(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
02 de junio de 2022 (02.06.2022)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2022/111742 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:
A61K 31/167 (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)
A61K 31/27 (2006.01) *A61K 9/20* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) *A61K 47/06* (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CU2021/050012

(22) Fecha de presentación internacional:
18 de noviembre de 2021 (18.11.2021)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

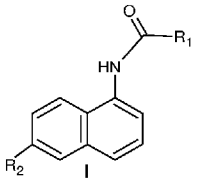
(30) Datos relativos a la prioridad:
2020-0087 24 de noviembre de 2020 (24.11.2020) CU

(71) Solicitante: **CENTRO DE NEUROCIENCIAS DE CUBA** [CU/CU]; Calle 190 No. 19818 entre 25 y 27, Cubanacán, Playa, 11600 La Habana (CU).

(72) Inventores: **RODRÍGUEZ-TANTY, Chryslaine**; Calle 88a, N° 307 esquina 3era, Miramar, Playa, 11300 La Habana (CU). **SABLÓN CARRAZANA, Marquiza**; Calle 31, N° 32006, entre 320 y 322, Reparto Fraga, La Lisa, 17100 La Habana (CU). **MENÉNDEZ SOTO DEL VALLE, Roberto**; Ave 25, N° 957, Apto. 4, entre Paseo y 2, Plaza de la Revolución, 10400 La Habana (CU). **BENCOMO MARTÍNEZ, Alberto**; Calle 36 A, N° 8701, Vereda Nueva, Caimito, 32300 Artemisa (CU). **RIVERA MARRERO, Suchitil**; Calle Cowley, N° 12808, entre Rodríguez Morine y Entrada, EMBIL, Boyeros, 10800 La Habana (CU). **GARCÍA PUPO, Laura**; Calle Mercado, No. 14511 altos, entre 3era y Final, Barrio Obrero, San Miguel del Padrón, 17100 La Habana (CU). **GONZÁLEZ MESA, Leonora**; Ave. 57, No. 12632, apto 7, entre calle 128 y 128 B, Marianao, 11500 La Habana (CU). **LEÓN CHAVIANO, Samila**; Calle 240, Edif. 2308, apto 3, entre 23 y 25, La Lisa, 17100 La Habana (CU). **ÁGUILA CORDOVA, Adriana**; Calle La Rosa, No. 556, entre Ermita y Ayuntamiento, Plaza de la Revolución, 10400 La Habana (CU). **CASTRO-PALOMINO ANTELA, Kathleen**; Calle F, Edif. 503, apto 1, entre 23 y 21, Plaza de la Revolución, 10400 La Habana (CU). **PENTÓN ROL, Giselle**; Calle 110, No. 539, entre 5taF y 7ma, Playa,

(54) **Title:** PHARMACEUTICAL COMPOSITION OF NAPHTHALENE DERIVATIVES AS MULTI-TARGET THERAPEUTIC AGENTS FOR THE TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE

(54) **Título:** COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA DE DERIVADOS DE NAFTALENO COMO AGENTES TERAPÉUTICOS MULTIBLANCOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER



(I)

I

(57) **Abstract:** This invention relates to pharmaceutical chemistry and specifically to the pharmaceutical composition of the compounds, which show multi-targeted action on the cholinergic, glutamatergic and mitochondrial systems that are affected in Alzheimer's Disease (AD), whose general Formula (I) is I, wherein the substituents R_1 and R_2 are set out in the description and claims. The formulation of these compounds increases effectiveness and tolerance in oral, sublingual, parenteral, transdermal and nasal administration. They can be used on their own, as monotherapy, as a replacement of the multi-therapy currently used for AD. The formulation of these compounds, their salts, hydrates, enantiomers, isomers, metabolites, prodrugs for administration to humans, as active ingredients for the treatment of AD, increases bioavailability, residence time of the active ingredient and adequate excretion, which increases the effectiveness, biosafety, adherence and tolerance to the treatment.

(57) **Resumen:** Esta invención se relaciona con la Química Farmacéutica y se refiere a la composición farmacéutica de los compuestos, los cuales muestran acción multiblanco sobre los sistemas colinérgico, glutamatérgico y mitocondrial que se afectan en la Enfermedad de Alzheimer (EA), cuya Fórmula (I) general I es, donde los sustituyentes R_1 y R_2 están expuestos en la descripción y reivindicaciones. La formulación de estos compuestos incrementa la eficacia y tolerancia mediante su administración por vía oral, sublingual, parenteral, transdérmica y nasal. Pueden emplearse por sí solos, como monoterapia, en sustitución de la multiterapia que hoy se emplea para la EA. La formulación de estos compuestos, sus sales, hidratos, enantiómeros, isómeros, metabolitos, profármacos para su administración a humanos, como principios activos para el tratamiento de la EA, aumenta la biodisponibilidad, tiempo de residencia del principio activo, y la excreción adecuada lo que incrementa la eficacia, bioseguridad, adherencia y tolerancia al tratamiento.

WO 2022/111742 A1

[Continúa en la página siguiente]

11300 La Habana (CO). **OTAÑO TAMAYO, Laura**; Calle Perla, No. 503, apto 23, entre Callejón La Rosa y Pastora, Boyeros, 10800 La Habana (CU). **PÉREZ PERERA, Rafaela**; Ave. 33, No. 23008, apto. 11, entre 230 y 232, La Lisa, 17100 La Habana (CU). **CERVANTES LLANOS, Majel**; Calle 13, No. 6804, entre 68 y 70, Playa, 11300 La Habana (CU). **DÍAZ GARCÍA, Orestes de Jesús**; Calle 216, No. 7307, entre 73 y Ave. 75, La Lisa, 17100 La Habana (CU). **DORESTE BROWN, Miriam**; Calle 39, No. 3606, entre 36 y 42, Playa, 11300 La Habana (CU).

(74) **Mandatario: ÁLVAREZ SALGADO, Esperanza**; Calle 190 No. 19818 entre 25 y 27, Cubanacán, Playa, 11600 La Habana (CU).

(81) **Estados designados** *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) **Estados designados** *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

— *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))*

DESCRIPCIÓN

La presente invención se relaciona con la Química Farmacéutica y se refiere a la composición farmacéutica de los compuestos de la Fórmula I, los cuales muestran acción multiblanco sobre los diferentes mecanismos de los sistemas colinérgico, glutamatérgico y mitocondrial que se afectan en la Enfermedad de Alzheimer (EA). La formulación de estos compuestos, incrementa la eficacia y tolerancia mediante su administración por vía oral, sublingual, parenteral, transdérmica y nasal.

Esta invención es particularmente útil para proporcionar una formulación efectiva, en la cual los compuestos de Fórmula I, sus sales, hidratos, enantiómeros, isómeros, metabolitos, profármacos para su administración a humanos, son considerados como sustancia o principio activo para el tratamiento de la EA.

Con el incremento de la esperanza de vida de la población mundial se ha producido un incremento de las enfermedades neurodegenerativas, y fundamentalmente las relacionadas con las demencias seniles. En particular, la Enfermedad de Alzheimer (EA) presenta una alta incidencia en la población mayor de 60 años (entre un 50 % - 60 %) Esta dolencia conduce a una demencia progresiva, que se caracteriza por la ocurrencia de episodios amnésicos, desorientación, trastornos de la función ejecutiva y cognitiva, alucinaciones, depresión y agitación.

En la actualidad, aún está en discusión el mecanismo exacto que produce esta enfermedad de etiología compleja. De acuerdo a las evidencias experimentales, las hipótesis de la cascada amiloide y la de la fosforilación de la proteína *tau* juegan un rol fundamental en su origen (*Hardy JA, et al. en Science, 1992; 256:184-5; Haass C. et al. en Cold Spring Harb Perspect Med.2012; 2: a006270; Mucke L et al. en Cold Spring Harb Perspect Med. 2012; 2: a006338*). Sin embargo, también existen otras hipótesis alternativas sustentadas por los hallazgos científicos, como la de la alteración de la actividad mitocondrial, la hipótesis de la neuroinflamación y la hipótesis sobre el papel del metabolismo (relacionada con el colesterol y la insulina) y la hipótesis dendrítica. (*Castello MA*

et al. en Ageing Res Rev. 2013; 12:282-8; Castello MA et al. en Ageing Res Rev.2014; 13: 10-2; Drachman DA. en Alzheimers Dement 2014; 10: 372-80; Ferreira ST et al. en Alzheimers Dement 2014; 10 (1 Suppl): S76-83; De Felice FG, et al. en Diabetes 2014; 63: 2262-72; De Felice FG en J Clin Invest. 2013; 123: 531-9; Cochran JN et al. en Brain Res Bull. 2014; 103: 18-28).

De manera general, la neuropatología de la EA se manifiesta como una reacción inflamatoria inmune, que involucra la activación en el cerebro tanto del sistema inmune innato como del adaptativo, lo que conduce a una cascada neuroquímica que involucra la agregación de los péptidos β-Amiloide (βA) y la proteína *tau*. Se plantea que la presencia de fibras o placas amiloideas genera secuencialmente la activación del complemento, de la microglia, la liberación de citoquinas (quimioquinas), y por último, la neurotoxicidad difusa (*Reitz C. en International Journal of Alzheimer's disease. 2012 Jan; 2012:369808; Rodrigue K. en Neuropsychol Rev. 2009 December; 19(4): 436–450. doi: 10.1007/s11065-009-9118-x; Bateman, R. J. et al. en Alzheimer's disease. N. Engl. J. Med. 367, 795–804, 2012; Karran, E., et al. en Nat. Rev. Drug Discov. 10, 698–712, 2011*). Por otro lado, Soyon Hong et al. en *Science* (*2016, doi: 10.1126/science.aad8373*), describen que en el estadío inicial de la EA asintomática se produce una pérdida sináptica temprana mediada por el complemento y la microglia, específicamente por un incremento de la proteína C1q, antes de la deposición de placas βA. También, se conoce que la participación del péptido βA en su estado inicial de agregación resulta crucial para la sobreexpresión de C1q. La inflamación crónica como respuesta inmunológica en el cerebro juega un papel importante en la muerte neuronal progresiva en muchas enfermedades degenerativas. Así, el sistema fagocitario, constituido por los macrófagos y monocitos infiltrados unidos a las células de la microglia residentes, produce cantidades excesivas de citoquinas tales como el factor de necrosis tumoral α (TNF α), la interleucina 1 (IL1), así como las especies reactivas de oxigeno (EROS) y nitrógeno (ENOS), las cuales se encuentran implicadas en la EA. Este conjunto de respuestas a estímulos dados, desencadena un círculo vicioso de agresiones que se sostiene por las células gliales localizadas, las cuales provocan un ataque fagocítico que lesiona

irreversiblemente a las neuronas (*Malm T. M., en Neurotherapeutics 2015, 12:81–93; ElAli A. et al. en Brain, Behavior, and Immunity, 2015, doi: 10.1016/j.bbi.2015.07.021; Michaud J.-P. et al., en Neuron, 85, 4, 450-2, 2015*).

Las disfunciones mitocondriales se describen como un acontecimiento temprano en la fisiopatología de la EA y aparecen antes de la deposición βA y el déficit de memoria en pacientes con EA y en ratones transgénicos (*Maurer, I., et al. en Neurobiol. Aging 2000, 21, 455–462; Caspersen, C. et al. en FASEB J. 2005, 19, 2040–2041; Mosconi, L et al. en Ann. N Y Acad. Sci. 2008, 1147, 180–195*). Durante la patogénesis de la EA, los oligómeros βA se acumulan en las mitocondrias, lo que da lugar a una alteración del metabolismo energético, un aumento del estrés oxidativo (EO) y apoptosis (*Lustbader, et al. en Science 2004, 304, 448–452.; Caspersen, C. et al. en FASEB J. 2005, 19, 2040–2041; Manczak, et al. en Hum. Mol. Genet. 2006, 15, 1437–1449*). En estudios realizados en pacientes con EA y en ratones transgénicos, se describen las disminuciones constantes de las enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico y de las actividades del citocromo c oxidasa (*Yates, et al. en J. Neurochem 1990, 55, 1624–1630; Maurer, I., et al. en Neurobiol. Aging 2000, 21, 455–462; Caspersen, C. et al. en FASEB J. 2005, 19, 2040–2041; Leuner, et al. en Mol. Neurobiol. 2012, 46, 186–193*). Algo similar se describe para las mitocondrias aisladas de cerebros de ratones transgénicos y en las mitocondrias aisladas expuestas a oligómeros βA en las que se ha encontrado además un aumento del EO, elemento clave en la fisiología de la EA (*Casley, et al., en Neurobiol. Dis. 2002a. 10, 258–267; Aleardi, A. M., et al., en J. Bioenerg. Biomembr. 2005, 37, 207–225; Caspersen, C. et al. en FASEB J. 2005, 19, 2040–2041; Clementi, M. E. et al. en FEBS Lett. 2005, 579, 2913–2918; Leuner, et al. en Mol. Neurobiol. 2012, 46, 186–193*; *Smith, M. A., et al. en Nature 1996, 382, 120–121; Leuner, et al. en Mol. Neurobiol. 2012, 46, 186–193*).

Un posible mecanismo de la disfunción mitocondrial se relaciona con la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP), que puede desencadenarse por la sobrecarga de Ca^{2+} y el EO (*Kroemer, G. y Reed, J. C. en Nat. Med. 2000, 6, 513–519*) y que induce la liberación de factores proapoptóticos, como la proteína proapótica Bax que contribuye a la formación del mPTP

(*Jürgensmeier, J. M., et al. en Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95, 4997–5002; Marzo, I., et al. en Science 1998, 281, 2027–2031; Narita, M., et al. en Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95, 14681–14686*). Consecuentemente se libera el citocromo c, que promueve la apoptosis, al unirse al factor de activación de la proteasa de la apoptosis (APAf-1) y formar un complejo conocido como "apoptosoma" (*Liu, X., et al. en Cell 1996, 86, 147–157; Yang, J., et al. en Science 1997, 275, 1129–1132*).

Además se conoce que la disfunción bioenergética mitocondrial asociada al βA promueve la excitotoxicidad glutamatérgica y por tanto la muerte celular. Al reducirse los depósitos de energía celular, se afecta el potencial de membrana citoplasmática, lo cual elimina el bloqueo por Mg^{2+} de los receptores de *N*-metil-*D*-aspartat*o* (NMDA). Esto permite la activación persistente por el glutamato endógeno, y supone un aumento de la entrada de iones Ca^{2+} en la célula, lo que provoca excitoxicidad en las neuronas, evento que ha sido relacionado con los problemas de memoria característicos de la EA (*Zádori D. en Journal of Alzheimer's Disease, 2018, 62, 523–547*). En apoyo a esta hipótesis, está el hecho demostrado que los antagonistas del glutamato aminoran la muerte neuronal inducida por toxinas mitocondriales. Estas y otras evidencias posteriores, sugieren que las ERO generadas por la cadena de transporte electrónico y/o por vías intracelulares ligadas a la activación del receptor del glutamato, pudieran ser la causa de la degeneración de las neuronas (*Villegas S. en Medicina Clínica, 2015, 145, 2, 76-83*).

La complejidad neuropatológica de la EA indica que es una enfermedad multifactorial, sin embargo, terapéuticamente no ha sido así abordada hasta este momento.

Solo existen cuatro fármacos aprobados por las entidades regulatorias. Estos pertenecen a dos grupos: los inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChEI) y los antagonistas de los receptores de ácido *N*-metil-*D*-aspártico (NMDAr) (*Chiang K et al. en Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2014; 54: 381-405; Francis PT et al. en Trends Pharmacol Sci. 2005; 26: 104-11; Huang Y. et al. en Cell. 2012; 148: 1204-22.*)

Los AChEI son el donepezilo, la rivastigmina y la galantamina. El mecanismo de acción de ellos es aumentar la transmisión colinérgica mediante la inhibición de la acetilcolinesterasa en la hendidura sináptica y por ello, podrían incrementar la capacidad cognitiva de los pacientes con EA. Los AChEI están disponibles en varias formulaciones que incluyen las formas de liberación inmediata, tales como comprimidos, cápsulas y soluciones, así como la forma de liberación controlada para la administración oral, entre otras (*Villegas S. en Medicina Clínica, 2015, 145, 2, 76-83*). Sin embargo, estos AChEI sólo ofrecen un moderado beneficio clínico para algunos pacientes, incluso cuando estos medicamentos se administran en sus dosis máximas de seguridad y tolerabilidad. Además, estos compuestos originan efectos secundarios que incluyen anorexia, náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal y pérdida de peso (en *Physicians Desk Reference de 2008, Thomson PDR et al. en Clinical Geriatrics: Volume 2011, 19, 1; Ali T. et al. en PLOS ONE, 2015, 7, 1-10; Tsoi K. K. F. en JAMDA, 1-7, 2015, doi:10.1016/j.jamda.2015.08.007*).

Por otra parte, los NMDAr son receptores ionotrópicos de glutamato, un neurotransmisor que actúa como componente esencial en la plasticidad sinaptica neuronal y en la memoria. La memantina, un antagonista de estos receptores, se utiliza en la práctica clínica por su efecto neuroprotector indicado en la EA de moderada a severa (*National Institute for Clinical Excellence. Technology appraisal guidance 217. Donepezil, galantamine, rivastigmine and memantine for the treatment of Alzheimer's disease en www.nice.org.uk/guidance/TA217; O'Brien JT, et al. en J Psychopharmacol Oxf Engl. 2011; 25: 997-1019; Francis PT et al. en Trends Pharmacol Sci. 2005; 26: 104-11; Huang Y et al. en Cell. 2012; 148: 1204-22*). Con el objetivo de disminuir los efectos colaterales de la memantina, se ha desarrollado una formulación de liberación controlada que permite la liberación de la droga en dos estadios de tiempo (en *US 5,382,601*), y/o la administración de una sola dosis diaria (en *US 2006/0051416*). No obstante, este tratamiento tampoco detiene la progresión de la enfermedad, solo tiene efectos beneficiosos durante algunas etapas y son muy variables en función del paciente.

Actualmente, no hay un tratamiento efectivo de esta enfermedad, lo que justifica el desarrollo de otras estrategias terapéuticas encaminadas a buscar otros blancos de esta compleja etiología, como son:

- Antagonistas de receptores ACh (Home-ClinicalTrials.gov [acceso 21 marzo 2016]. Disponible en: http://www.cli- nicaltrials.gov/. *Zawieja P, et al. en Geriatr Gerontol. Int. 2012; 12:365–71. Frolich L, et al. en J Alzheimers Dis. 2011; 24: 363–74*.
- Inhibidores de la agregación de βA (Aisen PS, et al. en Arch Med Sci. 2011;7:102–11. Caltagirone C, et al. en Alzheimers Dis. 2010;20:509–16. *Salloway S, et al. en Neurology. 2011; 77: 1253–62. Home-ClinicalTrials.gov* [acceso 21 marzo 2016]. disponible en: http://www.cli- nicaltrials.gov/)
- Inhibidor/activador de proteasas (*Yan R, et al.. en Lancet Neurol. 2014;13:319–29. Vellas B, et al..en Curr Alzheimer Res. 2011;8: 203–12. Xia W, y co. en J Alzheimers Dis. 2012;31: 685–96.*)
- Hipolipemiantes como las estatinas (Home-ClinicalTrials.gov [acceso 21 marzo 2016]. Disponible en: http://www.cli- nicaltrials.gov/. *Wong WB. et al. en Pharmacoepidemiol Drug Saf. 2013; 22: 345–58; Frolich L, et al. en J Alzheimers Dis. 2011; 24: 363–74.*)
- Inmunoterapia Activa (*Panza F. et al. en Expert Rev Clin Immunol. 2014; 10: 405–19; Ryan R. JM et al. en J Alzheimers Dis. 2009; 17: 243; Winblad B. et al. en Lancet Neurol. 2012;11:597–604; Schneeberger A. et al. en N Engl J Med. 2014; 370:322–33.*)
- Inmunoterapia Pasiva (Home-ClinicalTrials.gov [acceso 21 marzo 2016]. Disponible en: http://www.cli- nicaltrials.gov/. *Panza F. et al. en Expert Rev Clin Immunol. 2014; 10: 405–19; Salloway S. et al. en N Engl J Med. 2014; 370: 322–33; Doody RS. Et al. en N. Engl J Med. 2014; 370: 311–21; Ostrowitzki S. et al. en Arch Neurol. 2012; 69: 198–207*).

Ninguna de estas estrategias terapéuticas ha sido aprobada para su uso en humanos, ni han demostrado su eficacia hasta el momento e incluso la gran mayoría tienen resultados negativos o contradictorios. Tampoco en el desarrollo de estas estrategias se concibió el concepto de desarrollar un compuesto capaz

de interactuar positivamente en diferentes blancos afectados en el metabolismo cerebral de los sujetos que sufren la EA.

