



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 337 255**

51 Int. Cl.:
A61K 31/437 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04767477 .5**
96 Fecha de presentación : **25.06.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1638559**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.03.2006**

54 Título: **Uso de pirazolopiridinas para el tratamiento de déficit cognitivos.**

30 Prioridad: **27.06.2003 FR 03 07824**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.04.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.04.2010

73 Titular/es: **Exonhit Therapeutics S.A.**
63-65, boulevard Masséna
75013 Paris, FR

72 Inventor/es: **Schweighoffer, Fabien;**
Desire, Laurent;
Resink, Annelies y
Rouquette, Magali

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 337 255 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

Uso de pirazolopiridinas para el tratamiento de déficit cognitivos.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la biología, la genética y la medicina. Se refiere especialmente a nuevas composiciones y procedimientos para el tratamiento de patologías neurodegenerativas y especialmente para mejorar, aumentar o facilitar la cognición de sujetos aquejados de patologías neurodegenerativas. La invención se basa más particularmente en el uso de compuestos de la familia de las pirazolopiridinas para mejorar las facultades cognitivas de sujetos aquejados de enfermedades neurodegenerativas. La invención es utilizable para la mejora de la condición de sujetos aquejados de diversas patologías neurodegenerativas, y muy particularmente de la enfermedad de Alzheimer o de la demencia vascular.

15 Antecedentes de la invención

Se han descrito numerosas patologías neurodegenerativas que tienen un componente o un estado ligado al fenómeno de apoptosis o muerte celular programada. Se pueden citar tanto las patologías neurodegenerativas del sistema nervioso central (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica, ELA, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer o demencia vascular), como las enfermedades degenerativas periféricas, especialmente oculares. Estas patologías disponen principalmente de tratamientos sintomáticos, especialmente de tratamientos de los fenómenos inflamatorios asociados, pero pocos tratamientos de las causas reales de estos trastornos, debido especialmente a la complejidad de los mecanismos y rutas metabólicas implicados y de la diversidad de los factores causantes.

La solicitud internacional de patente n° WO 03/016563, presentada por la solicitante, describe nuevas dianas moleculares de neurotoxicidad así como nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento de patologías neurodegenerativas. Estos enfoques están basados en una modulación de la actividad o la expresión de una fosfodiesterasa de tipo 4.

La solicitud internacional n° PCT/FR04/00366, presentada por la solicitante, propone nuevos enfoques de tratamiento de patologías degenerativas oculares basados en una modulación de la actividad o de la expresión de una fosfodiesterasa de tipo 4.

Las solicitudes WO 01/78709, WO 01/81348, WO 01/81345 y WO 03/045949 se refieren al uso de pirazolopiridinas en el tratamiento de ciertos eventos asociados a patologías neurológicas, tales como la formación de agregados peptídicos (documento WO 01/78709), la fosforilación de la proteína TAÚ (WO 01/81348) o el bloqueo de la enzima GSK-3 (documentos WO 01/81345 y WO 03/045949).

La solicitud WO 02/098878 describe el uso de trifluorometilpurinas como inhibidores de la PDE4 para el tratamiento de problemas cognitivos.

40 Sumario de la invención

La presente solicitud se refiere ahora a nuevas estrategias terapéuticas de enfermedades en las que la percepción cognitiva está alterada, como se observa especialmente en la enfermedad de Alzheimer. Estas estrategias están basadas en la modulación de una o varias rutas metabólicas identificadas por los inventores, que están correlacionadas con la aparición, el desarrollo y la progresión de excitotoxicidad y apoptosis en células nerviosas, y son particularmente pertinentes en enfermedades neurodegenerativas y en la función cognitiva.

La presente solicitud deriva más particularmente de la manifestación de las propiedades ventajosas y notables del etazolato para el tratamiento de déficit cognitivos, especialmente aquellos inducidos por la enfermedad de Alzheimer. La presente solicitud propone así nuevas estrategias terapéuticas destinadas a tratar o reducir los problemas cognitivos, en particular en pacientes aquejados de enfermedades neurodegenerativas.

La presente invención se refiere por lo tanto al uso del etazolato o de una sal o éster del mismo para la preparación de una composición farmacéutica dirigida a mejorar la percepción cognitiva en un paciente humano.

La presente invención se refiere también a una composición que comprende etazolato o una sal o éster del mismo para uso para mejorar la percepción cognitiva en un paciente humano.

Sin querer quedar ligado por un mecanismo de acción, parece que la acción benéfica inesperada y ventajosa de los compuestos según la invención sobre los trastornos cognitivos puede explicarse por un doble impacto al nivel del receptor GABA(A) y de la mitocondria. Efectivamente, la presente invención describe la identificación en el cerebro de sujetos patológicos de tres eventos moleculares originales caracterizados por una alteración de la expresión del ARNm de PDE4, de AKAP1 y de GABA(A)RAPL1. Estos eventos están correlacionados en el tiempo con el fenómeno de excitotoxicidad y/o de muerte neuronal, y demuestran la existencia de alteraciones de la señalización de GABA con relación a problemas cognitivos. Así, especialmente, la presente invención revela la existencia de alteraciones del corte y empalme del ARNm que codifica la subunidad épsilon del receptor GABA(A) entre los ARNm extraídos de la corteza prefrontal de pacientes aquejados de enfermedad de Alzheimer por un lado y los ARNm extraídos de la

misma región del cerebro de individuos de control que tienen la misma edad por otro lado. Este descubrimiento es particularmente interesante, ya que esta proteína está implicada en la presentación y la desensibilización del receptor GABA(A) y que el envejecimiento y los procesos ligados a la edad están asociados a un aumento de la duración necesaria para la desensibilización de este receptor GABA(A). Estos procesos, y especialmente los déficit cognitivos, podrían compensarse por lo tanto por los compuestos según la invención, que presentan una acción al nivel de la ruta GABA y de las mitocondrias.

La presente invención aporta por lo tanto elementos nuevos y esenciales para la elección del receptor GABA (A) como diana terapéutica para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, y más generalmente de trastornos cognitivos, y permite así dar cuenta de los efectos biológicos y terapéuticos observados en el uso de los compuestos de la familia de las pirazolopiridinas en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer y la demencia vascular, y más particularmente para tratar trastornos cognitivos. Los resultados presentados en los ejemplos ilustran especialmente la eficacia de dichos compuestos para mejorar las capacidades de memorización de los animales en una situación de aversión.

Descripción detallada de la invención

La excitotoxicidad y la apoptosis son las dos causas principales de muerte neuronal. Las múltiples rutas de la apoptosis surgen de la mitocondria, y uno de los puntos cruciales para la aparición de la apoptosis es, por ejemplo, la apertura del poro mitocondrial de transición (MPTP). La sobreproducción de radicales libres (ROS) debida a la disfunción de la mitocondria desequilibra la regulación de la apoptosis e induce así un aumento de la vulnerabilidad de las neuronas a la excitotoxicidad.

Estos dos fenómenos, la sobreproducción de radicales libres y la excitotoxicidad, están implicados en el mecanismo patológico que conlleva la muerte neuronal debida a la edad y enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer y la ELA. Efectivamente, se ha demostrado que los radicales libres son al menos en parte responsables de las deficiencias de los cerebros envejecidos. El estrés oxidativo se ha implicado en la progresión de la enfermedad de Alzheimer, la demencia vascular, la enfermedad de Parkinson y la ELA. El estrés oxidativo es el resultado de una desregulación de la homeostasis entre los prooxidantes y los antioxidantes, que conduce a la generación de radicales libres tóxicos.

Los inventores han establecido un repertorio de alteraciones del corte y empalme de ARN en el cerebro de animales modelo de ELA de 60 días de edad, que se ha realizado mediante cribado diferencial cualitativo según la técnica DATAS (descrita en la solicitud n° WO 99/46403). Este repertorio se ha construido a partir de ARN extraídos de muestras de cerebro y de médula espinal, sin aislamiento previo de neuronas, con el fin de tener en cuenta el máximo de eventos de corte y empalme alternativos ligados al desarrollo de la patología. El repertorio así producido contiene más de 200 secuencias distintas, que implican a los actores clave del fenómeno de excitotoxicidad, tales como los canales potásicos y el receptor de NMDA. La especificidad de las secuencias que constituyen este repertorio está atestiguada por el hecho de que el mismo análisis diferencial cualitativo de la expresión genética realizado en animales de 90 días de edad desemboca en un repertorio diferente, del que están ausentes especialmente los diferentes marcadores de excitotoxicidad. El análisis de las modificaciones de corte y empalme confirma que los eventos moleculares son diferentes según el estado de la patología.

