



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 380 473**

②1 Número de solicitud: 201001340

⑤1 Int. Cl.:

C07D 309/30 (2006.01)

A61K 31/366 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 25/08 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

②2 Fecha de presentación: **13.10.2010**

④3 Fecha de publicación de la solicitud: **14.05.2012**

④3 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
14.05.2012

⑦1 Solicitante/s: **NEURON BIOPHARMA, S.A.**
Parque Tec. Ciencias de la Salud
Avda. de la Innovación, 1
18100 Armilla, Granada, ES

⑦2 Inventor/es: **Burgos Muñoz, Javier Santos;**
Ramos Martín, María del Carmen;
Sierra Ávila, Saleta;
Alfaro Sánchez, Juan María;
Ramírez Moreno, Carlos;
Velasco Álvarez, Javier y
Adrio Fondevila, José Luis

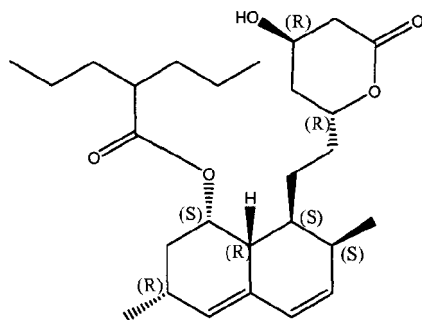
⑦4 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

⑤4 Título: **Compuesto neuroprotector, hipocolesterolémico, antiinflamatorio y antiepiléptico.**

⑤7 Resumen:

Compuesto neuroprotector, hipocolesterolémico, antiinflamatorio y antiepiléptico.

Se describe un compuesto de fórmula (I)



(I)

su forma hidroxilada, las sales farmacéuticamente aceptables de dicho hidroxilado y prodrugs y solvatos farmacéuticamente aceptables del compuesto y de su forma hidroxilada y, en particular, dicho compuesto, su forma hidroxilada, sales, etc. para su uso en la prevención de: enfermedades neurodegenerativas, deterioro cognitivo, enfermedades asociadas con una oxidación indeseada, procesos patológicos asociados a la edad y progeria, enfermedades cardiovasculares como aterosclerosis, fibrilación auricular, dislipemia, hipercolesterolemia, hiperlipidemia, e hipertrigliceridemia, o inflamación o procesos inflamatorios, o epilepsia, crisis epilépticas y convulsiones.

DESCRIPCIÓN

Compuesto neuroprotector, hipocolesterolémico, antiinflamatorio y antiepiléptico.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con la prevención y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas o de enfermedades asociadas con una oxidación indeseada o de procesos patológicos asociados a la edad, así como con la disminución de los niveles de colesterol y con la inhibición de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa para la prevención de la dislipemia y de las enfermedades cardiovasculares, así como de enfermedades asociadas a procesos inflamatorios agudos o crónicos, así como con la prevención y/o el tratamiento de la epilepsia, de las crisis epilépticas o de las convulsiones.

15 **Antecedentes de la invención**

La gran incidencia de las enfermedades neurodegenerativas y de las enfermedades asociadas al envejecimiento es un problema de primer orden en todo el mundo. Por ello es necesaria la búsqueda de compuestos neuroprotectores que eviten o palién dichas enfermedades. De todas ellas, la enfermedad de Alzheimer (EA) es la más prevalente, estimándose que en el año 2040, 81 millones de personas sufrirán esa enfermedad (Blennow *et al.*, Lancet 2006; 368: 387-403). Sólo en España se estima que más de medio millón de personas sufren actualmente EA. Los costes asociados a esta enfermedad son proporcionalmente altos, y se calcula que el coste total derivado del cuidado de los enfermos de Alzheimer es de 81.000 y 22.000 millones de € en Estados Unidos y en el Reino Unido, respectivamente. Actualmente no existen fármacos eficientes que prevengan o impidan esta enfermedad, con lo que la búsqueda y validación de nuevos compuestos neuroprotectores que eviten el daño neuronal es una necesidad.

En la actualidad, se están siguiendo diferentes estrategias para la obtención de nuevos compuestos, una vez que se ha visto que los actuales fármacos ofrecen pocos beneficios a los pacientes. Estos fármacos retrasan temporalmente (en el mejor de los casos un año), algunos síntomas de la dolencia, pero no evitan su evolución. Las opciones terapéuticas actuales se basan en la inhibición de la acetilcolinesterasa con fármacos como el donepezilo, la galantamina o la rivastigmina, o en la capacidad de la memantina en antagonizar un receptor de glutamato, el NMDA (ácido N-metil-D-aspartico).

Debido al poco éxito de estos fármacos se han abierto nuevas líneas de investigación, y, entre ellas, destaca en los últimos tiempos la investigación de los inhibidores de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMGR) (más conocidos como estatinas) como agentes terapéuticos. La HMGR es la enzima que cataliza el paso limitante en la biosíntesis del colesterol, por lo que su inhibición por las estatinas es una estrategia terapéutica habitual para disminuir los altos niveles de colesterol asociados a las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Estos fármacos reducen el riesgo de infarto de miocardio y de muerte coronaria, y son considerados seguros. Además, la hipercolesterolemia (definida como un alto nivel de colesterol en sangre) es el principal factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares (ECV), como la aterosclerosis.

Diversos factores genéticos y ambientales que afectan al metabolismo del colesterol están asociados con la EA. Por ejemplo, la isoforma $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (apoE4) es un factor de riesgo para la EA y está ligado a un incremento de los niveles de colesterol. La aterosclerosis, que tiene a la hipercolesterolemia como principal factor de riesgo, parece estar asociada también a la EA. Además, estudios epidemiológicos indican que altos niveles de colesterol en suero incrementan el riesgo de EA, y se ha propuesto que la regulación homeostática del metabolismo del colesterol puede estar alterada en el Alzheimer. Por otra parte, se ha descrito una reducción significativa del riesgo de Alzheimer en pacientes tratados con estatinas. En conjunto, todos estos estudios sugieren que la reducción de los niveles de colesterol puede inhibir la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (Cole & Vassar; Neurobiol Dis 2006; 22[2]: 209-22).

El colesterol es transportado por la sangre mediante diferentes tipos de lipoproteínas, donde los mayores portadores de colesterol son las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de alta densidad (HDL). Las LDL son lipoproteínas especializadas en el transporte del colesterol y de los triglicéridos desde el hígado a tejidos periféricos, donde son captados por las células a través de los receptores LDL (R-LDL) en membrana celular. Las LDL también regulan la síntesis de colesterol, y se han asociado los altos niveles de colesterol-LDL al riesgo de padecer ECV. Por su parte, las HDL son lipoproteínas que transportan el colesterol desde los diferentes tejidos hasta el hígado. Debido a que las HDL pueden retirar el colesterol de las arterias y transportarlo de vuelta al hígado para su excreción, se les otorga un papel protector frente a las enfermedades cardiovasculares. Los inhibidores de la HMGR son los agentes hipolipemiantes de más éxito en la historia, siendo capaces de reducir los niveles de colesterol total a base de disminuir los niveles de colesterol-LDL sin alterar los de colesterol-HDL.

Recientemente se han descrito nuevas propiedades de las estatinas, especialmente a nivel de daño cerebral causado por trauma o en demencias, proponiéndose nuevas actividades (Pahan, Cell Mol Life Sci. 2006; 63[10]: 1165-78), y se ha demostrado que ciertas estatinas (e.g., simvastatina) intensifican la capacidad de memoria y aprendizaje en ratones (Ling *et al.*, Ann Neurol. 2006; 60[6]: 729-39) o protegen de las crisis convulsivas asociadas a fenómenos epilépticos (Lee *et al.*, Neurosci Lett. 2008; 440: 260-4). Además, las estatinas también han demostrado su eficacia en

ensayos clínicos en fase II que sugieren resultados positivos frente al tratamiento del vasoespasma cerebral (Fandino *et al.*, Neurocirugía. 2007; 18: 16-27), así como frente a la muerte neuronal inducida por daño isquémico en la retina (Honjo *et al.*, Arch. Ophthalmol. 2002; 120: 1707-13). No obstante, actualmente se encuentra en discusión si los efectos neuroprotectores de las diferentes estatinas comerciales (e.g., atorvastatina, lovastatina, simvastatina, etc.) son debidos a un efecto directo sobre el metabolismo lipídico, o si por el contrario es consecuencia de rutas alternativas.

Por otra parte, y en relación a la continua búsqueda de los sucesos causales tanto de las END como de las ECV, se ha propuesto a la inflamación crónica como un fenómeno subyacente a este tipo de enfermedades. Por ejemplo, se ha visto que la inflamación sistémica periférica de bajo grado está asociada al aumento del daño cognitivo. En este sentido se ha determinado que la inflamación sistémica es un factor de riesgo para sufrir la EA (revisado en: Holmes *et al.*, "Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease" Neurology. 2009).

Compendio de la invención

Aunque existe literatura sobre el potencial efecto neuroprotector de las estatinas, los autores de esta invención han encontrado que un derivado de monacolina J no comercial, en concreto el 2-Propylpentanoic Acid (1S,3R,7S,8S,8aR)-1,2,3,7,8,8a-hexahydro-3,7-dimethyl-8-[2-[(2R,4R)-tetrahydro-4-hydroxy-6-oxo-2H-pyran-2yl]ethyl]-1-naphthalenyl ester (también identificado en ocasiones en esta solicitud de patente como NST0060 es un agente con un potencial neuroprotector sorprendente, además de tener una alta capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) y una alta eficiencia para disminuir los niveles de colesterol, inhibiendo de forma específica la HMGR, así como de proteger de la epilepsia, de las crisis epilépticas y de las convulsiones. Además, y de forma sorprendente, este compuesto es más seguro que las estatinas comerciales, mostrando niveles de toxicidad por debajo de la estatina más biosegura, la simvastatina. Adicionalmente, se trata de un compuesto que resulta más barato de sintetizar debido al bajo coste de la cadena lateral a añadir a la molécula de monacolina J.

La actividad neuroprotectora de dicho compuesto se ha puesto de manifiesto frente a diferentes agresiones que causan la muerte neuronal en líneas celulares humanas de origen colinérgico mediante diferentes tipos de agresiones que causan estrés oxidativo, inhibición de la proteína fosfatasa 1, inhibición de la succinato deshidrogenasa, estrés de retículo endoplásmico y apoptosis (Ejemplo 2, Figuras 1 a 6). Dicho ejemplo pone de manifiesto el potencial empleo de dicho compuesto en la prevención y/o tratamiento de la muerte neuronal asociada a enfermedades neurodegenerativas (e.g., Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, *status epilepticus*, Huntington, etc.) o de enfermedades asociadas con una oxidación indeseada o de procesos patológicos asociados a la edad.

Para estudiar el mecanismo de acción de este compuesto, y confirmar su efecto neuroprotector, se ha estudiado su modulación sobre el gen seladin-1/DHCR24, implicado en la EA (Ejemplo 3, Figura 7), observándose que el compuesto NST0060 es capaz de aumentar los niveles del mRNA de este gen neuroprotector de forma dosis dependiente en líneas celulares humanas de origen colinérgico.

Con el objetivo de definir mejor el paso de barrera hematoencefálica del compuesto NST0060, los inventores analizaron diferentes parámetros como la lipofiliidad teórica, el porcentaje de paso y la permeabilidad efectiva (Figura 8 y Tabla 1) tal como se describe en el Ejemplo 4, determinando que NST0060 presenta un alto paso de BHE, siendo éste muy próximo al control positivo utilizado (el verapamilo).

La actividad hipolipemiente de dicho compuesto se ha puesto de manifiesto mediante la determinación de la inhibición de la HMGR en comparación con una estatina comercial, la simvastatina (Ejemplo 5, Figura 9). Con el objetivo de definir mejor el efecto hipocolesterolémico del compuesto, los inventores analizaron con más detalle la actividad hipocolesterolémica mediante el análisis de las reducciones de colesterol en una línea celular humana de origen hepático (Figura 10), tal como se describe en el Ejemplo 5. Dicho ejemplo pone de manifiesto el potencial empleo de dicho compuesto en la prevención y/o tratamiento de la hipercolesterolemia asociada a enfermedades cardiovasculares (e.g., infarto de miocardio, aterosclerosis, cardiopatía congénita, cardiopatía adquirida, cardiopatía isquémica, cardiopatía hipertensiva, valvulopatías, miocardiopatías, trastornos sanguíneos, etc.).

La bioseguridad del compuesto NST0060 se ha puesto de manifiesto mediante la evaluación de su toxicidad en un modelo de embrión de pez cebra, en comparación con una estatina comercial, la simvastatina, observándose que el NST0060 es menos tóxico que la simvastatina a diferentes concentraciones ya que produce una menor mortalidad (Ejemplo 6, Tabla 2), un mayor porcentaje de larvas sanas al final del experimento (Ejemplo 6, Figura 11), y una menor alteración del ritmo cardíaco que la simvastatina (Ejemplo 6, Figura 12).

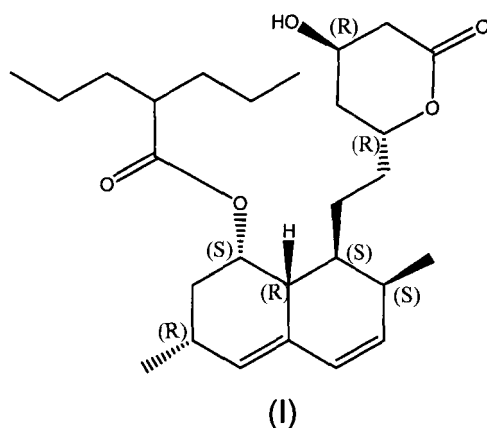
La actividad antiinflamatoria de dicho compuesto se ha puesto de manifiesto en un modelo de inflamación sistémica en ratón generado mediante la inyección intraperitoneal de lipopolisacárido (LPS) (Ejemplo 7, Figuras 13 a 17). Dicho ejemplo pone de manifiesto el potencial empleo de dicho compuesto en la prevención y/o tratamiento de la inflamación y las enfermedades asociadas, entre las que se encuentran las enfermedades neurodegenerativas o las enfermedades cardiovasculares.

La actividad antiepiléptica y anticonvulsivante de dicho compuesto se ha puesto de manifiesto mediante la determinación de la protección de las crisis epilépticas y de las convulsiones en un modelo de epilepsia en ratones (Ejemplo 8, Figuras 18 y 19). Dicho ejemplo pone de manifiesto el potencial empleo de este compuesto en la prevención y/o tratamiento de la epilepsia y de las crisis convulsivas o convulsiones.

La actividad antioxidante *in vivo* de dicho compuesto se ha puesto de manifiesto mediante la determinación de la protección del estrés oxidativo causado en el cerebro de ratones inoculados con una sustancia excitotóxica (Ejemplo 9, Figuras 20 y 21). Dicho ejemplo pone de manifiesto el potencial empleo de este compuesto en la prevención y/o tratamiento de las enfermedades asociadas a una oxidación indeseada.

El efecto protector del NST0060 se ha puesto de manifiesto mediante la determinación de los niveles de supervivencia frente a la acción de una sustancia excitotóxica que causa la muerte en los ratones (Ejemplo 10, Figura 22). Dicho ejemplo pone de manifiesto el potencial empleo de este compuesto en la prevención y/o tratamiento de las enfermedades asociadas al síndrome excitotóxico, como las enfermedades neurodegenerativas.

Por tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I), [también identificado en ocasiones en esta solicitud de patente como NST0060]:



a su forma hidroxilácida, a las sales farmacéuticamente aceptables de dicho hidroxilácido y a prodrugas y solvatos farmacéuticamente aceptables del compuesto y de su forma hidroxilácida.

Otro aspecto de la presente invención, es una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) y/o su forma hidroxilácida y/o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilácido y/o una prodruga o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilácida, y al menos un adyuvante, portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I), a su forma hidroxilácida o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilácido y/o a una prodruga o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilácida para su uso como medicamento.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I), a su forma hidroxilácida o a una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilácido y/o a una prodruga o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilácida para su uso como agente neuroprotector, en particular en la prevención y/o el tratamiento de:

- a. enfermedades neurodegenerativas (e.g., Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, *status epilepticus*, Huntington, etc.), más concretamente, como neuroprotector frente a procesos de estrés oxidativo, inhibición de la proteína fosfatasa 1, inhibición de la succinato deshidrogenasa, estrés de retículo endoplásmico y apoptosis asociados a dichas enfermedades neurodegenerativas crónicas,
- b. deterioro cognitivo,
- c. enfermedades asociadas con una oxidación indeseada,
- d. procesos patológicos asociados a la edad y progeria,
- e. enfermedades cardiovasculares como aterosclerosis, fibrilación auricular, dislipemia, hipercolesterolemia, hiperlipidemia, e hipertrigliceridemia, o
- f. inflamación, procesos inflamatorios y enfermedades que cursan o cuya causa es la inflamación,
- g. epilepsia, crisis epilépticas y convulsiones.

Un aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I), de su forma hidroxilada, de una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilado y/o de una prodroga o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilada en la elaboración de un medicamento. Según una realización particular, el medicamento es para su uso como agente neuroprotector, en particular en la prevención y/o el tratamiento de:

- a. enfermedades neurodegenerativas (e.g., Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, *status epilepticus*, Huntington, etc.), más concretamente, como neuroprotector frente a procesos de estrés oxidativo, inhibición de la proteína fosfatasa 1, inhibición de la succinato deshidrogenasa, estrés de retículo endoplásmico y apoptosis asociados a dichas enfermedades neurodegenerativas crónicas,
- b. deterioro cognitivo,
- c. enfermedades asociadas con una oxidación indeseada,
- d. procesos patológicos asociados a la edad y progeria,
- e. enfermedades cardiovasculares como aterosclerosis, fibrilación auricular, dislipemia, hipercolesterolemia, hiperlipidemia, e hipertrigliceridemia, o
- f. inflamación, procesos inflamatorios y enfermedades que cursan o cuya causa es la inflamación,
- g. epilepsia, crisis epilépticas y convulsiones.

Otro aspecto de la presente invención es un compuesto de fórmula (I), su forma hidroxilada o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilado y/o una prodroga o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilada para su uso en el aumento de la expresión del gen seladin-1/DHCR24.

Otro aspecto de la presente invención es un compuesto de fórmula (I), su forma hidroxilada o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilado y/o una prodroga o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilada para su uso en la prevención y/o tratamiento de enfermedades relacionadas con el gen seladin-1/DHCR24.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I), de su forma hidroxilada, de una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilado y/o de una prodroga o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilada en la elaboración de un medicamento caracterizado por incrementar la expresión del gen seladin-1/DHCR24.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, deterioro cognitivo, enfermedades asociadas con una oxidación indeseada, procesos patológicos asociados a la edad y progeria, enfermedades cardiovasculares como aterosclerosis, fibrilación auricular, dislipemia, hipercolesterolemia, hiperlipidemia e hipertrigliceridemia, epilepsia, crisis epilépticas y convulsiones, o enfermedades cuya causa o curso está relacionado con la inflamación, en un sujeto con necesidad de tratamiento, que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente eficiente de un compuesto de fórmula (I), su forma hidroxilada o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilado y/o una prodroga o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilada.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una gráfica de dispersión XY que representa el efecto protector del compuesto NST0060 de la muerte causada por xantina/xantina oxidasa (XXO). La figura muestra el porcentaje de la muerte celular (tomando el 100% la producida por XXO) de los cultivos tratados con 10 μ M xantina (X) 60 mU/mL xantina oxidasa (XO) y NST0060 a diferentes concentraciones, representando las medias $\pm$ SD de 3 experimentos independientes por triplicado. * Diferencia significativa respecto a los tratamientos con XXO sola, de acuerdo al test de Student ($p < 0.05$).

La Figura 2 es una gráfica de dispersión XY que representa el efecto protector del compuesto NST0060 de la muerte causada por ácido okadaico (OA). La figura muestra el porcentaje de la muerte celular (tomando el 100% la producida por OA) de los cultivos tratados con 20 nM OA y NST0060 a diferentes concentraciones, representando las medias $\pm$ SD de 2 experimentos independientes por triplicado. * Diferencia significativa respecto a los tratamientos con OA solo, de acuerdo al test de Student ($p < 0.05$).

