



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 763**

51 Int. Cl.:

C07D 493/22 (2006.01) **C07D 311/86** (2006.01)
C07D 493/04 (2006.01) **C07D 493/08** (2006.01)
C07D 493/10 (2006.01) **A61K 31/35** (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01) **A61P 9/10** (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) **A61P 25/14** (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01) **C12P 17/18** (2006.01)
C12P 17/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03731824 .3**

96 Fecha de presentación : **22.01.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1475382**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.11.2004**

54 Título: **Compuestos como inhibidores de la semafarina.**

30 Prioridad: **24.01.2002 JP 2002-15216**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

73 Titular/es: **Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.**
6-8, Dosho-machi 2-chome
Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 541-8524, JP

72 Inventor/es: **Kumagai, Kazuo y**
Hosotani, Nobuo

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 316 763 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos como inhibidores de la semaforina.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un nuevo compuesto con actividad inhibitora de la semaforina, a un procedimiento microbiológico para producir el compuesto, a un activador de regeneración de nervios que contiene el compuesto como ingrediente activo o similares.

10 **Antecedentes de la técnica**

Las células nerviosas son tejidos especiales que no presentan potencial mitótico en un adulto. Por consiguiente, una vez se dañan, el daño se prolongará un largo periodo de tiempo. Particularmente, no existe regeneración potencial en el sistema nervioso central tal como el cerebro y la médula espinal. La falta de potencial de regeneración en los nervios centrales puede considerarse como una de las razones de que hayan existido terapias no estabilizadas para las lesiones traumáticas tales como la lesión de la médula espinal, ni para enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. Por otra parte, los nervios periféricos poseen potencial de regeneración. Sus axones pueden regenerarse y sus funciones pueden recuperarse incluso después de haber sido dañadas. En este caso, sin embargo, la recuperación requiere un largo lapso de tiempo que varía desde varios meses hasta incluso más de un año, y de este modo los pacientes tienen que experimentar sufrimientos considerables. Además, el periodo de recuperación es tan largo que algunas células nerviosas pueden morir durante este periodo, lo que con frecuencia conduce al fallo de recuperación de las funciones. E incluso, aunque los nervios periféricos con regeneración potencial son completamente incapaces de desarrollarse cuando se colocan en el sistema central tal como el cerebro y la médula espinal. Esto conlleva la base para la hipótesis de que existen algunas sustancias en el sistema nervioso central que inhiben el desarrollo de los nervios. Si se suprimen las sustancias inhibitoras para la regeneración de los nervios en el sistema nervioso central utilizando anticuerpos o similares, se observará la regeneración de nervios en el sistema nervioso central así como la recuperación de sus funciones, si bien parcialmente. Como una de dichas sustancias inhibitoras para la regeneración del nervio central, Nogo ha sido descubierta recientemente (*Nature* 403, 434, 2000, *Nature* 403, 439, 2000). Sin embargo, solamente una pequeña porción de axones se regeneran inhibiendo a Nogo y por eso se supone que existen algunas otras sustancias inhibitoras de la regeneración pero hasta ahora, no está todavía claro qué sustancias actúan para inhibir la regeneración de nervios *in vivo*.

Con respecto a la semaforina, su gen se aisló en primer lugar como un factor implicado en la formación del sistema nervioso en los locus de desarrollo. Desde entonces, se ha informado de que las semaforinas constituyen una gran familia de genes distribuidos en los nemátodos, peces, mamíferos e incluso determinadas clases de virus, y actualmente los genes de semaforina se clasifican en ocho subfamilias o clases de genes basadas en sus estructuras (*Cell* 97, 551, 1999). La semaforina es una proteína endógena identificada como un factor que colapsa el cono del crecimiento de nervios y suprime el desarrollo del axón, y hasta ahora, se han descrito aproximadamente 20 especies moleculares (*Cell* 97, 551, 1999). Sin embargo, la mayoría de las funciones de muchas familias de semaforina no han sido clarificadas todavía con detalle. El grupo de genes más estudiado es de una subfamilia denominada clase 3, todos cuyos productos de traducción son proteínas secretoras. Aunque es conocido que las proteínas codificadas por estos genes poseen actividad supresora del desarrollo de neuritas intensiva y actividad del colapso del cono de crecimiento *in vitro*, se describió también que pueden actuar de manera inductiva el desarrollo de neuritas en determinadas condiciones. De las semaforinas, la semaforina 3A (Sema3A) es la más estudiada y es conocido que induce el crecimiento del colapso del cono de las células nerviosas cultivadas hasta una concentración tan baja como 10 pM en un corto periodo de tiempo (*Cell* 75, 21, 1993, *Cell* 75, 1389, 1993). Con el fin de analizar las funciones *in vivo* de las semaforinas, se han estudiado ratones modificados genéticamente por neuropilina-1, que es uno de los componentes del receptor Sema 3A (*Neuron* 19, 995, 1997). Los ratones modificados genéticamente presentan letalidad embrionaria así como anomalía motora en algunos sistemas nerviosos tales como el nervio trigémino y la anomalía de angiogénesis. Aunque se observa una anomalía motora similar en el sistema nervioso en ratones modificados genéticamente Sema3A, se describen algunos ratones individuales hasta el desarrollo a adultos sin problemas graves. Por consiguiente, las funciones *in vivo* de Sema3A continúan desconocidas en gran parte.

Además, con respecto a las semaforinas son conocidas también las siguientes: nucleótidos complementarios y antagonistas tales como los anticuerpos o similares para la semaforina W, semaforina Y y semaforina Z se preparan para activadores de regeneración del nervio central (documentos WO 98/15628, WO 98/11216 y WO 98/20928) y es conocido un procedimiento para provocar el desarrollo de neuritas poniendo en contacto una célula nerviosa con un anticuerpo que se une específicamente a la colapsina humana (patente US nº 5.416.197). Sin embargo, ninguno de los compuestos de bajo peso molecular que inhibe específicamente la semaforina era completamente desconocido hasta ahora.

Exposición de la invención

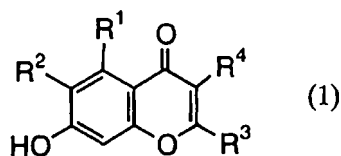
El objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un nuevo compuesto con actividad inhibitora de semaforina, un procedimiento microbiológico para producir el compuesto, un activador de la regeneración de nervios que contiene el compuesto como ingrediente activo o similares.

ES 2 316 763 T3

Se cree que las semaforinas presentan varias acciones, y algunos investigadores han afirmado que las semaforinas estaban implicadas no solamente en el desarrollo de nervios sino también en la regeneración de nervios, pero realmente no se conocía nada al respecto. Los presentes inventores han descubierto que los compuestos denominados SPF-3059-1 y similares descubiertos en el cultivo de la cepa SPF-3059 de *Penicillium* sp. presentan actividad inhibidora de semaforina y se ha demostrado que los compuestos también activan la regeneración de nervios *in vivo*. Los presentes inventores han descubierto además un nuevo compuesto con actividad inhibidora de semaforina aislando y purificando el cultivo de la cepa SPF-3059 e identificando una sustancia que inhibe la actividad de semaforina *in vivo*. La presente invención se realizó basándose en estos descubrimientos.

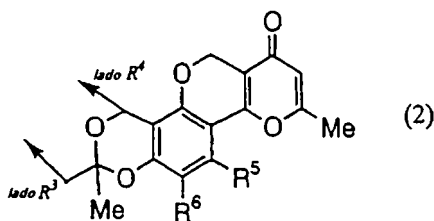
Por consiguiente, la presente invención se refiere a lo siguiente:

[1] Un compuesto representado por la fórmula general (1):



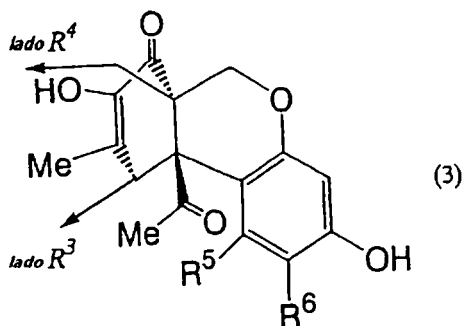
en la que R¹, R², R³ y R⁴ representan uno de los siguientes [I] a [IX]:

[I] R¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo carboxilo, R² representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo, y R³ y R⁴, se unen para formar un grupo divalente de fórmula (2):



en la que R⁵ representa un átomo de hidrógeno o un grupo carboxilo y R⁶ representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo;

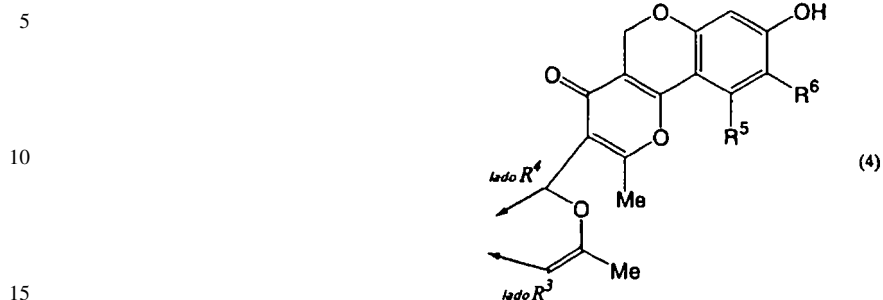
[II] R¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo carboxilo, R² representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo, y R³ y R⁴, se unen para formar un grupo divalente de fórmula (3):



en la que R⁵ y R⁶ tienen los mismos significados que anteriormente;

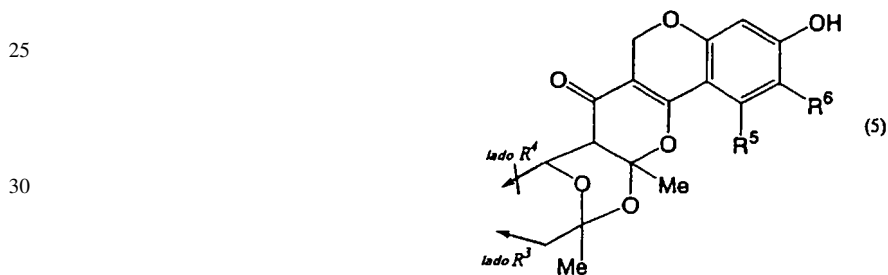
ES 2 316 763 T3

- [III] R¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo carboxilo, R² representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo, y R³ y R⁴, se unen para formar un grupo divalente de fórmula (4):



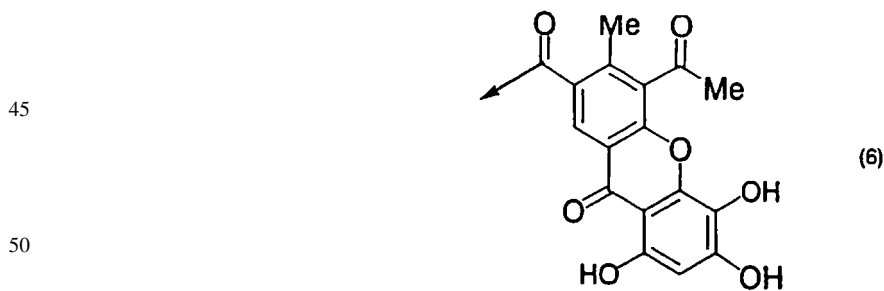
en la que R⁵ y R⁶ tienen los mismos significados que anteriormente;

- [IV] R¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo carboxilo, R² representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo, y R³ y R⁴, se unen para formar un grupo divalente de fórmula (5):

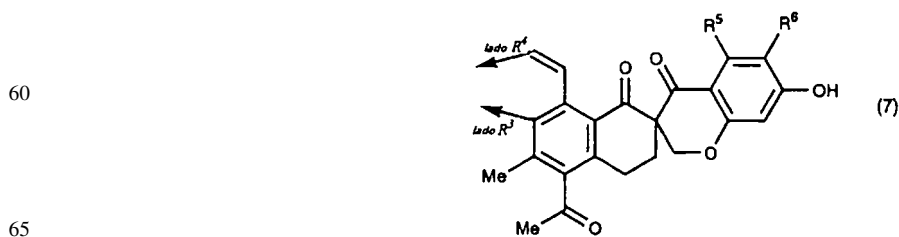


en la que R⁵ y R⁶ tienen los mismos significados que anteriormente;

- [V] R¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo carboxilo, R² representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo, R³ representa un átomo de hidrógeno y R⁴ representa un grupo de fórmula (6):



- [VI] R¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo carboxilo, R² representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo y R³ y R⁴ se unen para formar un grupo divalente de fórmula (7):

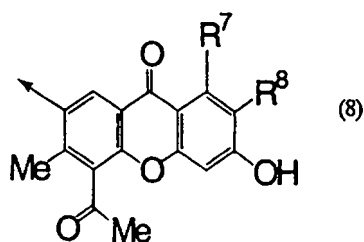


en el que R⁵ y R⁶ tienen los mismos significados que anteriormente;

ES 2 316 763 T3

- [VII] R^1 representa un átomo de hidrógeno o un grupo carboxilo, R^2 representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo, y R^3 representa un grupo de fórmula (8):

5

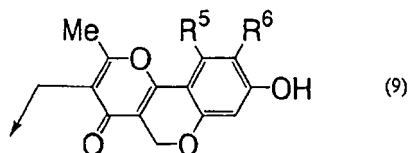


10

15

en la que R^7 representa un átomo de hidrógeno o un grupo carboxilo y R^8 representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo y R^4 representa un grupo de fórmula (9);

20



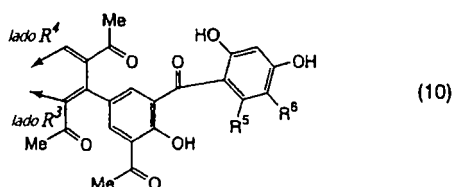
25

30

en la que R^5 representa un grupo carboxilo y R^6 tiene el mismo significado que anteriormente;

- [VIII] R^1 representa un grupo carboxilo, R^2 representa un grupo hidroxilo, y R^3 y R^4 se unen para formar un grupo divalente de fórmula (10):

35



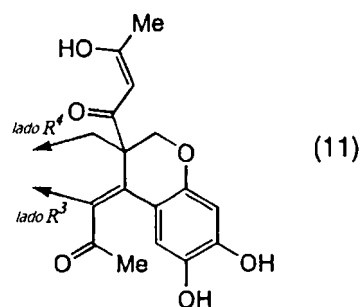
40

45

en la que R^5 representa un grupo carboxilo y R^6 representa un grupo hidroxilo;

- [IX] R^1 representa un grupo carboxilo; R^2 representa un grupo hidroxilo, y R^3 y R^4 se unen para formar un grupo divalente de fórmula (11):