De manera particularmente interesante e inesperada, la realización de DATAS sobre ARN de animales de control y transgénicos de 60 días de edad ha permitido aislar un fragmento de ADNc derivado del ARNm de la fosfodiesterasa 4B, de la proteína AKAP1 (“una proteína de anclaje de cinasa”) y de la proteína GABA(A)RAPL1 (“proteína asociada al receptor GABA(A) de tipo 1”).

La proteína PDE4B, capaz de hidrolizar AMPc, está implicada en la regulación de la concentración intracelular de AMPc. La proteína AKAP1 ancla la subunidad reguladora de la proteína cinasa A (activada por AMPc) a la membrana mitocondrial y regula la actividad del poro de transición mitocondrial. Los resultados obtenidos muestran una expresión más pronunciada de PDE4B en los tejidos nerviosos patológicos, ligada a una modificación estructural del ARN correspondiente, especialmente a una delección de una región en la parte 3' no codificante. Este resultado es totalmente compatible con la presencia de secuencias de desestabilización de los ARNm en la secuencia identificada por DATAS. La delección de estas secuencias de desestabilización del ARNm de PDE4B por corte y empalme o por el uso de secuencias de poliadenilación alternativas puede desembocar en una estabilización, por lo tanto en un aumento de la expresión, de la parte codificante de este ARN. Este evento se produce específicamente en el cerebro de sujetos patológicos y no en los sujetos de control.

La identificación de un fragmento derivado de AKAP1 demuestra por otra parte la implicación de esta proteína en el desarrollo de procesos de excitotoxicidad y de muerte neuronal. La AKAP1 interacciona con la subunidad reguladora de la proteína cinasa A y con el receptor periférico de benzodiazepinas (PBR), que participa en la regulación de la apertura del poro mitocondrial de transición, apertura que caracteriza la ejecución de la apoptosis. En consecuencia, la invención sugiere que la AKAP1 regula la intervención del PBR en los fenómenos de muerte celular tales como la muerte neuronal.

La identificación de un fragmento derivado de GABA(A)RAPL1 destaca la desregulación de la señalización dependiente del receptor GABA(A). Esta observación es totalmente compatible con la importancia del neurotransmisor

como inhibidor de la transmisión sináptica, especialmente por su interacción con el receptor GABA(A). Esta inhibición permite proteger a las neuronas contra una excitación mantenida que podría conducir a la muerte neuronal por excitotoxicidad. Estos trabajos indican por lo tanto una alteración de este nivel de regulación, implicados en la presentación y desensibilización del receptor GABA(A).

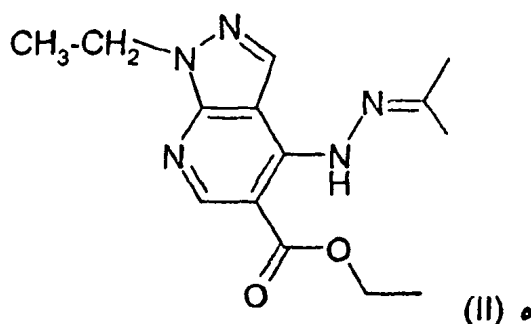
Más particularmente, el descubrimiento reseñado en la presente invención ilustra la existencia de alteraciones de la señalización de GABA con relación a problemas cognitivos. La presente invención revela también la existencia de alteraciones del corte y empalme del ARNm que codifica la subunidad épsilon del receptor GABA(A) entre los ARNm extraídos de la corteza prefrontal de pacientes aquejados de enfermedad de Alzheimer por un lado y de ARNm extraídos de la misma región del cerebro de individuos de control que tienen la misma edad por otro lado. No se había reseñado nunca ninguna anomalía de esta subunidad hasta ahora en la patología humana.

La presente invención permite por lo tanto proponer nuevas estrategias terapéuticas de los trastornos de la función cognitiva basadas en una modulación de estas rutas metabólicas, que se correlacionan con la aparición, el desarrollo y la progresión de la excitotoxicidad y de la apoptosis en células nerviosas, y son particularmente pertinentes en las enfermedades neurodegenerativas.

La presente solicitud documenta las propiedades ventajosas y notables de los compuestos de la familia de las pirazolopiridinas, como etazolato, para el tratamiento de déficit cognitivos, especialmente aquellos inducidos por la enfermedad de Alzheimer y la demencia vascular.

En el contexto de la invención, el término "tratamiento" designa el tratamiento preventivo, curativo, paliativo, así como hacerse cargo de los pacientes (reducción del sufrimiento, mejora del tiempo de vida, ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora de la supervivencia de las neuronas, protección de las neuronas contra la excitotoxicidad o la apoptosis, etc.), etc. El tratamiento puede realizarse además en combinación con otros agentes o tratamientos, especialmente dirigidos a los eventos tardíos de la patología, tales como inhibidores de caspasas u otros compuestos activos.

La invención está particularmente adaptada al tratamiento de déficit cognitivos en los sujetos, es decir, a la reducción de estos efectos y/o a la mejora de la percepción cognitiva en los pacientes. El etazolato responde a la fórmula (II) siguiente:



Los compuestos pueden estar en forma de sal, éster, racemato, isómero activo, etc. La capacidad de los compuestos para proteger las células de radicales libres puede verificarse *in vitro*.

La presente invención propone así, por primera vez, una intervención terapéutica que liga una modulación de los radicales libres y una modulación del receptor GABA(A) como diana terapéutica para el tratamiento de déficit cognitivos asociados a las enfermedades neurodegenerativas. Según los modos de ejecución particulares, la invención puede utilizarse para tratar los déficit cognitivos en fase precoz de estas enfermedades. Es aplicable especialmente en el caso de enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, corea de Huntington y enfermedad de Parkinson.

El compuesto utilizado en el marco de la presente invención puede formularse y administrarse de formas diferentes. La administración puede realizarse mediante cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia, preferiblemente por vía oral o por inyección, sistémica o local. La invención se realiza típicamente por vía intraocular, intraperitoneal, intracerebral, intravenosa, intraarterial, subcutánea o intramuscular. Se prefiere la administración por vía oral o sistémica. Las dosis administradas pueden adaptarse por el experto en la técnica. Típicamente, se inyectan aproximadamente de 0,01 mg a 100 mg/kg para compuestos de naturaleza química. Son dosificaciones unitarias particulares, por ejemplo, de 0,5 a 40 mg por dosis administrada. Se entiende que pueden realizarse inyecciones repetidas, eventualmente en combinación con otros agentes activos y cualquier vehículo aceptable en el plano farmacéutico (ej.: tampones, soluciones salinas, isotónicas, en presencia de agentes estabilizadores, etc.).

El vehículo o excipiente aceptable en el plano farmacéutico puede elegirse entre los solutos tampones, disolventes, ligantes, estabilizadores, emulsionantes, etc. Son solutos tampones o diluyentes son especialmente fosfato de calcio, sulfato de calcio, lactosa, celulosa, caolín, manitol, cloruro de sodio, almidón, azúcar en polvo e hidroxipropilmetil-

ES 2 337 255 T3

celulosa (HPMC) (para liberación retardada). Son ligantes, por ejemplo, almidón, gelatina y solutos de relleno como sacarosa, glucosa, dextrosa, lactosa, etc. Pueden utilizarse también gomas naturales o sintéticas, como especialmente alginato, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, etc. Son otros excipientes, por ejemplo, celulosa y estearato de magnesio. Pueden incorporarse a las formulaciones agentes estabilizadores como, por ejemplo, polisacáridos (goma arábiga, agar, ácido algínico, goma guar y tragacanto, quitina o sus derivados y éteres de celulosa). Son disolventes o solutos, por ejemplo, la solución de Ringer, agua, agua destilada, tampones fosfato, soluciones salinas fosfatadas y otros fluidos convencionales.

La invención es utilizable en mamíferos, especialmente en el ser humano. Los resultados presentados en los ejemplos ilustran la eficacia del etazolato para mejorar la viabilidad de neuronas dispuestas en condiciones de excitotoxicidad, de estrés oxidativo o de isquemia cerebral, y para mejorar las capacidades de memorización de animales en una situación de aversión.