La Figura 3 es una gráfica de dispersión XY que representa el efecto protector del compuesto NST0060 de la muerte causada por ácido 3-nitropropiónico (3-NP). La figura muestra el porcentaje de la muerte celular (tomando el 100% la producida por 3-NP) de los cultivos tratados con 30 μ M 3-NP y NST0037 a diferentes concentraciones, representando las medias $\pm$ SD de 2 experimentos independientes por triplicado. * Diferencia significativa respecto a los tratamientos con 3-NP solo, de acuerdo al test de Student ($p < 0.05$).

La Figura 4 es una gráfica de dispersión XY que representa el efecto protector del compuesto NST0060 de la muerte causada por tunicamicina (TM). La figura muestra el porcentaje de la muerte celular (tomando el 100% la producida por TM) de los cultivos tratados con 24 μ M TM y NST0060 a diferentes concentraciones, representando las medias $\pm$ SD de 2 experimentos independientes por triplicado. * Diferencia significativa respecto a los tratamientos con TM sola, de acuerdo al test de Student ($p<0.05$).

La Figura 5 es una gráfica de barras que representa el efecto inhibidor del pretratamiento del compuesto NST0060 sobre la activación de la caspasa 3/7 (caspasas efectoras de la apoptosis), y donde la apoptosis es producida por camptotecina (CPT). La figura muestra el porcentaje de la caspasa 3/7 activa referida a las células control sin CPT y con 50 μ M de CPT, y el efecto del pretratamiento con NST0060 a 10 ó 40 μ M o del inhibidor Z-VAD-fmk a 50 μ M (control de inhibición), representando las medias $\pm$ SD de 2 experimentos independientes por triplicado. * Diferencia significativa respecto al tratamiento con CPT de acuerdo al test de Student ($p<0.05$).

La Figura 6 es una gráfica de barras que representa el efecto inhibidor del pretratamiento del compuesto NST0060 sobre la fragmentación de DNA producida por CPT. La figura muestra el porcentaje de la fragmentación de DNA referida a las células control sin CPT y con 50 μ M de CPT, y el efecto del pretratamiento con NST0060 a 10 ó 40 μ M o del inhibidor Z-VAD-fmk a 50 μ M (control de inhibición), representando las medias $\pm$ SD de 2 experimentos independientes por duplicado. * Diferencia significativa respecto al tratamiento con CPT de acuerdo al test de Student ($p<0.05$).

La Figura 7 es una gráfica de barras que representa la expresión del gen seladin-1/DHCR24, normalizado por GAPDH, tras los tratamientos celulares con el compuesto NST0060 a 1, 4, 10 y 40 μ M, cuantificado mediante RT-PCR cuantitativa. Se representan las medias $\pm$ SD de un experimento por triplicado, y se muestran los valores de dos controles (células sin tratamiento) en el ensayo. * Diferencia significativa respecto a los controles de acuerdo al test de Student ($p<0.05$).

La Figura 8 es una gráfica de dispersión XY que representa la permeabilidad efectiva expresada como P_e (cm/s) frente al paso de BHE (%) de simvastatina y NST0060 en sus formas activas, ambos parámetros han sido determinados *in vitro* mediante el método PAMPA. Como controles positivo y negativo se emplearon verapamilo y teofilina respectivamente.

La Figura 9 es una gráfica de dispersión XY que representa el porcentaje de actividad HMGR con respecto al control ejercida por la simvastatina y NST0060 en sus formas activas a diferentes concentraciones determinados mediante un ensayo *in vitro*. Los resultados son la media $\pm$ SD de los cinco ensayos independientes por duplicado llevados a cabo.

La Figura 10 es un diagrama de barras que representa el efecto de la simvastatina y del NST0060 en sus formas activas sobre los niveles de colesterol total en la línea celular humana HepG2. Los resultados vienen expresados como el porcentaje de reducción de colesterol respecto al control en cada línea tras la incubación de los compuestos durante 20 h en ausencia de FBS. Las determinaciones fueron llevadas a cabo por medios enzimáticos y fluorométricos y se presentan los resultados como la media $\pm$ SD de 2 ensayos Independientes por triplicado. * Diferencia significativa respecto a las células sin tratar, de acuerdo al test de Student ($p<0.05$).

La Figura 11 es un diagrama de barras que representa el porcentaje de larvas sanas tras exposición del compuesto NST0060 en comparación con la simvastatina. Los resultados se expresan como las medias $\pm$ SD del porcentaje de animales sanos (sin problemas toxicológicos) después del tratamiento con diferentes dosis de NST0060 y simvastatina. Las barras en color negro representan el grupo de animales tratados con NST0060 y las barras de color gris representan los animales tratados con simvastatina.

La Figura 12 es un diagrama de barras que representa la variación de la cardiotoxicidad del compuesto NST0060 en comparación con la simvastatina en función de la dosis. Los resultados se expresan como las medias $\pm$ SD del porcentaje del ritmo cardiaco de los embriones o larvas tratados con dosis crecientes de NST0060 o de simvastatina, a las 72 horas post-tratamiento. La línea negra punteada horizontal representa el valor medio del ritmo cardiaco correspondiente a los controles. * Diferencia significativa de los tratamientos respecto al control, de acuerdo al test de Student ($p<0.05$). # Diferencia significativa entre NST0060 frente a simvastatina, de acuerdo al test de Student ($p < 0.05$).

La Figura 13 es un diagrama de barras que representa el efecto antiinflamatorio de la simvastatina y del NST0060 mediado por la disminución de la concentración plasmática de $TNF\alpha$ en ratones 2 h después de la administración de LPS a 8 mg/kg i.p. Los tratamientos se administraron 12 h y 1 h antes de la inyección de LPS a ratones macho C57BL6 (n=8). Los resultados vienen expresados como la concentración plasmática de $TNF\alpha$ en pg/mL determinada mediante ELISA y son la media $\pm$ SEM. * Diferencia significativa respecto al grupo control (vehículo), de acuerdo al test de Student ($p<0.05$); # diferencia significativa entre los tratamientos, de acuerdo al test de Student ($p<0.05$).

La Figura 14 es una gráfica de Kaplan-Meier que representa el índice de supervivencia de ratones macho C57BL6 tras la inyección i.p. de suero salino fisiológico o LPS 8 mg/kg previo tratamiento i.p. con NST0060 a 50 mg/kg o vehículo. Los tratamientos se administraron 12 h y 1 h antes de la inyección de LPS (n=8/grupo). El vehículo se administró con la misma pauta (n=8). * Diferencia significativa con respecto al Grupo Control de acuerdo al test de Student ($p<0.05$).

La Figura 15 es una gráfica de dispersión XY que representa el *score* asociado a la sintomatología de los animales inoculados i.p. con LPS 8 mg/kg previo tratamiento con NST0060 50 mg/kg frente al tiempo. Los tratamientos se administraron 12 h y 1 h antes de la inyección de LPS a ratones macho C57BL6 (n=8/grupo). * Diferencia significativa con respecto al Grupo Control+LPS de acuerdo al test de Student ($p<0.05$). Las diferentes etapas del *score* corresponden a: 0 = asintomáticos; 1 = letargia leve e hipotermia; 2 = letargia severa, diarreas y temblores; 3 = inmovilidad absoluta.

La Figura 16 es un diagrama de barras que representa el efecto antiinflamatorio del NST0060 mediado por la disminución de la concentración plasmática de $\text{TNF}\alpha$ en ratones a 2 h o 4 h después de la administración de LPS a 8 mg/kg i.p. Los tratamientos se administraron 12 h y 1 h antes de la inyección de LPS a ratones macho C57BL6 (n=8 a 16). Los resultados vienen expresados como la concentración plasmática de $\text{TNF}\alpha$ en pg/mL determinada mediante ELISA y son la media $\pm$ SEM. * Diferencia significativa respecto al grupo control (vehículo), de acuerdo al test de Student ($p<0.05$); # diferencia significativa entre los tratamientos, de acuerdo al test de Student ($p<0.05$).

La Figura 17 es un diagrama de barras que representa el efecto antiinflamatorio del NST0060 mediado por la disminución de la concentración plasmática de IL-1 β en ratones a 2 h después de la administración de LPS a 8 mg/kg i.p. Los tratamientos se administraron 12 h y 1 h antes de la inyección de LPS a ratones macho C57BL6 (n=8). Los resultados vienen expresados como la concentración plasmática de IL-1 β en ng/mL determinada mediante ELISA y son la media $\pm$ SEM. * Diferencia significativa respecto al grupo control (vehículo), de acuerdo al test de Student ($p<0.05$).

La Figura 18 es una gráfica de barras donde se representa la media $\pm$ SEM del tiempo en minutos tras la inoculación de KA en el que aparece la primera convulsión (eje Y) en función del pretratamiento recibido (eje X). El grupo de pretratamiento con vehículo se representa en negro y el grupo de tratamiento con NST0060 a 50 mg/Kg de peso se representa en blanco. *p-valor <0.05 según el test de la t de Student con dos colas de distribución para muestras de varianza desigual.

La Figura 19 es una gráfica de dispersión XY que representa el nivel de severidad de los síntomas epileptogénicos según la escala de Racine (Racine, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1972; 32[3]: 281-94), frente al tiempo post-inoculación de la sustancia epileptogénica (ácido kaínico o kainato o KA). La gráfica muestra la evolución del estado epileptogénico de los animales según el tratamiento recibido: vehículo se representa con cuadrados y línea continua y el grupo de tratamiento con NST0060 a 50 mg/Kg de peso se representa con círculos y línea discontinua. *p-valor <0.05 según el test de ANOVA de varianza general ANOVA y el test *post-hoc* de Newman-Keuls.

La Figura 20 es un panel con las imágenes representativas de la cinética de emisión fotónica de los diferentes grupos de tratamiento: (i) Vehículo+PBS, (ii) Vehículo+KA y (iii) NST0060+KA. Junto a las imágenes tomadas se muestra una escala de color que representa la intensidad de la señal desde 6 000 hasta 30 000 fotones/seg/cm²/sr.

La Figura 21 es una gráfica de dispersión XY con la media $\pm$ SEM de la cuantificación de la señal en los distintos puntos temporales de los sujetos de los grupos experimentales: (i) Vehículo+PBS representado con triángulos y línea de puntos, (ii) Vehículo+KA representado con cuadrados y línea continua y (iii) NST0060+KA representado con círculos y línea discontinua. *p-valor <0.05 para cada punto temporal respecto del grupo Vehículo+PBS según el test de la t de Student con una cola de distribución para muestras de varianza desigual.

La Figura 22 es una gráfica de Kaplan-Meier que representa el índice de supervivencia de los ratones en función del tratamiento (-24 y -0.5 horas de la inoculación de la sustancia excitotóxica [KA o Kainato]), la inoculación de la sustancia excitotóxica (0 días post-inoculación [d.p.i.]) y el posterior tratamiento (hasta 7 d.p.i.).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Para facilitar la comprensión de la invención objeto de esta solicitud de patente, a continuación se expone el significado de algunos términos y expresiones utilizados en el contexto de la invención.

El término “neuroprotector”, tal como aquí se utiliza, se refiere a cualquier sustancia capaz de producir la atenuación o desaparición de los efectos de la degeneración o muerte neuronal mediante cualquier mecanismo conocido o por conocer, por ejemplo, necrosis, apoptosis, autofagia, daño oxidativo, excitotoxicidad, daño de retículo endoplásmico, deposición de subproductos, desorganización del citoesqueleto, inhibición de la cadena de transporte electrónico, pérdida de la arquitectura celular, etc., o a la disminución o desaparición de sus efectos secundarios.

El término “estatina”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un inhibidor de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMGCR), enzima que cataliza el paso limitante de la biosíntesis del colesterol, e incluye cualquier estatina tanto natural como sintética o semisintética. Algunas estatinas pueden presentarse en forma cerrada (lactona) o en forma abierta (hidroxiácido). Los hidroxiácidos (forma abierta) pueden prepararse a partir de las lactonas correspondientes por hidrólisis convencional, por ejemplo, con hidróxido sódico en metanol, hidróxido sódico en tetrahidrofurano-agua y similares. En la forma abierta (hidroxiácido), las estatinas reaccionan para formar sales con

caciones de metales y aminas, farmacéuticamente aceptables, formadas a partir de bases orgánicas o inorgánicas. Las sales farmacéuticamente aceptables de las estatinas pueden diferir de los ácidos libres correspondientes en algunas características físicas tales como solubilidad y punto de fusión, pero se consideran equivalentes a la forma de ácido libre para los fines de esta invención. La forma abierta (hidroxiácido) libre de las estatinas puede regenerarse a partir de la forma de sal, si se desea, poniendo en contacto la sal con una solución acuosa diluida de un ácido tal como ácido clorhídrico y similares. La forma cerrada (lactona) de las estatinas puede regenerarse por disolución de la forma abierta (hidroxiácido) en un disolvente inerte tal como, por ejemplo, tolueno, benceno, acetato de etilo y similares, a temperaturas comprendidas entre aproximadamente 0°C y aproximadamente el punto de ebullición del disolvente, típicamente (aunque no necesariamente) con separación simultánea del agua resultante y catálisis con ácidos fuertes, e.g., ácido clorhídrico y similares. Asimismo, las estatinas pueden existir en forma solvatada o no solvatada y tales formas son equivalentes a la forma no solvatada para los fines de esta invención.

El término “cardioprotector”, tal como aquí se utiliza, se refiere a cualquier sustancia capaz de producir la atenuación o desaparición de los efectos subyacentes a las enfermedades cardiovasculares o cardiopatías o del daño cardíaco mediante cualquier mecanismo conocido o por conocer, por ejemplo, necrosis, apoptosis, isquemia, arritmia, deposición de subproductos, pérdida de la arquitectura celular, etc., o a la disminución o desaparición de sus efectos secundarios.

El término “hipolipemiente”, tal como aquí se utiliza, se refiere a cualquier sustancia farmacológicamente activa que tenga la propiedad de disminuir los niveles de lípidos en sangre o en otros tejidos. La importancia de estas sustancias viene dada porque el exceso de algunos tipos de lípidos (colesterol o triglicéridos) o de las lipoproteínas, es uno de los principales factores de riesgo para las enfermedades cardiovasculares.

El término “hipocolesterolémico”, tal como aquí se utiliza, se refiere a cualquier sustancia farmacológicamente activa que tenga la propiedad de disminuir los niveles de colesterol en sangre o en otros tejidos.

El término “antiinflamatorio”, tal como aquí se utiliza, se refiere a la atenuación de los procesos inflamatorios o a la inflamación aguda o a la inflamación crónica o sistémica, por ejemplo, en la duración y/o en la intensidad, o a la desaparición de los procesos inflamatorios o a la inflamación aguda o a la inflamación crónica o sistémica, o a la disminución o desaparición de sus efectos secundarios.

El término “bioseguro” tal como aquí se utiliza, se refiere a ausencia de efectos tóxicos, generación de tumores, alteraciones en el desarrollo embrionario (teratogénesis) u otros efectos adversos.

El término “enfermedad neurodegenerativa”, tal como aquí se utiliza, incluye enfermedades que resultan de la degeneración o deterioro del tejido nervioso, en particular de las neuronas, que conduce, a lo largo del tiempo, a una disfunción o a una incapacidad; el término degeneración incluye pérdida de la viabilidad celular, pérdida de la función celular y/o pérdida del número de células (neuronas u otras). Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de enfermedades neurodegenerativas incluyen enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple, etc. En una realización particular, dicha enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad relacionada con la muerte neuronal causada por una sustancia que, por ejemplo, causa estrés oxidativo o estrés de retículo endoplásmico o apoptosis o excitotoxicidad o desorganización del citoesqueleto o inhibición de la cadena de transporte electrónico o muerte neuronal en general.

El término “enfermedad asociada con una oxidación indeseada”, tal como aquí se utiliza, se refiere a una enfermedad causada por una oxidación indeseada (e.g., excesiva) o en el que dicha oxidación indeseada es un síntoma. Dicha oxidación indeseada puede ser la consecuencia del daño causado por radicales libres a proteínas, DNA y/o lípidos independientemente del radical libre específico implicado o de la diana. La oxidación indeseada implica una generación excesiva de radicales libres que puede causar una disfunción en células, tejidos u órganos y puede constituir, por tanto, un mecanismo potencial de una enfermedad. En una realización particular, dicha oxidación indeseada puede ser causada por la edad (envejecimiento) o por un proceso neurodegenerativo y puede provocar por sí sola o en combinación con otros factores el comienzo de diversas enfermedades. En una realización concreta, dicha oxidación indeseada se relaciona con el daño oxidativo causado por una sustancia que causa estrés oxidativo.

El término “proceso patológico asociado a la edad”, tal como aquí se utiliza, se refiere a cualquier evento o combinación de eventos relacionado/s con el envejecimiento que produzca/n pérdida de viabilidad celular del tejido nervioso o sensibilización celular del tejido nervioso, pérdida de la función celular y/o pérdida del número de células (neuronas u otras), incluyendo disfunción metabólica de las células, procesos de estrés, infecciones por patógenos, alteraciones genéticas, susceptibilidad genética, trauma, isquemia, epilepsia, etc.

El término “enfermedad cardiovascular”, tal como aquí se utiliza, se refiere a cualquier enfermedad o disfunción o alteración del corazón o del resto del sistema cardiovascular o de la sangre.

El término “inflamación”, tal como aquí se utiliza, se refiere a una respuesta inespecífica frente a las agresiones del medio, o generada por agentes inflamatorios (bacterias, virus, parásitos, hongos, procesos de muerte celular como apoptosis o necrosis, moléculas que activan la respuesta inflamatoria como ácido úrico, nucleótidos, ácidos nucleicos, toxinas..., traumatismos, cuerpos extraños, agentes físicos, alteraciones vasculares, procesos degenerativos, alteraciones inmunitarias y autoinmunes, hipersensibilidad, etc.

El término “deterioro cognitivo”, tal como aquí se utiliza, se refiere a la pérdida o alteración de las funciones mentales, tales como memoria, orientación, lenguaje, reconocimiento visual o conducta que interfieren con la actividad e interacción social de la persona afectada de forma persistente en el tiempo.

5 El término “epilepsia”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un síndrome cerebral crónico de causas diversas, caracterizada por crisis recurrentes debidas a unas descargas excesivas hipersincrónicas de impulsos nerviosos por las neuronas cerebrales, asociadas eventualmente con diversas manifestaciones clínicas y paraclínicas. Las crisis pueden ser convulsivas o no convulsivas. La epilepsia puede tener muchas causas; en unos casos puede ser debida a lesiones cerebrales de distintos tipos (e.g., traumatismos craneales, secuelas de meningitis, tumores, etc.); en otros casos no hay
10 ninguna lesión sino una predisposición de origen genético a padecer la crisis; en otros casos, la etiología de la epilepsia puede ser ambiental, por tratamientos farmacológicos, por excitotoxicidad, trauma, procesos de estrés, envejecimiento, problemas del desarrollo, enfermedades neurológicas, crisis psicológicas, problemas en la gestación, problemas en el parto, etc.

15 El término “epiléptico o convulsivante”, tal como aquí se utiliza, se refiere a cualquier crisis epiléptica o convulsión de cualquier etiología, por ejemplo, genética, ambiental, por tratamientos farmacológicos, por excitotoxicidad, por trauma, por procesos de estrés, por envejecimiento, por problemas del desarrollo, por enfermedades neurológicas, por crisis psicológicas, por problemas en la gestación, por problemas en el parto, etc. Una crisis epiléptica ocurre cuando una actividad anormal eléctrica en el cerebro causa un cambio involuntario de movimiento o función del cuerpo, de
20 sensación, en la capacidad de estar alerta o de comportamiento, y pueden ser parciales o generalizadas (convulsivas o no-convulsivas).

El término “sujeto”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un miembro de una especie de mamífero, e incluye, pero no se limita a, animales domésticos, primates y humanos; preferentemente, el sujeto es un ser humano, masculino
25 o femenino, de cualquier edad o raza. En una realización particular, dicho sujeto es un mamífero que padece, o es susceptible de padecer, procesos patológicos asociados a la edad, tal como envejecimiento, o una enfermedad neurodegenerativa, tal como una enfermedad neurodegenerativa crónica.