50



55

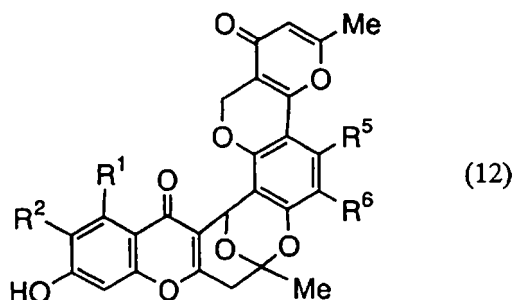
60

65

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

ES 2 316 763 T3

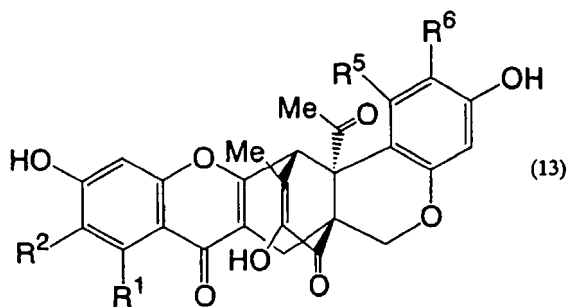
Compuesto según [1] representado por la fórmula general (12):



20 en la que R^1 , R^2 , R^5 y R^6 tienen los mismos significados que en [1] [I], o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 Compuesto según [2], en la que R^1 y R^5 son independientemente un grupo carboxilo, R^2 es un grupo hidroxilo un átomo de hidrógeno y R^6 es un grupo hidroxilo en la fórmula general (12), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

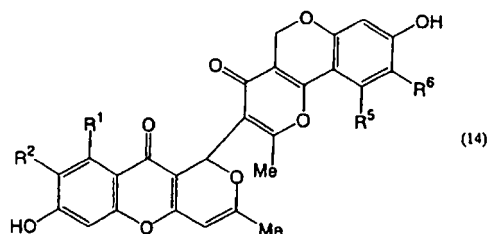
30 Compuesto según [1] representado por la fórmula general (13):



45 en la que R^1 , R^2 , R^5 y R^6 tienen los mismos significados que en [1] [III], o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

50 Compuesto según [4], en el que R^1 y R^5 son independientemente un grupo carboxilo, y R^2 y R^6 son independientemente un grupo hidroxilo en la fórmula general (13) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

55 Compuesto según [1] representado por la fórmula general (14):



60 en la que R^1 , R^2 , R^5 y R^6 tienen los mismos significados que en [1] [III] o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

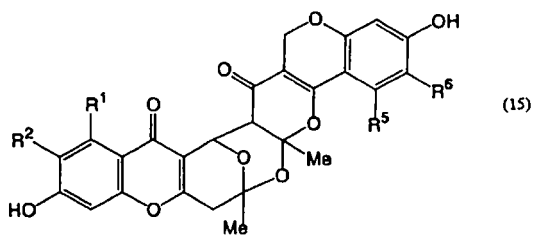
65 Compuesto según [6], en el que R^1 y R^5 son independientemente un grupo carboxilo, y R^2 y R^6 son independientemente un grupo hidroxilo en la fórmula general (14) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

ES 2 316 763 T3

Compuesto según [1] representado por la fórmula general (15):

5

10



15

en la que R^1 , R^2 , R^5 y R^6 tienen los mismos significados que en [1] [IV], o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

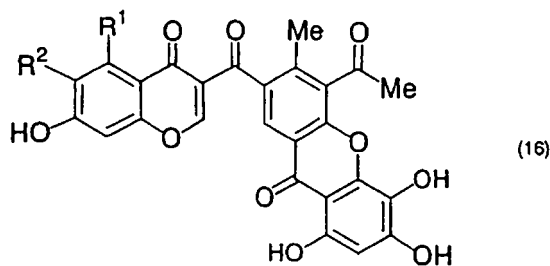
20

Compuesto según [8], en la que R^1 y R^5 son independientemente un grupo carboxilo y R^2 y R^6 son independientemente un grupo hidroxilo en la fórmula general (15), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Compuesto según [1] representado por la fórmula general (16):

25

30



35

en la que R^1 y R^2 tienen los mismos significados que en [1] [V], o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

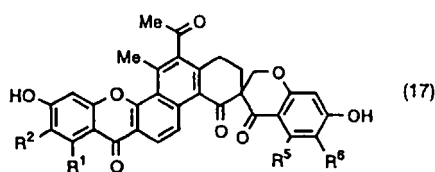
40

Compuesto según [10], en la que R^1 representa un grupo carboxilo y R^2 representa un grupo hidroxilo en la fórmula general (16), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Compuesto según [1] representado por la fórmula general (17):

45

50



55

en la que R^1 , R^2 , R^5 y R^6 tienen los mismos significados que en [1] [VI], o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

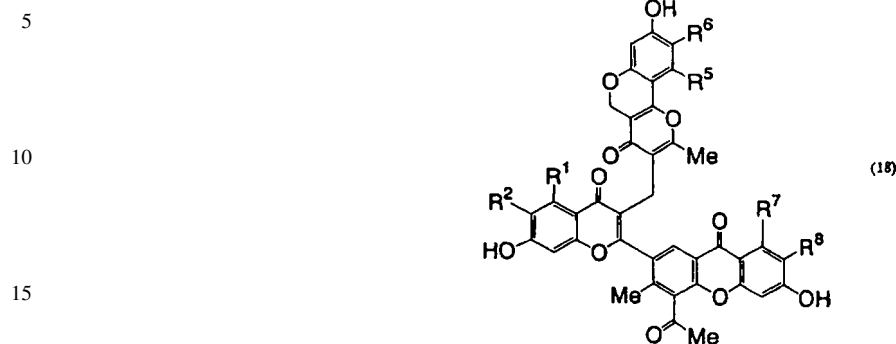
60

Compuesto según [12], en la que R^1 y R^5 representa cada uno un grupo carboxilo y R^2 y R^6 representan independientemente un grupo hidroxilo en la fórmula general (17), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

65

ES 2 316 763 T3

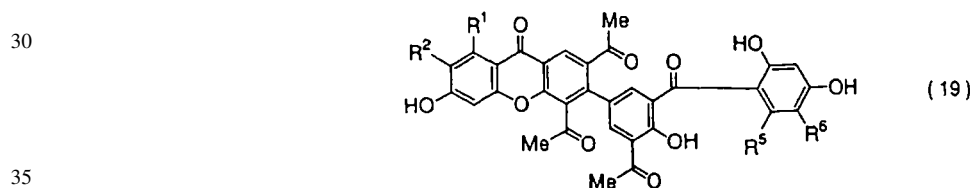
Compuesto según [1] representado por la fórmula general (18):



20 en la que R¹, R², R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ tienen los mismos significados que en [1] [VII], o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

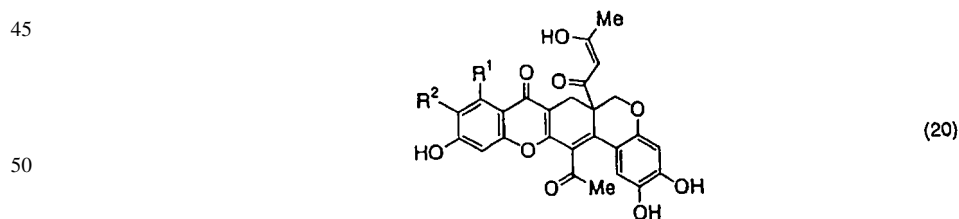
25 Compuesto según [14], en el que R¹ representa un grupo carboxilo, R², R⁶ y R⁸ son independientemente un grupo hidroxilo y R⁵ es un átomo de hidrógeno en la fórmula general (18), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 Compuesto según [1] representado por la fórmula general (19):



40 en la que R¹ y R⁵ representa cada uno un grupo carboxilo y R² y R⁶ representa cada uno un grupo hidroxilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

45 Compuesto según [1], representado por la fórmula general (20):



55 en la que R¹ es un grupo carboxilo y R² es un grupo hidroxilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Utilización de un compuesto de cualquiera de [1] a [17], o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para inhibir la actividad de una semaforina.

60 Utilización según [18], en la que la semaforina es una semaforina de clase 3.

Utilización según [19], en la que la semaforina de clase 3 es la semaforina 3A.

65 Utilización del compuesto según cualquiera de [1] a [17], o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para inhibir la actividad de un factor repelente del desarrollo de nervios.

ES 2 316 763 T3

Utilización de un compuesto según cualquiera de [1] a [17], o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para suprimir la actividad de colapso del cono de crecimiento y/o inhibir el desarrollo del nervio en un gel de colágeno.

5 Utilización del compuesto según cualquiera de [1] a [17], o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para activar la regeneración de nervios.

Utilización del compuesto según cualquiera de [1] a [17], o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para la prevención o el remedio de enfermedades neuropáticas y/o enfermedades
10 neurodegenerativas.

Utilización del compuesto según cualquiera de [1] a [17], o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para la prevención o el remedio de enfermedades incluyendo la lesión del nervio raquídeo y/o la lesión del nervio periférico.
15

Utilización del compuesto según cualquiera de [1] a [17], o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para la prevención o el remedio de enfermedades de anomalía olfativa, neuropatía traumática, neuropatía de infarto cerebral, parálisis del nervio facial, neuropatía diabética, glaucoma, retinitis pigmentosa, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedades neurodegenerativas, esclerosis lateral
20 hipoplástica muscular, enfermedad de Lou Gehrig, corea de Huntington, infarto cerebral o enfermedades neurodegenerativas traumáticas.

Procedimiento para producir un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según cualquiera de [1] a [17], en la que un microorganismo *Penicillium* sp. SPF-3059 se cultiva y que se recoge el compuesto del cultivo.
25

[A] Se ha dado a conocer también: Un compuesto que puede obtenerse a partir de la cepa SPF-3059 que pertenece al género *Penicillium* con las siguientes propiedades físicas y químicas y una actividad inhibidora de semaforina:

- 30 (a) valor m/z (M+H)⁺: 545 del espectro de masas por bombardeo de átomo rápido;
- (b) fórmula molecular: C₂₈H₁₆O₁₂;
- 35 (c) $\lambda_{\text{máx}}$. del espectro de absorción UV-visible (en metanol) nm(ϵ): 213(41700), 286(29500), 338sh(14900), 429sh(6500);
- (d) $\nu_{\text{máx}}$ (KBr) del espectro de absorción infrarrojo cm⁻¹: 3358, 3073, 1700, 1674, 1631, 1464, 1276, 1248;
- 40 (e) espectro ¹H-RMN (DMSO-d₆, 500 MHz): cartografía del espectro mostrada en la Figura 1;
- (f) espectro ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 125 MHz): cartografía del espectro mostrada en la Figura 2.

45 [B] Un compuesto que puede obtenerse a partir de la cepa SPF-3059 que pertenece al género *Penicillium* con las siguientes propiedades físicas y químicas y una actividad inhibidora de semaforina:

- (a) valor m/z (M+H)⁺: 561 del espectro de masas por bombardeo de átomo rápido;
- 50 (b) fórmula molecular: C₂₈H₁₆O₁₃;
- (c) $\lambda_{\text{máx}}$. del espectro de absorción UV-visible (en metanol) nm(ϵ): 219(34300), 257(28900), 311(28600), 404(14600), 450(14400);
- 55 (d) $\nu_{\text{máx}}$ (KBr) del espectro de absorción infrarrojo cm⁻¹: 3154, 1657, 1605, 1468, 1279;
- (e) espectro ¹H-RMN (DMSO-d₆): cartografía del espectro mostrada en la Figura 3;
- 60 (f) espectro ¹³C-RMN (DMSO-d₆): cartografía del espectro mostrada en la Figura 4.

[C] Un compuesto que puede obtenerse a partir de la cepa SPF-3059 que pertenece al género *Penicillium* con las siguientes propiedades físicas y químicas y una actividad inhibidora de semaforina:

- 65 (a) valor m/z (M+H)⁺: 669 del espectro de masas por bombardeo de átomo rápido;

ES 2 316 763 T3

- (b) fórmula molecular: $C_{34}H_{20}O_{15}$;
- (c) $\lambda_{\text{máx.}}$ del espectro de absorción UV-visible (en metanol) nm(ϵ): 213(54600), 235sh(39400), 312(31300), 350(24200);
- (d) $\nu_{\text{máx}}$ (KBr) del espectro de absorción infrarrojo cm^{-1} : 3348, 1766, 1707, 1644, 1588, 1464, 1301;
- (e) espectro ^1H -RMN (DMSO- d_6 , 500 MHz): cartografía del espectro mostrada en la Figura 5;
- (f) espectro ^{13}C -RMN (DMSO- d_6 , 125 MHz): cartografía del espectro mostrada en la Figura 6.

[D] Un compuesto que puede obtenerse a partir de la cepa SPF-3059 que pertenece al género *Penicillium* con las siguientes propiedades físicas y químicas y una actividad inhibidora de semaforina:

- (a) valor m/z (M+H) $^+$: 549 del espectro de masas por bombardeo de átomo rápido;
- (b) fórmula molecular: $C_{28}H_{20}O_{12}$;
- (c) $\lambda_{\text{máx.}}$ del espectro de absorción UV-visible (en metanol) nm(ϵ): 227(30200), 282sh(13500), 315(13900), 356(11000);
- (d) $\nu_{\text{máx}}$ (KBr) del espectro de absorción infrarrojo cm^{-1} : 3396, 1688, 1662, 1622, 1470, 1294;
- (e) espectro ^1H -RMN (DMSO- d_6 , 500 MHz): cartografía del espectro mostrada en la Figura 7;
- (f) espectro ^{13}C -RMN (DMSO- d_6 , 125 MHz): cartografía del espectro mostrada en la Figura 8.

[E] Inhibidor de semaforina que comprende como ingrediente activo el compuesto según cualquiera de [1] a [17] o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas.

[F] Inhibidor de semaforina según [E], en la que la semaforina es una semaforina de clase 3.

[G] Inhibidor de semaforina según [F], en la que la semaforina de clase 3 es la semaforina 3A.

[H] Inhibidor de semaforina según [E], en la que la semaforina es una semaforina de clase 6.

[I] Inhibidor de semaforina según [H], en la que la semaforina de clase 6 es la semaforina 6C.

[J] Inhibidor del factor repelente del desarrollo de nervios que comprende un inhibidor de semaforina según cualquiera de [E] a [I], como ingrediente activo.

[K] Agente con acción supresora de la actividad de colapso del cono de crecimiento y/o sobre la actividad inhibidora de desarrollo de nervios en un gel de colágeno que comprende un inhibidor de semaforina según cualquiera de [E] a [I], como ingrediente activo.

[L] Activador de regeneración de nervios que comprende un inhibidor de semaforina según cualquiera de [E] a [I], como ingrediente activo.