Aparecerán otros aspectos y ventajas de la presente invención con la lectura de los ejemplos siguientes.

Leyenda de las figuras

Figura 1: Efecto neuroprotector del etazolato sobre la toxicidad inducida por NMDA/serina sobre células granulares del cerebelo.

Figura 2: Efecto neuroprotector del etazolato sobre la toxicidad inducida por cainato sobre células granulares del cerebelo.

Figura 3: Efecto neuroprotector del etazolato sobre la toxicidad inducida por NMDA/serina sobre neuronas corticales.

Figura 4: Efecto neuroprotector del etazolato sobre la toxicidad inducida por cainato sobre neuronas corticales.

Figura 5: Efecto neuroprotector del etazolato sobre la toxicidad inducida por NMDA/serina sobre células de la médula espinal ventral.

Figura 6: Efecto neuroprotector del etazolato sobre la toxicidad inducida por cainato sobre células de la médula espinal ventral.

Figura 7: Efecto protector del etazolato en el modelo de infarto cerebral en rata.

Ejemplos

Ejemplo 1

Identificación de PDE4, AKAP1 y GABA(A)RAPLI como dianas moleculares de la excitotoxicidad

Se ha efectuado el análisis cualitativo diferencial a partir de ARN poliadenilados (poli A+) extraídos de muestras de cerebros de animales correspondientes a diferentes estados, sin aislamiento previo de neuronas con el fin de tener en cuenta el máximo de eventos de corte y empalme alternativos ligados al desarrollo de la patología.

Los ARN poli A+ se preparan según técnicas conocidas por el experto en la materia. Puede tratarse en particular de un tratamiento mediante agentes caotrópicos tales como tiocianato de guanidinio seguido de la extracción de ARN totales mediante disolventes (fenol, cloroformo, por ejemplo). Dichos procedimientos son bien conocidos por el experto en la materia (véase Maniatis *et al.*, Chomczynski *et al.*, *Anal. Biochem.* 162 (1987), 156), y pueden practicarse fácilmente utilizando kits disponibles comercialmente. A partir de estos ARN totales, se preparan ARN poli A+ según procedimientos clásicos conocidos por el experto en la materia y propuestos por kits comerciales.

Estos ARN poli A+ sirven de matriz a reacciones de transcripción inversa con la ayuda de transcriptasa inversa. Ventajosamente, se utilizan transcriptasas inversas desprovistas de actividad ARNasa H que permiten obtener las primeras cadenas de ADN complementario de tamaños superiores a los obtenidos con las transcriptasas inversas clásicas. Dichas preparaciones de transcriptasas inversas sin actividad ARNasa H están disponibles comercialmente.

Para cada punto de la cinética de desarrollo de la patología (30 días, 60 días y 90 días), se preparan los ARN poli A+ así como los ADNc monocatenarios a partir de animales transgénicos (T) y animales de control singénicos (C).

Según la técnica DATAS, por cada punto de la cinética se realizan hibridaciones de ARNm (C) con ADNc (T) e hibridaciones recíprocas de ARNm (T) con ADNc (C).

Estos heterodúplex de ARNm/ADNc se purifican a continuación según los protocolos de la técnica DATAS.

Se liberan de estos heterodúplex las secuencias de ARN no apareadas con un ADN complementario bajo la acción de ARNasa H, degradando esta enzima las secuencias de ARN apareadas. Estas secuencias no apareadas represen-

ES 2 337 255 T3

tan las diferencias cualitativas que existen entre ARN por lo demás homólogos entre sí. Estas diferencias cualitativas pueden localizarse en cualquier lugar de la secuencia de los ARN, tanto en 5', 3' como al interior de la secuencia, y especialmente en la secuencia codificante. Según su localización, estas secuencias pueden no ser solamente modificaciones de corte y empalme, sino igualmente consecuencia de translocaciones o deleciones.

5

Las secuencias de ARN que representan las diferencias cualitativas se clonan a continuación según técnicas conocidas por el experto en la materia y especialmente las descritas en la patente de la técnica DATAS.

Se reagrupan estas secuencias dentro de bancos de ADNc que constituyen bancos cualitativos diferenciales. Uno de estos bancos contiene los exones e intrones específicos de la situación sana; los otros bancos contienen eventos de corte y empalme característicos de las condiciones patológicas.

Se ha verificado la expresión diferencial de clones mediante hibridación con sondas obtenidas mediante transcripción inversa a partir de ARN mensajeros extraídos de las diferentes situaciones estudiadas. Los clones que hibridan de forma diferencial se han retenido para análisis posterior. Las secuencias identificadas por DATAS corresponden a intrones y/o a exones expresados de forma diferencial por corte y empalme entre las situaciones patológicas y la situación sana. Estos eventos de corte y empalme pueden ser específicos de una etapa dada de desarrollo de la patología o característicos del estado sano.

La comparación de estas secuencias con los bancos de datos permite clasificar las informaciones obtenidas y proponer una selección razonada de secuencias según su interés de diagnóstico o terapéutico.

La realización de DATAS sobre ARN de animales de control y transgénicos de 60 días de edad ha permitido aislar un fragmento de ADNc derivado de ARNm de fosfodiesterasa 4B. Este fragmento corresponde a un fragmento de exón presente específicamente en los animales de control y por lo tanto eliminado específicamente en los animales transgénicos para SOD1 G93A en el estado de 60 días. Este fragmento cubre los nucleótidos 377 a 486 referidos a partir del codón de detención de la PDE4B de ratón (secuencia accesible en GenBank nº AF208023). Esta secuencia comprende 2912 bases, correspondiendo el fragmento eliminado a las bases 2760 a 2869. Esta región es no codificante y se expresa diferencialmente entre los animales de control y los animales transgénicos debido al uso alternativo de un exón 3' no codificante o debido al uso de dos sitios de poliadenilación alternativos.

La realización de DATAS sobre ARN de animales de control y transgénicos de 60 días de edad ha permitido igualmente aislar un fragmento de ADNc derivado de ARNm de AKAP1. Este fragmento corresponde a un fragmento de exón presente específicamente en animales de control y por lo tanto eliminado específicamente en los animales transgénicos para SOD1 G93A en el estado de 60 días. Este fragmento es homólogo de los nucleótidos 1794 a 2322 de la secuencia referida en GenBank con el número NM_009648. Esta región es codificante y se expresa diferencialmente entre los animales de control y los animales transgénicos, debido a un corte y empalme alternativo.

La realización de DATAS sobre ARN de animales de control y transgénicos de 60 días de edad ha permitido igualmente aislar un fragmento de ADNc derivado de ARNm de GABA(A)RAPL1. Este fragmento corresponde a un fragmento de exón presente específicamente en animales de control y por lo tanto eliminado específicamente en animales transgénicos para SOD1 G93A en el estado de 60 días. Este fragmento es homólogo de los nucleótidos 1055 a 1461 de la secuencia referida en GenBank con el nº BC024706. Esta región deriva de la región 3' no codificante y se expresa diferencialmente entre los animales de control y los animales transgénicos. Estos elementos permiten aclarar y definir las vías de señalización importantes, y muestran que la señalización dependiente de GABA(A)R parece alterada en el cerebro de pacientes aquejados de enfermedad de Alzheimer. Efectivamente, el análisis por cribado diferencial cualitativo según la técnica DATAS de ARNm extraídos de la corteza prefrontal de pacientes aquejados de enfermedad de Alzheimer por una parte y ARN extraídos de la misma región del cerebro de individuos de control que tienen la misma edad, ha evidenciado alteraciones del corte y empalme del ARNm que codifica la proteína GABA(A)RAP (proteína asociada al receptor GABA(A)). Esta alteración revela la retención de 135 bases de una secuencia intrónica al nivel de la base 273 de la secuencia catalogada en GenBank con el número NM_007278.1. Esta retención modifica la fase abierta y por lo tanto la funcionalidad de la proteína GABA(A)RAP. Al estar implicada esta proteína en la presentación y desensibilización del receptor GABA(A), el análisis DATAS revela una alteración a este nivel de la regulación de las actividades sinápticas.

55

La señalización de GABA representa uno de los mecanismos más potentes de regulación negativa de la actividad sináptica. En la estimulación de este receptor GABA(A) por el neurotransmisor GABA, este receptor que es un canal iónico permite la entrada de iones de cloro que participan en la repolarización de las neuronas. El receptor GABA(A) presenta una estructura pentamérica formada por la asociación de 2 subunidades alfa, dos subunidades beta y una subunidad accesoria, delta, épsilon o gamma principalmente.

