

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 933**

51 Int. Cl.:

**C07D 259/00** (2006.01)

**C07D 213/06** (2006.01)

**A61K 31/395** (2006.01)

**A61K 31/495** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.06.2019** **PCT/US2019/035839**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2019** **WO19236884**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2019** **E 19814860 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2024** **EP 3801499**

54 Título: **Inhibidores de SARM1**

30 Prioridad:

**07.06.2018 US 201862682045 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.11.2024**

73 Titular/es:

**DISARM THERAPEUTICS, INC. (100.0%)**  
**1 Main Street, 11th Floor**  
**Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**HUGHES, ROBERT OWEN;**  
**DEVRAJ, RAJESH;**  
**BOSANAC, TODD;**  
**JARJES-PIKE, RICHARD ANDREW;**  
**BREARLEY, ANDREW SIMON y**  
**BENTLEY, JONATHAN**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

### Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 988 933 T3

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

## DESCRIPCIÓN

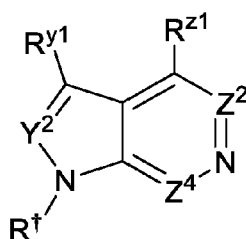
Inhibidores de SARM1

## Antecedentes

La degeneración axonal es una característica distintiva de varios trastornos neurológicos, incluyendo la neuropatía periférica, lesión cerebral traumática y enfermedades neurodegenerativas (Gerdt et al., SARM1 activation triggers axon degeneration locally via NAD(+) destruction. Science 348 2016, pp. 453-457 que se incorpora por referencia en su totalidad). Las enfermedades y lesiones neurodegenerativas son devastadoras tanto para los pacientes como para sus cuidadores. Los costes asociados a estas enfermedades superan actualmente varios cientos de miles de millones de dólares anuales sólo en Estados Unidos. Dado que la incidencia de muchas de estas enfermedades y trastornos aumenta con la edad, su incidencia está aumentando rápidamente a medida que cambia la demografía.

## Sumario

La presente invención proporciona un compuesto de la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

Y<sup>2</sup> se selecciona entre N y C-R<sup>y2</sup>;

Z<sup>2</sup> se selecciona entre N y C-R<sup>z2</sup>;

Z<sup>4</sup> se selecciona entre N y C-R<sup>z4</sup>;

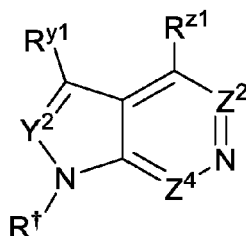
cada R<sup>t</sup> se selecciona independientemente entre hidrógeno y alifático C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituidos con -OR, -C(O)N(R)<sub>2</sub>, o -C(O)OR;

R<sup>y1</sup>, R<sup>y2</sup>, R<sup>z1</sup>, R<sup>z2</sup>, y R<sup>z4</sup> se seleccionan independientemente entre hidrógeno, halógeno, -CN, -OR, -C(O)OR y alifático C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con halógeno, -CN, -OR, -N(R)<sub>2</sub>, -C(O)OR o -C(O)N(R)<sub>2</sub>; y

cada R se selecciona independientemente entre hidrógeno y alifático C<sub>1-6</sub>;

o dos casos de R, junto con el átomo al que están unidos, forman un anillo heterocíclico saturado o parcialmente insaturado de 3 a 6 miembros, para su uso en el tratamiento o prevención de la degeneración axonal.

La presente invención también proporciona un compuesto de la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

Y<sup>2</sup> se selecciona entre N y C-R<sup>y2</sup>;

Z<sup>2</sup> se selecciona entre N y C-R<sup>z2</sup>;

Z<sup>4</sup> se selecciona entre N y C-R<sup>z4</sup>;

cada R<sup>t</sup> se selecciona independientemente entre hidrógeno y alifático C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con -OR, -C(O)N(R)<sub>2</sub>, o -C(O)OR;

$R^{y1}$ ,  $R^{y2}$ ,  $R^{z1}$ ,  $R^{z2}$ , y  $R^{z4}$  se seleccionan independientemente entre hidrógeno, halógeno, -CN, -OR, -C(O)OR y alifático  $C_{1-6}$  opcionalmente sustituido con halógeno, -CN, -OR, -N(R)<sub>2</sub>, -C(O)OR o -C(O)N(R)<sub>2</sub>; y

cada R se selecciona independientemente entre hidrógeno y alifático  $C_{1-6}$ ;

- 5 o dos casos de R, junto con el átomo al que están unidos, forman un anillo heterocíclico saturado o parcialmente insaturado de 3 a 6 miembros, para su uso en el tratamiento de una afección seleccionada entre neuropatía periférica inducida por quimioterapia, neuropatía diabética, neuropatía por HIV, enfermedad de Charcot Marie Tooth y esclerosis lateral amiotrófica.

### Breve descripción de los dibujos

- 10 FIG. 1 ilustra la estructura de la proteína SARM1.

FIG. 2 ilustra que una línea estable NRK1-HEK293T con suplementación de NR mantiene niveles más altos de NAD<sup>+</sup> tras la expresión de SARM1-TIR.

### Definiciones

- 15 Alifático: El término "alifático" se refiere a una cadena de hidrocarburos lineal (es decir, no ramificada) o ramificada, sustituida o no sustituida, completamente saturada o que contiene una o más unidades de insaturación, o a un hidrocarburo monocíclico o bicíclico completamente saturado o que contiene una o más unidades de insaturación, pero que no es aromático (también denominado en la presente memoria "carbociclo" o "cicloalifático"), que tiene un único punto de unión al resto de la molécula. A menos que se especifique lo contrario, los grupos alifáticos contienen de 1 a 6 átomos de carbono alifáticos. En algunas realizaciones, los grupos alifáticos contienen 1-5 átomos de carbono alifáticos. En otras realizaciones, los grupos alifáticos contienen 1-4 átomos de carbono alifáticos. En otras realizaciones más, los grupos alifáticos contienen 1-3 átomos de carbono alifáticos, y en incluso otras realizaciones, los grupos alifáticos contienen 1-2 átomos de carbono alifáticos. En algunas realizaciones, "cicloalifático" (o "carbociclo") se refiere a un hidrocarburo monocíclico C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> o a un hidrocarburo bicíclico C<sub>7</sub>-C<sub>10</sub> que está completamente saturado o que contiene una o más unidades de insaturación, pero que no es aromático, que tiene un único punto de unión al resto de la molécula. Los grupos alifáticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, grupos alquilo, alqueno y alquino lineales o ramificados, sustituidos o no sustituidos, e híbridos de los mismos.

- Alquilo: El término "alquilo", utilizado solo o como parte de una unidad estructural mayor, se refiere a un grupo hidrocarburo saturado, de cadena lineal o ramificada o cíclico, opcionalmente sustituido, con 1-12, 1-10, 1-8, 1-6, 1-4, 1-3 o 1-2 átomos de carbono. El término "cicloalquilo" se refiere a un sistema de anillo saturado opcionalmente sustituido de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono en el anillo. Los anillos de cicloalquilo monocíclicos ejemplares incluyen el ciclopropilo, el ciclobutilo, el ciclopentilo, el ciclohexilo y el cicloheptilo.

- Alqueno: El término "alqueno" se refiere a un grupo alquilo bivalente. En algunas realizaciones, "alqueno" es un grupo alquilo bivalente lineal o ramificado. En algunas realizaciones, una "cadena de alqueno" es un grupo polimetileno, es decir, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, en el que n es un número entero positivo, por ejemplo, desde 1 a 6, desde 1 a 4, desde 1 a 3, desde 1 a 2, o desde 2 a 3. Una cadena de alqueno opcionalmente sustituida es un grupo polimetileno en el que uno o más átomos de hidrógeno metileno se sustituyen opcionalmente por un sustituyente. Los sustituyentes adecuados incluyen los descritos a continuación para un grupo alifático sustituido y también incluyen los descritos en la presente memoria descriptiva. Se apreciará que dos sustituyentes del grupo alqueno pueden tomarse juntos para formar un sistema de anillo. En determinadas realizaciones, dos sustituyentes pueden tomarse juntos para formar un anillo de 3-7 miembros. Los sustituyentes pueden estar en el mismo átomo o en átomos diferentes.