[M] Un agente preventivo o remedio para enfermedades neuropáticas y/o enfermedades neurodegenerativas, que comprende un inhibidor de semaforina según cualquiera de [E] a [I], como ingrediente activo.

[N] Agente preventivo o remedio para enfermedades incluyendo la lesión del nervio raquídeo y/o la lesión del nervio periférico, que comprende un inhibidor de semaforina según cualquiera de [E] a [I] como ingrediente activo.

[O] Agente preventivo o remedio para la anomalía olfativa, la neuropatía traumática, la neuropatía del infarto cerebral, parálisis del nervio facial, neuropatía diabética; glaucoma; retinitis pigmentosa, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedades degenerativas, esclerosis lateral hipoplástica muscular; enfermedad de Lou Gehrig; corea de Huntington, infarto cerebral o enfermedades neurodegenerativas traumáticas, comprendiendo un inhibidor de semaforina según cualquiera de [E] a [I], como ingrediente activo.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 presenta un espectro de ¹H-RMN (DMSO-d₆) de SPF-3059-10.

5 La Figura 2 presenta un espectro de ¹³C-RMN (DMSO-d₆) de SPF-3059-10.

La Figura 3 presenta un espectro de ¹H-RMN (DMSO-d₆) de SPF-3059-18.

10 La Figura 4 presenta un espectro de ¹³C-RMN (DMSO-d₆) de SPF-3059-18.

La Figura 5 presenta un espectro de ¹H-RMN (DMSO-d₆) de SPF-3059-31.

La Figura 6 presenta un espectro de ¹³C-RMN (DMSO-d₆) de SPF-3059-31.

15 La Figura 7 presenta un espectro de ¹H-RMN (DMSO-d₆) de SPF-3059-41.

La Figura 8 presenta un espectro de ¹³C-RMN (DMSO-d₆) de SPF-3059-41.

20 Mejor modo de poner en práctica la invención

En la presente invención, la semaforina es una denominación genérica para proteínas que tienen dominios de semaforina con estructuras similares constituidas por aproximadamente 500 restos de aminoácidos (*Neuron* 14, 941-948, 1995) y aproximadamente 20 variantes o más han sido descritas hasta la fecha. En la presente invención, sin embargo, las semaforinas no estarán limitadas por estas semaforinas conocidas públicamente. Lo que se expone a continuación puede resultar ejemplificativo de dichas semaforinas: semaforinas de mamíferos tales como seres humanos, etc.; preferentemente semaforinas de clase 3, 4, 5 ó 6 definidas en la bibliografía (*Cell* 97, 551, 1999); más preferentemente semaforinas de clase 3 ó 6; y aún más preferentemente la semaforina 3A (*Cell* 75, 217, 1993; *Cell* 75, 1389, 1993) en semaforinas de clase 3 y semaforina 6C (documento WO 98/11216, *Moll. Cell. Neurosci.* 13, 9-23 (1999)) en semaforinas de clase 6. La información de la secuencia con respecto a los genes que codifican estas semaforinas se da a conocer en la base de datos del GenBank, las bibliografías mencionadas anteriormente o similares. Además, la semaforina en la presente invención no estará limitada a una proteína natural o recombinante pero incluye también: una proteína en la que solamente el dominio extracelular de una semaforina unida a la membrana se expresa y se disuelve; una proteína de fusión con otra proteína tal como un anticuerpo, fosfatasa alcalina o similares; una proteína a la que se añade una etiqueta tal como His-tag, Flag o similares; o un mutante en el que parte de los aminoácidos se han eliminado, sustituido o añadido.

Por ejemplo, la semaforina 6C (Sema6C) es una proteína unida a la membrana y el dominio extracelular de Sema6C se utiliza habitualmente tal como para medir la actividad de un inhibidor utilizando acciones activadoras o supresoras de actividades de Sema6C. Son conocidas dos isoformas en el dominio extracelular de Sema6C (documento WO 98/11216; *Moll. Cell. Neurosci.* 13, 9-23 (1999)), que tienen ambas actividad de colapso del cono de crecimiento. Una proteína de fusión en la que el dominio extracelular de dicha Sema6C y una proteína marcadora y/o una etiqueta de péptido se unen pueden utilizarse provechosamente para dichos casos de medición de la actividad de una sustancia presente siempre que la actividad de Sema6C no se altere. Los ejemplos de proteínas marcadoras incluyen las proteínas marcadoras convencionalmente bien conocidas tales como la fosfatasa alcalina (*Cell* 63, 185-194 (1990)), la zona Fc de un anticuerpo (número de registro M87789 del GenBank), HRP y similares, y etiquetas de péptido resultan ejemplificativas por Mic-tag, His-tag, Flag-tag y similares convencionalmente muy conocidas.

En la presente invención, un inhibidor de semaforina significa una sustancia que inhibe una actividad de cualquiera de las semaforinas mencionadas anteriormente tales como, por ejemplo, la actividad de migración de una célula, la actividad de provocación de la muerte celular, los cambios morfológicos de una célula tal como una célula el acabado de una célula o el colapso del cono de crecimiento, la actividad de supresión o de activación para el desarrollo de neuritas, suprimiendo o estimulando la actividad para el desarrollo de dendritas o de células nerviosas, la actividad de guía del axón nervioso o similares. Puede adoptarse cualquier sustancia que inhiba las actividades anteriores de la semaforina tal como dicho inhibidor de semaforina sin limitación específica. Preferentemente, se ponen como ejemplos un compuesto con acción de activación sobre la regeneración de los nervios centrales y/o periféricos, más preferentemente un compuesto que tiene acción de supresión sobre la actividad de colapso del cono de crecimiento poseída por la semaforina y/o la acción inhibidora del desarrollo de nervios en un gel de colágeno, y aún más preferentemente un compuesto que tiene acción supresora tanto sobre la actividad de colapso del cono de crecimiento como la actividad inhibidora del desarrollo de nervios de la semaforina en un gel de colágeno.

La acción activadora en la regeneración del nervio central y/o periférico se refiere a una acción que activa la regeneración nerviosa en los tejidos del sistema nervioso central tales como el cerebro, la médula espinal y similares, y/o en los tejidos del sistema nervioso periférico que están en órganos o en la superficie del cuerpo o en el cuerpo que consisten en las partes marginales y periféricas y no en los tejidos del sistema nervioso central. A este respecto, la acción activadora en la regeneración del nervio central incluye la activación de la acción no solamente en la regeneración de nervios en la que un axón surge de un cuerpo de la célula nerviosa en la zona central, tal como un nervio de la retina o un nervio de la corteza cerebral, y se proyecta sobre otra célula nerviosa que está también en la zona

central, sino también en la regeneración de nervios en la que un axón del nervio se regenera en el tejido nervioso central circunstancia aun cuando un nervio, tal como una fibra aferente de un nervio olfativo o un nervio sensorial del ganglio de la espina dorsal, surge de un cuerpo de la célula nerviosa en la periferia. Además, la acción activadora sobre la regeneración del nervio periférico incluye la acción activadora no solamente sobre la regeneración del nervio de un nervio que surge de un cuerpo celular del nervio periférico y que se prolonga en un tejido periférico, sino también sobre la regeneración del nervio en el que la circunstancia para la regeneración es el tejido nervioso periférico aun cuando emerja un nervio de un cuerpo celular del nervio central (cerebro, médula espinal o similares). Este último puede resultar ejemplificativo por la acción activadora de la regeneración de nervios para dicho nervio motor de la médula espinal, un nervio preganglionario en los sistemas nerviosos autónomos como los nervios del simpático y del parasimpático y similares. La acción activadora en la regeneración de un nervio tal como el nervio ciático, que tiene ambos nervios mencionados anteriormente puede resultar ejemplificativa. Un compuesto con acción activadora sobre la regeneración del nervio central y periférico es particularmente preferible para un inhibidor de semaforina de la presente invención. El tejido nervioso central descrito inicialmente se refiere a un tejido que comprende el cerebro, el bulbo raquídeo, la médula espinal, los ojos y similares, y más específicamente se refiere a una zona en la que el transporte de sustancias de alto peso molecular está limitada por las estructuras tales como la barrera sangre-cerebro y la barrera sangre-retina. El sistema nervioso periférico (tejido) se refiere a la zona de las demás partes del cuerpo. Las fibras nerviosas son en general capaces de regenerarse en los tejidos nerviosos periféricos, pero no pueden regenerarse en los tejidos nerviosos centrales.

La actividad de colapso del cono de crecimiento de semaforina descrita anteriormente significa una actividad para hacer que desaparezcan los conos de crecimiento. Esta actividad se observa después de realizar las etapas siguientes: cultivar células nerviosas (generalmente explantes tisulares de ganglios) durante un periodo de tiempo dado *in vitro* hasta que las neuritas prolongadas así como los conos de crecimiento en el borde de dichas neuritas puedan observarse; y a continuación añadir a éstas una concentración dada (por ejemplo aproximadamente 3 unidades/ml; 1 unidad/ml se define como la concentración de semaforina a la que se colapsa el 50% de los conos de crecimiento) de semaforina y cultivar durante otro periodo de tiempo dado (por ejemplo una hora). Con objeto de obtener las neuritas prolongadas y los conos de crecimiento en el borde de dichas neuritas listas para la observación, las células nerviosas se cultivan generalmente durante 10 a 20 horas *in vitro*, cuya duración puede alterarse según una variante del nervio y las condiciones del cultivo. Cuando se suprime el colapso del cono de crecimiento producido por la semaforina, por ejemplo, por adición de un compuesto a su sistema experimental en una concentración apropiada alrededor de una hora antes de la adición de semaforina, entonces dicho compuesto se considera inhibidor de semaforina, especialmente como compuesto con acción supresora sobre la actividad de colapso del cono de crecimiento de semaforina. Aunque no existe ninguna limitación específica para un compuesto con dicha acción supresora sobre la actividad de colapso del cono de crecimiento, pueden resultar ejemplificativos los compuestos que presentan la acción supresora a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ o inferior, preferentemente 30 $\mu\text{g/ml}$ o inferior, más preferentemente 10 $\mu\text{g/ml}$ o inferior y aún más preferentemente 3 $\mu\text{g/ml}$ o inferior. Además, un compuesto que no afecta sustancialmente la proliferación de las células tal como las células nerviosas, las células que expresan semaforina o similares es preferible como inhibidor de semaforina con el fin de confirmar el efecto de los inhibidores de semaforina de la presente invención y en vista de la seguridad cuando se utiliza como compuesto farmacéutico.

La actividad inhibidora del desarrollo nervioso de semaforina en un gel de colágeno descrito anteriormente significa, por ejemplo, la actividad inhibidora del desarrollo de neuritas observado en un gel de colágeno que contiene, por ejemplo, tanto células productoras de semaforina como células nerviosas (normalmente ganglios). Y la acción supresora de dicha actividad inhibidora del desarrollo de neuritas es una actividad para inhibir continuamente la actividad de semaforina en un gel de colágeno, y, por ejemplo, es una actividad mediante la cual las neuritas pueden crecer demasiado al lado de las células que producen semaforina tanto como 1/2 o más del desarrollo observado en el lado opuesto en presencia de la sustancia objeto en condiciones experimentales en las que las neuritas pueden crecer solamente hasta 1/3 o menos para las células que producen semaforina en comparación con el crecimiento observado en el lado opuesto de las células que producen semaforina cuando se observan después de cultivar las células que producen semaforina y las células nerviosas adyacentes en un gel de colágeno, normalmente durante la noche o incluso más. Además, no existe ninguna limitación particular para un compuesto con acción supresora en la actividad inhibidora de neuronas de la semaforina en dicho gel de colágeno. Sin embargo, las que presentan la acción supresora anterior a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ o inferior, preferentemente 30 $\mu\text{g/ml}$ o menos, más preferentemente 10 $\mu\text{g/ml}$ o menos y aún más preferentemente 3 $\mu\text{g/ml}$ o menos se ponen como ejemplos.

La semaforina utilizada para medir los dos tipos de actividades de semaforina mencionadas anteriormente no está limitada a una semaforina natural y las semaforinas siguientes descritas inicialmente también pueden utilizarse: semaforina en la que se expresa y se disuelve solamente el dominio extracelular de la semaforina que se une a la membrana; una proteína de fusión con otra proteína tal como un anticuerpo, fosfatasa alcalina o similares; semaforina a la que se le añade un tag tal como un His-tag o un Flag; o semaforina en la que algunos aminoácidos están alterados. Además, los ganglios de la espina dorsal de embriones de pollo de embriones de 7 u 8 días se utilizan convenientemente como células nerviosas para el cultivo. Sin embargo, los ganglios de la médula espinal de otros animales distintos de pollo, o de cualquier otra célula nerviosa tal como los ganglios del simpático, los ganglios de la retina, los ganglios cervicales superiores o similares aparte de los ganglios de la espina dorsal pueden utilizarse también siempre que las células nerviosas sean capaces de prolongar sus neuritas en el cultivo *in vitro*. No existe ninguna limitación específica a la condición del cultivo siempre que pueda observarse el desarrollo de las neuritas y puedan medirse las actividades de la semaforina.

ES 2 316 763 T3

El mecanismo de actuación de los inhibidores de semaforina de la presente invención puede considerarse de la manera siguiente. La inhibición del crecimiento de neuritas o el colapso del cono de crecimiento producido por la semaforina es desencadenado por la fijación de la semaforina a su receptor en la superficie de la célula nerviosa (cono de crecimiento). La señal se transmite desde el receptor al que está unido la semaforina a la trayectoria de señalización intracelular y la despolimerización de las fibras de actina aparece finalmente, que como resultado da lugar a la supresión del desarrollo de neuritas y al colapso del cono de crecimiento. La inhibición de la actividad de semaforina se consigue inhibiendo o bloqueando cualquiera de las etapas en el transcurso de estas reacciones. Como receptor para semaforina mencionado anteriormente, puede adoptarse un receptor para cualquiera de las semaforinas anteriores, y un mutante o un componente de una parte de dicho receptor puede adoptarse también con la condición de que la semaforina pueda unirse a él. Ejemplos específicos del mismo son Neuropilina-1, plexina y similares (documento WO 01/405457). Los inhibidores de semaforina de la presente invención no estarán limitados a sus mecanismos de actuación y a un inhibidor que inhibe cualquiera de las etapas del mecanismo de actuación descrito anteriormente está incluido en la categoría de la presente invención. Es decir, está incluido también un compuesto en la categoría de la presente invención, cuando el compuesto inhibe la actividad de semaforina inhibiendo las reacciones que se refieren a la trayectoria de señalización intracelular que tiene lugar desde la fijación del receptor mencionado anteriormente de semaforina hasta la despolimerización de las fibras de actina. Además, un procedimiento de medición de la actividad inhibidora de fijación al receptor de semaforina puede ser cualquier procedimiento si es seleccionado de manera apropiada por los expertos en la materia, el cual está ejemplificado por un procedimiento de medición de la actividad inhibidora de fijación al receptor de semaforina en el que se fusiona la semaforina con otra proteína tal como un anticuerpo, fosfatasa alcalina o similar o la semaforina a la que se añade His-tag, Flag o similares, como se describió inicialmente, está unido a un receptor de dicha semaforina o a una célula que expresa un componente del receptor en presencia de una sustancia presente. En las fórmulas generales (1) y (12) a (18), R¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo carboxilo y preferentemente un grupo carboxilo y R² representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo y preferentemente un grupo hidroxilo.