El término “farmacéuticamente aceptable”, tal como aquí se utiliza, se refiere a que el compuesto es tolerable fisiológicamente y no produce, en general, una reacción alérgica o una reacción desfavorable similar, tal como un trastorno gástrico, mareo o similares, cuando se administra a un sujeto; preferiblemente, dicho término “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora de un gobierno o recogido en la farmacopea estadounidense o en otra farmacopea reconocida generalmente para uso en animales (e.g., farmacopea europea, etc.).

35 El término “sal farmacéuticamente aceptable”, tal como aquí se utiliza, incluye “sales metálicas farmacéuticamente aceptables” así como “sales de amina farmacéuticamente aceptables”. El término “sal metálica farmacéuticamente aceptable” contempla sales formadas con iones de sodio, potasio, calcio, magnesio, aluminio, hierro o zinc. El término “sal de amina farmacéuticamente aceptable” contempla sales con amoníaco y bases nitrogenadas orgánicas suficientemente fuertes para formar sales con ácidos carboxílicos. Dichas sales farmacéuticamente aceptables pueden ser
40 obtenidas por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

El compuesto el 2-Propylpentanoic Acid (1S,3R,7S,8S,8aR)-1,2,3,7,8,8a-hexahydro-3,7-dimethyl-8-[2-[(2R,4R)-tetrahydro-4-hydroxy-6-oxo-2H-pyran-2yl]ethyl]-1-naphthalenyl ester puede ser obtenido por métodos de semisíntesis, tal como se describe para otros compuestos de la misma familia en la patente norteamericana US 4866090.

45 Numerosos ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto el efecto neuroprotector del compuesto NST0060 frente a la acción de una sustancia causante de estrés oxidativo, así como su efecto neuroprotector frente a una sustancia que causa desorganización del citoesqueleto, así como su efecto neuroprotector frente a una sustancia que causa inhibición de la cadena de transporte electrónico, así como su efecto neuroprotector frente a la acción de una
50 sustancia causante de estrés de retículo endoplásmico, y su efecto neuroprotector frente a la acción de una sustancia causante de apoptosis en neuronas humanas colinérgicas.

El efecto neuroprotector frente a la acción de una sustancia causante de estrés oxidativo, tal como xantina/xantina oxidasa (XXO) se describe en el Ejemplo 2. En dicho ejemplo se observa que el compuesto NST0060, es capaz de
55 reducir cuantitativamente y de forma significativa la muerte neuronal causada por estrés oxidativo, lo que pone de manifiesto la capacidad neuroprotectora de este compuesto (Figura 1). Con el objetivo de definir mejor el efecto neuroprotector del compuesto, los inventores analizaron con más detalle el proceso neurodegenerativo mediante el análisis de la muerte neuronal causada por la acción por ácido okadaico (OA) el cual causa la muerte por desorganización del citoesqueleto mediante la inhibición de la proteína fosfatasa 1, determinando que el compuesto NST0060 es capaz de
60 reducir cuantitativamente y de forma significativa la muerte neuronal causada por desorganización del citoesqueleto, lo que pone de manifiesto la capacidad neuroprotectora de dicho compuesto (Figura 2). Con el objetivo de definir mejor el efecto neuroprotector del compuesto, los inventores analizaron con más detalle el proceso neurodegenerativo mediante el análisis de la muerte neuronal causada por la acción por ácido 3-nitropropiónico (3-NP) el cual causa la muerte mediante la inhibición de la cadena de transporte electrónico mediante la inhibición de la succinato deshidrogenasa, y se acepta como modelo de la enfermedad de Huntington, determinando que el compuesto NST0060 es
65 capaz de reducir cuantitativamente y de forma significativa la muerte neuronal causada por la inhibición de la cadena de transporte electrónico, lo que pone de manifiesto la capacidad neuroprotectora de dicho compuesto (Figura 3). Con el objetivo de definir mejor el efecto neuroprotector del compuesto, los inventores analizaron con más detalle el pro-

ceso neurodegenerativo mediante el análisis de la muerte neuronal causada por la acción de una sustancia causante de estrés de retículo endoplásmico (tunicamicina), determinando que el compuesto NST0060 es capaz de reducir cuantitativamente y de forma significativa la muerte neuronal causada por estrés de retículo endoplásmico, lo que pone de manifiesto la capacidad neuroprotectora de dicho compuesto (Figura 4). Con el objetivo de definir mejor el efecto neuroprotector del compuesto, los inventores analizaron con más detalle el proceso neurodegenerativo mediante el análisis de la muerte neuronal causada por la acción de una sustancia causante de apoptosis (camptotecina, CPT), determinando que el compuesto NST0060 es capaz de reducir cuantitativamente y de forma significativa la activación de las caspasas efectoras 3/7 que causan apoptosis, lo que pone de manifiesto la capacidad neuroprotectora de dicho compuesto (Figura 5). Asimismo, con el objetivo de definir mejor el efecto neuroprotector de dicho compuesto, los inventores analizaron con más detalle el proceso neurodegenerativo mediante el análisis por citometría de flujo de la muerte neuronal causada por apoptosis y su inhibición por dicho compuesto, en comparación con un inhibidor específico de la muerte neuronal por apoptosis, el Z-VAD-fmk, determinando que el compuesto NST0060 es capaz de inhibir cuantitativamente y de forma significativa la muerte neuronal causada por apoptosis (Figura 6).

Por otra parte, se estudió la capacidad del compuesto NST0060 para incrementar la expresión del gen seladin-1/DHCR24, ya que se han demostrado los efectos neuroprotectores del aumento de expresión de este gen frente a la enfermedad de Alzheimer (Cechi *et al.*, J. Cell. Mol. Med. 2008; 12: 1990-2002). Se ha descrito (Greeve *et al.*, J. Neurosci. 2000; 20: 7345-52) que el producto del gen seladin-1/DHCR24 ejerce su poder neuroprotector mediante el efecto antiapoptótico por inhibición de la caspasa-3, y regulando la síntesis de colesterol a partir de desmosterol, lo que determina la generación de una barrera contra las agresiones neurotóxicas y previene la producción de β -amiloides. Estos mecanismos de acción indican que el aumento de la expresión del gen seladin-1/DHCR24 tiene un efecto neuroprotector general, con lo que aquellos fármacos que producen un aumento de la expresión de este gen pueden ser potencialmente utilizados en la prevención y/o tratamiento de la muerte neuronal asociada a enfermedades neurodegenerativas (e.g., Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, *status epilepticus*, Huntington, etc.) o de enfermedades asociadas con una oxidación indeseada o de procesos patológicos asociados a la edad. La capacidad de aumentar la expresión del gen seladin-1/DHCR24 mediante la administración de NST0060 se describe en el Ejemplo 3. En dicho ejemplo se observa que el compuesto NST0060 es capaz de aumentar cuantitativamente, de forma significativa y dosis-dependiente la expresión del gen seladin-1/DHCR24, lo cual se demuestra mediante el análisis de la expresión relativa usando PCR cuantitativa a tiempo real. Dichos resultados ponen de manifiesto la capacidad neuroprotectora del compuesto NST0060 (Figura 7).

Con el objetivo de definir el paso de barrera hematoencefálica (BHE) del compuesto NST0060, los inventores analizaron diferentes parámetros como la lipofilicidad teórica, el porcentaje de paso y la permeabilidad efectiva (Figura 8 y Tabla 1) tal como se describe en el Ejemplo 4. El compuesto NST0060, sorprendentemente, produjo un alto paso de BHE prácticamente idéntico al del control positivo (el verapamilo) y considerablemente superior a la estatina conocida con mejor paso de BHE (la simvastatina).

Además, y debido a la naturaleza del compuesto NST0060, se estudió la capacidad inhibidora de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGR). Sorprendentemente, y tal como se muestra en el Ejemplo 5 los resultados demuestran que el compuesto NST0060 presenta un fuerte efecto inhibidor de la enzima. En los resultados obtenidos y tal como muestra la Figura 9, se puede apreciar que la actividad inhibitoria de la enzima HMGR por parte del compuesto NST0060 está próxima al de una estatina comercial (la simvastatina) usada habitualmente para disminuir los niveles de colesterol en la población humana. Con el objetivo de definir mejor el efecto hipocolesterolémico del compuesto, los inventores analizaron con más detalle la actividad hipocolesterolémica mediante el análisis de las reducciones de colesterol en una línea celular humana de origen hepático. En los resultados obtenidos y tal como muestra la Figura 10, se puede apreciar que la actividad hipocolesterolémica del compuesto NST0060 está próxima al de una estatina comercial (la simvastatina).

Para que un compuesto pueda ser administrado a la población humana, es necesario que se demuestre su inocuidad y seguridad. Con este objetivo, los inventores analizaron la bioseguridad del compuesto NST0060 en un modelo toxicológico ampliamente utilizado, el embrión de pez cebra, siguiendo la metodología descrita en el protocolo C.15 de la OECD, tal como se describe en el Ejemplo 6. En este modelo, los inventores compararon el efecto del compuesto con la simvastatina en concentraciones superiores a las dosis utilizadas en la clínica, con el objetivo de causar daños evidentes en los embriones para poder definir mejor los efectos adversos de dicho compuesto. Así, la administración de una alta dosis de NST0060 provocó una mortalidad que fue inferior que la detectada con la misma dosis de simvastatina (Tabla 2). Con el objetivo de definir mejor la bioseguridad del compuesto, se estudió el porcentaje de larvas sanas al final del experimento en comparación con la simvastatina, observándose un mayor número de larvas sanas en los tratamientos con NST0060 en comparación con la simvastatina a dosis iguales (Figura 11). Con el objetivo de definir mejor la bioseguridad del compuesto, se estudió el porcentaje de latidos cardíacos en función de la dosis utilizada comparando NST0060 con la simvastatina, observándose una mayor disminución del ritmo cardíaco en la administración de simvastatina que en la de NST0060, (Figura 12), lo que indica una mayor bioseguridad del compuesto NST0037.

También se estudió la actividad antiinflamatoria del compuesto NST0060 *per se* y en comparación con una estatina conocida (simvastatina). Los resultados obtenidos mostraron que el compuesto NST0060 posee un fuerte poder antiinflamatorio, y sorprendentemente y significativamente mayor que la simvastatina, ya que produjo una fuerte disminución de los niveles de TNF α y de IL-1 β , así como de los efectos causados por la inyección de LPS a ratones (Figuras 13 a 17).

Asimismo, como es conocido, la administración de una sustancia excitotóxica induce, en algunos casos, crisis convulsivas y epilepsia en el animal; por este motivo, los inventores analizaron si el efecto neuroprotector del compuesto NST0060 se veía acompañado de un efecto antiepiléptico y anticonvulsivante producido por una sustancia excitotóxica (Figuras 18 y 19), así como de la oxidación indeseada producida por una sustancia excitotóxica (Figuras 20 y 21), así como de la muerte causada por una sustancia excitotóxica (Figuras 22), observándose que la administración de NST0060 producía una disminución de todos estos parámetros.

La composición farmacéutica proporcionada por esta invención puede contener el compuesto NST0060, y/o su forma hidroxilada y/o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilado y/o una prodroga o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilada junto con uno o más adyuvantes, vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

El término “sal, prodroga o solvato” farmacéuticamente aceptable se refiere a cualquier sal, solvato farmacéuticamente aceptable o cualquier otro compuesto que, en su administración al receptor, es capaz de proporcionar (de forma directa o indirecta) un compuesto tal y como se ha descrito en la presente invención. No obstante, las sales farmacéuticamente inaceptables también caen dentro del alcance de la invención, ya que éstas pueden ser útiles para la preparación de sales farmacéuticamente aceptables. La preparación de sales y prodrogas puede ser llevada a cabo mediante métodos conocidos en el estado de la técnica.

Cualquier compuesto que es una prodroga del compuesto de fórmula (I) o de su forma hidroxilada está dentro del alcance de la invención. El término “prodroga” se utiliza en su significado más amplio y abarca aquellos derivados que son convertidos *in vivo* a los compuestos de la invención. Tales derivados serían evidentes para un experto medio en la materia e incluyen los siguientes derivados de los presentes compuestos: ésteres, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfatos, ésteres de sales sulfonato de metales, carbamatos y amidas. Los compuestos según la invención pueden estar en forma cristalina, bien como compuestos libres o como solvatos (por ejemplo, hidratos) y se pretende que ambas formas estén dentro del alcance de la presente invención. Los métodos de solvatación en general son conocidos en el estado de la técnica. En una realización particular el solvato es un hidrato.

Las composiciones farmacéuticas que contienen el compuesto NST0060, o una forma hidroxilada del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilado, pueden formularse en cualquier forma farmacéutica de administración adecuada para su administración por la vía de administración elegida, e.g., oral, parenteral (subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, etc.), tópica, rectal, etc. A modo ilustrativo, no limitativo, las composiciones farmacéuticas proporcionadas por esta invención pueden formularse en una forma farmacéutica sólida de administración por vía oral (e.g., gránulos, comprimidos, cápsulas, etc.), en una forma farmacéutica líquida de administración por vía oral (e.g., soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.), en una forma farmacéutica para su administración por vía parenteral (e.g., soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.). Para ello, en cada caso, se elegirán los vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados para la forma farmacéutica de administración y vía de administración elegida, por ejemplo, aglutinantes, diluyentes, desintegrantes, lubricantes, humectantes, etc., para la formulación de formas farmacéuticas de administración sólidas, y tampones, tensioactivos, etc., para la formulación de formas farmacéuticas de administración líquidas. Dichos vehículos y excipientes deben ser farmacéuticamente aceptables y farmacológicamente tolerables y han de poder ser combinados con otros componentes de la formulación sin ejercer ningún efecto adverso sobre el sujeto tratado. Información sobre dichos vehículos y excipientes, así como sobre dichas formas farmacéuticas de administración de dicho principio activo puede encontrarse en tratados de farmacia galénica. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos, en general, y de sus procedimientos de preparación puede encontrarse en el libro “Tratado de Farmacia Galénica”, de C. Fauli i Trillo, 1ª Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

La composición farmacéutica proporcionada por esta invención comprende, el compuesto NST0060, o una forma hidroxilada del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilado, en una cantidad terapéuticamente eficiente. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente eficiente” se refiere a la cantidad de compuesto calculada para producir el efecto deseado. La dosis del compuesto NST0060, o una forma hidroxilada del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilado, a administrar a un sujeto puede variar dentro de un amplio intervalo dependiendo de numerosos factores, entre los que se incluyen las características del compuesto utilizado, e.g., su actividad y vida media biológica, la concentración del compuesto en la composición farmacéutica, la situación clínica del sujeto, la severidad de la patología, la forma farmacéutica de administración elegida, etc. La composición farmacéutica proporcionada por esta invención se puede administrar una o más veces al día con fines preventivos o terapéuticos o, alternativamente, se pueden seguir otras pautas de administración, no necesariamente diaria sino también de forma puntual, semanal, etc.

La composición farmacéutica proporcionada por esta invención, si se desea, puede usarse junto con otros fármacos, por ejemplo, fármacos útiles en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, deterioro cognitivo, enfermedades asociadas con una oxidación indeseada, procesos patológicos asociados a la edad y progeria, epilepsia, crisis epilépticas, convulsiones, inflamación o procesos inflamatorios o enfermedades cardiovasculares, con el fin de aumentar la eficiencia de la composición farmacéutica proporcionada por esta invención, generándose de este modo una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden facilitarse como una composición farmacéutica separada para su administración al mismo tiempo (administración simultánea) que la composición farmacéutica proporcionada por esta invención o en momentos di-

ferentes (administración secuencial) respecto a la administración de la composición farmacéutica proporcionada por esta invención.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados en sentido limitativo de la misma.

Ejemplo 1

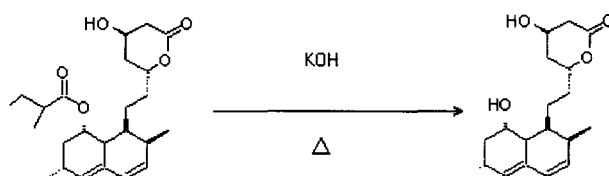
Síntesis del 2-Propylpentanoic Acid (1S,3R,7S,8S,8aR)-1,2,3,7,8,8a-hexahydro-3,7-dimethyl-8-[2-[(2R,4R)-tetrahydro-4-hydroxy-6-oxo-2H-pyran-2yl]ethyl]-1-naphthalenyl ester

El compuesto Identificado como NST0060 se preparó siguiendo la metodología descrita en Hoffman, *et al.* (*J. Med. Chem.*, 1986, 29, 849-852) para compuestos similares.

1.1. Purificación de lovastatina

Partiendo de un extracto de procedencia natural, la lovastatina se purificó por cromatografía en columna utilizando como eluyente un gradiente de hexano y acetato de etilo.

1.2. Obtención de monacolina J



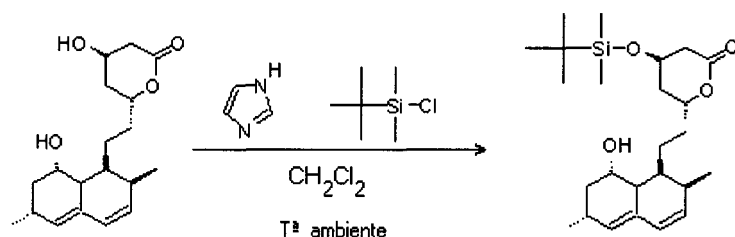
Se prepara una disolución de 0,7 g de hidróxido potásico en 0.5 ml de agua y se añade poco a poco 3 ml de metanol. Posteriormente, se añaden 0.5 g de Lovastatina y se pone la disolución a reflujo durante 21 horas. Después del tratamiento de la reacción se obtiene una mezcla al 50% de monacolina J y producto de apertura.

Datos de RMN (CDCl_3) de la monacolina J

Nº	C	H
1	36.26	1.82 m
2	30.76	2.37 m
3	133.59	5.78 (dd, J= 9.5 y 6.1 Hz)
4	128.50	5.97 (d, J= 9.5 Hz)
4a	131.35	
5	130.08	5.52 s _{ancho}
6	27.44	2.44 m
7	35.84	A: 1.87 m B: 1.79 m
8	65.24	4.23 (dd, J= 6.0 y 2.9 Hz)
8a	38.70	2.15 m

9	24.00	A: 1.82 m B: 1.44 m
10	32.73	A: 1.80 m B: 1.52 m
11	76.26	4.70 m
12	36.24	A: 1.98 m B: 1.70 m
13	62.55	4.34 m
14	38.61	A: 2.69 (dd, J= 17.6 y 4.8 Hz) B: 2.59 (ddd, J= 17.6, 3.6 y 1.1 Hz)
15	170.96	
16	13.98	0.88 (d, J= 7.0 Hz)
17	23.74	1.17 (d, J= 7.5 Hz)

1.3. Preparación del derivado protegido



Se prepara una disolución de 0,5 g de Monacolina J en 10 ml de diclorometano.

Se añaden 0,4345 g de imidazol y se agita hasta disolución. A continuación se añade 0,4835 g de cloruro de terc-butil-dimetilsilano disueltos en 5 ml de diclorometano, y se continúa la agitación durante 24 horas. Se sigue la reacción por TLC utilizando como eluyente diclorometano-metanol (10:1).

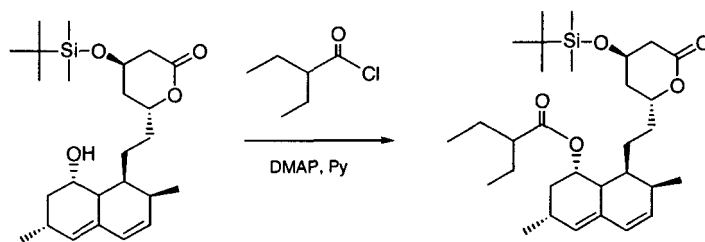
Rendimiento: 96%.

Datos de RMN (CDCl₃) del derivado protegido.