Carrazana et al. (en *WO2010118706 A4*) declaran la síntesis de nuevos compuestos neutros, lipofílicos y de bajo peso molecular que atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE) y se adhieren a las placas amiloideas, y que son utilizados como agentes de diagnósticos, a través de las técnicas SPECT, PET y MRI, para la visualización de estas estructuras. En esta invención se declara que estos compuestos pueden ser utilizados como agentes terapéuticos de las enfermedades de Alzheimer y Parkinson. Por otro lado, estos autores declaran en *WO2014131374 A1*, el empleo de estos compuestos como agentes terapéuticos de esta enfermedad debido a que ellos pueden: inhibir, reducir, replegar, desagregar oligómeros solubles, estructuras prefibrilares, protofibrillas y fibras amiloidogénicas, así como placas amiloides. Sin embargo, en estas patentes no se declaran la acción anticolinérgica, antioxidante, antiglutamatérgica y antiinflamatoria de estos compuestos, ni su hallazgo y concepción como un agente terapéutico multiblanco, que permite el desarrollo de una monoterapia novedosa, lo que superaría las dificultades que hasta este momento existen en el tratamiento de la EA. Tampoco se declara una formulación efectiva para la administración de los compuestos de Fórmula I, sus sales, hidratos, enantiómeros, isómeros, metabolitos, profármacos para su administración a humanos, como sustancias o principios activos para el tratamiento de la EA.

Actualmente, el desarrollo de formas farmacéuticas de liberación controlada prácticamente se asocia al empleo de materiales poliméricos con especificaciones muy precisas en el campo biofarmacéutico. Gracias a ello, son capaces de mantener la concentración de fármaco en la meseta terapéutica utilizando una dosis única, así como de liberarla de una forma continua en un tiempo determinado (*Rodriguez, I.C.; Cerezo, A.; Salem, en I.I. Bioadhesive delivery systems. Ars Pharmaceutica,* ***2000****, 41, 1, 115-128; Vintiloiu, A., Leroux,J.C. en Organogels and their use in drug delivery. Journal of Controlled Release,* ***2008****, 125, 179–192*). En los sistemas matriciales, el principio activo se encuentra uniformemente distribuido en el seno de un polímero, ya sea como suspensión o

como disolución, y su cinética de liberación dependerá de la estructura de la matriz y la naturaleza química de los materiales utilizados (*Frenkel, J., en Rubber Chemistry and Technology, 1940, 13, 264-274; Tanaka et al. en Encyclopedia of Polymer Science, 1986, 2º ed. 6, 514; Fyfe, C.A., Blazer, A.I., en Journal of Controlled Release, 1998, 52, 221–225*). Los excipientes de acción retardada o modificada que se usan para formular comprimidos matriciales pueden ser matrices de polímeros insolubles o inertes, matrices lipídicas o insolubles en agua o matrices hidrófilas.

Las matrices hidrófilas se obtienen al mezclar el principio activo con polímeros hidrófilos lo que da lugar a matrices poliméricas. Los éteres de celulosa son polímeros hidrofílicos ampliamente utilizados en el desarrollo de sistemas de liberación controlada, al ser biológicamente compatibles y no tóxicos. Entre los más conocidos tenemos: hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), carboximetilcelulosa sódica (CMC·Na), metilcelulosa (MC), etilcelulosa (EC) y los polisacáridos de celulosa microcristalina y sus derivados, los óxidos de polialquileno, polietilenglicoles, quitosano, poli(alcohol vinílico), goma xantana, copolímeros de anhídrido maleico, poli(pirrolidona de vinilo), polímeros de almidón y a base de almidón, maltodextrinas, poli (2-etil-2-oxazolina), poli(etilenimina), hidrogeles de poliuretano, ácidos poliacrílicos reticulados y sus derivados. En las formulaciones en que se empleen estas matrices, con otros excipientes adecuados, es posible preparar comprimidos, o bien en cápsulas de gelatina rígida (*Dabbagh, M.A., et al. en Internacional. Journal of Pharmaceutics, 1996, 140, 85-95*).

Recientemente, se ha centrado mucho interés en la exploración de la ruta intranasal para la entrega de drogas al cerebro debido a la alta permeabilidad del epitelio nasal, que permite la administración de fármacos de mayor masa molecular, y una rápida tasa de absorción de drogas con perfiles de concentraciones plasmáticas a veces casi idénticos a los de las inyecciones intravenosas (*Michael IU, et al. en J Pharm Pharmacol 2001; 53: 3-22*). Otras ventajas de esta vía son: gran área de superficie para la absorción de fármacos, mejor adherencia al tratamiento por parte del paciente, rápida obtención de niveles

terapéuticos en sangre, no presenta condiciones agresivas y evita el efecto de primer paso hepático.

En la literatura se describe que la captación de la droga en el cerebro desde la mucosa nasal ocurre principalmente a través de tres vías diferentes (*Illum L. en Eur J Pharm Sci 2000; 11: 1-18; Frey WH II. en Drug Deliv Tech 2002; 2: 46-49. Vyas TK, et al. en. Curr Drug Deliv 2005; 2(2): 164-175*). Una es la vía sistémica donde la droga es absorbida por la circulación sistémica y posteriormente llega al cerebro cruzando la BHE. Las otras dos vías directas son la vía olfativa y la vía trigémino-neural, por la que el fármaco viaja en parte desde la cavidad nasal hasta el líquido cefalorraquídeo (LCR) y el tejido cerebral (*Thorne RG, et al. en Neuroscience 2004; 127: 481-496*). Para lograr la entrega de drogas al SNC, las drogas deben penetrar eficiente y rápidamente a través de la mucosa nasal. Así, el diseño de la forma de la dosis desempeña un papel fundamental en la farmacocinética y la biodisponibilidad tras la administración intranasal. La retención de la droga en el lugar de absorción y la intimidad del contacto son dos factores importantes a tener en cuenta en la formulación. Se sabe que a medida que aumenta la viscosidad de la formulación, aumenta el tiempo de residencia de esta en la cavidad nasal y, por lo tanto, la probabilidad de absorción (*Pires, A, et al. en J Pharm. Pharmaceut Sci. 2009; 12(3): 288-311*). Por otra parte, la mucosa nasal y la capa de mucosidad contienen una gran variedad de enzimas, por lo que se ha probado varias técnicas para evitar la degradación enzimática, entre las que se incluye el uso de inhibidores de proteasas y peptidasas (*Pires, A, et al. en J Pharm. Pharmaceut Sci. 2009; 12(3): 288-311*). También, existen promotores de la absorción que producen modificaciones reversibles de la barrera epitelial, aumentan la permeabilidad de esta barrera al modificar la membrana lipídica, aumentan su fluidez, o abren los espacios intercelulares, lo que aumenta el transporte paracelular. Estos compuestos se relacionan con un aumento del daño tisular, sin embargo, algunos como quitosano, ciclodextrinas y algunos derivados de fosfolípidos, presentan un aumento de la absorción y biodisponibilidad, que superan cualquier efecto negativo derivado de la modificación de la mucosa (*Pires,*

A, et al. en J Pharm. Pharmaceut Sci. 2009; 12(3): 288-311; Casettari, L. y Illum, L. en J. Control. Release 2014, 190, 189–200).

Los compuestos mucoadhesivos permiten la unión de la forma farmacéutica a la capa mucosa, lo que aumenta el tiempo de contacto entre la mucosa y el fármaco, y favorecen la absorción. Entre ellos están la agarosa, el quitosano, la gelatina, el carragenano, la pectina, los derivados de celulosa, los poliacrilatos, el PEG, el metacrilato, el ácido acrílico, el PVA aminodextrano, quitosano-EDTA, PAC, el alginato, la carboximetilcelulosa y su forma sódica (CMC y Na-CMC), el almidón hidroxietilado, polivinilpirrolidona (PVP), los polímeros tiolados, el ácido poliacrílico, (*Mansuri, S. et al. en React. Funct. Polym. 100 (2016) 151–172*).

La ruta intranasal puede utilizarse para el transporte de fármacos de baja masa molecular (menos de 1000 Da) (*Behl CR, et al. en Adv Drug Del Rev 1998; 29(1): 89-116*). En varias patentes se declaran distintos enfoques de entrega de estas pequeñas moléculas al SNC.

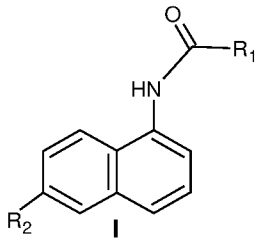
*Quay, S.C. et al. (*en *US20030225031A1* (2003) y en *US20060003989A1 (2006)*) reivindican composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la demencia, la EA, los trastornos del aprendizaje, el síndrome de abstinencia de la nicotina por inhibidores de la acetilcolinesterasa (donepezilo, tacrina, rivastigmina, galantamina, entre otros), que comprende una solución líquida, gel o polvo para la administración nasal del fármaco y un potenciador de la permeabilidad para la absorción transmucosal de la droga en el LCR por administración intranasal.

Went G.T. et al en *US20050245617A1 (2005)* reivindican una composición farmacéutica de un antagonista del receptor del *N*-metil-D-aspartato (NMDA) (memantina), un inhibidor de la monoaminoxidasa (MAO) o un inhibidor del GADPH (selegilina); y un portador farmacéutico aceptable, cuya composición se administra como una forma de dosificación de liberación prolongada para la administración oral, tópica transepitelial, subdérmica, intravenosa, intranasal o por inhalación para el tratamiento de afecciones relacionadas con el SNC, como la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple y la EA. Estos autores en *US20060252788A1 (2006)* declaran una composición donde combinan la memantina con el donepezilo, y en *US20060189694A1 (2006)* revelan una

composición de un derivado de la aminoadamantina (memantina, rimantadina, amantadina) y de un inhibidor de la descarboxilasa (Levodopa, Carbidopa) o un inhibidor de la catecol-O-metiltransferasa (talcapone, entacapone), junto con portadores en una forma de dosis de liberación prolongada para el tratamiento de distintas condiciones neurodegenerativas.

Cummings, C.J., et al. *en US20070037800A1* (2007) declara un método intranasal para tratar trastornos neurológicos como la enfermedad de Huntington o la EA mediante el uso de clotrimazol y sus derivados. Por su parte, Tao, T. et al. en *CN1621039 (2005)* revela la preparación biodisponible de Huperzina-A y su derivado o sal, que se administra por vía nasal para la prevención y el tratamiento de la demencia senil y el mejoramiento de la memoria y la capacidad de aprendizaje de los adolescentes.

La presente invención se relaciona con la Química Farmacéutica y se refiere a la composición farmacéutica de los compuestos de la Fórmula I, los cuales muestran acción multiblanco sobre los sistemas colinérgico, glutamatérgico y mitocondrial que se afectan en la Enfermedad de Alzheimer (EA). La formulación de estos compuestos incrementa la eficacia y tolerancia mediante su administración por vía oral, sublingual, parenteral, transdérmica y nasal.



I

donde:

R_1: -alquilenil-C(O)NH-alquilenil- R_3, -alquilenil-C(O)O-R_4;

R_3: -COOH, -OH, -SH, -NH_2, -NH-alquilo-, -NH-alquilenil-NH_2, -NH-alquilenil-NH-C(O)-alquilenil-S-R_5, -NH-ditiocarbamato-alquilo, -N-alquilo-ditiocarbamato sales metálicas alcalinotérreas; o sales de los grupos arriba mencionados, farmacéuticamente aceptables.

R_4: grupo succinimidilo;

R_5: -H, -C(O)-alquilo, -C(O)-C_6H_5; y

R_2: -H,-alquilo.

El término ¨alquilo¨ se caracteriza por ser una cadena alifática lineal o ramificada, de átomos de carbono saturados y átomos de hidrógeno, preferentemente metilo o etilo. El término alquilenil se refiere a un análogo divalente de un grupo alquilo lineal o ramificado, preferentemente metilenil (-CH_2-), etilenil (-CH_2CH_2-) o propilenil (-$CH_2CH_2CH_2$-).

Específicamente, los compuestos formulados de Fórmula I pueden emplearse por sí solos en sustitución de la multiterapia que hoy se emplea, en donde se utiliza una combinación de varios principios activos para mejorar la sintomatología de la EA. Los compuestos de Fórmula I, presentan individualmente actividad anticolinérgica, antioxidante, antiglutamatérgica y antiinflamatoria por lo que los convierte en principios activos potentes para la monoterapia de la EA. Además, ellos son capaces de inhibir la agregación de péptidos amiloidogénicos y la formación de placas (en *WO2010118706 A4*). Con ello, el paciente recibe una monoterapia, con la que mejora significativa de los síntomas clínicos y de las alteraciones biológicas presentes en el cerebro de los sujetos que sufre la EA.

La formulación que se presenta de los compuestos de Fórmula I, sus sales, hidratos, enantiómeros, isómeros, metabolitos, profármacos para su administración a humanos, como sustancias o principios activos para el tratamiento de la EA, permite aumentar la biodisponibilidad, el tiempo de residencia del principio activo, y la excreción adecuada lo que incrementa la eficacia, la bioseguridad, adherencia y tolerancia al tratamiento, mediante su administración por vía oral, sublingual, parenteral, transdérmica y nasal.

Los compuestos de la Fórmula I pueden ser convenientemente preparados como se describe en la patente Cubana Nº 2009-57, PCT-CU2010-000001.

En la presente invención, los compuestos de Fórmula I inesperadamente, presentan propiedades mito-protectoras. En la Figura 2 (del Ejemplo no limitativo 1) se observa el efecto del compuesto **1** sobre la disipación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$), relacionado con el flujo de electrones por los

complejos proteicos de la cadena de transporte electrónico (CTE). Las mitocondrias tratadas con el ácido etileno-bis (oxietilenitrilo) tetraacético (EGTA) muestran la menor disipación del potencial mitocondrial, al ser este el grupo control del experimento. En este caso, el EGTA actúa como quelante del Ca^{2+} contaminante del medio de reacción, por lo que las mitocondrias están en su mejor estado y retienen al máximo su potencial. El control EGTA + cianuro de carbonilo 3-clorofenildrazona (CCCP) es el grupo donde ocurre un daño mitocondrial, debido a que el CCCP disipa el $\Delta\psi$ al actuar como desacoplante de la fosforilación oxidativa. El compuesto **1** en el intervalo de concentración de 0.1 µmol/L a 100 µmol/L muestras valores de disipación del potencial similares al grupo control (EGTA). De acuerdo a estos resultados el compuesto **1**, en el intervalo de dosis ensayado disminuye la susceptibilidad a la disipación del potencial.

En la Figura 3 se muestran los resultados del ensayo de la evaluación del hinchamiento mitocondrial inducido por 50 µmol/L de Ca^{2+} y 2 mmol/L de fosfato inorgánico (Pi), lo cual se evaluó espectrofotométricamente a partir de la disminución de la absorbancia a 540 nm. En este caso, se observó que en el grupo control (en presencia de Ca^{2+}) se muestra los máximos valores de absorbancia, como una medida del máximo hinchamiento. Por otro lado, las muestras tratadas con EGTA (quelante del Ca^{2+}) mostraron bajos valores de absorbancia ($p< 0.001$), al ser este el control no dañado. El grupo tratado con CCCP también muestra bajos valores de absorbancia ($p < 0.001$), ya que al desacoplar impide la entrada de iones Ca^{2+}, y con ello evita el hinchamiento mitocondrial. El compuesto **1** a concentraciones similares revierte el efecto del hinchamiento inducido por el Ca^{2+}, por lo que se puede considerar como un protector de la integridad y funcionalidad mitocondrial. Estos efectos se corresponden con los efectos observados sobre la disipación del potencial de membrana de las mitocondrias.

También se evaluó el efecto del compuesto **1** sobre la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), lo cual está directamente relacionado con el estado de preservación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$). En condiciones basales, las mitocondrias producen elevadas cantidades de especies reactivas,

como se corrobora en el grupo control tratado con EGTA. Cuando se realizó el tratamiento con CCCP, se observó (Figura 4, del Ejemplo no limitativo 1) un comportamiento similar, pero en este caso se deduce que la generación de especies reactivas se asocia al desacoplamiento que induce el CCCP, y no a la producción de ATP por la ATPasa mitocondrial, o sea a un estado óptimo de funcionalidad de las mitocondrias. El tratamiento con el compuesto **1** protege de la producción de H_2O_2 en el intervalo de dosis ensayado.

En resumen, nuestros resultados sugieren que este compuesto actúa como un agente protector de la función mitocondrial ya que las mitocondrias fueron menos susceptibles a la disipación del potencial de membrana, reduce el hinchamiento y la generación de especies reactivas de oxígeno.

Según los estudios realizados *in silico, l*os compuestos de Fórmula I interaccionan con la enzima AChE de manera similar que el donepezilo. Estas interacciones son de tipo hidrofóbicas con los aminoácidos Trp 84, Trp 279 y Phe 330. De igual manera, estos compuestos interactúan con todos los residuos de serina en la cavidad involucrada en la reacción con acetilcolina, al formar tres enlaces de hidrógeno que dan estabilidad al enlace ligando/enzima, lo cual sugiere que los compuestos pueden bloquear la actividad enzimática. El modelo de amnesia inducido por la Escopolamina (ESC) es uno de los más utilizados para inducir déficits cognitivos asociados con la demencia y el envejecimiento *(Bajo R, et al. Scientific reports 2015, 5: 9748; Gilles C y Ertle S. Dialogues Clin. Neurosci. 2000, 2(3): 247-255; Haider S et al. Brain Res. Bull. 2016, 127 (Supplement C): 234-247*). El empleo de este antagonista competitivo no selectivo de los receptores colinérgicos muscarínicos es una forma eficaz de bloquear la neurotransmisión colinérgica y, por lo tanto, inducir la demencia. También, la ESC induce un incremento de la actividad de la enzima acetilcolina esterasa (AChE del Inglés *Acetylcholine esterase*) que contribuye junto al bloqueo de los receptores al déficit de la neurotransmisión colinérgica. Este modelo es utilizado en los ensayos *in vivo* de aquellos agentes inhibidores de la actividad enzimática como es el caso del donepezilo (*Shin CY, et al. en Biomolecules & Therapeutics 2018, 26(3): 274-281*). Junto a estos efectos se observan otros mecanismos como la inducción de EO,

neuroinflamación, disfunción mitocondrial, disminución de la fosforilación de CREB (*cAMP response element-binding*, del inglés) y regulación negativa de BNDF (factor neurotrópico derivado del cerebro, en inglés) y de la proteína fibrilar acídica de la glía (GFAD) *(Haider et al., en Brain Research Bulletin 2016, 127, 234-247; Jung et al., en Biol. Pharm. Bull. 2009, 32(2), 242-246; Konar et al., en PLOS ONE, 2011, 6, 11, e27265; Lee et al., en Scientific reports, 2015, 5, 9651.; Wong-Guerra et al., en Neurol Res. 2017; 39(7), 649-659*), que contribuyen todos a la disfunción cognitiva observada en este modelo.

La evaluación conductual en el modelo ESC agudo se realizó mediante la "versión espacial" del laberinto en Y, que evalúa la memoria espacial a corto plazo (*McGaugh J.L, en Science, 153 (1966) 1351*), y se basa en la habilidad de los animales en reconocer espontáneamente nuevos espacios dentro del laberinto. La memoria evaluada en este protocolo involucra la función del hipocampo (*Csiszar A., et al. en Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. (2013), 305 H1120-1130; Olton D.S. y Paras B.C., en Neuropsychologia, 17 (1979) 669-682.*)

La Figura 5 (Ejemplo no limitativo 2) muestra los resultados del ensayo conductual en el laberinto Y del compuesto metil (2-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino}etill)ditio carbamato (**3**), evaluado en el modelo de ESC. En este experimento se observó que los animales del grupo control tienen preferencia por el brazo novedoso, lo cual se evidenció por una disminución significativa del tiempo de permanencia en los dos brazos familiares ($p < 0.001$). Este perfil conductual preferencial no se reprodujo con la administración de ESC 30 minutos antes del entrenamiento. En este caso disminuyó el tiempo de permanencia en el brazo novedoso, sin observarse diferencias significativas estadísticamente con respecto a los otros dos brazos. En cambio, en el grupo donde se administró el compuesto **3** (dosis de 0.1 mg/kg a 10 mg/kg) se revertió significativamente ($p < 0.001$) la amnesia inducida por la ESC. Así, los animales exhibieron un perfil conductual preferencial análogo al del grupo control, caracterizado por un incremento significativo de permanencia en el brazo novedoso en comparación con los brazos familiares. En este ensayo, el donepezilo (control positivo; dosis: 1 mg/kg, i.p.) administrado 30 minutos antes de la prueba, también revertió el déficit

inducido por ESC, lo que concuerda con lo observado por otros autores y con los efectos anticolinestáricos de este fármaco (*Lee J-S, et al. en Scientific reports 2015, 5: 9651; Riedel G, et al. en Behav. Brain Res. 2009, 204(1): 217-225*). De este modo, nuestros resultados indican que el compuesto **3**, administrado a dosis simples en el intervalo de 0.1 a 10 mg/kg, 30 minutos antes del entrenamiento, sorprendentemente previene el efecto amnésico inducido por la administración de ESC. Se compararon los tiempos de permanencia en el brazo novedoso de los diferentes grupos experimentales (Figura 6, Ejemplo no limitativo 2). Así, el tiempo del grupo control *vs* el de ESC mostró una clara disminución en este último grupo (control: 133,8 ± 9.3 seg; ESC: 98,8 ± 4,2 seg), que resultó estadísticamente significativa ($p < 0.001$). El comportamiento de los animales de los grupos tratados con el compuesto **3** dependió de la concentración administrada. Hasta la dosis de 1 mg/kg hubo un gradual incremento del tiempo de exploración, significativamente diferente al grupo ESC ($p < 0.01$). A dosis mayores se observó una disminución de este parámetro. En el caso del grupo tratado con donepezilo, como era de esperar, el tiempo de permanencia fue significativamente superior al de ESC. En resumen, en esta experiencia la dosis de **3** de 1 mg/kg se comportó como la dosis de mayor efecto.