60

Los agonistas del receptor GABA(A) son ansiolíticos pero amnesiantes.

Los antagonistas del receptor GABA(A) son ansiogénicos, proconvulsionantes y promnesiantes.

65

Además, es conocido que, en el cerebro de pacientes aquejados de enfermedad de Alzheimer, una de las subunidades del receptor GABA(A), la subunidad beta3, está subexpresada.

ES 2 337 255 T3

La subunidad épsilon, presente en el hipocampo y que es una de las primeras estructuras cerebrales que se alteran en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, confiere propiedades farmacológicas originales al receptor GABA (A). Efectivamente, el enlace mediante las subunidades beta a los receptores GABA(A) que contienen una subunidad épsilon de agentes farmacológicos como pirazolopiridinas, tales como tracazolato y etazolato, acelera la desensibilización del receptor GABA(A) después de la interacción con el neurotransmisor GABA. Este efecto es particularmente interesante, puesto que el envejecimiento está asociado a un aumento de la duración necesaria para la desensibilización del receptor GABA(A).

Una alteración de la subunidad épsilon, como la descrita en la presente invención, asociada al alargamiento del periodo necesario para la desensibilización de los receptores GABA(A) en los procesos ligados a la edad como la enfermedad de Alzheimer, puede compensarse por lo tanto mediante el tratamiento de pacientes con agentes farmacológicos como pirazolopiridinas, tales como tracazolato y etazolato. Éste último compuesto presenta igualmente la ventaja de ser un inhibidor de PDE4, de la que la invención muestra su implicación en fenómenos de excitotoxicidad.

La posibilidad de afectar a esta vía de señalización puede conducir a tratamientos particularmente eficaces de patologías neurodegenerativas, especialmente de enfermedades degenerativas asociadas a una alteración de las funciones cognitivas como la enfermedad de Alzheimer y la demencia vascular.

Ejemplo 2

Inhibición de la excitotoxicidad

En este ejemplo, se han cultivado neuronas granulares del cerebelo, neuronas corticales, así como células de médula espinal ventral de rata según las técnicas descritas a continuación.

Cultivo primario de células granulares de cerebelo

Se decapitan ratas Wistar de 7 días de edad y se diseccionan sus cerebelos. Después de retirar las meninges, se corta el tejido en pequeños trozos y se tripsiniza durante 15 minutos a 37°C. Se disocian las células mediante trituración y se ponen en cultivo a una densidad de 300.000 células por cm² en un medio basal Eagle suplementado con 10% de suero fetal de ternero y glutamina 2 mM. Al día siguiente, se añade ARA-C 10 µM, un antimetabólico, para impedir la proliferación de células gliales. Se tratan las células durante 9 días después de poner en cultivo con el compuesto inhibidor etazolato, antes de la adición de los tóxicos cainato 50 µM o *N*-metil-D-aspartato 100 µM en presencia de D-serina 10 µM. Se añade 8-bromo-AMPC justo antes de los tóxicos. Se efectúan todos los tratamientos como mínimo por duplicado y en al menos dos cultivos diferentes. Después de una incubación de 6 horas, se mide la toxicidad mediante un ensayo MTT. Se analizan estadísticamente los resultados, normalizados a la media de no tratado, mediante el test de Wilcoxon. Se determina el valor significativo a *p* inferior o igual a 0,05.

Cultivos primarios de células corticales

Se extraen embriones de rata Wistar de 16 días de edad y se diseccionan las cortezas. Después de tripsinización a 37°C durante 25 minutos, se disocian las células mediante trituración. Se siembran las células en medio esencial mínimo, suplementado con 10% de suero de caballo y 10 de suero fetal de ternero y glutamina 2 mM, a una densidad de 300.00 células por cm². Después de 4 días de cultivo, se cambia la mitad del medio por medio esencial mínimo suplementado con 5% de suero de caballo y glutamina 2 mM. El mismo día, se añade 5-fluoro-2-desoxiuridina 10 µM, un antimetabólico. Después de 7 y 11 días de cultivo, se cambia la mitad del medio por medio acondicionado. El medio acondicionado está compuesto por MEM que contiene 5% de suero de caballo y glutamina 2 mM; este medio se pasa sobre un césped de astrocitos corticales durante una noche antes de su uso. El día 14, se tratan las células con el compuesto inhibidor etazolato, antes de la adición de los tóxicos cainato 50 µM o *N*-metil-D-aspartato 20 µM en presencia de serina 10 µM. Se efectúan todos los tratamientos como mínimo por duplicado y en al menos dos cultivos diferentes. Después de una incubación de 6 horas, se mide la toxicidad mediante un ensayo MTT. Se analizan estadísticamente los resultados, normalizados a la media de no tratado, mediante el test de Wilcoxon. Se determina el valor significativo a *p* inferior o igual a 0,05.

Cultivos primarios de células de médula espinal ventral

Se aíslan las células a partir de embriones de rata Wistar de 14 días de edad. A su llegada, se sacrifican las ratas gestantes con dióxido de carbono. Se extrae la sarta de embriones y se pone en una placa que contiene PBS. Se disecciona la médula espinal de cada embrión y se separa el cordón ventral de los cordones dorsales. Se tripsinizan a continuación los cordones ventrales a 37°C durante 20 min. Se detiene el efecto de la tripsina mediante la adición de un medio compuesto por medio Leibovitz 15, 20% de suero de caballo, suplemento N2 (1x), 20% de glucosa (3,2 mg/ml), 7,5% de bicarbonato (1,8 mg/ml) y L-glutamina (2 mM). Se disocian las células por trituración. Se retiran las masas tisulares y se cuantifican a continuación las células disociadas mediante coloración con azul de tripano. Se siembran las células a una densidad de 250.00 células/cm² en un medio compuesto por medio neurobasal, suero de caballo (al 2%), suplemento B27 (1x) y glutamina (2 mM). Después de 3 días de cultivo *in vitro*, se añade un agente antimetabólico, ARA-C (5 µM), a las células con el fin de inhibir la producción de células gliales. Se ponen en cultivo las células a 37°C en un incubador humidificado (5% de CO₂) durante 9 días. Después de 9 días de cultivo, se tratan las células con

ES 2 337 255 T3

el compuesto inhibidor etazolato antes de la adición de *N*-metil-D-aspartato (NMDA) 25 μ M en presencia de D-serina 10 μ M. Se efectúan todos los tratamientos como mínimo por duplicado y en al menos dos cultivos diferentes. Después de 3 horas de incubación con NDMA/D-serina como tóxicos, se revela la toxicidad mediante el ensayo MTT.

5 Se normalizan los resultados a la media de controles no tratados y se analizan estadísticamente con un test de Wilcoxon con *p* inferior a 0,05.

Ensayo MTT

10 Se mide la toxicidad utilizando el ensayo MTT. Después de la incubación con los compuestos, se añade MTT a una concentración final de 0,5 mg/ml por pocillo. Se incuban a continuación las placas durante 30 minutos a 37°C en la oscuridad. Se aspira el medio y se vuelven a poner en suspensión los cristales en 500 μ l de DMSO (dimetilsulfóxido). Se lee la absorbancia a 550 nm y se calcula el porcentaje de viabilidad.

Resultados

15 Se presentan los resultados obtenidos en las figuras 1-5. Estos resultados ilustran el efecto protector de los compuestos de la invención sobre la supervivencia neuronal. En el cotratamiento de neuronas con un inhibidor de la invención, se observa un efecto protector dependiente de la dosis en los modos de inducción de la excitotoxicidad (NDMA/serina y/o cainato).

20 Las figuras 1 y 2 presentan los resultados obtenidos con la ayuda de etazolato sobre células granulares del cerebelo. Los resultados presentados muestran que el etazolato permite alcanzar en estas células un efecto protector del 40% en el caso de tratamiento con NMDA/Ser y del 50% en el caso de toxicidad inducida por cainato.

25 Las figuras 3 y 4 presentan los resultados obtenidos con la ayuda de etazolato sobre neuronas corticales. Los resultados presentados muestran que el etazolato permite alcanzar en estas células un efecto protector del 47% en el caso de tratamiento con NMDA/ser y del 40% en el caso de toxicidad inducida por cainato.

