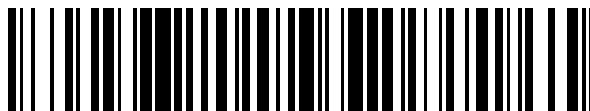


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 979**

21 Número de solicitud: 201300667

51 Int. Cl.:

A61K 31/404 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

17.07.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.01.2015

Fecha de la concesión:

21.10.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

28.10.2015

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE
LA PRINCESA (72.0%)
C/ Diego de León, 62
28006 Madrid (Madrid) ES;
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (22.0%);
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (3.5%) y
DNS NEUROSCIENCE S.A. (2.5%)**

72 Inventor/es:

**LEÓN MARTÍNEZ , Rafael ;
EGEA MAÍQUEZ , Javier ;
BUENDÍA ABAITUA , Izaskun;
PARADA PÉREZ, Esther y
NAVARRO GONZÁLEZ DE MESA, Elisa**

54 Título: **Uso del 3-(2-isotiocianatoetil)-5-metoxi-1H-indol para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas**

57 Resumen:

Uso del 3-(2-isotiocianatoetil)-5-metoxi-1H-indol para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. La presente invención se refiere al uso del 3-(2-isotiocianatoetil)-5-metoxi-1H-indol o de una composición que comprende el 3-(2-isotiocianatoetil)-5-metoxi-1H-indol para el tratamiento de enfermedades que cursan con declive de la capacidad cognitiva o motoras secundarias a degeneración neuronal. La presente invención también se refiere al uso del 3-(2-isotiocianatoetil)-5-metoxi-1H-indol para el tratamiento de otras enfermedades neurodegenerativas que cursan con elevados niveles de estrés oxidativo y/o neuroinflamación y/o autoinmunes. Preferiblemente, la presente invención se refiere al uso del 3-(2-isotiocianatoetil)-5-metoxi-1H-indol para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, ictus cerebral o esclerosis lateral amiotrófica.

ES 2 526 979 B1

DESCRIPCIÓN

Uso del 3-(2-isotiocianatoetil)-5-metoxi-1*H*-indol para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas

Sector de la técnica

5

La invención se encuadra en el ámbito de la industria farmacéutica y, en concreto, en el uso del 3-(2-isotiocianatoetil)-5-metoxi-1*H*-indol en el tratamiento de aquellas enfermedades que cursan con un declive de la capacidad cognitiva o motora secundarias a degeneración neuronal, tal como la enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y enfermedad de Huntington (EH) o el ictus, así como la pérdida de neuronas secundaria a enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple (EM).

15 Estado de la técnica

El envejecimiento es un riesgo inherente a las enfermedades neurodegenerativas. En estas patologías influyen factores como el incremento en la oxidación de proteínas y lípidos, así como la disminución de las defensas anti-oxidantes en las neuronas. En este contexto, la ruta Nrf2-ARE (Nuclear Factor Erythroid-2-Related Factor 2) se está utilizando como diana terapéutica para la prevención y el tratamiento de este tipo de patologías (de Vries y col., 2008, *Free Radic. Biol. Med.*, 45: 1375-83, Johnson y col., 2008, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1147: 61-9, van Muiswinkel y col., 2005, *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.*, 4: 267-81).

El sistema nervioso central (SNC) es particularmente vulnerable a radicales libres debido a la gran acumulación de ácidos grasos poli-insaturados fácilmente oxidables por las especies reactivas de oxígeno. Además, existen cantidades significativas de iones metálicos como hierro (II) y cobre (I) que catalizan reacciones redox para producir dichos radicales libres, incrementándose así el estrés oxidativo. El alto consumo de oxígeno

del cerebro lleva a altos niveles de peroxidación lipídica, proteica, de ADN y ARN que causan una considerable disfunción y muerte neuronal.

Una vía por la cual las células regulan su capacidad antioxidante es a través de la activación del factor de transcripción Nrf2. El elemento de respuesta antioxidante (ARE) es un regulador que gobierna la expresión de enzimas detoxificantes de fase II. Así, el Nrf2 regula la activación de las secuencias ARE de forma que activa la expresión de genes de fase II por interacción con estas secuencias. En condiciones normales, el factor Nrf2 se encuentra secuestrado en el citosol por la proteína Keap1 (Itoh y col., 1999, *Genes Dev.*, 13: 76-86), que es ubiquitinado y degradado rápidamente por el sistema ubiquitina-proteosoma. En condiciones de estrés oxidativo, se interrumpe la interacción entre el factor Nrf2 y Keap1, de esta manera se facilita la translocación de Nrf2 al núcleo. En el núcleo, se une a proteínas Maf que incrementan la tasa de transcripción de los genes inducidos por las secuencias ARE.

Los múltiples genes relacionados con el equilibrio redox, el efecto anti-inflamatorio y la detoxificación de especies reactivas de oxígeno se inducen por la vía Nrf2-ARE. Estos genes tienen efecto citoprotector frente al daño celular por estrés oxidativo en diferentes tejidos y órganos, incluido el SNC. Los sistemas de enzimas antioxidantes regulados por Nrf2 incluyen la regulación redox [superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), sulfaredoxin (Srx), tioredoxin (Trx), peroxiredoxin (Prdx)], síntesis y metabolismo de glutatión [glutatión peroxidasa (Gpx), glutatión reductasa (GR), γ -glutamina cisteína ligasa (GCL) y sintasa (GCS)], reciclado de quinonas [NAD(P)H quinona oxidoreductasa (NQO1)] y homeostasis del hierro [hemo-oxigenasa-1 (HO-1), ferritina]. Algunos genes antioxidantes tienen efectos más importantes que otros en el cerebro dependiendo de la enfermedad, el entorno celular o el subtipo celular. En condiciones normales, la expresión de genes dependientes de la ruta Nrf2-ARE está menos activada en las neuronas que en los astrocitos (Lee y col., 2003, *J. Biol. Chem.*, 278: 12029-38, Kraft y col., 2004, *J. Neurosci.*, 24: 1101-12); por tanto, generalmente,

las neuronas dependen de los astrocitos para protegerse frente al estrés oxidativo (Tanaka y col., 1999, *Glia*, 28: 85-96).

Enfermedad de Alzheimer: La EA es una enfermedad neurodegenerativa progresiva asociada al envejecimiento, caracterizada por pérdida de memoria y disfunción cognitiva; es la demencia más común en el envejecimiento. La EA se caracteriza por la atrofia del cerebro debida a una marcada pérdida neuronal y de sinapsis, aparición de placas seniles formadas principalmente por el péptido amiloide- β ($A\beta$) y ovillos neurofibrilares formados por agregados de proteína tau hiperfosforilada. La EA también se caracteriza por disfunción mitocondrial, gliosis reactiva y lesión oxidativa en lípidos y proteínas (Schipper y col., 2006, *Neurobiol. Aging*, 27: 252-61, Shaftel y col., 2008, *J. Neuroinflammation*, 5: 7, Smith y col., 1997, *J. Neurosci.*, 17: 2653-7, Wang y col., 2007, *Free Radic. Biol. Med.*, 43: 1569-73).

En cerebros post-mortem de pacientes de EA se observa sobreexpresión de HO-1 en el córtex temporal e hipocampo, en comparación con sujetos control (Schipper y col., 2006, *Neurobiol. Aging*, 27: 252-61). Además, se encuentra una actividad anormalmente alta de la enzima NQO1 en astrocitos y neuronas, lo que demuestra la presencia de un alto nivel de estrés oxidativo (Wang y col., 2000, *Neurobiol. Aging*, 21: 525-31, Raina y col., 1999, *Redox Rep.*, 4: 23-7). Por otra parte, la localización del factor de transcripción Nrf2 es predominantemente citoplasmática en neuronas hipocampales de enfermos de EA (Raina y col., 1999, *Redox Rep.*, 4: 23-7, Ramsey y col., 2007, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 66: 75-85). Estudios recientes en modelos animales envejecidos de EA con la mutación APP/PS1 mostraron una reducción en los niveles del factor Nrf2, de NQO1 y de las enzimas sintetizadoras de GSH; estos hechos demuestran la existencia de una regulación negativa de este factor durante el transcurso de la enfermedad (Kanninen y col., 2008, *Mol. Cell. Neurosci.*, 39: 302-13). También ha sido demostrado que la manipulación de las rutas antioxidantes

celulares endógenas se traduce en protección frente a la toxicidad neuronal inducida por A β (Kanninen y col., 2008, *Mol. Cell. Neurosci.*, 39: 302-13, Wruck y col., 2008, *Mol. Pharmacol.*, 73: 1785-95). Estos y otros resultados *in vitro* e *in vivo* indican que la ruta Nrf2-ARE es una diana terapéutica con gran potencial para el tratamiento de la EA.

