

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 901 059**

51 Int. Cl.:

A61K 31/427 (2006.01)

A61K 31/404 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.08.2017 PCT/KR2017/008569**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.02.2018 WO18030762**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2017 E 17839780 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.10.2021 EP 3498277**

54 Título: **Composición farmacéutica para el tratamiento de apoplejía basado en la inhibición de AMPK**

30 Prioridad:

09.08.2016 KR 20160101093

03.08.2017 KR 20170098417

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.03.2022

73 Titular/es:

**ZINCURE CORP. (100.0%)
1126, Chungmu-center, 209, Neungdong-ro,
Gwangjin-gu
Seoul 05006, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, YANG HEE;
PARK, HWANG SEO;
KOH, JAE YOUNG;
EOM, JAE WON;
KIM, TAE YOUN y
SEO, BO RA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 901 059 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

Composición farmacéutica para el tratamiento de apoplejía basado en la inhibición de AMPK

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de apoplejía y, más particularmente, a una composición farmacéutica novedosa para su uso en el tratamiento de apoplejía basada en la función inhibidora de AMPK.

La apoplejía se refiere a síntomas neurológicos locales que están causados por un trastorno repentino en el flujo sanguíneo cerebral. El cerebro representa solo el 2 % del peso corporal total, pero al caudal sanguíneo que llega al cerebro es tan alto como aproximadamente el 15 % del gasto cardíaco, mientras que el consumo de oxígeno del cerebro se acerca al 20 % del consumo de oxígeno del cuerpo entero. Además, dado que el cerebro usa solo glucosa como fuente de energía, experimenta necrosis fácilmente incluso si el suministro de energía se interrumpe por un momento. Por lo tanto, el flujo sanguíneo cerebral está estrechamente relacionado con el daño cerebral. El daño cerebral causado por una apoplejía involucra diversos mecanismos de toxicidad tales como excitotoxicidad, agresión oxidativa, apoptosis y neurotoxicidad por cinc, por lo tanto, se necesita un fármaco eficaz para todas las diversas propiedades neurotóxicas para prevenir el daño cerebral.

Actualmente, aunque se han realizado muchos estudios para el tratamiento de apoplejía, aún no se han desarrollado medicamentos específicos. La lesión por isquemia-reperfusión requiere un sistema de evaluación objetivo, tal como modelos *in vitro* o modelos animales, para el desarrollo de fármacos y la evaluación del efecto de los mismos en base a diferentes mecanismos complejos de muerte celular neuronal. Sin embargo, los métodos para la evaluación de un cambio en los signos vitales o los efectos secundarios del tratamiento con medicamentos están muy restringidos en una etapa de estudio preclínico, por lo que es probable que fracasen debido a los efectos adversos durante los ensayos clínicos. En particular, se han realizado muchos estudios clínicos con respecto a los antagonistas de NMDA, pero todos los esfuerzos fueron infructuosos. A este respecto, la patente coreana con nº de registro 1283416 divulga un método neuroprotector que reduce significativamente el tamaño de una parte infartada al administrar el compuesto C inhibidor de AMPK o el inhibidor C75 de FAS a un ratón, para conservar las funciones después de una apoplejía o lesión isquémica.

La publicación internacional WO 2009/078586 A1 divulga una composición para la prevención y el tratamiento de cáncer, que contiene derivados de fenil-amino-tiazolona que inhiben la actividad de las proteína fosfatasa o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas como ingrediente activo.

El documento US 2009/088432 A1 divulga tiazolinonas y oxazolinonas y su uso como inhibidores de Ptp1b.

La publicación internacional WO 2015/167246 A1 divulga una composición farmacéutica y un método para tratar apoplejía basándose en la función de supresión de AMPK.

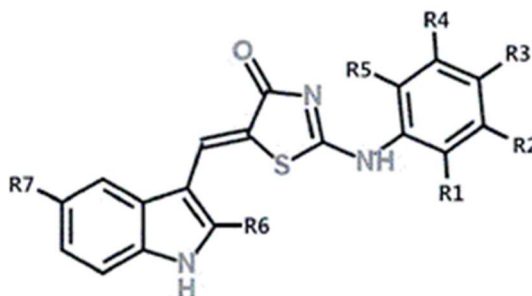
LI J ET AL., NEUROSCIENCE, ELSEVIER, ÁMSTERDAM, NL, vol. 482, nº 1, ISSN 0304-3940, (20100920), páginas 62 - 65, describe que la inhibición de la proteína cinasa activada por monofosfato de adenosina es protectora en ambos sexos después de apoplejía experimental.

JAE-WON EOM ET AL., ACS CHEMICAL NEUROSCIENCE, EE. UU., (20190214), vol. 10, nº 5, doi: 10.1021/acschemneuro.8b00654, ISSN 1948-7193, páginas 2345 - 2354, identifica inhibidores de la proteína cinasa activada por AMP.

Sin embargo, la técnica anterior previa ha demostrado efectos protectores de los pares craneales de los animales modelo de isquemia únicamente, pero no garantiza efectos terapéuticos sobre apoplejía debida a otros mecanismos excepto isquemia. Por lo tanto, la presente invención sirve para resolver varios problemas, incluyendo el mencionado anteriormente, y es un objeto de la presente invención proporcionar un medicamento novedoso para apoplejía basado en la inhibición eficaz de AMPK en apoplejía mediante una variedad de mecanismos.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de apoplejía, que incluye un compuesto que tiene una estructura representada por la fórmula I a continuación como ingrediente activo:

[Fórmula I]



en la que R₁ a R₅ son cada uno independientemente hidrógeno, hidroxilo, halógeno, alquilo C₁ a C₇ sustituido o no sustituido, alcoxi C₁ a C₇ sustituido o no sustituido, grupo amina o carboxilo, o de lo contrario, R₂ y R₃ juntos forman un anillo -O- (CH₂)_n-O- o un anillo de benceno sustituido o no sustituido, en el que n es un número entero de 1 a 3; R₆ es hidrógeno o un grupo metilo; y R₇ es hidrógeno o un halógeno. En la composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de apoplejía, el grupo alquilo sustituido es un grupo trifluorometilo y el halógeno incluye yodo, bromo o cloro.

De acuerdo con una realización de la presente invención descrita anteriormente, el uso de un nuevo compuesto para inhibir la actividad AMPK de la neurotoxicidad por cinc como causa principal de apoplejía puede lograr el tratamiento de apoplejía.

La figura 1 representa (A) fotografías que demuestran un aumento de la neurotoxicidad después de tratamiento con cinc de neuronas cultivadas de la corteza cerebral identificadas mediante tinción TUNEL; y (B) y (C) gráficos que muestran un grado de citotoxicidad después del tratamiento usando el compuesto C (+ comp. C) como inhibidor de AMPK, que se cuantificaron mediante tinción TUNEL, así como ensayo de LDH (B y C).

La figura 2 es (A) una fotografía de transferencia de Western que demuestra un aumento en la actividad de AMPK después de tratamiento con cinc de neuronas cultivadas de la corteza cerebral; y (B) un gráfico de ensayo de actividad enzimática.

La figura 3 es (A) una fotografía de transferencia de Western que demuestra la observación de una expresión aumentada de Bim y actividad de caspasa-3, siendo ambos genes promotores de la apoptosis, después de tratamiento con cinc de las neuronas de cultivadas la corteza cerebral; y (B) una fotografía de transferencia de Western que demuestra que los aumentos en la expresión de Bim y la actividad de caspasa-3 se atenuaron después del tratamiento usando compuesto C (+ comp. C) como inhibidor de AMPK.

La figura 4 es un gráfico que muestra que, después de medir la actividad enzimática mediante el kit de ensayo de actividad de AMPK (CycLex, Japón) y una AMPK recombinante (α2/β1/γ1; CycLex, Japón) adquirida en el mercado, y luego, comparando la misma con los efectos de compuesto C, se seleccionaron 40 compuestos candidatos que mostraban efectos de inhibición similares o más fuertes.

La figura 5 es gráficos que muestran los resultados observados para la inhibición de diferentes neurotoxicidades induciendo dicha neurotoxicidad en las neuronas cultivadas de la corteza cerebral, y luego, usando los 7 compuestos seleccionados para el tratamiento, seguido de la cuantificación del grado de citotoxicidad a través del ensayo de LDH.

La figura 6 es gráficos que muestran la observación de los efectos inhibidores del daño cerebral al administrar el fármaco nº 28 finalmente seleccionado a un modelo animal que padece apoplejía, y dibujos que muestran resultados comparativos de un grado de daño cerebral final en los animales experimentales en comparación con un grupo de control.

La figura 7 es gráficos que muestran los resultados de una prueba de toxicidad aguda que incluye administrar el fármaco nº 28 finalmente seleccionado a una rata y luego extraer un bazo (A), hígado (B) y riñón (C).

La figura 8 es un gráfico que muestra la observación de los efectos neuroprotectores sobre la neurotoxicidad por cinc en cultivos neuronales corticales de ratón mediante la administración de 25 compuestos similares, que se seleccionaron después de buscar compuestos que tuvieran una estructura similar a la del fármaco nº 28 previamente seleccionado.

La figura 9 es un gráfico que muestra la observación de los efectos neuroprotectores seleccionando 12 fármacos que presentan efectos farmacológicos significativos sobre la toxicidad del cinc, y luego, usando los mismos para tratar las neuronas de la corteza cerebral de ratón que tienen neurotoxicidad inducida por NMDA.

La figura 10 es un gráfico que muestra la observación de efectos neuroprotectores al tratar las neuronas de la corteza cerebral de un ratón que tiene neurotoxicidad inducida por H_2O_2 usando los 12 fármacos seleccionados.

La figura 11 es gráficos que muestran los resultados analizados de la concentración de cinc libre mediante un medidor de pZn después del tratamiento de células neuronales usando el fármaco nº 28 de la presente invención y clioquinol a diferentes concentraciones.

La figura 12 es un gráfico que muestra los resultados analizados de un cambio en las concentraciones de cinc libre aplicando Newport Green DCF ($K_d(Zn) = 1 \mu M$) como tinte fluorescente después del tratamiento usando cinc, clioquinol y el fármaco nº 28 en un tubo de ensayo.

La figura 13 es un gráfico que muestra los resultados analizados de un cambio en las concentraciones de cinc libre aplicando FluoZin-3 ($K_d(Zn) = 15 nM$) como tinte fluorescente después del tratamiento usando cinc, clioquinol y el fármaco nº 28 en un tubo de ensayo.

La figura 14 es (A) un gráfico que muestra los resultados analizados de los efectos inhibidores de nº 28 sobre la neurotoxicidad mediada por cinc por clioquinol o piritona; y (B) es un gráfico que muestra los resultados analizados de los efectos inhibidores de nº 28 o clioquinol como quelante de cinc sobre la neurotoxicidad intracelular liberada por cinc mediante DTDP.

La figura 15 es (A) fotografías que demuestran la observación de células neuronales mediante microscopia láser confocal usando tinte FluoZin-3 después del tratamiento de las células neuronales usando el fármaco nº 28; y (B) un gráfico que muestra los resultados del análisis cuantitativo de la magnitud de la fluorescencia de FluoZin-3 después del tratamiento de 4C01, 4C07 o el fármaco nº 28.

La figura 16 es un gráfico que muestra los resultados analizados de si la neurotoxicidad por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) disminuye mediante un quelante de cinc tal como TPEN o CaEDTA, pero no con un quelante de calcio tal como ZnEDTA, respectivamente.

La figura 17 es fotografías que demuestran la observación de los efectos inhibidores de TPEN, los fármacos nº 28, 4C01 o 4C07 sobre los aumentos intracelulares de cinc mediados por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por tinción con FluoZin-3.

La figura 18 es un gráfico que muestra el efecto protector del fármaco nº 28 a diferentes concentraciones sobre la neurotoxicidad por ionomicina, un ionóforo de calcio.

La figura 19 es un gráfico que muestra los resultados analizados de los efectos de quelación del calcio usando tinte Fura-2 como material fluorescente después del tratamiento usando el fármaco nº 28 o EDTA en un tubo de ensayo.

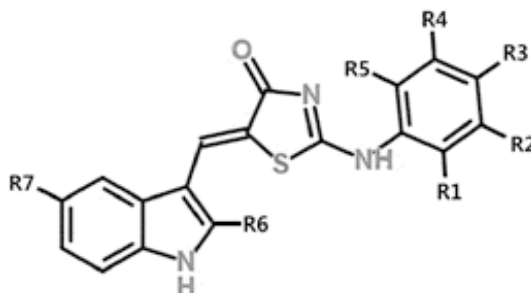
La figura 20 es (A) un gráfico que muestra el efecto inhibidor del cinc, el fármaco nº 28 o clioquinol sobre la actividad de caspasa-3 inducida por TPEN en cultivos corticales de ratón; y (B) un gráfico que muestra la atenuación de la neurotoxicidad inducida por TPEN (secreción de LDH) por cinc, el fármaco nº 28 o clioquinol.

La figura 21 es un gráfico que muestra los resultados analizados de un cambio en las concentraciones de cinc dentro de las células neuronales al clasificar una solución de cultivo de células neuronales en un medio de cultivo simple, un medio de cultivo complementado con cinc y un medio de cultivo sin cinc, tratando los mismos con clioquinol y el fármaco nº 28 y luego aplicando ZinPyr-1 como material fluorescente.