Para el estudio de la memoria a largo plazo (*McGaugh J.L, en Science, 153 (1966) 1351*) se ha desarrollado el "laberinto acuático" (denominado Laberinto Acuático de Morris, MWM; *Morris R, en Journal of Neuroscience Methods 1984, 11 (1): 47-6*). Este modelo conductual ha demostrado su validez como una medida de la navegación espacial dependiente del hipocampo y la memoria de referencia. Para él se reporta un protocolo de MWM de dos días, que se basa en una serie inicial de pruebas de entrenamiento con la plataforma visible, seguida de una prueba de memoria a las 24 h después, pero con la plataforma oculta (*Gulinello M., M. Gertner et al. en Behav. Brain Res., 196 (2009) 220-227).* Este protocolo ha sido validado en ratones triples transgénicos (3xTG) ancianos (15-18 meses). El criterio que se evalúa es la diferencia y/o el cociente de las latencias de escape: la de la última prueba del entrenamiento con la plataforma visible y la de la primera prueba con la plataforma oculta (24 h después). Así, los animales que desarrollan una

estrategia espacial correcta se mueven rápidamente hacia la zona de la plataforma oculta, lo que indica que mantienen la capacidad de memoria a largo plazo intacta. En cambio, los animales que demoran en localizar la plataforma oculta tienen fallos en la memoria espacial a largo plazo, con latencias de escape mayores.

La Figura 7 (Ejemplo no limitativo 2) muestra los resultados de la evaluación conductual del compuesto **3** en el modelo de ESC aguda empleando el MWM. Los resultados indican que los ratones administrados con ESC tienen déficit de memoria espacial de largo término, no así los tratados con el compuesto **3**. La diferencia aritmética, así como el cociente del tiempo de latencia de la última prueba del entrenamiento con la plataforma visible y el de la primera prueba con la plataforma oculta demuestran que el grupo tratado con el compuesto **3** difiere significativamente del grupo con ESC. De este modo, los resultados de este experimento confirman los obtenidos en la experiencia anterior sobre la memoria espacial de corto término.

En estos animales se determinó la actividad de AChE (µmol/L/min/mg de proteína) *ex vivo*, en muestras de fracción soluble de homogenados de cerebros (Figura 8, Ejemplo no limitativo 3). Los resultados muestran que hubo un aumento significativo ($p < 0{,}001$) en la actividad de AChE en el grupo tratado con ESC en comparación con el grupo de control. Sin embargo, la actividad de AChE sorprendentemente se redujo significativamente en el grupo tratados con **3** ($p < 0.05$), en comparación con el grupo de ESC, y como era esperar en el tratado con donezepilo ($p < 0.01$).

El modelo de ESC crónica ha surgido recientemente como otra alternativa en la evaluación experimental de nuevos agentes para el tratamiento de la EA (*Klinkenberg I y Blokland A,* en *Neurosci Biobehav Rev 2010, 34(8):1307-1350*). En roedores se induce la disfunción cognitiva administrando dosis seriadas de ESC (i.p.) durante 10 días consecutivos, a razón de una administración diaria. Con este modelo, se mantienen algunas características que se manifiestan en el agudo, y aparecen otras que se relacionan mejor con la EA. Así, se produce una degeneración del sistema colinérgico como son; incremento de la

actividad/expresión de la acetilcolinesterasa, una disminución de la actividad/expresión de la enzima de síntesis colinoacetiltransferasa y un déficit en el consumo activo de colina a nivel del terminal presináptico (*Haider, S. et al. en Brain research bulletin, 2016, 127, 234-247*). También ocurre un incremento en la expresión de la proteína precursora amiloide (AβPP) y la presencia de agregados βA y *tau* hiperfosforilada (*Bihaqi SW, et al. en Indian J. Pharmacol. 2012, 44(5): 593-598; Ramandeep K, et al. en Int J Prev Med Res. 2015. Vol. 1, No. 2, pp. 45-64*).

La Figura 9 (Ejemplo no limitativo 4) muestra los resultados de la evaluación conductual de la memoria a largo plazo del compuesto **3** en el modelo de ESC crónico (dosis diaria de 1.5 mg/kg, 2 semanas). El compuesto **3** se suministró tres días antes de la administración de ESC y durante las dos siguientes semanas de ESC. Los resultados del MWM indican el déficit de la memoria de los ratones administrados con ESC. Por otra parte, en el caso de los grupos administrados con el compuesto **3** (1 y 10 mg/kg) el cociente de la primera latencia de escape del ensayo con la plataforma oculta (T7) y el último ensayo con la plataforma visible (T6), disminuye significativamente en comparación con el grupo ESC. Los resultados indican que la dosis de 1 mg/kg se comporta como la dosis de máximo efecto. En resumen, los resultados demuestran que en este modelo se induce una degeneración del sistema colinérgico, evidenciado por el detrimento de la memoria espacial de larga duración en el MWM, el cual se previene con el empleo del compuesto **3**.

Es reconocido que la excitotoxicidad mediada por los receptores de glutamato puede subyacer en la fisiopatología de una serie de anomalías neurológicas, incluida la EA y la enfermedad de Parkinson (EP). El glutamato juega en condiciones fisiológicas normales un papel central en el desarrollo neurológico, la transmisión y la plasticidad sináptica. Asimismo, este neurotransmisor interviene en los procesos de memoria y aprendizaje. En eventos citotóxicos agudos como la hipoxia-isquemia o en enfermedades neurodegenerativas crónicas como el Alzheimer y el Parkinson, las concentraciones de glutamato se elevan en el tejido cerebral, en respuesta a las diferentes noxas, y este fenómeno desencadena la

muerte neuronal, especialmente debido al aumento de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular. Se ha comprobado, sorprendentemente, en ensayos *in vitro* que los compuestos de Fórmula 1 tiene un efecto neuroprotector contra el daño excitotóxico inducido por el glutamato, como se muestra de manera no limitativa en el Ejemplo 5 y la Figura 10. Aquí, las células SH-SY5Y fueron pre-tratadas con el compuesto **3** (1,8-60 µmol/L) por 24 horas, y posteriormente co-incubadas con las mismas concentraciones de **3** y 60 mmol/L de glutamato (24 horas). El compuesto **3** disminuyó significativamente ($p < 0,05$) la muerte neuronal a las concentraciones de 7,5 y 15 µmol/L. Estos resultados sugieren que la neuroprotección podría regular diferencialmente el metabolismo mitocondrial.

La muerte celular excitotóxica es también afectada por otros receptores del sistema glutamatérgico. Así, es posible inducir experimentalmente el daño por la administración de ácido kaínico (AK) o de α-amino-3-hidroxi-5-ácido metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), ambos potentes agonistas del glutamato (*Wang Q, et al. en Mol Neurobiol. 2005, 31:3–16*). Se conoce que la administración en roedores de AK induce convulsiones recurrentes, cambios de comportamiento y degeneración posterior de neuronas, específicamente de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo (*Wang Q, et al. en Mol Neurobiol. 2005, 31:3–16*). La muerte neuronal inducida por AK se acompaña de un aumento de la activación de microglía y astrocitos, incrementando la generación de citocinas inflamatorias (*Chen, Z.et al. en J. Neurobiol., 2005, 62(2), 207-218*). Además, la activación de los receptores AK produce la despolarización de la membrana mitocondrial y como resultado, la alteración de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular (*Brorson, J.R. et al. en J. Neurosci., 1994, 14(1), 187-197*). Como consecuencia, se induce un daño en la función mitocondrial (*Wang, Q. et al. en Mol. Neurobiol., 2005, 31(1-3), 3-16*) y un incremento en la generación de EROS y ENOS, generando EO y estrés nitrosativo (EN), que inducen muerte celular por sus acciones deletéreas neuronales (*Ueda, Y. et al. en Exp. Brain Res. 2002, 147(2), 219-226*).

En nuestra experiencia, en los animales del grupo control AK se observó en los 10 a 20 minutos posteriores a la inyección de AK, inmovilidad, movimientos bucales y faciales y posturas rígidas y en algunos casos convulsiones tónico-clónicas de

intensidad moderada. Durante los próximos 20-60 minutos se observó cabeceo, movimientos repetitivos y levantamientos y caídas y posteriormente, levantamientos y caídas continuas hasta producirse finalmente convulsiones tónico-clónicas más severas. Sin embargo, en los tratados con el compuesto **3** (dosis: 5 y 50 mg/kg) estos efectos sorprendentemente se manifestaron con menor frecuencia e intensidad (Figura 11, Ejemplo no limitativo 6). En la Figura 11 se observa la disminución significativa de la puntuación total (0-120 minutos) de los grupos tratados con **3** (5 y 50 mg/kg), siendo mayor el efecto con la dosis de 50 mg/kg.

Los compuestos de Fórmula I no han sido formulados hasta el momento, por lo que las composiciones farmacéuticas de esta invención son únicas, las cuales tienen en consideración las propiedades físico-químicas de estos compuestos y de manera singular las relaciones en peso de los ingredientes en las composiciones. Así, las formulaciones presentadas garantizan las propiedades de estos agentes terapéuticos multiblancos de acción anticolinérgica, antioxidante, antiglutamatérgica, antiinflamatoria. Estas formulaciones permiten una dosis sostenida en el tiempo, de concentraciones plasmáticas efectivas del principio activo, que aseguran su eficacia, no descrita hasta el momento, y permiten incrementar la adherencia y tolerancia mediante su administración por vía oral, sublingual, parenteral, transdérmica y nasal.

Las formulaciones farmacéuticas de los compuestos de Fórmula I, sus sales, hidratos, enantiómeros, isómeros, metabolitos, profármacos para su administración a humanos, de la presente invención, incluye excipientes adecuados y puede estar en forma sólida, semisólida, gelatinosa o líquida, tales como: comprimidos, cápsulas, suspensiones, emulsiones, soluciones parenterales, parches transdérmicos, soluciones nasales, mucoadhesivos, entre otras. Típicamente, la formulación contendrá de un 0,1 a un 99 %, preferiblemente de un 1 a un 80 % de compuesto activo, junto con el vehículo o componentes de la formulación. Los excipientes son sustancias auxiliares líquidas, sólidas o semisólidas, compuestos de naturaleza orgánica e inorgánica, de origen natural o

sintético, fisiológicamente aceptables y de uso común en la formulación de principios activos.

Una forma farmacéutica de elección en esta invención son los comprimidos, que se administrará al menos una vez al día y contiene un ingrediente terapéuticamente activo seleccionado del grupo de compuestos de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de ellos, y un portador farmacéuticamente aceptable de matriz polimérica sólida, semi-sólida, gelatinosa o líquida. Las formas de dosificación de la invención sostienen la liberación del agente terapéuticamente activo entre 2 a 24 horas cuando dicha forma está expuesta a soluciones acuosas. Tras la administración de dicha formulación, la velocidad de disolución del principio activo es de más de un 80 % entre 6 y 18 horas, y el nivel efectivo en plasma de la droga se mantiene 24 horas. El ingrediente activo está presente en cantidades de aproximadamente de 1 a 100 mg por formulación.

En la presente invención los comprimidos, particularmente, emplean como polímeros: óxido de polietileno, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), carboximetil celulosa sódica (CCNa), derivados de celulosa, Eudragit RS PO, polivinilpirrolidona o combinaciones de ellos. En las formulaciones de liberación modificada de 24 horas, el polímero está presente en cantidades que van desde el 5 % p/p al 80% p/p, preferentemente desde un 10 % a un 70 % p/p. En las formulaciones de liberación modificada de 12 horas, el polímero está presente preferentemente en un 5 % p/p a un 50 % p/p. Las formulaciones se preparan de la forma convencional descrita en la literatura.

En las Figuras 12, 13 y 14 se observan los perfiles de liberación controlada de las tres formulaciones de comprimidos, que no deben ser consideradas como limitativos de esta invención (Ejemplos 7, 8 y 9), para la obtención de comprimidos de los principios activos: (N-[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]-β-alanina (**1**), 6-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino} ácido hexanoico) (**2**) y metil (2-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino}etill)ditio carbamato (**3**). Estas formulaciones contienen 10 mg de principio activo, y otros aditivos como almidón como aglutinante, celulosa microcristalina como disgregante, lactosa como diluyente, dióxido de silicio como deslizante y estereato de magnesio como lubricante, en

diferentes proporciones y se empleó como matrices poliméricas: HMPC, HPC y Eudragit RS PO. En las figuras 12, 13 y 14 se observa que en las tres formulaciones se producen dos fases de liberación dependientes del pH del medio. Así, a los 60 minutos de exposición de los comprimidos (HMPC, HPC y Eudragit RS PO), a un medio ácido no enzimático, la liberación de los principios activos desde la matriz no fue significativa, con menos de un 1 % de principio liberado. En cambio, cuando los comprimidos de las tres formulaciones fueron expuestos a una disolución tampón de pH 7.5, el proceso de liberación de los principios activos aumenta paulatinamente, obteniéndose una entrega casi completa, más del 96 %, al medio durante las 24 horas. Esta liberación ocurre para los tres principios activos ejemplificados como no limitativos.

Estos perfiles de liberación de las tres formulaciones, presentadas con carácter no limitativo de la invención, muestran claramente que al cambiar el pH se produce un incremento de la pendiente en la curva de disolución, lo que significa que se produce una liberación sostenida en el tiempo del principio activo. La implicación de este patrón de liberación para el uso humano, plantea que la liberación se produce en dos etapas en donde se produce un aumento paulatino y moderado de la concentración del principio activo en sangre, reduciendo así los efectos secundarios no deseados. Esto es particularmente eficaz para evitar los posibles efectos secundarios gástricos ya que solo alrededor del 1% del contenido del principio activo se libera en el estómago. Más allá de esto, una liberación lenta fiable, generalmente a intervalos largos de la dosificación, mejora el efecto farmacológico en el paciente lo que incrementa la adherencia al tratamiento y la tolerancia.

En resumen, las formulaciones de los comprimidos de los compuestos de Fórmula I de esta invención tienen un perfil de liberación óptimo. Emplea matrices poliméricas accesibles por lo que los comprimidos pueden ser producidos de una manera simple y económica con la incorporación de componentes fisiológicamente compatibles, que proporciona composiciones de liberación extendida en dos fases, que faciliten la dosificación, sin producir efectos secundarios adversos.

El sistema transdérmico desarrollado en esta invención está constituido por las siguientes capas sucesivas: a) capa externa protectora lipofílica; b) capa que contiene al principio activo de Fórmula I, en forma de gel, suspensión, emulsión, u otro; en donde el compuesto está incorporado a una matriz (que puede ser acrílica), que asegura su almacenamiento efectivo; c) membrana controladora bifacial que libera el principio activo; d) módulo de liberación, que incluye un depósito de principio activo y un sistema controlador de la liberación del fármaco y está constituido generalmente, por un material polimérico (carboximetilcelulosa (CMC), etilcelulosa, gelatina, metilcelulosa, almidón, etc; elastómeros sintéticos: polibutadieno, poliisopreno, neopreno, polisiloxano, etc; polímeros sintéticos: alcohol polivinílico (PVA), polietileno, poliestireno, poliuretano, polivinil pirrolidona (PVP), etc. e) capa adhesiva hipoalergénica, que permite la fijación del parche mediante presión y contiene polímeros acrílicos, silicona hipoalérgica, resinas, aceites minerales, poliisobutileno, etc y f) lámina protectora interna, que se retira antes de aplicar el sistema sobre la piel. El revestimiento de estos parches tópicos garantiza una liberación continua y suave del fármaco, a través de la piel hacia el torrente sanguíneo; sin reacciones adversas. Se declaran dos tipos de parches, de acuerdo a su dimensión y capacidad de dosificación. Uno de un área de 5 cm^2, dosis de 5 mg de principio activo y liberación de 4 mg/día de compuesto. Otro con proporciones y capacidad duplicadas. La terapia inicia con una dosis diaria del parche más pequeño, y luego de una buena tolerancia y un mínimo de 4 semanas, se aplica el parche mayor (10 cm^2, 10 mg/24 h).

La formulación nasal de los compuestos de Fórmula I, sus sales, hidratos, enantiómeros, isómeros, metabolitos, profármacos para su administración a humanos, de la presente invención emplea distintos componentes que funcionan como disolvente, bioadhesivo, preservante, antioxidante y surfactante/humectante. Los excipientes bioadhesivos no limitativos pueden ser: hidroxipropilmetilcelulosa (HMPC), hidroxipropilcelulosa (HPC), metilcelulosa (MC), carboximetilcelulosa (CMC), todos ellos con concentraciones desde un 0.5 a un 7 % y derivados del ácido poliacrilico (carbol) desde un 0.01 a un 1.5%. Como disolvente de los principios activos se utiliza el PEG. Los polímeros bioadhesivos presentan, de

manera no limitativa, una viscosidad de 10 a 60 mPas, con el objetivo de incrementar el tiempo de residencia en la cavidad nasal. Como excipiente preservante antimicrobiano se emplea de preferencia el cloruro de benzalconio de 0.005 a 0.5 % o en combinación con EDTA disódico, en concentraciones de 0.002 a 0.2 % y propilparabeno desde 0.005 a 0.05 %. El pH se ajustó entre 6 y 7.5 empleando disoluciones isotónicas de tampones de fosfatos o citratos. Los agentes isotonizantes pueden ser: cloruro de sodio, manitol, sorbitol, glucosa, entre otros. El antioxidante utilizado de preferencia es el tocoferol desde 0.05 a 2 %. Como agentes humectantes se emplean el glicerol desde 3 a 6%) y el Tween 80 desde 0.1 a 0.4 %, que permiten aumentar la permeabilidad. El disolvente empleado en todos los casos fue agua para inyección.

La administración intranasal es considerada un método para administrar agentes terapéuticos al sistema nervioso central (SNC). La liberación del fármaco se produce en minutos a lo largo de las vías olfativas y las vías neurales del trigémino, rutas extracelulares que no requiere que el fármaco se una a ningún receptor o sistema de transporte axonal (*Thorne, R.G. et al. en Neuroscience. 2002, 127, 481-496*).

La Figura 15 muestra los resultados de la evaluación conductual (prueba de laberinto en Y) del efecto de la administración de la formulación nasal del compuesto **3** sobre la amnesia inducida por la administración aguda de ESC. Como se observa, no existen diferencias entre los grupos controles lo que indica que la formulación empleada no afecta el desempeño de los animales en la prueba del laberinto en Y. Como era de esperar, se observa una disminución significativa ($p < 0.001$) del tiempo de exploración en el brazo novedoso de los animales tratados con ESC en comparación con ambos grupos controles. Sin embargo, los animales del grupo tratado con el compuesto **3** presentan valores similares a los de los grupos controles (salina y vehículo), lo que indica que **3** previene la amnesia inducida por la ESC. La Figura 16 muestra los resultados en la prueba de discrinimación de objeto (PDO). No se observan diferencias significativas en el índice de discriminación (ID) del objeto novedoso entre los

grupos controles y el grupo tratado con **3**. En cambio, en el grupo administrado con ESC, se observa una drástica disminución del ID ($p < 0.001$).

Los resultados de este experimento muestra que la administración aguda de ESC induce disfunción cognitiva tanto en el modelo de laberinto en Y, como en la PDO, de forma análoga a lo observado por otros autores (*de Bruin N, et al., J Neurodegener Dis. 2015; 2015:242505. doi:10.1155/2015/242505*). Junto a ello, la administración intranasal del compuesto **3** previene la disfunción cognitiva en ambos modelos, lo que concuerda con resultados anteriores para este compuesto, administrado por vía oral, en el modelo de ESC aguda y crónico. La administración de **3** vía intranasal permite prevenir los efectos amnésicos de la ESC a dosis inferiores que las empleadas en la vía oral.

Los siguientes ejemplos y figuras, los cuales no deben interpretarse en forma alguna como limitativos de la presente invención, ilustran la acción multiblanco sobre los diferentes mecanismos de los sistemas colinérgico, glutamatérgico y mitocondrial de la formulación farmacéutica de los compuestos de Fórmula I, sus sales, hidratos, enantiómeros, isómeros, metabolitos, profármacos para su administración a humanos.

Descripción del contenido de las figuras

Figura 1: Estructuras y propiedades físico-químicas de algunos de los compuestos de Fórmula I seleccionados para los ejemplos no limitativos de esta invención.

Figura 2: Efecto del compuesto de Fórmula I (N-[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]-β-alanina (**1**) sobre el potencial de membrana de mitocondrias aisladas de hígado de rata.

Figura 3: Efecto de los compuestos de Fórmula I (N-[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]-β-alanina (**1**) sobre el hinchamiento de mitocondrias aisladas de hígado de rata. ***$p < 0.001$. Comparación vs control mediante prueba de la *t-Student*. Se consideró una $p < 0.05$ como diferencia estadísticamente significativa.

Figura 4: Efecto de los compuestos de Fórmula I (N-[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]-β-alanina (**1**) sobre la producción de especies reactivas de oxígeno

en mitocondrias aisladas de hígado de rata. ***p < 0.001. Comparación contra grupo EGTA mediante prueba de la *t-Student*. Se consideró una p <0.05 como diferencia estadísticamente significativa.

Figura 5: Efecto modulador anticolinérgico del compuesto metil (2-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino}etill)ditio carbamato (**3**) en un modelo de pérdida de memoria inducida por una administración aguda de escopolamina (ESC). Memoria espacial de corto término en el laberinto en Y posteriores a la sesión de adquisición de los grupos control, ESC y tratados a dosis simples con **3** (0.1, 1, 10 y 20 mg/kg, i.p.). * p < 0.05, ** p < 0.01, ***p < 0.001. Análisis de varianza de una vía seguido de la prueba *post-hoc* de Turkey.

