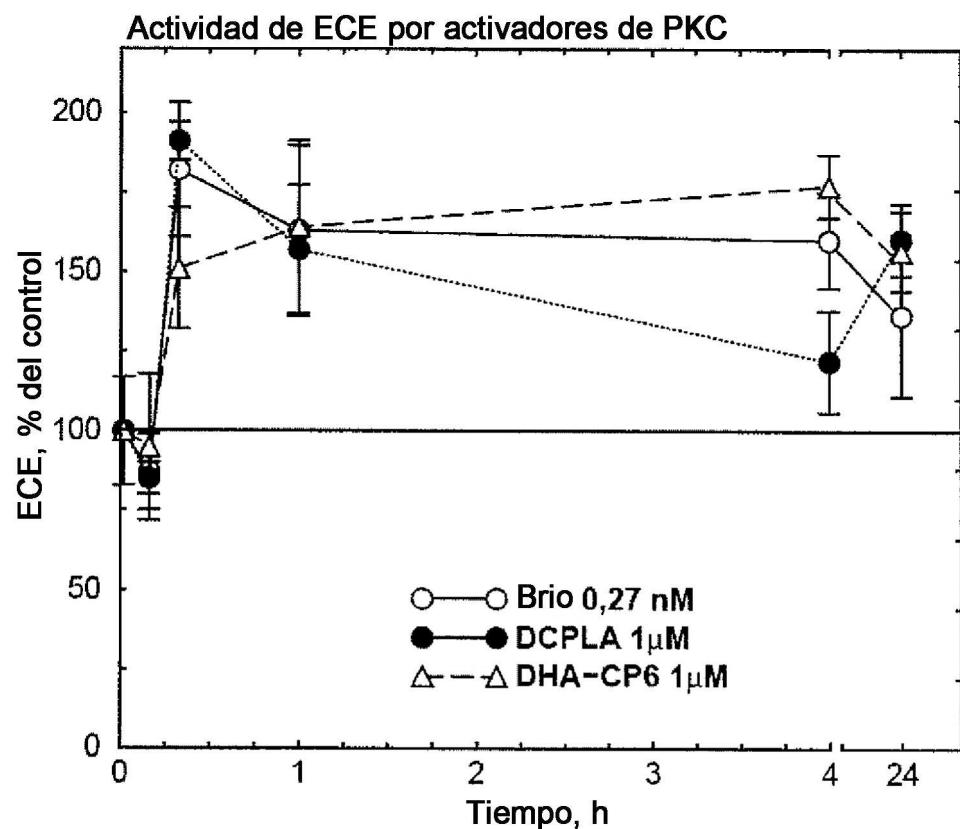
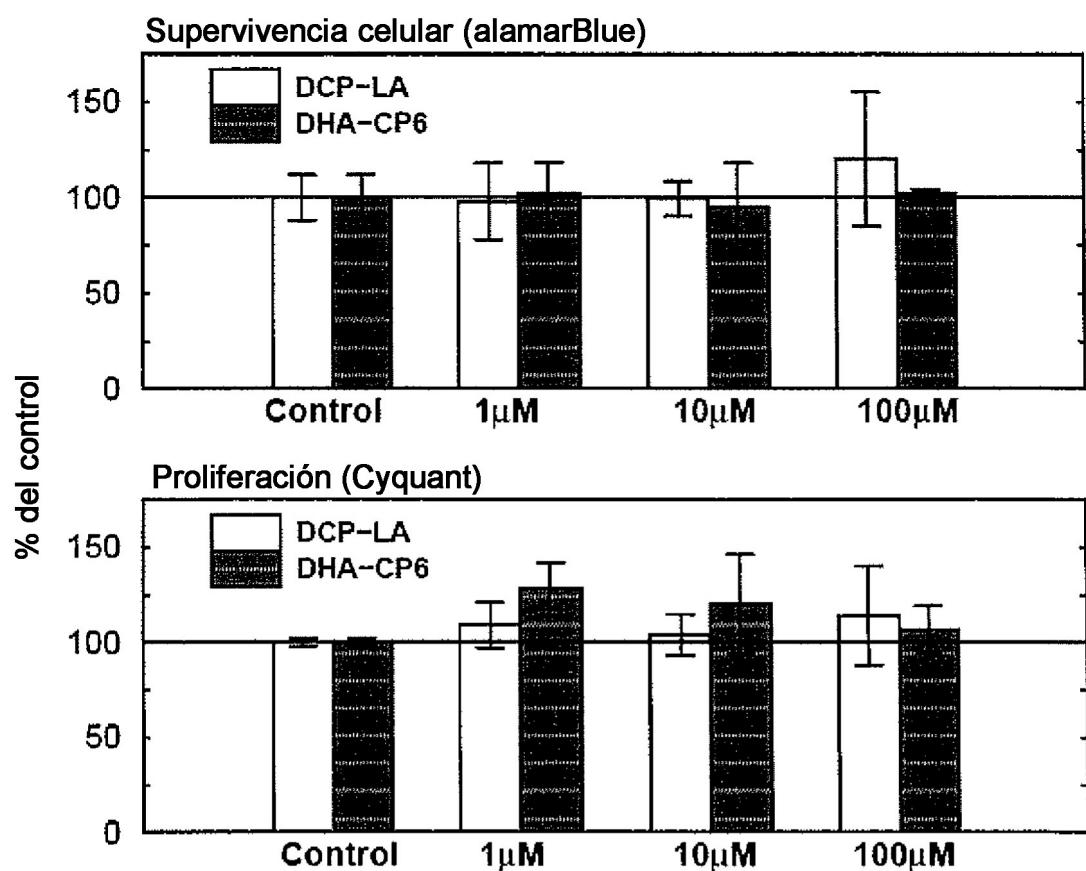


Figura 8

**Figura 9**

**Figura 10**

**Figura 11**