En las fórmulas generales (19) y (20) R¹ representa un grupo carboxilo y R² representa un grupo hidroxilo.

En las fórmulas generales (1), (12) a (15) y (17), R⁵ representa un átomo de hidrógeno o un grupo carboxilo, y preferentemente un grupo carboxilo, y R⁶ representa un átomo de hidroxilo o un grupo hidroxilo y preferentemente un grupo hidroxilo.

En la fórmula general (18), R⁵ representa un grupo carboxilo, y R⁶ representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo, preferentemente un grupo hidroxilo.

En la fórmula general (19) R⁵ representa un grupo carboxilo y R⁶ representa un grupo hidroxilo.

En la fórmula general (18), R⁸ representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo y preferentemente un grupo hidroxilo.

Los compuestos que constituyen inhibidores de semaforina de la presente invención pueden ser ejemplificados por los compuestos descritos a continuación en los ejemplos en la presente descripción.

Un compuesto representado por cualquiera de las fórmulas generales (1) y (12) a (20) mencionadas anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable puede obtenerse, por ejemplo, a partir del cultivo de SPF-3059 de *Penicillium* sp. con actividad inhibidora de semaforina como índice. La cepa fue aislada por los presentes inventores a partir de una muestra de suelo recogida en Osaka Prefecture, Japón.

La cepa SPF-3059 posee las características taxonómicas siguientes.

(a) Características del cultivo y morfológicas

En agar-agar con extracto de malta, las colonias crecen lentamente alcanzando un diámetro de 2,8 a 2,9 cm en 21 días a 25°C. Las superficies de la colonia son blancas a amarillas y con aspecto floculento y el color en el lado del reverso es amarillo oscuro. No se observa producción de pigmento soluble ni formación de esporas. En agar-agar con dextrosa de patata, las colonias crecen lentamente alcanzando un diámetro de 3,2 a 3,3 cm en 21 días a 25°C. Las superficies de la colonia son de color amarillo crema blanco y con aspecto de flóculos y el color del reverso es amarillo oscuro a pardo. No se observa producción de pigmento soluble ni formación de esporas. En agar-agar con Czapek, las colonias crecen lentamente alcanzando un diámetro de 3,1 a 3,2 cm en 21 días a 25°C. Las superficies de la colonia son blancas a grises y con aspecto floculento y el color del reverso es amarillo crema. No se observa producción de pigmento soluble ni formación de esporas. En agar-agar con harina de avena (Actino Medium n° 3 "DAIGO", Nihon Pharmaceutical Co., Ltd.), las colonias crecen lentamente alcanzando un diámetro de 2,0 a 2,1 cm en 21 días a 25°C. Las superficies de la colonia son blancas a amarillo o verde grisáceas y con aspecto floculento y el color del reverso es amarillo crema a gris. No se produce pigmento soluble pero se observa formación de conidios. Los conidióforos son de pared lisa con una longitud de 5 a 20 μm y se generan 3 a 6 fialidas de manera monoverticilada en el extremo de los conidióforos. En la parte superior de las cialidas, que tienen una longitud de 3 a 4 μm , se forman conidios en forma de cadena, con 2 a 10 conidios por cadena. Los conidios son en forma de globo con un diámetro de 2,2 a 2,4 μm con la superficie estriada (en general, 10 líneas longitudinales en la superficie). No se observa teleomorfo.

ES 2 316 763 T3

(b) Características fisiológicas

(1) Intervalo de pH para el crecimiento

5 Se examinó el crecimiento en cultivo en agitación utilizando el caldo de cultivo Sabouraud. Se realizó la observación después del cultivo durante 3 días a 27°C. Los resultados son los siguientes:

	pH	Crecimiento
10	3,1	-
	4,5	+
	5,5	++
15	7,1	+++
	8,0	++
	9,0	±
20	10,0	-

(2) Intervalo de temperatura para el crecimiento

25 Se observó el crecimiento en un medio de agar-agar con harina de avena tras la incubación durante 5 días a 38°C.

Basándose en las características taxonómicas anteriores, se identificó la cepa como una cepa del género *Penicillium* y se denominó SPF-3059 de *Penicillium* sp. La cepa se depositó en el International Patent Organism Depository of the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, una institución administrativa independiente, 30 Japón, con el número de registro FERM BP-7663 como número de registro internacional bajo el Tratado de Budapest en reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para el procedimiento de patente.

Según la presente invención, el medio nutriente para la fermentación de la cepa SPF-3059 mencionado anteriormente puede ser líquido o sólido. Resulta preferido el cultivo en agitación o el cultivo sumergido con aireación. No se imponen limitaciones específicas en la composición del medio para su utilización. Los ejemplos de superficies con carbono adecuadas son la glucosa, sacarosa, glicerina, almidón, dextrina, molasas o similares. Ejemplos de fuentes de nitrógeno adecuadas son el hidrolizado de proteínas tal como la peptona y los casaminoácidos; el extracto de carne, el extracto de levadura, la harina de soja, la harina de semillas de algodón, el licor saturado de maíz, aminoácidos tales como histidina u otras fuentes de nitrógeno orgánico, sales amónicas, sales de nitrato u otras fuentes de nitrógeno inorgánico. Los elementos inorgánicos tales como varias sales de fosfato, sulfato de magnesio, cloruro sódico, cloruro potásico, carbonato cálcico pueden añadirse también para ajustar la presión osmótica, ajustar el pH, elementos traza de enriquecimiento o similares. Además, pueden añadirse varios aditivos tales como vitaminas y compuestos relacionados con ácidos nucleicos para estimular el crecimiento de la cepa. También es posible añadir un agente antiespumante tales como el aceite de silicona, el derivado de polipropilenglicol y aceite de soja durante el periodo del cultivo. Un intervalo de temperatura preferido para el cultivo es preferentemente de 20°C a 35°C, más preferentemente de 25 a 30°C y preferentemente el pH del medio es, por ejemplo, los comprendidos en aproximadamente la neutralidad y el periodo de cultivo es, por ejemplo, un lapso de 5 a 10 días.

Para el aislamiento y la purificación de los inhibidores de semaforina de la presente invención representados por cualquiera de las fórmulas (1) y (12) a (20) mencionadas anteriormente del caldo de cultivo de fermentación, puede adoptarse cualquier procedimiento convencional para el aislamiento y la purificación de metabolitos secundarios producidos por microorganismos. Para el aislamiento y purificación del presente compuesto del sobrenadante del caldo de cultivo de fermentación, pueden utilizarse cualquiera de los procedimientos de aislamiento y purificación convencionales adoptados para el aislamiento y la purificación del filtrado del cultivo, por ejemplo, la extracción con disolvente, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de adsorción, cromatografía de partición, cromatografía de filtración en gel, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía en capa fina y similares. Estos procedimientos de aislamiento y purificación pueden adoptarse ya sea solos o en combinación. Para el aislamiento y la purificación del presente compuesto del micelio cultivado, el micelio puede recogerse por medios tales como la filtración o la centrifugación y puede extraerse directamente utilizando un disolvente orgánico soluble en agua tal como acetona, metanol o similares. A continuación puede obtenerse un compuesto de interés a partir del extracto por métodos similares descritos para el aislamiento y la purificación del sobrenadante del caldo de fermentación. Dicho compuesto de interés puede convertirse también en una sal añadiendo una cantidad equivalente de base en un disolvente tal como agua, metanol, etanol, acetona, acetato de etilo, cloroformo, éter o similares.

65 En los compuestos que constituyen los inhibidores de semaforina de la presente invención, sus sales, preferentemente las sales farmacéuticas o veterinariamente aceptables, están incluidas también en la categoría de la presente invención. Los ejemplos de sales incluyen: sales básicas inorgánicas tales como la sal sódica, la sal potásica, la sal de

ES 2 316 763 T3

calcio, la sal de magnesio, la sal de aluminio, la sal de amonio; sales básicas orgánicas tales como la sal de trietilamonio, la sal de trietanolanamónio, la sal de piridinio, la sal de diisopropilamónio; sales básicas de aminoácidos tales como la sal de arginina y la sal de lisina.

5 No existe ninguna limitación específica en cuanto a agentes preventivos y remedios de la presente invención para enfermedades neuropáticas y/o enfermedades neurodegenerativas incluyendo la lesión del nervio raquídeo y/o la lesión del nervio periférico, siempre que contengan los activadores de regeneración de nervios descritos al principio que tienen un inhibidor para un factor repelente de desarrollo de nervios, particularmente los inhibidores de semaforina mencionados anteriormente, como ingrediente activo. Pueden añadirse varios ingredientes tales como los vehículos, aglutinantes, estabilizantes, excipientes, diluyentes, tampones de pH, agentes de disgregación, disolventes, coadyuvantes de disolución, agentes isotónicos. Además, estos agentes preventivos y remedios pueden administrarse por vía oral o parenteral. En otras palabras, pueden administrarse en modos de administración habituales, por ejemplo, pueden administrarse por vía oral en formas de agentes tales como en polvo, gránulos, cápsulas, jarabe, líquido en suspensión o pueden administrarse por vía parenteral inyectándolos en formas de agentes tales como en solución, emulsión y suspensión. Alternativamente, pueden administrarse por vía nasal en forma de agentes de atomización.

10 Aunque la dosificación y la frecuencia de la administración difieren dependiendo del procedimiento de administración y de la edad, peso, condiciones médicas y similares de un paciente, resulta preferido administrar por vía local en la zona de la enfermedad. Como transcurren de varios días a por encima de varios meses para regenerar los nervios, los agentes de prevención o los remedios se administran preferentemente una o más de dos veces durante este periodo para suprimir las actividades de semaforina. Cuando se administran dos veces o más, es preferible administrar los agentes de prevención o los remedios repetidamente durante días consecutivos o a intervalos apropiados. La dosificación puede definirse como varios centenares de μg a 2 g por cada administración en forma de inhibidor de semaforina, preferentemente varias docenas de mg o menos. Para reducir la frecuencia de la administración, pueden utilizarse agentes de liberación mantenida, una bomba osmótica o similares. En alguno de estos procedimientos de administración, resulta preferido adoptar una vía de administración y un procedimiento en los que la concentración debería alcanzar el nivel suficiente para inhibir la actividad de semaforina en la zona de actuación.

15 Las enfermedades neuróticas y las enfermedades neurodegenerativas mencionadas anteriormente que incluyen la lesión del nervio raquídeo y/o la lesión del nervio periférico incluyen la lesión o enfermedades degenerativas de los nervios periféricos o centrales enumerados por: anomalía olfativa debido al envejecimiento o similares; lesión nerviosa aparte de la olfativa causada por traumatismo tal como lesión de la médula espinal; daños en nervios debidos al infarto cerebral o similares; parálisis del nervio facial; neuropatía diabética; glaucoma; retinitis pigmentosa; enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y ALS; esclerosis lateral hipoplástica muscular; enfermedad de Lou Gehrig; corea de Huntington; infarto cerebral; enfermedades neurodegenerativas traumáticas; y así sucesivamente. Las enfermedades acompañadas de angiogénesis en las que está implicada VEGF165 son también las dianas, ya que VEGF165 también utiliza neuropilina como su receptor.

20 Además, la aplicación de los activadores de la regeneración de nervios de la presente invención no estará limitada a productos farmacéuticos tales como agentes de prevención o remedios para enfermedades neuropáticas y/o enfermedades neurodegenerativas, pero se pueden también aplicar a fármacos veterinarios o mejor a reactivos experimentales industrialmente importantes tales como los inhibidores de señalización de semaforina. Debido a que contienen inhibidores de semaforina como ingrediente activo, los activadores de regeneración de nervios de la presente invención estimulan la regeneración del nervio olfativo que es un nervio periférico y estimulan la regeneración de nervios en la zona central, los cuales son el bulbo olfativo, la corteza cerebral, el hipocampo, el cuerpo estriado, el tálamo, el diencéfalo, el mesoencéfalo, el cerebelo, la protuberancia de Varolio, el bulbo raquídeo, la médula espinal, la retina y similares, que están seccionados por la barrera sangre-cerebroespinal.

50 Ejemplos

La presente invención se explicará con mayor detalle haciendo referencia a los ejemplos siguientes. El alcance técnico de la invención, sin embargo, no se limita a estos ejemplos.

55 Ejemplo 1

Producción del compuesto según la presente invención

60 Un volumen de 10 ml de un medio líquido que contiene glucosa al 2%, sacarosa al 5%, polvo de semillas de algodón al 2%, nitrato sódico al 0,1%, L-histidina al 0,1%, fosfato dipotásico al 0,05%, cloruro potásico al 0,07% y sulfato magnésico heptahidratado al 0,0014%, con su pH ajustado a 7,0, se preparó en un matraz Erlenmeyer de 50 ml y se esterilizó en un autoclave. Una aguja de inoculación de SPF-3059 de *Penicillium* sp. (FERM BP-7663) en un cultivo inclinado se inoculó en este medio y se cultivó en rotación y agitación a 180 rpm durante 4 días a 27°C como preprecultivo. Se distribuyeron 125 ml de un medio con la misma composición que el medio mencionado anteriormente a cada uno de cinco matraces Erlenmeyer de 500 ml y se esterilizó en un autoclave. Posteriormente, 4 ml de la solución de preprecultivo mencionada anteriormente se añadieron a cada uno de estos matraces, que se cultivaron a continuación con rotación y agitación a 180 rpm durante 4 días a 27°C como precultivo. Treinta litros

ES 2 316 763 T3

de un medio líquido que contiene 1,43% de glucosa, 3,57% de sacarosa, 1,43% de polvo de semillas de algodón, 0,07% de nitrato sódico, 0,07% de L-histidina, 0,036% de fosfato dipotásico, 0,05% de cloruro potásico, 0,001% de sulfato de magnesio heptahidratado y 0,01% de Adekanol LG-295S (agente antiespumante de Asahi Denka Co., Ltd.), con su pH ajustado a 7,0, se prepararon en un fermentador de jarra de 50 litros y se esterizaron con vapor de alta presión (121°C, 20 min.). A continuación se añadieron 500 ml de la solución de precultivo mencionada anteriormente al fermentador y se cultivó a 27°C durante 9 días con una agitación de 400 rpm y una aireación de 15 litros/min.