Nº	C	H
1	36.55	1.84 m
2	30.89	2.41 m
3	133.76	5.82 (dd, J= 9.6 y 6.2 Hz)
4	128.48	6.01 (d, J= 9.6 Hz)
4a	131.40	
5	130.07	5.58 <i>s</i> _{ancho}
6	27.43	2.49 m
7	35.87	A: 1.95 m B: 1.90 m
8	65.34	4.28 (dd, J= 6.0 y 3.0 Hz)
8a	38.91	2.20 m
9	24.40	A: 1.82 m

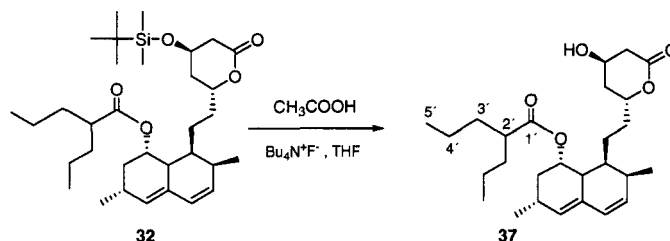
		B: 1.52 m
10	33.11	A: 1.82 m B: 1.50 m
11	76.49	4.71 m
12	36.92	A: 1.93 m B: 1.74 m
13	63.63	4.33 m
14	39.36	A: 2.65 (dd, J= 17.4 y 4.4 Hz) B: 2.59 (ddd, J= 17.4, 3.4 y 1.6 Hz)
15	170.46	
16	14.01	0.94 (d, J= 7.0 Hz)
17	23.88	1.22 (d, J= 7.5 Hz)
CH ₃ Si	-4.84	0,11 s
CH ₃ -C	18.00	
CH ₃ -C	25.74	0.92 s

1.4. Preparación del derivado acilado



En un matraz con atmósfera inerte, se disuelven 0,3 g del derivado protegido obtenido previamente en 2 ml de piridina. Posteriormente, se añade 0,06 g de DMAP disuelta en 2 mL de piridina. Se coloca el matraz de reacción en baño de hielo y se añaden 0,378 ml del cloruro de 2-etilbutirilo. A continuación se agita durante una hora a 0°C y a temperatura ambiente durante 18 horas. Se sigue la reacción por TLC utilizando como eluyente hexano-acetato de etilo (2:1). Rendimiento 95%.

1.5. Síntesis del compuesto final



0,368 g del derivado obtenido previamente se disuelven en 2 ml de THF. A continuación, se añade sobre el medio de reacción una disolución de 0,16 ml de ácido acético y 2,16 ml de fluoruro de tetrabutilamonio 1 M. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 16 horas. Se sigue la reacción por TLC utilizando como eluyente diclorometano-acetona (6:1).

Rendimiento 75%.

ES 2 380 473 A1

Datos de RMN (CDCl₃) del compuesto final

Nº	C	H
1	36.50	1.60 m
2	30.63	2.30 m
3	133.07	5.72 (dd, J= 9.7 y 6.1 Hz)
4	128.32	5.92 (d, J= 9.7 Hz)
4a	131.53	
5	129.69	5.45 (dd, J= 3.1 y 2.9 Hz)
6	27.41	2.38 m
7	32.07	1.86 m
8	67.68	5.37 (dd, J= 6.2 y 3.1 Hz)
8a	37.42	2.19 (dddd, J=12.0; 5.3; 2.5 y 2.5 Hz)
9	24.63	A: 1.46 m B: 1.35 m
10	32.96	A: 1.80 m B: 1.20 m
11	76.54	4.54 m
12	36.32	A: 1.91 m B: 1.60 m
13	62.63	4.29 m
14	38.64	A: 2.66 (dd, J= 17.6 y 5.1 Hz) B: 2.56 (ddd, J= 17.6, 3.7 y 1.5 Hz)
15	170.47	
16	13.90	0.82 (d, J= 7.0 Hz)
17	23.17	1.01 (d, J= 7.4 Hz)
1'	176.69	
2'	45.67	2.27 m
3'	34.64 34.03	A: 1.45 m y B: 1.35 m A: 1.50 m y B: 1.31 m
4'	20.82 20.63	A y B: 1.25 – 1.15
5'	14.17	0.81 (t, J= 7.3 Hz) 0.80 (t, J=7.3 Hz)

Ejemplo 2

Protección por NST0060 de la muerte neuronal inducida por diferentes agresiones: estrés oxidativo, inhibición de la proteína fosfatasa 1, inhibición de la succinato deshidrogenasa, estrés de retículo endoplásmico y apoptosis

2.1. Protección por NST0060 de la muerte neuronal inducida por estrés oxidativo

El ensayo fue realizado sobre células en cultivo de neuroblastoma humano SK-N-MC procedentes de “American Type Culture Collection (ATCC)”, en todos los casos se siguieron estrictas normas de esterilidad y la manipulación se llevó a cabo en cabinas de seguridad biológica clase II que siguen la norma europea EN 12469. Las células fueron mantenidas en el siguiente medio de cultivo: “Minimun Essential Medium Eagle” (MEM) suplementado con piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, gentamicina 0.05 mg/ml y suero fetal bovino 10%.

Se analizó la inhibición producida por el compuesto NST0060 de la muerte celular causada por el tratamiento con xantina/xantina oxidasa que origina daño oxidativo (produce radicales libres como peróxido de hidrógeno, anión superóxido, radical hidroxilo) lo que desencadena muerte celular. Estas células, en pase no superior a 15, fueron sembradas sobre placas de 96 pocillos tratadas para células adherentes con una concentración celular de 5×10^4 células/pocillo; para cada condición del ensayo se sembraron 3 pocillos de la placa.

ES 2 380 473 A1

Tras 24 h de incubación de las células (a 37°C y 5% CO₂) se procedió a los tratamientos celulares con 100 µl de volumen total para las condiciones siguientes:

- Control: medio de cultivo (medio).
- Xantina/xantina oxidasa (XXO): medio más xantina 10 µM/xantina oxidasa 60 mU/mL, que produce la muerte del 50% de las células.
- XXO más NST0060: medio más XXO (10 µM/60 mU/mL) más NST0060 a 1, 4, 10, 20, 40 ó 100 µM.

Las células fueron incubadas (a 37°C y 5% CO₂) con estos tratamientos durante 22 h, pasadas las cuales se añadió el reactivo WST-1 (Roche). El test WST-1 se basa en la medida de la actividad metabólica. El daño celular produce la pérdida de la habilidad de las células de obtener la energía necesaria para mantener sus funciones metabólicas y el crecimiento celular, por lo que las células metabólicamente activas (vivas) reducen la sal de tetrazolium a formazán mediante el sistema succinato-tetrazolium reductasa (de la cadena respiratoria mitocondrial). El formazán formado puede ser detectado colorimétricamente, ya que tiene una absorbancia de 440 nm. A las 2 horas de añadido el reactivo se realizó la lectura en un lector de placas a 440 nm.

Los resultados obtenidos se muestran, como aparece en la Figura 1, como el porcentaje de muerte celular para cada tratamiento referido a la muerte producida por la XXO. Se observó protección de la muerte desde 1 a 40 µM de NST0060, siendo las diferencias respecto a la XXO estadísticamente significativas según la *t* de Student, y alcanzando una máxima protección del 80% a 10 µM. Estos resultados indican que el compuesto NST0060 muestra un efecto protector de la muerte de células humanas de origen neuronal causada por estrés oxidativo.

2.2. Protección por NST0060 de la muerte neuronal inducida por la inhibición de la proteína fosfatasa 1 (PP1)

El ensayo fue realizado sobre células en cultivo de neuroblastoma humano SK-N-MC, mantenidas tal y como se detalla en el punto 2.1.

Se analizó la inhibición producida por el compuesto NST0060 de la muerte celular causada por el tratamiento con ácido okadaico (OA) que inhibe la actividad de la proteína fosfatasa 1 (PP1). El OA es una de las drogas más utilizadas para el estudio del mecanismo de fosforilación de la proteína tau, involucrada en la patogénesis y en la progresión de la EA. La inhibición de la PP1 produce alteraciones del citoesqueleto y daño mitocondrial. Estas células, en pase no superior a 15, fueron sembradas sobre placas de 96 pocillos tratadas para células adherentes con una concentración celular de 5x10⁴ células/pocillo; para cada condición del ensayo se sembraron 3 pocillos de la placa.

Tras 24 h de incubación de las células a (37°C y 5% CO₂) se procedió a los tratamientos celulares con 100 µl de volumen total para las condiciones siguientes:

- Control: medio de cultivo (medio).
- Ácido okadaico (OA): medio más OA 20 nM, que produce la muerte del 50% de las células.
- OA más NST0060: medio más OA (20 nM) más NST0060 a 1, 4, 10, 40 ó 100 µM.

Las células fueron incubadas (a 37°C y 5% CO₂) con estos tratamientos durante 22 h, pasadas las cuales se añadió el reactivo WST-1 (Roche). El test WST-1 se basa en la medida de la actividad metabólica (método descrito en el punto 2.1).

Los resultados obtenidos se muestran, como aparece en la Figura 2, como el porcentaje de muerte celular para cada tratamiento referido a la muerte producida por OA. Se observó protección de la muerte de forma estadísticamente significativa a 4 y 10 µM de NST0060, alcanzando un 83% a 10 µM. Estos resultados indican que el compuesto NST0060 muestra un efecto protector de la muerte de células humanas de origen neuronal causada por inhibición de la PP1.

2.3. Protección por NST0060 de la muerte neuronal inducida por la inhibición de la succinato deshidrogenasa

El ensayo fue realizado sobre células en cultivo de neuroblastoma humano SK-N-MC, mantenidas tal y como se detalla en el punto 2.1.

Se analizó la inhibición producida por el compuesto NST0060 de la muerte celular causada por el tratamiento con ácido 3-nitropropiónico (3-NP). El 3-NP es un inhibidor irreversible de la enzima succinato deshidrogenasa que en modelos animales produce estrés oxidativo y muerte celular apoptótica en el estriado, y que mimetiza los cambios neuroquímicos y anatómicos asociados a la enfermedad de Huntington (HD). Estas células, en pase no superior a 15,

ES 2 380 473 A1

fueron sembradas sobre placas de 96 pocillos tratadas para células adherentes con una concentración celular de 5×10^4 células/pocillo; para cada condición del ensayo se sembraron 3 pocillos de la placa.

Tras 24 h de incubación de las células (a 37°C y $5\% \text{ CO}_2$) se procedió a los tratamientos celulares con $100 \mu\text{l}$ de volumen total para las condiciones 1 siguientes:

- Control: medio de cultivo (medio).
- 3-Nitropropiónico (3-NP): medio más 3-NP $30 \mu\text{M}$, que produce la muerte del 50% de las células.
- 3-NP más NST0060: medio más 3-NP ($30 \mu\text{M}$) más NST0060 a 1, 4, 10, 40 ó $100 \mu\text{M}$.

Las células fueron incubadas (a 37°C y $5\% \text{ CO}_2$) con estos tratamientos durante 22 h, pasadas las cuales se añadió el reactivo WST-1 (Roche). El test WST-1 se basa en la medida de la actividad metabólica (método descrito en el punto 2.1).

Los resultados obtenidos se muestran, como aparece en la Figura 3, como el porcentaje de muerte celular para cada tratamiento referido a la muerte producida por 3-NP. Se observó protección de la muerte de forma estadísticamente significativa en el rango de 4 a $40 \mu\text{M}$ de NST0060, alcanzando un 32% a $40 \mu\text{M}$. Estos resultados indican que el compuesto NST0060 muestra un efecto protector de la muerte de células humanas de origen neuronal causada por inhibición de enzima succinato deshidrogenasa.

2.4. Protección por NST0060 de la muerte neuronal inducida por estrés de retículo endoplásmico

El ensayo fue realizado sobre células en cultivo de neuroblastoma humano SK-N-MC, mantenidas tal y como se detalla en el punto 2.1.

Se analizó la inhibición producida por el compuesto NST0060 de la muerte celular causada por el tratamiento con tunicamicina que origina estrés de retículo endoplásmico. La tunicamicina es un inhibidor de la N-glicosilación de proteínas, lo que produce el plegamiento anormal de las proteínas en el retículo endoplásmico, con lo que dichas proteínas se acumulan y producen estrés que desemboca en la muerte celular. Estas células, en pase no superior a 15, fueron sembradas sobre placas de 96 pocillos tratadas para células adherentes con una concentración celular de 5×10^4 células/pocillo; para cada condición del ensayo se sembraron 3 pocillos de la placa.

Tras 24 h de incubación de las células (a 37°C y $5\% \text{ CO}_2$) se procedió a los tratamientos celulares con $100 \mu\text{l}$ de volumen total para las condiciones siguientes:

- Control: medio de cultivo (medio).
- Tunicamicina (TM): medio más tunicamicina $24 \mu\text{M}$, que produce la muerte del 50% de las células.
- TM más NST0060: medio más TM ($24 \mu\text{M}$) más NST0060 a 1, 4, 10, 40 ó $100 \mu\text{M}$.

Las células fueron incubadas (a 37°C y $5\% \text{ CO}_2$) con estos tratamientos durante 22 h, pasadas las cuales se añadió el reactivo WST-1 (Roche). El test WST-1 se basa en la medida de la actividad metabólica (método descrito en el punto 2.1).

Los resultados obtenidos se muestran, como aparece en la Figura 4, como el porcentaje de muerte celular para cada tratamiento referido a la muerte producida por la TM. Se observó protección de la muerte de forma estadísticamente significativa desde 1 a $40 \mu\text{M}$ de NST0060, alcanzando un 42% a $4 \mu\text{M}$. Estos resultados indican que el compuesto NST0060 muestra un efecto protector de la muerte de células humanas de origen neuronal causada por estrés de retículo endoplásmico.

2.5. El tratamiento con NST0060 inhibe la activación de caspasa 3/7 en un modelo celular de apoptosis

El ensayo fue realizado sobre células en cultivo de neuroblastoma humano SK-N-MC, mantenidas tal y como se detalla en el punto 2.1.

La inducción de apoptosis sobre las células en cultivo se realizó con camptotecina (CPT), que desencadena la activación la apoptosis celular. La apoptosis fue cuantificada por medida de la activación de las caspasas efectoras, caspasa 3 o caspasa 7, para lo que se utilizó un kit de detección fluorimétrica de caspasa 3/7 activa (Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7, Promega). Así, la caspasa 3 ó 7 activas de las células producen la ruptura de un sustrato, lo que lleva a la emisión de fluorescencia, que es leída mediante un fluorímetro. De esta manera se analizó el efecto del pretratamiento del compuesto NST0060 a 10 y $40 \mu\text{M}$ sobre la activación de la caspasa 3/7 producida por $50 \mu\text{M}$

de camptotecina (CPT) en las células SK-N-MC. Estas células, en pase no superior a 15, fueron sembradas sobre placas de 96 pocillos tratadas para células adherentes con una concentración celular de 5×10^4 células/pocillo, para cada condición del ensayo se sembraron 3 pocillos de la placa.

Tras 24 h de incubación de las células (a 37°C y $5\% \text{ CO}_2$) se procedió al pretratamiento con NST0060 a 10 y $40 \mu\text{M}$.

Tras 24 h, se realizaron los tratamientos celulares con $100 \mu\text{l}$ de volumen total para las condiciones siguientes:

- Control: medio de cultivo (medio).
- Camptotecina (CPT): medio más CPT $50 \mu\text{M}$, para producir apoptosis, tanto a los puntos del ensayo pretratados con NST0060 a 10 ó $40 \mu\text{M}$, como a células sin pretratamiento.
- CPT más Z-VAD-fmk: medio más CPT (a la misma concentración que la condición anterior) más Z-VAD-fmk a $50 \mu\text{M}$, como control positivo de inhibición de la activación de las caspasas.

Las células fueron incubadas (a 37°C y $5\% \text{ CO}_2$) con estos tratamientos durante 6 h, tras lo que se añadió el tampón de lisis celular y el sustrato de las caspasas a las concentraciones especificadas por el fabricante; se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se congeló a -20°C durante una noche. Al día siguiente se determinó la fluorescencia (499/521 nm, Exci/Emi).

En la Figura 5 se muestra el porcentaje de activación de la caspasa 3/7 respecto a las células control de los diferentes tratamientos. Se observó una inhibición de la caspasa 3/7 respecto a la camptotecina del 58 y 32% a 10 y $40 \mu\text{M}$ de NST0060, respectivamente, lo que demuestra un efecto anti-apoptótico funcional de este compuesto. El Z-VAD-fmk, como inhibidor de caspasas, inhibió totalmente la activación de la caspasa 3/7.

2.6. El tratamiento con NST0060 inhibe la fragmentación de DNA en un modelo celular de apoptosis

Debido a los resultados obtenidos y presentados en los apartados anteriores del presente ejemplo, los inventores decidieron analizar el efecto del NST0060 en un nuevo modelo celular de apoptosis por medida de la fragmentación de DNA.

El ensayo fue realizado sobre células en cultivo de neuroblastoma humano SK-N-MC, mantenidas tal y como se detalla en el punto 2.1.

Se analizó la inhibición producida por el compuesto NST0060 de la apoptosis causada por el tratamiento con camptotecina (CPT) que inhibe la enzima topoisomerasa I, lo que impide la duplicación del DNA y desencadena la muerte celular apoptótica. Estas células, en pase no superior a 15, fueron sembradas sobre placas de 6 pocillos tratadas para células adherentes con una concentración celular de 7×10^5 células/pocillo; para cada condición del ensayo se sembraron 2 pocillos de la placa.

Tras 24 h de incubación de las células (a 37°C y $5\% \text{ CO}_2$) se procedió al pretratamiento de las células con 10 y $40 \mu\text{M}$ de NST0060 durante 24 h; posteriormente se trataron con $50 \mu\text{M}$ CPT durante 6 h. Se utilizó además el Z-VAD-fmk a $50 \mu\text{M}$, como control positivo de inhibición.

Tras el tratamiento, las células se recogieron junto con su medio de cultivo y se centrifugaron a $300 \times g$ durante 5 min. Se eliminó el medio, se realizó un lavado con PBS y se fijaron durante 2 minutos con $500 \mu\text{l}$ de etanol al 70% a -20°C . Una vez fijadas se centrifugaron a $400 \times g$ durante 5 min, se lavaron con PBS y se les añadió yoduro de propidio a 0.05 mg/ml , diluido en tampón de ciclo (Citrato sódico 0.1%, Nonidet P-40 0.3% y RNAsa 0.02 mg/ml) y se incubaron 1 hora a 37°C . Pasado este tiempo se analizaron por citometría de flujo, comparando la fluorescencia del yoduro de propidio frente a la cantidad de DNA. El porcentaje de apoptosis se midió sobre la región sub-G1 de cada una de las condiciones.

Los resultados obtenidos se muestran, como aparece en la Figura 6, como el porcentaje de la apoptosis (por fragmentación de DNA) de cada tratamiento referido a la apoptosis producida por CPT. Se observó una protección máxima del 41% a $10 \mu\text{M}$ de NST0060. Por su parte, el Z-VAD-fmk inhibió específicamente la apoptosis producida por la CPT. Estos resultados indican que el compuesto NST0060 muestra un efecto protector de la apoptosis en células humanas de origen neuronal.

Ejemplo 3

Inducción de la expresión celular del gen 24-dehidrocolesterol reductasa (seladin-1/DHCR24) por el tratamiento con NST0060

El ensayo fue realizado sobre células en cultivo de neuroblastoma humano SK-N-MC procedentes de “American Type Culture Collection (ATCC)”. En todos los casos se siguieron estrictas normas de esterilidad y la manipulación se llevó a cabo en cabinas de seguridad biológica clase II que siguen la norma europea EN 12469. Las células fueron mantenidas en el siguiente medio de cultivo: “Minimum Essential Medium Eagle” (MEM) suplementado con piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, gentamicina 0.05 mg/ml y suero fetal bovino 10%.

Para analizar la expresión del gen de seladin-1/DHCR24 se utilizó una RT-PCR cuantitativa. Las células SK-N-MC fueron tratadas durante 24 h en ausencia (control) o en presencia de NST0060 a 1, 4, 10 ó 40 μ M. El RNA total se extrajo mediante el kit *High Pure RNA Isolation* (Roche) y la cantidad y calidad del RNA se analizó mediante espectrofotometría en el sistema NanoQuant acoplado al Infinite 200 (Tecan). La RT-PCR se realizó mediante dos pasos; en primer lugar se transformó el mRNA en cDNA usando el *RNA to cDNA kit* (Applied Biosystem) y posteriormente se analizó la expresión génica mediante sondas TaqMan utilizando las sondas validadas Hs00207388_m1 para seladin-1/DHCR24 y Hs99999905_m1 para GAPDH (utilizado para normalizar los resultados), ambas específicas de humano, en el equipo 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem). Se realizó un ensayo por triplicado. La cantidad relativa de la expresión del gen se determinó utilizando el método $\Delta\Delta C_t$ con el software SDS v2.1.1 (Applied Biosystem); la expresión de GAPDH fue usada como normalizadora.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7, donde se observa el aumento de la expresión del gen seladin-1/DHCR24 con el tratamiento con NST0060 a todas las concentraciones ensayadas, produciendo un incremento de 2.5 veces respecto al control a 4 μ M NST0060. Estos resultados indican que el tratamiento con NST0060 produce el aumento de la expresión del gen seladin-1/DHCR24, relacionado con la biosíntesis de colesterol y con la capacidad anti-apoptótica.