Figura 6: Efecto modulador anticolinérgico del compuesto metil (2-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino}etill)ditio carbamato (**3**) en un modelo de pérdida de memoria inducida por una administración aguda de escopolamina (ESC). Tiempo de permanencia en el brazo novedoso, posterior a la sesión de entrenamiento de los grupos control, ESC y tratados con **3** a dosis de 0.1, 1, 10 y 20 mg/kg. * p < 0.05, comparación vs grupo control. ≈ p < 0.05, comparación vs ESC. Análisis de varianza de una vía seguido de la prueba *post-hoc* de Turkey.

Figura 7: Efecto modulador anticolinérgico del compuesto metil (2-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino}etill)ditio carbamato (**3**) en un modelo de pérdida de memoria inducida por una administración aguda de escopolamina (ESC). Panel superior: Desempeño en el MWM en el protocolo de dos días de los diferentes grupos experimentales. Paneles inferiores: Memoria espacial de largo termino, latencia de escape del último ensayo con la plataforma visible (D1T4); latencia de escape del primer ensayo con la plataforma visible (D2T1). ** p < 0.01, *** p < 0.001, comparación vs grupo ESC. ≈ p < 0.05, comparación vs grupo control. Análisis de varianza de una vía seguido de la prueba *post-hoc* de Turkey.

Figura 8. Efecto modulador anticolinérgico del compuesto metil (2-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino}etill)ditio carbamato (**3**) en un modelo de pérdida de memoria inducida por una administración aguda de escopolamina (ESC). Actividad anticolinesterásica en fracciones solubles de homogenados de cerebros de animales provenientes del modelo de ESC aguda del grupo control, grupo tratado con ESC y los grupos tratados con metil (2-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino} etil)ditiocarbamato (**3**) y donezepilo. Las barras se corresponden al valor promedio ± EEM, n= 10 animales/grupo. *** p < 0.001, comparación vs grupo control. ≈ p < 0.05, ≈≈ p < 0.01, comparación vs grupo ESC. Se consideró una p <0.05 como diferencia estadísticamente significativa. Prueba estadística utilizada: análisis de varianza de una vía seguido de la prueba *post-hoc* de Turkey.

Figura 9: Efecto modulador anticolinérgico del compuesto metil (2-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino}etill)ditio carbamato (**3**) en un modelo de pérdida de memoria inducida con el empleo de Escopolamina crónica. *** p < 0.001,

comparación vs grupo control. ≈ p < 0.05, ≈≈ p < 0.01, comparación vs grupo ESC. Análisis de varianza de una vía seguido de la prueba *post-hoc* de Turkey.

Figura 10. Efecto neuroprotector del compuesto metil (2-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino} etil) ditiocarbamato (**3**) sobre el daño excitotóxico inducido por glutamato, en la línea celular SH-SY5Y. Las células SH-SY5Y se trataron con diferentes concentraciones del compuesto **3** (1.8 - 60 µmol/L), durante 24 horas, luego el medio se reemplazó por medio nuevo que contenía el compuesto nuevamente y el glutamato 60 mmol/L. Controles: células no tratadas (NT) y glutamato (Glut). La viabilidad se determinó mediante el ensayo MTT. Metil (2-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino}etill)ditio carbamato disminuyó significativamente la muerte celular generada por el glutamato a las concentraciones (7,5 y 15 µmol/L). Cada barra representa la media ± EEM, n = 3. Se consideró una p <0.05 como diferencia estadísticamente significativa.

Figura 11. Efecto neuroprotector del compuesto metil (2-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino}etill)ditio carbamato (**3**) sobre las convulsiones inducidas por la administración icv de ácido kainico, expresado como puntuaciones finales (0-120 minutos) de los diferentes grupos de animales. Las barras representan el valor medio ± EEM, n= 7 por grupo. *p < 0.05; **p < =.001. Comparación vs grupo control. Análisis de varianza de una vía seguido de la prueba *post-hoc* de Turkey. Se consideró como diferencia estadísticamente significativa un valor de p < 0.05.

Figura 12: Perfiles de liberación de la Formulación 1 de comprimidos de los compuestos: (N-[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]-β-alanina (**1**) y metil (2-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino}etill)ditio carbamato (**3**), sin enzimas a pH 1.2, a pH 7.5 y a cambio de pH de 1.2 a 7.5, durante 18 horas.

Figura 13: Perfiles de liberación de la Formulación 2 de comprimidos de los compuestos: 6-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino} ácido hexanoico) (**2**) y metil (2-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino}etill)ditio carbamato (**3**), sin enzimas a pH 1.2, a pH 7.5 y a cambio de pH de 1.2 a 7.5, durante 18 horas.

Figura 14: Perfiles de liberación de la Formulación 3 de comprimidos del compuesto: metil (2-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino}etill)ditio carbamato (**3**), sin enzimas a pH 1.2, a pH 7.5 y a cambio de pH de 1.2 a 7.5, durante 18 horas.

Figura 15. Efecto de la administración de dosis únicas por vía intranasal (7.2 mg/kg) del compuesto **3** sobre la amnesia inducida por la administración aguda de escopolamina (1.5 mg/kg, i.p.) en la prueba del laberinto en Y. Las barras representan al valor medio ± EEM del tiempo de permanencia en el brazo novedoso, n = 10 animales/grupo. *** p < 0.001; comparación vs grupo control salina y control vehículo. ≈≈ p < 0.01. Comparación vs grupo ESC. Prueba de ANOVA simple seguido de la prueba de las comparaciones múltiples de Turkey.

Figura 16. Efecto de la administración de dosis únicas por vía intranasal (74 µg/kg) del compuesto **3** sobre la amnesia inducida por la administración aguda de escopolamina (1.5 mg/kg., i.p.) en la prueba de discriminación de objeto. Las barras representan al valor medio ± EEM del índice de discriminación, n = 10 animales/grupo. *** $p < 0.001$; comparación vs grupo control salina y control vehículo. ≈≈≈ $p < 0.001$. Comparación vs grupo escopolamina. Prueba de ANOVA simple seguido de la prueba de las comparaciones múltiples de Turkey.

A continuación, se exponen los ejemplos para tres de los compuestos de la Fórmula I, los cuales no deben interpretarse en forma alguna como limitativos de la presente invención.

Ejemplo 1. Evaluación del efecto del compuesto de Fórmula 1 (N-[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]-β-alanina (1) en el potencial de membrana, hinchamiento y producción de especies reactivas de oxígeno en mitocondrias aisladas de hígado de rata.

Aislamiento de las mitocondrias de ratas: Las mitocondrias se aislaron por el método clásico de centrifugación diferencial a partir del hígado de ratas Wistar machos (*Mirandola SR, et al., en J Neurosci Res 2010; 88: 630–39*).

Procedimientos de incubación: Las mitocondrias se energizaron con 5 mmol/L de succinato de potasio (más 2.5 µmol/L rotenona) en un medio de incubación estándar que contenía 125 mmol/L de sacarosa, 65 mmol/L de KCl y 10 mmol/L de HEPES-KOH, pH 7.4, a 30°C.

Ensayos mitocondriales

El potencial de membrana mitocondrial y las EROS se determinaron mediante espectrofotometría, utilizando como sondas fluorescentes, respectivamente, a la safranina (10 µmol/L) (Zanotti A., y Azzone G.F. *en Archives of Biochemistry and Biophysics 1980, 201(1), 255-265*) y al Rojo Amplex (Molecular Probes, OR, Eugene) en presencia de peroxidasa de rábano (1 UI/mL) (Votyakova and Reynolds, *en J Neurochem. 2001, 79(2), 266-77*). Las mediciones fueron realizadas en un espectrofotómetro de fluorescencia Hitachi, modelo F-4500 (Tokyo, Japan) a λ_{exc} 495/λ_{em} 586 nm (safranina) y a λ_{exc} 563/λ_{em} 587 nm (Rojo Amplex). Estos experimentos se desarrollaron en presencia de 0.1 mmol/L de EGTA y el compuesto evaluado fue N-[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]-β-alanina (**1**) en un rango de concentraciones de 0.1 a 100 µmol/L. El hinchamiento

mitocondrial se estimó espectrofotométricamente a partir de la disminución de la absorbancia a 540 nm, utilizando un espectrofotómetro Hitachi, Modelo U-2910 (Japón).

Análisis de los datos: En todos los casos se evaluó la distribución normal y homogeneidad de varianzas de los datos mediante las pruebas de Kolmogorov Smirnov y Levene, respectivamente. La comparación de las variables de funcionalidad mitocondrial se realizaron mediante una prueba *t-Student*. Se trabajó con un nivel de significación de 0.05 y para el análisis de los datos se empleó el programa Statistica 8.0 (StatSoft Ink). Las representaciones gráficas de los resultados fueron realizadas en el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, California, EEUU).

Ejemplo 2. Evaluación del efecto modulador anticolinérgico del compuesto metil (2-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino}etill)ditio carbamato (3) en un modelo de pérdida de memoria inducida con el empleo agudo de Escopolamina.

Animales

Se emplearon ratones OF-1 machos jóvenes (20-25 g), suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales Laboratorios (CENPALAB, Cuba). Antes del experimento, los animales fueron adaptados durante siete días a las condiciones de laboratorio (temperatura controlada 25 ± 2ºC, humedad relativa 60 ± 10% y ciclos luz/oscuridad de 12 h). En este período, y durante la realización del experimento, los animales recibieron agua *ad libintum* y dieta estándar para roedores suministrados por CENPALAB. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices de la Comisión Europea para el uso y cuidado de animales de laboratorio y aprobado por el Comité para el Cuidado de Animales en Investigación. Se empleó el número mínimo de animales y de duración de las observaciones requeridas para obtener datos consistentes.

Diseño experimental.

Al concluir el período de adaptación, los animales se distribuyeron aleatoriamente de acuerdo con sus pesos corporales en 5 grupos experimentales de 12 animales por grupo. Para la inducción del déficit cognitivo se empleó bromohidrato de escopolamina (ESC, Sigma Aldrich), el cual se disolvió en solución salina

fisiológica y se administró por vía intraperitoneal (i.p.) a dosis de 1.5 mg/kg, 30 minutos antes de la prueba *(Miranda HF et al. en. J. Biomed. Sci., 2014 21(1): 62-62*). Las dosis empleadas del compuesto **3** fueron 0.1, 1, 10 y 20 mg/kg de peso corporal. El compuesto se formuló con el empleo de carboximetilcelulosa (CMC). El esquema de administración se diseñó del siguiente modo:

Grupo 1 (control negativo) con función cognitiva normal. Dos administraciones con un intervalo de 30 minutos con vehículo (CMC al 5%) por vía oral y solución salina por via i.p., respectivamente.

Grupo 2 (control positivo) con disfunción cognitiva. Dos administraciones con un intervalo de 30 minutos, la primera con vehículo (CMC al 5 %), la segunda con ESC 1 mg/kg.

Grupo 3, 4, 5 y 6 tratados con **3** (0.1, 1, 10 y 20 mg/kg). Dos administraciones con un intervalo de 30 minutos, la primera con **3** a la dosis correspondiente a cada grupo, la segunda con ESC 1 mg/kg. La evaluación conductual se realizó 30 minutos posteriores a esta segunda administración.

Pruebas conductuales

Laberinto en Y

El estudio de la memoria de espacial de corto término se realizó a través del estudio de la preferencia espacial novedosa, empleando el paradigma conductual laberinto en Y (40 cm de largo x 9 cm de ancho x 16 cm de alto) con pistas extra laberínticas alrededor del laberinto. La prueba consistió en dos ensayos separados por un intervalo de 2 h. En la primera prueba de entrenamiento (adquisición), los ratones se colocaron en el centro del laberinto y mirando hacia el final de uno de los brazos cuya selección fue aleatoria. Luego de ser colocados, se les permitió explorar el laberinto durante 10 minutos con uno de los brazos cerrado (brazo novedoso). Al terminar este ensayo, los ratones fueron devueltos a su jaula original hasta la segunda prueba (recuperación), durante la cual pudieron explorar libremente los tres brazos del laberinto durante 5 minutos. El tiempo total de permanencia (exploración) en cada brazo se midió y analizó a partir de grabaciones de video. La entrada al brazo se definió como la entrada de las cuatro

patas del animal en dicho brazo. El tiempo de permanencia (seg) en cada brazo durante la prueba de recuperación de la tarea aprendida se empleó para el análisis estadístico. El laberinto se limpió con etanol al 70% entre los ensayos. Todos los ratones fueron transportados a la sala de pruebas conductuales en sus jaulas de origen al menos 1 día antes de la prueba. Los experimentos se realizaron entre las 8:00 am y las 12:30 pm.

Laberinto acuático de Morris (MWM).

La experiencia se realizó durante dos días; un primer día de entrenamiento y un segundo día de prueba. Todos los ratones fueron transportados a la sala de pruebas conductuales en sus jaulas de origen al menos 1 día antes de la prueba y los experimentos se realizaron entre las 8:00 am y las 12:30 pm. Los animales se entrenaron según el criterio en una serie de ensayos de plataforma visible el día 1 (D1) en una piscina de 120 cm de diámetro y 51 cm de profundidad con la temperatura del agua de 24 ± 2 ° C, en la que se colocaron señales visuales de alto contraste en la pared en cada cuadrante y señales externas en la sala. La fase de entrenamiento comprendió cuatro pruebas con la plataforma visible (V1-V4) y se consideró la última prueba como su latencia basal de escape posterior a la habituación. Esta se denominó D1V4 (día 1, plataforma visible de prueba 4). El entrenamiento de los animales se escalonó en tiempo para que cada ratón tuviese el mismo intervalo entre ensayos, es decir 30 ± 10 minutos entre cada prueba y se inició en cada ocasión desde diferentes posiciones del laberinto seleccionadas aleatoriamente. Con el objetivo de hacer visible la plataforma, esta se identificó con un objeto de alto contraste con respecto al fondo del tanque. Los animales que no pudieron escapar en 1 minutos fueron guiados manualmente hacia la plataforma y se les permitió permanecer sobre ella durante 5-10 seg antes de ser retirados. Posteriormente, fueron secados y colocados en sus respectivas jaulas alumbradas con una luz incandescente para evitar la hipotermia. 24 horas posteriores a la última prueba de plataforma visible (D2), los animales se evaluaron en una serie de tres ensayos con la plataforma oculta (T1-T3). Los ensayos se realizaron cada 30 minutos y cada prueba tuvo un máximo de 1 minuto de duración. Para todas las pruebas la plataforma permaneció en el mismo lugar.

Análisis estadístico.

Todos los datos se expresan como la media ± error estándar de la media (EEM). Los datos del laberinto acuático de Morris se analizaron de dos maneras. Las latencias de escape en la fase de entrenamiento con la plataforma visible se analizaron mediante un ANOVA de dos factores (tratamiento x ensayo). Para el estudio de la memoria a largo término, se utilizó el último valor de latencia de escape de la fase de entrenamiento con la plataforma visible (D1V4) y el primer valor de la prueba con la plataforma oculta realizada 24 h después (D2T1). Los ratones con capacidad intacta de memoria a largo plazo, deben llegar rápidamente a la plataforma oculta en la primera prueba. Se generó un sistema de puntuación con la diferencia D2T1-D1V4 y con el cociente D2T1/D1V4. La puntuación D2T1-D1V4 para un sujeto exitoso debe ser cercana a 0, y la puntuación D2T1/D1V4 alrededor de 1 o menor. Los valores mayores indican una latencia de escape más prolongada después de las 24 h, lo que implica un déficit en el desempeño espacial de los animales. Esta comparación se realizó mediante un análisis de varianza de una vía, seguido de la prueba *post-hoc* de Turkey. El análisis de los datos del laberinto en Y también se realizó mediante la misma prueba anterior. Se consideró una $p < 0.05$ como diferencia estadísticamente significativa. El análisis estadístico se realizó mediante GraphPadPrism versión 5 (GraphPad Software, Inc, San Diego, EE. UU.).

Ejemplo 3. Evaluación del efecto modulador anticolinérgico del compuesto metil (2-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino}etill)ditio carbamato (3) en un modelo de pérdida de memoria inducida con el empleo agudo de Escopolamina a través de la actividad de la AChE en homogenados de cerebro total.

La actividad de AChE en el cerebro de los ratones fue determinada de acuerdo con el ensayo colorimétrico de Ellman et al. (*Ellman GL, et al. en Biochem Pharmacol., 1961; 7: 88–95*) adaptado para determinar actividad de la enzima en el sobrenadante de homogenados de cerebro. Brevemente el procedimiento fue el siguiente; al finalizar los experimentos conductuales, los ratones fueron anestesiados y decapitados para extraer rápidamente los cerebros, que se colocaron en una placa helada. Se pesaron y homogeneizaron (1/10, p/v) en

tampón Tris-HCl 10 mmol/L frío, pH 7.2, que contenía sacarosa 160 mmol/L. Los homogeneizados se centrifugaron a 10 000 X G durante 10 minutos a 4 ° C, y los sobrenadantes transparentes resultantes se utilizaron como fuentes de enzimas, los cuales se dividieron en alícuotas (n = 10 por grupo) y se almacenaron a -20 ° C. El ensayo se realizó en placas de microtitulación de 96 pocillos usando el reactivo de Ellman (DTNB 10 mmol/L), 50 µL de homogenado y 10 µL de loduro de acetilcolina (AChl, 20 mmol/L) (volumen final 200 µL). La absorbancia del hidrolizado amarillo del dianión del ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (coeficiente de extinción molar: 13 700 mol/L^{-1} cm^{-1}), se midió a 412 nm, durante 20 minutos con un intervalo de 1 minuto. La actividad de AChE se realizó por triplicado y se expresó en nmol de Achl hidrolizado por minuto por mg de proteína. Las concentraciones de proteína se determinaron mediante el método de Lowry modificado (*Markwell MAK et al. en Anal. Biochem. 1978, 87(1): 206-210*).

Análisis estadístico.

Todos los datos se expresan como la media ± error estándar de la media (EEM). La comparación de los valores de actividad colinesterasa fueron realizados mediante un análisis de varianza de una vía, seguido de la prueba *post-hoc* de Turkey. El análisis estadístico se realizó mediante GraphPadPrism versión 5 (GraphPad Software, Inc, San Diego, EE. UU.).

Ejemplo 4. Evaluación del efecto modulador anticolinérgico del compuesto metil (2-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino}etill)ditio carbamato (3) en un modelo de pérdida de memoria inducida con el empleo crónico de Escopolamina.

Animales:

Se emplearon ratones C57BL/6 machos (20-25 g), suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales Laboratorios (CENPALAB, Cuba). Durante la realización del experimento, los animales recibieron agua *ad libitum* y dieta estándar suministrados por CENPALAB. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices de la Comisión Europea para el uso y cuidado de animales de laboratorio y aprobado por el Comité para el Cuidado de

Animales en Investigación. Se empleó el número mínimo de animales y de duración de las observaciones requeridas para obtener datos consistentes.

Diseño experimental.

Al concluir el período de adaptación, los animales se distribuyeron aleatoriamente de acuerdo con sus pesos corporales en cinco grupos experimentales de 12 animales cada uno. Para la inducción del déficit cognitivo se empleó ESC (Sigma Aldrich), el cual se disolvió en solución salina fisiológica y se administró diariamente por vía intraperitoneal (i.p.) a dosis de 1.5 mg/kg durante 2 semanas, en el horario de la mañana (*Park JH, et al. en J Mol Neurosci. 2016; 59(4):579-589*). El compuesto **3** fue preparado en forma de suspensión, en almidón soluble 0.5% (Merck Millipore), y administrado por vía oral mediante cánula intragástrica a dosis diaria de 0.1, 1, 10 mg/kg de peso corporal (0.01 mL/kg). Los grupos experimentales fueron:

Grupo 1 (control negativo) con función cognitiva normal. Administraciones diarias del vehículo: almidón 0.5 % (oral) y de solución salina fisiológica (i.p.) durante dos semanas.

Grupo 2 (control positivo) con disfunción cognitiva. Administraciones diarias de ESC 1.5 mg/kg durante dos semanas y de vehículo (almidón 0.5 % por vía oral).

Grupo 3, 4, 5 La administración del compuesto **3** se inició cuatro días antes del inicio de la administración de ESC. Los animales de cada grupo fueron tratados con **3** por vía oral a dosis de 0.1, 1 y 10 mg/kg, respectivamente. La administración diaria de ESC (1.5mg/kg) se llevó a cabo durante dos semanas. Al concluir este tratamiento, se inició la evaluación conductual.

Laberinto acuático de Morris (MWM): De manera análoga al ejemplo 2, se empleó el ensayo MWM de dos días para determinar la memoria espacial de larga duración. En este caso como se empleó un tanque de 1.35 m de diámetro, se realizaron seis ensayos en el período de entrenamiento (D1V1 a D1V6), y tres ensayos a las 24 h posteriores (D2T1 a D2T3). De esta manera se determinó la memoria espacial de largo termino mediante el cociente de los valores de la latencia de escape D2T1/D1V6.

Análisis estadístico.

Para el análisis de los datos de la memoria a largo término se realizó un procedimiento estadístico similar al del Ejemplo no limitativo 2, con ayuda del programa GraphPadPrism versión 5 (GraphPad Software, Inc, San Diego, EE. UU.).