Tras el cultivo, se centrifugó la solución de cultivo a 10.000 rpm durante 10 minutos para separar el sobrenadante y el micelio. Se extrajeron las fracciones de micelio con 30 litros de acetona, a continuación se filtraron y se concentraron. Una vez concentradas en una solución acuosa, se extrajo dos veces con 10 litros de acetato de etilo-ácido fórmico (99:1). El extracto se concentró a presión reducida para obtener 130 g de extracto en bruto. El extracto se disolvió a continuación en 200 ml de metanol y se aplicó a una cromatografía en columna con Sephadex® LH-20 (Amersham Pharmacia Biotech, Ltd.), y se eluyó con metanol. Se recogieron las fracciones activas y se evaporó el disolvente a presión reducida para obtener 91,4 g de material aceitoso. Este material en bruto se disolvió a continuación en 200 ml de metanol para cromatografía en columna utilizando TOYOPEARL® HW-40F (Tosoh Corporation) y se eluyó con metanol. Se recogieron las fracciones activas y se evaporó el disolvente a presión reducida para obtener 41,9 g de sustancia en bruto. Esta sustancia en bruto fue disuelta a continuación por alícuotas de 500 mg en 2,5 ml de sulfóxido de dimetilo (DMSO) para una HPLC de preparación en fase inversa. Las condiciones de la HPLC de preparación en fase inversa fueron, columna: Wakopak® Wakosil-II5C18HGPrep (conexión $\varphi 5 \times 10$ cm y $\varphi 5 \times 25$ cm, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), solución A: solución de ácido fórmico acuoso al 1%, solución B: metanol, gradiente: un gradiente lineal durante 2 horas desde el 45% hasta el 75% para la proporción de la solución B, caudal: 25 ml/min., detección: absorbancia a 260 nm. Se recogieron las fracciones eluidas en cada minuto.

Se analizaron por HPLC analítica las fracciones eluidas descritas anteriormente. Las condiciones de la HPLC analítica fueron, columna: Wakopak® Wakosil-II5C18RS ($\varphi 4,6 \times 150$ mm, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), solución A: solución acuosa al 1% de ácido fórmico, solución B: metanol, gradiente: gradiente lineal durante 71,1 min. desde el 20% al 67% para la proporción de la solución B, caudal: 1,3 ml/min. y detección: absorbancia a 260 nm. Las fracciones que contienen el compuesto objetivo se recogieron con el tiempo de retención en esta HPLC analítica como índice, y se evaporó el disolvente a presión reducida. El material resultante se aplicó de nuevo a la HPLC de preparación y se purificó de manera similar a la anterior, y se continuó aplicando a una cromatografía en columna utilizando TOYOPEARL® HW-40F (Tosoh Corporation) y se purificó de igual manera que anteriormente. Las fracciones que contienen el compuesto objetivo se recogieron y el disolvente se evaporó a presión reducida, y se secó. De este modo, se obtuvieron los compuestos purificados descritos a continuación.

TABLA 1

Compuesto	Cantidad obtenida (mg)	Tiempo de retención en la HPLC analítica
SPF-3059-8	11,1	51,2
SPF-3059-10	3,3	54,8
SPF-3059-16	6,7	41,5
SPF-3059-17	7,9	57,0
SPF-3059-18	1,6	51,5
SPF-3059-19	7,8	39,6
SPF-3059-20	1,3	45,5
SPF-3059-22	1,0	48,4
SPF-3059-23	16,7	33,2
SPF-3059-31	6,5	49,6
SPF-3059-38	4,0	63,1
SPF-3059-40	2,3	53,7
SPF-3059-41	1,0	54,0
SPF-3059-42	2,4	48,2

Las propiedades fisicoquímicas de los compuestos obtenidos son las siguientes:

(SPF-3059-8)

Aspecto: polvo amarillo

Peso molecular: 578

Fórmula molecular: $C_{28}H_{18}O_{14}$

ES 2 316 763 T3

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido (FAB-MS) m/z (positiva): 579(M+H)⁺

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido (FAB-MS) m/z (negativa): 576(M+H)⁻

Espectro de masas de bombardeo atómico rápido de alta resolución (HRFAB-MS) m/z (M+H)⁺

Valor medido: 579,0779

Valor calculado: 579,0775 (C₂₈H₁₉O₁₄)

$\lambda_{\text{máx}}$ del espectro de absorción UV-VISIBLE (en metanol) nm (ϵ): 220(45700), 305(18200), 358(16800)

$\nu_{\text{máx}}$ (KBr) del espectro de absorción infrarrojo cm⁻¹: 3414, 1652, 1568, 1464, 1614, 1289

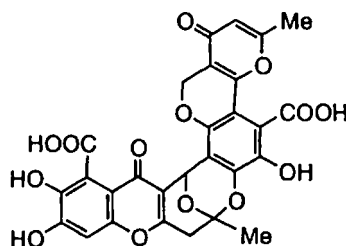
¹H-RMN (DMSO-d₆) δ ppm: 1,75 (3H, s), 2,21 (3H, s), 3,06 (1H, d, 18,8), 3,41 (1H, d, 18,8), 4,72 (1H, d, 13,6), 5,02 (1H, d, 13,6), 6,16 (1H, s), 6,17 (1H, s), 6,84 (1H, s)

¹³C-RMN (DMSO-d₆) δ ppm: 18,7, 26,9, 38,2, 62,0, 62,1, 101,1, 102,1, 104,8, 112,3, 112,6, 113,3, 113,5, 116,6, 119,1, 119,4, 141,4, 143,7 (2C), 145,0, 149,9, 152,0, 154,7, 159,4, 164,6, 167,3, 167,7, 170,9, 174,8

Solubilidad:

Insoluble en agua y hexano y soluble en metanol y DMSO.

Considerada en conjunto, la estructura de SPF-3059-8 se determinó como la fórmula siguiente:



(SPF-3059-10)

Aspecto: polvo amarillo

Propiedades de la sustancia: sustancia ácida

Peso molecular: 544

Fórmula molecular: C₂₈H₁₆O₁₂

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido (FAB-MS) m/z (positiva): 545 (M+H)⁺

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido (FAB-MS) m/z (negativa): 543 (M-H)⁻

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido de alta resolución (HRFAB-MS) m/z (M+H)⁺:

Valor medido: 545,0732

Valor calculado: 547,0740 (C₂₈H₁₇O₁₂)

$\lambda_{\text{máx}}$ del espectro de absorción UV-VISIBLE (en metanol) nm (ϵ): 213(41700), 286(29500), 338sh(14900), 429sh(6500)

$\nu_{\text{máx}}$ del espectro de absorción infrarrojo (KBr) cm⁻¹: 3358, 3073, 1700, 1674, 1631, 1464, 1276, 1248

Espectro ¹H-RMN:

Espectro medido a 500 MHz en hexadeutero sulfóxido de dimetilo (DMSO-d₆) se muestra en la Figura 1.

Espectro ¹³C-RMN:

Espectro medido a 125 MHz en hexadeutero sulfóxido de dimetilo (DMSO-d₆) se muestra en la Figura 2.

ES 2 316 763 T3

Solubilidad:

Insoluble en agua y hexano y soluble en metanol y DMSO.

(SPF-3059-16)

Aspecto: polvo de color crema

Peso molecular: 580

Fórmula molecular: $C_{28}H_{20}O_{14}$

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido (FAB-MS) m/z (positiva): 581 (M+H)⁺

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido (FAB-MS) m/z (negativa): 579 (M-H)⁻

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido de alta resolución (HRFAB-MS) m/z (M+H)⁻:

Valor medido: 579,0812

Valor calculado: 579,0776 ($C_{28}H_{19}O_{14}$)

λ máx del espectro de absorción UV-VISIBLE (en metanol) nm (ϵ): 210(44500), 323(15000), 353sh(12000)

ν máx del espectro de absorción infrarrojo (KBr) cm^{-1} *: 3420, 1694, 1668, 1634, 1568, 1464, 1278

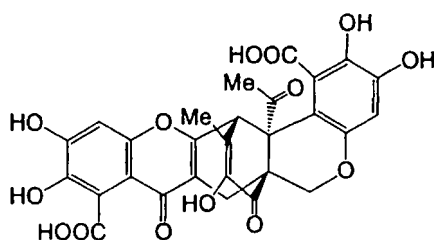
¹H-RMN (DMSO- d_6) δ ppm: 1,88 (3H, s), 2,08 (3H, s), 2,28 (1H, d, 16,6), 2,34 (1H, d, 16,6), 4,07 (1H, d, 10,1), 4,17 (1H, s), 4,42 (1H, d, 10,1), 6,29 (1H, s), 6,93 (1H, s)

¹³C-RMN (DMSO- d_6) δ ppm: 21,1, 24,2, 30,4, 50,1, 50,4, 64,9, 69,3, 102,3, 104,1, 110,6, 111,6, 112, 119,0, 121,6, 138,7, 139,4, 141,6, 147,1, 148,0, 150,4, 152,1, 160,4, 162,6, 167,7, 171,3, 174,3, 198,6, 201,3

Solubilidad:

Insoluble en agua y hexano y soluble en metanol y DMSO.

Considerada en conjunto, la estructura de SPF-3059-16 se determinó como la fórmula siguiente (la configuración estérica es una configuración relativa):



(SPF-3059-17)

Aspecto: polvo amarillo

Peso molecular: 578

Fórmula molecular: $C_{28}H_{18}O_{14}$

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido (FAB-MS) m/z (positiva): 579 (M+H)⁺

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido (FAB-MS) m/z (negativa): 577 (M-H)⁻

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido de alta resolución (HRFAB-MS) m/z (M-H)⁻:

Valor medido: 577,0675

Valor calculado: 577,0619 ($C_{28}H_{17}O_{14}$)

ES 2 316 763 T3

$\lambda_{\text{máx}}$ del espectro de absorción UV-VISIBLE (en metanol) nm (ϵ): 214(49400), 301(8900), 390(22100)

$\nu_{\text{máx}}$ del espectro de absorción infrarrojo (KBr) cm^{-1} : 3109, 1656, 1564, 1459, 1272

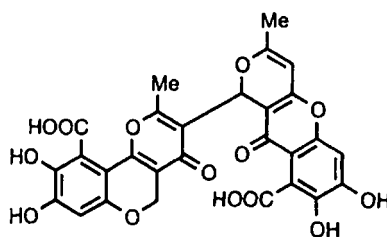
$^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6) δ ppm: 1,89 (3H, s), 2,46 (3H, s), 4,85 (1H, d, 13,3), 4,92 (1H, d, 13,3), 5,52 (1H, s), 6,42 (1H, s), 6,65 (1H, s), 6,88 (1H, s)

$^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6) δ ppm: 17,1, 20,2, 61,9, 71,9, 91,8, 102,8, 103,0 (2C), 103,5, 111,0, 112,6, 117,6, 119,2, 122,9, 139,4, 143,3, 149,2, 150,4, 151,2, 151,7, 154,4, 159,1, 163,4, 165,6, 167,8, 168,6, 170,9, 172,9

Solubilidad:

Insoluble en agua y hexano y soluble en metanol y DMSO.

Considerada en conjunto, la estructura de SPF-3059-17 se determinó como la fórmula siguiente:



(SPF-3059-18)

Aspecto: polvo naranja

Propiedades de la sustancia: sustancia ácida

Peso molecular: 560

Fórmula molecular: $\text{C}_{28}\text{H}_{16}\text{O}_{13}$

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido (FAB-MS) m/z (positiva): 561 (M+H)⁺

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido (FAB-MS) m/z (negativa): 559 (M-H)⁻

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido de alta resolución (HRFAB-MS) m/z (M+H)⁺:

Valor medido: 561,0710

Valor calculado: 561,0670 ($\text{C}_{28}\text{H}_{17}\text{O}_{13}$)

$\lambda_{\text{máx}}$ del espectro de absorción UV-VISIBLE (en metanol) nm (ϵ): 219(34300), 257(28900), 311(28600), 404 (14600), 450(14400)

$\nu_{\text{máx}}$ del espectro de absorción infrarrojo (KBr) cm^{-1} : 3154, 1657, 1605, 1468, 1279

Espectro $^1\text{H-RMN}$:

Espectro medido a 500 MHz en hexadeutero sulfóxido de dimetilo (DMSO- d_6) se muestra en la Figura 3.

Espectro $^{13}\text{C-RMN}$:

Espectro medido a 125 MHz en hexadeutero sulfóxido de dimetilo (DMSO- d_6) se muestra en la Figura 4.

Solubilidad:

Insoluble en agua y hexano y soluble en metanol y DMSO.

(SPF-3059-19)

Aspecto: polvo amarillo

ES 2 316 763 T3

Peso molecular: 596

Fórmula molecular: $C_{28}H_{20}O_{15}$

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido (FAB-MS) m/z (positiva): 597 (M+H)⁺

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido (FAB-MS) m/z (negativa): 595 (M-H)⁻

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido de alta resolución (HRFAB-MS) m/z (M-H)⁻:

Valor medido: 597,0890

Valor calculado: 597,0881 ($C_{28}H_{21}O_{15}$)

$\lambda_{\text{máx}}$ del espectro de absorción UV-VISIBLE (en metanol) nm (ϵ): 204(34600), 225(30900), 267sh(8300), 319(17100), 349(13800), 404(10100)

$\nu_{\text{máx}}$ del espectro de absorción infrarrojo (KBr) cm^{-1} : 3418, 1634, 1605, 1462, 1270

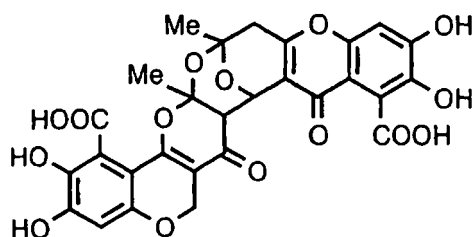
¹H-RMN (DMSO- d_6) δ ppm: 1,43 (3H, s), 1,55 (3H, s), 2,94 (1H, d, 5,5), 3,17 (1H, d, 18,6), 3,24 (1H, d, 18,6), 4,38 (1H, d, 11,9), 4,54 (1H, d, 11,9), 5,27 (1H, d, 5,5), 5,84 (1H, s), 6,59 (1H, s)

¹³C-RMN (DMSO- d_6) δ ppm: 24,5, 28,7, 36,6, 49,4, 62,1, 64,2, 96,8, 99,6, 102,0, 102,6, 103,0, 104,0, 111,1, 120,2 (2C), 113,1, 137,3, 146,5, 150,8, 151,8, 152,0, 153,0, 159,2, 161,3, 167,7, 169,8, 172,6, 185,4

Solubilidad:

Insoluble en agua y hexano y soluble en metanol y DMSO.