Como se usa en la presente memoria, "proteína cinasa activada por AMP (AMPK)" es una proteína trimérica heteróloga que consiste en una subunidad α catalítica ($\alpha 1$ o $\alpha 2$) y dos subunidades de control (β y γ). La AMPK se fosforila y activa a un nivel de energía celular bajo mientras regula la expresión génica durante un largo período de tiempo controlando el metabolismo de las células, restaurando de ese modo el nivel de ATP. Se sabe que un aumento en la relación de AMP/ATP, un cambio en el pH de las células y en el estado de oxidorreducción y un aumento en la relación de creatina/fosfocreatina activarían AMPK.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de apoplejía, que incluye un compuesto representado por la fórmula I a continuación como ingrediente activo:

[Fórmula I]



en la que R₁ a R₅ son cada uno independientemente hidrógeno, hidroxilo, halógeno, alquilo C₁ a C₇ sustituido o no sustituido, alcoxi C₁ a C₇ sustituido o no sustituido, grupo amina o carboxilo, o de lo contrario, R₂ y R₃ juntos forman un anillo -O-(CH₂)_n-O- o un anillo de benceno sustituido o no sustituido, en el que n es un número entero de 1 a 3; R₆ es hidrógeno o un grupo metilo; y R₇ es hidrógeno o un halógeno.

En la composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de apoplejía, el grupo alquilo sustituido es un grupo trifluorometilo y el halógeno incluye yodo, bromo o cloro.

En la composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de apoplejía, el compuesto puede incluir, por ejemplo, (5Z)-5-(1H-indol-3-ilmetilen)-2-[[2-(trifluorometil)fenil]amino]-1,3-tiazol-4(5H)-ona, (5Z)-5-(1H-indol-3-ilmetilen)-2-[[3-(trifluorometil)fenil]amino]-1,3-tiazol-4(5H)-ona, (5Z)-2-[[3-bromofenil]amino]-5-(1H-indol-3-ilmetilen)-1,3-tiazol-4(5H)-ona, (5Z)-5-(1H-indol-3-ilmetilen)-2-[[4-metilfenil]amino]-1,3-tiazol-4(5H)-ona, (5Z)-5-(1H-indol-3-ilmetilen)-2-[[3-metilfenil]amino]-1,3-tiazol-4(5H)-ona, (5Z)-2-anilino-5-(1H-indol-3-ilmetilen)-1,3-tiazol-4(5H)-ona, (5E)-5-[(2-metil-1H-indol-3-il)metilen]-2-[[4-metilfenil]amino]-1,3-tiazol-4(5H)-ona, ácido 3-[[5-(1H-indol-3-ilmetilen)-4-oxo-4,5-dihidro-1,3-tiazol-2-il]amino]benzoico, ácido 2-[[5-(1H-indol-3-ilmetilen)-4-oxo-4,5-dihidro-1,3-tiazol-2-il]amino]benzoico, (5Z)-2-[(2-clorofenil)amino]-5-[(2-metil-1H-indol-3-il)metilen]-1,3-tiazol-4(5H)-ona o ácido 2-hidroxi-5-[[5-(1H-indol-3-ilmetilen)-4-oxo-4,5-dihidro-1,3-tiazol-2-il]amino]benzoico.

En la composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de apoplejía, la apoplejía puede incluir, por ejemplo, apoplejía hemorrágica, apoplejía isquémica o apoplejía por toxicidad por metales, en la que el metal puede incluir plomo (Pb), mercurio, manganeso, arsénico, talio, hierro, cinc, cadmio, bismuto o estaño. La apoplejía isquémica puede estar causada por muerte neuronal excitadora o muerte neuronal oxidativa.

Una cantidad eficaz del compuesto en la composición farmacéutica de la presente invención puede variar dependiendo de los tipos de partes afectadas del paciente, el lugar de aplicación, el proceso de recuperación, el tiempo de tratamiento, la forma de dosificación, el estado del paciente, los tipos de adyuvante, etc. La dosis no está particularmente limitada, pero puede variar de 0,01 µg/kg/día a 10 mg/kg/día. La dosificación por día puede incluir la administración una vez al día, de 2 a 3 veces al día en un intervalo apropiado o la administración intermitente en un intervalo de varios días.

En la composición farmacéutica de la presente invención, la cantidad eficaz del compuesto puede variar de un 0,1 a un 100 % en peso ("%" en peso) basado en el peso total de la composición. La composición farmacéutica de la presente invención puede incluir además vehículos, excipientes y diluyentes adecuados usados convencionalmente para fabricar una composición farmacéutica. Además, la fabricación de la composición farmacéutica puede incluir además la adición de un aditivo para formulaciones sólidas o líquidas. Dichos aditivos para formulación pueden ser orgánicos o inorgánicos.

El excipiente puede incluir, por ejemplo, lactosa, sacarosa, azúcar blanco, glucosa, almidón de maíz, almidón, talco, sorbitol, celulosa cristalina, dextrina, caolín, carbonato de calcio, dióxido de silicio, etc. El aglutinante puede incluir, por ejemplo, poli(alcohol vinílico), poli(éter vinílico), etilcelulosa, metilcelulosa, goma arábica, tragacanto, gelatina, goma laca, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, ácido cítrico, calcio, dextrina, pectina, etc. El lubricante puede incluir, por ejemplo, estearato de magnesio, talco, polietilenglicol, sílice, aceite vegetal endurecido, etc. El agente colorante puede incluir uno cualquiera de los usados habitualmente en la técnica, siempre que se haya permitido como aditivo utilizable para medicamentos. Los comprimidos o gránulos de los mismos pueden recubrirse adecuadamente con recubrimiento de azúcar, recubrimiento de gelatina y otros recubrimientos apropiados, según lo necesario. Además, también se puede añadir un conservante, un antioxidante, etc., según lo necesario.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede fabricar en cualquier formulación que se prepare

convencionalmente en la técnica (por ejemplo, bibliografía [Remington's Pharmaceutical Science, última edición; Mack Publishing Company, Easton PA]), el tipo de dicha preparación no está particularmente limitado. Las formulaciones se han descrito en la bibliografía de prescripción conocida en general en las aplicaciones farmacéuticas y químicas, es decir, Remington's Pharmaceutical Science, 15.^a edición, 1975, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania 18042 (Capítulo 87: Blaug, Seymour).

El compuesto en la composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse por vía oral o tópica y, preferiblemente, administración tópica (o parenteral) incluyendo, por ejemplo, inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intracerebroventricular, inyección dentro del líquido cefalorraquídeo (LCR), inyección intramuscular e inyección intraperitoneal.

La presente invención se describirá con más detalle mediante los siguientes ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se limita particularmente a las realizaciones expuestas en la presente memoria, sino que puede realizarse de muchas formas diferentes. Por lo tanto, los siguientes ejemplos se proporcionan para describir más completamente la presente invención.

Método general

Cultivo de neuronas de la corteza cerebral

Las neuronas de la corteza cerebral de un ratón usadas en la presente invención se extrajeron del cerebro de embriones de ratón y se cultivaron, seguido de un cultivo adicional de las mismas usando un medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco, Grand Island, NY, EE. UU.) que contenía un 5 % de suero fetal bovino (FBS) y un 5 % de suero de caballo (HS) en condiciones de un 95 % de humedad, un 5 % de CO₂ y 37 °C de temperatura. Para la activación y diferenciación de las células anteriores, estas células se hicieron proliferar a una densidad de 2 x 10⁴ células en placa de histocultivo de 24 pocillos. Además, antes del tratamiento con cinc y los compuestos, las células se incubaron en medio MEM sin FBS ni HS.

Ejemplo 1: Determinación de la reducción de la toxicidad celular por el inhibidor de AMPK

De acuerdo con una realización de la presente invención, la toxicidad por cinc es uno de los mecanismos representativos que causan apoplejía, y se investigó si la toxicidad por cinc derivada en las neuronas cultivadas de la corteza cerebral se reduce o no mediante el tratamiento con inhibidor de AMPK.

Más particularmente, las neuronas cultivadas de la corteza cerebral de acuerdo con la realización de la presente invención se trataron con cinc 300 µM (ZnCl₂) durante 10 minutos y luego se retiraron. Después de 10 horas, se observó citotoxicidad mediante tinción TUNEL o LDH (lactato deshidrogenasa). Además, estas células se trataron con inhibidor de AMPK, es decir, compuesto C 20 µM (+ comp. C, Tocris), seguido de la observación de si la neurotoxicidad se reduce o no.

Como resultado, las neuronas de la corteza cerebral después del tratamiento con cinc mostraron un aumento de la neurotoxicidad, que se demostró mediante la tinción TUNEL (figura 1A). Se cuantificó un grado de citotoxicidad mediante tinción TUNEL y ensayo de LDH. Además, el inhibidor de AMPK, es decir, el compuesto C (+comp. C) demostró que la neurotoxicidad por cinc se reducía significativamente (figuras 1B y 1C).

Ejemplo 2: Observación de la actividad de AMPK después del tratamiento con cinc

Para comprender una correlación entre la toxicidad por cinc y la actividad enzimática de AMPK de acuerdo con una realización de la presente invención, las neuronas de la corteza cerebral se trataron con cinc, seguido de la observación de la actividad de AMPK mediante transferencia de Western y ensayos de actividad enzimática.

2-1: Transferencia de Western

Las neuronas cultivadas de la corteza cerebral se trataron con cinc 300 µM (ZnCl₂) durante 10 minutos y luego se retiraron. Después de 0,5, 1, 2, 4 y 6 horas, la muestra de células obtenida se cargó en gel de poliacrilamida junto con una escala de proteínas, seguido de una separación basada en el tamaño de la proteína. Posteriormente, la muestra se trató con un anticuerpo, se lavó y se leyó.

Como resultado, se observó que los residuos de treonina de AMPK alfa-1 y alfa-2 estaban fosforilados. Esto significa activación de AMPK, es decir, AMPK fosforilada. Sin embargo, no se observó fosforilación de otros residuos de serina (figura 2A).

2-2: Ensayo de actividad enzimática

En las mismas condiciones descritas anteriormente, las neuronas de la corteza cerebral se trataron con cinc y se obtuvieron extractos de proteínas a las 0,5, 1, 2, 4 y 6 horas después del tratamiento, seguido de la medición de la actividad enzimática usando un kit de ensayo de actividad de AMPK (CycLex, Japón).

Como resultado, se observó que la actividad de la enzima AMPK de acuerdo con el tratamiento con cinc tiene un

aumento dependiente del tiempo (figura 2B).

Ejemplo 3: Actividad inhibidora de la toxicidad por cinc a través de la inhibición de la actividad de AMPK

De acuerdo con una realización de la presente invención, para determinar si un aumento en la actividad enzimática está asociado con la apoptosis, las neuronas de la corteza cerebral se trataron con cinc y se observaron.

5 Más particularmente, las neuronas de la corteza cerebral se trataron con cinc 300 μ M ($ZnCl_2$) durante 2, 3, 4, 5 y 6 horas para inducir la toxicidad por cinc. De cada muestra, se separó la proteína y se sometió a transferencia de Western y tratamiento usando compuesto C 20 μ M (+ comp. C) como inhibidor de AMPK, para identificar una relación entre la toxicidad por cinc y la apoptosis.

10 Como resultado, a partir de las 3 horas posteriores al tratamiento con cinc, uno de la familia Bcl de solo BH3, que es una proteína promotora de la apoptosis ("proteína proapoptótica"), es decir, Bim, mostró un aumento en la expresión. Además, también se observó la forma activa escindida de caspasa-3 (figura 3A). Sin embargo, se descubrió que el tratamiento usando un inhibidor de AMPK tal como compuesto C puede reducir tanto el aumento de la actividad de caspasa-3 como el aumento de Bim causado por la toxicidad por cinc (figura 3B). Por lo tanto, se entiende que la enzima AMPK está asociada con la apoptosis en el mecanismo de toxicidad por cinc, y la inhibición de la actividad enzimática de AMPK significa inhibir la apoptosis causada por la toxicidad por cinc.

Ejemplo 4: Cribado del compuesto inhibidor de la actividad de AMPK y determinación de los efectos inhibidores

4-1: Cribado virtual basado en estructuras

Con respecto a los compuestos diana que pueden actuar como inhibidores de la actividad de AMPK, se llevó a cabo un cribado principal de acuerdo con una realización de la presente invención.

20 Más particularmente, se identificó que la actividad de AMPK sobre las investigaciones previas está involucrada en el mecanismo de toxicidad por cinc, y otros estudios han informado de aumentos en la actividad de AMPK y la expresión de Bim con respecto a los mecanismos excitotóxicos. La enzima AMPK es una enzima que actúa con una estructura compleja de tres subunidades α , β y γ en la que una subunidad alfa doble tiene actividad enzimática cinasa. A partir de los resultados de estudios existentes, se informó de que AMPK alfa2 inhibe significativamente la neurotoxicidad causada por isquemia en ratones con genes inactivados, al contrario que alfa1. Por consiguiente, la presente invención seleccionó sustancias químicas candidatas que posiblemente inhiben la actividad enzimática de AMPK a través de un cribado virtual basado en estructuras dirigido a alfa2, lo que da como resultado la selección de 208 compuestos candidatos.

4-2: Ensayo de actividad enzimática de AMPK

30 Los 208 compuestos candidatos seleccionados en el ejemplo 4-1 se obtuvieron de un fabricante de colecciones (Interbioscreen, Rusia) y se sometieron a un cribado secundario basado en la observación de sus efectos inhibidores de la actividad enzimática de AMPK.