- Alqueno: El término "alqueno", utilizado solo o como parte de una unidad estructural mayor, se refiere a un grupo hidrocarburo de cadena lineal o ramificada o cíclico, opcionalmente sustituido, con al menos un doble enlace y que tiene 2-12, 2-10, 2-8, 2-6, 2-4 o 2-3 átomos de carbono. El término "cicloalqueno" se refiere a un sistema de anillos monocíclicos o multicíclicos no aromáticos opcionalmente sustituidos que contienen al menos un doble enlace carbono-carbono y tienen de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono. Los anillos de cicloalqueno monocíclicos ejemplares incluyen el ciclopentilo, el ciclohexeno y el ciclohepteno.

- Alquino: El término "alquino", utilizado solo o como parte de una unidad estructural mayor, se refiere a un grupo hidrocarburo de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido que tiene al menos un triple enlace y 2-12, 2-10, 2-8, 2-6, 2-4 o 2-3 átomos de carbono.

- Heterociclo: Como se utiliza en la presente memoria, los términos "heterociclo", "heterociclilo", "radical heterocíclico" y "anillo heterocíclico" se utilizan indistintamente y se refieren a una unidad estructural heterocíclica monocíclica estable de 3 a 8 miembros o bicíclica de 7 a 10 miembros que está saturada o parcialmente insaturada y que tiene, además de átomos de carbono, uno o más, tales como de uno a cuatro heteroátomos, como se ha definido anteriormente. Cuando se utiliza en referencia a un átomo de anillo de un heterociclo, el término

"nitrógeno" incluye un nitrógeno sustituido. Por ejemplo, en un anillo saturado o parcialmente insaturado con 0-3 heteroátomos seleccionados entre oxígeno, azufre o nitrógeno, el nitrógeno puede ser N (como en el 3,4-dihidro-2H-pirrolilo), NH (como en el pirrolidinilo) o NR<sup>+</sup> (como en el pirrolidinilo N-sustituido). Un anillo heterocíclico puede unirse a su grupo colgante en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que dé lugar a una estructura estable y cualquiera de los átomos del anillo puede estar opcionalmente sustituido. Ejemplos de tales radicales heterocíclicos saturados o parcialmente insaturados incluyen, sin limitación, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotienilo, piperidinilo, decahidroquinolinilo, oxazolidinilo, piperazinilo, dioxanilo, dioxolanilo, diazepinilo, oxazepinilo, tiazepinilo, morfolinilo y tiamorfolinilo. Un grupo heterociclilo puede ser mono-, bi-, tri-, o policíclico, preferentemente mono-, bi-, o tricíclico, más preferentemente mono- o bicíclico. El término "heterociclilalquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido por un heterociclilo, en el que las porciones alquilo y heterociclilo independientemente están opcionalmente sustituidas. Además, un anillo heterocíclico también incluye grupos en los que el anillo heterocíclico está fusionado a uno o más anillos arilo.

Parcialmente insaturado: Como se utiliza en la presente memoria, el término "parcialmente insaturado" se refiere a una unidad estructural de anillo que incluye al menos un enlace doble o triple entre los átomos del anillo. El término "parcialmente insaturado" pretende abarcar anillos que tienen múltiples sitios de insaturación, pero no pretende incluir unidades estructurales aromáticas (por ejemplo, arilo o heteroarilo), como se definen en la presente memoria.

Paciente: Como se utiliza en la presente memoria, el término "paciente" se refiere a cualquier organismo al que se administra o puede administrarse una composición proporcionada, por ejemplo, con fines experimentales, diagnósticos, profilácticos, cosméticos y/o terapéuticos. Los pacientes típicos incluyen animales (por ejemplo, mamíferos tales como ratones, ratas, conejos, primates no humanos y/o seres humanos). En algunas realizaciones, el paciente es un ser humano. En algunas realizaciones, un paciente padece o es susceptible de padecer uno o más trastornos o afecciones. En algunas realizaciones, un paciente muestra uno o más síntomas de un trastorno o afección. En algunas realizaciones, un paciente ha sido diagnosticado con uno o más trastornos o afecciones. En algunas realizaciones, el paciente está recibiendo o ha recibido determinada terapia para diagnosticar y/o tratar una enfermedad, trastorno o afección.

Farmacéuticamente aceptable: Como se utiliza en la presente memoria, la frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del ámbito del buen juicio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una proporción beneficio/riesgo razonable.

Sal farmacéuticamente aceptable: El término "sal farmacéuticamente aceptable", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a sales de tales compuestos que son apropiadas para su uso en contextos farmacéuticos, es decir, sales que son, dentro del ámbito del buen juicio médico, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de los seres humanos y animales inferiores sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares, y son proporcionales a una proporción beneficio/riesgo razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, S. M. Berge, et al. describe en detalle las sales farmacéuticamente aceptables en J. Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19 (1977). En algunas realizaciones, las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de adición ácida no tóxicas, que son sales de un grupo amino formadas con ácidos inorgánicos tales como el ácido clorhídrico, el ácido bromhídrico, el ácido fosfórico, el ácido sulfúrico y el ácido perclórico o con ácidos orgánicos tales como el ácido acético, el ácido maleico, el ácido tartárico, el ácido cítrico, el ácido succínico o el ácido malónico o mediante el uso de otros procedimientos utilizados en la técnica tales como el intercambio iónico. En algunas realizaciones, las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, canforato, canforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formiato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, gluconato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidroyoduro, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, lauril sulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, *p*-toluenosulfonato, undecanoato, sales de valerato y similares. Las sales representativas de metales alcalinos o alcalinotérreos incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares. En algunas realizaciones, las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, cuando sea apropiado, amonio no tóxico, amonio cuaternario y cationes amina formados usando contraiones tales como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, alquilo que tenga de 1 a 6 átomos de carbono, sulfonato y aril sulfonato.

Prevenir o prevención: Como se utilizan en la presente memoria, los términos "prevenir" o "prevención", cuando se utilizan en relación con la aparición de una enfermedad, trastorno y/o afección, se refieren a reducir el riesgo de desarrollar la enfermedad, trastorno y/o afección y/o a retrasar la aparición de una o más características o síntomas de la enfermedad, trastorno o afección. La prevención puede considerarse completa cuando la aparición de una enfermedad, trastorno o afección se ha retrasado durante un periodo de tiempo predefinido.

Tratar: como se utiliza en la presente memoria, los términos "tratar", "tratamiento" o "que trata" se refieren a cualquier procedimiento utilizado para aliviar parcial o completamente, mejorar, aliviar, inhibir, prevenir, retrasar la

aparición, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno y/o afección. El tratamiento puede administrarse a un sujeto que no muestre signos de una enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, el tratamiento puede administrarse a un sujeto que sólo presenta signos tempranos de la enfermedad, trastorno y/o afección, por ejemplo, con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar una patología asociada a la enfermedad, trastorno y/o afección.

## Descripción detallada

### Degeneración axonal programada y SARM1

La degeneración axonal es una característica patológica importante de enfermedades neurológicas tales como, pero no se limita a, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la ALS, la esclerosis múltiple, la neuropatía periférica diabética, la neuropatía periférica inducida por quimioterapia, la neuropatía hereditaria, la lesión cerebral traumática y/o el glaucoma. Los axones dañados o no sanos se eliminan mediante un programa intrínseco de autodestrucción distinto de las rutas tradicionales de muerte celular, como la apoptosis, conocido como degeneración walleriana. (Gerdtts, J., et al., *Neuron*, 2016, 89, 449-460; Whitmore, A.V. et al., *Cell Death Differ.*, 2003, 10, 260-261). En la degeneración walleriana, un nervio periférico sufre una ruptura selectiva del segmento axónico distal a una lesión, mientras que el segmento axónico proximal y el cuerpo celular permanecen intactos. Esta degeneración se caracteriza, en primer lugar, por una depleción de la nicotinamida mononucleótido adeniltransferasa (NMNAT), seguido de una pérdida de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>), pérdida de adenosina trifosfato (ATP), proteólisis de neurofilamentos y, por último, degradación axonal aproximadamente entre 8 y 24 horas después de la lesión. (Gerdtts, J., et al., *Neuron*, 2016, 89, 449-460).