Considerada en conjunto, la estructura de SPF-3059-19 se determinó como la fórmula siguiente:



(SPF-3059-20)

Aspecto: polvo amarillo

Peso molecular: 562

Fórmula molecular: $C_{28}H_{18}O_{13}$

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido (FAB-MS) m/z (positiva): 563 (M+H)⁺

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido (FAB-MS) m/z (negativa): 561 (M-H)⁻

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido de alta resolución (HRFAB-MS) m/z (M-H)⁻:

Valor medido: 563,0882

Valor calculado: 563,0826 ($C_{28}H_{19}O_{13}$)

$\lambda_{\text{máx}}$ del espectro de absorción UV-VISIBLE (en metanol) nm (ϵ): 216(49100), 301(21700), 369(14200)

$\nu_{\text{máx}}$ del espectro de absorción infrarrojo (KBr) cm^{-1} : 3444, 3069, 1690, 1649, 1619, 1536, 1435, 1283

¹H-RMN (DMSO- d_6) δ ppm: 1,76 (3H, s), 2,21 (3H, s), 3,09 (1H, d, 18,8), 3,43 (1H, d, 18,8), 4,75 (1H, d, 13,4), 5,03 (1H, d, 13,4), 6,17 (1H, s), 6,18 (1H, s), 6,75 (1H, d, 2,1), 6,83 (1H, d, 2,1)

¹³C-RMN (DMSO- d_6) δ ppm: 18,7, 27,0, 38,3, 61,8, 62,2, 101,0, 102,9, 104,8, 112,3, 112,7, 113,1, 113,3, 113,4, 117,4, 119,2, 136,3, 141,1, 143,7, 145,1, 154,7, 156,9, 160,2, 161,9, 164,7, 167,3, 169,3, 170,8, 174,9

ES 2 316 763 T3

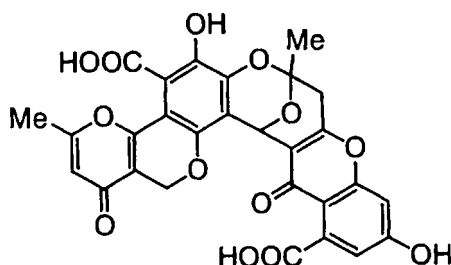
Solubilidad:

Insoluble en agua y hexano y soluble en metanol y DMSO.

5

Considerada en conjunto, la estructura de SPF-3059-20 se determinó como la fórmula siguiente:

10



15

20

(SPF-3059-22)

Aspecto: polvo de color crema

25

Peso molecular: 548

Fórmula molecular: $C_{27}H_{16}O_{13}$

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido (FAB-MS) m/z (positiva): 549 (M+H)⁺

30

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido (FAB-MS) m/z (negativa): 547 (M-H)⁻

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido de alta resolución (HRFAB-MS) m/z (M+H)⁺:

Valor medido: 547,0568

35

Valor calculado: 547,0513 ($C_{27}H_{15}O_{13}$)

$\lambda_{\text{máx}}$ del espectro de absorción UV-VISIBLE (en metanol) nm (ϵ): 208(51900), 240sh(43900), 270sh(38000), 310(30700), 387(18000)

40

$\nu_{\text{máx}}$ del espectro de absorción infrarrojo (KBr) cm^{-1} : 3410, 3068, 1655, 1619, 1599, 1561, 1460, 1310, 1251

¹H-RMN (DMSO- d_6) δ ppm: 2,34 (3H, s), 2,73 (3H, s), 6,31 (1H, s), 6,98 (1H, s), 8,08 (1H, s), 8,69 (1H, s)

45

¹³C-RMN (DMSO- d_6) δ ppm: 17,1, 32,3, 98,1, 101,8, 102,6, 113,3, 117,1, 119,8, 123,2, 125,4, 126, 131,9, 136,2, 140,4, 142,1, 144,7, 150,4, 152,7, 152,9, 154,8, 156,2, 160,4, 167,1, 172,1, 178,9, 192,7, 202,4

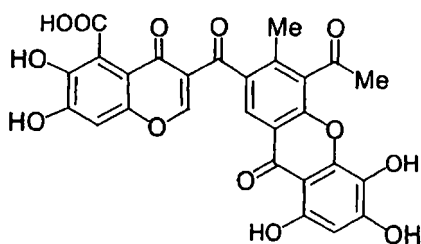
Solubilidad:

50

Insoluble en agua y hexano y soluble en metanol y DMSO.

Considerada en conjunto, la estructura de SPF-3059-22 se determinó como la fórmula siguiente:

55



65

ES 2 316 763 T3

(SPF-3059-23)

Aspecto: polvo amarillo

Peso molecular: 686

Fórmula molecular: $C_{34}H_{22}O_{16}$

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido (FAB-MS) m/z (positiva): 687 (M+H)⁺

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido (FAB- MS) m/z (negativa): 685 (M-H)⁻

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido de alta resolución (HRFAB- MS) m/z (M+H)⁺:

Valor medido: 685,0887

Valor calculado: 685,0830 ($C_{34}H_{21}O_{16}$)

$\lambda_{\text{máx}}$ del espectro de absorción UV-VISIBLE (en metanol) nm (ϵ): 213(53800), 282sh(24100), 324(21700)

$\nu_{\text{máx}}$ del espectro de absorción infrarrojo (KBr) cm^{-1} : 3354, 1688, 1588, 1468, 1288

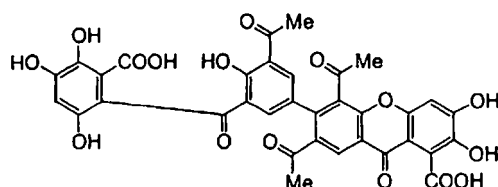
¹H-RMN (DMSO- d_6) δ ppm: 2,14 (3H, s), 2,21 (3H, s), 2,61 (3H, brs), 6,50 (1H, s), 6,85 (1H, s), 7,28 (1H, brs), 7,68 (1H, brs), 8,29 (1H, s)

¹³C-RMN (DMSO- d_6) δ ppm: 30,2, 31,3, 32,3, 102,4, 107,3, 110,0, 114,7, 114,9, 119,7, 120,5, 123,8, 125,9, 126,4, 126,5, 132,6, 135,6, 136,1, 136,7, 139,5, 141,0, 143,4, 145,6, 147,8, 150,4, 151,8, 154,1, 160,5, 167,5, 170,5, 172,7, 197,9, 200,4, 201,2, 202,0

Solubilidad:

Insoluble en agua y hexano y soluble en metanol y DMSO.

Considerada en conjunto, la estructura de SPF-3059-23 se determinó como la fórmula siguiente:



(SPF-3059-31)

Aspecto: polvo amarillo

Propiedades de la sustancia: sustancia ácida

Peso molecular: 668

Fórmula molecular: $C_{34}H_{20}O_{15}$

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido (FAB-MS) m/z (positiva): 669 (M+H)⁺

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido (FAB- MS) m/z (negativa): 667 (M-H)⁻

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido de alta resolución (HRFAB-MS) m/z (M+H)⁺:

Valor medido: 669,0887

Valor calculado: 669,0881 ($C_{34}H_{21}O_{15}$)

$\lambda_{\text{máx}}$ del espectro de absorción UV-VISIBLE (en metanol) nm (ϵ): 213(54600), 235sh(39400), 312(31300), 350(24200)

$\nu_{\text{máx}}$ del espectro de absorción infrarrojo (KBr) cm^{-1} : 3348, 1766, 1707, 1644, 1588, 1464, 1301

ES 2 316 763 T3

¹H-RMN: Espectro medido a 500 MHz en hexadeutero sulfóxido de dimetilo (DMSO-d₆) se muestra en la Figura 5.

¹³C-RMN: Espectro medido a 125 MHz en hexadeutero sulfóxido de dimetilo (DMSO-d₆) se muestra en la Figura 6.

Solubilidad:

Insoluble en agua y hexano y soluble en metanol y DMSO.

(SPF-3059-38)

Aspecto: polvo amarillo

Peso molecular: 654

Fórmula molecular: C₃₄H₂₂O₁₄

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido (FAB-MS) m/z (positiva): 655 (M+H)⁺

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido (FAB-MS) m/z (negativa): 653 (M-H)⁻

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido de alta resolución (HRFAB-MS) m/z (M+H)⁺:

Valor medido: 655,1100

Valor calculado: 655,1088 (C₃₄H₂₃O₁₄)

λmáx del espectro de absorción UV-VISIBLE (en metanol) nm (ε): 212(41100), 239sh(34000), 287(22200), 300sh(21900), 328(24400)

νmáx del espectro de absorción infrarrojo (KBr) cm⁻¹: 3418, 1696, 1660, 1607, 1471, 1283

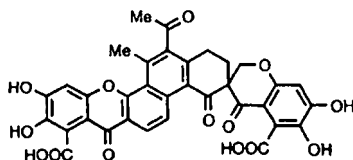
¹H-RMN (DMSO-d₆) δppm: 2,30 (1H, m), 2,36 (1H, m), 2,65 (3H, s), 2,81 (1H, m), 2,96 (1H, m), 3,00 (3H, s), 4,56 (1H, d, 11,8), 4,75 (1H, d, 11,8), 6,43 (1H, s), 7,07 (1H, s), 8,15 (1H, d, 9,2), 8,73 (1H, d, 9,2)

¹³C-RMN (DMSO-d₆) δppm: 21,7, 23,3, 26,6, 32,9, 56,9, 71,3, 102,3, 102,5, 107,9, 110,2, 117,4, 119,4, 121,2, 122,22, 122,24, 124,0, 127,1, 134,3, 136,1, 138,1, 141,7, 141,8, 142,1, 150,1, 154,0, 154,1, 154,6, 155,6, 167,7, 167,9, 173,1, 189,5, 197,5, 207,2

Solubilidad:

Insoluble en agua y hexano y soluble en metanol y DMSO.

Considerada en conjunto, la estructura de SPF-3059-38 se determinó como la fórmula siguiente:



(SPF-3059-40)

Aspecto: polvo naranja

Peso molecular: 536

Fórmula molecular: C₂₇H₂₀O₁₂

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido (FAB-MS) m/z (positiva): 537 (M+H)⁺

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido (FAB-MS) m/z (negativa): 535 (M-H)⁻

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido de alta resolución (HRFAB-MS) m/z (M+H)⁺:

ES 2 316 763 T3

Valor medido: 537,1018

Valor calculado: 537,1034 (C₂₇H₂₁O₁₂)

λ_{máx} del espectro de absorción UV-VISIBLE (en metanol) nm (ε): 209(34100), 223(34200), 277(19900), 340(11600), 460(25000)

ν_{máx} del espectro de absorción infrarrojo (KBr) cm⁻¹: 3361, 1698, 1620, 1465, 1293

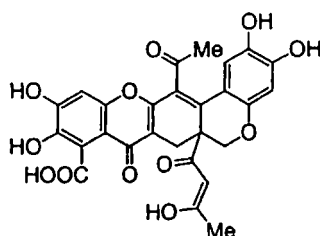
¹H-RMN (DMSO-d₆) δppm: 1,95 (3H, s), 2,34 (1H, d, 16,8), 2,63 (3H, s), 3,22 (1H, d, 16,8), 4,04 (1H, d, 10,8), 4,51 (1H, d, 10,8), 5,78 (1H, s), 6,27 (1H, s), 6,76 (1H, s), 6,78 (1H, s)

¹³C-RMN (DMSO-d₆) δppm: 23,7, 24,4, 32,0, 50,6, 71,9, 98,4, 102,5, 104,5, 109,0, 109,3, 111,9, 112,7, 118,8, 125,0, 135,4, 141,2, 143,0, 149,7, 151,1, 152,0, 152,6, 155,8, 168,3, 172,5, 189,0, 197,0, 204,2

Solubilidad:

Insoluble en agua y hexano y soluble en metanol y DMSO.

Considerada en conjunto, la estructura de SPF-3059-40 se determinó como la fórmula siguiente:



(SPF-3059-41)

Aspecto: polvo amarillo

Propiedades de la sustancia: sustancia ácida

Peso molecular: 548

Fórmula molecular: C₂₈H₂₀O₁₂

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido (FAB-MS) m/z (positiva): 549 (M+H)⁺

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido (FAB-MS) m/z (negativa): 547 (M-H)⁻

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido de alta resolución (HRFAB-MS) m/z (M+H)⁺:

Valor medido: 549,1002

Valor calculado: 549,1034 (C₂₈H₂₁O₁₂)

λ_{máx} del espectro de absorción UV-VISIBLE (en metanol) nm (ε): 227(30200), 282sh(13500), 315(13900), 356(11000)

ν_{máx} del espectro de absorción infrarrojo (KBr) cm⁻¹: 3396, 1688, 1662, 1622, 1470, 1294

Espectro ¹H-RMN:

Espectro medido a 500 MHz en hexadeutero sulfóxido de dimetilo (DMSO-d₆) se muestra en la Figura 7.

Espectro ¹³C-RMN:

Espectro medido a 125 MHz en hexadeutero sulfóxido de dimetilo (DMSO-d₆) se muestra en la Figura 8.

ES 2 316 763 T3

Solubilidad:

Insoluble en agua y hexano y soluble en metanol y DMSO.