Enfermedad de Parkinson: Es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por síntomas motores como temblor, bradicinesia, inestabilidad postural y rigidez. También se observan síntomas psiquiátricos como cambios de humor, déficit cognitivo, alteraciones del comportamiento, y en algunos casos, demencia (Shtilbans y col., 2012, *Curr. Opin. Neurol.*, 25: 460-5). El principal marcador patológico es la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra que proyectan al estriado, junto a la aparición de los cuerpos de Lewy por la acumulación de α -sinucleína unida a ubiquitina (Shtilbans y col., 2012, *Curr. Opin. Neurol.*, 25: 460-5). También se observa una marcada astrogliosis así como microgliosis. En la EP también se ha demostrado la implicación del estrés oxidativo, una distribución predominantemente citoplasmática del factor Nrf2 y la disfunción mitocondrial en las neuronas dopaminérgicas (Alam y col., 1997, *J. Neurochem.*, 69: 1196-203, Clements y col., 2006, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103: 15091-6). Existen diversos estudios *in vitro* e *in vivo* que demuestran que la inducción del factor Nrf2 ejerce efectos neuroprotectores frente a tóxicos que inducen parkinsonismo y en modelos transgénicos de la EP (Chen y col., 2009, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106: 2933-8, Innamorato y col., 2010, *PLoS One*, 5: e11838, Burton y col., 2006, *Neurotoxicol.*, 27: 1094-100, Rojo y col., 2010, *Glia*, 58: 588-98, Lastres-Becker y col., 2012, *Hum. Mol. Genet.*, 21: 3173-92).

Enfermedad de Huntington: se trata de una enfermedad neurodegenerativa progresiva autosómica dominante causada por la repetición expandida de tripletes de bases CAG en el gen de la proteína huntingtina. Esta repetición resulta en la expansión de poliglutaminas en el extremo N-terminal de la huntingtina y la acumulación de proteína mutante

en forma de agregados citosólicos y nucleares. La EH se caracteriza por la degeneración del neostriado (caudado y putamen) y córtex cerebral relacionado con los problemas motores, declive cognitivo y síntomas psiquiátricos que empeoran con el avance de la enfermedad. Se ha implicado al estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial en pacientes y modelos de EH. Prueba de ello son los defectos observados en los complejos mitocondriales II, III y IV en cerebros post-mortem de EH. Los estudios realizados en ratones transgénicos modelo de EH, mostraron mejoría en los síntomas motores y mayor tasa de supervivencia tras ser tratados con inductores de Nrf2 (triterpenoides sintéticos) suministrados en la dieta. También se observó una reducción tanto en marcadores de estrés oxidativo como de la atrofia estriatal. Estos resultados sugieren que el tratamiento de la EH con moléculas capaces de modular la ruta Nrf2-ARE sería una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento de la EH.

Esclerosis lateral amiotrófica: Es una enfermedad causada por la degeneración de las motoneuronas de la médula espinal, tronco del encéfalo y córtex motor. Se caracteriza por un debilitamiento muscular progresivo, espasticidad y atrofia muscular. Patológicamente, la ELA se caracteriza por lesión oxidativa, neuroinflamación y disfunción mitocondrial. Aunque en torno al 5-10% de los casos de ELA se debe a mutaciones en la enzima Cu/Zn-Superóxido dismutasa (SOD1), la mayoría de los casos son esporádicos y no se conocen las causas. No obstante, se ha señalado el estrés oxidativo como uno de los mecanismos que más afecta a la evolución de la enfermedad. La modulación de la ruta Nrf2-ARE como respuesta o como consecuencia del estrés oxidativo está suficientemente documentada. Las neuronas del córtex motor primario y de la médula espinal de muestras post-mortem de pacientes de ELA mostraron niveles reducidos de ARN mensajeros de proteínas antioxidantes. Por otra parte, otros estudios han demostrado que la sobre-expresión del factor Nrf2 en astrocitos mutantes hSOD1^{G93A}, revirtió completamente la toxicidad en neuronas motoras en un sistema de co-cultivo. Estas observaciones se demostraron también *in vivo* ya que el

cruce de ratones GFAP-Nrf2 (ratones que sobre-expresan este factor) con distintos modelos de ELA produjo un enlentecimiento en la aparición de la enfermedad y un aumento de la expectativa de vida. Por tanto, la activación del factor Nrf2 en astrocitos es beneficiosa para proteger las neuronas en enfermedades neurodegenerativas crónicas, lo que sugiere que la activación de Nrf2 es una estrategia terapéutica viable para la ELA. Recientemente, ciertos triterpenoides que son potentes activadores de la ruta Nrf2-ARE, produjeron una atenuación significativa en la pérdida de peso, mejoraron las funciones motoras y aumentaron la expectativa de vida de ratones mutantes hSOD1^{G93A} cuando se trataron de forma pre-sintomática. Así mismo, el tratamiento con estos compuestos, una vez iniciados los síntomas de la enfermedad, también mostró una neuroprotección altamente significativa y una ralentización de la progresión de la enfermedad.

Esclerosis Múltiple: Se trata de una enfermedad con carácter autoinmune dirigida contra los antígenos del SNC. Se caracteriza por la inflamación crónica de partes del SNC y pérdida de la mielina que recubre los axones neuronales (desmielinización), pérdida axonal y la muerte de las neuronas, oligodendrocitos y células gliales (O'Gorman y col., 2012, *Int. J. Mol. Sci.*, 13: 11718-52). La EM es crónica, progresiva, inhabilitante y normalmente aparece tras la adolescencia. No es una enfermedad directamente hereditaria aunque tiene un componente de susceptibilidad genética en su desarrollo. En diferentes estudios se ha demostrado la capacidad de los agentes inductores de la ruta Nrf2-ARE para reducir la inflamación que se produce en la EM (Schimrigk y col., 2006, *Eur. J. Neurol.*, 13: 604-10, Lee y col., 2012, *Int. J. Mol. Sci.*, 13: 11783-803), así como la demostración de que distintos derivados inductores de Nrf2 son capaces de disminuir la activación de astrocitos tanto *in vitro* como *in vivo* (Scannevin y col., 2012, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 341: 274-84). También reducen la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Lin y col., 2011, *ASN Neuro*, 3) y la señal pro-inflamatoria promovida por la estimulación de astrocitos en cultivo primario con lipopolisacárido (LPS). El tratamiento de

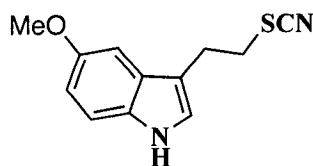
esta enfermedad con inductores de la ruta Nrf2 es una estrategia viable, como así lo demuestra la aprobación del dimetil fumarato (inductor de Nrf2) para el tratamiento de la EM en 2012 por la FDA (Tecfidera®).

5 En los documentos de patente WO2010/126605, WO2011/156889, WO2010/107733, WO2010/036711, WO2009/036204, WO2008/136838, WO2007/008652, WO2007/005879, WO2008/097596 se proponen distintas opciones de tratamiento de enfermedades neurodegenerativas basadas en uno o varios compuestos químicos y/o productos naturales cuya diana terapéutica es la inducción y/o modulación de la ruta Nrf2-ARE como
10 estrategia anti-oxidante, neuroprotectora, anti-inflamatoria e inmunomoduladora.

La presente invención se centra en el uso del derivado 3-(2-isotiocianatoetil)-5-metoxi-1*H*-indol como inductor de la ruta Nrf2-ARE mediante la liberación del factor de transcripción Nrf2 de la proteína Keap1
15 y posterior translocación al núcleo con los efectos antioxidantes, anti-inflamatorios y neuroprotectores que conlleva.

Descripción detallada de la invención

20 La presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I):



(I)

25 así como a sus sales farmacéuticamente aceptables.