Ejemplo 5. Efecto neuroprotector del compuesto metil (2-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino}etill)ditio carbamato (3) sobre el daño excitotóxico inducido por glutamato, en la línea celular SH-SY5Y.

El compuesto 3 fue disuelto en DMSO a una concentración de 100 mmol/L, y posteriormente se distribuyó en alícuotas y se almacenó a -20 °C. El medio RPMI 1640 (1X) + GlutaMax (Gibco Laboratorios Life Technologies, Inc.; Rockville, MD, USA), que contiene tampón HEPES (25 mmol/L) y L-glutamina (2 mmol/L), fue suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), 1 % de piruvato de sodio (100 mmol/L), 1% de la mezcla de antibióticos penicilina (10,000 U/mL)-estreptomicina (10 mg/mL), 1% de gentamicina (10 mg/mL), Tripsina-EDTA (0.25 %) y solución salina tamponada de fosfato (DPBS 1X). El bromuro de 3-(4,5 dimetil-2-tiazoil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT), dimetilsulfóxido (DMSO) y ácido glutámico fueron Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Cultivo celular: Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC CRL-2266) crecieron en frascos T-75 cm^2 con el medio de cultivo RPMI 1640 que contiene tampón HEPES (25 mmol/L) y L-glutamina (2 mmol/L) suplementado con el 10 % de suero fetal bovino (SFB), previamente inactivado por calor, piruvato de sodio 1 mmol/L, mezcla de antibióticos bencilpenicilina (100 U/mL) y estreptomicina (100 µg/mL). Además se le adicionó gentamicina (100 µg/mL) denominándose entonces medio completo (MC). El cultivo se incubó en una atmósfera húmeda de 5% CO_2, 95 % aire y una temperatura de 37 °C. El medio se cambió cada dos días y las células fueron subcultivadas cada cinco días por tripsinización a una densidad de 4-5 x 10^6 células/frasco 75 cm^2 para trabajo experimental y/o subcultivo de una nueva generación de células para posterior uso.

Citotoxicidad de metil (2-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino}etill)ditio carbamato (**3**): Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y fueron cultivadas

en RPMI 1640 (MC) incubadas a 37 °C en una atmósfera de CO_2 5 % y aire 95 %. Cuando alcanzaron una confluencia entre el 80-90 %, se tripsinizan con una mezcla de Tripsina/EDTA 0.25 % (1 mL/25 cm^2) durante 2-3 minutos para despegar las células. Luego esta suspensión es neutralizada con igual volumen de MC. Posteriormente, fueron centrifugadas a 112 X G durante 8 minutos, el sobrenadante se eliminó por decantación y el precipitado se resuspendió en 1 mL de medio completo para realizar el contaje en el hemocitómetro.

Una vez conocida la densidad celular se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos (200 µL en cada pozo) a una concentración de 80 x 10^4 células/pozo transcurridos 24 horas de incubación se eliminan 100 µL de sobrenadante en cada pozo y posteriormente se adicionan 100 µL del compuesto **3**, preparado en MC a diferentes concentraciones (0.93; 1.87; 3.75; 7.5; 15; 30; 60 y 100 µmol/L) e incubadas nuevamente durante 24 horas bajo condiciones de CO_2 5 %, aire 95 % a 37ºC. Transcurrido el tiempo de incubación, se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo del MTT.

Neuroprotección del metil (2-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino}etill)ditio carbamato frente a muerte neuronal inducida por glutamato: Para evaluar el efecto neuroprotector del compuesto **3** se procedió al cultivo de la línea celular SH-SY5Y hasta alcanzar una confluencia entre el 80-90 %, las células fueron tripzinisadas y posteriormente contadas en el hemocitómetro. Una vez conocida la densidad celular se sembraron en una placa de cultivo de 96 pocillos (200 µL en cada pozo) a una concentración de 80 x 10^4 células/pozo. Posteriormente, transcurridos 24 horas de incubación a 37°C en un ambiente húmedo al 5 % de CO_2 se elimina 100 µL de sobrenadante en cada pozo y se adiciona 100 µL del compuesto **3** preparado en medio completo a diferentes concentraciones (0.93; 1.87; 3.75; 7.5; 15; 30; 60 µmol/L) e incubadas nuevamente durante 24 horas bajo condiciones de CO_2 5 %, aire 95 % a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación se elimina 100 µL de sobrenadante en cada pozo y se adiciona 100 µL de la mezcla del compuesto **3** recién preparado a iguales concentraciones que el día anterior y 60 mmol/L de ácido glutámico recién preparado en medio completo e incubadas nuevamente durante 24 horas bajo condiciones de CO_2 5 %, aire 95 % a 37°C.

Transcurrido el tiempo de incubación se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo del MTT.

Viabilidad celular. Ensayos de MTT: La viabilidad celular fue medida a través de los productos azules formazán obtenidos de la transformación enzimática del MTT (del inglés: "3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2Htetrazoliumbromide") por las deshidrogenasas mitocondriales, las cuales son activas solamente en células viables. El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos, las células fueron expuestas a glutamato como agente estresante, al compuesto **3** o a ambos a distintos tiempos y concentraciones. Luego de ser sometidas a los distintos tratamientos se les adicionó el MTT (recién preparado a 5 mg/mL en MC) fue añadido 50 µL/pozo e incubado por 4 horas en una atmosfera de CO_2 5 %, aire 95 % a 37^0C. Después fue añadido en cada pozo 100 µl de isobutilalcohol (SDS 10 %, 2-butanol 50 %, 0.25 µL HCl 2 mmol/L) para solubilizar los cristales de formazán, y la densidad óptica de cada pozo fue medida antes de los 30 minutos a 570 nm en un espectrofotómetro Clariostar (BMG Labtech. La corrección de los valores de DO se realizó a 690 nm. Se realizó tres réplicas por cada experimento. Los resultados se expresaron como el porciento de densidad óptica de cada variante experimental en relación a la densidad óptica obtenida para el grupo de células no tratadas con glutamato.

Ejemplo 6 Efecto neuroprotector del compuesto metil (2-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino}etill)ditio carbamato (3) sobre las convulsiones inducidas por la administración icv de ácido kainico.

Animales y grupos experimentales.

Se emplearon ratones OF-1 machos jóvenes (20-25 g), suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales Laboratorios (CENPALAB, Cuba). Las condiciones de adecuacion y de mantenimiento de los animales antes de realizar el experimento fueron similares a las desarrolladas en el Ejemplo no limitativo 2. Los ratones fueron divididos en 5 grupos experimentales (7 animales/grupo) distribuidos en: un grupo control (PBS 2 µL icv), un grupo control de convulsiones (AK 2 µL, icv) y tres grupos tratados por vía oral mediante canulación gástrica con el compuesto **3** a dosis de 1, 5, 50 mg/kg (0.01 mL/kg) y AK 2 µL, icv. El compuesto **3** fue preparado en forma de suspensión en vehículo

carboximetilcelulosa (CMC) al 5%. La administración de **3** y del vehículo en los grupos controles fue realizada 1 h antes de la inyección icv de AK. A todos los animales se les administró AK (Sigma Aldrich) preparado en PBS a una concentración de 0.5 mg/mL.

Administración icv de AK.

Para la administración icv de AK los ratones fueron anestesiados con 685.71 mg/kg con hidrato de cloral i.p. y colocados en un manipulador dual. El marco estereotáxico y el cráneo quedó expuesto. Las coordenadas estereotáxicas para el ventrículo lateral se midieron con precisión como: anteroposterior −0.8 mmol/L, lateral ± 1.0 mmol/L y dorsoventral −3.0 mmol/L relativo a bregma y ventral de dura con la barra de dientes en 0 mmol/L. Se hizo un orificio de rebaba en el cráneo mediante microperforación automática unida a un brazo del aparato estereotáxico. A través del orificio, se colocó una jeringa Hamilton® de calibre 28 de 10 µL, unida a otro brazo del aparato estereotáxico, y el pistón de la jeringa se bajó manualmente al ventrículo lateral derecho vaciando su contenido por espacio de 3 minutos.

Observaciones conductuales

La puntuación de las convulsiones se realizó según la escala de Racine (R.J. Racine, en *Clin. Neurophysiol. 1972, 32 281–294*) utilizando los siguientes criterios de medida: (1) inmovilidad, movimientos de la boca y la cara; (2) extensión de la extremidad anterior y/o extensión de la cola, postura rígida; (3) movimientos repetitivos, balanceo de la cabeza; (4) empinamientos y caída; (5) empinamientos y caídas continuas; (6) convulsiones tónico-clónico severas; (7) muerte. Cada animal fue observado por dos observadores independientes y se cuantificaron las conductas durante 2 horas. La sumatoria de la puntuación acumulada por cada animal durante este intervalo de tiempo, se empleó para el análisis estadístico.

Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como la media ± error estándar de la media (EEM), y se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía seguido de la prueba *post-hoc* de Turkey. Para la comparación entre grupos, se empleó la media de la puntuación acumulada por cada grupo experimental al cabo de las 2 h de haberse

realizado la administración icv del AK. Se consideró una $p < 0.05$ como diferencia estadísticamente significativa. El análisis estadístico se realizó mediante GraphPadPrism versión 5 (GraphPad Software, Inc, San Diego, EE. UU.).

Ejemplo 7. Fórmula 1 de fabricación de comprimidos con hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) de los principios activos N-[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]-β-alanina (1) y metil (2-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino}etill)ditio carbamato (3).

Todos los componentes se pesaron de acuerdo a las cantidades requeridas en la fórmula. El principio activo y la matriz polimérica se tamizaron a través de una malla de cribado No. 40 y posteriormente, mezclados durante cinco minutos a 30 rpm. A continuación, se les adicionó, cada 15 minutos, el resto de los componentes a una velocidad de 50 rpm, hasta obtener una mezcla homogénea. Luego, la mezcla se comprime en una máquina rotativa de alta velocidad, empleando troqueles planos, biselados y no ranuradas.

Las tabletas obtenidas fueron lisas y uniformes, la variación del peso es menor al 1%, de dureza adecuada (4,51 ± 0,37 kgf), con buena resistencia a la abrasión, tiempo de desintegración adecuado y el contenido del principio activo se encontraba entre un 90 y un 110%.

El tratamiento estadístico de los perfiles de liberación del principio activo desde las matrices hidrofílicas en estudio, se realizó mediante el *software* Origin 5.0 con un nivel de confianza de 95%.

Fórmula 1 de fabricación por comprimido:

Componentes	**Peso (mg)**	**%**
Principio activo	10	10
HPMC	25	25
Lactosa monohidratada	9	9
Almidón	21	21
Celulosa microcristalina	32	32
Dióxido de silicio	1.5	1.5
Estearato de magnesio	1.5	1.5
Peso de la tableta (mg)	100	100

Ejemplo 8. Fórmula 2 de fabricación de comprimidos con hidroxipropilcelulosa (HPC) de los principios activos N-[4-(1-naftilamino)-4-

oxobutanoil]-β-alanina (1) y metil (2-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino}etill)ditio carbamato (3).

Todos los componentes se pesaron de acuerdo a las cantidades requeridas en la fórmula. El principio activo y la matriz polimérica se tamizaron a través de una malla de cribado No. 40 y posteriormente, mezclados durante 5 minutos a 30 rpm. A continuación, se les adicionó, cada 15 minutos, el resto de los componentes a una velocidad de 50 rpm, hasta obtener una mezcla homogénea. Luego, la mezcla se comprime en una máquina rotativa de alta velocidad, empleando troqueles planos, biselados y no ranuradas.

Las tabletas obtenidas fueron lisas y uniformes, la variación del peso es menor al 1%, de dureza adecuada (4,51 ± 0,37 kgf), con buena resistencia a la abrasión, tiempo de desintegración adecuado y el contenido del principio activo se encontraba entre un 90 y un 110%.

El tratamiento estadístico de los perfiles de liberación del principio activo desde las matrices hidrofílicas en estudio, se realizó mediante el *software* Origin 5.0 con un nivel de confianza de 95%.

Fórmula 2 de fabricación por comprimido:

Componentes	**Peso (mg)**	**%**
Principio activo	10	10
Hidroxipropilcelulosa (HPC)	30	30
Lactosa monohidratada	8	8
Almidón	20	20
Celulosa microcristalina	30	30
Dióxido de silicio	1	1
Estearato de magnesio	1	1
Peso de la tableta (mg)	100	100

Ejemplo 9: Fórmula 3 de fabricación de comprimidos con EUDRAGIT y lactosa del principio activo metil (2-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino}etill)ditio carbamato (3).

Todos los componentes se pesaron de acuerdo a las cantidades requeridas en la fórmula. El principio activo y la matriz polimérica se tamizaron a través de una malla de cribado No. 20 y posteriormente, mezclados durante 5 minutos a 30 rpm. A continuación, se les adicionó, cada 15 minutos, el resto de los componentes a una velocidad de 50 rpm, hasta obtener una mezcla homogénea. Luego, la mezcla se comprime en una máquina rotativa de alta velocidad, empleando troqueles planos, biselados y no ranuradas.

Las tabletas obtenidas fueron lisas y uniformes, la variación del peso es menor al 1%, de dureza adecuada (5,01 ± 0,68 kgf), buena resistencia a la abrasión, tiempo de desintegración adecuado y el contenido del principio activo se encontraba entre un 90 y un 110%

El tratamiento estadístico de los perfiles de liberación del principio activo desde las matrices hidrofílicas en estudio, se realizó mediante el *software* Origin 5.0 con un nivel de confianza de 95%.

Fórmula 3 de fabricación por comprimido:

Componentes	**Peso (mg)**	**%**
Principio activo	10	10
EUDRAGIT RS PO	39	39
Lactosa monohidratada	40	40
Celulosa microcristalina	9	9
Dióxido de silicio	1	1
Estearato de magnesio	1	1
Peso de la tableta (mg)	100	

Ejemplo 10: Formulación nasal de metil (2-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino}etill)ditio carbamato (3)

Disolución **A**: El compuesto **3** se solubiliza en PEG 400, Tocoferol y glicerol.

Disolución **B**: El HPMC se resuspende en el 40% del agua, hasta su total disolución con agitación y calor (80 ºC).

Disolución **C**: En el 60% de agua se disuelven el cloruro de benzalconio, el NaH_2PO_4, Na_2HPO_4, NaCl, EDTA, y el Tween 80. Se comprueba que el pH se mantiene en 6.3.

A continuación se unen las disoluciones **B** y **C** y se agitan hasta obtener una disolución homogénea. Luego, se adiciona lentamente a esta disolución, la disolución **A**, agitando y finalmente, se filtra a través de una membrana de 0.2 µmol/L.

Componentes	**Concentración (mg/mL)**
Compuesto activo **3**	6
PEG 400	3
HPMC	5
Cloruro de benzalconio	0.2
NaH_2PO_4	2
Na_2HPO_4	0.7
NaCl	7.4
Tween 80	0.25
EDTA	0.15
Glicerol	5
agua	completar hasta volumen final de 1 mL

Ejemplo 11: Formulación nasal de 1 (N-[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]-β-alanina (1)

Disolución **A**: El compuesto **3** se solubiliza en PEG 400, Tocoferol y glicerol.

Disolución **B**: El HPMC se resuspende en el 40% del agua, hasta su total disolución con agitación y calor (80 ºC).

Disolución **C**: En el 60% de agua se disuelven el cloruro de benzalconio, el NaH_2PO_4, Na_2HPO_4, NaCl, EDTA, y el Tween 80. Se comprueba que el pH se mantiene en 6.3.

A continuación se unen las disoluciones **B** y **C** y se agitan hasta obtener una disolución homogénea. Luego, se adiciona lentamente a esta disolución, la disolución **A**, agitando y finalmente, se filtra a través de una membrana de 0.2 µmol/L.

Componentes	Concentración (mg/mL)
Compuesto activo **1**	6
PEG 400	3
CMC	5
Cloruro de benzalconio	0.2
NaH_2PO_4	2
Na_2HPO_4	0.7
NaCl	7.4
Tocoferol	0.1
Tween 80	0.2
EDTA	0.1
Glicerol	5
Agua	completar hasta volumen final de 1 mL

Ejemplo 12. Estudios de los perfiles de disolución de las formulaciones 1, 2, y 3.

En los estudios de disolución se tuvo en cuenta la Norma cubana (CECMED: Validación de Métodos Analíticos. Regulación No. 41. La Habana: CECMED; 2007) y las presentadas en la Farmacopea de los Estados Unidos (en USP 36, Rockville: Mack Printing, New York 2013, p 3220- 3221).

Se verificó el peso de 20 comprimidos de cada lote de Formulación (Ejemplos 7, 8 y 9). Todos ellos, se encuentra dentro de los rangos de los valores de peso de los comprimidos permitidos, por lo que se determinaron los perfiles de liberación del fármaco de la matriz seleccionada, sin error asociado a la formulación inicial.

Medios para la determinación de los perfiles de liberación:

Medio 1.- Fluido gástrico simulado sin enzimas pH 1,2 ± 0,05

Se pesan 2 g de NaCl (puro para análisis) y se disolvió en 7 mL de HCl en un matraz de 1000 mL. El matraz se enrasa con agua destilada. El pH de la disolución es de 1.2.

Medio 2.- Fluido intestinal simulado sin enzima pH 7.5 ± 0.1

Se pesó 6.8 g de fosfato monobásico de potasio y se trasvaso a un matraz aforado de 1000 mL. Posteriormente se adiciono 250 mL de agua, se disolvió el sólido y se

agregaron 190 mL de solución de NaOH 0.2 N y 400 mL de agua bidestilada. Finalmente, se enrazo a 1000 mL con agua bidestilada. El pH de la disolución se ajustó con NaOH 0.2 N a un pH de 7.5 ± 0.1.

Procedimiento:

Se colocó cada tableta en el aparato de disolución (Distek, modelo Evolution 6100) con 600 mL de medio de disolución-1 a 37º ÷0.5 ºC, se agitó a 30 rpm durante 60 minutos. Se filtró inmediatamente una porción del medio en prueba a través de un filtro de 0.45 µmol/L, a los 5, 15, 30 y 60 minutos de prueba.

Posteriormente, se procedió a drenar del aparato disolutor el medio de disolucion-1 y se sustituyó por 600 mL del medio de disolucion-2 a una temperatura de 37º ± 0.5 ºC, agitando a 30 rpm durante 8 horas adicionales

Se realizaron muestreos desde 5 hasta 1080 minutos las muestras fueron filtradas inmediatamente a través de un filtro de 0.45 µmol/L, en los tiempos indicados.

Se obtuvieron las absorbancias de las soluciones muestras en cada medio de disolución a la longitud de máxima absorbancia determinada. Para cuantificar el compuesto formulado, se realizó una curva de calibración espectrofotométrica UV-Vis (λ_{max}), en el rango de concentración de 0.025 a 0.150 mg/mL y se empleó un blanco de ajuste (medio de disolución).

Según el análisis de los datos obtenidos, la metodología utilizada cumple con los parámetros de linealidad (R>0,999), precisión (reproducibilidad y repetibilidad) y exactitud exigidos a una metodología analítica, permitiendo obtener resultados precisos y exactos dentro del intervalo de concentraciones y en las condiciones experimentales utilizadas en este estudio

Ejemplo 13. Evaluación del efecto modulador anticolinérgico del compuesto metil (2-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino}etill)ditio carbamato (3) administrado vía nasal (Formulación según Ejemplo 10) en un modelo de pérdida de memoria inducida con el empleo crónico de Escopolamina

Animales.

Se emplearon ratones C57BL/6 machos (20-25 g), suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales Laboratorios (CENPALAB, Cuba). Las

condiciones de adecuacion y de mantenimiento de los animales antes de realizar el experimento fueron similares a las desarrolladas en el Ejemplo no limitativo 4.

Diseño experimental.

Al concluir el periodo de adaptación, los animales se distribuyeron aleatoriamente de acuerdo con sus pesos corporales en cuatro grupos experimentales de 10 animales cada uno: dos grupos controles sanos, administrados uno con vehículo por vía nasal (G1) y otro con solución salina por vía i.p. (G2); un grupo control enfermo, administrado con salina por vía nasal y luego, con ESC disuelta en solución salina (1.5 mg/kg, i.p.) (G3) y un grupo tratado, administrado con el compuesto **3** preparado según la formulación del Ejemplo no limitativo 10 y luego de 15 minutos se administra la ESC (1.5 mg/kg, i.p.) (G4). Este experimento se realizó en dos series experimentales bajo las mismas condiciones descritas con el objetivo de estudiar los efectos de la formulación nasal del compuesto **3** en dos modelos conductuales: laberinto en Y en la modalidad del brazo oculto y el modelo de discriminación de objetos. De esta manera se emplearon un total de 60 animales.

Para la administración intranasal se siguió la metodología descrita previamente (*Hanson, L.R., et al., J. Vis. Exp. 2013 (74), e4440, doi:10.3791/4440*). Brevemente: se sujetó la cabeza del ratón en una posición supina con el cuello en extensión y posteriormente, con la mano dominante, se cargó una pipeta automática con 6 µL del fármaco o vehículo. La punta de la pipeta se colocó cerca de la fosa nasal izquierda y se descargaron aproximadamente 3 µL del contenido de la pipeta. Al cabo de los 2-3 segundos, se repitió la misma operación en la misma fosa nasal. Al finalizar esta operación, se mantuvo el animal en la posición supina y se repitió el mismo procedimiento en este caso en la fosa nasal derecha. Al concluir, se colocó el ratón en su jaula y al cabo de los dos minutos, se realiza otra aplicación en ambas fosas. Con este sistema se inmovilizó al animal tres veces y se le aplicó un volumen total de 30 µL, equivalente a una dosis del compuesto **3** de 7.2 mg/kg de peso. Al cabo de los 15 minutos de finalizada la última administración, a cada animal se le administró por vía i.p. 1.5 mg/kg de ESC

o su vehículo (solución salina) y transcurridos 30 minutos se realizaron los experimentos conductuales.