Más particularmente, la actividad enzimática de AMPK se midió mediante un kit de ensayo de actividad de AMPK (CycLex, Japón) y AMPK recombinante ($\alpha 2/\beta 1/\gamma 1$ CycLex, Japón). Como resultado de medir los efectos inhibidores de la actividad enzimática de AMPK de los 208 compuestos seleccionados, así como del inhibidor de AMPK existente bien conocido en la técnica, es decir, el compuesto C, 40 tipos de fármacos a 10 μ M mostraron efectos de inhibición similares o mejores que el compuesto C. Estos 40 fármacos se muestran en la tabla 1 a continuación.

[TABLA 1]

ID del compuesto	Media (% de actividad restante)	ETM	ID del compuesto	Media (% de actividad restante)	ETM
nº 1	-1,2626	1,768	nº 22	-0,5291	0,000
nº 2	-1,7934	0,072	nº 23	1,0582	0,000
nº 3	-0,9684	0,036	nº 24	5,0505	5,051
nº 4	5,5556	0,265	nº 25	-0,1793	0,538
nº 5	4,2328	0,529	nº 26	-1,2554	0,036
nº 6	2,3810	0,794	nº 27	5,8201	0,000
nº 7	3,4392	0,265	nº 28	3,9683	1,852
nº 8	-0,2152	0,215	nº 29	0,0000	0,000
nº 9	0,5739	0,359	nº 30	1,0000	0,667
nº 10	-0,3945	0,179	nº 31	0,3641	0,850
nº 11	5,2910	0,529	nº 32	0,1257	0,126
nº 12	-1,3245	0,662	nº 33	2,9801	2,980

ID del compuesto	Media (% de actividad restante)	ETM	ID del compuesto	Media (% de actividad restante)	ETM
nº 13	-0,9684	0,681	nº 34	0,3143	0,556
nº 14	-0,1435	0,000	nº 35	0,1214	0,121
nº 15	5,0265	0,265	nº 36	0,2514	0,126
nº 16	6,3492	0,529	nº 37	7,3333	1,000
nº 17	2,9101	0,265	nº 38	5,6667	4,667
nº 18	2,9053	0,681	nº 39	1,667	3,333
nº 19	4,3400	1,614	nº 40	3,6667	0,000
nº 20	-1,7575	0,036	Compuesto C	5,3000	0,760
nº 21	0,8967	0,251			

4-3: Observación de los efectos inhibidores de los compuestos candidatos sobre la toxicidad por cinc

Mediante la observación de los efectos inhibidores de 40 compuestos seleccionados en el ejemplo 4-2 anterior sobre la neurotoxicidad por cinc, se llevó a cabo un cribado terciario.

- 5 Más particularmente, las neuronas cultivadas de la corteza cerebral de un ratón se expusieron brevemente a cinc 300 μ M durante 10 minutos y luego se trataron con los 40 fármacos seleccionados, respectivamente, para observar efectos neuroprotectores. Se cuantificó un grado de muerte neuronal de estas células mediante un ensayo de LDH en el que se promediaron los efectos de los fármacos individuales para dar como resultado un valor numérico, y se realizaron experimentos separados sobre cada uno de los fármacos seleccionados 4 veces, respectivamente (figura 4).
- 10 Como resultado, algunos compuestos inhibieron la toxicidad por cinc como se muestra en la figura 4 y se identificaron 7 compuestos entre ellos (nº 6, nº 11, nº 14, nº 17, nº 28, nº 35 y nº 37) que inhibían significativamente la toxicidad por cinc como se enumera en la tabla 2 a continuación.

[TABLA 2]

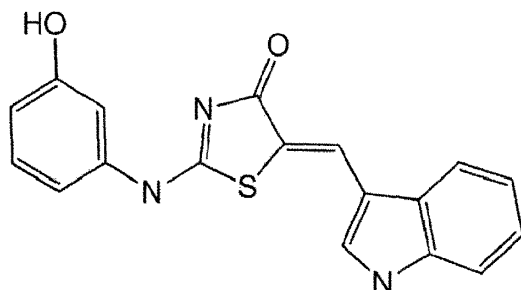
ID del compuesto	Significación	ID del compuesto	Significación
nº 1	0,5487	nº 22	0,0200
nº 2	0,8433	nº 23	0,8757
nº 3	0,5597	nº 24	0,8699
nº 4	0,0283	nº 25	0,4870
nº 5	0,9326	nº 26	0,6624
nº 6	0,0278	nº 27	0,3030
nº 7	0,0033	nº 28	0,0008
nº 8	0,0001	nº 29	0,1137
nº 9	0,8649	nº 30	0,2142
nº 10	0,1253	nº 31	0,1777
nº 11	0,0311	nº 32	0,7276
nº 12	0,0000	nº 33	0,2386
nº 13	0,4334	nº 34	0,1043
nº 14	0,0220	nº 35	0,0016
nº 15	0,2378	nº 36	0,0381
nº 16	0,2438	nº 37	0,0290
nº 17	0,0048	nº 38	0,3225
nº 18	0,3961	nº 39	0,0027
nº 19	0,7590	nº 40	0,0390
nº 20	0,8889	Compuesto C	0,0003
nº 21	0,6141		

4-4: Observación de efectos inhibidores sobre una variedad de neurotoxicidad

Mediante la observación de los efectos inhibidores de la neurotoxicidad de 7 compuestos seleccionados en el ejemplo 4-3 anterior, se llevó a cabo un cribado cuaternario.

Más particularmente, las neuronas cultivadas de la corteza cerebral de un ratón se trataron con NMDA 50 μ M, FeCl₂ 50 μ M, H₂O₂ 100 μ M, TPEN 2 μ M (N,N,N',N'-tetraquis(2-piridilmetil)etilendiamina, Sigma), estaurosporina 500 nM (Abcam) y etopósido 10 μ M (Sigma), respectivamente, para inducir neurotoxicidad, seguido de tratamiento usando los 7 compuestos seleccionados a una concentración de 20 μ M para observar efectos neuroprotectores. Se cuantificó un grado de apoptosis de estas células mediante un ensayo de LDH. Los modelos de neurotoxicidad usados anteriormente incluyen, por ejemplo, excitotoxicidad, daño oxidativo y apoptosis que se consideran mecanismo causante de apoplejía, en particular, el modelo de excitotoxicidad fue NMDA, el modelo de daño oxidativo fue modelos de toxicidad por hierro y toxicidad por H₂O₂, y el modelo de apoptosis fue TPEN, modelos de toxicidad de estaurosporina y etopósido. El TPEN es un quelante de cinc que es bien conocido por causar apoptosis típica en células neuronales, la estaurosporina es un inhibidor enzimático (inhibidor de cinasa) que también es bien conocido como uno de los materiales inductores de apoptosis típicos, y el etopósido es un fármaco conocido por causar apoptosis debido a daño del ADN.

Como resultado, después del tratamiento con los 7 fármacos seleccionados juntos, se observaron los efectos neuroprotectores debidos a una reducción de la neurotoxicidad. En particular, se descubrió que el compuesto nº 35 y el compuesto nº 28 representan efectos inhibidores sobre cualquier toxicidad (figura 5). El compuesto nº 28 obtenido del comprador de la colección se identificó como (Z)-5-((1H-indol-3-il)metilen)-2-((3-hidroxifenil)amino)tiazol-4(5H)-ona que tiene la siguiente estructura:



Ejemplo 5: Observación de los efectos inhibidores del daño cerebral en un modelo animal de apoplejía

Para determinar si el compuesto nº 28 finalmente seleccionado en el ejemplo 4-4 anterior es eficaz en modelos animales prácticos, se trató un modelo animal de apoplejía que tenía apoplejía inducida usando este compuesto y luego se sometió a investigación para determinar los efectos inhibidores del daño cerebral.

Más particularmente, se preparó un modelo de oclusión permanente de la arteria cerebral media (MCA) usando una rata macho Sprague-Dawley (SD) de 8 a 9 semanas de edad. En puntos de tiempo de 30 minutos antes de la MCAO y 10 minutos después de la misma, se midió el flujo sanguíneo cerebral (CBF) mediante un flujómetro láser-Doppler y los resultados medidos se muestran en la tabla 3 a continuación. Luego, 15 minutos después de la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO), se proporcionó el compuesto nº 28, que se selecciona finalmente como inhibidor de AMPK (75 ng/3 μ l), o un vehículo (DMSO al 10 %) en un área de 0,8 mm en el lomo y 1,2 mm en un lateral del bregma a una profundidad de 3,8 mm a través de inyección intracerebroventricular. Posteriormente, se evaluó un grado de falta de movimiento ("deficiencia motora") en la rata, en particular, los patrones de evaluación se clasifican de la siguiente manera (Lunga *et al.*, 1989): sin deficiencia (normal); fallo al extender las patas anteriores cuando se detiene verticalmente (leve); rotación en el lado opuesto (moderado); y pérdida de rotación (pérdida de capacidad de dar vueltas) o pérdida de movimiento reflejo (deficiencia grave). Después de la inducción de isquemia en el modelo de rata, se obtuvo el cerebro en el lapso de tiempo de 24 horas, seguido de la determinación del nivel de infarto cerebral mediante tinción del cerebro con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) al 2 %.

Como resultado, finalmente se identificó que el compuesto nº 28, como compuesto candidato final descubierto por la presente invención, puede inhibir significativamente el daño cerebral debido a la oclusión permanente de la arteria cerebral media (MCAO), que es uno de los modelos animales de apoplejía (figura 6).

[TABLA 3]

	Veh,	Inhibidor de AMPK
CBF (% de la línea base)	37,8+13,5	33,1+9,0
Reducción de peso (g)	48,3+4,7	43,8+6,1

Ejemplo 6: Ensayo de toxicidad aguda

Después de inyectar el compuesto finalmente seleccionado, es decir, el compuesto nº 28, se observaron los resultados de toxicidad aguda.

- 5 Más particularmente, el compuesto nº 28, que se selecciona finalmente como inhibidor de AMPK, o un vehículo (DMSO al 10 %) se proporcionó a ratas macho Sprague-Dawley (SD) en una cantidad de 75 µg/kg por rata a través de inyección intracerebroventricular. Este procedimiento se repitió 4 veces.

10 Como resultado, no se encontraron ratas muertas incluso después de transcurridas 24 horas. Además, se sacrificó la rata y se extrajeron órganos específicos tales como el hígado, el bazo y el riñón, seguido de la medición de los pesos de los mismos (figura 7). Además, después de tomar muestras de sangre, se controlaron algunos indicadores tales como WBC, RBC, BUN, AST, ALT, CREA y GLU, pero en comparación con los del grupo de control, la mayoría de estos indicadores fueron normales y no se observó toxicidad notable. Los resultados de los indicadores se muestran en la tabla 4 a continuación.

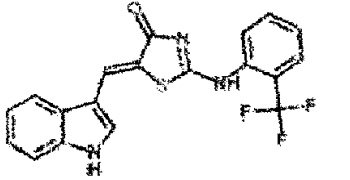
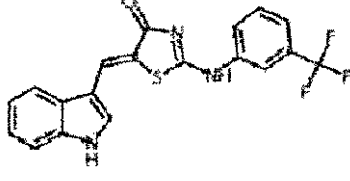
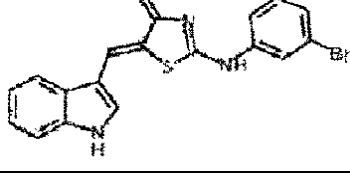
[TABLA 4]

	Intervalo normal	Veh. (n = 4)	Inhibidor de AMPK (n = 4)
WBCB (x 10 ³ células/ul)	6,6-12,6	11,0 ± 2,5	11,6 ± 1,9
RBC (x 10 ³ células/ul)	6,8-9,8	6,7 ± 0,4	7,4 ± 0,5
BUN (mg/dl)	5-21	16,1 ± 2,2	17,6 ± 1,8
AST (U/l)	45,7-80,8	121,7 ± 34,6	142,3 ± 50,7
ALT (U/l)	17,5-30,2	47,4 ± 10,1	54,5 ± 8,2
CREA (mg/dl)	0,2-0,8	0,5 ± 0, 0	0,5 ± 0,0
GLU (mg/dl)	50-135	174,6 ± 39, 5	174,6 ± 18,0

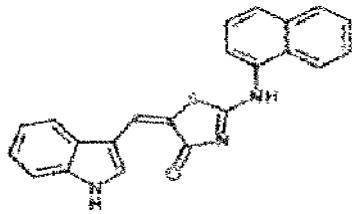
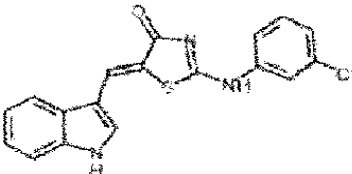
15 **Ejemplo 7: Búsqueda de compuestos similares y observación de los efectos inhibidores de la toxicidad por cinc**

Basándose en la similitud estructural del compuesto nº 28 finalmente seleccionado de acuerdo con una realización de la presente invención, se adquirieron 25 compuestos similares que tenían la estructura similar a la descrita anteriormente de InterBioScreen (Rusia) y Akos (Alemania). Luego, para inducir la toxicidad por cinc en las neuronas cultivadas de la corteza cerebral del ratón, las neuronas cultivadas se trataron con ZnCl₂ (400 µM) durante 10 minutos y, se trataron con los 25 compuestos seleccionados anteriormente, así como con el compuesto nº 28 seleccionado existente (20 µM), seguido de la observación de si estos compuestos inhiben la muerte celular o no a través del ensayo de viabilidad celular (Cell Counting Kit-8, Dojindo). Como resultado, a excepción de tres fármacos entre los 25 nuevos compuestos anteriores (4A02, 4B02 y 4D01), los 22 fármacos restantes mostraron efectos neuroprotectores (figura 8). Las denominaciones y estructuras de los 25 compuestos seleccionados se enumeran en la tabla 5 a continuación.