(SPF-3059-42)

Aspecto: polvo amarillo

Peso molecular: 806

Fórmula molecular: $C_{41}H_{26}O_{18}$

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido (FAB- MS) m/z (positiva): 807 (M+H)⁺

Espectro de masas por bombardeo atómico rápido (FAB- MS) m/z (negativa): 805 (M-H)⁻

Matriz de alta resolución - Ionización/Desorción asistida por láser

Tiempo de vuelo (HRMALDI-TOF-MS) m/z (M+H)⁺: Valor medido: 807,1261

Valor calculado: 807,1198 ($C_{41}H_{27}O_{18}$)

$\lambda_{\text{máx}}$ del espectro de absorción UV-VISIBLE (en metanol) nm (ϵ): 221(58300), 316(28000), 353(23100)

$\nu_{\text{máx}}$ del espectro de absorción infrarrojo (KBr) cm^{-1} : 3400, 1704, 1651, 1620, 1444, 1294

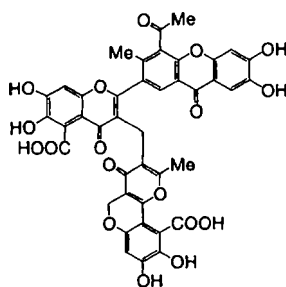
¹H-RMN (DMSO- d_6) δ ppm: 2,08 (3H, s), 2,10 (3H, s), 2,51 (3H, s), 3,47 (1H, d, 15,9), 3,54 (1H, d, 15,9), 4,48 (1H, d, 13,1), 4,65 (1H, d, 13,1), 6,28 (1H, s), 6,84 (1H, s), 6,89 (1H, s), 7,40 (1H, s), 8,12 (1H, s)

¹³C-RMN (DMSO- d_6) δ ppm: 16,5, 17,1, 19,1, 31,9, 61,8, 102,1, 102,9 (2C), 103,4, 108,7, 109,2, 111,5, 113,5, 118,5, 119,1 (2C), 119,7, 122,0, 127,8, 128,9, 131,2, 139,1 (2C), 141,7, 144,2, 150,0, 154,0 (2C), 150,5, 150,6, 150,7, 152,0, 152,3, 158,9, 160,9, 167,8, 167,9, 173,1, 173,3, 175,0, 202,5

Solubilidad:

Insoluble en agua y hexano y soluble en metanol y DMSO.

considerada en conjunto, la estructura de SPF-3059-42 se determinó como la fórmula siguiente:



Ejemplo 2

Acción supresora de los compuestos de la presente invención para la actividad de colapso de Sema3A

Una placa de 96 pocillos (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) recubierta con polilisina se recubrió más con laminina (20 $\mu\text{g/ml}$ de laminina, durante 1 hora a temperatura ambiente). A cada pocillo se le añadieron 100 μl de medio (medio F12 que contenía 10% de suero bovino fetal, 20 ng/ml de NGF, 100 unidades/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin) cuyo medio se inoculó a continuación con los ganglios del nervio de la espina dorsal extirpados de embriones de pollo E7 (embriones de 7 días) y se cultivaron durante 16 a 20 horas en CO_2 al 5% a 37°C. A continuación, los compuestos objetivos se añadieron al medio a varias concentraciones y se añadieron 3 unidades/ml de semaforina 3A de ratón (Sema3A) después de cultivar durante 1 hora. Se incubaron los cultivos durante otra hora. Se añadió rápidamente glutaraldehído en la misma después de dicha hora para preparar la concentración final al 1%. Los cultivos se dejaron a continuación durante 15 minutos a temperatura ambiente de modo que se fijaron las secciones del tejido y los índices de colapso de los conos de crecimiento se determinaron al microscopio. Se definieron los valores IC_{50} como una concentración de cada compuesto a la que la concentración del índice de colapso C iguala a (A+B)/2,

ES 2 316 763 T3

5 en la que (A)% es el índice de colapso del cono de crecimiento del grupo de referencia negativo (no se añadieron compuestos ni Sema3A); (B)% es el índice de colapso del cono de crecimiento del grupo de referencia positivo (no se añadieron compuestos pero se añadió Sema3A); y (C)% es el índice de colapso del cono de crecimiento del grupo de ensayo (se añadió cada uno de los compuestos y Sema3A). Los resultados se proporcionan a continuación. Estos resultados ponen de manifiesto que los compuestos de la presente invención inhiben fuertemente la semaforina.

TABLA 2

10	compound IC50 ($\mu\text{g/ml}$)	
	SPF-3059-8	2
15	SPF-3059-10	2
	SPF-3059-16	0,5
	SPF-3059-17	0,13
	SPF-3059-18	0,063
20	SPF-3059-19	0,5
	SPF-3059-20	4
	SPF-3059-22	0,5
	SPF-3059-23	0,5
25	SPF-3059-31	0,25
	SPF-3059-38	0,013
	SPF-3059-40	0,125
30	SPF-3059-41	0,25

Ejemplo 3

35 *Producción de sales de los compuestos de la presente invención*

Un compuesto de la presente invención se disuelve en metanol para preparar una solución 1 mM. La solución de metanol de hidróxido sódico 1 mM se añade a 1 ml de la solución anterior mediante 2 ml cuando el compuesto de la presente invención tiene dos grupos carboxilo, o mediante 1 ml cuando tiene un grupo carboxilo y se mezcla intensamente. A continuación, se evapora el disolvente de la solución a presión reducida y se secan los residuos. De este modo se obtiene 1 μmol de la sal sódica del compuesto de la presente invención.

Aplicabilidad industrial

45 Los compuestos de la presente invención presentan actividad inhibitoria de semaforina y se utilizan provechosamente como agente preventivo o remedio para varias enfermedades neuropáticas y neurodegenerativas.

50

55

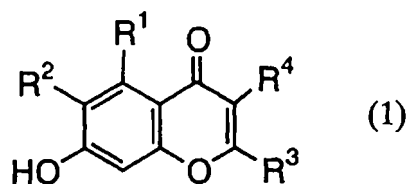
60

65

REIVINDICACIONES

1. Compuesto representado por la fórmula general (1):

5



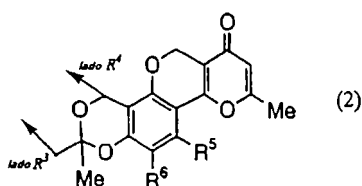
10

en la que R¹, R², R³ y R⁴ representan uno de los siguientes [I] a [IX]:

15

[I] R¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo carboxilo, R² representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo, y R³ y R⁴, se unen para formar un grupo divalente de fórmula (2):

20



25

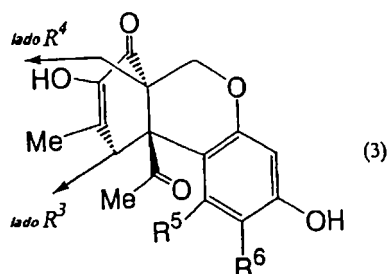
en la que R⁵ representa un átomo de hidrógeno o un grupo carboxilo y R⁶ representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo;

30

[II] R¹ representa un átomo de hidrógeno o un carboxilo,

R² representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo, y R³ y R⁴, se unen para formar un grupo divalente de fórmula (3):

35



40

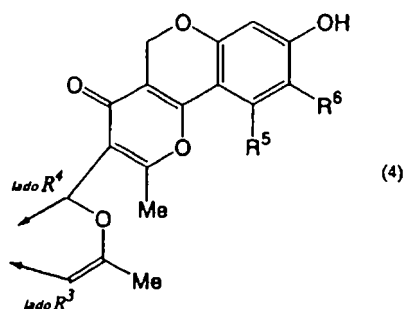
45

en la que R⁵ y R⁶ tienen los mismos significados que anteriormente;

50

[III] R¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo carboxilo, R² representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo, y R³ y R⁴, se unen para formar un grupo divalente de fórmula (4):

55



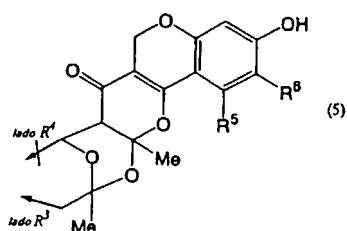
60

65

en la que R⁵ y R⁶ tienen los mismos significados que anteriormente;

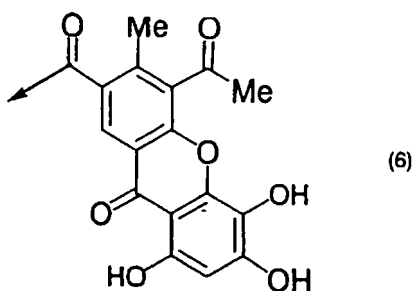
ES 2 316 763 T3

[IV] R¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo carboxilo, R² representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo, y R³ y R⁴, se unen para formar un grupo divalente de fórmula (5):

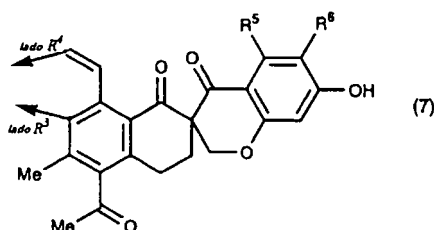


en la que R⁵ y R⁶ tienen los mismos significados que anteriormente;

[V] R¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo carboxilo, R² representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo, R³ representa un átomo de hidrógeno y R⁴ representa un grupo de fórmula (6):

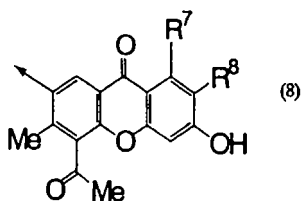


[VI] R¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo carboxilo, R² representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo y R³ y R⁴ se unen para formar un grupo divalente de fórmula (7):



en la que R⁵ y R⁶ tienen los mismos significados que anteriormente;

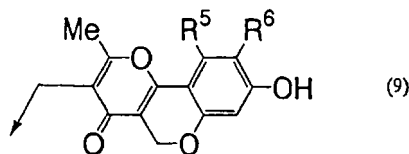
[VII] R¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo carboxilo, R² representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo y R³ representa un grupo de fórmula (8):



ES 2 316 763 T3

en la que R^7 representa un átomo de hidrógeno o un grupo carboxilo y R^8 representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo y R^4 representa un grupo de fórmula (9);

5



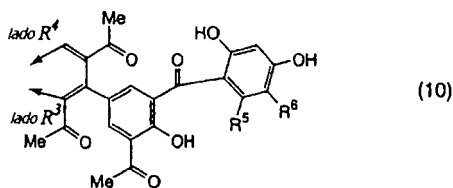
10

en la que R^5 representa un grupo carboxilo, y R^6 tiene el mismo significado que anteriormente;

15

[VIII] R^1 representa un grupo carboxilo, R^2 representa un grupo hidroxilo, y R^3 y R^4 se unen para formar un grupo divalente de fórmula (10):

20



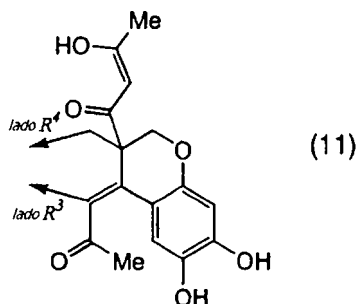
25

en la que R^5 representa un grupo carboxilo y R^6 representa un grupo hidroxilo;

30

[IX] R^1 representa un grupo carboxilo; R^2 representa un grupo hidroxilo, y R^3 y R^4 se unen para formar un grupo divalente de fórmula (11):

35



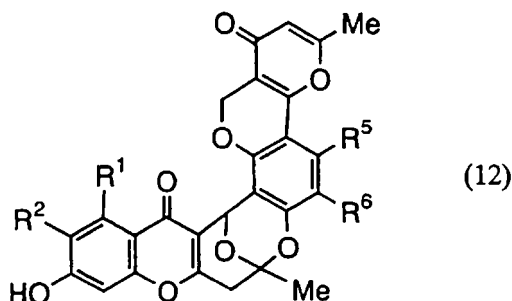
40

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

45

2. Compuesto según la reivindicación 1, representado por la fórmula general (12):

50



55

60

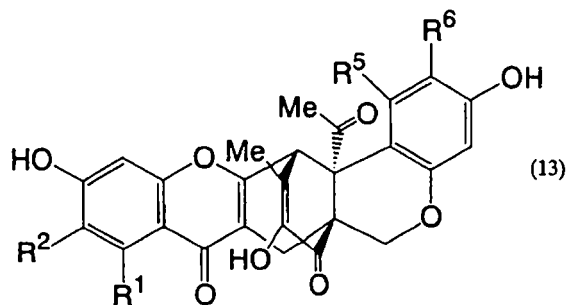
en la que R^1 , R^2 , R^5 y R^6 tienen los mismos significados que en la reivindicación 1 [I] o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

65

3. Compuesto según la reivindicación 2, en el que R^1 y R^5 son independientemente un grupo carboxilo, R^2 es un grupo hidroxilo o un átomo de hidrógeno y R^6 es un grupo hidroxilo en la fórmula general (12) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

ES 2 316 763 T3

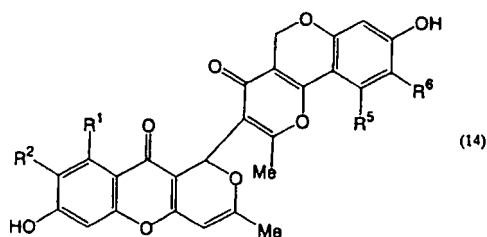
4. Compuesto según la reivindicación 1, representado por la fórmula general (13):



20 en la que R^1 , R^2 , R^5 y R^6 tienen los mismos significados que en la reivindicación 1 [II] o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. Compuesto según la reivindicación 4, en el que R^1 y R^5 son independientemente un grupo carboxilo, R^2 y R^6 son independientemente un grupo hidroxilo en la fórmula general (13) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

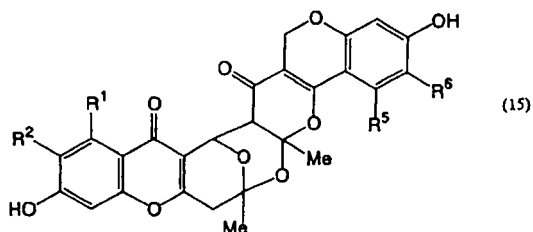
25 6. Compuesto según la reivindicación 1, representado por la fórmula general (14):



40 en la que R^1 , R^2 , R^5 y R^6 tienen los mismos significados que en la reivindicación 1 [III] o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. Compuesto según la reivindicación 6, en el que R^1 y R^5 son un grupo carboxilo, R^2 y R^6 son independientemente un grupo hidroxilo en la fórmula general (14) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

45 8. Compuesto según la reivindicación 1, representado por la fórmula general (15):



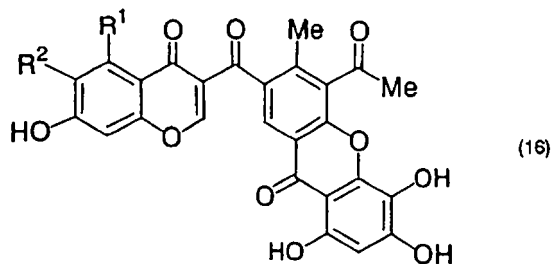
60 en la que R^1 , R^2 , R^5 y R^6 tienen los mismos significados que en la reivindicación 1 [IV] o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

9. Compuesto según la reivindicación 8, en el que R^1 y R^5 son independientemente un grupo carboxilo, R^2 y R^6 son independientemente un grupo hidroxilo en la fórmula general (15) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

65

ES 2 316 763 T3

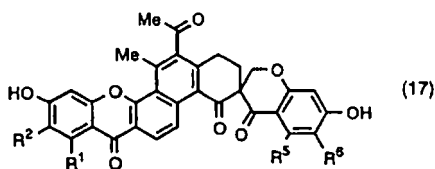
10. Compuesto según la reivindicación 1, representado por la fórmula general (16):



en la que R¹ y R² tienen los mismos significados que en la reivindicación 1 [V], o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

11. Compuesto según la reivindicación 10, en el que R¹ representa un grupo carboxilo y R² representa un grupo hidroxilo en la fórmula general (16) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

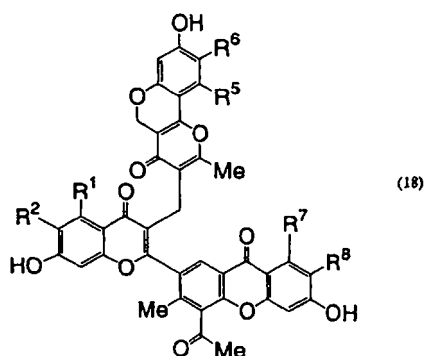
12. Compuesto según la reivindicación 1, representado por la fórmula general (17):



en la que R¹, R², R⁵ y R⁶ tienen los mismos significados que en la reivindicación 1 [VI], o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

13. Compuesto según la reivindicación 12, en el que R¹ y R⁵ representan cada uno un grupo carboxilo, y R² y R⁶ representan independientemente un grupo hidroxilo en la fórmula general (17), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

14. Compuesto según la reivindicación 1, representado por la fórmula general (18):

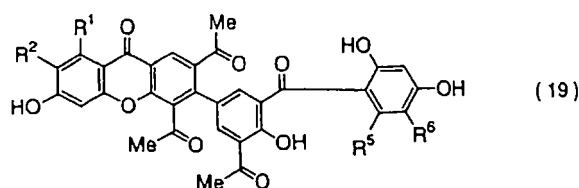


en la que R¹, R², R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ tienen los mismos significados que en la reivindicación 1 [VII] o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15. Compuesto según la reivindicación 14, en el que R¹ es un grupo carboxilo, R², R⁶ y R⁸ son independientemente un grupo hidroxilo, y R⁷ es un átomo de hidrógeno en la fórmula general (18), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

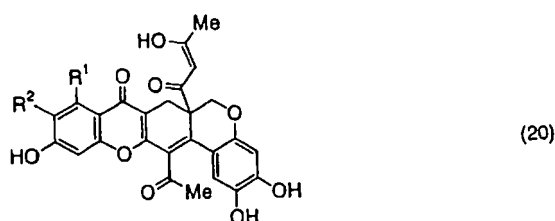
ES 2 316 763 T3

16. Compuesto según la reivindicación 1, representado por la fórmula general (19):



en la que R¹ y R⁵ representan cada uno un grupo carboxilo, y R² y R⁶ representan cada uno un grupo hidroxilo.