La NAD<sup>+</sup> es un metabolito ubicuo con funciones críticas en el metabolismo energético y la señalización celular (Belenkey et al., *Trends Biochem.*, 2007, 32, 12-19; Chiarugi et al., *Nat. Rev. Cancer*, 2012, 12, 741-752). La regulación homeostática de los niveles de NAD<sup>+</sup> también es responsable del mantenimiento de la estabilidad e integridad axonal. De acuerdo con lo anterior, las manipulaciones que aumentan la localización axonal de NMNAT1 confieren protección axonal (Babetto et al., *Cell Rep.*, 2010, 3, 1422-1429; Sasaki et al., *J. Neurosci.*, 2009).

En un cribado de ARNi de todo el genoma en neuronas primarias de ratón, se identificó el motivo alfa estéril y TIR que contine 1 (SARM1), en el que la eliminación de SARM1 condujo a una protección duradera de las neuronas sensoriales frente a la degeneración de los axones inducida por lesiones (Gerdtts et al., *J. Neurosci.*, 2013, 33, 13569-13580). SARM1 pertenece a la familia de las proteínas adaptadoras citosólicas, pero es única entre sus miembros porque es el adaptador más antiguo desde el punto de vista evolutivo, inhibe paradójicamente la señalización TLR y ha sido identificada como el ejecutor central de la vía de muerte axonal inducida por lesión (O'Neill, L.A. & Bowie, A.G., *Nat. Rev. Immunol.*, 2007, 7, 353-364; Osterloh, J.M., et al., *Science*, 2012, 337, 481-484; Gerdtts, J., et al., *J. Neurosci.* 33, 2013, 13569-13580). La activación de SARM1 mediante la lesión axonal o la dimerización forzada de los dominios SARM1-TIR promueve el agotamiento rápido y catastrófico de Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NAD<sup>+</sup>), seguido poco después por la degradación axonal, destacando así el papel central de la homeostasis de NAD<sup>+</sup> en la integridad axonal. (Gerdtts, J., et al., *Science*, 2015, 348, 453-457). SARM1 es necesaria para esta depleción de NAD<sup>+</sup> inducida por la lesión tanto *in vitro* como *in vivo* y la activación de SARM1 desencadena la degeneración de los axones a nivel local a través de la destrucción de NAD<sup>+</sup> (Gerdtts et al., et al., *Science*, 2015 348, 452-457; Sasaki et al., *J. Biol. Chem.* 2015, 290, 17228-17238 que se incorporan íntegramente como referencia al presente documento).

A partir de estudios genéticos de pérdida de función está claro que SARM1 sirve como ejecutor central de la ruta de degeneración axonal tras una lesión. La inactivación genética de SARM1 permite preservar los axones hasta 14 días después de la transección nerviosa (Osterloh, J.M., et al., *Science*, 2012, 337, 481-484; Gerdtts, J., et al. *J. Neurosci.*, 2013, 33, 13569-13580) y también mejora los resultados funcionales en ratones tras una lesión cerebral traumática (Henninger, N. et al., *Brain* 139, 2016, 1094-1105). Además del papel del SARM1 en la lesión axonal directa, el SARM1 también es necesario para la degeneración axonal observada en la neuropatía periférica inducida por la quimioterapia. La pérdida de SARM1 bloquea la neuropatía periférica inducida por la quimioterapia, inhibiendo tanto la degeneración axonal como el aumento de la sensibilidad al dolor que se desarrolla tras el tratamiento quimioterapéutico con vincristina (Geisler et al., *Brain*, 2016, 139, 3092-3108).

SARM1 contiene múltiples motivos conservados incluyendo dominios SAM, motivos ARM/HEAT y un dominio TIR (FIG. 1) que median la oligomerización y las interacciones proteína-proteína (O'Neill, L.A. & Bowie, A.G., *Nat. Rev. Immunol.*, 2007, 7, 353-364; Tewari, R., et al., *Trends Cell Biol.*, 2010, 20, 470-481; Qiao, F. & Bowie, J.U., *Sci. STKE* 2005, re7, 2005). Los dominios TIR se encuentran comúnmente en las proteínas de señalización que funcionan en las rutas de inmunidad innata, donde sirven como andamios para los complejos de proteínas (O'Neill, L.A. & Bowie, A.G., *Nat. Rev. Immunol.*, 2007, 7, 353-364). Curiosamente, la dimerización de los dominios SARM1-TIR es suficiente para inducir la degeneración axonal y desencadenar rápidamente la degradación de NAD<sup>+</sup> actuando como enzima de escisión de NAD<sup>+</sup> (Milbrandt et al., *WO* 2018/057989; Gerdtts, J., et al., *Science*, 2015, 348, 453-457). Dado el papel central de SARM1 en la ruta de la degeneración axonal y su identificada actividad NADasa, se han emprendido esfuerzos para identificar agentes que puedan regular SARM1, y potencialmente actuar como agentes terapéuticos útiles, por ejemplo, para proteger contra enfermedades neurodegenerativas incluyendo neuropatía periférica, lesión cerebral traumática, y/o enfermedades neurodegenerativas.

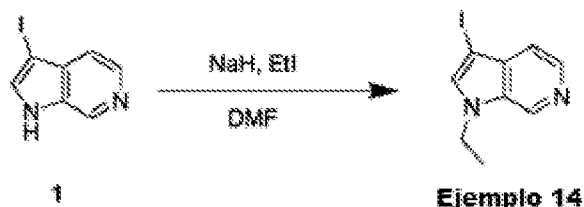
Entre otras cosas, la presente divulgación proporciona determinados compuestos y/o composiciones que actúan como agentes inhibidores de SARM1 (por ejemplo, como agentes inhibidores de SARM1), y tecnologías relacionadas con los mismos.

### Ejemplificación

#### 5 Métodos

Algunos procedimientos y composiciones descritos en la presente memoria utilizan técnicas de laboratorio bien conocidas por los expertos, y pueden encontrarse en manuales de laboratorio tales como Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001; Methods In Molecular Biology, ed. Richard, Humana Press, NJ, 1995; Spector, D. L. et al., Cells: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998 y Harlow, E., Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999. Los procedimientos de administración de productos farmacéuticos y los regímenes de dosificación pueden determinarse según los principios estándar de la farmacología, utilizando procedimientos proporcionados por textos de referencia estándar como Remington: the Science and Practice of Pharmacy (Alfonso R. Gennaro ed., 19th ed., 1995); Hardman, J.G., et al., Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth Edition, McGraw-Hill, 1996 y Rowe, R.C. et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, Fourth Edition, Pharmaceutical Press, 2003.

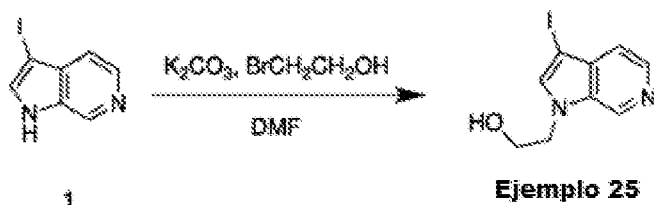
#### Ejemplo 1: Síntesis del ejemplo 14



A una mezcla de azaindol 1 (150 mg, 0,615 mmol) en DMF (3 ml) se le agrega NaH (60 % en aceite, 37 mg, 0,92 mmol) lentamente a 0 °C y después se agita a 0 °C, durante 0,5 h. Se agrega lentamente yodoetano (144 mg, 0,92 mmol) y se deja agitar a temperatura ambiente durante 2 h. Se agrega lentamente agua (30 ml) para inactivar la reacción y se extrae con EtOAc (50 ml × 3). El EtOAc combinado se lavó con salmuera y se concentró al vacío. El residuo se purifica por HPLC preparativa para obtener el **Ejemplo 14** (32 mg, rendimiento = 18,5 %).

Los ejemplos 13-16 y 26 se sintetizan de manera análoga.

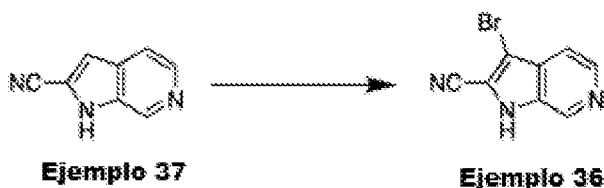
#### 25 Ejemplo 2: Síntesis del ejemplo 25



A una mezcla de azaindol 1 (150 mg, 0,615 mmol) y 2-bromoetanol (115 mg, 0,923 mmol) en DMF (3 ml) se le agrega K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (170 mg, 1,23 mmol). La mezcla se agita a 40 °C, durante 2 h, después se vierte en agua (30 ml) y se extrae con EtOAc (50 ml × 3). El EtOAc combinado se lava con salmuera y se concentra al vacío. El residuo se purifica por HPLC preparativa para obtener el **Ejemplo 25** (18 mg, rendimiento = 6 %).