Ejemplo 4

Paso de barrera hematoencefálica de NST0060 frente a simvastatina en un ensayo in vitro

El ensayo tuvo por objeto predecir si el compuesto NST0060, en su forma activa, es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE). Para ello la BHE se mimetizó en un sistema *in vitro* que permitió la evaluación del compuesto sin empleo de células, y donde se llevó a cabo el denominado ensayo PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeation Assay*), que emplea un sistema sándwich que contempla el paso de compuestos por medio de difusión pasiva. Como control positivo se empleó verapamilo, un compuesto de elevada permeabilidad, mientras que como control negativo se empleó la teofilina, un compuesto que no atraviesa BHE. Junto con NST0060 se ensayó la simvastatina, un compuesto de estructura semejante del que previamente se conocía que era capaz de atravesar BHE en cierta medida.

Para mimetizar la barrera hematoencefálica se hizo uso de una mezcla de lípidos comercial derivada de cerebro de cerdo con una composición de fosfolípidos muy semejante a la que constituye la barrera, y que se conoce como PBL (*Porcine Polar Brain Lipid*). Este compuesto se conservó a -20°C disuelto en dodecano a 100 μ g/mL en viales de cristal. El verapamilo y la teofilina se prepararon a 10 mM en DMSO. Las formas ácidas de NST0060 y simvastatina, se prepararon en agua y se activaron con NaOH 0.1 N a 4°C durante 12 h.

En el momento del ensayo, se preparó 1.5 mL de los compuestos a evaluar y de los controles, en todos los casos a 100 μ M a partir de los *stocks* en un tampón fosfato a pH 7.4 que contenía fosfato sódico monobásico (0.41 M) y fosfato potásico dibásico (0.287 M). Para ello se llevó a cabo una dilución 1/100 de los compuestos, igualando el contenido de DMSO al 1% en todos los casos.

En una placa con filtro de 96 pocillos, con una membrana de PVDF, con un tamaño de poro de 45 μ m (MAIPN4550, Millipore) se añadieron 5 μ L de PBL a 20 μ g/mL, preparado a partir del *stock* congelado a 100 μ g/mL. Transcurridos dos minutos, se añadieron 300 μ L del tampón fosfato empleado para diluir los compuestos. Esta placa se consideró la placa aceptora y se situó en la parte superior del *sándwich*. Sobre otra placa de 96 pocillos que ensambla con la anterior (MATRNP550 de Millipore) se añadieron 300 μ L de los compuestos a 100 μ M y por triplicado. Además, se incluyó un blanco que incluía únicamente el 1% de DMSO en el tampón fosfato empleado. Esta placa se denominó placa donadora. La placa aceptora fue situada sobre la placa donadora formando el sistema *sándwich*. Los compuestos objeto de estudio difundieron desde los pocillos de la placa donadora a los pocillos correspondientes de la placa aceptora durante las 18 h en las que el sistema se mantuvo intacto. El compuesto restante preparado se conservó en las mismas condiciones de humedad, temperatura y oscuridad que el sistema *sándwich* constituido por las placas. Transcurrido este tiempo, 100 μ L de los pocillos de las placas donadoras y de las aceptoras se transvasaron a una placa de 96 pocillos especial para lectura UV. Además, se transvasaron 100 μ L, por triplicado, de los compuestos preparados para la realización del ensayo y conservados de modo igual a las placas (pocillos basales). La placa UV se introdujo en un espectrofotómetro en el cual se llevó a cabo un *scan* en el UV desde 230 a 498 nm, con lecturas cada 4 nm. A

ES 2 380 473 A1

partir de los datos espectrofotométricos se calculó el porcentaje de paso de barrera así como la permeabilidad efectiva (P_e). Para calcular la P_e , se aplicó la siguiente fórmula:

$$P_e = C \times \ln \left(1 - \frac{[\text{Droga}]_{\text{aceptora}}}{[\text{Droga}]_{\text{equilibrio}}} \right)$$

Donde:

$$C = \frac{V_D \times V_A}{(V_D \times V_A) \times \text{Area} \times \text{Tiempo}}$$

$[\text{Droga}]_{\text{aceptora}}$ = Absorbancia del pocillo acceptor

$[\text{Droga}]_{\text{equilibrio}}$ = Absorbancia de la media de los pocillos basales / 2

V_A = Volumen del pocillo acceptor = 0.3 cm³

V_D = Volumen del pocillo donador = 0.3 cm³

Area = 0.24 cm²

Tiempo = 64.000 s

El cálculo teórico de la lipofilicidad de un compuesto se puede obtener calculando el logaritmo del coeficiente de partición octanol/agua, que viene dado por cLogP, el cual se calculó mediante el programa CLOGP (OSIRIS Property Explorer) introduciendo las estructuras químicas en el software.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8, donde se observa que el compuesto NST0060, en su forma hidroxilada, presenta un grado de penetración de BHE muy próximo al control positivo (el verapamilo) y que es además, superior al de la simvastatina. Estos datos se correlacionan con la mayor lipofilicidad del compuesto NST0060. En la siguiente tabla (Tabla 1) se recogen los parámetros obtenidos de este estudio (media±SD), y donde se refleja el paso de barrera (% Paso BHE), la permeabilidad efectiva (P_e), el número de experimentos realizados (n) y el cálculo de la lipofilicidad teórica (calculado teóricamente mediante el programa CLOGP, OSIRIS Property Explorer) (cLogP).

	% Paso BHE	P_e (cm/s)	n	cLogP
Verapamilo	32.0±4.6	10.1±2.4	6	5.32
Teofilina	1.6±0.7	0.3±0.1	6	-0.09
Simvastatina	17.8±0.6	4.3±0.3	6	4.61
NST0060	29.8±2.4	8.8±1.2	6	5.48

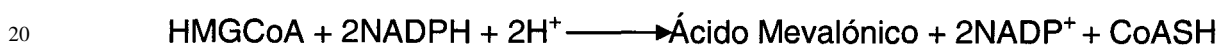
Los resultados mostrados en este ejemplo ponen de manifiesto sorprendentemente, un paso de BHE del compuesto NST0060 altamente eficiente.

Ejemplo 5

*Efecto hipocolesterolémico del compuesto NST0060*5 5.1. *Inhibición de la actividad enzimática 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGR) in vitro por NST0060 frente a la simvastatina*

El ensayo tuvo por objeto determinar el grado de inhibición por el compuesto NST0060 sobre la HMGR, enzima clave en la síntesis de colesterol celular y en la regulación fisiológica de dicha síntesis. El efecto de este compuesto se comparó con el de una estatina, la simvastatina, para la que ya está descrito un potente efecto inhibitorio sobre la HMGR.

Durante la reacción, la HMGR utiliza NADPH como agente reductor y como sustrato 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMGCoA). Como producto de reacción se obtiene el ácido mevalónico, que sirve como sustrato a la reacción siguiente para continuar la síntesis de colesterol. La reacción enzimática objeto de estudio se esquematiza a continuación:



Este ensayo *in vitro* está basado en la medida espectrofotométrica del descenso de absorbancia a 340 nm, que representa la oxidación del NADPH por la subunidad catalítica de la HMGR en presencia del sustrato HMGCoA reductasa.

Los compuestos objeto de estudio se prepararon en agua ultrapura a 10 mM y se activaron con NaOH 0.1N durante 12 h a 4°C. El ensayo se llevó a cabo en placa de 96 pocillos, con un volumen de reacción total de 200 µl. El tampón de reacción (KH₂PO₄ 50 mM, KCl 1 M, Bovine Serum Albumin [BSA] 2 mg/ml y DTT 5 mM, a pH=7.3) se preparó en el momento de llevar a cabo la reacción y se mantuvo a 37°C. En los ensayos se incluyeron:

- *Un blanco*: Carente de HMGR que informa de la estabilidad de NADPH durante la reacción.
- *Un control*: Contiene todos los componentes de la reacción pero carece de compuesto problema.
- *Compuestos problema*: NST0060 o simvastatina disueltos en el tampón de reacción a diversas concentraciones.

El efecto de ambos compuestos se evaluó a 0.0004, 0.001, 0.004, 0.01, 0.04, 0.1, 0.4, 1, 4, 10 y 40 µM en cinco ensayos por duplicado y en paralelo para ambos compuestos. Los compuestos problema fueron añadidos al tampón de reacción en la placa y se estandarizó la concentración de DMSO por reacción a 10 µl, habiéndose demostrado previamente la no interferencia del mismo durante la reacción. Las concentraciones de los reactivos implicados en la mezcla de reacción fueron las siguientes y se añadieron disueltos en tampón de reacción en el orden que se indican:

- *HMGCoA*: 0.2 mM.
- *HMGR* (dominio catalítico unido a proteínas GST): 3 µU/reacción.
- *NADPH*: 0.2 mM.

El NADPH es el compuesto que dispara la reacción, por lo que se añadió simultáneamente en todos los pocillos. Se incluyó un blanco y un control en cada tanda de adición de NADPH. Tras una breve agitación, la lectura de la placa se realizó en un espectrofotómetro a las condiciones de 340 nm, 37°C y con un programa de cinética que permitió leer cada 20 segundos durante 1200 segundos.

Se calculó la capacidad inhibitoria de la actividad enzimática HMGR de los diferentes compuestos mediante la determinación de las constantes de inhibición al 50% (IC₅₀), a partir de las curvas que se muestran en la Figura 9, ya que el descenso de absorbancia a 340 nm permite calcular el porcentaje de actividad enzimática HMGR respecto al control. Las IC₅₀ fueron determinadas mediante el método Trimmed Spearman-Kärber (Versión 1.5). Los resultados confirman el efecto inhibitorio sobre HMGR por parte de la simvastatina (IC₅₀: 83.3±24.3 nM, cinco ensayos independientes por duplicado), mientras que sorprendentemente el NST0060 mostró una alta potencia de inhibición sobre la enzima (IC₅₀: 126.0±34.6 nM, cinco ensayos independientes por duplicado).

5.2. Efecto de NST0060 y simvastatina en sus formas ácidas sobre los niveles intracelulares de colesterol total en la línea celular humana de origen hepático

En base a los resultados del punto anterior, los inventores decidieron averiguar si la actividad inhibidora de la enzima HMGR por el compuesto NST0060 se correspondía con una variación de colesterol total en líneas hepáticas humanas.

Para ello se realizó un ensayo que tuvo por objeto determinar si el compuesto NST0060 en su forma activa era capaz de modificar los niveles de colesterol total en la línea de hepatocarcinoma humano HepG2. El efecto de NST0060 se comparó al de una estatina conocida, la simvastatina. Para llevar a cabo este ensayo, los compuestos se prepararon a 10 mM en agua ultrapura y se activaron mediante NaOH 0.1 N durante 12 h a 4°C. Los compuestos se conservaron a -20°C hasta su uso.

La línea HepG2 fue obtenida de "American Type Culture Collection (ATCC)". Las células mantenidas en pase se sembraron en placas de 96 pocillos (4x10⁴ células/pocillo) en MEM suplementado con 10% de FBS, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato sódico, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales y 0.05 mg/mL de gentamicina. Transcurridas 24 h de la siembra, las células fueron desprovistas de FBS durante 8 h. Seguidamente, las células fueron incubadas con los tratamientos a diversas concentraciones durante 20 h. Tras el período de incubación, las células se lavaron con PBS y lisaron con un tampón fosfato con 0.5% de tritón X-100. La lisis se completó mediante una doble congelación-descongelación.

La cuantificación de colesterol total se llevó a cabo mediante técnicas enzimáticas y fluorométricas. Se transvasaron 25 µL de cada lisado a una placa de 96 pocillos junto con una curva patrón de colesterol (de 0.08 µg/mL a 10 µg/mL). Sobre las muestras se añadieron 75 µL de la mezcla reactiva preparada a base de MES 0.05 M (pH 6.5) conteniendo colesterol oxidasa (0.5 U/mL), colesterol esterasa (0.8 U/mL), peroxidasa de rábano (4 U/mL) y ampliflu red (20 µg/mL) y se incubó 15 minutos a 37°C. La intensidad de fluorescencia se determinó a 530 nm de excitación y 580 nm de emisión mediante un fluorímetro. Los resultados fueron estandarizados por cantidad de proteína, la cual se determinó mediante la técnica del BCA.

En la Figura 10 se puede apreciar, de forma sorprendente, como NST0060 produjo reducciones de colesterol total en las células semejantes a las ejercidas por la simvastatina. Estos datos confirman la capacidad hipocolesterolémica de NST0060 consecuencia de la inhibición ejercida sobre la HMGR, y mostrada en el punto anterior.

Ejemplo 6

Estudio de la bioseguridad del compuesto NST0060 en embrión de pez cebra

6.1. Análisis del índice de supervivencia del compuesto NST0060 en comparación con la simvastatina en embriones de pez cebra. Ensayo de toxicidad aguda

Para evaluar la bioseguridad del compuesto NST0060 se analizaron sus efectos toxicológicos en el modelo de embrión de pez cebra mediante la determinación de los parámetros de seguridad según protocolo C.15 de la OECD "Fish, short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages", método semi-estático.

Los huevos fertilizados fueron obtenidos por apareamiento natural del pez cebra (*Danio rerio*, cepa AB). Un total de 8-10 parejas fueron utilizadas para cada cruce y se generaron un total de 200-250 huevos de media por pareja. Los huevos se recogieron inmediatamente después del desove y fueron lavados con agua de dilución (CaCl₂·2H₂O 0.29 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.12 g/L, NaHCO₃ 0.065 g/L, KCl 0.006 g/L) ajustándose a pH 7.8±0.2, acorde con el Reglamento CE n° 440/2008 método C.1 de la OECD y depositados en una placa petri.

Para asegurar la exposición en los estadios más tempranos del desarrollo, los huevos fueron rápidamente transferidos (un mínimo de 50 por condición) a otra placa petri con las soluciones a ensayar de los compuestos. Posteriormente, sólo los huevos fertilizados (30 por condición experimental) fueron transferidos de las placas petri a las cámaras de exposición (placas microtiter M96) por medio de pipetas, y fueron expuestos a las sustancias a evaluar (NST0060 y simvastatina), con agua de dilución (controles) o con diferentes concentraciones de los tratamientos (de 1 a 100 mg/Kg). Los embriones fueron incubados sin aireación adicional y a la temperatura apropiada (25±1°C). Además, se tomaron estrictas precauciones para prevenir la contaminación durante los procesos de manipulación. Los estudios fueron llevados a cabo a 72 horas post-tratamiento, donde la frecuencia de renovación del tratamiento se realizó cada día, realizando así un ensayo semi-estático.

Cada experimento fue realizado con 10 replicas de 3 embriones cada una, siguiendo las siguientes pautas de tratamiento:

- 30 animales control, tratados con agua de dilución y recambio diario hasta el fin del ensayo,
- 30 animales tratados con el compuesto NST0060 (3 embriones por diez réplicas) diluido en agua de dilución a las dosis de entre 1 y 100 mg/Kg y recambio diario de la sustancia durante los días que duró el ensayo,

- 30 animales tratados con el compuesto simvastatina (3 embriones por diez réplicas) diluido en agua de dilución a las dosis de entre 1 y 100 mg/Kg y recambio diario de la sustancia durante los días que duró el ensayo.

Después del tiempo de exposición de las sustancias a estudio, se determinó el registro de la mortalidad de las larvas, mostrándose los resultados en la Tabla 2. En la tabla se muestra el número de larvas utilizadas para la experimentación, la dosis en mg/Kg (de peso del animal), el tiempo de tratamiento y el número de larvas muertas respecto al total.

Los resultados del estudio mostraron que ambos compuestos presentan un perfil toxicológico muy similar en cuanto al parámetro de inducción de mortalidad en larvas (72 hpf) de pez cebra, observándose la presencia de 7 óbitos de 30 animales en el grupo de NST0060 a la dosis de 10 mg/Kg, siendo de 16 los observados a la misma dosis y tiempo con la simvastatina. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de tratamiento (t-Student).

Grupo (NST0060)	Embriones	Dosis (mg/kg)	Tiempo (Días)	Mortalidad
1	30	Vehículo ^a	3	0/30
2	30	1	3	0/30
3	30	3	3	0/30
4	30	10	3	7/30
5	30	30	3	30/30
6	30	100	3	30/30
Grupo (simvastatina)	Embriones	Dosis (mg/kg)	Tiempo (Días)	Mortalidad
1	30	Vehículo ^a	3	0/30
2	30	1	3	0/30
3	30	3	3	0/30
4	30	10	3	16/30
5	30	30	3	30/30
6	30	100	3	30/30

^a Agua de embriones (agua de dilución).

Los resultados mostrados en la tabla anterior muestran que el compuesto NST0060 es, sorprendentemente, al menos tan seguro como la simvastatina.

6.2. Análisis del porcentaje de larvas sanas tras exposición del compuesto NST0060 en comparación con la simvastatina. Ensayo de toxicidad aguda

En base a los resultados del punto anterior, los inventores decidieron averiguar si las variaciones en la mortalidad consecuencia de los tratamientos se veían corroboradas con la determinación del porcentaje de larvas sanas, definido como el número de larvas vivas y sin síntomas de anomalías fisiopatológicas externas (morfológica y/o en comportamiento), siendo éste un parámetro que determina la bioseguridad de una sustancia a estudio y es complementaria a los índices de supervivencia.

Tal y como se muestra en la Figura 11, se observaron diferencias en los porcentajes de larvas sanas entre los dos tratamientos evaluados a la dosis de 1 y 3 mg/Kg, siendo del 100±0.0% para el compuesto NST0060 y de 50.0±22.4% para la simvastatina a la dosis de 1 mg/Kg y llegando al 86.7±6.2% para NST0060 y 50.0±22.4% para la simvastatina a la dosis de 3 mg/Kg, lo que indica, sorprendentemente, una mayor bioseguridad del compuesto NST0060 en el modelo de larva de pez cebra.

Estos resultados indican que el NST0060 presenta un mejor perfil de bioseguridad que la simvastatina.

6.3. Análisis de la variación de la cardiotoxicidad del compuesto NST0060 en comparación con la simvastatina en función de la dosis

En base a los resultados de los apartados anteriores, los inventores decidieron averiguar si la mayor bioseguridad del compuesto NST0060 en comparación con la simvastatina se corroboraba mediante el análisis de la cardiotoxicidad tras el tratamiento con los diferentes compuestos y a varias dosis. El estudio de este parámetro (cardiotoxicidad), no sólo determina el ritmo cardíaco de los animales sino que, además, permite observar alteraciones en el latido cardíaco (taquicardia, bradicardia, etc) o anomalías en el desarrollo del corazón (pericarditis, atrofia, hipertrofia, etc.).

La forma de determinar el ritmo cardíaco de los embriones o larvas de pez cebra se realiza de forma visual. Mediante una lupa (aumentos de 4-40 x), se cuenta el latido cardíaco (con la ayuda de un contador manual) durante un período de 15 segundos. En total, se realiza el conteo del latido cardíaco de 12 de los 30 animales utilizados por tratamiento. El número de latidos obtenidos se multiplica por 4 para obtener el número de latidos cardíacos por minuto del animal.

Los resultados se muestran en la Figura 12, donde se observa que el porcentaje del ritmo cardíaco de los embriones o larvas frente al control es dependiente de la dosis usada. A 72 hpt, se observa una disminución significativa del ritmo cardíaco en larvas tratadas con simvastatina respecto a los controles, y a las dosis de 3 y 10 mg/Kg. En relación al NST0060, la disminución del ritmo cardíaco se detecta exclusivamente a la dosis de 10 mg/Kg, pero sorprendentemente no a la de 3 mg/Kg. Por otro lado, la comparación del ritmo cardíaco de las dosis de 1 y 3 mg/Kg entre NST0060 y simvastatina, muestra de manera sorprendente, que NST0060 es más bioseguro que la simvastatina. Por lo tanto y de manera general, NST0060 presentó mejor comportamiento en los estudios de cardiotoxicidad que la simvastatina.