25 [TABLA 5]

Denominación clave	Fórmula estructural	Denominación según la IUPAC
4-A01		(5Z)-5-(1H-indol-3-ylmethyl)-2-((2-(trifluoromethyl)phenyl)amino)-1,3-tiazol-4(5H)-ona
4-A02		(5Z)-5-(1H-indol-3-ylmethyl)-2-((3-(trifluoromethyl)phenyl)amino)-1,3-tiazol-4(5H)-ona
4-A03		(5Z)-2-((3-bromophenyl)amino)-5-(1H-indol-3-ylmethyl)-1,3-tiazol-4(5H)-ona

Denominación clave	Fórmula estructural	Denominación según la IUPAC
4-A04		(5Z)-5-(1H-indol-3-ylmetilen)-2-[(4-metilfenil)amino]-1,3-tiazol-4(5H)-ona
4-A05		(5Z)-5-(1H-indol-3-ylmetilen)-2-[(3-metilfenil)amino]-1,3-tiazol-4(5H)-ona
4-A06		(5Z)-2-anilino-5-(1H-indol-3-ylmetilen)-1,3-tiazol-4(5H)-ona
4-A07		(5Z)-2-[(2,4-dimetilfenil)amino]-5-(1H-indol-3-ylmetilen)-1,3-tiazol-4(5H)-ona
4-A08		(5Z)-2-[(2-clorofenil)amino]-5-(1H-indol-3-ylmetilen)-1,3-tiazol-4(5H)-ona
4-B01		(5Z)-2-[(3,4-dimetilfenil)amino]-5-(1H-indol-3-ylmetilen)-1,3-tiazol-4(5H)-ona
4-B02		(5Z)-2-[(4-hidroxifenil)amino]-5-(1H-indol-3-ylmetilen)-1,3-tiazol-4(5H)-ona
4-B03		(5Z)-5-(1H-indol-3-ylmetileno)-2-[(2-metilfenil)amino]-1,3-tiazol-4(5H)-ona
4-B04		(5Z)-2-[(2,3-dimetilfenil)amino]-5-(1H-indol-3-ylmetilen)-1,3-tiazol-4(5H)-ona

Denominación clave	Fórmula estructural	Denominación según la IUPAC
4-B05		(5E)-5-(1H-indol-3-ylmethyl)-2-(1-naftilamino)-1,3-tiazol-4(5H)-ona
4-B06		(5Z)-2-[(3-clorofenil)amino]-5-(1H-indol-3-ylmethyl)-1,3-tiazol-4(5H)-ona

Ejemplo 8: observación del efecto inhibidor de la neurotoxicidad

Como resultado de la observación repetida de los efectos neuroprotectores de los 25 compuestos similares sobre la toxicidad por cinc de acuerdo con una realización de la invención, 12 fármacos mostraron efectos farmacológicos continuamente significativos. Para observar diferentes efectos inhibidores de la neurotoxicidad, se seleccionaron y usaron los 12 fármacos anteriores para el tratamiento.

Más particularmente, el modelo de neurotoxicidad para la observación de los efectos inhibidores de la neurotoxicidad incluye excitotoxicidad, daño oxidativo, etc. que se clasifican como un mecanismo causante de apoplejía. Se usó NMDA (N-metil-D-aspartato) como modelo de excitotoxicidad, mientras que el modelo oxidativo utilizado en la presente memoria fue un modelo de toxicidad por peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En primer lugar, usando NMDA (50 μM) o H_2O_2 (100 μM), las neuronas cultivadas de la corteza cerebral de un ratón se trataron durante 1,5 horas y 4,5 horas, respectivamente, dando como resultado la inducción de neurotoxicidad. Las neuronas se trataron adicionalmente con los 12 fármacos seleccionados (10 μM), así como con el fármaco seleccionado existente nº 28 (20 μM). Luego, después de teñir las neuronas con yoduro de propidio (PI), las células teñidas se cuantificaron para determinar un grado de muerte celular. Las células muertas se tiñen con PI ya que no tenían permeabilidad selectiva en una membrana plasmática de las mismas después de la tinción, mientras que las células sanas no se tiñen.

Como resultado, se identificó que, excepto por un solo fármaco (4B04, 4B07, 4B08), 9 fármacos mostraron efectos neuroprotectores al inhibir significativamente la neurotoxicidad inducida por NMDA (figura 9). Además, se observó que 10 fármacos distintos de dos fármacos (4B03, 4B04) inhibían significativamente la neurotoxicidad inducida por H_2O_2 (figura 10). Estos resultados demostraron que estos fármacos tienen efectos neuroprotectores iguales o superiores a los del fármaco nº 28 seleccionado previamente.

Ejemplo 9: Medición de la concentración de cinc libre

9-1: Medidor de pZn

Para medir los niveles de concentración de cinc libre, se usó el fármaco nº 28 de la presente invención para el tratamiento en diferentes concentraciones (2,5 a 20 μM) junto con ZnAF (2,5 μM) como material fluorescente de cinc en un tubo de ensayo. Por otro lado, un grupo de control usa clioquinol (1 a 5 μM) bien conocido como un quelante de cinc mucho más fuerte. Se midió la concentración de cinc libre con un medidor de pZn (NeuroBioTex Inc.).

Como resultado, se observó que la concentración de cinc libre se redujo de una manera dependiente de la concentración por el fármaco nº 28 de la presente invención (figura 11).

9-2: Tinte fluorescente

Además, junto con clioquinol (20 μM) o el fármaco nº 28 (20 μM), se usó un tinte fluorescente de cinc, es decir, Newport Green DCF (0,5 μM , $K_d(Zn) = 1 \mu M$) o FluoZin-3 (0,5 μM , $K_d(Zn) = 15 \text{ nM}$) para la medición de la concentración de cinc libre.

Como resultado, se observó que tanto el grupo de control, es decir, el clioquinol como el fármaco nº 28 se combinaron con iones de cinc para reducir así los iones de cinc libres (figuras 12 y 13). En particular, el fármaco nº 28 mostró efectos de disminución de la concentración de cinc libre con respecto al cinc de alta concentración (figura 12), sin embargo, no mostró efectos notables en un caso de cinc de baja concentración (figura 13). Estos resultados demostraron que la afinidad por el cinc del fármaco nº 28 es considerablemente baja en comparación con el clioquinol.

9-3: Efecto inhibidor de la neurotoxicidad por cinc

Para identificar que los efectos inhibidores de la neurotoxicidad por cinc del fármaco nº 28 de la presente invención no influyen directamente en un canal de paso de cinc, sino que son el resultado de la quelación del cinc, las neuronas cultivadas de la corteza cerebral de un ratón se trataron con clioquinol o piritiona bien conocido como transportador permeable a los iones de cinc ("ionóforo de cinc") que aumenta el cinc intracelular, así como un fármaco que induce la secreción de cinc intracelular, es decir, (2,2'-ditiodipiridina), seguido de la observación de los efectos neuroprotectores del fármaco nº 28 sobre la neurotoxicidad inducida por clioquinol, piritiona o DTDP.

Como resultado, se descubrió que la neurotoxicidad por cinc causada por el transportador permeable a los iones se reduce significativamente con el fármaco nº 28 (figura 14). Es decir, el efecto del fármaco nº 28 puede ser el resultado de la quelación directa del cinc en lugar del resultado de actuar sobre un paso de cinc.

9-4: Microscopio

Para controlar si la concentración real de cinc libre en las células neuronales aumenta o no, las neuronas cultivadas de la corteza cerebral de un ratón se pretrataron con un material de tinción FluoZin-3, se expusieron a cinc de alta concentración y luego se trataron con 4C01 (20 µM), 4C07 (20 µM) y el fármaco nº 28 (20, 50 µM). Posteriormente, se observaron imágenes de estas neuronas tratadas usando un microscopio de fluorescencia láser confocal y se midió cuantitativamente el tamaño de la fluorescencia usando un fotómetro de fluorescencia (fluorímetro).

Como resultado, se observó que el cinc libre en las neuronas aumentó notablemente a partir de 16 minutos después de la exposición al cinc; sin embargo, el aumento de cinc libre en las neuronas se redujo significativamente con el fármaco nº 28 (figura 15A). Además, como resultado del análisis cuantitativo de la magnitud de la fluorescencia, se descubrió que no solo el fármaco nº 28, sino también compuestos similares 4C01 y 4C07, también pueden inhibir un aumento del cinc libre intracelular hasta un nivel similar (figura 16B).

9-5: Toxicidad por H₂O₂ y quelación del cinc

Se informa de que el cinc libre intracelular aumenta en un mecanismo de neurotoxicidad debido al peróxido de hidrógeno, en el que la toxicidad por peróxido de hidrógeno se reduce cuando las células se tratan usando el quelante de cinc. De acuerdo con experimentos anteriores, el fármaco nº 28 inhibió la neurotoxicidad debida al peróxido de hidrógeno. Por lo tanto, para controlar si los efectos del fármaco nº 28 están asociados con una reducción de cinc en el caso anterior, las células neuronales se trataron con peróxido de hidrógeno (H₂O₂), un quelante de cinc tal como TPEN o CaEDTA y un quelante de calcio tal como ZnEDTA, seguido de un control de la neurotoxicidad (secreción de LDH). Además, se observó si el cinc libre en las células neuronales aumenta o no después del tratamiento con peróxido de hidrógeno mediante tinción con FluoZin-3, y el grupo de tratamiento con TPEN se usó como grupo de control. Aparte del fármaco nº 28, mediante microscopia confocal se observó si compuestos similares 4C01 y 4C07 están bajo quelación de cinc o no.

Como resultado, se descubrió que TPEN como uno de los quelantes de cinc típicos redujo la neurotoxicidad causada por el peróxido de hidrógeno, mientras que otro quelante de cinc, es decir, CaEDTA también redujo significativamente la toxicidad, demostrando de ese modo que la toxicidad por H₂O₂ está asociada con el cinc. Sin embargo, el EDTA combinado con cinc (ZnEDTA) no inhibió la toxicidad porque el EDTA no actuaba más para la quelación del cinc. En consecuencia, se descubrió que la neurotoxicidad por H₂O₂ se reduce mediante la quelación de cinc (figura 16).

Además, dado que la reducción de cinc en las células neuronales que aparece durante el proceso de toxicidad por H₂O₂ por tratamiento usando los fármacos nº 28, 4C01 y 4C07, se considera que los efectos inhibidores de la toxicidad conseguidos por los fármacos anteriores son el resultado de la reducción de cinc (figura 17).

9-6: Toxicidad por NMDA y quelación de Ca²⁺

En experimentos convencionales, la excitotoxicidad causada por NMDA como fármaco para abrir un canal de NMDA de células neuronales y hacer fluir iones de calcio al interior de las células también se inhibió por el fármaco nº 28. Para determinar si el resultado anterior se obtiene mediante la quelación de iones de Ca²⁺ distintos del fármaco nº 28, se observaron los efectos protectores del fármaco nº 28 (10 a 60 µM) después del tratamiento usando ionomicina, que es un transportador permeable a los iones de calcio ("ionóforo de calcio") que aumenta directamente la concentración de calcio intracelular. Además, usando un tinte Fura-2 que se combina con calcio para representar la fluorescencia, se controló si el fármaco nº 28 se combina con calcio en un tubo de ensayo y representa efectos quelantes.

Como resultado, se descubrió que el tratamiento usando el fármaco nº 28 puede inhibir la toxicidad del transportador permeable a los iones, pero se ha observado que el fármaco muestra efectos protectores de la toxicidad solo cuando se usa el mismo a una concentración de más de 40 µM (figura 18). Además, mientras que el EDTA tiene buenos efectos quelantes a una concentración baja de calcio, el fármaco nº 28 muestra los efectos quelantes de calcio en una concentración alta (figura 19). Por lo tanto, se puede observar que los efectos inhibidores de la neurotoxicidad por NMDA por el fármaco nº 28 son el resultado de quelar directamente los iones de calcio y tienen menor afinidad por los iones de calcio que los iones de cinc.

9-6: Toxicidad por TPEN y transportador permeable a los iones de cinc

En general, la aplicación de TPEN como quelante de cinc que fluye fácilmente al interior de las células provoca una muerte celular en forma de apoptosis típica (no se introduce EDTA en las células). Cuando se añade cinc al tratamiento anterior, se retienen iones de cinc libres intracelulares para reducir así la muerte neuronal y reducir aún más la actividad de la proteasa caspasa-3 en el proceso de apoptosis. Con la expectativa de que: el fármaco nº 28 y el clioquinol no solo sirvan como quelante, sino que también desempeñen una función de transportador permeable a los iones; estos fármacos fluyan al interior de las células cuando se combinan con cinc; posteriormente, el cinc se elimine del fármaco porque la concentración de cinc libre en el citoplasma es demasiado baja; por lo tanto, la concentración de cinc libre en el citoplasma aumente para reducir así la neurotoxicidad debida a TPEN, se observaron la actividad de caspasa-3 y la neurotoxicidad (secreción de LDH) después del tratamiento con cinc, el fármaco nº 28 y clioquinol.

Como resultado, se identificó que el tratamiento que usando cinc, el fármaco nº 28 y clioquinol puede reducir significativamente la actividad de caspasa-3 inducida por TPEN y disminuir aún más la neurotoxicidad por TPEN (figura 20).