El término “sales farmacéuticamente aceptables” utilizado aquí abarca cualquier sal formada a partir de ácidos orgánicos e inorgánicos, tales como el bromhídrico, el clorhídrico, el fosfórico, el nítrico, el sulfúrico, el acético, el adípico, el aspártico, el bencenosulfónico, el

benzoico, el cítrico, el etanosulfónico, el fórmico, el fumárico, el glutámico, el láctico, el maleico, el málico, el malónico, el mandélico, el metansulfónico, el 1,5-naftalendisulfónico, el oxálico, el piválico, el propiónico, el p-toluenesulfónico, el succínico, los tartáricos y similares, o una sal metálica, estando seleccionado el metal entre el sodio, el potasio, el litio, el calcio, el magnesio, el zinc, el aluminio y similares, o las sales amónicas, o una sal formada a partir de bases orgánicas, como el 2-amino-1-butanol, el 2-amino-2-etil-1,3-propanodiol, el 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol, la benzatina, la bencildimetilamina, la cloroprocaína, la colina, la dibencilmetilamina, la dietanolamina, la diisopropanolamina, la etilendiamina, la dimetil estearamina, la meglumina, el 2-metil-2-amino-1-propanol, los monoamino glicoles, la monoetanolamina, la monoisopropanolamina, la morfolina, la N,N-dibenciletilendiamina, el N,N-dimetil-2-amino-2-metil-1-propanol, la N,N-dimetilanilina, la procaína, la piridina, la quinolina, la t-butil-dimetilamina, la trietanolamina, la trietilamina, el trihidroximetilaminometano, la triisopropanolamina, la trimetilamina y similares, y sales con aminoácidos tales como la glicina, la lisina, la arginina, la taurina, la histidina, la alanina, la valina, la cisteína y similares.

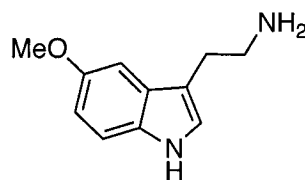
Una característica esencial del compuesto de la presente invención es que presenta efecto neuroprotector frente a diversos modelos de neurodegeneración cuyo mecanismo se debe a la actividad inductora del factor de transcripción Nrf2 y la ruta de señalización Nrf2-ARE; también exhibe propiedades antioxidantes.

El estrés oxidativo es reconocido como uno de los marcadores de envejecimiento desde que Denham Harman presentó su teoría de envejecimiento por radicales libres en 1956 (Harman, 1956, *J. Gerontol.*, 11: 298-300). Varios estudios indican que la activación de rutas mediadas por Nrf2 pueden aumentar la supervivencia en distintos modelos de enfermedades neurodegenerativas (Leiser y col., 2010, *Mol. Cell Biol.*, 30: 871-84, Lewis y col., 2010, *Integr. Comp. Biol.*, 50: 829-43). Por otro lado,

estas rutas están menos activas o desreguladas durante el envejecimiento, en procesos neurodegenerativos y en procesos degenerativos relacionados con la edad (Ungvari y col., 2011, *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 301: H363-72). La inhibición o la desregulación de este tipo de rutas, obviamente, pueden agravar el estrés oxidativo en este tipo de patologías. Además, la señalización vía Nrf2 puede proteger frente a patologías inflamatorias (Kim y col., 2010, *Mutat. Res.*, 690: 12-23) y por tanto, la deficiencia de señalización vía Nrf2, como ocurre durante el envejecimiento, puede aumentar el fenotipo inflamatorio.

10

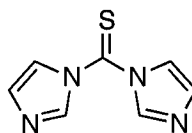
El compuesto de la presente invención se prepara mediante la reacción de 2-(5-metoxi-1*H*-indol-3-il)etanamina de fórmula (II):



(II)

15

con *N,N'*-tiocarbonildiimidazol (III):



(III)

20

La reacción se lleva a cabo en un disolvente inerte, tal como un heterociclo no aromático o hidrocarburos alifáticos halogenados escogido entre el tetrahidrofurano, diclorometano, el 1,2-dicloroetano y similares, y sus mezclas, resultando especialmente adecuado el tetrahidrofurano. Por tanto, la presente invención comprende también el procedimiento de obtención del compuesto de fórmula (I) según la mencionada reacción entre (II) y (III).

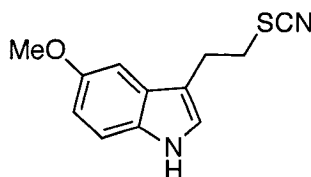
25

El compuesto de la presente invención se administra convenientemente formulado con los excipientes adecuados por vía oral, inyectable, intravenosa o rectal, a dosis diarias comprendidas entre 0,1 y 100 mg. Más preferentemente las dosis diarias estarán comprendidas entre 0,1 y 50 mg/Kg. Como vía de administración se prefiere la vía oral. Como presentaciones orales se eligen indistintamente los comprimidos, las cápsulas, las grageas, cápsulas de gelatina, gránulos, supositorios, las soluciones bebibles y las gotas para su posterior dilución en líquidos. El principio activo puede ser incorporado con excipientes normalmente usados en composiciones farmacéuticas como talco, lactosa, estearato de magnesio, vehículos acuosos o no acuosos, sustancias grasas de origen vegetal o animal, derivados de parafina, glicoles, agentes de dispersión, emulsión o empapado y conservantes.

15 Modos de realización de la invención

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

20 Ejemplo 1: Preparación del 5-metoxi-3-(2-isotiocianatoetil)-1*H*-indol.



a) Método:

25 A una solución de 2-(5-metoxi-1*H*-indol-3-il)etanamina (2,62 mmol) en THF se añadió *N,N'*-tiocarbonildiimidazol diluido en THF (2,62 mmol). La disolución resultante se mantuvo en agitación durante 3 horas. Una vez hubo terminado la reacción se extrajo la fase orgánica con salmuera, se secó sobre sulfato magnésico y se purificó el producto resultante mediante

columna de cromatografía flash. Se obtuvo así el compuesto de fórmula I con un rendimiento del 90 %. Los datos analíticos estuvieron de acuerdo con los publicados anteriormente. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} 7,91 (1H, S_{br} , NH), 7,20 (1H, d, $J = 8,60$ Hz, 7-H), 7,01 (1H, d, $J = 1,85$ Hz, 2-H), 6,91 (1H, d, $J = 2,40$ Hz, 4-H), 6,81 (1H, dd, $J = 2,40$ Hz, $J = 8,605$ Hz, 6-H), 3,81 (3H, s, OCH_3), 3,69 (2H, t, $J = 6,82$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCS}$), 3,06 (2H, t, $J = 6,82$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCS}$); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} 154,21, 131,44, 130,27, 127,29, 123,78, 112,49, 112,24, 110,97, 100,29, 56,07, 45,72, 26,50.

10 Ejemplo 2: Estudios biológicos

Los efectos neuroprotectores y antioxidantes del compuesto de fórmula (I) fueron estudiados en cultivos primarios de neuronas corticales de fetos de rata y en cultivos organotípicos de rodajas de hipocampo de rata (COHs). Los experimentos para medir su capacidad inductora del factor Nrf2 fueron realizados en células HEK-293T.

Descripción breve de las figuras:

20 **Fig. 1:** Efecto protector del compuesto I en el modelo de toxicidad neuronal inducida por la combinación de Rotenona/Oligomicina A (30/10 μM).

Fig. 2: Efecto protector del compuesto I en el modelo de toxicidad neuronal inducida por t-butil-hidroperóxido (30 μM).

25 **Fig. 3:** Efecto protector del compuesto I en el modelo de toxicidad en cultivos organotípicos de rodajas de hipocampo inducida por la combinación de privación de oxígeno y glucosa / reoxigenación.

30 **Fig. 4:** Efecto protector del compuesto I en el modelo de toxicidad en cultivos organotípicos de rodajas de hipocampo inducida por la combinación de antimicina A (0,1 μM) / LPS (1 ng/mL).

Fig. 5: Efecto inductor del factor de transcripción Nrf2 por el compuesto I.

Fig. 6: Efecto del compuesto I sobre la concentración de GSH en neuronas corticales.

5

Fig. 7: Efecto del compuesto I sobre la concentración de especies reactivas de oxígeno en neuronas corticales tratadas con rotenona/oligomicina (30/10 μM).

10 **Fig. 8:** Efecto del compuesto I sobre expresión de hemo-oxigenasa-1 en cultivos organotípicos de rodajas de hipocampo sometidas a POG/Reox.

Cultivo de Neuronas corticales

15 Se emplearon neuronas corticales aisladas de fetos de entre 15-17 días de gestación de ratas Wistar cultivadas en medio neurobasal/B27 hasta la diferenciación neuronal.