Ejemplo 7

Efecto antiinflamatorio de NST0060 en un modelo de inflamación sistémica en ratones

7.1. Estudio comparativo del efecto antiinflamatorio del NST0060 y de la simvastatina

Los investigadores consideraron necesario evaluar actividades alternativas a la hipocolesterolemia y neuroprotectora dadas las características y propiedades de la molécula. Por este motivo, se decidió evaluar la capacidad antiinflamatoria del compuesto NST0060, en comparación con la simvastatina, compuesto para el que está descrito un efecto antiinflamatorio. Para la evaluación de esta actividad se empleó un modelo de shock sistémico en ratones inducido por lipopolisacárido (LPS), un componente de la estructura de bacterias gram negativas que induce una respuesta inflamatoria mediada por citocinas, principalmente TNF α .

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron ratones macho C57BL6 de 12 semanas de edad. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo período de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante los tratamientos y manipulaciones.

Los ratones fueron divididos en tres grupos: Grupo control (n = 8); Grupo simvastatina (n = 8); Grupo NST0060 (n = 8). A los ratones se les administró i.p. dos dosis de 50 mg/kg de simvastatina o de NST0060 (en sus formas lactonas) separadas 12 h en el tiempo. En ambos casos se empleó como vehículo metilcelulosa al 0.5% en suero salino fisiológico, el cual fue administrado a los ratones del grupo control con la misma pauta de administración. Una hora después del último tratamiento se indujo la inflamación sistémica periférica mediante una única inyección i.p. de LPS a 8 mg/kg. Dos horas después se extrajo sangre y se obtuvo el plasma donde se evaluó el efecto antiinflamatorio llevando a cabo el análisis de las concentraciones plasmáticas de TNF α mediante ELISA.

En la Figura 13 se observa que a 2 horas post-inoculación del LPS se produce un aumento dramático de los niveles de TNF α en sangre. Por su parte, la administración tanto de simvastatina como de NST0060 producen una fuerte disminución de dichos niveles, siendo significativa con respecto al grupo control. Sorprendentemente, el compuesto NST0060 resultó ser más potente a este nivel, llevando a reducciones plasmáticas de TNF α estadísticamente significativas con respecto al grupo de simvastatina. Por lo tanto y de manera general, NST0060 presentó mejor comportamiento antiinflamatorio que la simvastatina.

7.2. Efecto de NST0060 sobre los marcadores inflamatorios, la supervivencia y la respuesta inflamatoria por evaluación sintomatológica en un modelo de shock sistémico en ratones

Una vez demostrada la sorprendente capacidad antiinflamatoria del compuesto NST0060, los investigadores consideraron oportuno profundizar en dicho efecto antiinflamatorio y determinar en el mismo modelo de shock sistémico el efecto del compuesto NST0060 sobre la supervivencia y la sintomatología de los tratamientos.

Para ello se llevó a cabo un ensayo adicional en el que todos los animales incluidos fueron ratones macho C57BL6 de 12 semanas de edad. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo período de cuarentena

y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante los tratamientos y manipulaciones.

Los ratones fueron divididos en tres grupos experimentales: Grupo control (n = 8); Grupo Control+LPS (n = 16); Grupo NST0060+LPS (n = 16). A los ratones se les administró i.p. dos dosis de 50 mg/kg de NST0060 (en su forma lactona) separadas 12 h en el tiempo. Se empleó como vehículo metilcelulosa al 0.5% en suero salino fisiológico, el cual fue administrado a los ratones de los grupos control con la misma pauta de administración. Una hora después del último tratamiento se indujo la inflamación sistémica periférica mediante una única inyección i.p. de LPS a 8 mg/kg. La mitad de los ratones a los que se indujo el shock sistémico (8 animales del grupo Control+LPS y 8 animales del grupo NST0060+LPS) fueron sacrificados 2 h después de la inoculación del LPS. Se extrajo sangre y se obtuvo el plasma, los cuales fueron congelados. A la otra mitad de los animales tratados con LPS se les extrajo sangre y obtuvo el plasma tras 4 h de la inyección de LPS. Estos animales se observaron durante los 15 días posteriores para determinar la mortalidad y evaluar el daño mediante un *score* que abarcaba del 0 al 3 (0 = no sintomatología; 1 = letargia leve e hipotermia; 2 = letargia severa, diarreas y temblores; 3 = inmovilidad absoluta). Los animales control a los que se les inyectó i.p. suero salino fisiológico en vez de LPS fueron sacrificados al final del estudio tras llevar a cabo extracciones de sangre a 2 hpi y 4 hpi para la posterior comparación de resultados. En el plasma obtenido se evaluó la concentración de las citocinas inflamatorias TNF α e IL-1 β mediante ELISA.

En la Figura 14 puede observarse el índice de supervivencia de los animales correspondientes a los diferentes grupos de tratamiento, observándose que la mortalidad inducida por el LPS es prevenida de forma estadísticamente significativa por la administración de NST0060 lo que indica su actividad antiinflamatoria. Este efecto protector también se refleja en una menor severidad del proceso de shock sistémico, como puede apreciarse en la Figura 15 en la que se presenta el *score* asociado a la sintomatología presentada por los animales supervivientes tras la inyección de LPS, siendo éste estadísticamente significativo en el punto temporal de 24 horas. Adicionalmente, el tratamiento con NST0060 produce una disminución de la respuesta inflamatoria tanto a las 2 como a las 4 horas post-LPS, tal y como puede observarse en la Figura 16. Además, a las 2 horas post-LPS, el tratamiento con NST0060 produce una disminución estadísticamente significativa de la citocina IL-1 β en plasma, tal y como se muestra en la Figura 17.

Por lo tanto y de manera general, el compuesto NST0060 presenta una alta actividad antiinflamatoria que, sorprendentemente, resulta ser mayor que la de la simvastatina.

Ejemplo 8

35 Efecto antiepiléptico de NST0060 frente a la acción de una sustancia excitotóxica

Es conocido que la administración de una sustancia excitotóxica a animales induce, en algunos casos, crisis epilépticas y convulsiones en los animales. Debido a esto los inventores decidieron averiguar si el efecto neuroprotector de NST0060 se veía acompañado de un efecto antiepiléptico producido por una sustancia excitotóxica.

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron machos de 12 semanas de edad y de la cepa FVB/NHan. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo período de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

Los animales fueron inoculados intraperitonealmente con 25 mg/kg de kainato (KA) disuelto en PBS. Catorce animales fueron pretratados a 24 y 0.5 horas antes de la inoculación con KA mediante inyección intraperitoneal con metilcelulosa al 0.25% en PBS (pauta de administración Vehículo+KA) y 14 fueron pretratados a 24 y 0.5 horas antes de la inoculación con KA mediante inyección intraperitoneal con el compuesto NST0060 a una dosis de 50 mg/kg (pauta de administración NST0060+KA). Tras la inoculación los animales fueron alojados en cubetas de manera individual para su seguimiento. Durante la observación se registró el nivel máximo de epilepsia de los animales según la escala Racine cada diez minutos y durante al menos 120 minutos post-inoculación (m.p.i.).

Posteriormente se realizaron estudios comparativos de los fenómenos epileptogénicos entre el tratamiento con Vehículo (Vehículo+KA) y con NST0060 (NST0060+KA). Tal y como muestra la siguiente tabla (Tabla 3), se observaron diferencias en el porcentaje de animales que entraron en *status epilepticus*, es decir que presentaron convulsiones clónico-tónicas, entre el grupo de NST0060+KA y que fue de un 36% (5 de 14) frente al grupo Vehículo+KA y que fue de un 93% (13 de 14), lo que demuestra que el compuesto NST0060 es anticonvulsivante. Además también se observaron diferencias en el porcentaje de animales que entraron en *status epilepticus*, es decir presentaron convulsiones clónico-tónicas durante al menos 30 minutos de manera ininterrumpida, entre el grupo de NST0060+KA y que es de un 29% (4 de 14) frente al grupo de pauta de tratamiento con Vehículo+KA y que es de un 79% (11 de 14), lo que demuestra que el compuesto NST0060 es antiepiléptico además de anticonvulsivante.

65

	Convulsiones	Status epilepticus
KA+Vehículo	93%	79%
KA+NST0060	36%	29%

Debido a estos resultados los inventores decidieron averiguar si el efecto antiepiléptico del NST0060 se veía acompañado de un retraso en el período de latencia (tiempo en el que aparecían las primeras convulsiones). Tal y como muestra la Figura 18, se observaron diferencias en la latencia entre ambos grupos, estando por encima de los 100 minutos en el grupo NST0060+KA (100.1 ± 7.3 min.), y siendo ésta mayor de manera estadísticamente significativa ($p < 0.05$) que con la pauta de tratamiento Vehículo+KA (45.7 ± 7.5 min.), lo que confirma las propiedades antiepilépticas y anticonvulsivantes del compuesto NST0060.

En base a estos resultados los inventores decidieron averiguar si el efecto antiepiléptico y anticonvulsivante se confirmaba con los niveles de epilepsia y por la gravedad de los síntomas observados durante dos horas tras la inoculación del KA. Tal y como muestra la Figura 19, los animales del grupo con la pauta Vehículo+KA alcanzaban niveles de epilepsia por encima de 4 en la escala Racine en varios puntos temporales, y en especial a partir de los 40 minutos, mientras la pauta NST0060+KA no produjo en ningún momento una media en el nivel de epilepsia mayor de 3 en dicha escala. De hecho, la cinética de aparición y gravedad de los síntomas epileptogénicos producidos por el KA es diferente de manera estadísticamente significativa entre el tratamiento con NST0060 y con vehículo ($F(1,26) = 6,8016$; $p = 0,0149$; análisis de la varianza general mediante el test de ANOVA con un test *post-hoc* de Newman-Keuls).

Estos resultados muestran definitivamente la capacidad antiepiléptica y anticonvulsivante que del compuesto NST0060 frente a la administración de una sustancia excitotóxica.

Ejemplo 9

Efecto antioxidante in vivo de NST0060 frente al estrés oxidativo del cerebro inducido por una sustancia excitotóxica

Una vez conocida la capacidad antiepiléptica y anticonvulsivante del compuesto NST0060 frente a la acción de una sustancia excitotóxica, los inventores decidieron averiguar si este efecto neuroprotector mostrado por el NST0060 frente a la excitotoxicidad se veía acompañado por una disminución del estrés oxidativo que se produce en el cerebro cuando una sustancia excitotóxica es administrada en ratones.

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron machos de 12 semanas de edad y de la cepa FVB/N portadores de una construcción génica con el promotor de un gen modulable por el estrés oxidativo unido al gen reportero de la luciferasa de luciérnaga. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo período de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

Los animales fueron inoculados intraperitonealmente con 25 mg/kg de kainato (KA) disuelto en PBS. Siete ratones fueron pretratados a 24 y 0.5 horas antes de la inoculación con KA y posteriormente de manera diaria hasta los 7 días post-inoculación mediante inyección intraperitoneal con metilcelulosa al 0.25% en PBS como vehículo (pauta de administración Vehículo+KA) y otros 7 ratones fueron pretratados a 24 y 0.5 horas antes de la inoculación con KA y posteriormente de manera diaria hasta los 7 días post-inoculación mediante inyección intraperitoneal con el compuesto NST0060 a una dosis de 50 mg/kg (pauta de administración NST0060+KA). Tras la inoculación los animales fueron alojados en cubetas de manera individual para su seguimiento. Adicionalmente se trataron 3 ratones únicamente con vehículo en todas las administraciones y sin recibir inyección de KA para que actuaran como controles. El seguimiento del estrés oxidativo en el cerebro se realizó mediante la técnica de bioluminiscencia *in vivo* con el sistema IVIS Lumina (Caliper LS). Las adquisiciones se realizaron a -1 dpi (señal basal) y a 1, 2, 3 y 4 dpi en todos los grupos experimentales. Previamente a la adquisición los animales fueron inoculados por vía intraperitoneal con D-luciferina a 150 mg/Kg. A continuación los ratones fueron sedados con isoflurano al 3% durante 2 minutos. Una vez alojados en el sistema IVIS Lumina, los ratones permanecieron anestesiados con isoflurano al 1.5%, O_2 a 0.2 L/min/ratón y aire comprimido a 2 L/min/ratón durante el período de adquisición de las imágenes. Las imágenes de emisión fotónica se tomaron 15 minutos después de la administración de la D-luciferina con un período de adquisición de 5 minutos en posición de alta sensibilidad.

Tal y como se muestra en la Figura 20 donde se presentan imágenes representativas de la cinética de emisión fotónica de los diferentes grupos experimentales, la administración de KA induce un aumento significativo del estrés oxidativo en el cerebro desde 1 dpi hasta 4 dpi, punto temporal en el que se registró un mayor aumento de la expresión

génica en el cerebro. Sorprendentemente, los animales que fueron inoculados con KA y tratados con NST0060 no mostraron un aumento significativo de la expresión de este gen asociado al estrés oxidativo durante toda la cinética estudiada.

Tal y como se muestra en la Figura 21 donde se presenta la cuantificación de la señal media de todos los sujetos correspondientes a los diferentes grupos experimentales, la administración de KA induce un aumento significativo de del estrés oxidativo en el cerebro desde 1 dpi hasta 4 dpi, punto temporal en el que se registró un mayor aumento de la expresión génica en el cerebro. Sorprendentemente, los animales que fueron inoculados con KA y tratados con NST0060 no mostraron un aumento significativo de la expresión de este gen asociado al estrés oxidativo durante toda la cinética estudiada.

Estos resultados indican que el compuesto NST0060 tiene propiedades antioxidantes y que en el caso del cerebro protege del estrés oxidativo producido por la administración una sustancia excitotóxica.

Ejemplo 10

Efecto protector de NST0060 frente a la muerte causada por la administración aguda de una sustancia excitotóxica en ratón

Una vez conocida la capacidad antiepiléptica, anticonvulsivante y antioxidante del compuesto NST0060 frente a la acción de una sustancia excitotóxica en ratones, los inventores decidieron averiguar si este efecto protector mostrado por el NST0060 frente a la excitotoxicidad se veía acompañado por una disminución de los niveles de muerte causados por una sustancia excitotóxica en ratones.

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron machos de 12 semanas de edad y de la cepa FVB/NHan. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo período de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

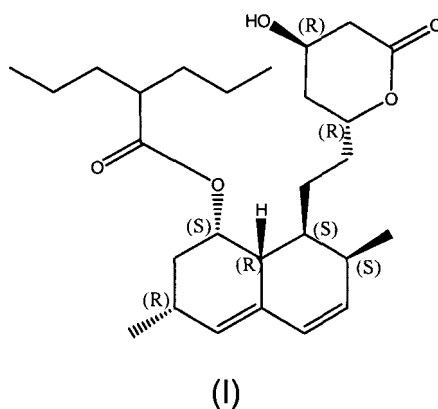
Los animales fueron inoculados intraperitonealmente con 25 mg/kg de kainato (KA) disuelto en PBS. Catorce animales fueron pretratados a 24 y 0.5 horas antes de la inoculación con KA y posteriormente de manera diaria hasta los 7 días post-inoculación mediante inyección intraperitoneal con metilcelulosa al 0.25% en PBS como vehículo (pauta de administración Vehículo+KA) y 14 fueron pretratados a 24 y 0.5 horas antes de la inoculación con KA y posteriormente de manera diaria hasta los 7 días post-inoculación mediante inyección intraperitoneal con el compuesto NST0060 a una dosis de 50 mg/kg (pauta de administración NST0060+KA). Tras la inoculación los animales fueron alojados en cubetas de manera individual para su seguimiento. Adicionalmente se trataron 8 ratones únicamente con vehículo en todas las administraciones y sin recibir inyección de KA para que sirvieran como controles. Durante todo el procedimiento experimental fueron registrados los óbitos en los distintos grupos de tratamiento, y con estos datos se realizaron las correspondientes curvas de supervivencia que se presentan en la Figura 22.

Los resultados indicaron que la administración de una dosis de 25 mg/Kg de KA intraperitoneal produce un aumento estadísticamente significativo de la muerte de los ratones. De forma sorprendente, el tratamiento con NST0060 antes y después de la inoculación de KA reduce la mortalidad observada de manera estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Estos resultados indican que el compuesto NST0060 aumenta la supervivencia frente a la mortalidad producida por una sustancia excitotóxica.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I),



su forma hidroxilada, las sales farmacéuticamente aceptables de dicho hidroxilado y prodrogas y solvatos farmacéuticamente aceptables del compuesto y de su forma hidroxilada.

2. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1 y/o su forma hidroxilada y/o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilado y/o una prodroga o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilada, y al menos un adyuvante, portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

3. Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, su forma hidroxilada o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilado y/o una prodroga o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilada para su uso como medicamento.

4. Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, su forma hidroxilada o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilado y/o una prodroga o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilada para su uso en la prevención y/o el tratamiento de:

- a. enfermedades neurodegenerativas,
- b. deterioro cognitivo,
- c. enfermedades asociadas con una oxidación indeseada,
- d. procesos patológicos asociados a la edad y progeria,
- e. enfermedades cardiovasculares como aterosclerosis, fibrilación auricular, dislipemia, hipercolesterolemia, hiperlipidemia, e hipertrigliceridemia, o
- f. inflamación o procesos inflamatorios,
- g. epilepsia, crisis epilépticas y convulsiones.

5. Un compuesto de fórmula (I), su forma hidroxilada o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilado y/o una prodroga o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilada según la reivindicación 4 donde las enfermedades neurodegenerativas son: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) o esclerosis múltiple.

6. Uso de un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, de su forma hidroxilada, de una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilado y/o de una prodroga o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilada en la elaboración de un medicamento.

7. Uso según la reivindicación 6 donde el medicamento se emplea en la prevención y/o el tratamiento de:

- a. enfermedades neurodegenerativas,

- b. deterioro cognitivo,
- c. enfermedades asociadas con una oxidación indeseada,
- 5 d. procesos patológicos asociados a la edad y progeria,
- e. enfermedades cardiovasculares como aterosclerosis, fibrilación auricular, dislipemia, hipercolesterolemia, hiperlipidemia, e hipertrigliceridemia, o
- 10 f. inflamación o procesos inflamatorios,
- g. epilepsia, crisis epilépticas y convulsiones.

15 8. Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, su forma hidroxilácida o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilácido y/o una prodroga o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilácida para su uso en el aumento de la expresión del gen seladin-1/DHCR24.

20 9. Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, su forma hidroxilácida o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilácido y/o una prodroga o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilácida para su uso en la prevención y/o tratamiento de enfermedades relacionadas con el gen seladin-1/DHCR24.

25 10. Un compuesto de fórmula (I), su forma hidroxilácida o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilácido y/o una prodroga o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilácida según la reivindicación 9, donde se previene y/o se trata la muerte neuronal asociada a enfermedades neurodegenerativas, enfermedades asociadas con una oxidación indeseada o procesos patológicos asociados a la edad.

30 11. Uso de un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, de su forma hidroxilácida, de una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilácido y/o de una prodroga o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilácida en la elaboración de un medicamento **caracterizado** por incrementar la expresión del gen seladin-1/DHCR24.

35 12. Uso de un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, de su forma hidroxilácida, de una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilácido y/o de una prodroga o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilácida en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de enfermedades relacionadas con el gen seladin-1/DHCR24.