30 La figura 5 presenta los resultados obtenidos con etazolato sobre células de médula espinal ventral. Estos resultados muestran que el etazolato permite alcanzar en estas células un efecto protector del 36% en el caso de tratamiento con NMDA/Ser.

35 La presente invención documenta por lo tanto no solamente la implicación de la PDE4B y los receptores GABA (A) en los mecanismos de excitotoxicidad, sino igualmente la capacidad de los inhibidores de conservar la viabilidad neuronal en estrés ligado a excitotoxicidad.

Ejemplo 3

Inhibición del estrés oxidativo

40 En este ejemplo, se han puesto en cultivo células de la línea SH-SY5Y según técnicas conocidas por el experto en la materia. Estas células, derivadas de un neuroblasto humano, poseen propiedades que caracterizan a un precursor neuronal en un estado precoz de desarrollo. El tóxico empleado es la 6-hidroxiopamina (6-OHDA) que induce un estrés oxidativo. La toxicidad se mide mediante un ensayo MTT.

45 La figura 6 presenta los resultados obtenidos con el etazolato sobre células SH-SY5Y. Estos resultados muestran que el etazolato permite alcanzar en estas células un efecto protector del 40% en el caso de tratamiento con 6-OHDA.

50 El etazolato es por lo tanto un protector potencial *in vitro* de la muerte celular inducida por ROS. Por lo tanto, el potencial neuroprotector del etazolato se refuerza por los resultados obtenidos en el ejemplo 2 y 3.

Ejemplo 4

Estudio de la isquemia en rata

55 Se evalúa el efector protector *in vivo* del etazolato en un modelo de infarto cerebral en rata. En el curso de este estudio, se provoca un infarto cerebral por oclusión intracavitaria de la carótida interna y de las arterias medias del cerebro. Se trata un grupo de 8 ratas con etazolato (10 mg/kg, oral) antes y varias veces después de la oclusión. Se trata un grupo de 8 ratas con el compuesto de referencia L-NAME (1 mg/kg, i.p.) antes y varias veces después de la oclusión. Se trata un grupo de 8 ratas sólo con el vehículo. Se evalúan los efectos mediante observaciones clínicas, ensayos funcionales neurológicos y mediante la determinación del tamaño del infarto al final del estudio.

60 Los resultados obtenidos muestran que el etazolato induce una reducción del 28% de media del tamaño del infarto con relación al control (véase el ejemplo de la figura 7). Por otro lado, se observa una mejora de la hipoactividad en el grupo tratado con etazolato con relación al grupo de control (31% para el grupo de etazolato frente a 42% para el

ES 2 337 255 T3

grupo de control). Además, la evaluación neurológica de los animales demuestra una mejora en el grupo tratado con relación al grupo de control.

5 Ejemplo 5

Ensayo del laberinto acuático (piscina de Morris)

Se utiliza este ensayo para evaluar las capacidades de memorizar y gestionar la información espacial en rata en una situación de aversión. La tarea para el animal consiste en localizar con la ayuda de índices distales una plataforma “de refugio” invisible mediante inmersión en una cubeta llena de agua opacificada. El dispositivo permite evaluar la memoria de referencia del animal (la plataforma se encuentra en el mismo lugar en cada día del ensayo). Este ensayo permite apreciar los desempeños mnésicos dependientes de funciones del hipocampo de los animales ensayados. Especialmente, este ensayo permite discriminar los desempeños de ratas adultas (10 meses) y los de ratas envejecidas (30 meses). El hipocampo es una estructura cerebral cuyas funciones se alteran precozmente en la enfermedad de Alzheimer. El ensayo de la piscina de Morris es por lo tanto particularmente reconocido por el experto en la materia para permitir apreciar las propiedades farmacológicas de compuestos dirigidos a tratar la enfermedad de Alzheimer así como otras patologías asociadas a un déficit cognitivo. Se han utilizado para este estudio ratas envejecidas tratadas con etazolato (3 mg/kg y 10 mg/kg) administrado por vía oral, así como ratas tratadas con vehículo. Se han comparado los desempeños de estos animales en el ensayo de la piscina de Morris con los de un grupo de control de ratas adultas.

El tratamiento con 3 mg/kg de etazolato mejora ligeramente los desempeños de las ratas envejecidas. El tratamiento con 10 mg/kg de etazolato acerca de forma importante los desempeños de los animales envejecidos a los de los animales adultos.

Este resultado indica que el etazolato mejora las propiedades mnésicas y cognitivas dependientes del hipocampo, permitiendo reducir los déficit de desempeño ligados a la edad. Este resultado cualifica al etazolato para el tratamiento de problemas cognitivos ligados a la edad como la enfermedad de Alzheimer, especialmente.

30 Ejemplo 6

Uso clínico en el hombre

Este ejemplo describe las condiciones de uso en el hombre de etazolato para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Este ejemplo ilustra el potencial terapéutico de la invención y sus condiciones de uso en el hombre.

En este estudio, se han administrado dosis únicas crecientes de etazolato (0,5, 1, 2, 5, 10 y 20 mg) por vía oral en forma de cápsulas dosificadas a 0,5 y 5 mg a grupos diferentes y secuenciales de 8 sujetos jóvenes y sanos, voluntarios de sexo masculino. Este estudio se ha realizado en un solo centro, por doble ciego, y 2 de los 8 sujetos han recibido un placebo. Los parámetros evaluados han sido la tolerancia clínica (aparición de efectos adversos, de señales clínicas, cambio de la presión arterial o la frecuencia cardíaca), electrocardiográficos (registro del ECG) y biológicos (hematología y bioquímica sanguínea, examen urinario) durante las 24 h siguientes a la administración del producto. Se ha realizado una dosificación plasmática del producto en cada sujeto en diferentes momentos antes y después de la administración del producto (0,25-0,50-1,00-1,50-2,00-3,00-4,00-5,00-6,00-8,00-10,00-12,00 y 24,00 horas). Se ha realizado igualmente una dosificación urinaria del producto a partir de orinas recogidas antes y después de la administración del producto (4, 4-8, 8-12 y 12-24 horas).

Al término de esta fase de administración de dosis crecientes, un grupo suplementario de 6 sujetos recibe una dosis de etazolato en dos tomas: en ayunas y en el curso de una comida rica en grasa. El objetivo de esta segunda parte es comparar la evolución de las tasas sanguíneas de producto entre las dos condiciones de administración. Los parámetros evaluados son la tolerancia clínica (aparición de efectos adversos, de señales clínicas, cambio de la presión arterial o la frecuencia cardíaca), electrocardiográficos (registro del ECG) y biológicos (hematología y bioquímica sanguínea, examen urinario) durante las 24 h después de la administración del producto. Se ha realizado una dosificación plasmática del producto en cada sujeto en diferentes momentos antes y después de la administración del producto (0,25-0,50-1,00-1,50-2,00-3,00-4,00-5,00-6,00-8,00-10,00-12,00 y 24,00 horas).

Se ha realizado igualmente una dosificación urinaria del producto a partir de orinas recogidas antes y después de la administración del producto (4, 4-8, 8-12 y 12-24 horas). Se desarrolla igualmente una cápsula gastroresistente para este producto de forma que se pueda utilizar en estudios clínicos en el hombre. Los resultados obtenidos en el transcurso de la primera fase de estudio de dosis crecientes han mostrado que el etazolato es bien tolerado y no conlleva efectos secundarios. Además, las dosificaciones plasmáticas han confirmado en el hombre la buena absorción del producto a dosis altas.

65

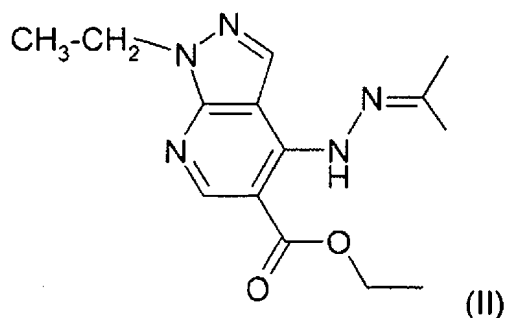
REIVINDICACIONES

1. Utilización de etazolato de fórmula (II)

5

10

15



20

o de una sal o éster del mismo, para la preparación de una composición farmacéutica dirigida a mejorar la percepción cognitiva en un paciente humano.

25

2. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada** porque el paciente está aquejado de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o corea de Huntington.