9-7: Transportador permeable a los iones de cinc

ZinPyr-1 es un tinte fluorescente que tiene un valor de Kd más bajo que el de FluoZin-3 y se usa para medir un cambio en la concentración de cinc incluso a una concentración más baja. Se observó si el fármaco nº 28 de la presente invención puede actuar como transportador permeable a los iones usando ZinPyr-1. Más particularmente, las neuronas cultivadas de la corteza cerebral de un ratón se trataron con ZinPyr-1 y luego se trataron con el fármaco nº 28 (0,05 µM) y clioquinol (0,5 µM) en un medio de cultivo de células neuronales típicamente usado, para determinar un cambio en las concentraciones de iones de cinc en las neuronas. Además, se usó un grupo sin tratamiento como grupo de control.

Como resultado, en condiciones generales de cultivo, se observó un aumento de cinc por clioquinol, mientras que no se demostró claramente un aumento de cinc por el fármaco nº 28. Por lo tanto, después de añadir una concentración adicional de cinc de 0,5 µM al medio de cultivo celular, se observó un cambio en la concentración de cinc en las células. Como resultado, se identificó un aumento significativo de cinc mediante el tratamiento usando el fármaco nº 28 (figura 21). Por consiguiente, se considera que el fármaco nº 28 de la presente invención puede tener una función de transportador permeable a los iones y, en comparación con el clioquinol, puede aumentar el cinc a un nivel bajo.

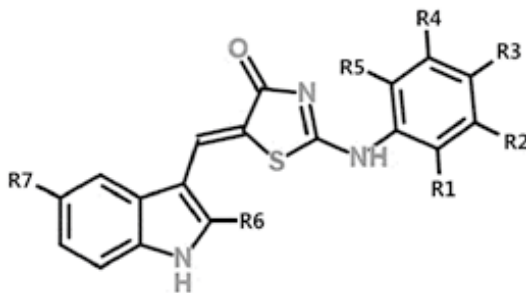
De hecho, el clioquinol tiene una alta afinidad iónica y se puede quelar el cinc en una alta concentración. Sin embargo, es bien sabido que, debido a una función del propio fármaco como transportador permeable a los iones, la concentración de cinc en el citoplasma aumenta fácilmente para causar toxicidad. Por lo tanto, el clioquinol no es adecuado para el tratamiento de apoplejía, pero el fármaco nº 28 de la presente invención puede servir como un transportador permeable a los iones, siempre que no aumente significativamente la concentración de cinc en el citoplasma. Además, se considera que, si el cinc libre en el citoplasma aumenta hasta un nivel en el que se induce toxicidad, la homeostasis del cinc puede controlarse hasta un nivel deseado mediante quelación.

Para resumir los resultados anteriores, se puede encontrar que la enzima AMPK tiene una función importante en la toxicidad por cinc, que se cree que es uno de los posibles mecanismos causantes de apoplejía. Por lo tanto, el fármaco nº 28 que tiene excelentes efectos sobre la toxicidad por cinc se seleccionó finalmente mediante el cribado de un nuevo grupo de compuestos candidatos que tienen función inhibidora de la actividad de AMPK varias veces. Además, como resultado del tratamiento de un modelo animal con apoplejía con el fármaco anterior, se descubrió que el daño cerebral se reduce significativamente. Además, como resultado de seleccionar compuestos similares basados en la estructura del fármaco nº 28, induciendo una variedad de neurotoxicidad y tratando la misma, estos compuestos mostraron excelentes efectos neuroprotectores, por lo que se pueden aplicar como un nuevo agente de tratamiento de apoplejía.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de apoplejía, que comprende un compuesto que tiene una estructura representada por la fórmula 1 a continuación como ingrediente activo:

[Fórmula I]



- 5 en la que R₁ a R₅ son cada uno independientemente hidrógeno, hidroxilo, halógeno, alquilo C₁ a C₇ sustituido o no sustituido, alcoxi C₁ a C₇ sustituido o no sustituido, grupo amina o carboxilo, o de lo contrario, R₂ y R₃ juntos forman un anillo -O-(CH₂)_n-O- o un anillo de benceno sustituido o no sustituido, en el que n es un número entero de 1 a 3; R₆ es hidrógeno o un grupo metilo; y R₇ es hidrógeno o un halógeno,

el grupo alquilo sustituido es un grupo trifluorometilo, y

- 10 el halógeno incluye yodo, bromo o cloro.

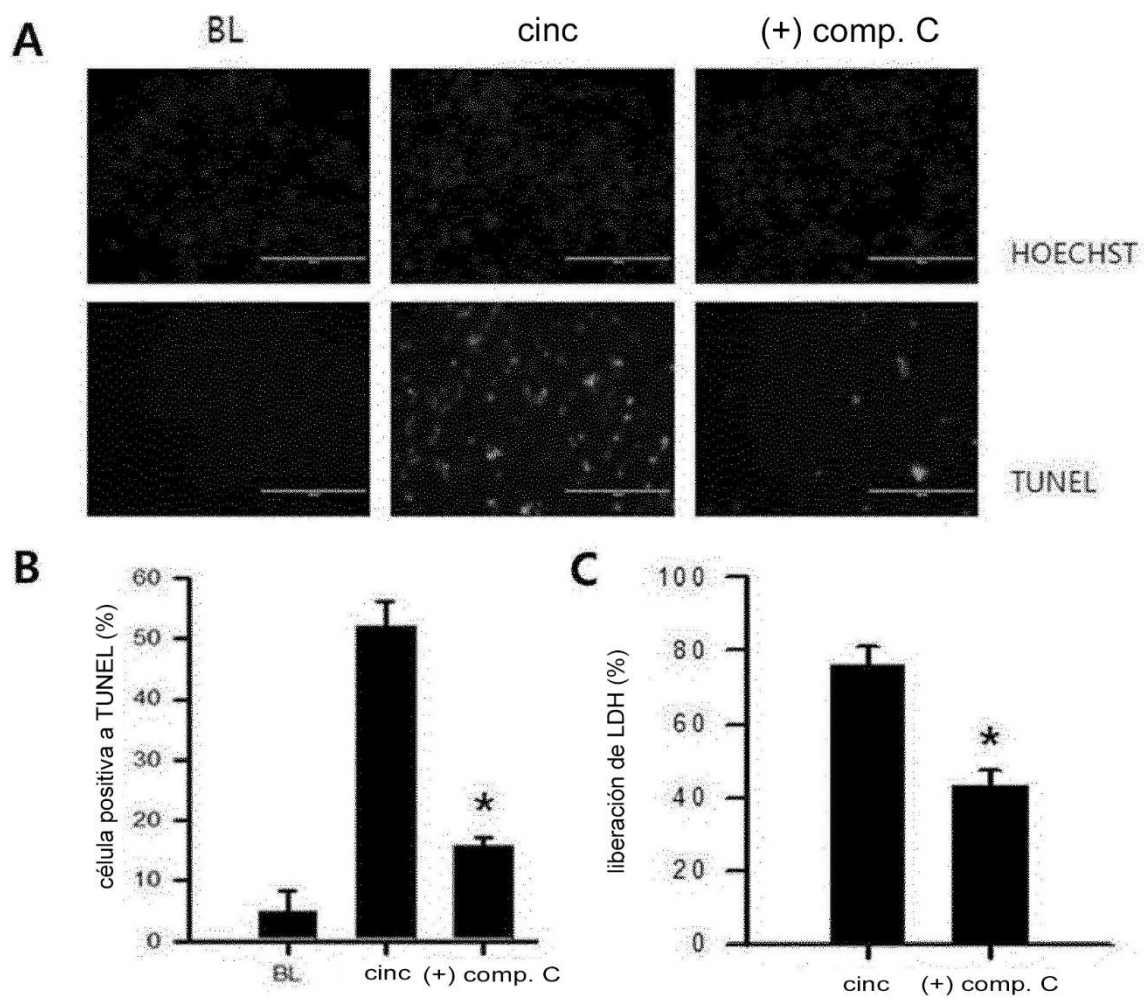
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el compuesto es (5Z)-5-(1H-indol-3-ilmetilen)-2-[[2-(trifluorometil)fenil]amino]-1,3-tiazol-4(5H)-ona, (5Z)-5-(1H-indol-3-ilmetilen)-2-[[3-(trifluorometil)fenil]amino]-1,3-tiazol-4(5H)-ona, (5Z)-2-[(3-bromofenil)amino]-5-(1H-indol-3-ilmetilen)-1,3-tiazol-4(5H)-ona, (5Z)-5-(1H-indol-3-ilmetilen)-2-[(4-metilfenil)amino]-1,3-tiazol-4(5H)-ona, (5Z)-5-(1H-indol-3-ilmetilen)-2-[(3-metilfenil)amino]-1,3-tiazol-4(5H)-ona, (5Z)-2-anilino-5-(1H-indol-3-ilmetilen)-1,3-tiazol-4(5H)-ona, (5E)-5-[(2-metil-1H-indol-3-il)metilen]-2-[(4-metilfenil)amino]-1,3-tiazol-4(5H)-ona, ácido 3-[[5-(1H-indol-3-ilmetilen)-4-oxo-4,5-dihidro-1,3-tiazol-2-il]amino]benzoico, ácido 2-[[5-(1H-indol-3-ilmetilen)-4-oxo-4,5-dihidro-1,3-tiazol-2-il]amino]benzoico, (5Z)-2-[(2-clorofenil)amino]-5-[(2-metil-1H-indol-3-il)metilen]-1,3-tiazol-4(5H)-ona o ácido 2-hidroxi-5-[[5-(1H-indol-3-ilmetilen)-4-oxo-4,5-dihidro-1,3-tiazol-2-il]amino]benzoico.

- 20 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la apoplejía incluye apoplejía hemorrágica, apoplejía isquémica o apoplejía por toxicidad por metales.

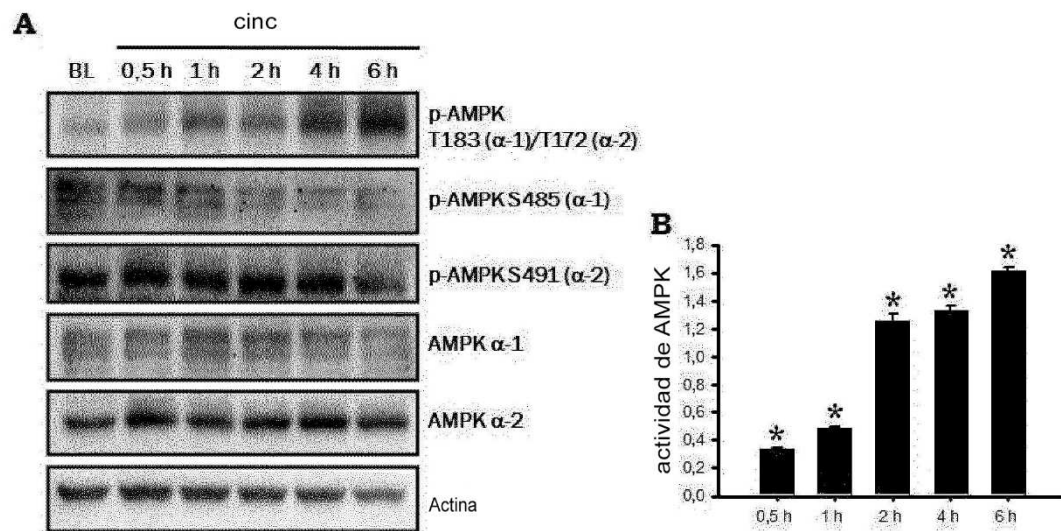
4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el metal incluye plomo, mercurio, manganeso, arsénico, talio, hierro, cinc, cadmio, bismuto o estaño.

- 25 5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la apoplejía isquémica deriva de muerte neuronal excitotóxica o muerte neuronal oxidativa.