Figura 1

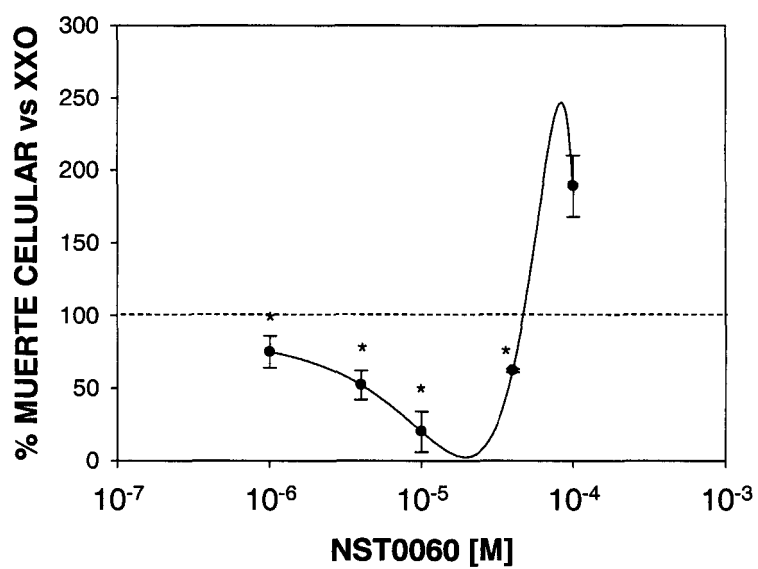


Figura 2

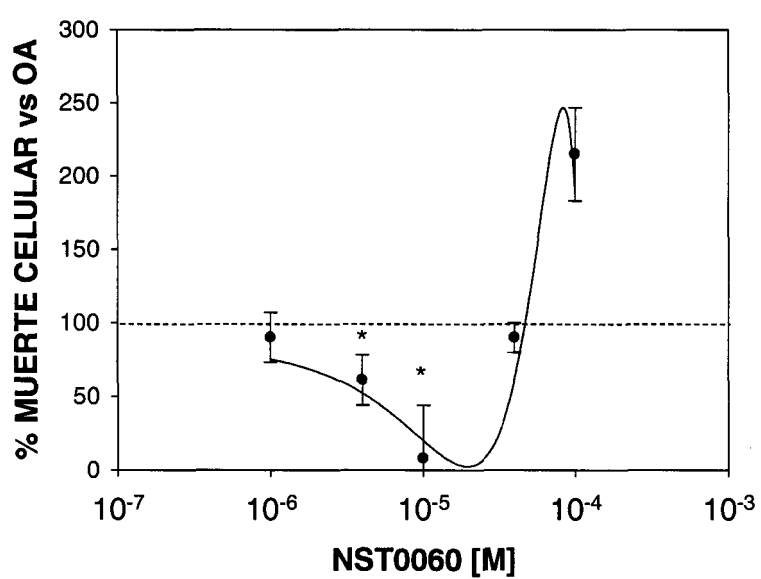


Figura 3

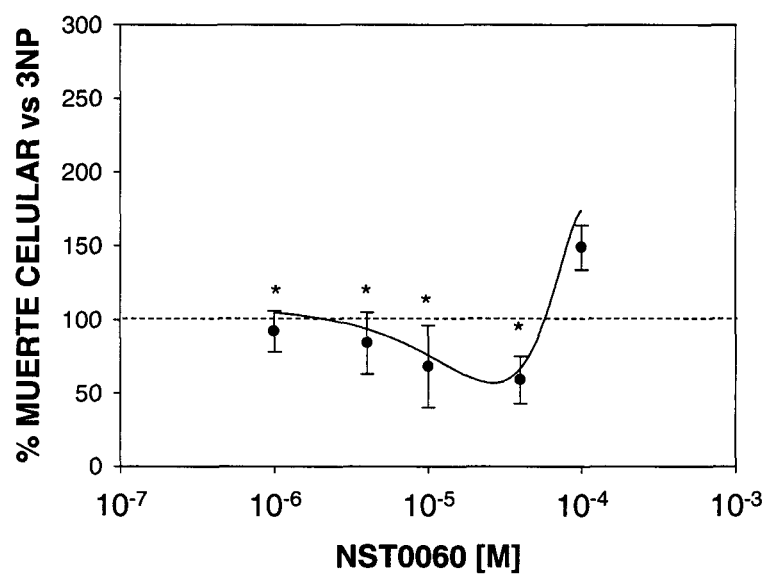


Figura 4

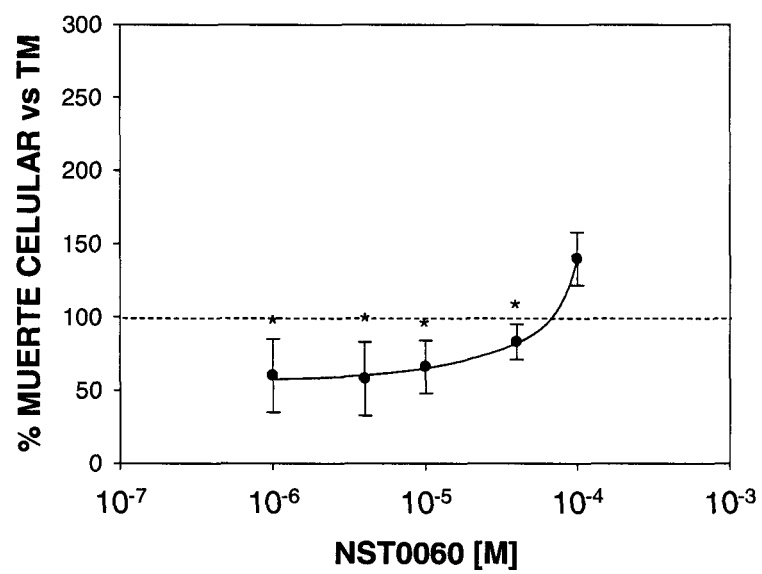


Figura 5

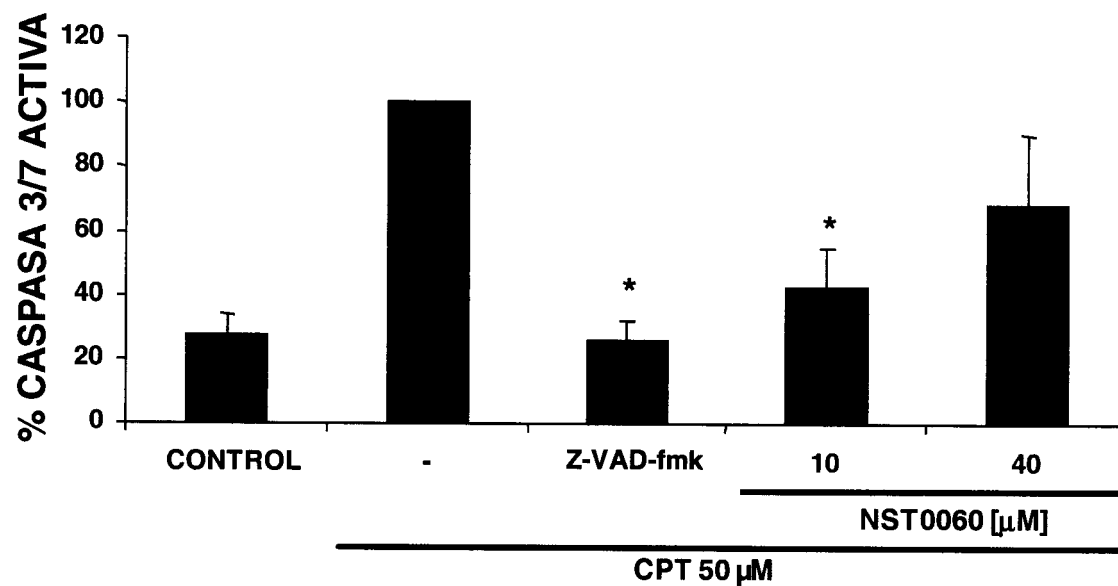


Figura 6

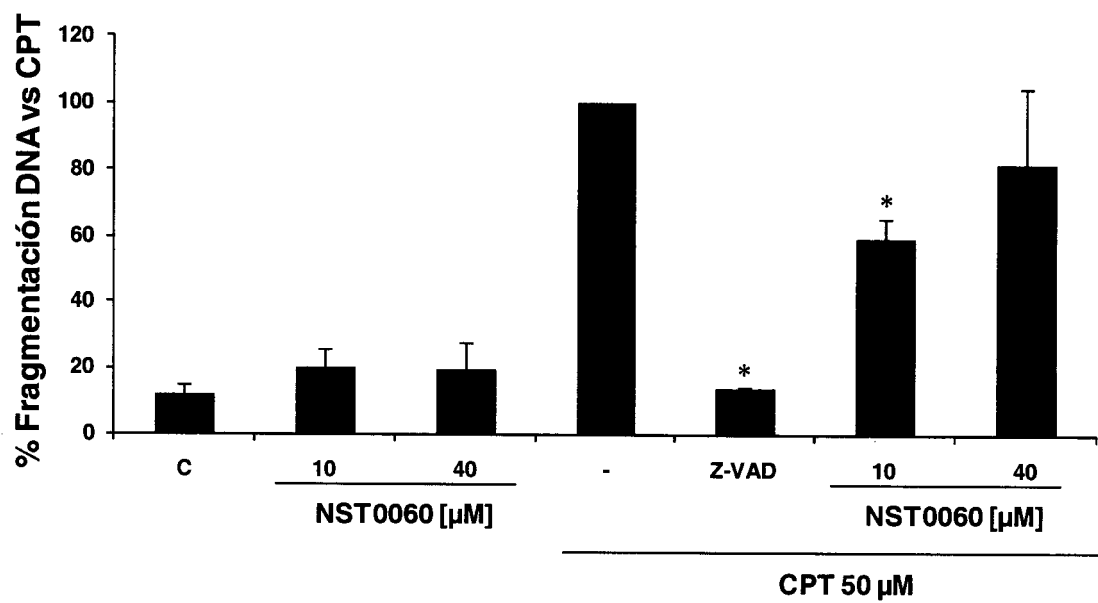


Figura 7

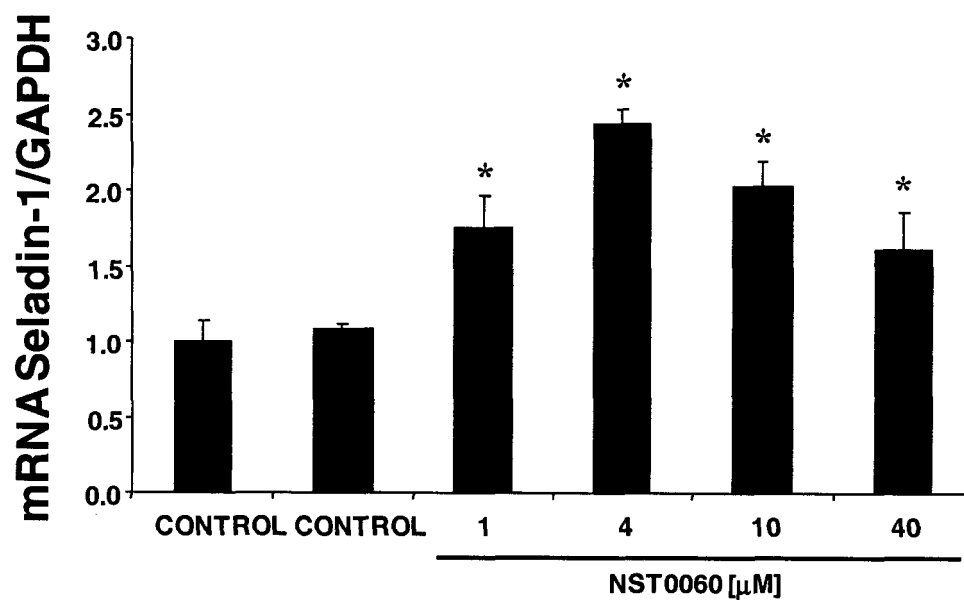


Figura 8

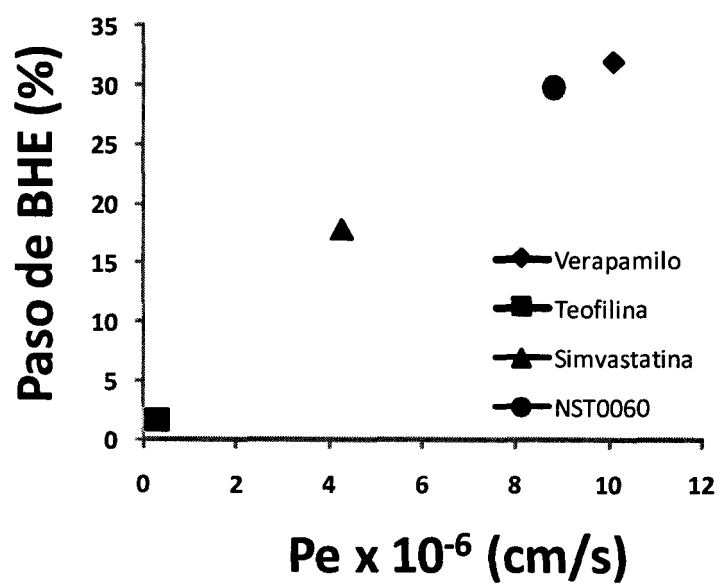


Figura 9

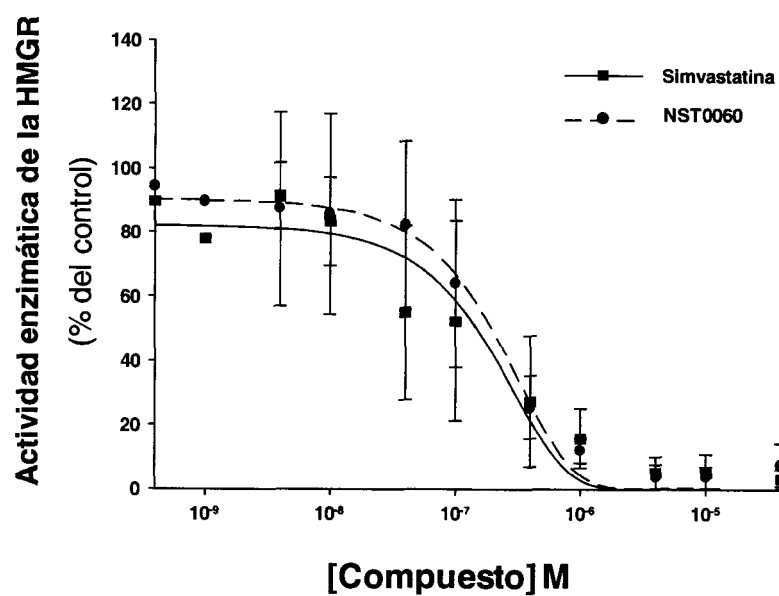


Figura 10

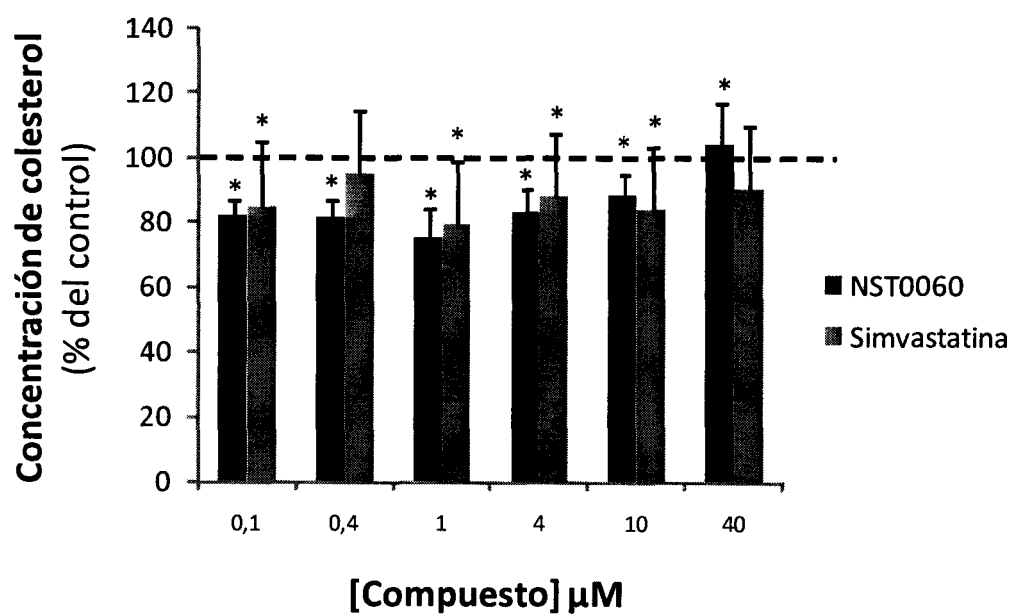


Figura 11

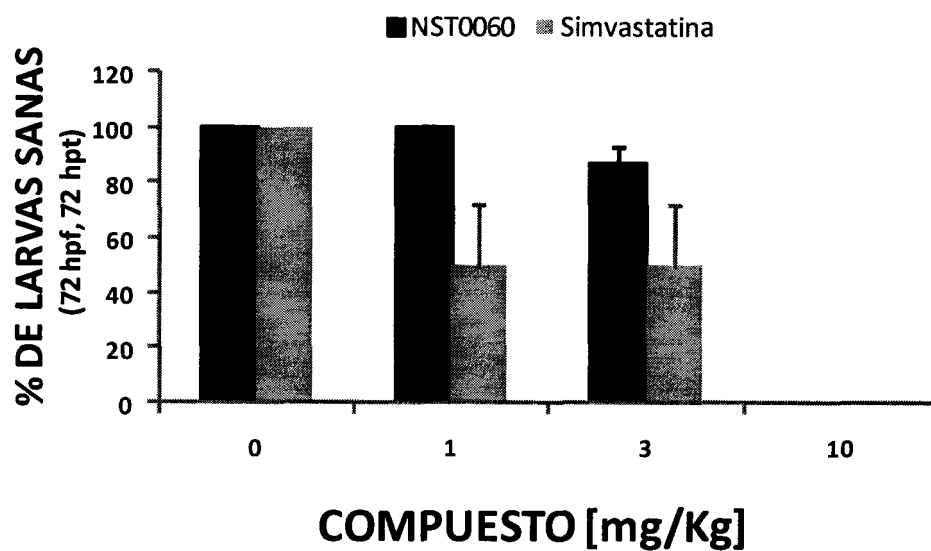


Figura 12

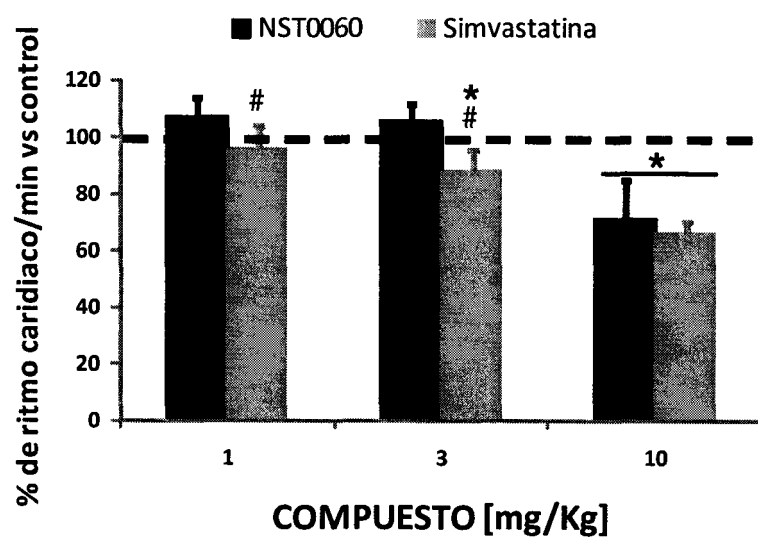


Figura 13

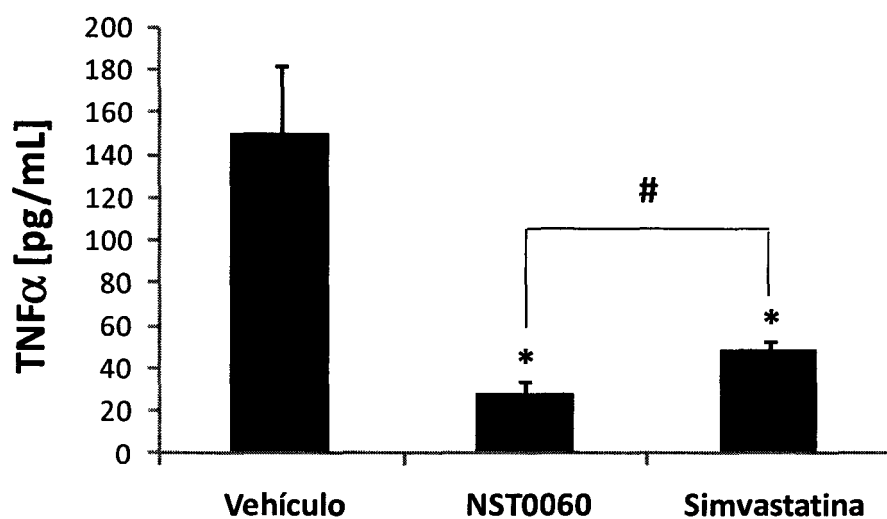


Figura 14

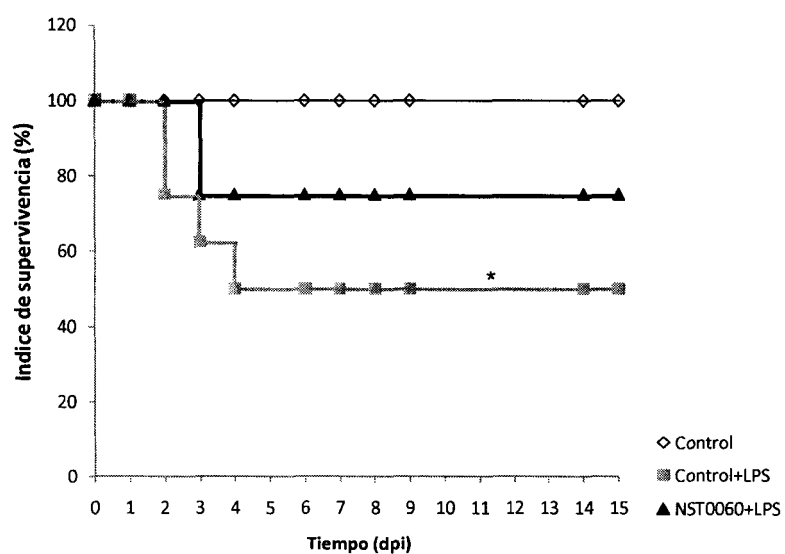


Figura 15

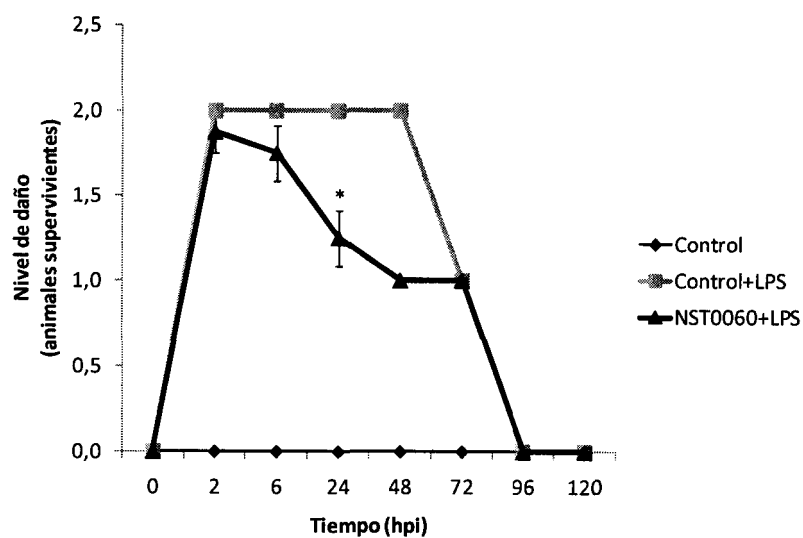


Figura 16

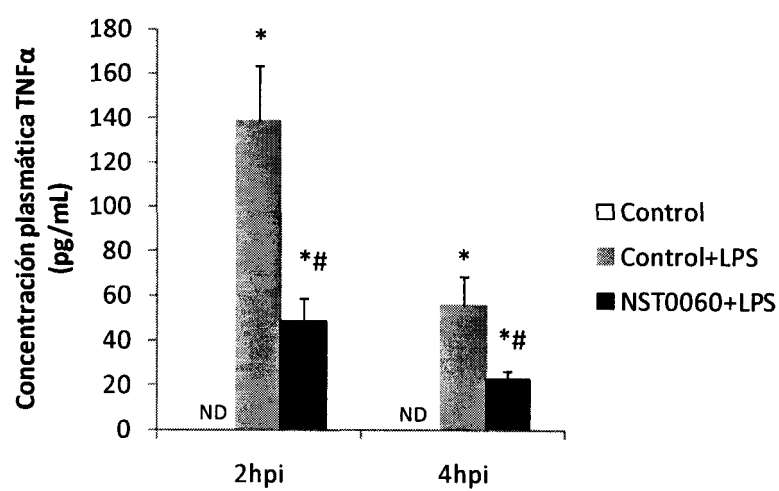


Figura 17

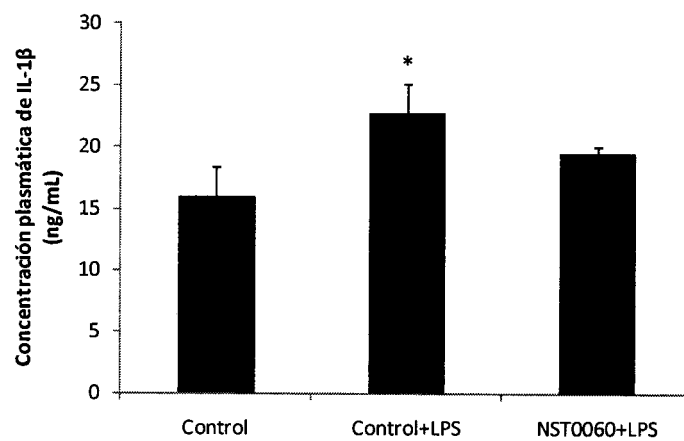


Figura 18

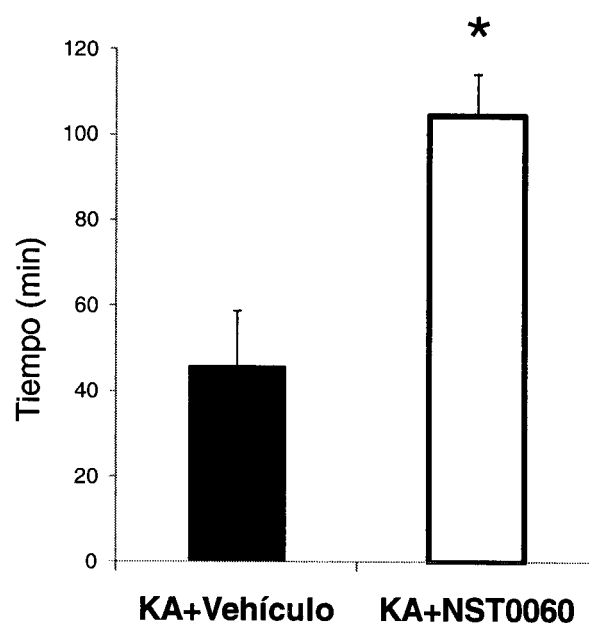


Figura 19

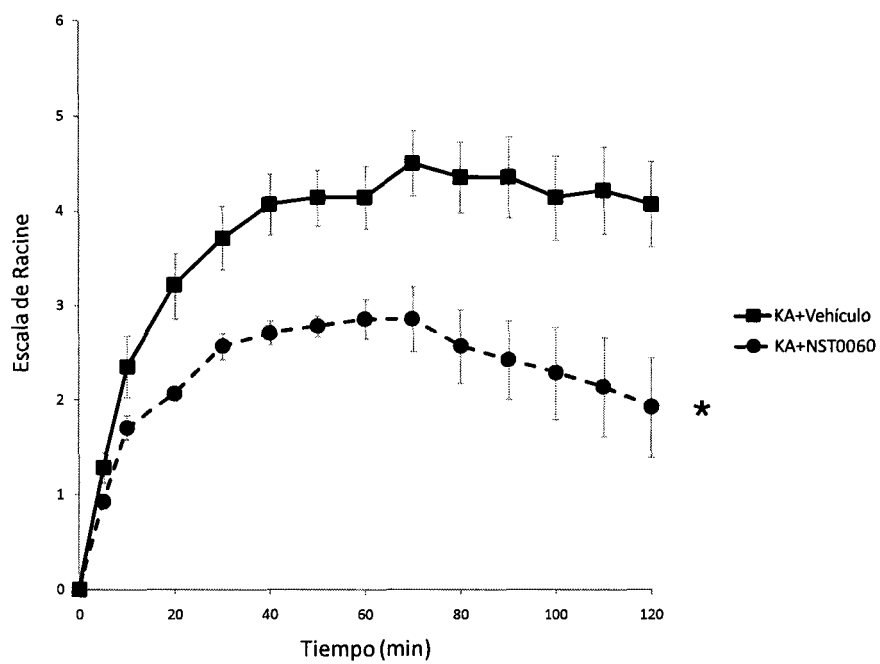


Figura 20

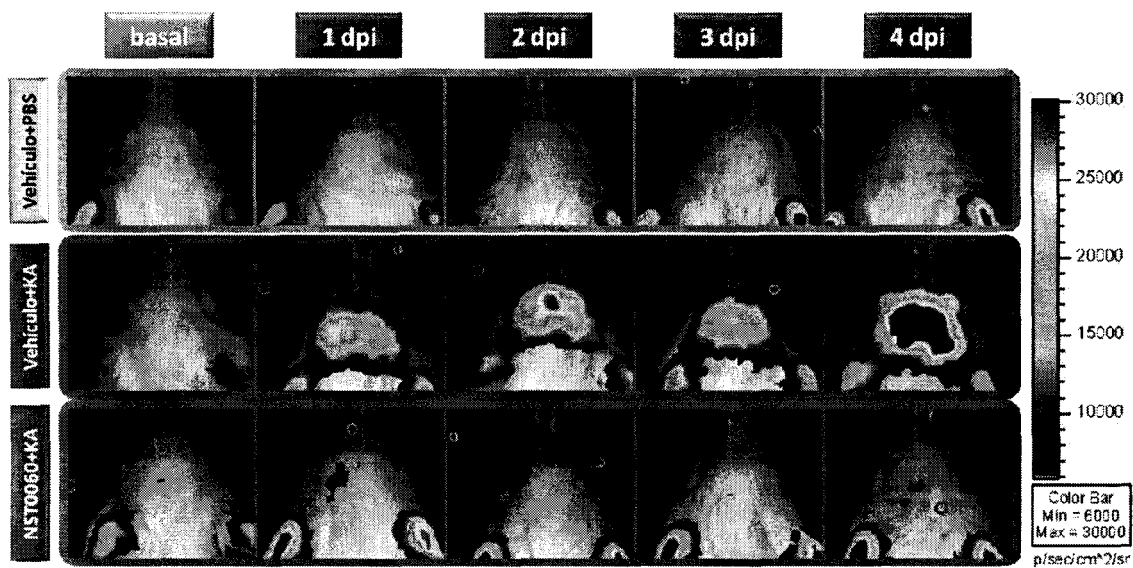


Figura 21

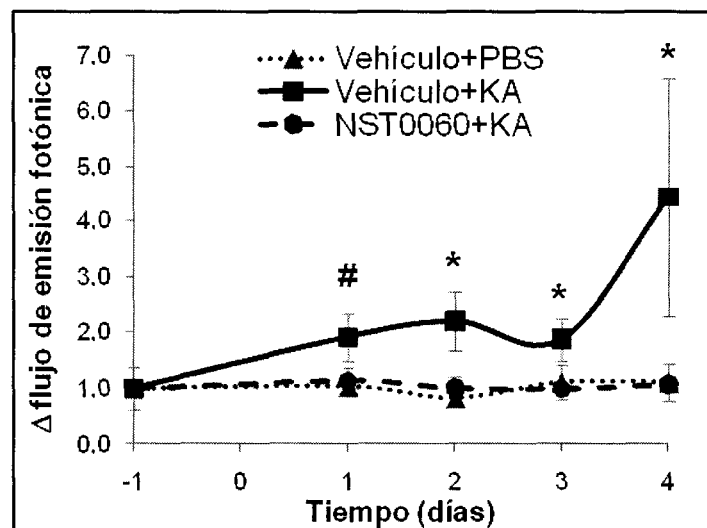
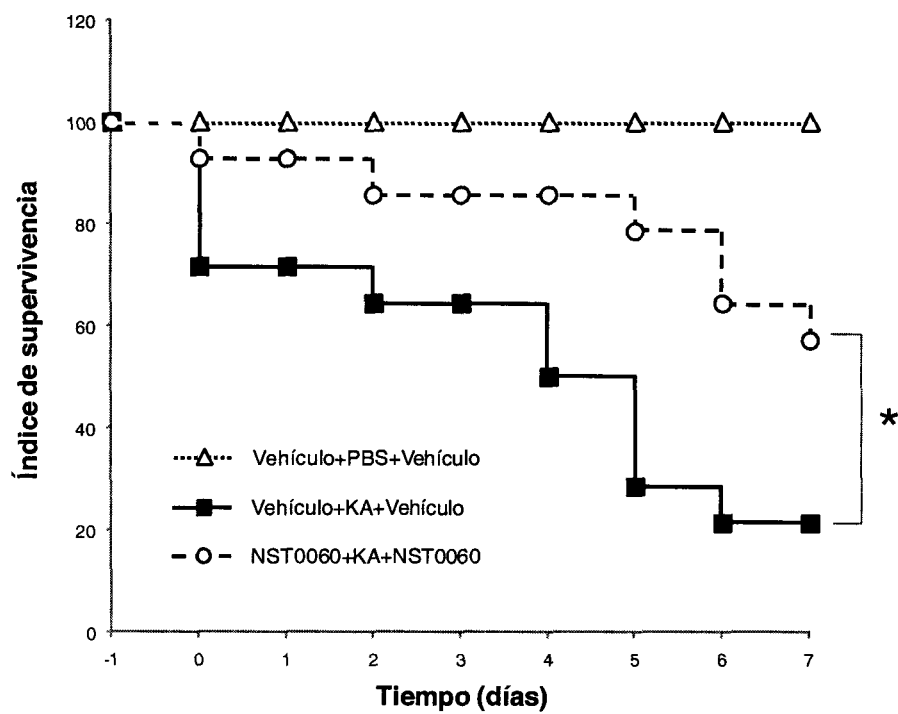


Figura 22





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201001340

22 Fecha de presentación de la solicitud: 13.10.2010

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

51 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 9911258 A1 (NOVARTIS- ERFINDUNGEN VERWALTUNGSGESELLSCHAFT MBH) 11.03.1999, página 9, párrafo 3; página16; reivindicaciones 1,4.	1-12
A	US 4450171 A (HOFFMAN et al.) 22.05.1984, columna 12, líneas 45-65; reivindicaciones; compuestos IIIa-e; tablas.	1-12
A	US 4293496 A (WILLARD ALVIN K) 06.10.1981, columna 15, línea 62 – columna 16, línea 15; compuestos Ia-e; reivindicaciones.	1-12
A	WO 2007089787 A2 (BRYSON, I.) 09.08.2007, página 1, líneas 8-15; página 3, líneas12-20; reivindicaciones.	1-12
A	LEE, J.K. et al.: "Statin inhibits kainic acid-induced seizure and associated inflammation and hippocampal cell death". Neuroscience Letters, agosto 2008, vol. 440, nº 3, páginas 260-264, página 260, página 261, primer párrafo.	1-12
A	VOLLMER, T. et al.: "Oral Simvastatintreatment in relapsing- 1-6 remitting multiplesclerosis". The Lancet. 15 Mayo 2004, Vol. 363, páginas 1607-1608, todo el documento.	1-12
A	CORDLE, A et al.: "3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A 1-6 Reductase Inhibitors Attenuate Beta-Amyloid-Induced Microglial Inflammatory Responses". The Journal of Neuroscience. 2005, Vol. 25, Nº 2, páginas 299-307, todo el documento.	1-12
A	WOLOZIN, B. et al. "Simvastatin is associated with a reduced 1-6 incidence of dementia and Parkinson's disease". BMC Medicine. 2007, Vol. 5, Nº 20, páginas 1-11, todo el documento.	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 nº:

Fecha de realización del informe
06.03.2012

Examinador
H. Aylagas Cancio

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D309/30 (2006.01)

A61K31/366 (2006.01)

A61P25/28 (2006.01)

A61P25/08 (2006.01)

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

C07D, 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, XPESP, REGISTRY, HCAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, NPL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 06.03.2012

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 9911258 A1 (NOVARTIS-ERFINDUNGEN VERWALTUNGSGESELLSCHAFT MBH)	11.03.1999
D02	US 4450171 A (HOFFMAN et al.)	22.05.1984
D03	US 4293496 A (WILLARD ALVIN K)	06.10.1981
D04	WO 2007089787 A2 (BRYSON, I.)	09.08.2007
D05	LEE, J.K. et al.: "Statin inhibits kainic acid-induced seizure and associated inflammation and hippocampal cell death". Neuroscience Letters, agosto 2008, vol. 440, nº 3, páginas 260-264, página 260, primer párrafo.	