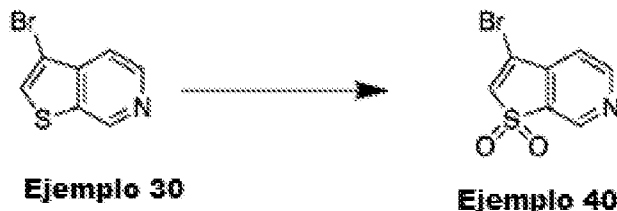
Los ejemplos 10-12 y 17-25 se sintetizan de manera análoga.

#### Ejemplo 3: Síntesis del ejemplo 36



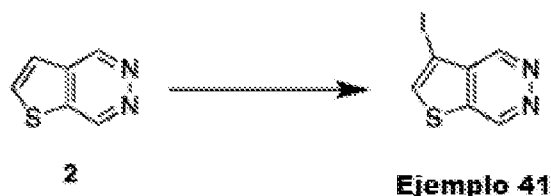
A una solución del **Ejemplo 37** (40 mg, 0,27 mmol) en DMF (1 ml) se le agrega *N*-bromosuccinimida (57 mg, 0,32 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 horas, después se diluye con agua (1 ml) y se purifica directamente por HPLC preparativa para obtener el **Ejemplo 36** (13 mg, rendimiento= 21 %).

#### Ejemplo 4: Síntesis del ejemplo 40



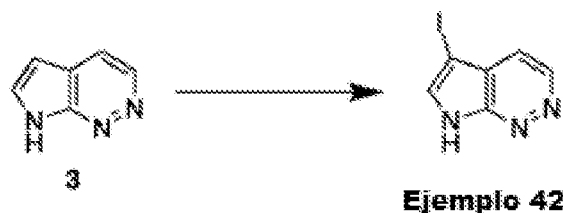
El **ejemplo 30** (100 mg, 0,47 mmol) se disuelve en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acuoso (50 % en peso, 1 ml) y se agita a temperatura ambiente durante 19 horas. A esta mezcla se le agrega anhídrido trifluoroacético (0,35 ml, 2,5 mmol) y se agita durante 4 días. La mezcla se extrae con EtOAc (3 × 2 ml), se seca sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtra y se concentra para dar un producto en bruto que se purifica por cromatografía instantánea (SiO<sub>2</sub>, 0-10 % de MeOH en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para dar el compuesto base **Ejemplo 40** (11 mg, 9 %).

#### Ejemplo 5: Síntesis del ejemplo 41



La tienopiridizina **2** (30 mg, 0,22 mmol) se disuelve en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (2 ml) y se trata con *N*-yodosuccinimida (0,03 ml, 0,26 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 h y luego se diluye con agua (5 ml) y se ajusta el pH a pH=8 con hidróxido amónico acuoso. La mezcla se extrae con EtOAc, se seca sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtra y se concentra para dar un producto en bruto que se purifica por HPLC preparativa para dar el compuesto base **Ejemplo 41** (5 mg, 9 %).

#### Ejemplo 6: Síntesis del ejemplo 42



La pirrolopiridizina **3** (50 mg, 0,42 mmol) se disuelve en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (2 ml) y se trata con *N*-yodosuccinimida (0,05 ml, 0,5 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 h y luego se diluye con agua (5 ml) y se ajusta el pH a pH=8 con hidróxido amónico acuoso. La mezcla se extrae con EtOAc, se seca sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtra y se concentra para dar el compuesto base **Ejemplo 42** (35 mg, 33 %).

El ejemplo 44 se sintetiza de forma similar a partir de pirrolopiridizina **3** y *N*-bromosuccinimida.

#### Ejemplo 7: Caracterización de los compuestos

Procedimientos LCMS:

Procedimiento A de análisis analítico LC/MS:

ESI +/- modo iónico 100-1000Da

Columna: XBridge C18, 50 × 4,6 mm, 3,5 μm

Temperatura: 40 °C

Gradiente:

## ES 2 988 933 T3

Tiempo (min)	Agua (10 mM de $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )	acetonitrilo	Flujo (ml/min)
0	95 %	5 %	2,0
1,2	5 %	95 %	2,0
3,0	5 %	95 %	2,0

Procedimiento B de análisis analítico LC/MS:

ESI +/- modo iónico 150-850Da

Columna: Phenomenex Kinetix-XB C18, Referencia: 00D-4498-AN, 2,1 × 100 mm, 1,7  $\mu\text{m}$

5 Temperatura: 40 °C

Gradiente:

Tiempo (min)	Agua + ácido fórmico al 0,1 %	Acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1 %	Flujo (ml/min)
0,00	95 %	5 %	0,6
5,30	0 %	100 %	0,6
5,80	0 %	100 %	0,6
5,82	95 %	5 %	0,6
7,00	95 %	5 %	0,6

Métodos de HPLC preparativa:

Procedimiento prep. de pH alto dirigido por UV

10

Columna	Waters Xbridge C18 Referencia 186003930 30 × 100 mm, 10 $\mu\text{m}$
Disponible en	Gilson 3 y Gilson5
Temperatura de columna	Temperatura ambiente
Fase móvil	A, Agua+ Hidróxido de amonio al 0,2 % B, Acetonitrilo + Hidróxido de amonio al 0,2 %



(continuación)

Gradiente	Tiempo (min)	% orgánico
	0	10
	0,55	10
	14,44	95
	16,55	95
	16,75	10
Caudal	40 ml/min	
Volumen de inyección	1500 µl	
Detección		
Señal	UV 215	

Procedimiento de preparación de pH bajo dirigido por UV

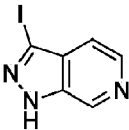
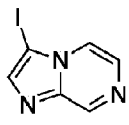
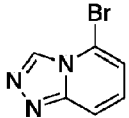
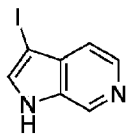
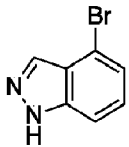


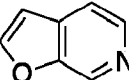
Columna	Waters Sunfire C18	
	Referencia 186003971	
	30 × 100 mm, 10µm	
Disponible en	Gilson 6 & Gilson 7	
Temperatura de columna	Temperatura ambiente	
Fase móvil	A, Agua + Ácido fórmico al 0,1 %	
	B, Acetonitrilo + Ácido fórmico al 0,1 %	
Gradiente	Tiempo (min)	% orgánico
	0	10
	0,55	10
	14,44	95
	16,55	95
	16,75	10
Caudal	40 ml/min	
Volumen de inyección	1500 µl	

(continuación)

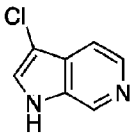
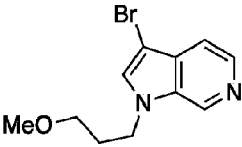
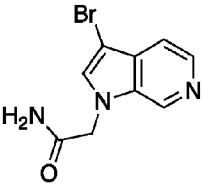
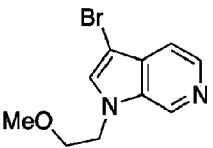

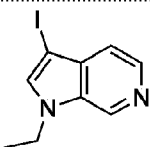
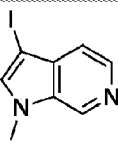
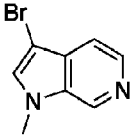
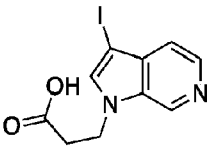
Detección	
Señal	UV 215

Los resultados se presentan en la tabla 1:

Tabla 1.