Medida de la viabilidad celular: MTT

20 La reducción de MTT se midió espectrofotométricamente según las instrucciones del proveedor.

Ejemplo 1: Protección frente a la toxicidad inducida por rotenona (30 μM) y oligomicina A (10 μM).

25 La supervivencia neuronal es un proceso crucial para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. En ese contexto, se utilizaron distintos cultivos neuronales para determinar la capacidad del compuesto de fórmula (I) para evitar la muerte neuronal. Los cultivos celulares fueron incubados con diferentes concentraciones del compuesto (I) (0,1, 0,3 y 1 μM), dos compuestos de referencia (melatonina y sulforafano) y la mezcla de ambos durante 24 h. Transcurrido el periodo de pre-incubación, los
30 tratamientos se retiraron y las neuronas en cultivo se incubaron con la mezcla de tóxicos (rotenona/oligomicina 30/10 μM). Tras 24 h de incubación

del estímulo tóxico se monitorizó la supervivencia neuronal mediante la técnica de MTT. Los resultados se muestran en la Figura 1. El compuesto I aumentó la supervivencia neuronal de forma estadísticamente significativa a todas las concentraciones respecto a la supervivencia de neuronas tratadas sólo con el estímulo tóxico. Los mejores resultados de supervivencia se observaron a la concentración de 1 μM del compuesto I.

Ejemplo 2: Protección frente a la toxicidad inducida por tert-butil hidroperóxido (30 μM).

En este experimento, se usaron distintos cultivos neuronales para determinar la capacidad del compuesto de fórmula (I) para evitar la muerte neuronal. Los cultivos celulares fueron incubados con el compuesto (I) a las concentraciones de 0,1, 0,3 y 1 μM , dos compuestos de referencia (melatonina y sulforafano) y la mezcla de ambos durante 24 h. Transcurrido el periodo de pre-incubación, los tratamientos se suspendieron y las neuronas se trataron seguidamente con el estímulo tóxico (tert-butil hidroperóxido 30 μM). Tras 24 h de incubación del estímulo tóxico se midió la supervivencia neuronal mediante la técnica de MTT. Los resultados se muestran en la Figura 2. El compuesto I aumentó la supervivencia neuronal de forma estadísticamente significativa a las concentraciones de 0,3 y 1 μM respecto a la supervivencia de neuronas tratadas sólo con el estímulo tóxico. Los mejores resultados de supervivencia se observaron a la concentración del compuesto I de 1 μM .

Ejemplo 3: Protección frente a la toxicidad inducida por privación de oxígeno y glucosa en cultivos organotípicos de rodajas de hipocampo de rata.

En este experimento se utilizaron COHs de rata para determinar la capacidad del compuesto de fórmula (I) para evitar la muerte neuronal inducida por 15 minutos de privación de oxígeno y glucosa (POG) seguido de 24 horas de reoxigenación (POG/Reox). Los cultivos organotípicos se

incubaron con diferentes concentraciones del compuesto (I) a las concentraciones de 0,3 y 1 μM y dos compuestos de referencia (melatonina y sulforafano) tras 15 minutos de POG, durante las 24 h de reoxigenación. Al final de las 24 h de reoxigenación, se midió la muerte de las neuronas piramidales de CA1 mediante la tinción con yoduro de propidio (IP). Los resultados se muestran en la Figura 3. El compuesto I redujo la muerte neuronal de forma estadísticamente significativa a las concentraciones de 0,3 y 1 μM respecto a la muerte neuronal producida por el estímulo tóxico.

10 **Ejemplo 4: Protección frente a la toxicidad inducida por antimicina A (0,1 μM) y LPS (1 ng/mL) en cultivos organotípicos de rodajas de hipocampo de rata.**

En este experimento se utilizaron COHs de rata para determinar la capacidad del compuesto de fórmula (I) para evitar la muerte neuronal inducida por la combinación de estrés oxidativo, mediante el uso de un bloqueante de la cadena respiratoria mitocondrial (antimicina-A), e inflamación, mediante el uso de lipopolisacárido bacteriano (LPS). Los cultivos organotípicos se incubaron con diferentes concentraciones del compuesto (I) a las concentraciones de 0,3 y 1 μM y dos compuestos de referencia (melatonina y sulforafano) durante los 4 días junto con la combinación de antimicina-A/LPS. Transcurridos los 4 días, se midió la muerte de las neuronas piramidales de CA1 mediante la tinción con yoduro de propidio (IP) la cual se normalizó mediante el número de núcleos totales, teñidos con Hoechst. Los resultados se muestran en la Figura 4. El compuesto I aumentó la supervivencia neuronal de forma estadísticamente significativa a las concentraciones de 0,3 y 1 μM respecto a la muerte neuronal producida por el estímulo tóxico.

30

Ejemplo 5: Medida de la inducción de la expresión de luciferasa (Unión a secuencias ARE del factor Nrf2).

Se realizaron transfecciones transitorias de las células HEK293T con los vectores 3xARE-Luc y renilla; éste último se utilizó como control de transfección para normalización. 24 h después de la transfección, las células se incubaron durante 16 horas con diferentes concentraciones del compuesto (I) a las concentraciones de 0,1, 0,3, y 1 μM y se utilizó como referencia el sulforafano. Al final del experimento, las células se lisaron y se midió la actividad de la luciferasa. Los resultados se muestran en la Figura 5. El compuesto I aumentó la actividad de la luciferasa a la concentración de 1 μM de forma estadísticamente significativa.

Ejemplo 6: Medida de la concentración de glutatión.

La medida de la concentración de glutatión (GSH) en el cultivo celular sirve como medida indirecta de la concentración de las enzimas sintetizadoras de este antioxidante natural. Para demostrar su mecanismo de acción a través de la translocación del factor de transcripción Nrf2, se utilizó la medida de GSH. La inducción de genes de fase II conlleva la sobre-expresión de las enzimas limitantes de la síntesis de GSH. Por tanto, se midió la concentración de GSH en cultivos neuronales de corteza cerebral de feto de rata tratados con el compuesto I a distintas concentraciones (0,1, 0,3 y 1 μM), así como en presencia de los controles positivos (melatonina y sulforafano) a las concentraciones especificadas. El compuesto I aumentó de forma significativa la concentración de GSH a las concentraciones de 0,3 y 1 μM .

Ejemplo 7: Medida de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) por incubación con rotenona/oligomicina (30/10 μM) durante 4 h.

En este experimento se analizó la capacidad de detoxificar radicales libres producidos por la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial. Cultivos de neuronas corticales de feto de rata fueron pre-tratados durante

24 h con concentraciones crecientes del compuesto I (0,1, 0,3 y 1 μM), dos compuestos de referencia (melatonina y sulforafano) y la mezcla de ambos. Posteriormente, fueron incubadas con la sonda fluorescente sensible a especies reactivas de oxígeno H₂DFCDA durante 45 min. Finalmente, las
5 neuronas fueron incubadas con la mezcla de los tóxicos rotenona/oligomicina (30/10 μM) durante 4 horas. El compuesto I produjo una reducción significativa a todas las concentraciones estudiadas. A la concentración de 1 μM , el compuesto I, redujo la concentración de radicales libres de al mismo nivel que melatonina, un potente secuestrador de
10 radicales libres natural.

Ejemplo 8: Medida de la expresión de hemo-oxigenasa-1 (HO-1) en cultivos organotípicos de hipocampo de rata sometidos a POG/Reox.

La inducción de enzimas de fase 2 en las condiciones experimentales
15 descritas en la figura 3 ha sido corroborada mediante el estudio de la expresión de HO-1. Al final del experimento, las rodajas del cultivo organotípico fueron lisadas, se extrajeron las proteínas y se realizó la electroforesis y posterior transferencia para la cuantificación. El compuesto I a la concentración de 1 μM , aumenta significativamente la expresión de la
20 enzima HO-1 (Fig. 8). La melatonina y el sulforafano se utilizaron como controles.