D06	VOLLMER, T. et al.: "Oral Simvastatin treatment in relapsing- 1-6 remitting multiplesclerosis". The Lancet. 15 Mayo 2004, Vol. 363, páginas 1607-1608, todo el documento.	
D07	CORDLE, A et al.: "3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A 1-6 Reductase Inhibitors Attenuate Beta-Amyloid-Induced Microglial Inflammatory Responses". The Journal of Neuroscience. 2005, Vol. 25, Nº 2, páginas 299-307, todo el documento.	
D08	WOLOZIN, B. et al. "Simvastatin is associated with a reduced 1-6 incidence of dementia and Parkinson's disease". BMC Medicine. 2007, Vol. 5, Nº 20, páginas 1-11, todo el documento.	

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 a un compuesto de fórmula I, composición farmacéutica que comprende dicho compuesto y a su uso para la elaboración de un medicamento para incrementar la expresión del gen seladin-1/DHCR24 que previene y/o trata la muerte neuronal asociada a enfermedades neurodegenerativas, asociadas con una oxidación indeseada o procesos patológicos asociados a la edad.

El documento D1 se refiere a compuestos de fórmula I (ver reivindicación 4 y página 169), entre los valores preferidos para el radical R2 se encuentra el 1 propilbutilo, radical que coincide con el de la presente solicitud, y para el radical R3 entre otras se encuentra la opción (i) (pirano) que coincide con el de la estructura de la presente solicitud. Así mismo dichos compuestos tienen unas actividades farmacológicas como las de la presente solicitud.

El documento D2 (ver columna 12, líneas 45-65, reivindicaciones, columna 11, compuestos IIIa-e y tablas) y el documento D3 se refiere a compuestos antihipercolesterolémicos, son compuestos estructuralmente semejantes a los de la presente solicitud pero que difieren en el resto ácido unido a la posición 8 del anillo de naftaleno hidratado.

El documento D4 se refiere a composiciones que comprenden estatinas de diferentes grupos, entre las que se encuentran las que son estructuralmente semejantes al compuesto de la presente solicitud (lovastatina, pitavastatina, mevastatina y simvastatina) (ver página 3, líneas 12-20). Asimismo se refiere a su utilización en enfermedades cardiovasculares, en hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, etc.

En la introducción del documento D5 se hace una revisión bibliográfica sobre el efecto neuroprotector de diferentes estatinas en varios modelos animales y estudios clínicos, entre ellos esclerosis múltiple y enfermedad de Alzheimer. Se sugiere el uso de estatinas en el tratamiento de convulsiones y otras enfermedades neurológicas asociadas con el mecanismo de exotoxicidad que implica muerte neuronal inducida por isquemia, traumatismo cerebral, sesiones de la médula espinal, enfermedad de Alzheimer, epilepsia y convulsiones.

Los documentos D6-D8 divulgan el efecto neuroprotector de estatinas tales como simvastatina y lovastatina en la enfermedad de Alzheimer y en la esclerosis múltiple.

Los documentos citados D1-D8 muestran solo el estado de la técnica del campo al que pertenece la invención. Ninguno de ellos se refiere específicamente al compuesto de fórmula I y al uso que se reivindica.

A pesar de la similitud estructural entre el compuesto de la solicitud y las estatinas conocidas como simvastatina y lovastatina y a la vista del efecto neuroprotector sorprendente conseguido con el compuesto de la presente solicitud, (derivado de nonacolina J), se considera que las reivindicaciones 1-12 de la presente solicitud tienen novedad, actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P