Ejemplo	Estructura	Procedimiento LCMS	Tiempo de ret. (min)	Mol ion (m/z)
1		B	1,74	246,0
2		B	1,52	246,0
3		B	2,45	198/ 200
4		B	3,42	245,0
5		B	2,53	197/ 199
6		B	2,63	231/ 233
7		B	2,38	197/ 199
8		B	0,65	120

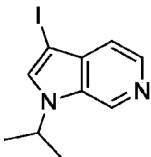
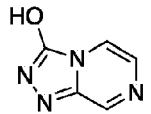
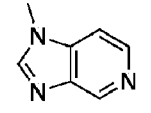
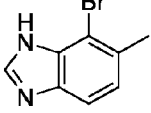


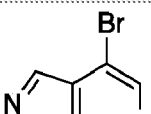
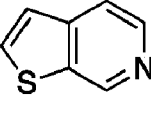
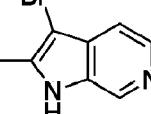
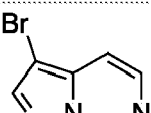
(continuación)

Ejemplo	Estructura	Procedimiento LCMS	Tiempo de ret. (min)	Mol ion (m/z)
9		B	0,68	153
10		A	1,59	269,0
11		A	1,25	254,0
12		A	1,53	255,0
13		A	1,67	239,0
14		A	1,63	273,0
15		A	1,53	258,9
16		A	1,49	211,0
17		A	1,14	316,9

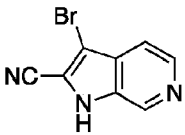
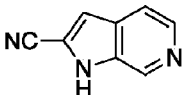
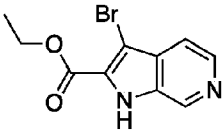
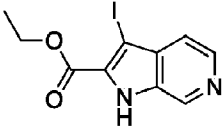

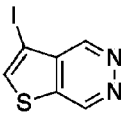
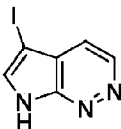
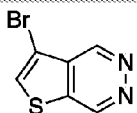
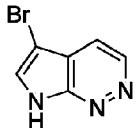
(continuación)

Ejemplo	Estructura	Procedimiento LCMS	Tiempo de ret. (min)	Mol ion (m/z)
18		A	1,13	269,0
19		A	1,12	303,0
20		A	1,10	254,9
21		A	1,38	3301
22		A	1,34	282,0
23		A	1,39	255,0
24		A	1,42	303,0
25		A	1,37	288,9

(continuación)

Ejemplo	Estructura	Procedimiento LCMS	Tiempo de ret. (min)	Mol ion (m/z)
26		A	1,72	287,0
27		B	0,57	137
28		B	2,05	134
29		B		
30		B	1,35	214/ 216
31		B	0,90	198/ 200
32		B	198/ 200	1,56
33		B		
34		B		
35		B	1,97	198/ 200

(continuación)

Ejemplo	Estructura	Procedimiento LCMS	Tiempo de ret. (min)	Mol ion (m/z)
36		B	2,62	222/ 224
37		B	2,66	144
38		B	2,70	269/ 271
39		B	3,50	303
40		B	1,73	246
41		B	2,95	263
42		B	2,98	246
43		B	2,79	215/ 217
44		B	2,83	198/ 200

**Ejemplo 8: Ensayo IC50 de SAM-TIR SARM1**

5 Este ejemplo describe un ensayo de la actividad SAM-TIR NADasa y el uso de este ensayo para medir la eficacia de los compuestos de fórmula I para bloquear la escisión de NAD<sup>+</sup> mediada por SARM1. Este ensayo se optimiza de manera que se caracterice la eficacia de los compuestos de la fórmula I para inhibir la actividad SARM1 y se calcule un valor IC50 para cada compuesto. Este ensayo utiliza un fragmento de la molécula SARM1 que abarca

los dominios SAM y TIR. Como se ha demostrado en la presente memoria, la expresión de este fragmento sin el dominio terminal N autoinhibitorio genera una enzima constitutivamente activa que escinde NAD<sup>+</sup>.

#### **Preparación del lisado SARM1 SAM-TIR (STL)**

5 Células NRK1-HEK293T se refiere a una línea celular que ha sido transfectada de forma estable e con un vector de expresión FCIV que expresa Nicotinamida Ribósido Quinasa 1 (NRK1) humana, una enzima que convierte el precursor biosintético NAD<sup>+</sup> nicotinamida ribósido (NR) en NMN, el precursor inmediato de NAD<sup>+</sup>. Cuando se le suministra NR, esta línea celular aumenta los niveles intracelulares de NAD<sup>+</sup> y mantiene la viabilidad celular, al expresar SARM1 SAM-TIR. La figura 2 ilustra que una línea estable NRK1-HEK293T con suplementación de NR mantiene niveles más altos de NAD<sup>+</sup> tras la expresión de SARM1-TIR. Los datos se generaron a partir de tres mediciones independientes de NAD<sup>+</sup> de tres experimentos de transfección independientes, y se normalizaron con respecto a los datos de un experimento no transfectado realizado simultáneamente. Los datos se presentan como media ± SEM; barras de error: SEM; \*\*\* P < 0,001 prueba t de student de dos colas.

15 Las células NRK1-HEK293T representan una línea celular que ha sido transfectada de forma estable con un vector de expresión FCIV que expresa Nicotinamida Ribósido Quinasa 1 (NRK1) humana, una enzima que convierte el precursor biosintético NAD<sup>+</sup> nicotinamida ribósido (NR) en NMN, el precursor inmediato de NAD<sup>+</sup>.

Las células NRK1-HEK293T se sembraron en placas de 150 cm<sup>2</sup> a 20 × 10<sup>6</sup> células por placa. Al día siguiente, las células se transfectaron con 15 µg de FCIV-SST (plásmido de expresión SAM-TIR, SEQ ID NO: 1) utilizando el reactivo de transfección de ADN X-TREMEGENE™ 9 (producto de Roche No. 06365787001).

gtcgacggatcgggagatctcccgatccctatggcgactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagftaagccagtatctgctccctgc  
 ttgtgtgttgagggtcgtgagtagtgccgagcaaaatftaagctacaacaaggcaaggcttgaccgacaattgcatgaagaatctgcttag  
 ggtaggcgttttgcgctgcttcgcatgtacggccagatatacgcgttgacattgattattgactagtattataatagtaataatcacgggtc  
 attagttcatagcccatafatggagttccgcttacataactacggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacccccgccattgac  
 gtcaataatgacgtatgtcccatagtaacgcaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtattacggtaactgccacttggca  
 gtacatcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgccagttacatgaccttat  
 gggactttcctacttggcagttacatctacgtattatgtcatcgtattaccatgggtgatgcggttttggcagttacatcaatggcggtgtagcgg  
 ttgactcacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaa  
 caactccgccccattgacgcaaatggcggtaggcggtgtacgggtgggaggtctatataagcagcgcttttgcctgtactgggtctctctgct  
 tagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaaccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgttcaagtagtgt  
 gtgcccgtctgtgtgactctggttaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtgccgcccgaacaggga  
 cttgaaagcgaaagggaaccagaggagctctctcgacgcaggactcggcttgcgtgaagcgcgacggcaagaggcgagggggcggc  
 gactggtgagtacgcaaaaatfttactagcggaggctagaaggagagagatgggtgagagcgctcagtattaagcgggggagaatt  
 agatcgcatgaggaaaaatcggtaaggccagggggaaagaaaaataaaatataatagttgggcaagcaggagctagaa  
 cgattcgagttatctggtggttagaacaatcagaaggctgtagaacaactgggacagctacaacatcccttcagacaggatcaga  
 agaacttagatcattatataatcagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaaggatagagataaaagacaccaaggaagcttagacaagat  
 agagggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcgccgctgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattg  
 gagaagtgaattatataaaatataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagagaagtggtgcagagaga  
 aaaaagagcagtgaggaaataggagctttgtccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatggcgcgagcgtcaatgacgtgacggt  
 acaggccagacaattattgtctgtatagtcagcagcagaaacatttgcctgagggtattgaggcgcaacagcatctgttgaactcacagt  
 ctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaaagatacctaaaggatcaacagctcctggggatttgggggtgctctgga  
 aaactcatttgcaccactgctgtgcttggatgtagtggagtaataatctctggaacagatttggatcacacgacctggatggagtggg  
 acagagaaattaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaat  
 tagataaatgggcaagtttgggaattggttaacatacaaaatggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggttggtaggtt  
 aagaatagttttgctgtactttctatagtgaatagagttaggcagggatattcaccattatcgtttcagaccacctcccaaccccaggggac  
 ccgacaggcccgaaggaaatagaagaagaagggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatcggcactgcgtgc  
 gccaatctgcagacaaatggcagttatccacaattttaaaagaaaagggggattgggggtacagtgcaggggaaagaatagtaga



cataatagcaacagacatacaaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaattttcgggtttattacaggacagcagagatcc  
 agtttgggtaattaagggtgcagcggcctccgcgcgggttttggcgctcccgcgggcgccccctcctcacggcgagcgtgccacgt  
 cagacgaaggcgagcagcgttctgatcctccggcgagcgtcaggacacggcgccgctgctcataagactcggccttagaaccc  
 cagtatcagcagaaggacatttaggacgggacttgggtgactctagggcactggtttctttccagagagcggaacaggcgaggaaaagt  
 agtcccttctcggcgattctgcggaggatcctgtggggcggtgaacggcgatgattatataaggacgcgcgggtgtggcacagctagt  
 tccgtcgcagccgggatttgggtcgcggttcttgttggatcgtgtgacgtcacttgggtgagttgcgggctgctgggctggccggggt  
 ttcgtggccgcccggcgtcgtgggacggaagcgtgtggagagaccgccaagggtctagctgtgggtccgcgagcaaggttgcct  
 gaactgggggttgggggagcgcaaaaatggcggtcttcccagagcttgaatggaagacgcttgaaggcggtgtgaggtcgttga  
 aacaaggtggggggcatggtggcggaagaacccaaggtcttagggcctcgtaatgcgggaaagctctattcgggtgagatgggt  
 ggggcaccatctggggaccctgacgtgaagttgtcactgactggagaactcgggttgcgtctggtgcggggcggcagttatgcgt  
 gccgttgggcagtgacccgtaccttgggagcgcgccctcgtcgtgtgacgtcaccggttctgttggcttataatcaggggtggggc  
 cacctgccggtaggtgtcggtaggcttttccgtcgcaggacgcagggttcgggcctagggtaggctctcctgaatcgacaggcgccg  
 gacctctggtgaggggagggataagtgagggcgtcagtttcttggcgttttatgtacctatcttctaagtagctgaagctccggtttgaact  
 atgcgctcgggggttggcagtggtgtttgtgaagtttttaggcacctttgaaatgaatcatttgggtcaatatgaattttcagtgtagactagt  
 aaagcttctgcaggtcgtactctagaaaattgtccgctaaattctggccgtttttggctttttgttagacgaagcttgggctgcaggtcgtactta  
 gaggatccGGATCCGCCACCATGTCAgctTGGAGCCACCCACAATTCGAAAAAGGCGGTGG  
 CTCAGGCGGTGGCTCAGGTGGCTCAGCTTGGAGCCACCCACAATTCGAAAAAGGCG  
 GTGGCTCATCTGGCGGAGGTGGCGGTGGCTCATCTGGCGGAGGTGCTAGCgtgccagctg  
 gaaggaggccgaggttcagacgtggctgcagcagatcggttctccaagtactgcgagagcttccgggagcagcaggtggatggcgacc  
 tgccttctcggctcacggaggaggaactccagaccgacctgggcagatgaatcgggcatcaccgcaagaggttctttagggagctcacgg  
 agctcaagaccttcgcaactattctacgtgcgaccgcagcaacctggcgactggctgggcagcctggaccgcgctccgccagtaca  
 cctacggcctggctcagctcggcctggaccgtccctcgtcgcaccgctgtcagcagcagctcgggaagactcggcatccacctgg  
 gcgtgcaccgcgcccgcctcctcacggcgccagagaaaatgctacactccccgtgcctgtactggtggcaaacccagtggggacact  
 ccagatgtcttcacagctaccgcccgaactcaggttccagctggccagctcctgaaggtgcacctgcagctgcattggtcagtgcttc  
 attgatgtggagaagctggaagcaggcaagttcgaggacaaactcatccagagtgatgggtgcccgcaactttgttgggtgctatcacc  
 tggagcactggacaagtgcatgcaagaccatgactgcaaggattgggtgcataaggagattgtactgcttaagctcgggcaagaacatt  
 gtgcccatcattgatggcttcagtgccctgagccccaggtcctgcctgaggacatgcaggctgtgcttactttaacggatatcaagtggtcc  
 cacgaataaccaggaggccaccattgagaagatcatcgcttctgcaggggcgctcctccgggactcatcgcaggctctgacaccagtt  
 tggagggtgctgcacccatgggtccaacctaaactctagaattcgatatcaagcttatcgataatcaacctctggattacaaaattgtgaaag  
 attgactggtattcttaactatgttgccttttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgctattgctcccgatggcttcat  
 ctctcctgtataaatcctggttgcgtctctttatgaggagttgtggccggtgtcaggcaacgtggcggtgtgactgtgttgcgtgacgc

aacccccactggtggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgtttccccctccctattgccacggcggaactcatcgcc  
gctgccttggcccgtgctggacaggggctcggctgttgggactgacaattccgtggtgttcggggaaatcatcgtcctttccttgctg  
ctcgctgtgttccacctggattctgcggggacgtccttctgctacgtccttgcgcccctcaatccagcggaccttcttcccgggcctg  
ctcgggctctgcgcccttcccgcttctgccttcgcccctagacgagtcggatctcctttgggcccctccccgcacgataccgtcga  
cctcgagacctagaaaaacatggagcaatcacaagtagcaatacagcagctaccaatgctgattgtgcctggctagaagcacaagaggag  
gaggagggtgggtttccagtcacacctcaggtacctttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaagaaaagg  
ggggactggaagggctaattcactcccaacgaagacaagataccttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttccctgattggcag  
aactacacaccaggggccaggatcagatatccactgaccttggatgggtgctacaagctagtagcagttgagcaagagaaggtagaagaa  
gccaatgaaggagagaacacccgctttagtaccctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagattagagtgagggttt  
gacagccgctagcattcatcacatggcccgagagctgcacgcgactgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagct  
ctctggctaactaggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgactctggt  
actagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagggcccgttfaaacccgctgatcagcctcagctgtgcctttagt  
gccagccatctgttgttggcccctccccgtgccttcttgacctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaatgaggaaattgca  
tcgcatgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcat  
gctggggatcggtgggtctctatggcttctgagcggaagaaccagctggggctctagggggatccccacgcgcctgtagcggcgc  
attaagcgcggcgggtgtgtgtgttacgcgagcgtgaccgtacacttgccagcgccctagcgcggcctcttctcgttcttcccttctt  
ctcgccacgttcgcccgttccccgtcaagctcaaatcgggggctccctttaggggtccgatttagtgcctttagcgcacctcgaccccaaaa  
aacttgattaggtgatggttcacgtagtgggccatcgccctgatagacgggttttccgctttagcgttggagtcacgttctttaaagtggac  
tcttgttccaaactggaacaacactcaacctatctcggtctatctttagtattataagggaatttggccgatttgcggctattgttaaaaatgag  
ctgatttaacaaaaatttaacgcgaattatctgtggaatgtgtgtcagttagggtgtggaagtccccaggctccccagcaggcagaagtat  
gcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccaggtgtggaagtccccaggctccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaat  
tagtcagcaaccatagtcggccccctaacctcgcccatcccgcccctaacctcgcccagttccgcccatttccgccccatggctgactaatt  
ttttttattatgcagaggccgagccgctctgctctgagctattccagaagtagtgaggaggctttttggaggcctaggcttttgcaaaaa  
gctcccgaggactgtatatccatttgggatctgatcagcacgtgttgacaattaatcatcggcatagtatatcggcatagtataatcgacaa  
ggtgaggaactaaacctgccaagttagcagtgccgttccgggtgctaccgcgcgcgacgtcgggagcggtcagttcttgaccg  
accggctcgggttctccgggacttctggaggacgacttccgggtgtggtccgggacgacgtgacctgttcacagcgcgggtccagg  
accaggtggtgccggacaacacctggcctgggtgtgggtgcgcgcctggagcagctgtacccgagtggtcggaggtcgtgtccac  
gaacttccgggacgctccggggccggccatgaccgagatcgggagcagccgtggggggcgggagttccctgcgcgacccggccg  
gcaactgcgtgacttctgtggccgaggagcaggactgacacgtgtacgagatttcatccaccgccccttctatgaaaggttgggttc  
ggaatcgtttccgggacggcggtgatgatcctccagcgcggggatctcatgctggagtcttccgccaccccaactgtttattgcagctt  
ataatggtacaaaataagcaatagcatcacaatttcacaaataagcattttttcactgcattctagttgtgtgttgcacaaactcatcaatgtat