25

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de un compuesto de fórmula (I), o sus sales farmacéuticamente aceptables para la preparación de medicamentos con efecto inductor de Nrf2 y/o antioxidante y/o neuroprotector y/o inmunomodulador para el tratamiento preventivo o terapéutico de las enfermedades neurodegenerativas centrales o periféricas.
- 10 2. El uso según la reivindicación 1 donde el compuesto de fórmula (I) y/o una sal farmacéuticamente aceptable, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas centrales y/o periféricas.
- 15 3. El uso según reivindicaciones 1 a 2, en la fabricación de un medicamento para la enfermedad de Alzheimer.
- 20 4. El uso según reivindicaciones 1 a 2, en la fabricación de un medicamento para la enfermedad de Parkinson.
- 25 5. El uso según reivindicaciones 1 a 2, en la fabricación de un medicamento para la enfermedad de Huntington.
6. El uso según reivindicaciones 1 a 2, en la fabricación de un medicamento para la esclerosis múltiple.
7. El uso según reivindicaciones 1 a 2, en la fabricación de un medicamento para el ictus cerebral.
- 30 8. El uso según reivindicaciones 1 a 2, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades periféricas neuropáticas.

9. El uso según reivindicación 8, en la fabricación de un medicamento para la esclerosis lateral amiotrófica.
- 5 10. El uso según reivindicaciones 1 a 9, en la fabricación de un medicamento para su administración por vía oral, rectal, subcutánea, intramuscular o intravascular.
- 10 11. El uso según reivindicaciones 1 a 9, en la fabricación de un medicamento con dosificaciones de 0,1 a 500 mg del compuesto de fórmula (I).
- 15 12. El uso según reivindicaciones 1 a 10, en la fabricación de un medicamento administrado a dosis comprendidas entre 0,1 mg/kg y 50 mg/kg.
- 20
- 25