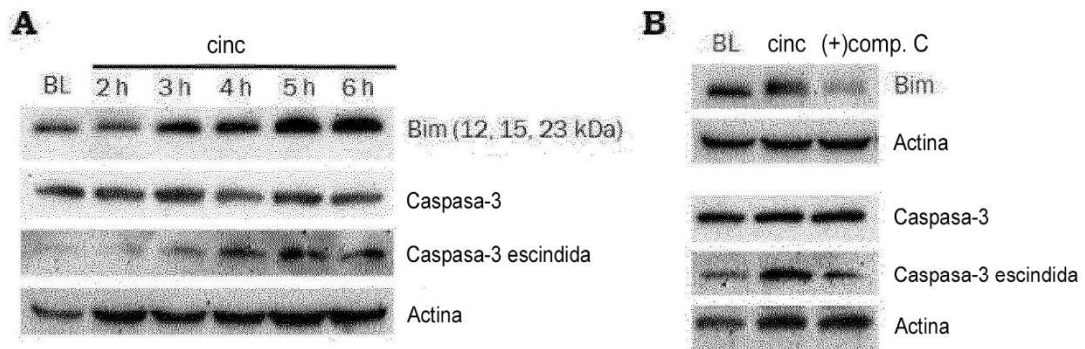
【FIG. 1】



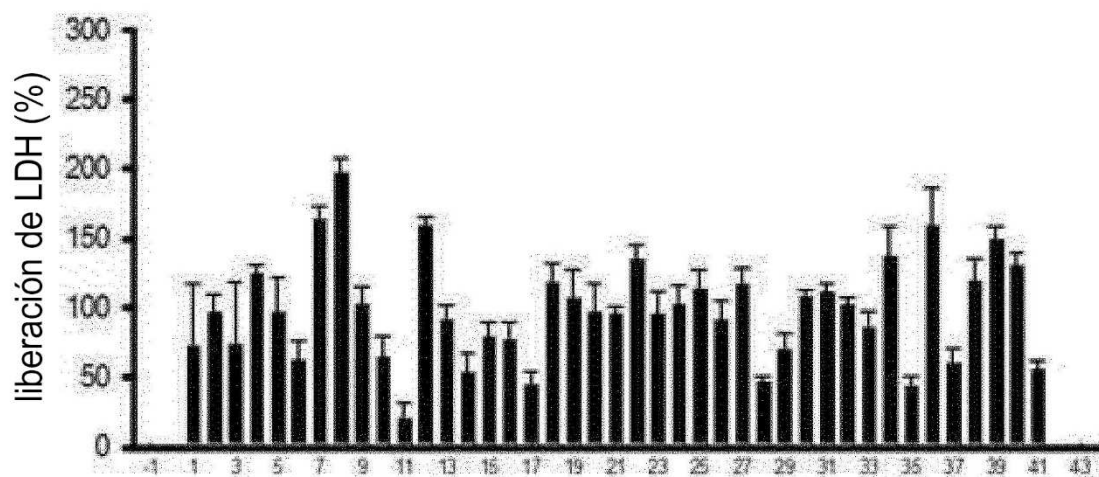
【FIG. 2】



【FIG. 3】

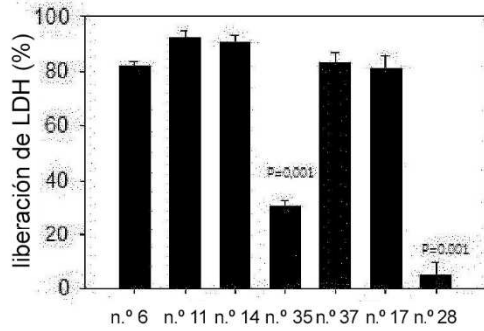


【FIG. 4】

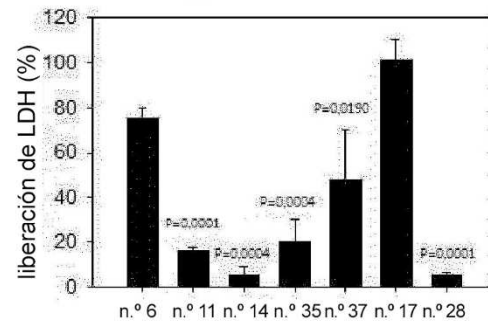


【FIG. 5】

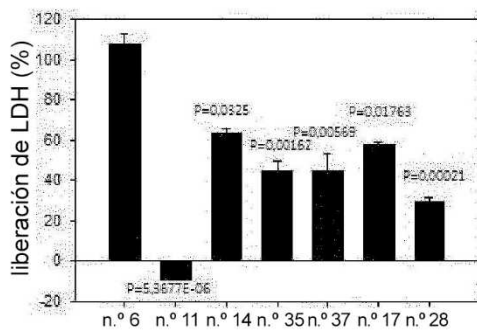
Toxicidad de NMDA



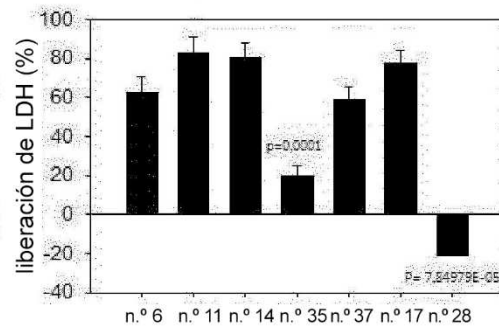
Toxicidad de hierro



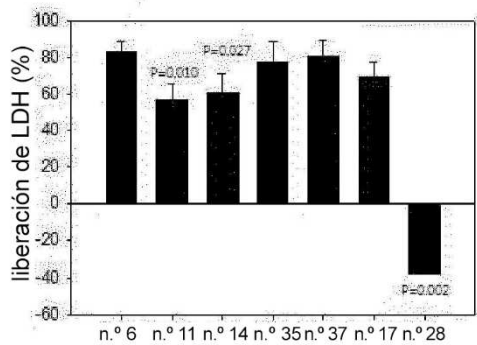
Toxicidad de H2O2



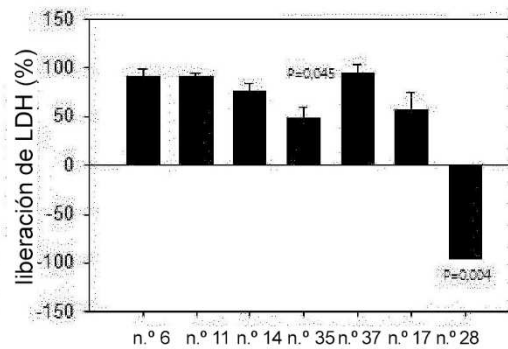
Toxicidad de TPEN