Pruebas conductuales.

Laberinto en Y

El estudio de la memoria de espacial de corto término se realizó a través del estudio de la preferencia espacial novedosa empleando el paradigma conductual laberinto en Y (40 cm de largo x 9 cm de ancho x 16 cm de alto) con pistas extra laberínticas alrededor del equipo, para evaluar el reconocimiento de la memoria espacial, dependiente del hipocampo. La prueba se desarrollo siguiendo el mismos protocolo descrito en el Ejemplo no limitativo 2. Los experimentos se realizaron entre las 8 y las 12.30 am.

Discriminación de objetos

La prueba de reconocimiento de objetos (PRO) es un ensayo conductual comúnmente utilizado para la investigación de varios aspectos del aprendizaje y la memoria, particularmente la memoria de reconocimiento, en modelos de roedores de trastornos del SNC. El protocolo empleado consta de tres fases: una primera fase de habituación (día 1) , una segunda fase de familiarización (día 2) y finalmente la fase de prueba (día 3). Todas las fases tuvieron una duración de cinco minutos y se realizaron durante tres días consecutivos. En la primera fase los animales fueron colocados en una caja de plexiglás (25 cm x 25 cm x 25 cm) en el interior. El comportamiento del animal se registró mediante una cámara de video. Este primer día los animales se llevaron a la sala de pruebas 30 minutos antes del experimento para familiarizarse con el medio ambiente. A continuación, se permitió a los ratones explorar libremente la caja en ausencia de objetos durante cinco minutos El segundo día a cada ratón se le realizó la prueba de entrenamiento en la cual se colocaron dos objetos idénticos en dos posiciones opuestas dentro de la caja a la misma distancia de la esquina más cercana. Durante esta fase se les permitió a los ratones explorar los objetos idénticos durante cinco minutos y luego se regresaron a sus jaulas de origen. Durante la fase de prueba (dia 3) los animales se volvieron a colocar en la misma caja, donde uno de los dos objetos familiares se cambió por uno nuevo, antes de esta fase.

Todos los objetos utilizados en este estudio eran diferentes en formas y colores pero idénticos en tamaño. Se fijaron al suelo de la caja para evitar movimientos. Para evitar la existencia de señales olfativas, toda la caja y los objetos siempre se limpiaron con alcohol al 70%, después de cada prueba. Se observó la capacidad de discriminar el objeto nuevo del familiar a través del tiempo necesario para explorar los objetos. El tiempo de exploración del objeto se definió como el período de tiempo durante el cual el animal dirigió su nariz a una distancia de 2 cm del objeto, o lo olió o pateó. Sentarse o pararse sobre el objeto no se reconoció como exploración. El tiempo de exploración se analizó manualmente utilizando un software de video inteligente. Se calculó el índice de discriminacion (ID) de la siguiente manera.

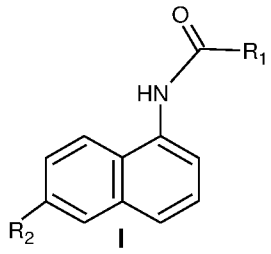
ID = tiempo de exploración del objeto novedosos /tiempo de exploración del objeto novedoso + tiempo de exploración del objeto familiar.

Análisis estadístico.

Todos los datos se expresan como la media ± error estándar de la media (EEM), y se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía seguido de la prueba *post-hoc* de Turkey. Se consideró una $p < 0.05$ como diferencia estadísticamente significativa. El análisis estadístico se realizó mediante GraphPadPrism versión 5 (GraphPad Software, Inc, San Diego, EE. UU.).

REIVINDICACIONES

1.- Una composición farmacéutica de un compuesto que actúa como agente terapéutico multiblanco para el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer, caracterizada porque dicho compuesto es seleccionado del grupo de compuestos que tiene Fórmula I,



I

donde:

R_1: -alquilenil-C(O)NH-alquilenil- R_3, -alquilenil-C(O)O-R_4;

R_3: -COOH, -OH, -SH, -NH_2, -NH-alquilo-, -NH-alquilenil-NH_2, -NH-alquilenil-NH-C(O)-alquilenil-S-R_5, -NH-ditiocarbamato-alquilo, -N-alquilo-ditiocarbamato sales metálicas alcalinotérreas; o sales de los grupos arriba mencionados, farmacéuticamente aceptables.

R_4: grupo succinimidilo;

R_5: -H, -C(O)-alquilo, -C(O)-C_6H_5; y

R_2: -H,-alquilo.

El término ¨alquilo¨ se caracteriza por ser una cadena alifática lineal o ramificada, de átomos de carbono saturados y átomos de hidrógeno, preferentemente metilo o etilo. El término alquilenil se refiere a un análogo divalente de un grupo alquilo lineal o ramificado, preferentemente metilenil (-CH_2-), etilenil (-CH_2CH_2-) o propilenil (-$CH_2CH_2CH_2$-).

en donde dicha composición farmacéutica contiene excipientes farmacéuticamente aceptables,

en donde estos compuestos, sus sales, hidratos, enantiómeros, isómeros, metabolitos, profármacos atraviesan la barrera hematoencefálica del cerebro de un mamífero vivo.

2.- La composición farmacéutica de un compuesto que actúa como agente terapéutico multiblanco de la reivindicación 1, caracterizada porque dicha composición interactúa con las células colinérgicas cerebrales, inhibe la actividad patológica de la acetilcolinesterasa y restablece los niveles fisiológicos de la acetilcolina.

3.- La composicion farmacéutica de un compuesto que actúa como agente terapéutico multiblanco de la reivindicación 1, caracterizada porque dicha composición interactúa con las células glutamatérgicas cerebrales, inhibe la activación patológica de los receptores de NMDA y kainato y restablece el funcionamiento fisiológico del sistema glutamatérgico.

4.- La composicion farmacéutica de un compuesto que actúa como agente terapéutico multiblanco de la reivindicación 1, caracterizada porque dicha composición interactúa con las mitocondrias cerebrales, inhibe la disipación del potencial de membrana mitocondrial e impide el hinchamiento para mantener los niveles fisiológicos de las especies reactivas de oxígeno.

5.- La composicion farmacéutica de un compuesto que actúa como agente terapéutico multiblanco de la reivindicación 1, caracterizada porque dicha composición se administra por vía oral, tópica, sistémica, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular y nasal, o combinaciones de ellas.

6.- La composicion farmacéutica de un compuesto que actúa como agente terapéutico multiblanco de las reivindicaciones 1 y 5, caracterizado porque la formulación oral de dicha composición farmacéutica en forma de comprimidos contiene de 1 mg a 100 mg del principio activo.

7- La composicion farmacéutica de un compuesto que actúa como agente terapéutico multiblanco de las reivindicaciones 1 y 6, caracterizada porque los

comprimidos de dicha composición farmacéutica contienen una matriz polimérica, que es seleccionada del grupo: óxido de polietileno, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), carboximetil celulosa sódica (CCNa), derivados de celulosa, Eudragit RS PO y polivinilpirrolidona, o combinaciones de ellos.

8- La composicion farmacéutica de un compuesto que actúa como agente terapéutico multiblanco de la reivindicación 7, caracterizada porque la matriz de los comprimidos de dicha composición farmacéutica está en una proporción de un 5 % p/p a un 80% p/p, preferentemente desde un 10 % p/p a un 70 % p/p.

9.- La composicion farmacéutica de un compuesto que actúa como agente terapéutico multiblanco de las reivindicaciones 1 y 5, caracterizada porque la formulación nasal de dicha composición farmacéutica contiene por dosis de 0.1 mg a 25 mg del principio activo.

10.- La composicion farmacéutica de un compuesto que actúa como agente terapéutico multiblanco de las reivindicaciones 1 y 9, caracterizada porque la formulación nasal de dicha composición farmacéutica contiene excipientes bioadhesivos, en una proporción desde 0.05 a un 6 %, seleccionados del grupo: hidroxipropilmetilcelulosa (HMPC), hidroxipropilcelulosa (HPC), metilcelulosa (MC), carboximetilcelulosa (CMC) y derivados del ácido poliacrilico (carbol), o combinaciones de ellos.

11.- La composicion farmacéutica de un compuesto que actúa como agente terapéutico multiblanco de las reivindicaciones 1 y 10, caracterizada porque la formulación nasal de dicha composición farmacéutica tiene una viscosidad de 10 a 60 mPas.

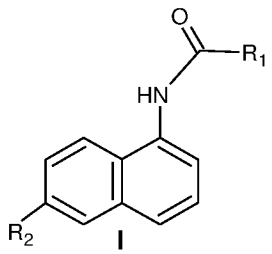
12.- La composicion farmacéutica de un compuesto que actúa como agente terapéutico multiblanco de las reivindicaciones 1, 9, 10 y 11, caracterizada porque

la formulación nasal de dicha composición farmacéutica contiene PEG a una concentración de 0.09 a 1.8 %; tocoferol a una concentración de 0.08 a 1 %; un preservante antimicrobiano seleccionado del grupo: cloruro de benzalconio a una concentración de 0.007 a 0.47 %, EDTA disódico a una concentración de 0.003 a 0.19 % y propilparabeno a una concentración de 0.005 a 0.04%, o combinaciones de ellos; y un humectante seleccionado del grupo: glicerol a una concentración de 3.5 a 5.5% y Tween 80 a una concentración de 0.17 a 0.38 %; o combinaciones de ellos.

13.- La composicion farmacéutica de un compuesto que actúa como agente terapéutico multiblanco de las reivindicaciones 1 y 12, caracterizada porque la formulación nasal de dicha composición farmacéutica tiene un pH entre 5.5 y 6.5, preferentemente 6.3.

14.- Un método para el tratamiento en forma de monoterapia de la Enfermedad de Alzheimer, caracterizado porque dicho método comprende:

a) la administración de una composición farmacéutica de un compuesto con acción multiblanco de Fórmula I,



I

donde:

R_1: -alquilenil-C(O)NH-alquilenil- R_3, -alquilenil-C(O)O-R_4;

R_3: -COOH, -OH, -SH, -NH_2, -NH-alquilo-, -NH-alquilenil-NH_2, -NH-alquilenil-NH-C(O)-alquilenil-S-R_5, -NH-ditiocarbamato-alquilo, -N-alquilo-ditiocarbamato sales metálicas alcalinotérreas; o sales de los grupos arriba mencionados, farmacéuticamente aceptables.

R_4: grupo succinimidilo;

R_5: -H, -C(O)-alquilo, -C(O)-C_6H_5; y

R_2: -H,-alquilo.

El término ¨alquilo¨ se caracteriza por ser una cadena alifática lineal o ramificada, de átomos de carbono saturados y átomos de hidrógeno, preferentemente metilo o etilo. El término alquilenil se refiere a un análogo divalente de un grupo alquilo lineal o ramificado, preferentemente metilenil (-CH_2-), etilenil (-CH_2CH_2-) o propilenil (-$CH_2CH_2CH_2$-).

donde dicha composición farmacéutica contiene excipientes farmacéuticamente aceptables,

donde dicha composición farmacéutica se administra por vía oral, tópica, sistémica, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular y nasal, o combinaciones de ellas,

b) que la composición farmacéutica del compuesto del paso a) atraviesa la barrera hematoencefálica del cerebro de un mamífero vivo,

c) poner en contacto a las células colinérgicas cerebrales con el compuesto de la composición farmacéutica del paso b) e inhibir la actividad patológica de la acetilcolinesterasa para restablecer el nivel fisiológico de acetilcolina,

d) poner en contacto a las células glutamatérgicas cerebrales con el compuesto de la composición farmacéutica del paso b) e inhibir la activación patológica de los receptores de NMDA y kainato para restablecer el funcionamiento fisiológico del sistema glutamatérgico, y

e) poner en contacto a las mitocondrias cerebrales con un compuesto de la composición farmacéutica del paso b) para inhibir la disipación del potencial de membrana mitocondrial e impedir el hinchamiento para mantener los niveles fisiológicos de las especies reactivas de oxígeno.

15.- El método para el tratamiento en forma de monoterapia de la Enfermedad de Alzheimer de la reivindicación 14, caracterizada porque la composición farmacéutica oral en forma de comprimidos contiene de 1 mg a 100 mg del principio activo.

16.- El método para el tratamiento en forma de monoterapia de la Enfermedad de Alzheimer de las reivindicaciones 14 y 15, caracterizada porque los comprimidos contienen una matriz polimérica, que es seleccionada del grupo: óxido de polietileno, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), carboximetil celulosa sódica (CCNa), derivados de celulosa, Eudragit RS PO, polivinilpirrolidona o combinaciones de ellos.

17.- El método para el tratamiento en forma de monoterapia de la Enfermedad de Alzheimer de las reivindicaciones 14 y 16, caracterizada porque la matriz de los comprimidos está en una proporción de un 5 % p/p a un 80% p/p, preferentemente desde un 10 % p/p a un 70 % p/p.

18.- El método para el tratamiento en forma de monoterapia de la Enfermedad de Alzheimer de las reivindicaciones 14 y 15, caracterizada porque los comprimidos emplean excipientes seleccionados del grupo: almidones, lactosas, sacarosa, sorbitol, manitol y otros azúcares, talco, dióxido de silicio coloidal, carbonatos, óxidos de magnesio, fosfatos de calcio, dióxido de titanio, povidonas, gelatina, lacto-proteínas, citratos, tartratos, alginatos, dextrana, elastómeros de silicona, polisorbatos, amilopectina, parabenos, aceites animales y vegetales, propilenglicol, agua estéril, alcoholes mono o polihidroxílicos, estearato de magnesio, estearato de calcio, estearil fumarato de sodio, lauril sulfato de sodio y glicerina, o combinaciones de ellos.

19.- El método para el tratamiento en forma de monoterapia de la Enfermedad de Alzheimer de la reivindicación 14, caracterizada porque la composición farmacéutica nasal contiene de 0.1 mg a 25 mg del principio activo.

20.- El método para el tratamiento en forma de monoterapia de la Enfermedad de Alzheimer de las reivindicaciones 14 y 19, caracterizada porque la formulación nasal contiene excipientes bioadhesivos, en una proporción desde 0.05 a un 6 %, seleccionados del grupo: hidroxipropilmetilcelulosa (HMPC), hidroxipropilcelulosa

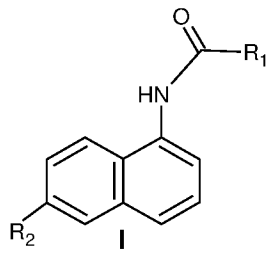
(HPC), metilcelulosa (MC), carboximetilcelulosa (CMC) y derivados del ácido poliacrilico (carbol), o combinaciones de ellos.

21.- El método para el tratamiento en forma de monoterapia de la Enfermedad de Alzheimer de las reivindicaciones 14 y 20, caracterizada porque la formulación nasal tiene una viscosidad de 10 a 60 mPas.

22.- El método para el tratamiento en forma de monoterapia de la Enfermedad de Alzheimer de las reivindicaciones 14 y 19, caracterizada porque la formulación nasal contiene PEG, tocoferol, un preservante antimicrobiano seleccionado del grupo: cloruro de benzalconio, EDTA disódico, metilparabeno y propilparabeno, o combinaciones entre ellos, y un humectante seleccionado del grupo: glicerol y Tween 80 o combinaciones de ellos.

23.- El método para el tratamiento en forma de monoterapia de la Enfermedad de Alzheimer de las reivindicaciones 1 y 22, caracterizada porque la formulación nasal tiene un pH entre 6 y 7.5, preferentemente 6.3.

24.- Una composición farmacéutica de un compuesto que actúa como agente terapéutico multiblanco para su uso en el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer, caracterizada porque dicho compuesto es seleccionado del grupo de compuestos que tienen Fórmula I



I

donde:

R_1: -alquilenil-C(O)NH-alquilenil- R_3, -alquilenil-C(O)O-R_4;

R_3: -COOH, -OH, -SH, -NH_2, -NH-alquilo-, -NH-alquilenil-NH_2, -NH-alquilenil-NH-C(O)-alquilenil-S-R_5, -NH-ditiocarbamato-alquilo, -N-alquilo-

ditiocarbamato sales metálicas alcalinotérreas; o sales de los grupos arriba mencionados, farmacéuticamente aceptables.

R_4: grupo succinimidilo;

R_5: -H, -C(O)-alquilo, -C(O)-C_6H_5; y

R_2: -H,-alquilo.

El término ¨alquilo¨ se caracteriza por ser una cadena alifática lineal o ramificada, de átomos de carbono saturados y átomos de hidrógeno, preferentemente metilo o etilo. El término alquilenil se refiere a un análogo divalente de un grupo alquilo lineal o ramificado, preferentemente metilenil (-CH_2-), etilenil (-CH_2CH_2-) o propilenil (-$CH_2CH_2CH_2$-).

en donde dicha composición farmacéutica contiene excipientes farmacéuticamente aceptables,

en donde estos compuestos, sus sales, hidratos, enantiomeros, isómeros, metabolitos, profármacos atraviesan la barrera hematoencefálica del cerebro de un mamífero vivo.

25.- La composición farmacéutica de un compuesto que actúa como agente terapéutico multiblanco para su uso en el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer de la reivindicación 24, caracterizada porque dicha composición interactúa con las células colinérgicas cerebrales, inhibe la actividad patológica de la acetilcolinesterasa y restablece los niveles fisiológicos de la acetilcolina.

26.- La composición farmacéutica de un compuesto que actúa como agente terapéutico multiblanco para su uso en el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer de la reivindicación 24, caracterizada porque dicha composición interactúa con las células glutamatérgicas cerebrales, inhibe la activación patológica de los receptores de NMDA y kainato y restablece el funcionamiento fisiológico del sistema glutamatérgico.

27.- La composición farmacéutica de un compuesto que actúa como agente terapéutico multiblanco para su uso en el tratamiento de la Enfermedad de

Alzheimer de la reivindicación 24, caracterizada porque dicha composición interactúa con las mitocondrias cerebrales, inhibe la disipación del potencial de membrana mitocondrial e impide el hinchamiento para mantener los niveles fisiológicos de las especies reactivas de oxígeno.

28.- La composición farmacéutica de un compuesto que actúa como agente terapéutico multiblanco para su uso en el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer de la reivindicación 24, caracterizada porque dicha composición se administra por vía oral, tópica, sistémica, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, nasal o combinaciones de ellas

29.- La composición farmacéutica de un compuesto que actúa como agente terapéutico multiblanco para su uso en el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer de las reivindicaciones 24 y 28, caracterizada porque dicha composición farmacéutica oral en forma de comprimidos contiene de 1 mg a 100 mg del principio activo.

30- La composición farmacéutica de un compuesto que actúa como agente terapéutico multiblanco para su uso en el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer de las reivindicaciones 24 y 29, caracterizada porque en dicha composición farmacéutica, los comprimidos contienen una matriz polimérica, que es seleccionada del grupo: óxido de polietileno, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), carboximetil celulosa sódica (CCNa), derivados de celulosa, Eudragit RS PO y polivinilpirrolidona, o combinaciones de ellos.

31- La composición farmacéutica de un compuesto que actúa como agente terapéutico multiblanco para su uso en el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer de la reivindicación 30, caracterizada porque en dicha composición farmacéutica la matriz de los comprimidos está en una proporción de un 5 % p/p a un 80% p/p, preferentemente desde un 10 % p/p a un 70 % p/p.

32.- La composición farmacéutica de un compuesto que actúa como agente terapéutico multiblanco para su uso en el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer de las reivindicaciones 24 y 28, caracterizada porque dicha composición farmacéutica nasal contiene por dosis de 0.1 mg a 25 mg del principio activo.

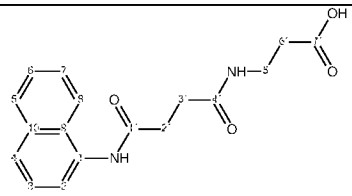
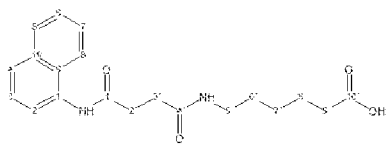
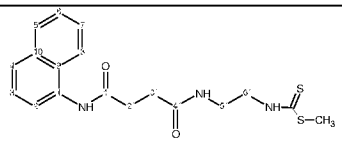
33.- La composición farmacéutica de un compuesto que actúa como agente terapéutico multiblanco para su uso en el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer de las reivindicaciones 24 y 32, caracterizada porque dicha formulación nasal contiene excipientes bioadhesivos, en una proporción desde 0.05 a un 6 %, seleccionados del grupo: hidroxipropilmetilcelulosa (HMPC), hidroxipropilcelulosa (HPC), metilcelulosa (MC), carboximetilcelulosa (CMC) y derivados del ácido poliacrilico (carbol), o combinaciones de ellos.

34.- La composición farmacéutica de un compuesto que actúa como agente terapéutico multiblanco para su uso en el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer de las reivindicaciones 24 y 33, caracterizada porque dicha formulación nasal tiene una viscosidad de 10 a 60 mPas.