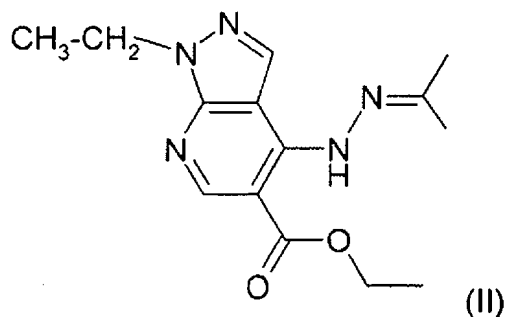
3. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada** porque la composición se administra por vía oral o sistémica.

30

4. Composición que comprende etazolato de fórmula (II)

35

40



45

o una sal o éster del mismo, para uso para mejorar la percepción cognitiva en un paciente humano.

50

55

60

65

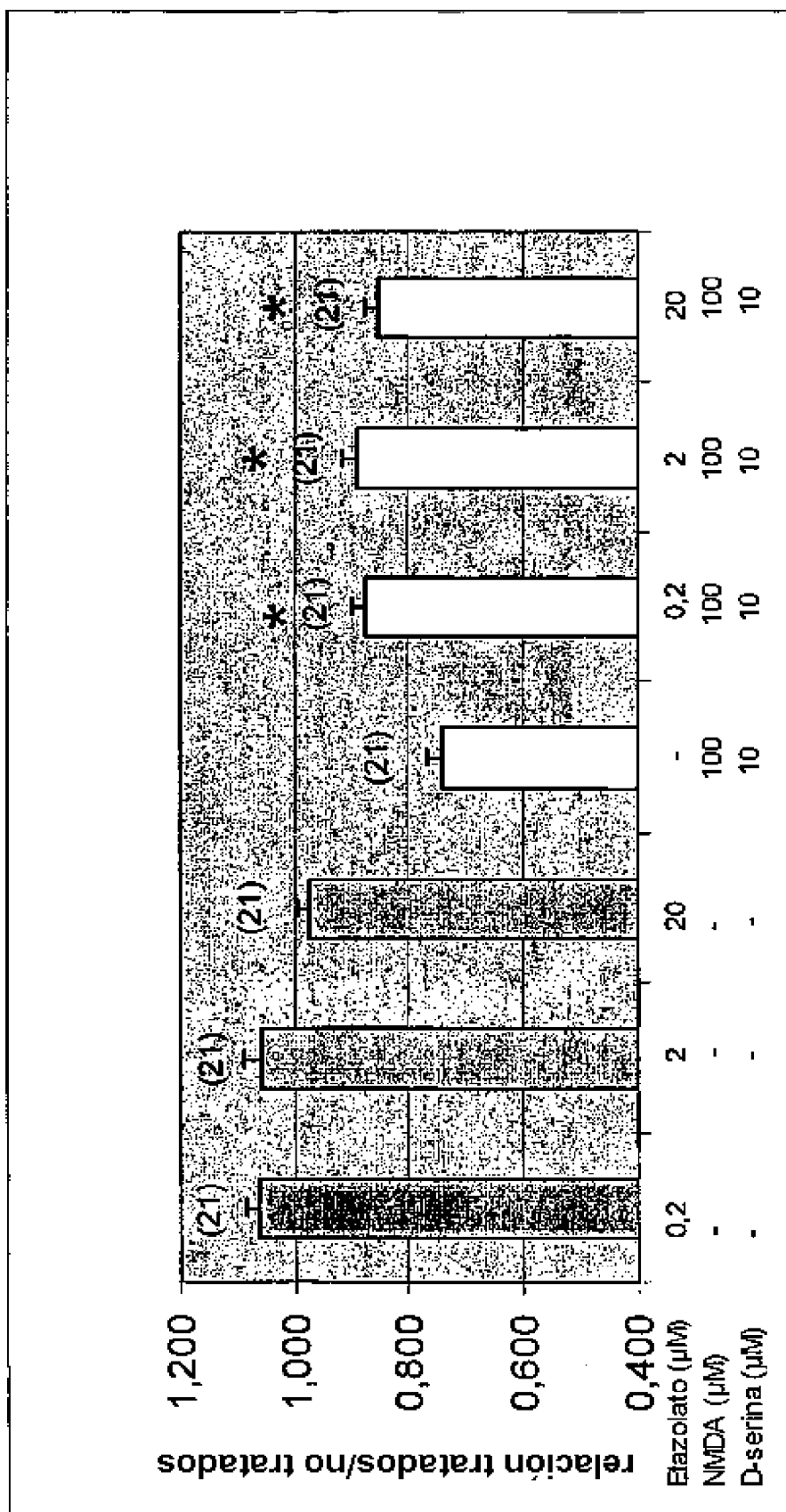


Figura 1

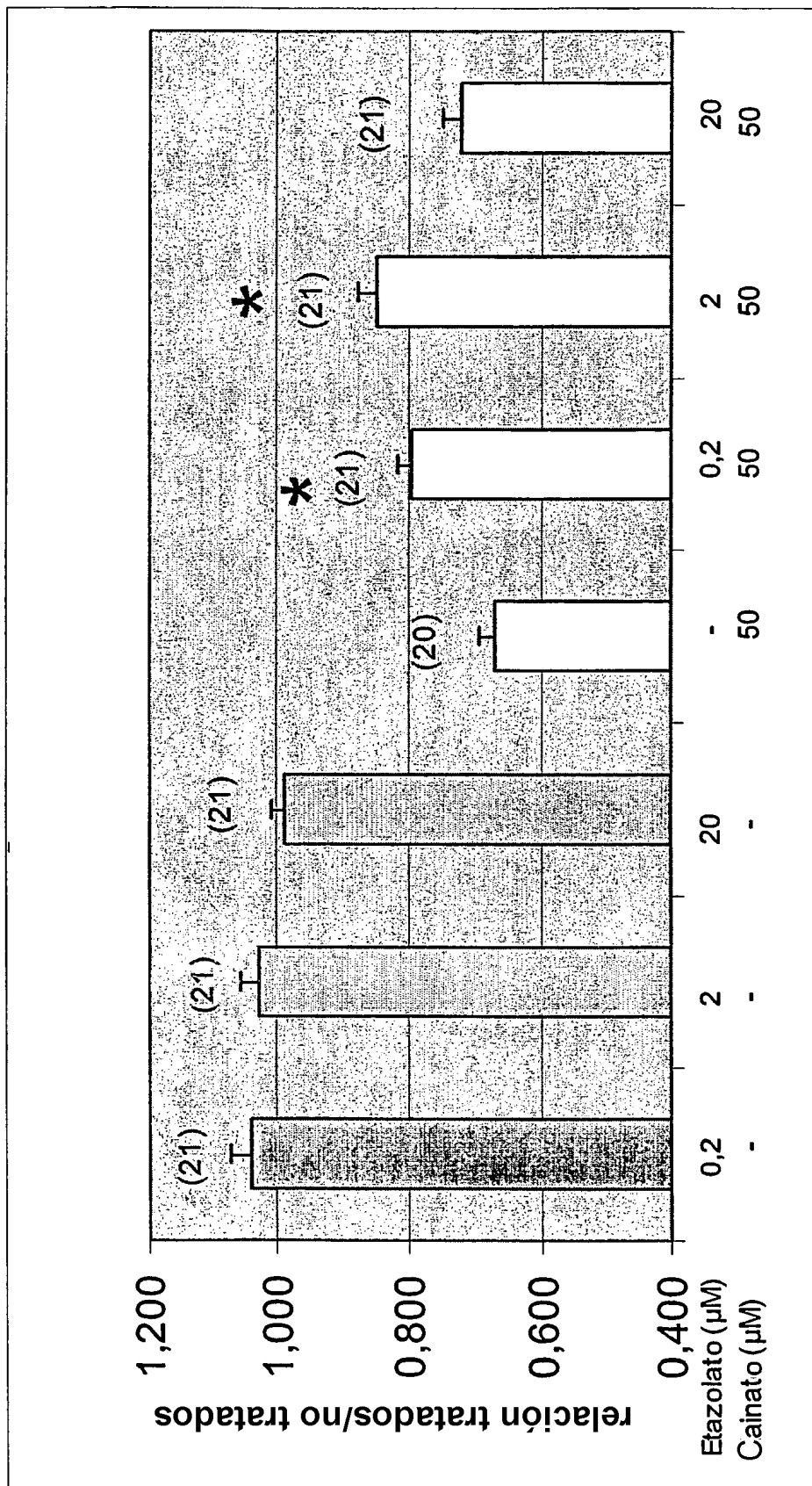


Figura 2

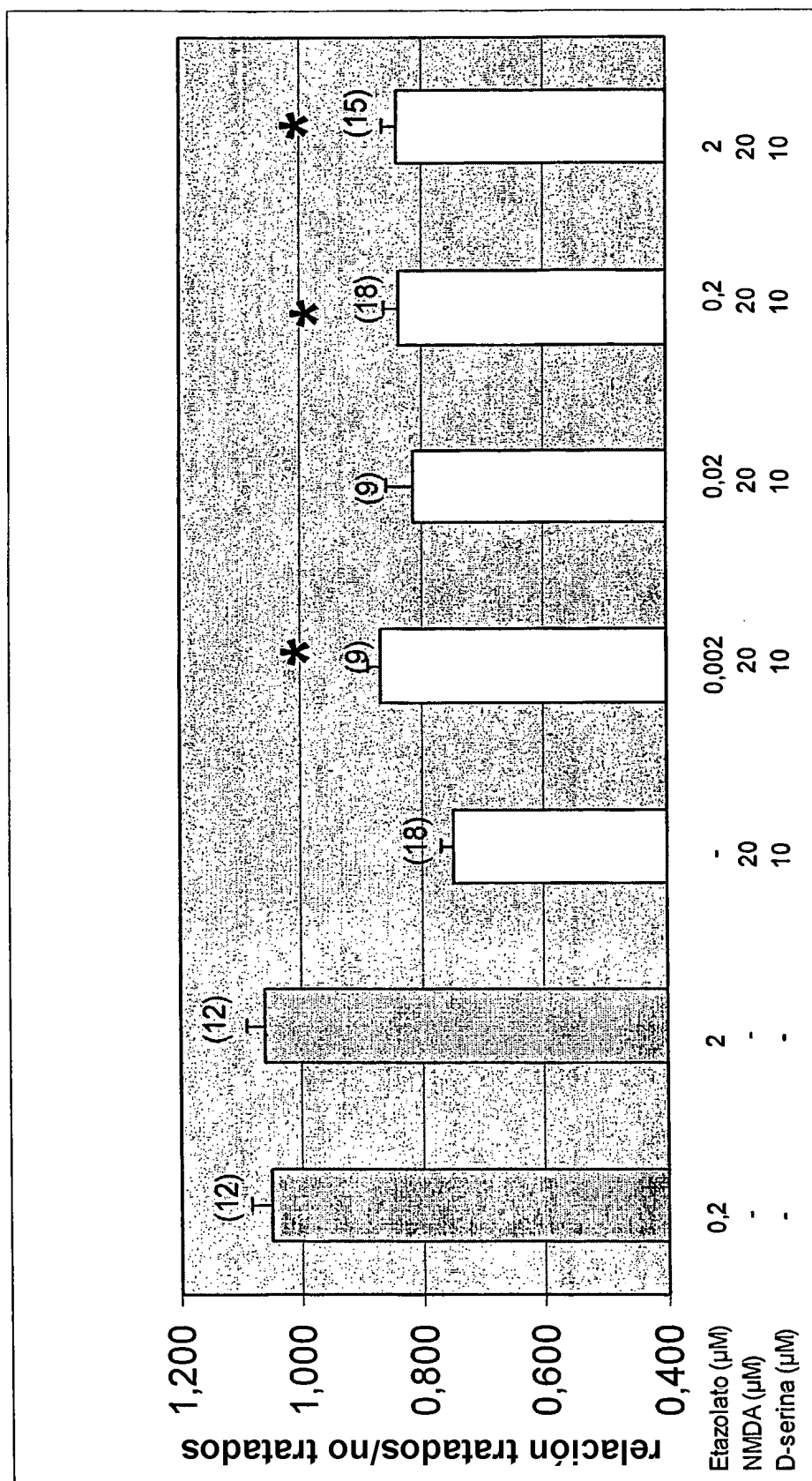


Figura 3

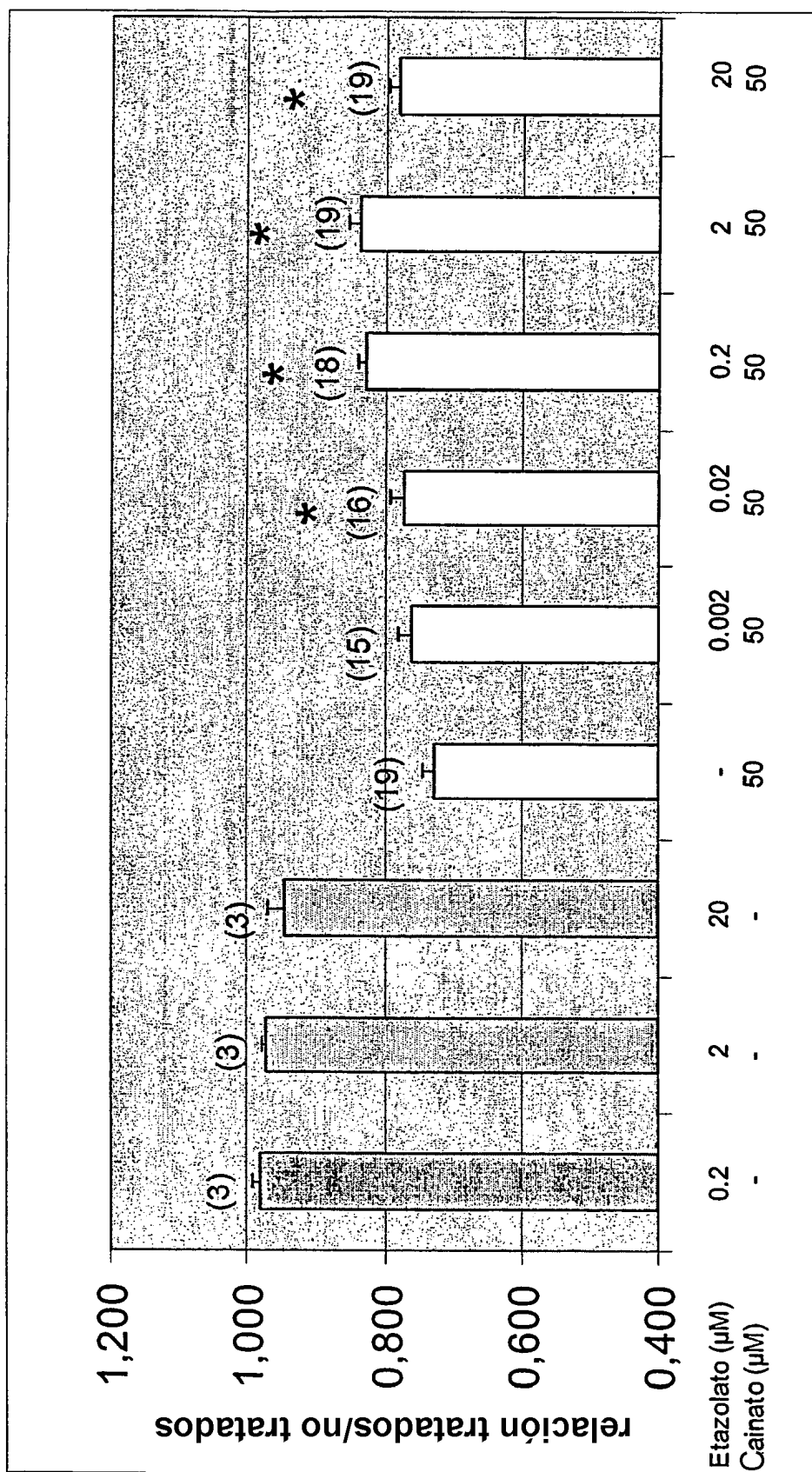


Figura 4

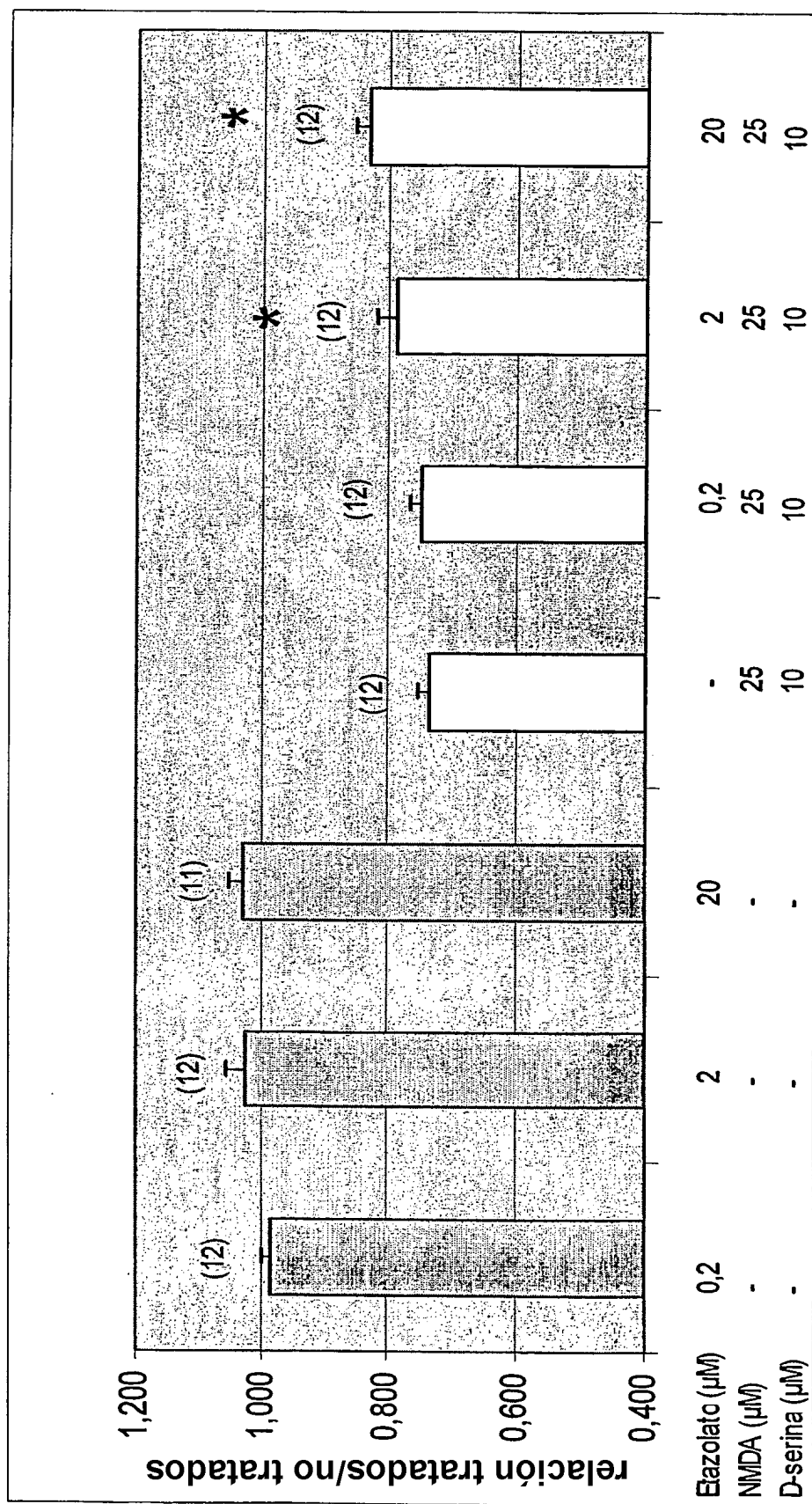


Figura 5

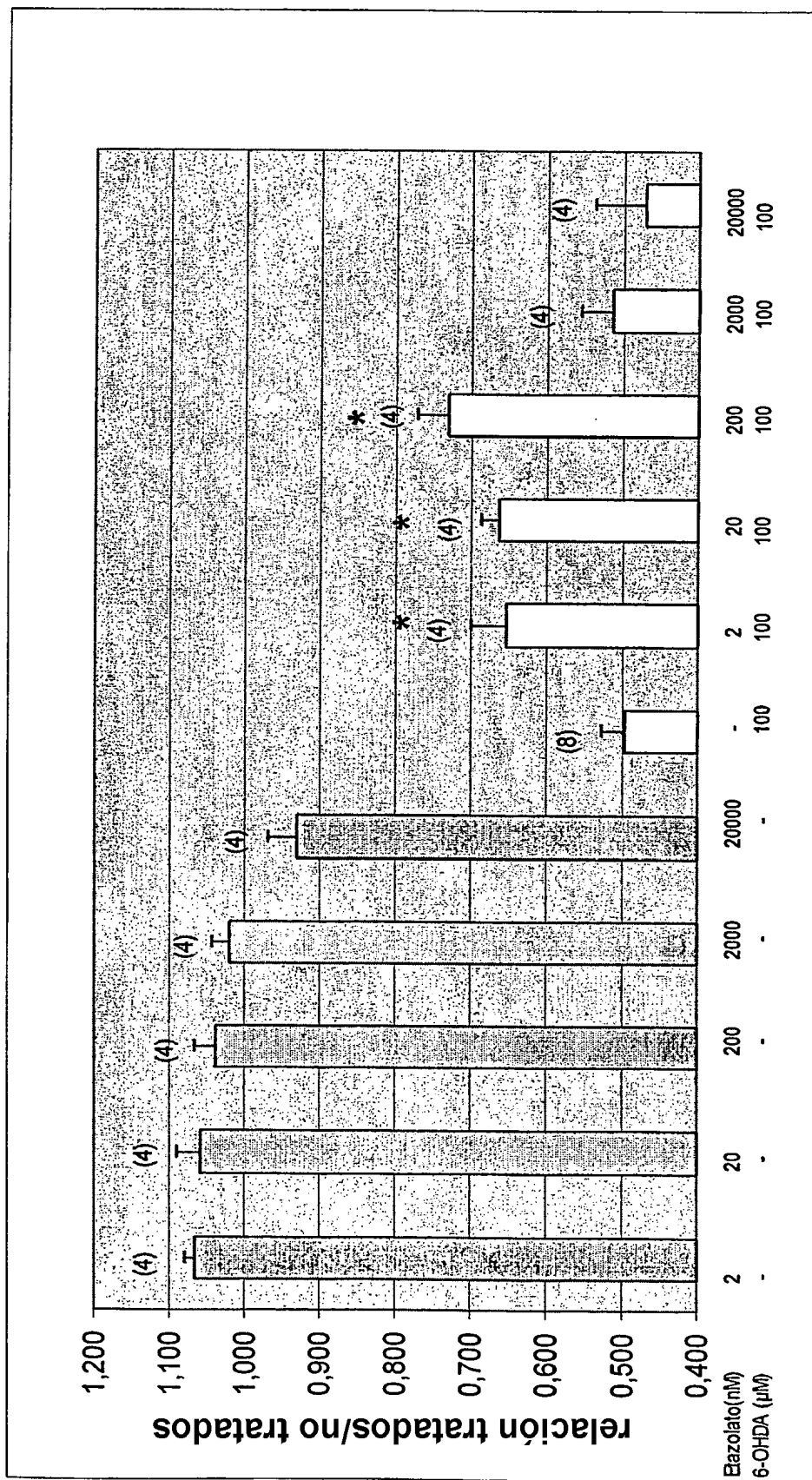
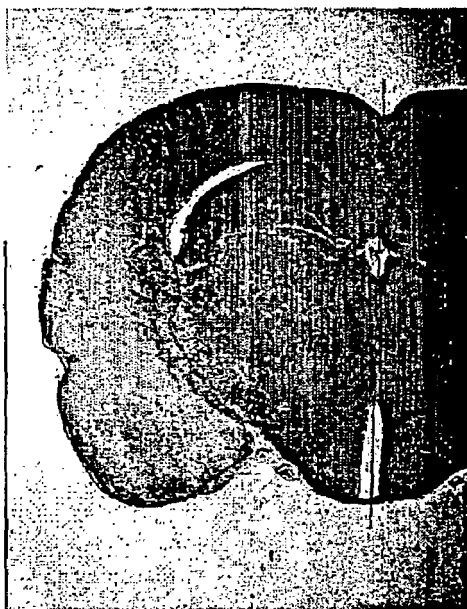


Figura 6



Animal tratado con etazolato
superficie de infarto= 29% en este corte
volumen de infarto= 20% del hemisferio isquémico



Animal tratado con vehículo
superficie de infarto= 82% en este corte
volumen de infarto= 72% del hemisferio isquémico

Figura 7