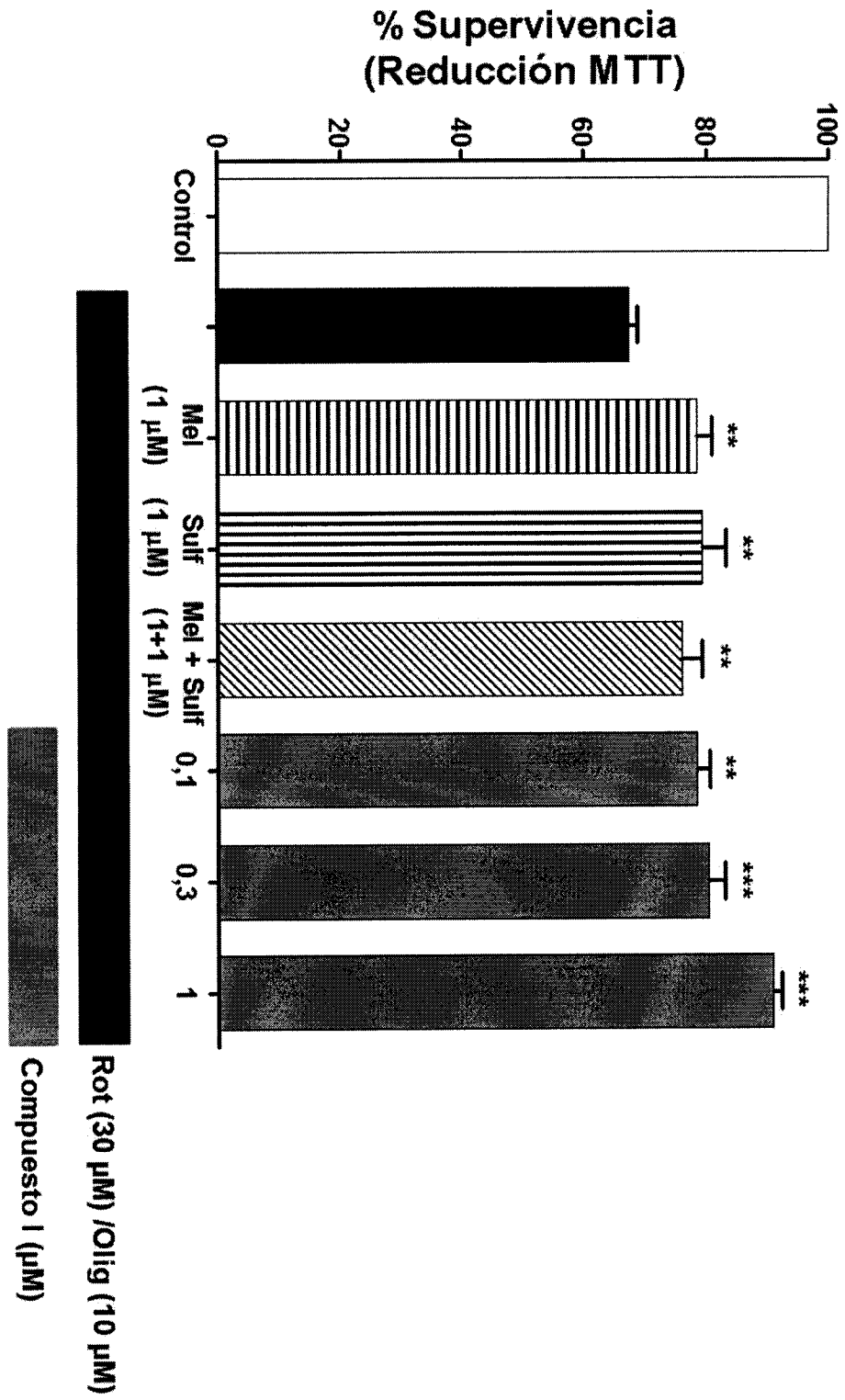


Figura 1

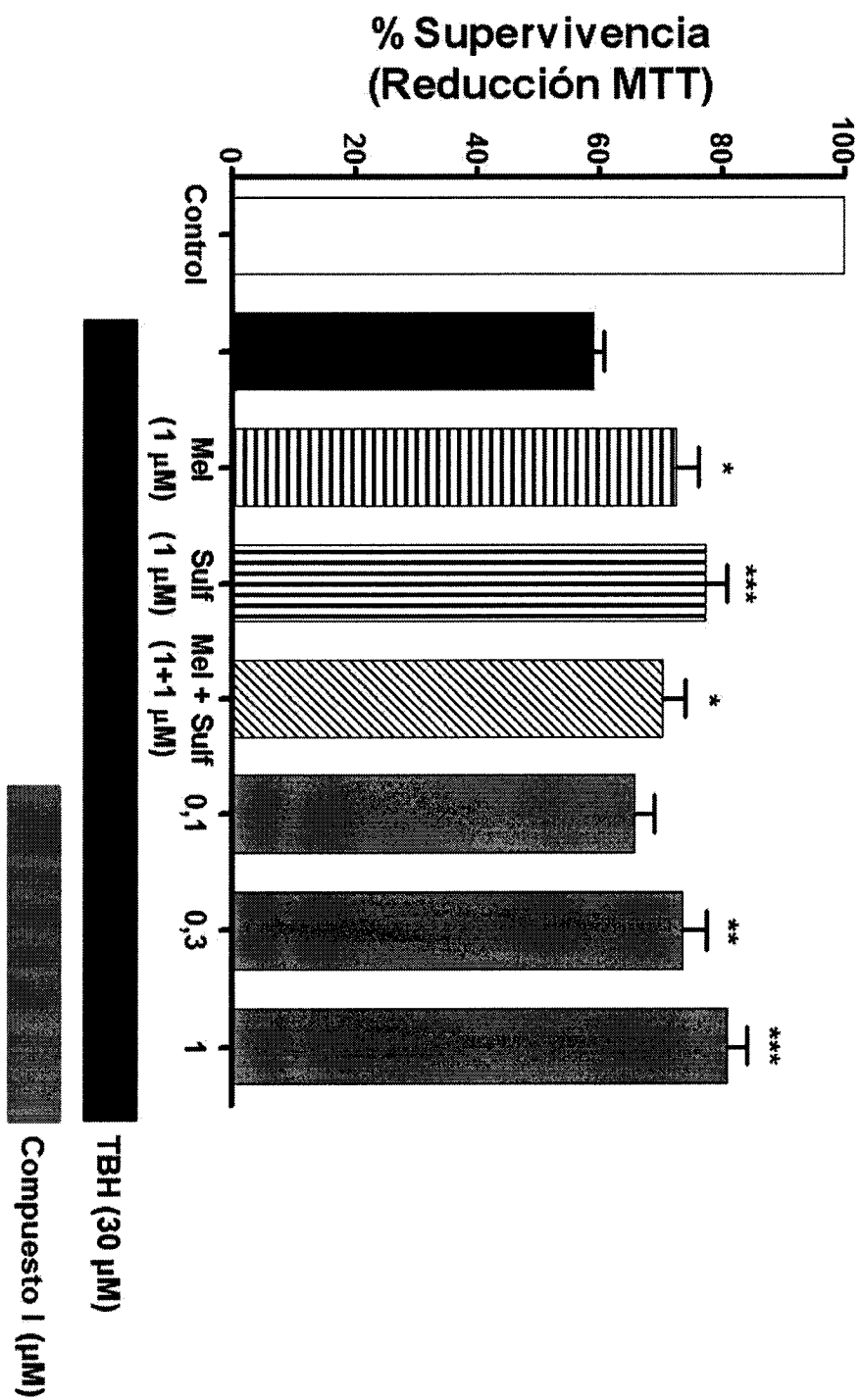


Figura 2

Figura 3

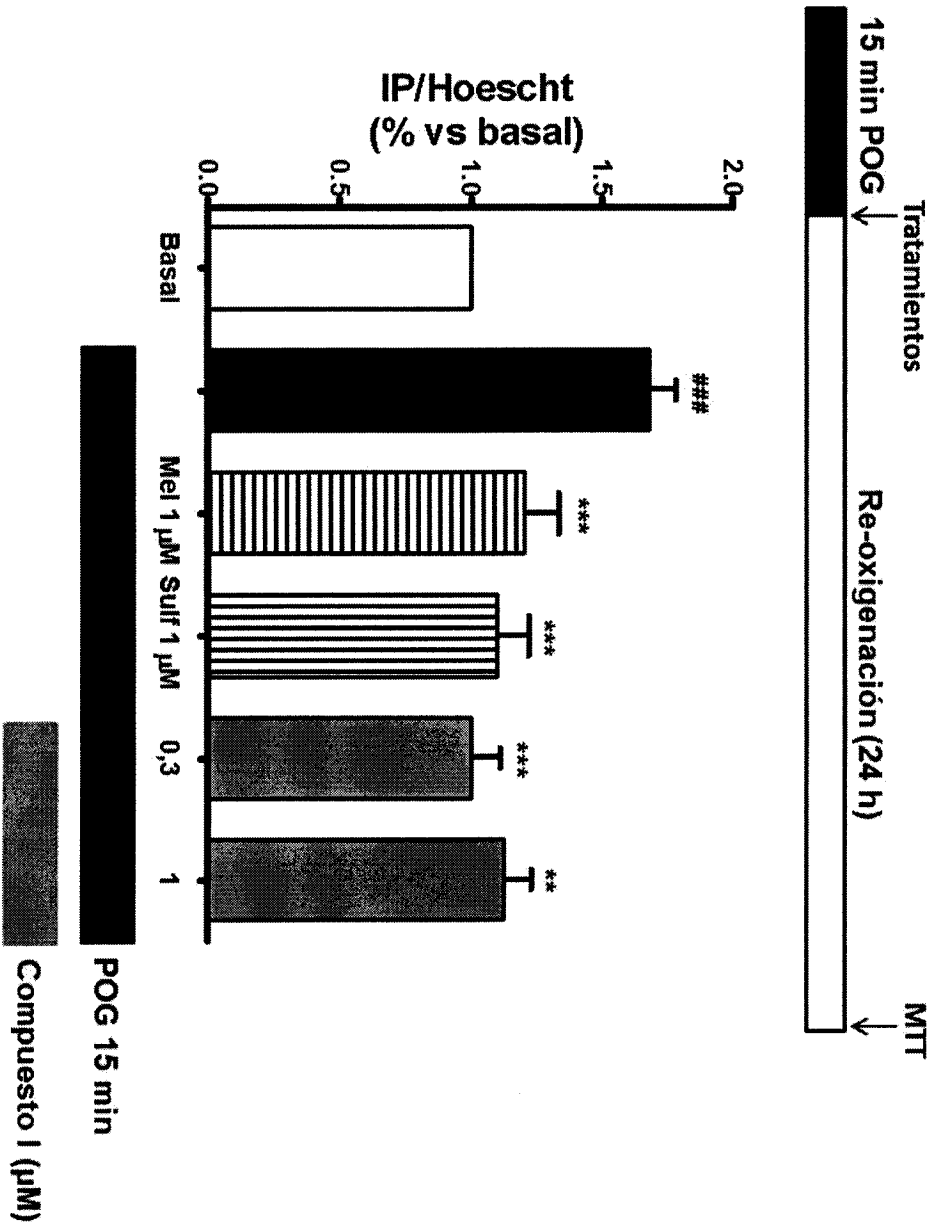
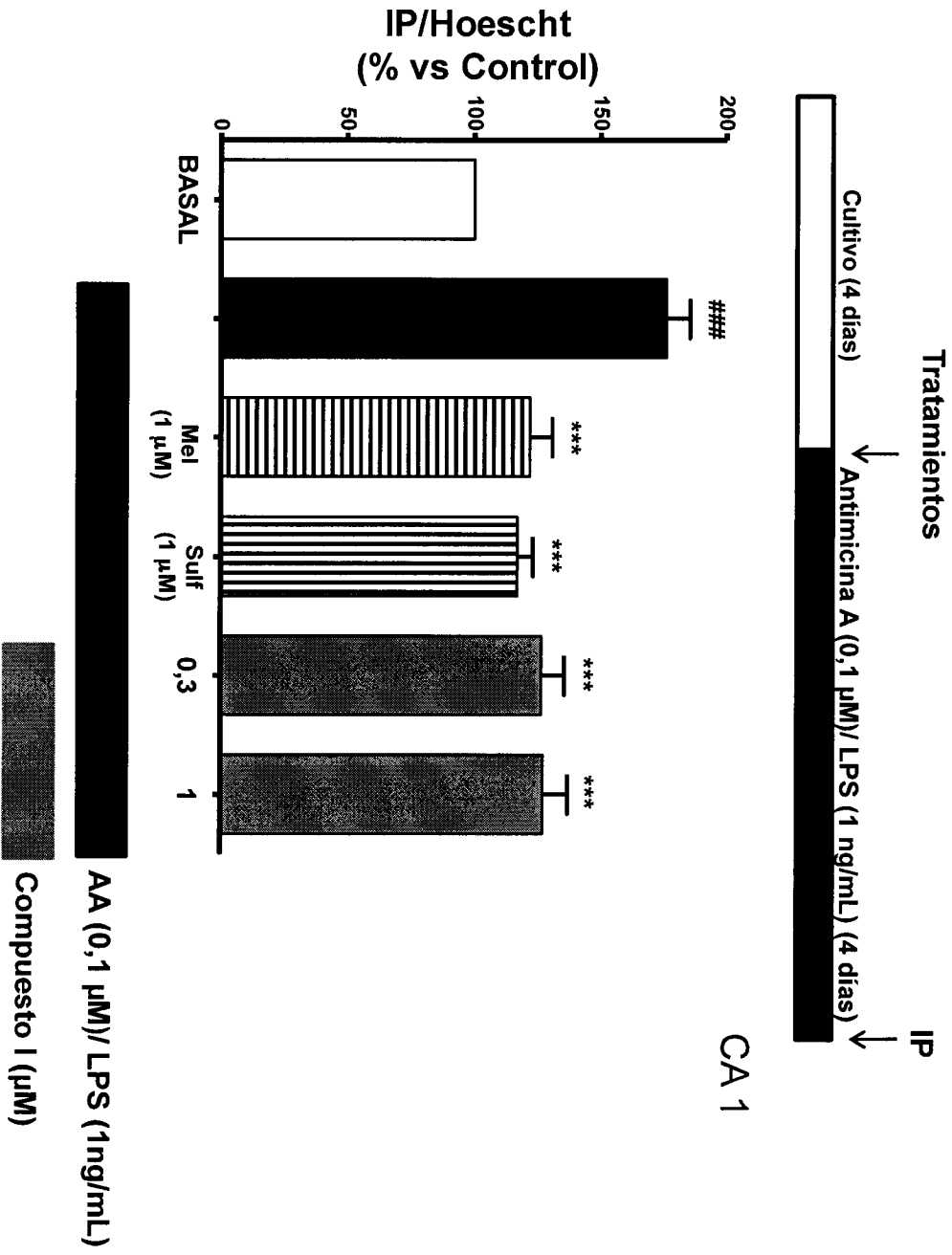