35.- La composición farmacéutica de un compuesto que actúa como agente terapéutico multiblanco para su uso en el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer de las reivindicaciones 24, 32 y 34, caracterizada porque dicha formulación nasal contiene PEG a una concentración de 0.09 a 1.8 %; tocoferol a una concentración de 0.08 a 1 %; un preservante antimicrobiano seleccionado del grupo: cloruro de benzalconio a una concentración de 0.007 a 0.47 %, EDTA disódico a una concentración de 0.003 a 0.19 % y propilparabeno a una concentración de 0.005 a 0.04%, o combinaciones de ellos; y un humectante seleccionado del grupo: glicerol a una concentración de 3.5 a 5.5% y Tween 80 a una concentración de 0.17 a 0.38 %; o combinaciones de ellos.

36.- La composición farmacéutica de un compuesto que actúa como agente terapéutico multiblanco para su uso en el tratamiento de la Enfermedad de

Alzheimer de las reivindicaciones 24 y 35, caracterizada porque dicha formulación nasal tiene un pH entre 5.5 y 6.5, preferentemente 6.3.

Compuesto	Estructura	Propiedades físico-químicas
***N*-[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]-β-alanina (1)**		MASA MOLECULAR: 314.3 g/mol. Polvo cristalino, blanco. ESPECIFICACIONES DE CALIDAD. HR-TOF/MS (*m/z*): calcd. para $C_{17}H_{18}N_2O_4$: 314.33; encontrado 315.13 $(M + H)^+$. T.f: 172,5-174,8 ºC. Rf: 0,1 (acetato de etilo). HPLC. Columna cromatográfica Phenomenex C18 (150 x 4.6 mmol/L , 4 µmol/L , 80Å). Fase Móvil: H_2O/TFA (0.1%) ACN/TFA (0.05%). Tiempo de retención: 25.051 minutos Pureza: 99.76%.
Acido 6-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino}hexanoico (2):		MASA MOLECULAR: 356.3 g/mol. Polvo cristalino, blanco. ESPECIFICACIONES DE CALIDAD. HR-TOF/MS (m/z): calcd. para $C_{20}H_{24}N_2O_4$: 357.42 $(M + H)^+$; encontrado 357.18. T.f: 129,9-133 ºC. Rf: 0,6 ($CHCl_3$:CH_3OH, 10:3). HPLC. Columna cromatográfica Phenomenex C18 (150 x 4.6 mmol/L , 4 µmol/L , 80Å). Fase Móvil: H_2O/TFA (0.1%) ACN/TFA (0.05%). Tiempo de retención: 27,935 minutos Pureza: 99.19%.
Metil (2-{[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino} etil) ditiocarbamato (3):		MASA MOLECULAR: 375.5 g/mol. Polvo cristalino, amarillo claro. ESPECIFICACIONES DE CALIDAD. HR-TOF/MS (m/z): calcd. para $C_{18}H_{21}N_3O_2S_2$:

		375.511; encontrado 377.121 $(M + D)^+$. T.f: 140-141ºC. Rf: 0,3 (acetato de etilo). HPLC. Columna cromatográfica Phenomenex C18 (150 x 4.6 mmol/L , 4 µmol/L , 80Å). Fase Móvil: H_2O/TFA (0.1%) ACN/TFA (0.05%). Tiempo de retención: 31,428 minutos Pureza: 96,59%.

Figura 1

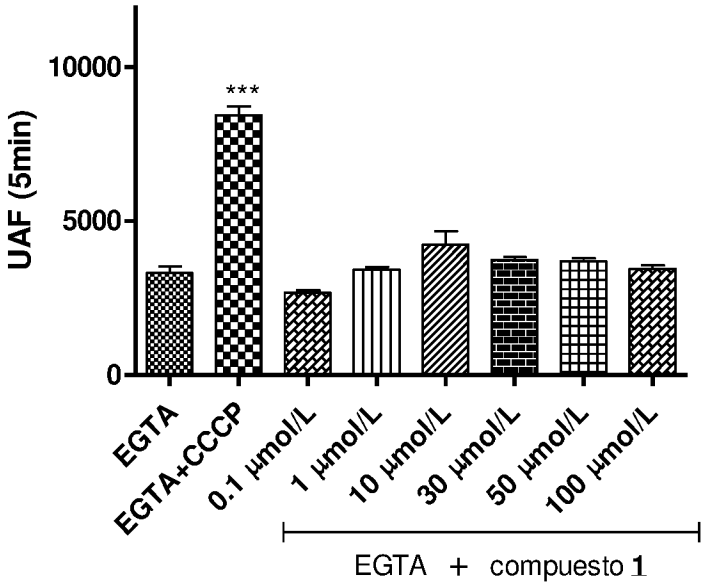

10000
5000
0
UAF (5min)
***
EGTA
EGTA+CCCP
0.1 µmol/L
1 µmol/L
10 µmol/L
30 µmol/L
50 µmol/L
100 µmol/L
EGTA + compuesto 1

Figura 2

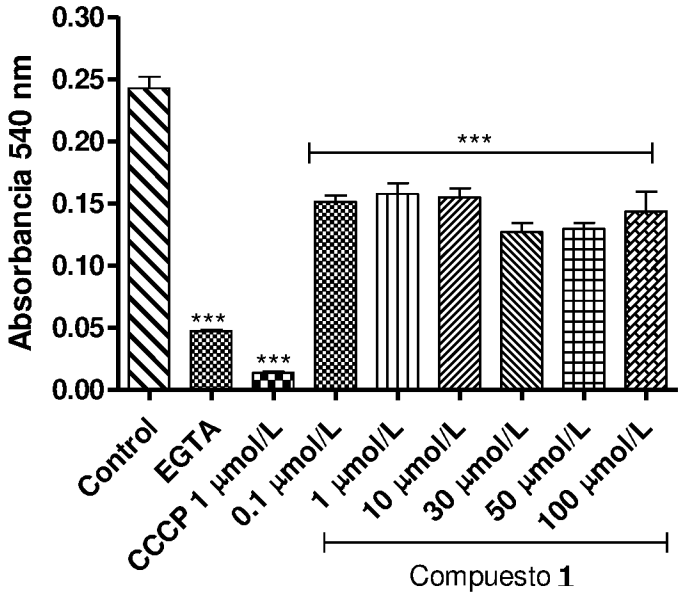

Absorbancia 540 nm
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
***
***
***
Control
EGTA
CCCP 1 µmol/L
0.1 µmol/L
1 µmol/L
10 µmol/L
30 µmol/L
50 µmol/L
100 µmol/L
Compuesto 1

Figura 3

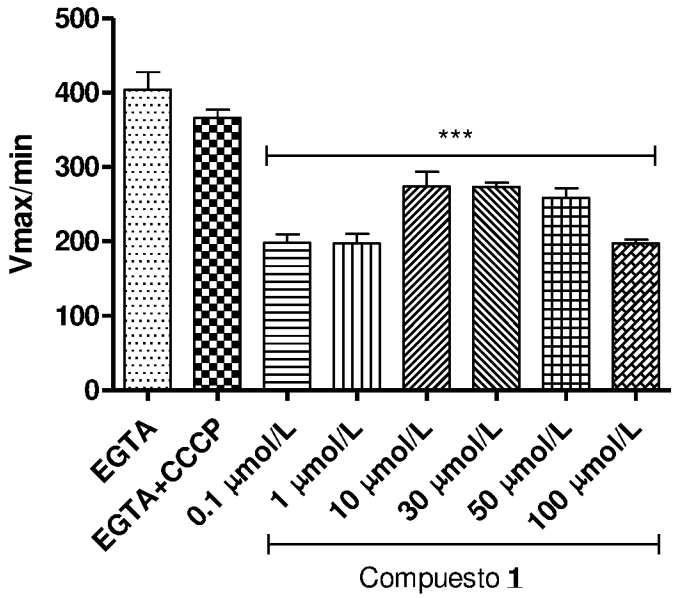

500
400
300
200
100
0
Vmax/min
***
EGTA
EGTA+CCCP
0.1 µmol/L
1 µmol/L
10 µmol/L
30 µmol/L
50 µmol/L
100 µmol/L
Compuesto 1

Figura 4

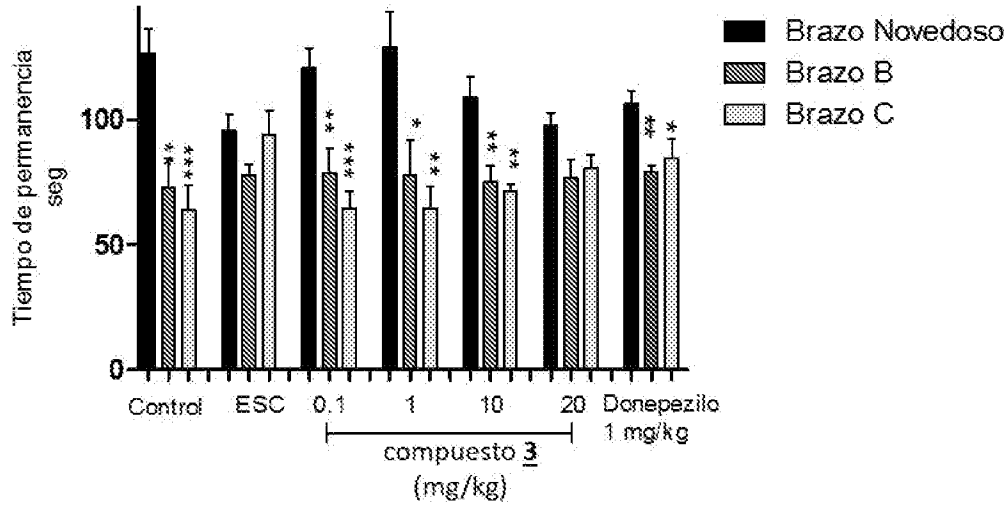

Tiempo de permanencia
seg
100
50
0
Control
ESC
0.1
1
10
20
Donepezilo
1 mg/kg
compuesto 3
(mg/kg)
Brazo Novedoso
Brazo B
Brazo C

Figura 5

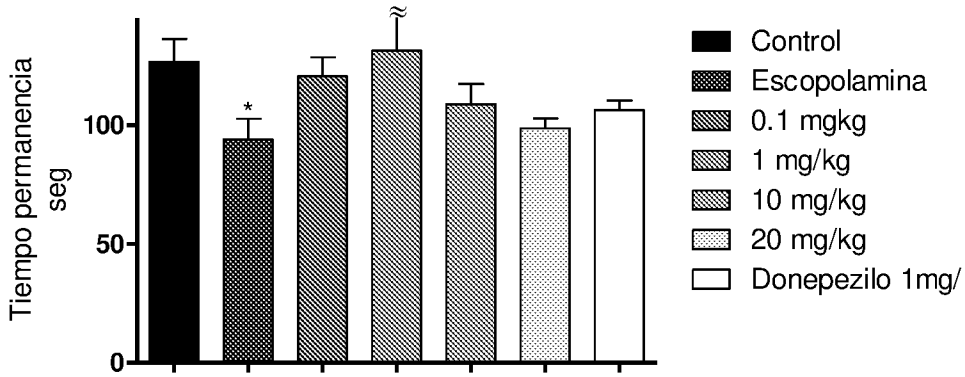

Tiempo permanencia seg
100
50
0
*
≈
Control
Escopolamina
0.1 mgkg
1 mg/kg
10 mg/kg
20 mg/kg
Donepezilo 1mg/

Figura 6

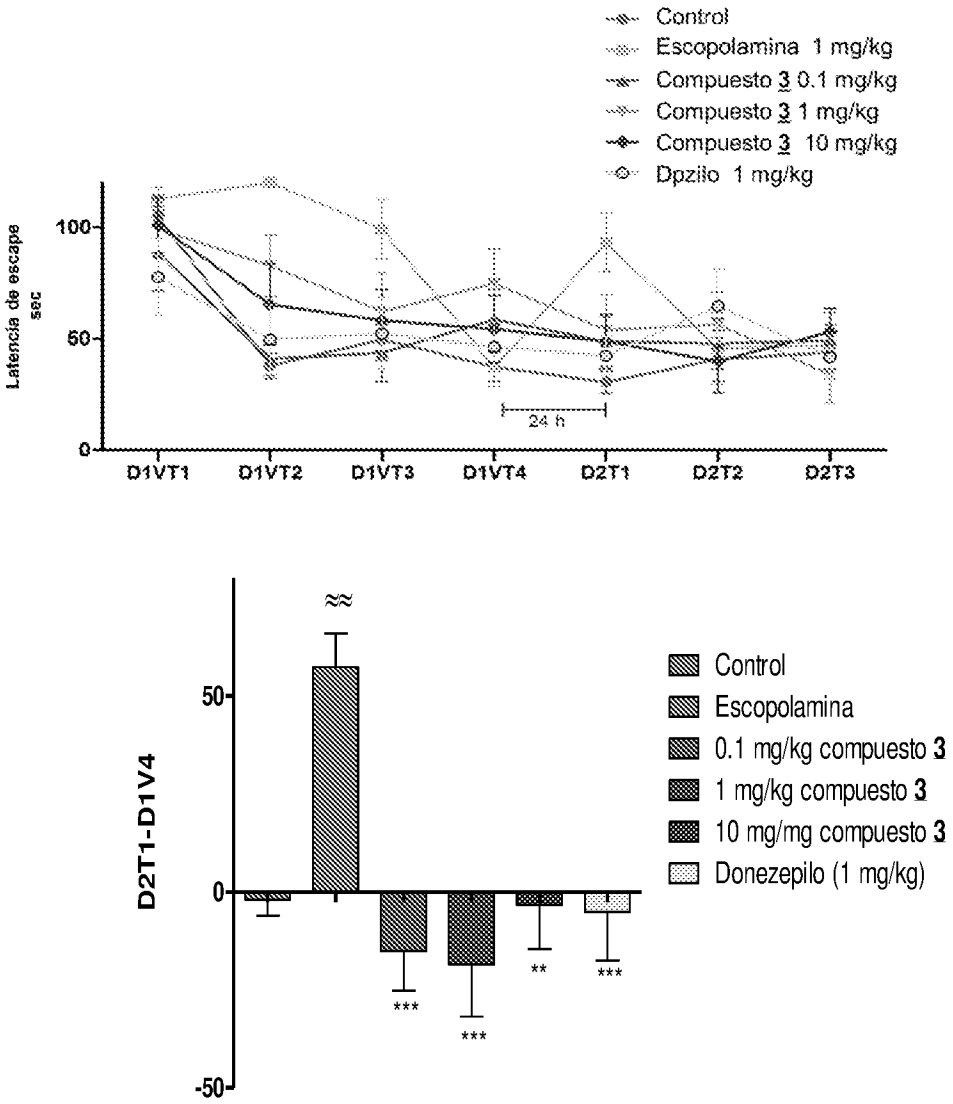

Control
Escopolamina 1 mg/kg
Compuesto 3 0.1 mg/kg
Compuesto 3 1 mg/kg
Compuesto 3 10 mg/kg
Dpzilo 1 mg/kg
Latencia de escape
seg
100
50
0
24 h
D1VT1
D1VT2
D1VT3
D1VT4
D2T1
D2T2
D2T3
D2T1-D1V4
50
0
-50
≈≈
***
***
**
***
Control
Escopolamina
0.1 mg/kg compuesto 3
1 mg/kg compuesto 3
10 mg/mg compuesto 3
Donezepilo (1 mg/kg)

Figura 7

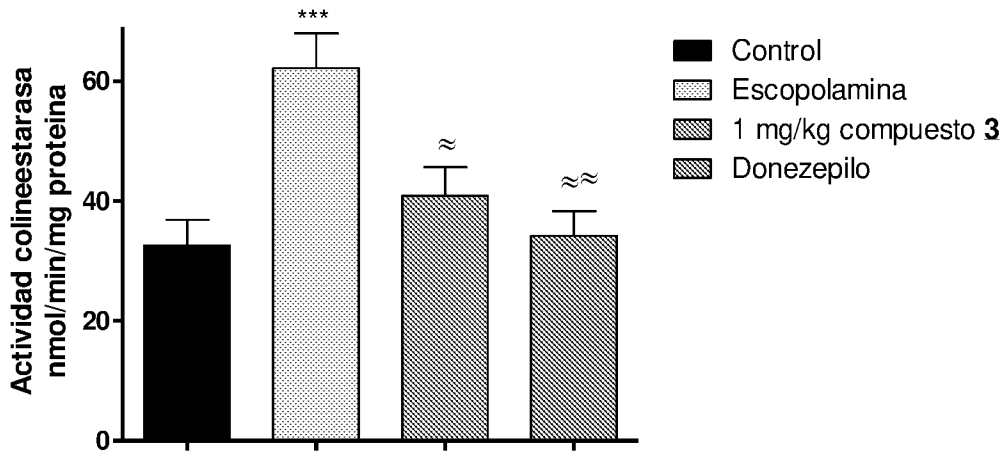

Actividad colineestarasa
nmol/min/mg proteina
60
40
20
0
***
≈
≈≈
Control
Escopolamina
1 mg/kg compuesto 3
Donezepilo

Figura 8

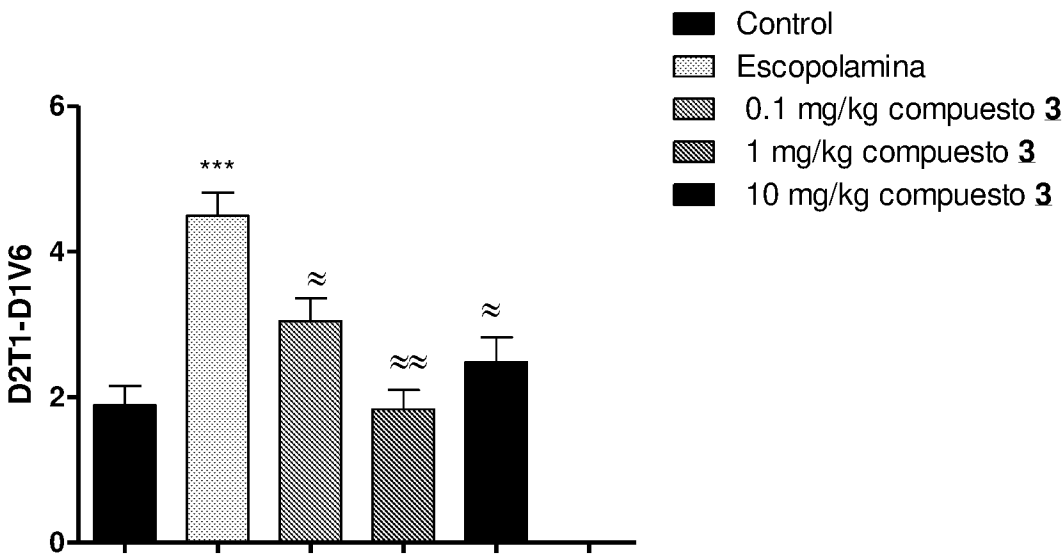

Control
Escopolamina
0.1 mg/kg compuesto 3
1 mg/kg compuesto 3
10 mg/kg compuesto 3
D2T1-D1V6
6
4
2
0
***
≈
≈≈
≈

Figura 9

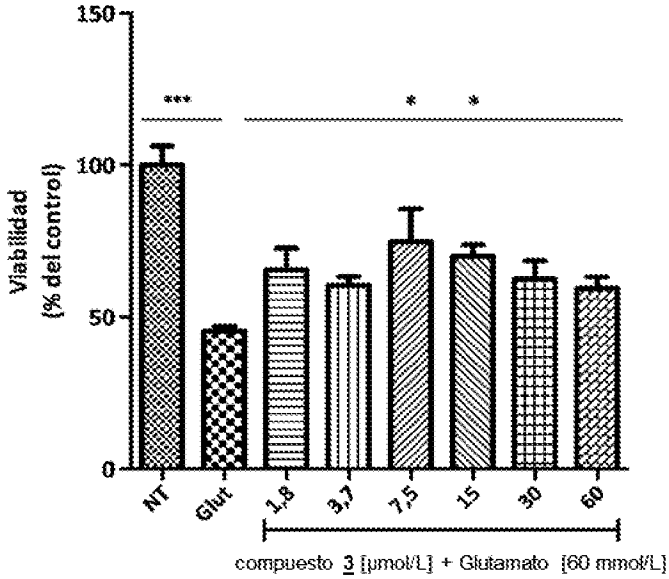

150
100
50
0
Viabilidad
(% del control)
***
*
*
NT
Glut
1,8
3,7
7,5
15
30
60
compuesto 3 [µmol/L] + Glutamato [60 mmol/L]

Figura 10

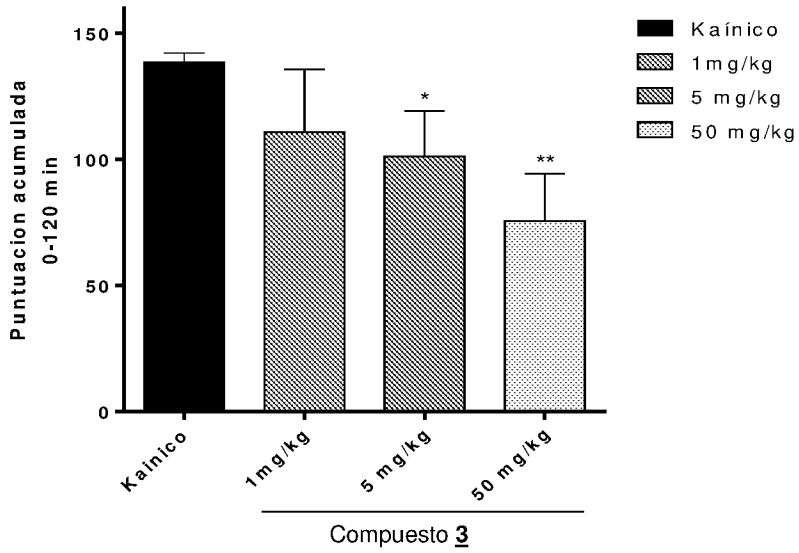

Puntuacion acumulada
0-120 min
150
100
50
0
*
**
Kaínico
1mg/kg
5 mg/kg
50 mg/kg
Kainico
1mg/kg
5 mg/kg
50 mg/kg
Compuesto 3