Toxicidad de estaurosporina



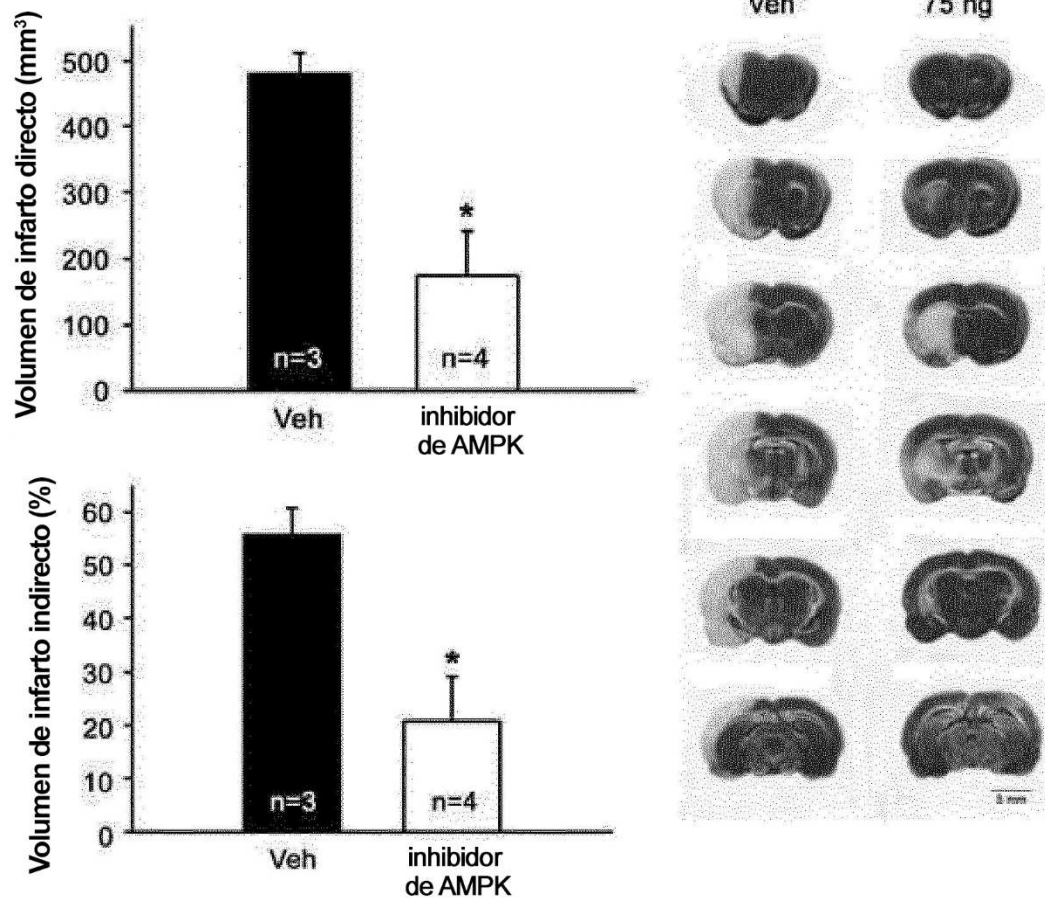
Toxicidad de etopósido



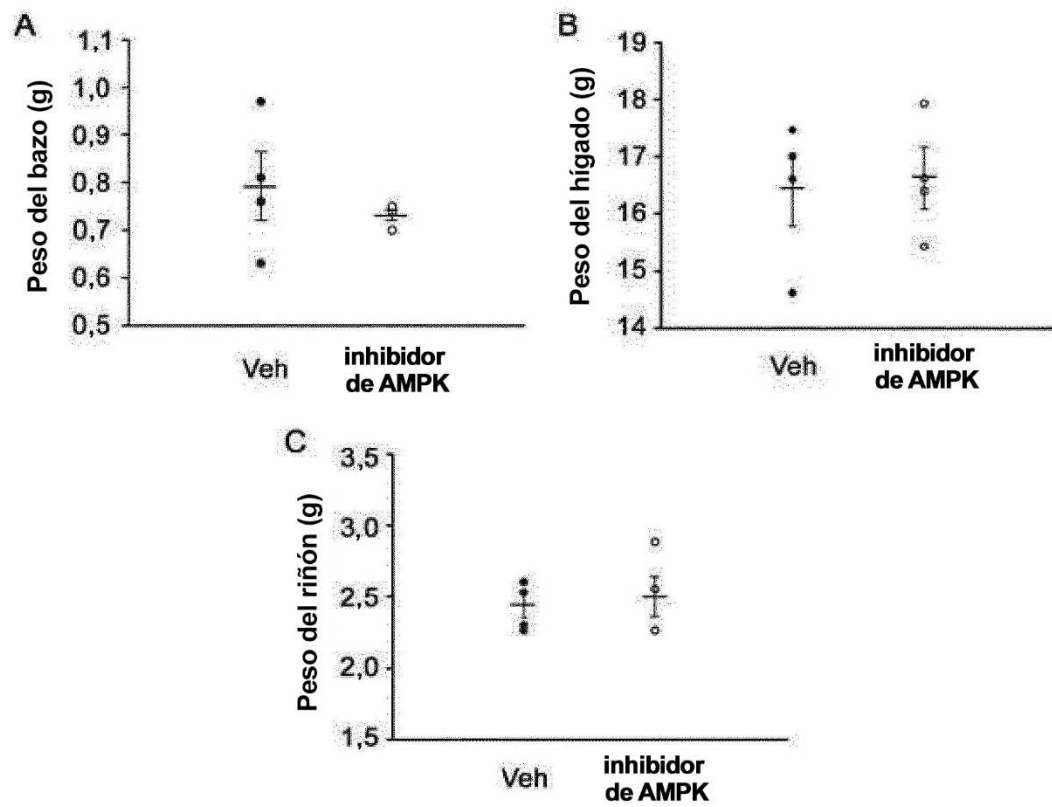
【FIG. 6】

Efecto de inhibidor II de AMPK sobre isquemia cerebral focal

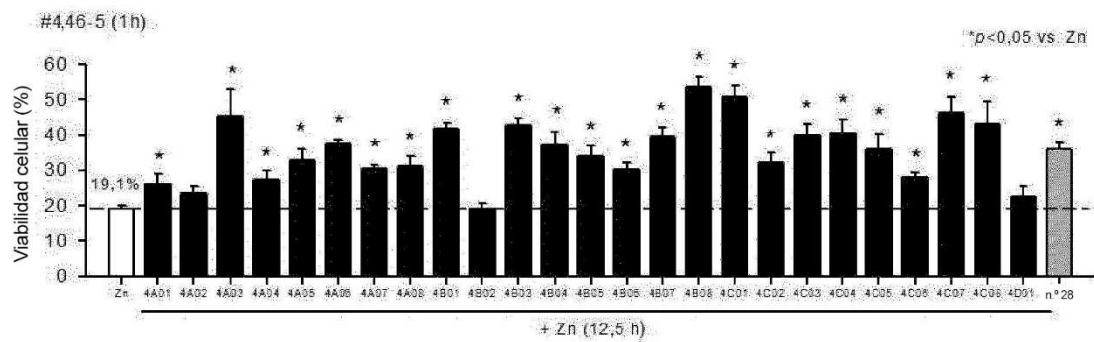
inyección icv de 75ng/3ul



【FIG. 7】

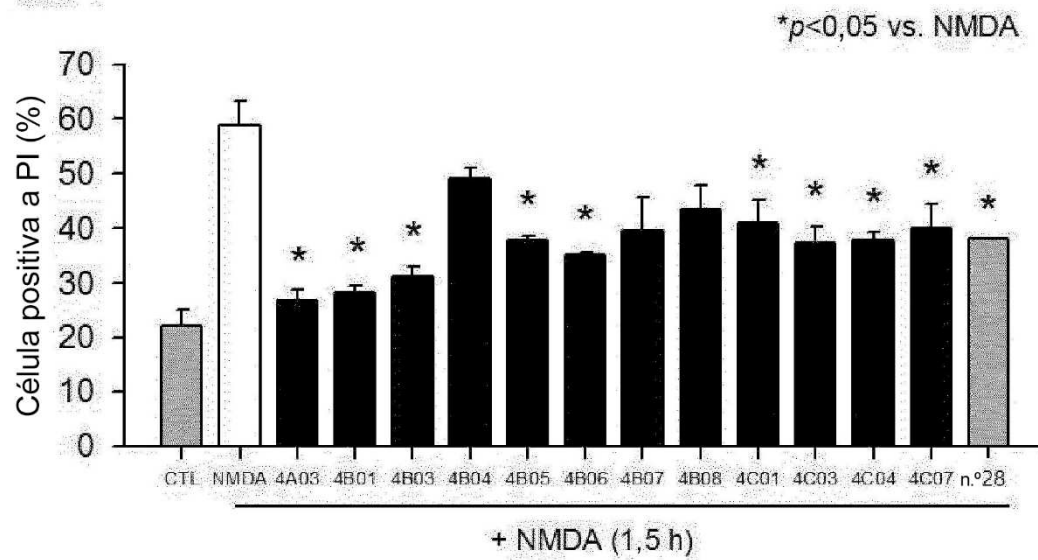


【FIG. 8】

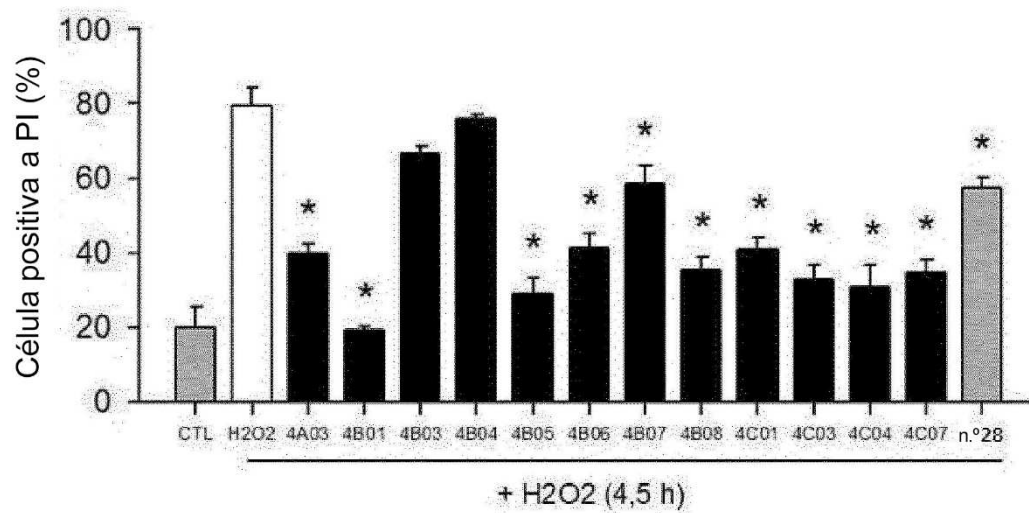


【FIG. 9】

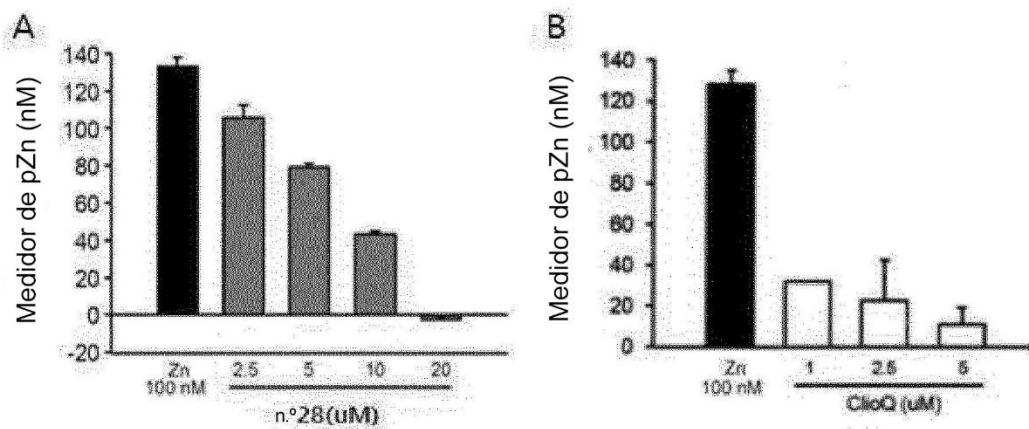
n.º 458-1



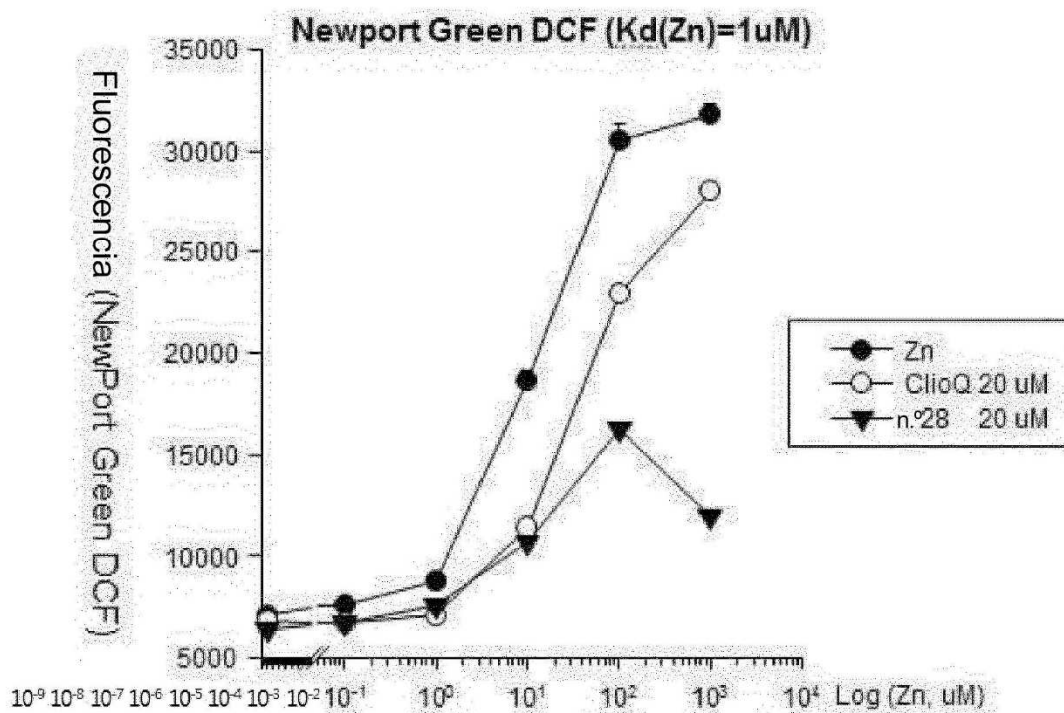