[illegible]

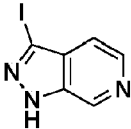
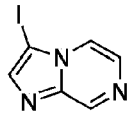
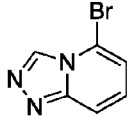
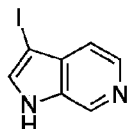
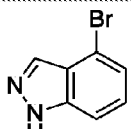

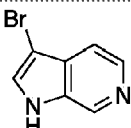
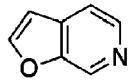
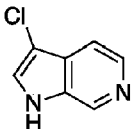
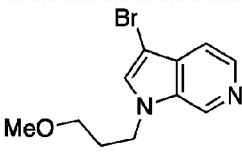
Los cultivos se suplementaron con 1 mM de NR en el momento de la transfección para minimizar la toxicidad de la sobreexpresión de SAM-TIR. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se cosecharon las células, se precipitaron por centrifugación a 1.000 rpm (centrifugadora Sorvall ST 16R, Thermo Fisher) y se lavaron una vez con PBS frío (solución salina tamponada con fosfato 0,01 M NaCl 0,138 M; KCl 0,0027 M; pH 7,4). Las células se volvieron a suspender en PBS con inhibidores de la proteasa (cOmplete™ cóctel de inhibidores de la proteasa, Roche, producto No. 11873580001) y los lisados celulares se prepararon por sonicación (Branson Sonifer 450, potencia = 3, 20 episodios de golpe). Los lisados se centrifugaron (12.000×g durante 10 min a 4 °C) para eliminar los restos celulares y los sobrenadantes (que contenían la proteína SARM1 SAM-TIR) se almacenaron a -80 °C para su uso posterior en el ensayo in vitro de SARM1 SAM-TIR NADasa (véase más adelante). La concentración de proteínas se determinó por el procedimiento Bicinchoninic (BCA) y se utilizó para normalizar las concentraciones de lisado.

Ensayo SAM-TIR IC50 de los compuestos de fórmula I.

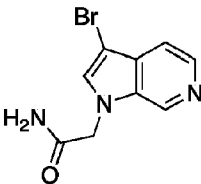
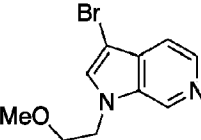
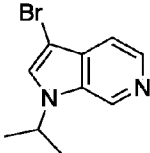
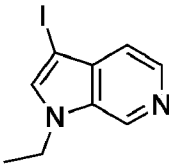
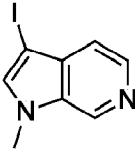
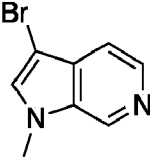
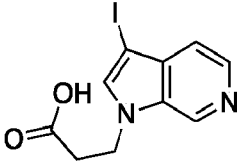
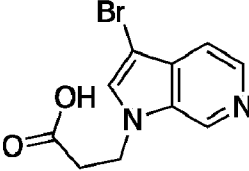
El ensayo enzimático se realizó en una placa de polipropileno de 384 pocillos en tampón PBS de Dulbecco en un volumen final de ensayo de 20  $\mu$ l. El lisado SAM-TIR con una concentración final de 5  $\mu$ g/ml se preincubó con el compuesto respectivo a una concentración final de ensayo de DMSO al 1% durante 2h a temperatura ambiente. La reacción se inició agregando 5  $\mu$ M de concentración final de ensayo de NAD<sup>+</sup> como sustrato. Tras 2 h de incubación a temperatura ambiente, la reacción se terminó con 40  $\mu$ l de solución de parada de ácido tricloroacético al 7,5 % en acetonitrilo. Las concentraciones de NAD<sup>+</sup> y ADPR se analizaron mediante un sistema de espectrometría de masas de alto rendimiento RapidFire (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) utilizando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo API4000 (AB Sciex Framingham, MA).

Los resultados se presentan a continuación en la tabla 2. Los compuestos con una actividad designada como "A" proporcionaron una  $IC_{50} < 10\mu M$ ; los compuestos con una actividad designada como "B" proporcionaron una

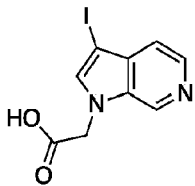
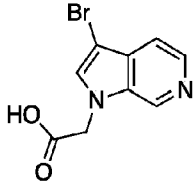
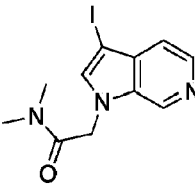
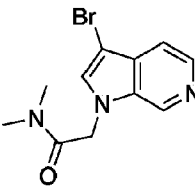
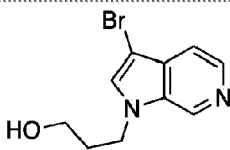
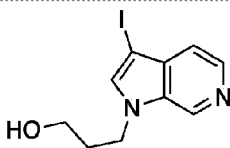
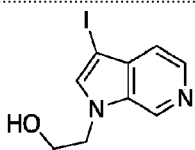
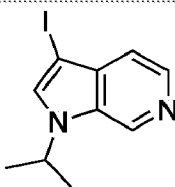
IC<sub>50</sub> 10-30µM; los compuestos con una actividad designada como "C" proporcionaron una IC<sub>50</sub> 30,01-50µM; los compuestos con una actividad designada como "D" proporcionaron una IC<sub>50</sub> > 50µM; ND: no determinado. **Tabla 2.**

Ejemplo	Estructura	SARM1 IC <sub>50</sub>
1		ND
2		C
3		D
4		A
5		B
6		A
7		A
8		ND
9		A
10		D

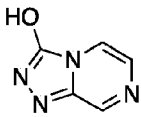
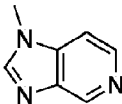
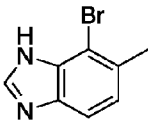
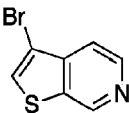

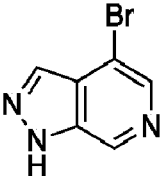
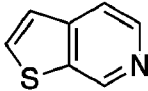
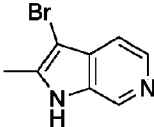
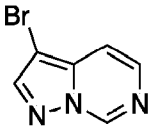
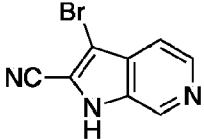
(continuación)

Ejemplo	Estructura	SARM1 IC <sub>50</sub>
11		D
12		C
13		C
14		A
15		A
16		A
17		ND
18		ND

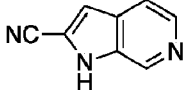
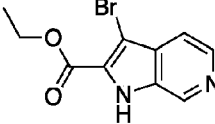
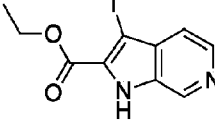
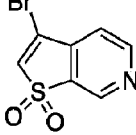
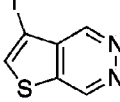
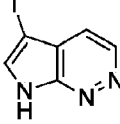
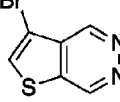
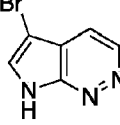
(continuación)

Ejemplo	Estructura	SARM1 IC <sub>50</sub>
19		ND
20		ND
21		ND
22		ND
23		ND
24		ND
25		ND
26		ND

(continuación)

Ejemplo	Estructura	SARM1 IC <sub>50</sub>
27		D
28		A
29		C
30		A
31		B
32		A
33		A
34		ND
35		ND
36		ND

(continuación)

Ejemplo	Estructura	SARM1 IC <sub>50</sub>
37		D
38		D
39		B
40		C
41		A
42		D
43		A
44		D

**Ejemplo 9: Índice de degeneración axonal**

Este ejemplo ilustra un ensayo de degeneración axonal *in vitro* utilizado para caracterizar compuestos de fórmula I. Este ensayo se utiliza para probar la eficacia de los compuestos de fórmula I para prevenir la degeneración axonal en un cultivo de gotas de ganglio de la raíz dorsal (DRG) de ratón.