Figura 4



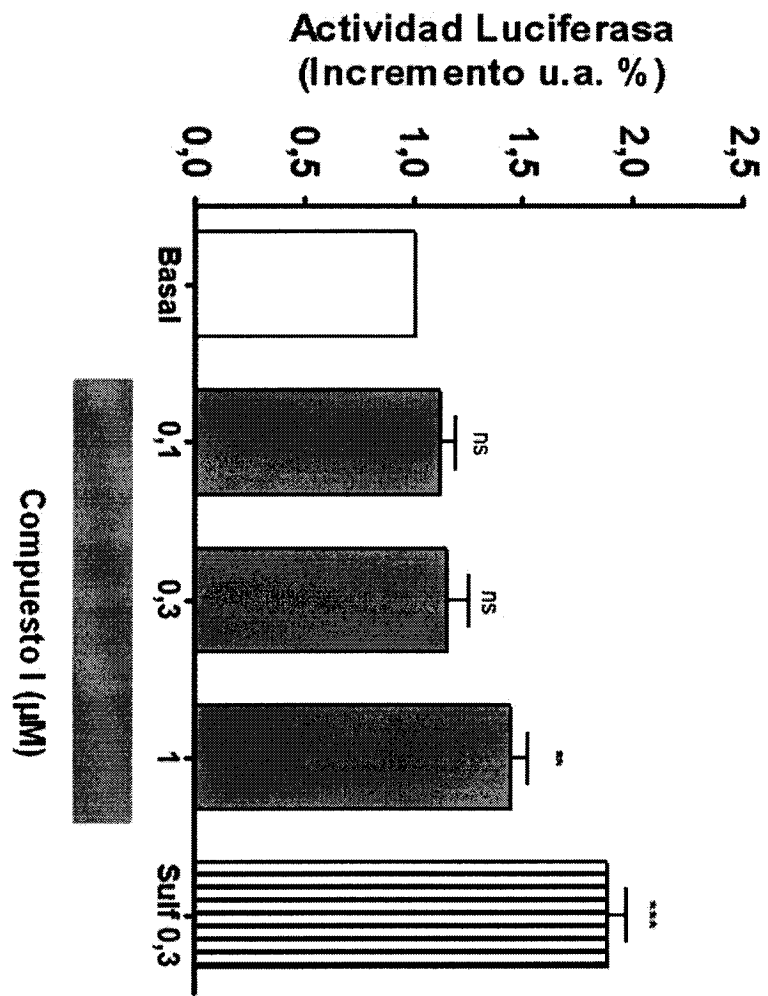


Figura 5

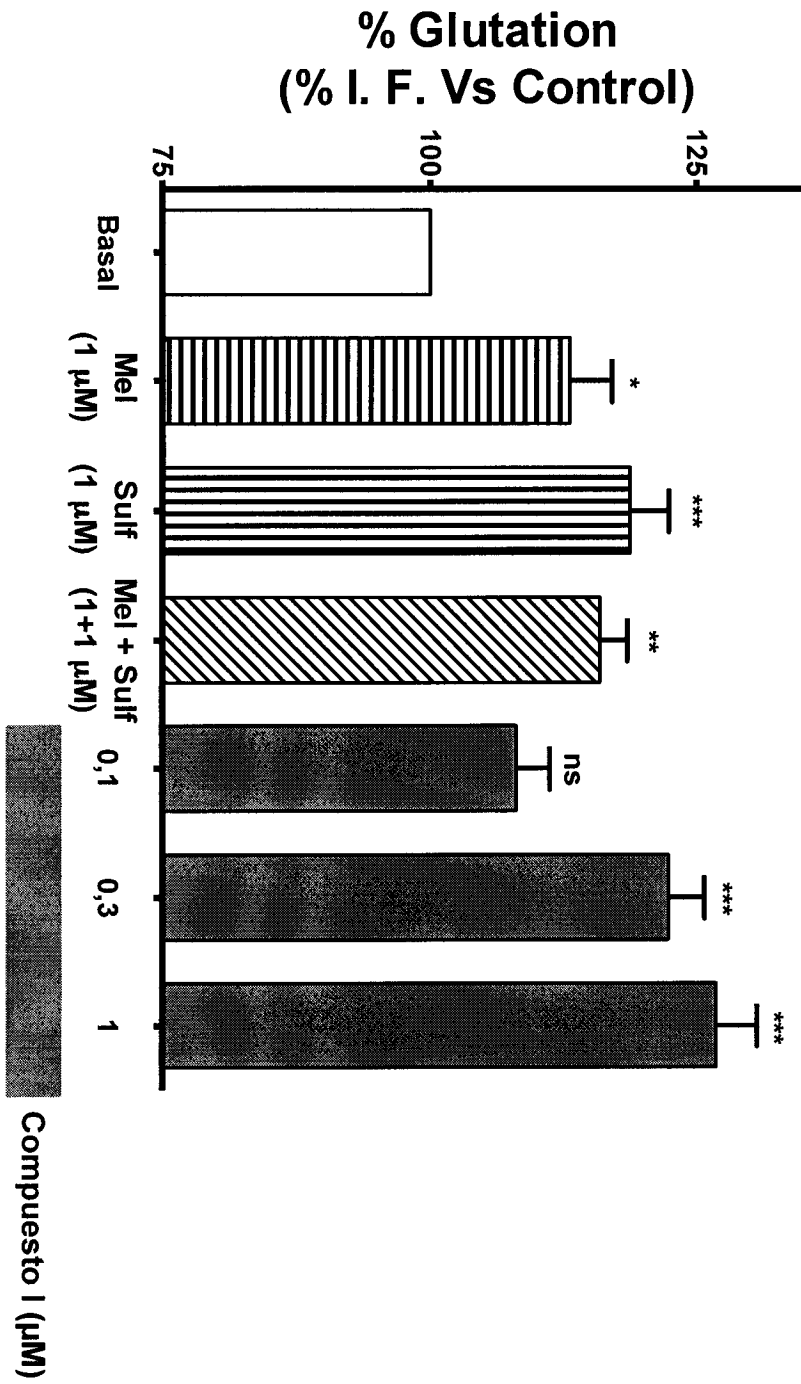


Figura 6

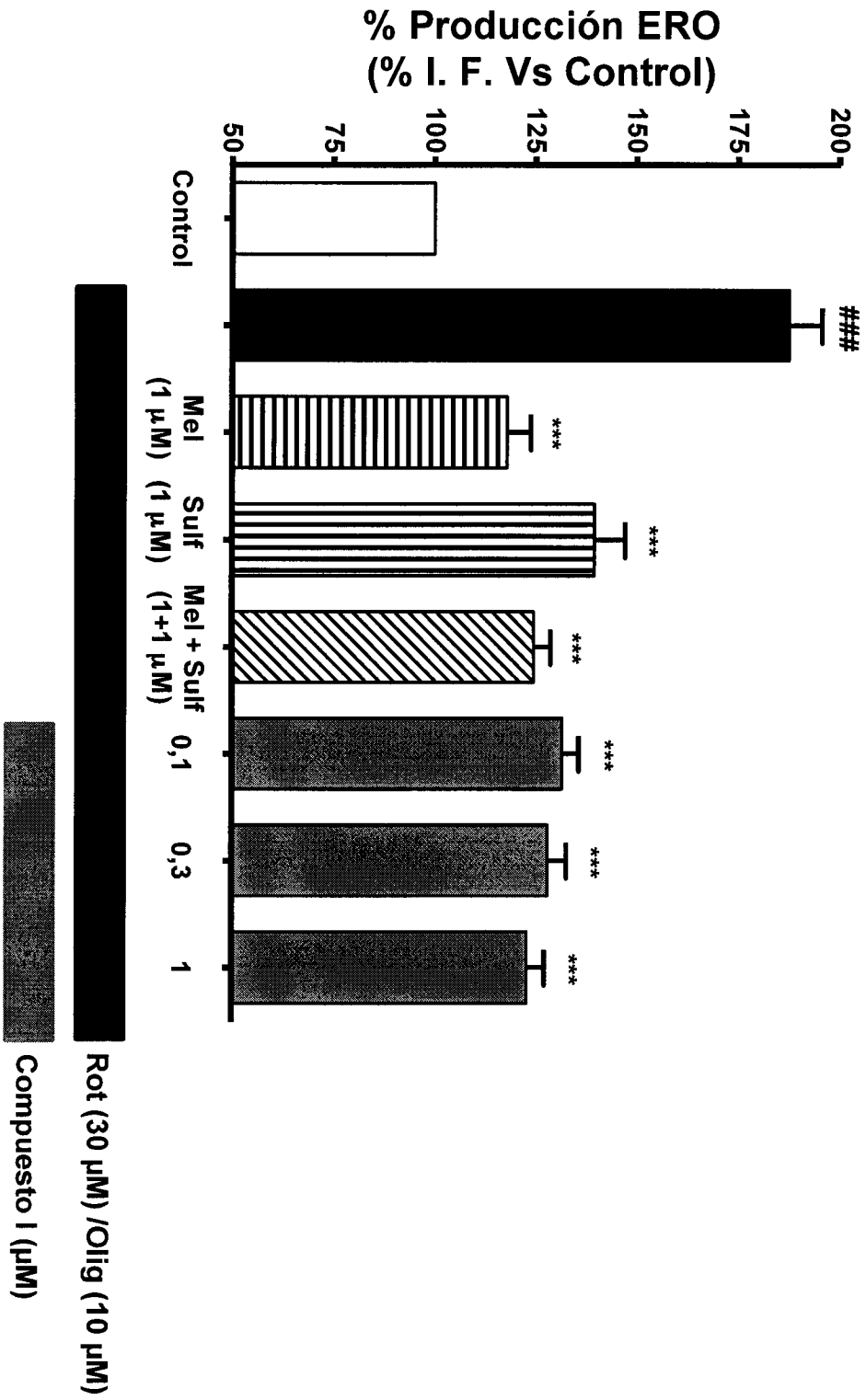
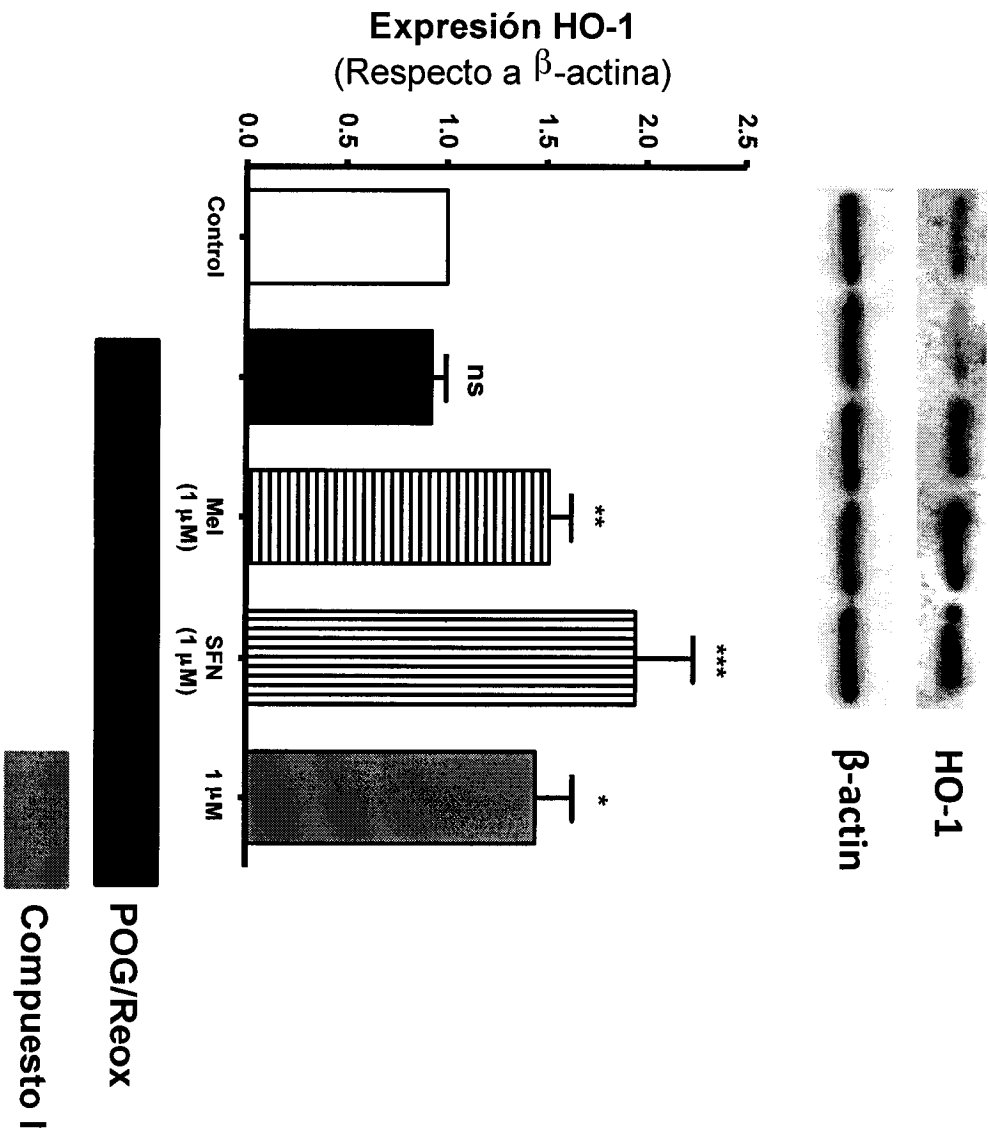


Figura 7





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201300667

②② Fecha de presentación de la solicitud: 17.07.2013

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K31/404** (2006.01)
A61P25/28 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2008097596 A2 (BIOGEN IDEC INC et al.) 14.08.2008, párrafos 8-10.	1-12
A	KESINGER N G et al. Covalent interaction of ascorbic acid with natural products. PHYTOCHEMISTRY, 20091201 PERGAMON PRESS, GB 01.12.2009 VOL: 70 No: 17-18 Págs: 1930-1939 ISSN 0031-9422 Doi: doi:10.1016/j.phytochem.2009.09.028, página 1932, último párrafo, fórmula 12.	1-12
A	KOHLE C et al. Activation of coupled Ah receptor and Nrf2 gene batteries by dietary phytochemicals in relation to chemoprevention. Biochemical Pharmacology, 20060928 Elsevier, US 28.09.2006 VOL: 72 No: 7 Págs: 795-805 ISSN 0006-2952 Poirot Marc; Silvente-Poirot Sandrine, página 799, apartado 3, figura 3.	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
14.11.2014

Examinador
H. Aylagas Cancio

Página
1/4

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

A61K, A61P

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

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, XPESP2, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 14.11.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2008097596 A2 (BIOGEN IDEC INC et al.)	14.08.2008