【FIG. 10】



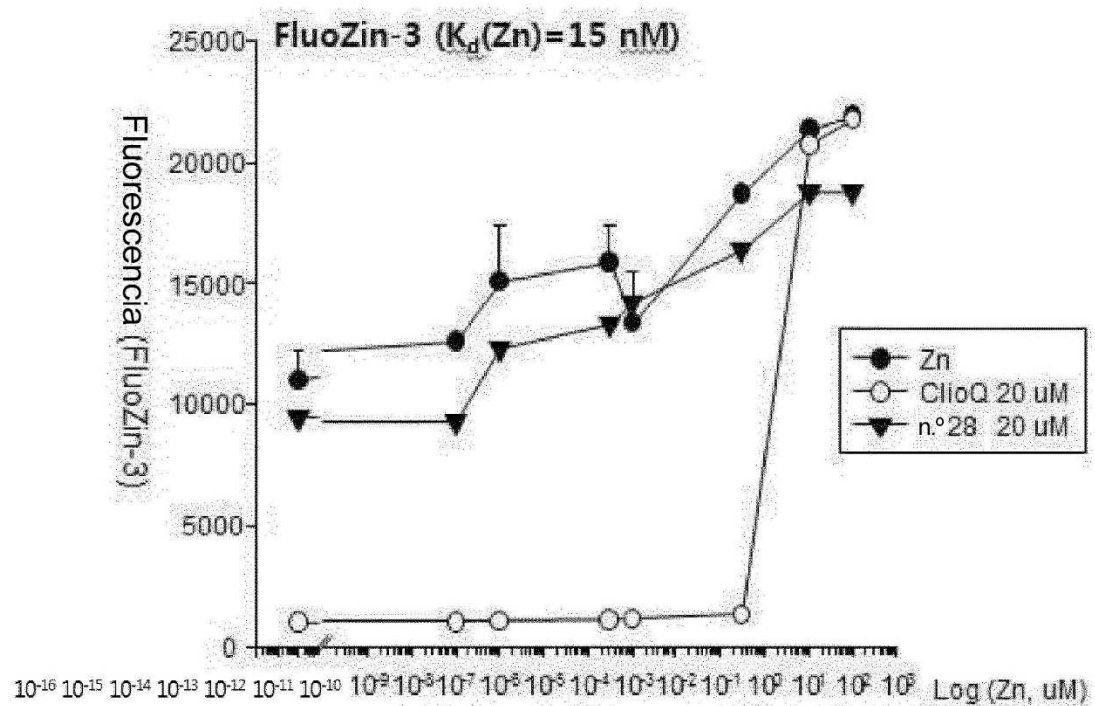
【FIG. 11】



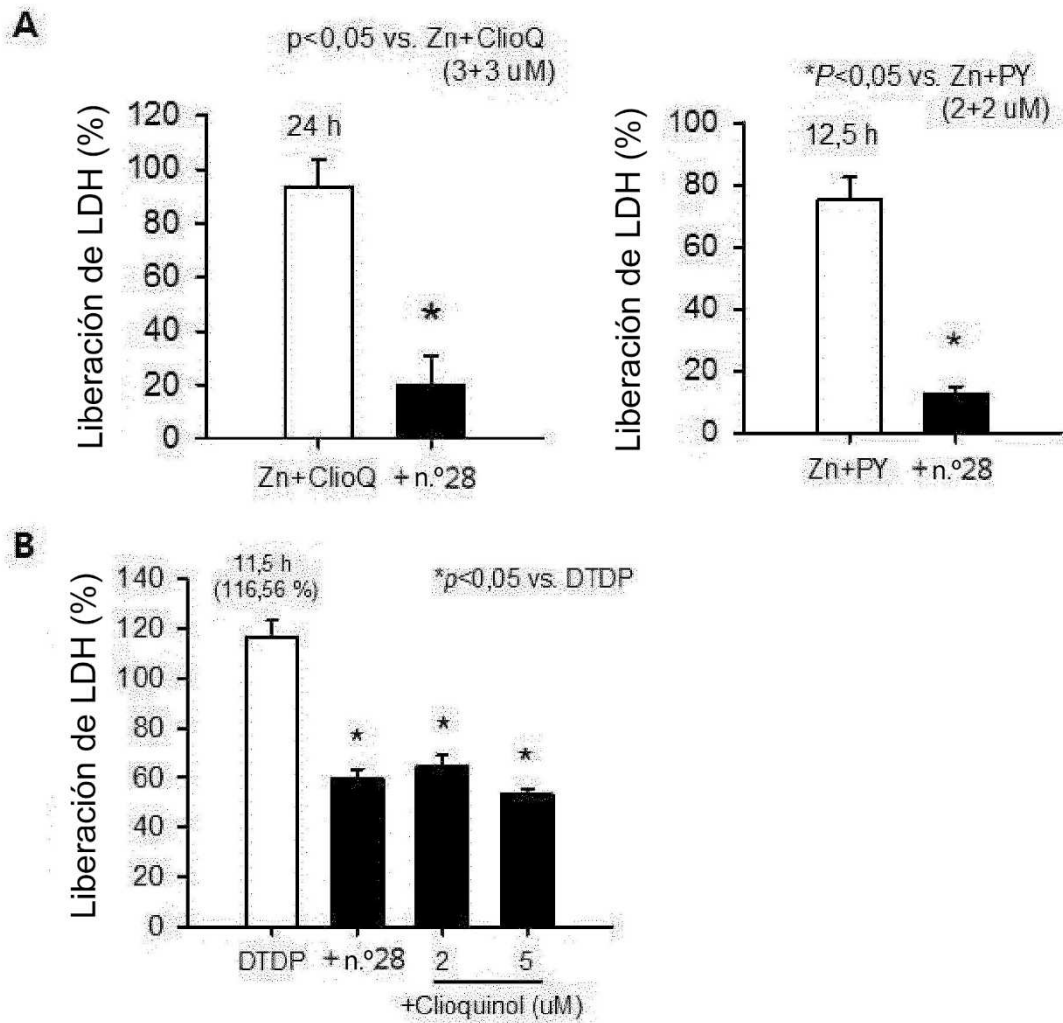
【FIG. 12】



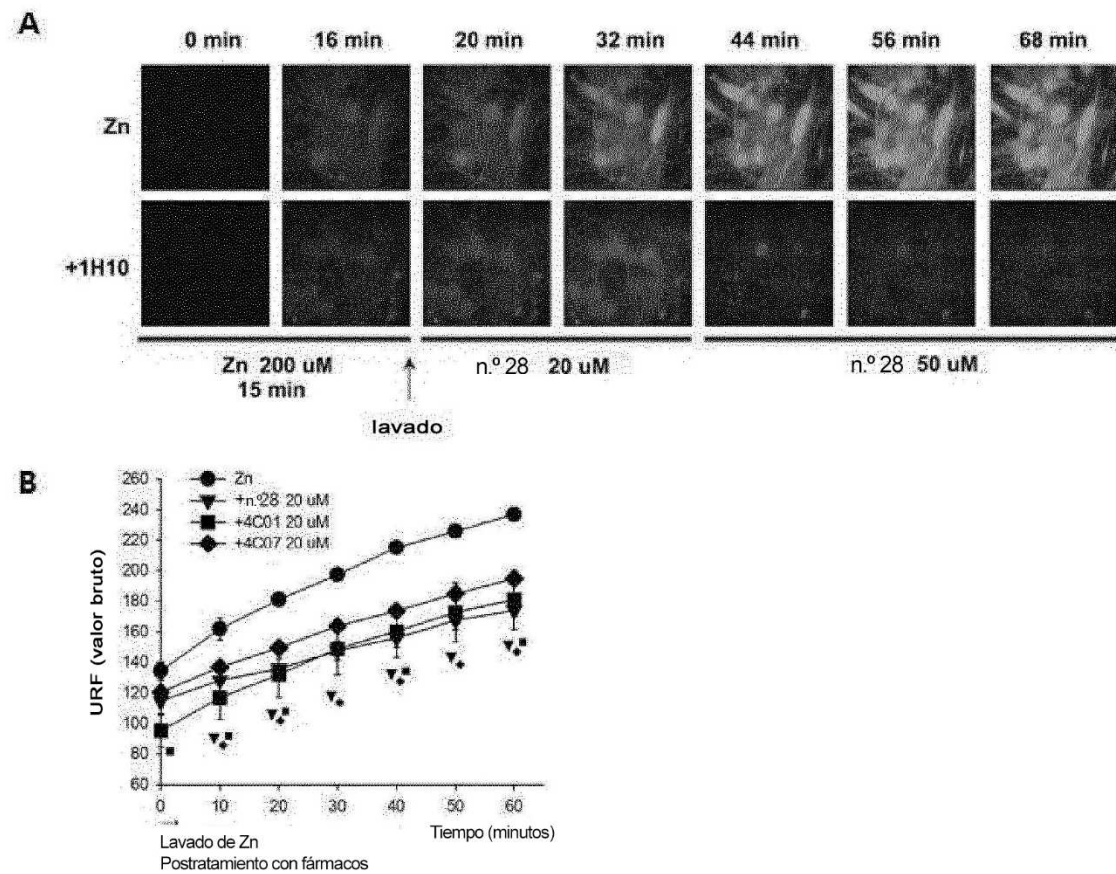
【FIG. 13】



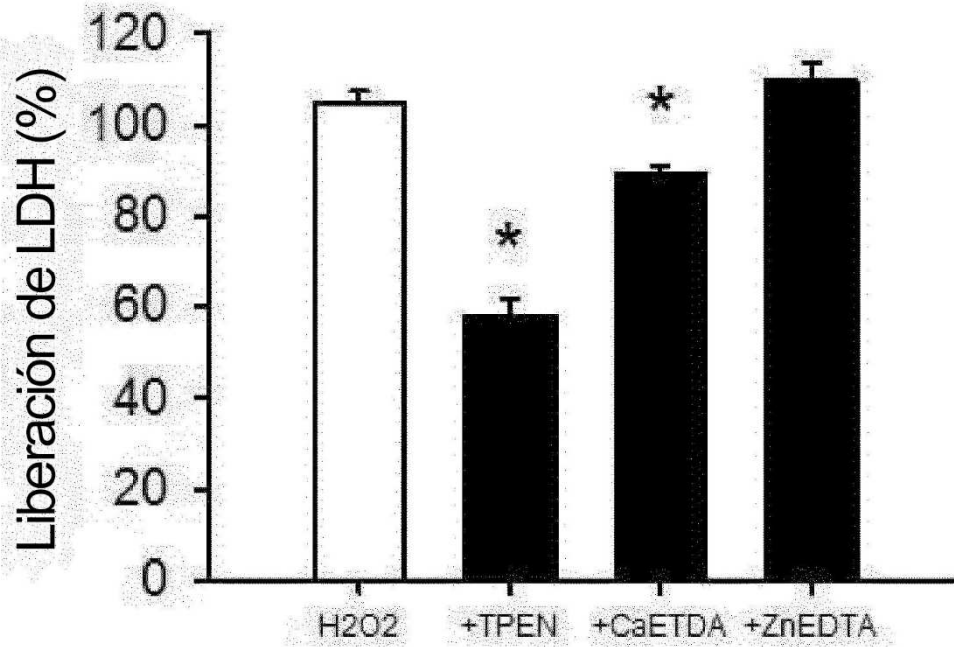
【FIG. 14】



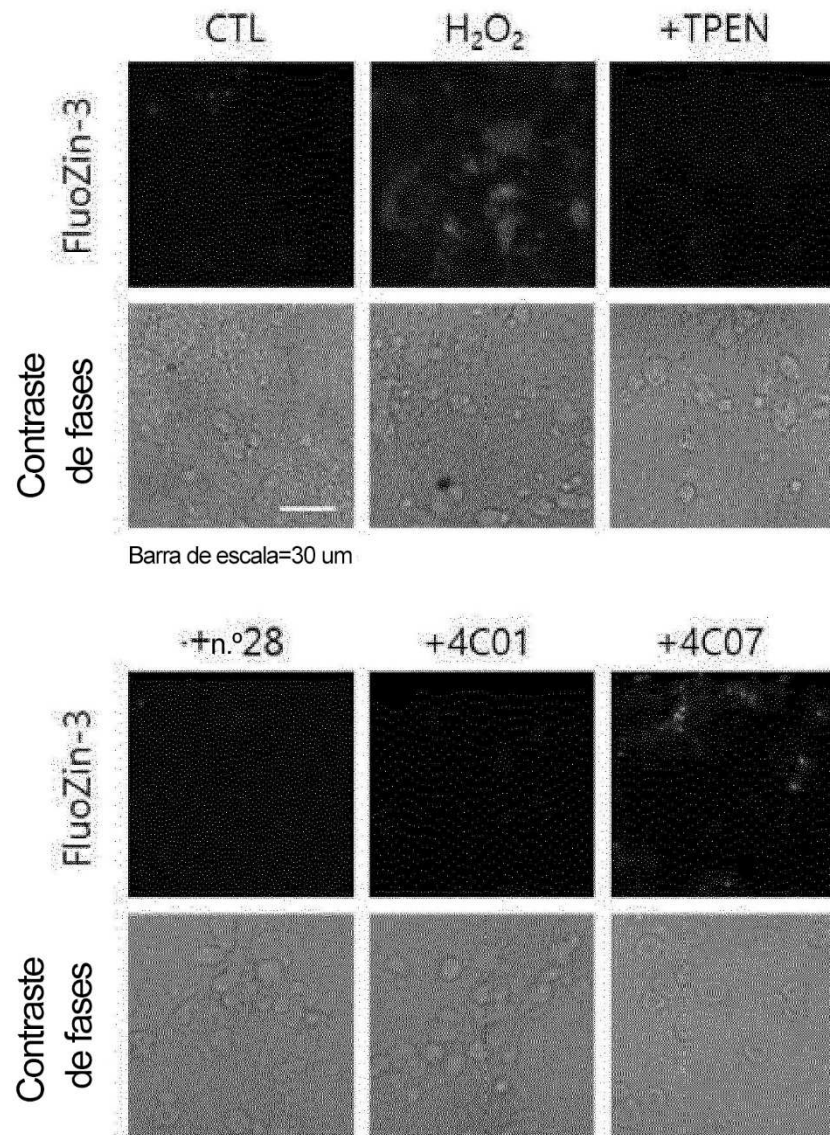
【FIG. 15】



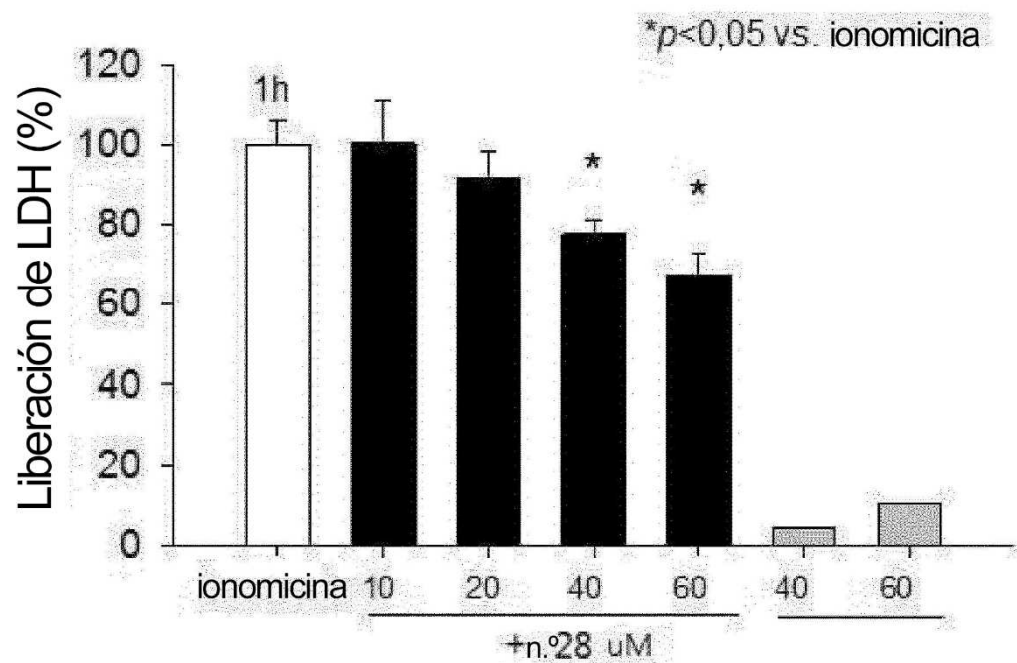
【FIG. 16】



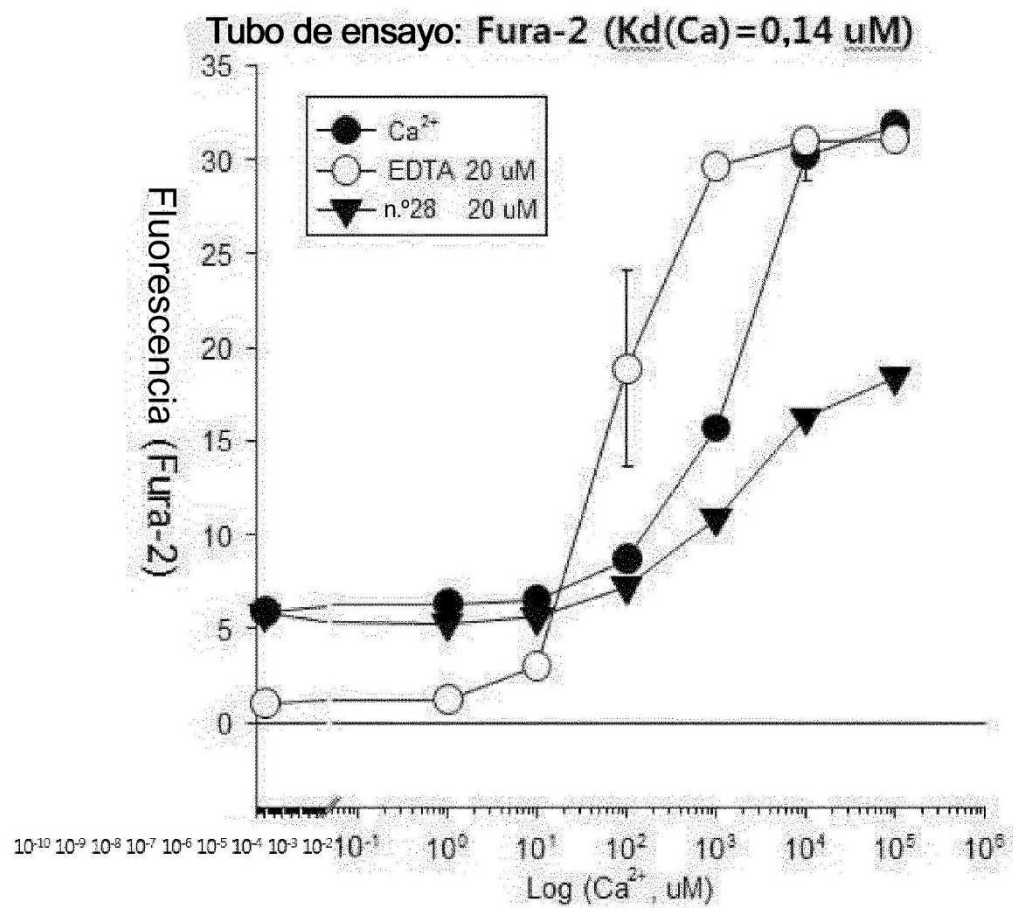
【FIG. 17】



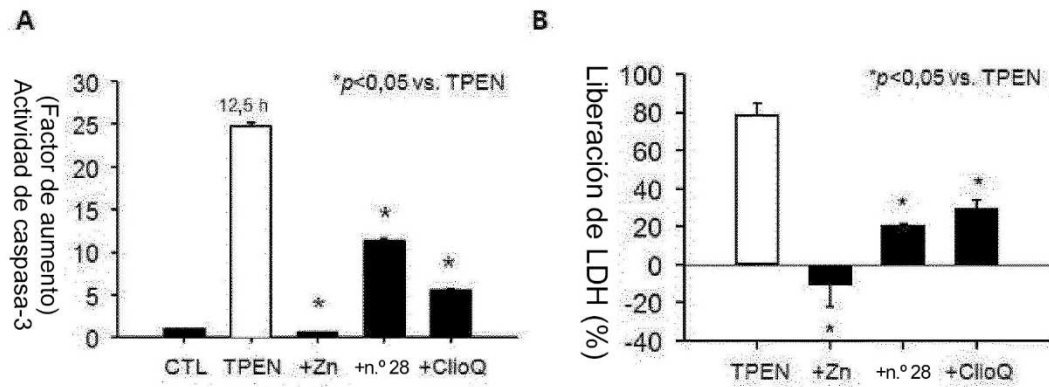
【FIG. 18】



【FIG. 19】



【FIG. 20】



【FIG. 21】