Cultivo de gotas de DRG de ratón: Las neuronas ganglionares de la raíz dorsal (DRG) de ratón se diseccionaron de ratones E12.5 CD1 (50 ganglios por embrión) y se incubaron con una solución de tripsina al 0,5 % que contenía un 0,02 % de EDTA (Gibco) a 37 °C, durante 15 minutos. A continuación, las células se trituraron mediante pipeteo suave y se lavaron 3 veces con medio de crecimiento DRG (medio Neurobasal (Gibco) que contenía un 2 % de B27 (Invitrogen), 100 ng/ml de 2,5S NGF (Harland Bioproducts), 1 mM de 5-fluoro-2'-desoxiuridina (Sigma), penicilina y estreptomycin). Las células se suspendieron en el medio de crecimiento DRG. Los cultivos de gotas de DRG se crearon colocando 5000 células/pocillo en el centro de cada pocillo de una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos recubierta con poli-D-lisina (0,1 mg/ml; Sigma) y laminina (3 mg/ml; Invitrogen). Se dejó que las



células se adhirieran a las placas en un incubador de cultivo de tejidos humidificado (5 % de CO<sub>2</sub>) durante 15 minutos y, a continuación, se agregó suavemente el medio de crecimiento DRG (100 ml de pocillo).

Ensayo de degeneración de axones: La degeneración axonal se estimuló mediante la transección axonal manual con una hoja de bisturí o mediante estímulos quimiotóxicos. Tras un periodo de tiempo experimental adecuado, los cultivos de DRG se fijaron en PFA al 1 % más sacarosa y se conservaron en el frigorífico antes de la obtención de imágenes. Las imágenes de campo claro de los axones y cuerpos celulares del DRG se recogieron utilizando el objetivo de inmersión en agua 20x de un microscopio confocal automatizado Phenix (PerkinElmer) y la cuantificación de los axones se realizó utilizando secuencias de comandos desarrolladas internamente (Acapella, PerkinElmer).

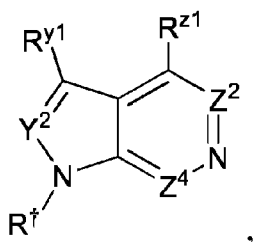
- 5
- 10 Los resultados se presentan a continuación en la tabla 3. Los compuestos descritos en la presente memoria demuestran la protección de la fragmentación del axón en un ensayo celular y están clasificados por IC<sub>50</sub> 10-30µM (B), <10µM (A).

**Tabla 3.**

Ejemplo	Degeneración del axón IC <sub>50</sub>
4	A
7	A
30	B

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que

5 Y<sup>2</sup> se selecciona entre N y C-R<sup>y2</sup>;

Z<sup>2</sup> se selecciona entre N y C-R<sup>z2</sup>;

Z<sup>4</sup> se selecciona entre N y C-R<sup>z4</sup>;

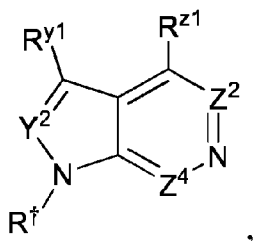
R<sup>t</sup> se selecciona independientemente entre hidrógeno y alifático C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con -OR, -C(O)N(R)<sub>2</sub>, o -C(O)OR;

10 R<sup>y1</sup>, R<sup>y2</sup>, R<sup>z2</sup>, R<sup>z1</sup> y R<sup>z4</sup> se seleccionan independientemente entre hidrógeno, halógeno, -CN, -OR, -C(O)OR, y alifático C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con halógeno, -CN, -OR, -N(R)<sub>2</sub>, -C(O)OR, o -C(O)N(R)<sub>2</sub>; y

15 cada R se selecciona independientemente entre hidrógeno y alifático C<sub>1-6</sub>, o dos casos de R, junto con el átomo al que están unidos, forman un anillo heterocíclico saturado o parcialmente insaturado de 3 a 6 miembros,

para su uso en el tratamiento o la prevención de la degeneración axonal.

2. Un compuesto de la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que

20 Y<sup>2</sup> se selecciona entre N y C-R<sup>y2</sup>;

Z<sup>2</sup> se selecciona entre N y C-R<sup>z2</sup>;

Z<sup>4</sup> se selecciona entre N y C-R<sup>z4</sup>;

R<sup>t</sup> se selecciona independientemente entre hidrógeno y alifático C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con -OR, -C(O)N(R)<sub>2</sub>, o -C(O)OR;

25 R<sup>y1</sup>, R<sup>y2</sup>, R<sup>z2</sup>, R<sup>z1</sup> y R<sup>z4</sup> se seleccionan independientemente entre hidrógeno, halógeno, -CN, -OR, -C(O)OR, y alifático C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con halógeno, -CN, -OR, -N(R)<sub>2</sub>, -C(O)OR, o -C(O)N(R)<sub>2</sub>; y

30 cada R se selecciona independientemente entre hidrógeno y alifático C<sub>1-6</sub>, o dos casos de R, junto con el átomo al que están unidos, forman un anillo heterocíclico saturado o parcialmente insaturado de 3 a 6 miembros,

para su uso en el tratamiento de una afección seleccionada entre neuropatía periférica inducida por quimioterapia, neuropatía diabética, neuropatía por HIV, enfermedad de Charcot Marie Tooth y esclerosis lateral amiotrófica.

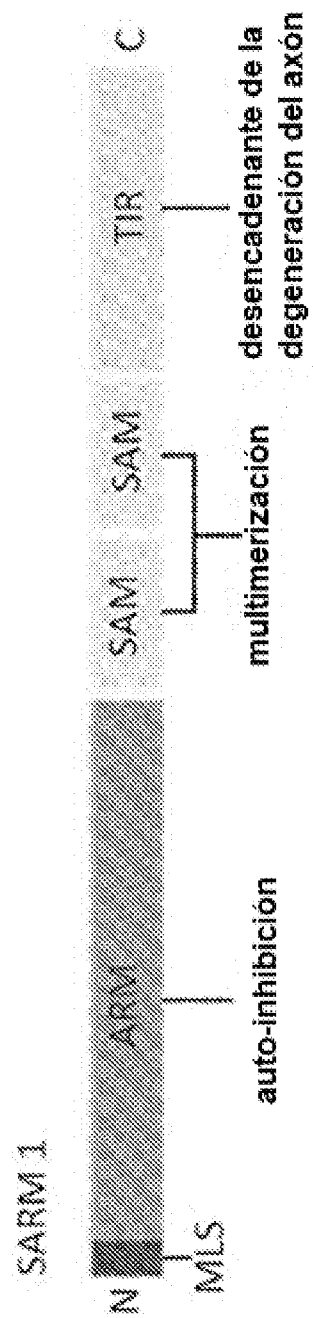


FIG. 1

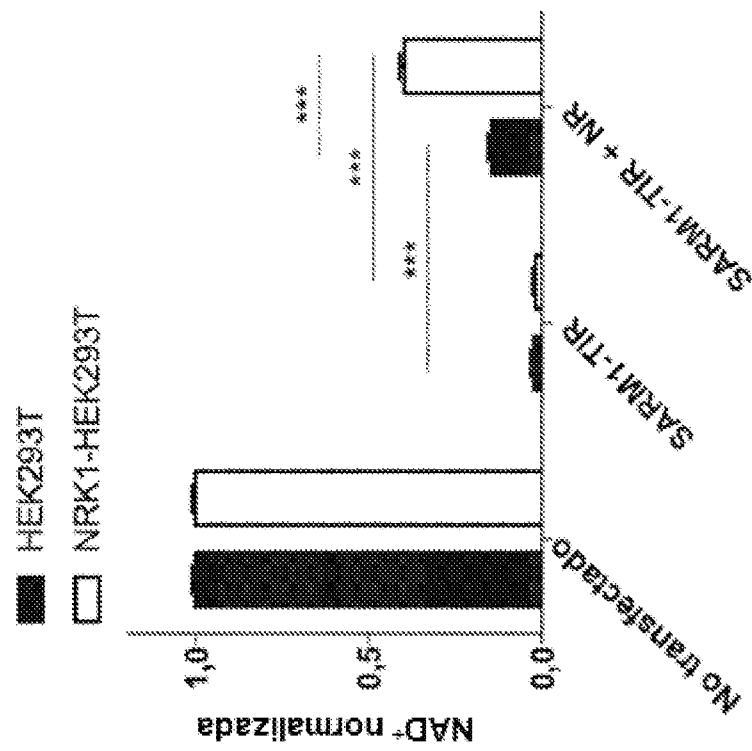


FIG. 2