D02	KESINGER N G et al. Covalent interaction of ascorbic acid with natural products.PHYTOCHEMISTRY, 20091201 PERGAMON PRESS, GB 01.12.2009 VOL: 70 No: 17-18 Págs: 1930-1939 ISSN 0031-9422 Doi: doi:10.1016/j.phytochem.2009.09.028, página 1932, último párrafo, fórmula 12.	01.12.2009
D03	KOHLÉ C et al. Activation of coupled Ah receptor and Nrf2 gene batteries by dietary phytochemicals in relation to chemoprevention. Biochemical Pharmacology, 20060928 Elsevier, US 28.09.2006 VOL: 72 No: 7 Págs: 795-805 ISSN 0006-2952 Poirot Marc; Silvente-Poirot Sandrine, página 799, apartado 3, figura 3.	28.09.2006

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

La presente solicitud se refiere al uso de un compuesto de fórmula I para la preparación de medicamentos con efecto inductor de Nrf2 y/o antioxidante y/o neuroprotector y/o inmunomodulador para el tratamiento preventivo o terapéutico de las enfermedades neurodegenerativas tales como Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerosis múltiple, etc.

En el documento D1 se cita que como inductores de Nrf2 se identifican entre otros los derivados de isotiocianato, y su acción sobre las enfermedades neurodegenerativas tales como Alzheimer, Parkinson y de Huntington (ver párrafos 8-10 del documento D1). En los documentos D2 (ver página 1932, último párrafo) y D3 (ver apartado 3 de la página 799) se cita que el efecto inductor sobre la transcripción del factor Nrf2 se debe entre otros a la presencia del grupo isotiocianato.

Sin embargo en ninguno de los documentos anteriores se hace referencia específicamente a los compuestos de fórmula I referidos en la presente solicitud.

Por lo tanto, a la vista de los documentos D1-D3 la materia correspondiente a las reivindicaciones 1-12 de la presente solicitud tiene novedad y actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.