Figura 11

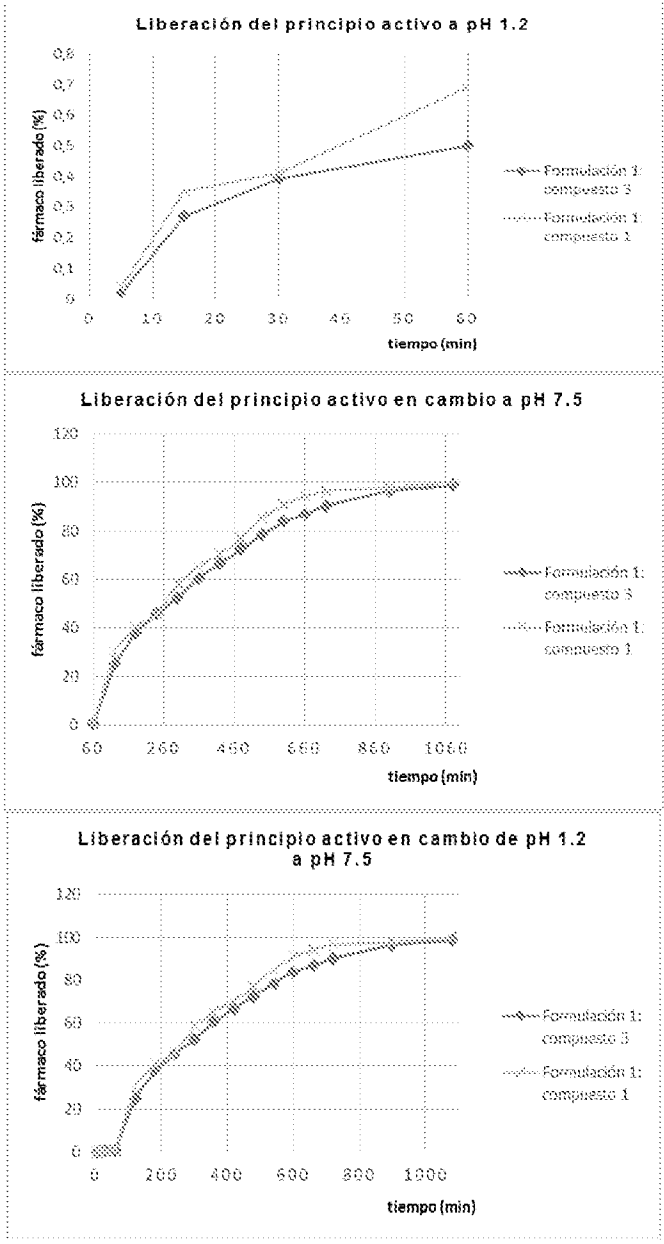

Liberación del principio activo a pH 1.2
fármaco liberado (%)
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0
10
20
30
40
50
60
tiempo (min)
Formulación 1: compuesto 3
Formulación 1: compuesto 1
Liberación del principio activo en cambio a pH 7.5
fármaco liberado (%)
120
100
80
60
40
20
0
60
260
460
660
860
1060
tiempo (min)
Formulación 1: compuesto 3
Formulación 1: compuesto 1
Liberación del principio activo en cambio de pH 1.2 a pH 7.5
fármaco liberado (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
200
400
600
800
1000
tiempo (min)
Formulación 1: compuesto 3
Formulación 1: compuesto 1

Figura 12

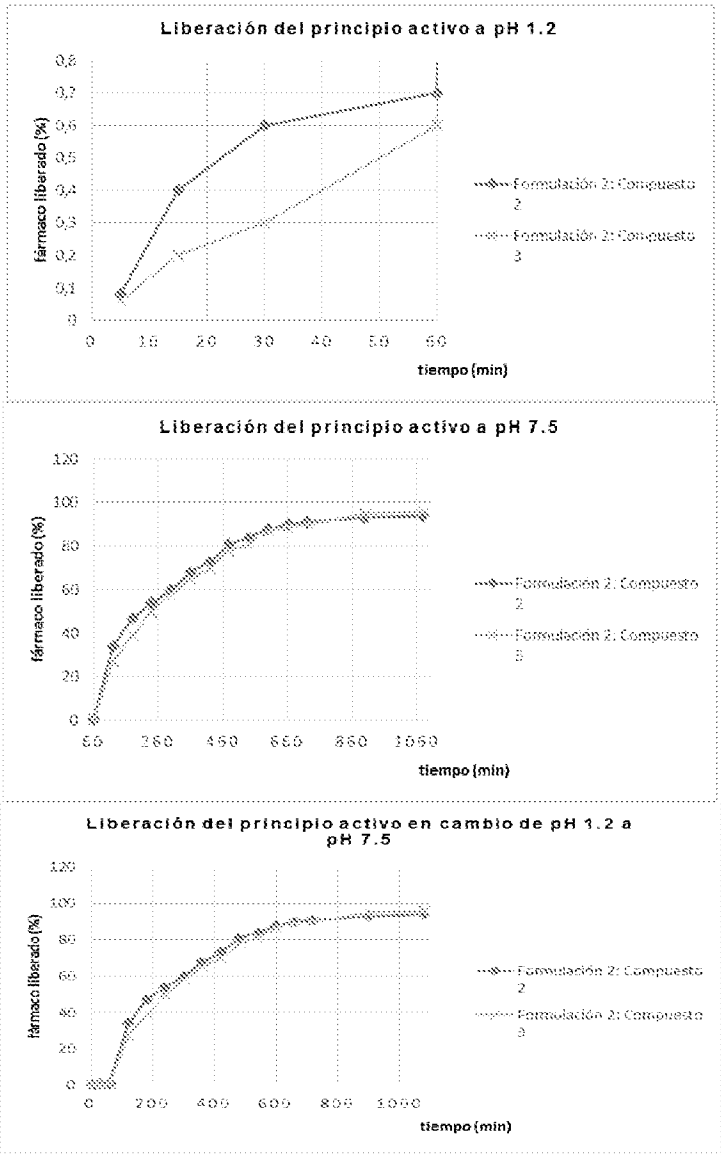

Liberación del principio activo a pH 1.2
fármaco liberado (%)
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0
10
20
30
40
50
60
tiempo (min)
Formulación 2: Compuesto 2
Formulación 2: Compuesto 3
Liberación del principio activo a pH 7.5
fármaco liberado (%)
120
100
80
60
40
20
0
50
250
450
650
850
1050
tiempo (min)
Formulación 2: Compuesto 2
Formulación 2: Compuesto 3
Liberación del principio activo en cambio de pH 1.2 a pH 7.5
fármaco liberado (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
200
400
600
800
1000
tiempo (min)
Formulación 2: Compuesto 2
Formulación 2: Compuesto 3

Figura 13

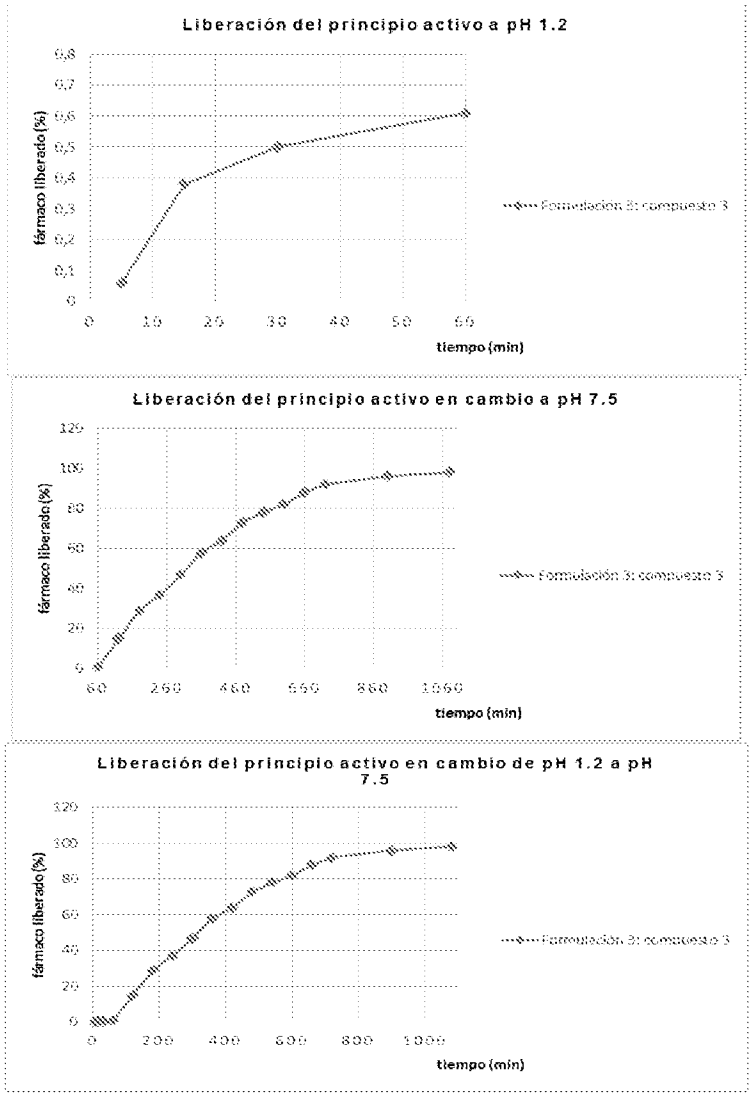

Liberación del principio activo a pH 1.2
fármaco liberado (%)
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0
10
20
30
40
50
60
tiempo (min)
Formulación 3: comprimido 3
Liberación del principio activo en cambio a pH 7.5
fármaco liberado (%)
120
100
80
60
40
20
0
60
260
460
660
860
1060
tiempo (min)
Formulación 3: comprimido 3
Liberación del principio activo en cambio de pH 1.2 a pH 7.5
fármaco liberado (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
200
400
600
800
1000
tiempo (min)
Formulación 3: comprimido 3

Figura 14

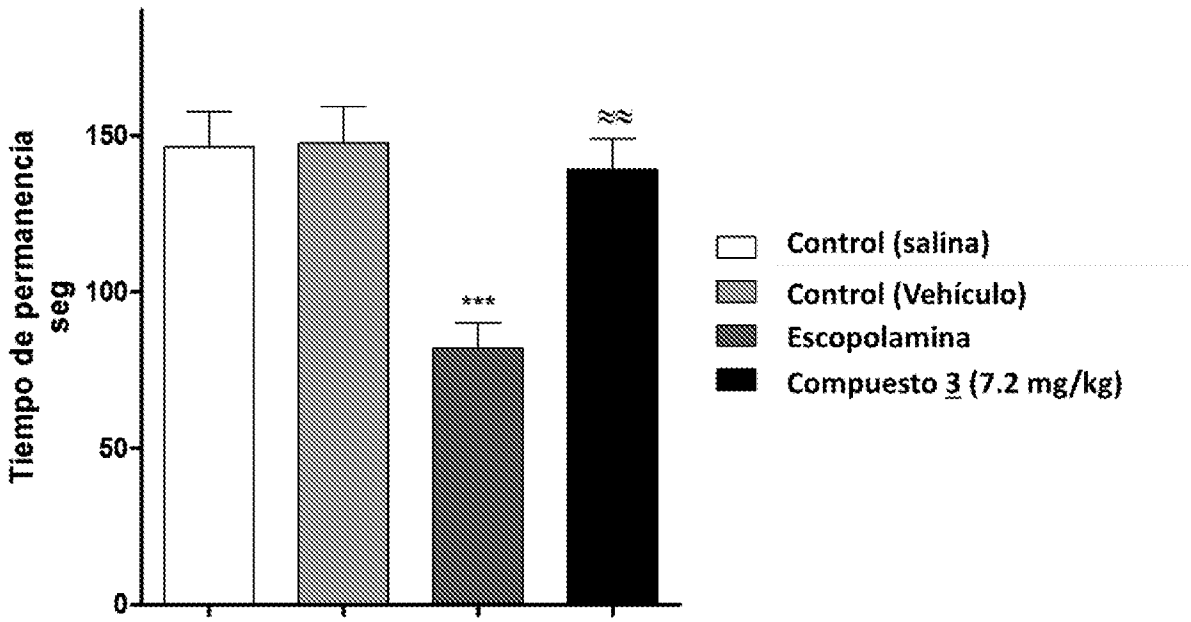

Tiempo de permanencia seg
150
100
50
0
***
≈≈
Control (salina)
Control (Vehículo)
Escopolamina
Compuesto 3 (7.2 mg/kg)

Figura 15

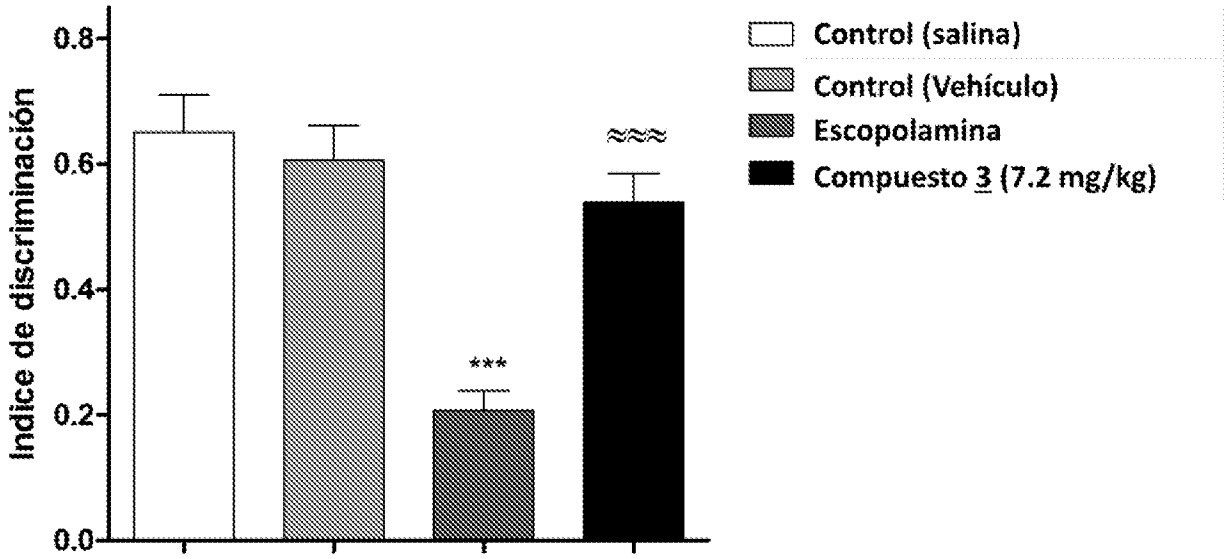

Indice de discriminación
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
***
≈≈≈
Control (salina)
Control (Vehículo)
Escopolamina
Compuesto 3 (7.2 mg/kg)

Figura 16

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU2021/050012

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

INV. A61K31/167 A61K31/27 A61P25/28 A61K9/00 A61K9/20 A61K47/06

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

A61K A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) **EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data**

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	US 2016/106691 Al (CARRAZANA MARQUIZA SABLON [CU] ET AL) 21 de Abril de 2016 (2016-04-21)	**1-36**
Y	Reivindicaciones 1-7 párrafos [0046] , [0055] figuras 1-15 ; ejemplos 1-8 ; "componentes" A-B , D-E, G	**1-5,7,8, 10,13, 14, 16-18, 20, 23-28, 30,31, 33,36**

	-/--	

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
16 de Marzo de 2022	25 de Marzo de 2022
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional EPO	Funcionario autorizado
N° de fax	N° de teléfono

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU2021/050012

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	RIVERA-MARRERO SUCHITIL ET AL: "A new naphthalene derivative with anti-amyloidogenic activity as potential therapeutic agent for Alzheimer'sdisease" , BIOORGANIC, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 28, no. 20, 11 de Agosto de 2020 (2020-08-11) , XP086296996, ISSN: 0968-0896, DOI: 10.1016/ J. BMC.2020.115700 [recuperado el 11.08.2020] todo el documento, en particular :la administration of compound 8 to a mice model of Alzheimer	1-36
Y		1-5,7,8, 10,13, 14, 16-18, 20, 23-28, 30,31, 33,36

X	WO 2020/094161 Al (CENT NEUROCIENCIAS CUBA) 14 de Mayo de 2020 (2020-05-14) reivindicaciones 1-11 párrafos [0012]	1-13
Y		1-5,7,8, 10,13, 14, 16-18, 20, 23-28, 30,31, 33,36

X,P	EP 3 878 475 Al (CENTRO DE NEUROCIENCIAS DE CUBA [CU] ET AL.) 15 de Septiembre de 2021 (2021-09-15) reivindicaciones 1-14 párrafo [0011] ejemplo 8	1-13
Y,P		1-5,7,8, 10,13, 14, 16-18, 20, 23-28, 30,31, 33,36

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional Nº

PCT/CU2021/050012

US 2016106691	A1	21-04-2016	CA	2904762	A1	04-09-2014
			CU	20130027	A7	30-10-2014
			JP	6595345	B2	23-10-2019
			JP	2016510007	A	04-04-2016
			US	2016106691	A1	21-04-2016
			WO	2014131374	A1	04-09-2014
			ZA	201506583	B	31-07-2019
WO 2020094161	A1	14-05-2020	CA	3118959	A1	14-05-2020
			CN	113226381	A	06-08-2021
			CU	20180138	A7	20-10-2020
			EP	3878475	A1	15-09-2021
			JP	2022515706	A	22-02-2022
			KR	20210091216	A	21-07-2021
			US	2021290782	A1	23-09-2021
			WO	2020094161	A1	14-05-2020
EP 3878475	A1	15-09-2021	CA	3118959	A1	14-05-2020
			CN	113226381	A	06-08-2021
			CU	20180138	A7	20-10-2020
			EP	3878475	A1	15-09-2021
			JP	2022515706	A	22-02-2022
			KR	20210091216	A	21-07-2021
			US	2021290782	A1	23-09-2021
			WO	2020094161	A1	14-05-2020

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/CU2021/050012

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K31/167 A61K31/27 A61P25/28 A61K9/00 A61K9/20
A61K47/06
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2016/106691 A1 (CARRAZANA MARQUIZA SABLON [CU] ET AL) 21 April 2016 (2016-04-21)	1-36
Y	claims 1-7 paragraphs [0046], [0055] figures 1-15; examples 1-8; compounds A-B, D-E, G	1-5,7,8, 10,13, 14, 16-18, 20, 23-28, 30,31, 33,36

-/--

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 March 2022	25/03/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Renard, Delphine

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RIVERA-MARRERO SUCHITIL ET AL: "A new naphthalene derivative with anti-amyloidogenic activity as potential therapeutic agent for Alzheimer's disease", BIOORGANIC, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 28, no. 20, 11 August 2020 (2020-08-11), XP086296996, ISSN: 0968-0896, DOI: 10.1016/J.BMC.2020.115700 [retrieved on 2020-08-11]	1-36
Y	whole document, in particular the administration of compound 8 to a mice model of Alzheimer	1-5,7,8, 10,13, 14, 16-18, 20, 23-28, 30,31, 33,36

X	WO 2020/094161 A1 (CENT NEUROCIENCIAS CUBA) 14 May 2020 (2020-05-14)	1-13
Y	claims 1-11 paragraph [0012]	1-5,7,8, 10,13, 14, 16-18, 20, 23-28, 30,31, 33,36

X,P	EP 3 878 475 A1 (CENTRO DE NEUROCIENCIAS DE CUBA [CU] ET AL.) 15 September 2021 (2021-09-15)	1-13
Y,P	claims 1-14 paragraph [0011] example 8	1-5,7,8, 10,13, 14, 16-18, 20, 23-28, 30,31, 33,36

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/CU2021/050012

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2016106691 A1	21-04-2016	CA 2904762 A1	04-09-2014
		CU 20130027 A7	30-10-2014
		JP 6595345 B2	23-10-2019
		JP 2016510007 A	04-04-2016
		US 2016106691 A1	21-04-2016
		WO 2014131374 A1	04-09-2014
		ZA 201506583 B	31-07-2019
WO 2020094161 A1	14-05-2020	CA 3118959 A1	14-05-2020
		CN 113226381 A	06-08-2021
		CU 20180138 A7	20-10-2020
		EP 3878475 A1	15-09-2021
		JP 2022515706 A	22-02-2022
		KR 20210091216 A	21-07-2021
		US 2021290782 A1	23-09-2021
		WO 2020094161 A1	14-05-2020
EP 3878475 A1	15-09-2021	CA 3118959 A1	14-05-2020
		CN 113226381 A	06-08-2021
		CU 20180138 A7	20-10-2020
		EP 3878475 A1	15-09-2021
		JP 2022515706 A	22-02-2022
		KR 20210091216 A	21-07-2021
		US 2021290782 A1	23-09-2021
		WO 2020094161 A1	14-05-2020