17. Compuesto según la reivindicación 1, representado por la fórmula general (20):



25 en la que R¹ es un grupo carboxilo y R² es un grupo hidroxilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

18. Utilización del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para inhibir la actividad de una semaforina.

30 19. Utilización según la reivindicación 18, en la que la semaforina es una semaforina de clase 3.

20. Utilización según la reivindicación 19, en la que la semaforina de clase 3 es la semaforina 3A.

35 21. Utilización del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para inhibir la actividad de un factor repelente de desarrollo de nervios.

40 22. Utilización del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para suprimir la actividad de colapso del cono de crecimiento y/o inhibir el desarrollo de nervios en un gel con colágeno.

23. Utilización del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para activar la regeneración de nervios.

45 24. Utilización del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para la prevención o el remedio de enfermedades neuropáticas y/o enfermedades neurodegenerativas.

50 25. Utilización del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para la prevención o el remedio de enfermedades que comprenden la lesión del nervio raquídeo y/o la lesión del nervio periférico.

55 26. Utilización del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para la prevención o el remedio de anomalía olfativa, neuropatía traumática, neuropatía de infarto cerebral, parálisis del nervio facial, neuropatía diabética, glaucoma, retinitis pigmentosa, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedades neurodegenerativas, esclerosis lateral hipoplástica muscular, enfermedad de Lou Gehrig, corea de Huntington, infarto cerebral o enfermedades neurodegenerativas traumáticas.

60 27. Procedimiento para producir un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que se cultiva un microorganismo *Penicillium* sp. SPF-3059 y que se recoge el compuesto del cultivo.

65

Figura 1

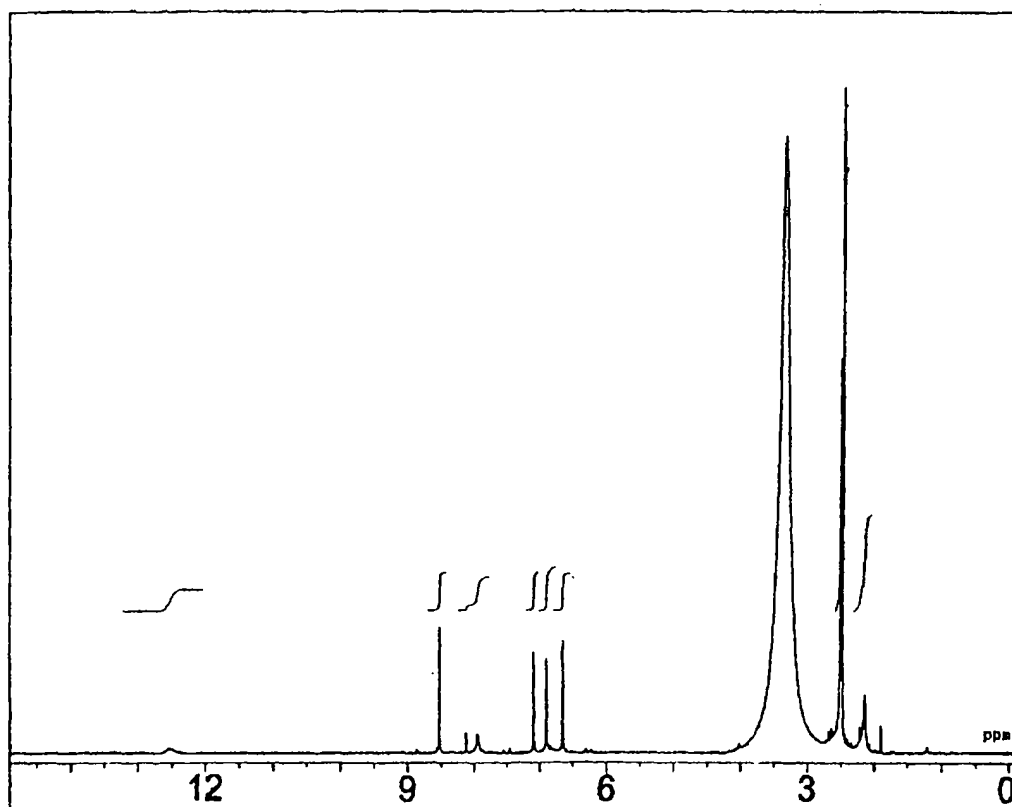


Figura 2

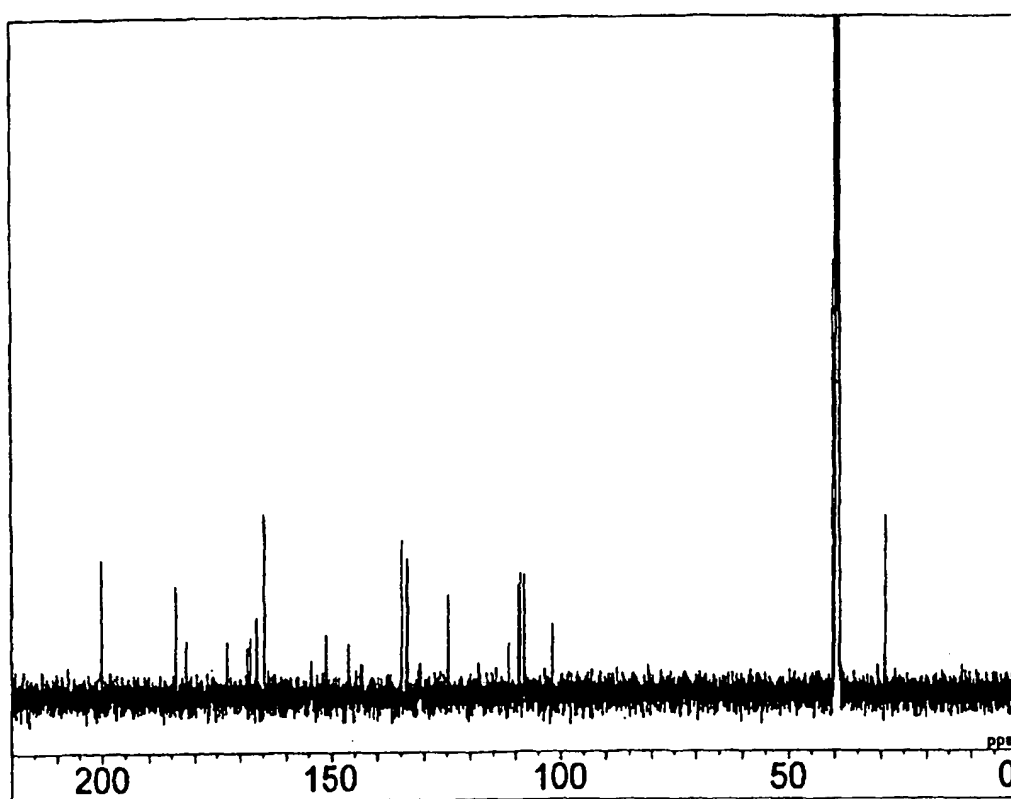


Figura 3

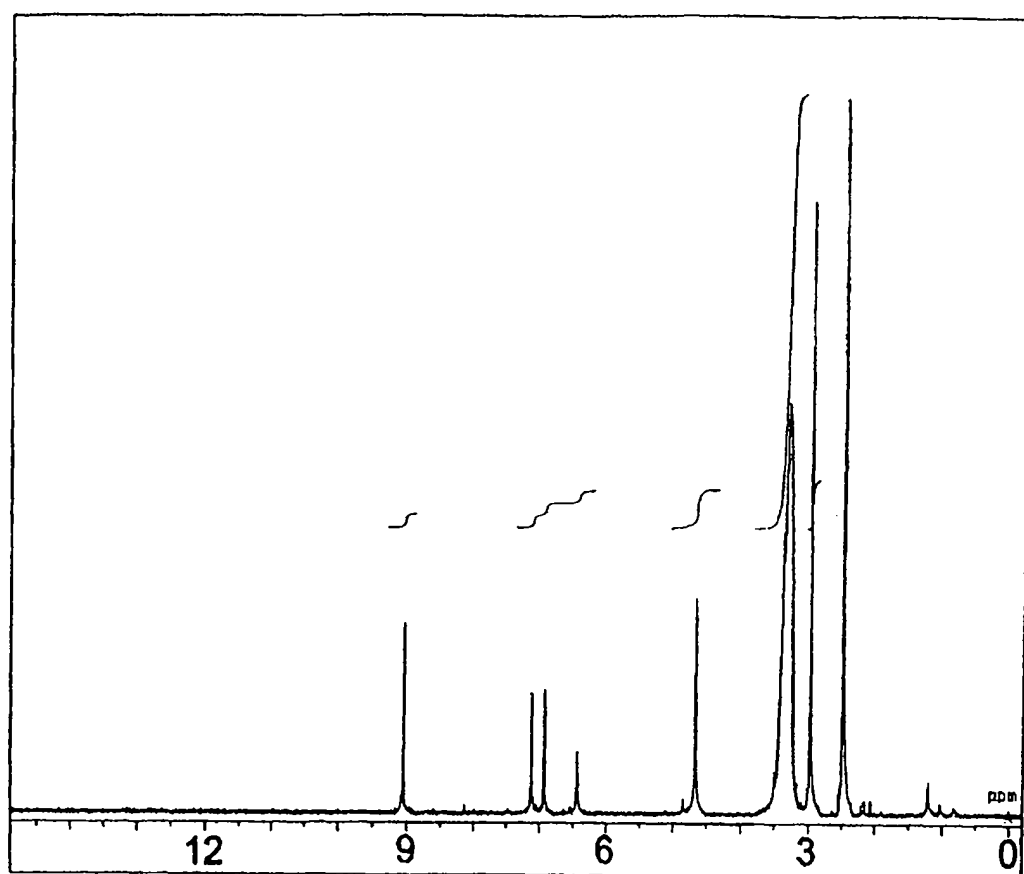


Figura 4

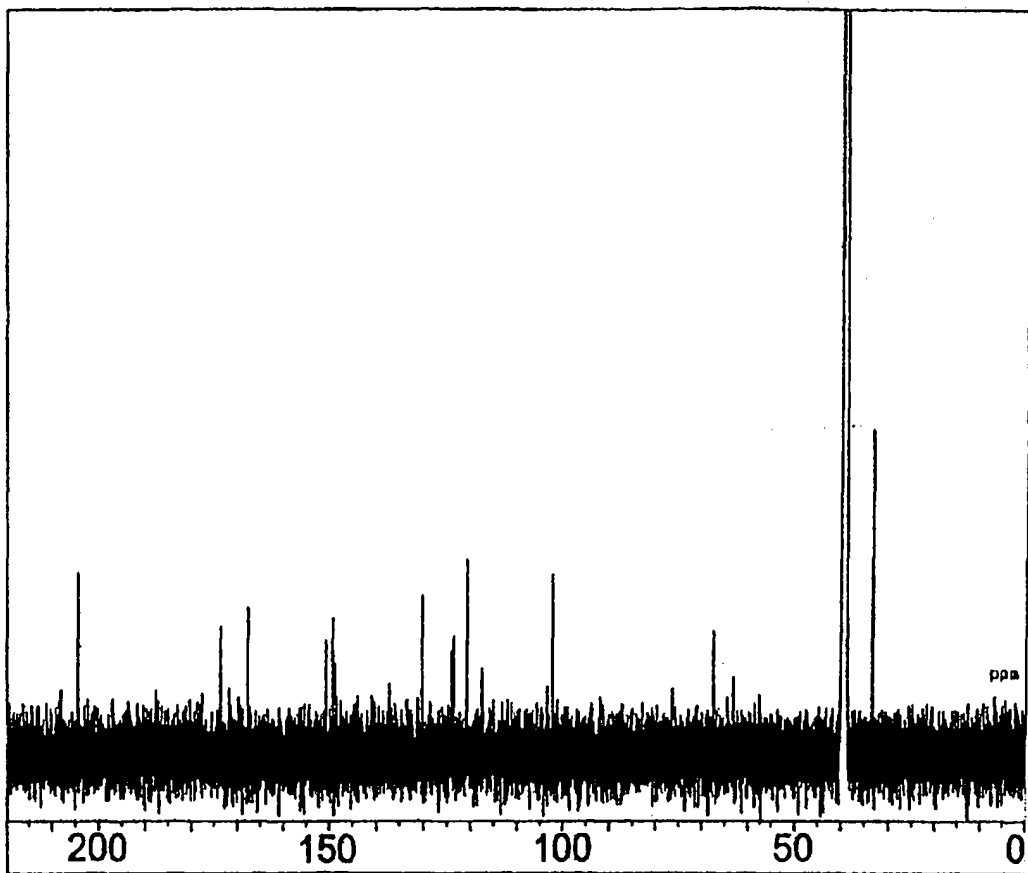


Figura 5

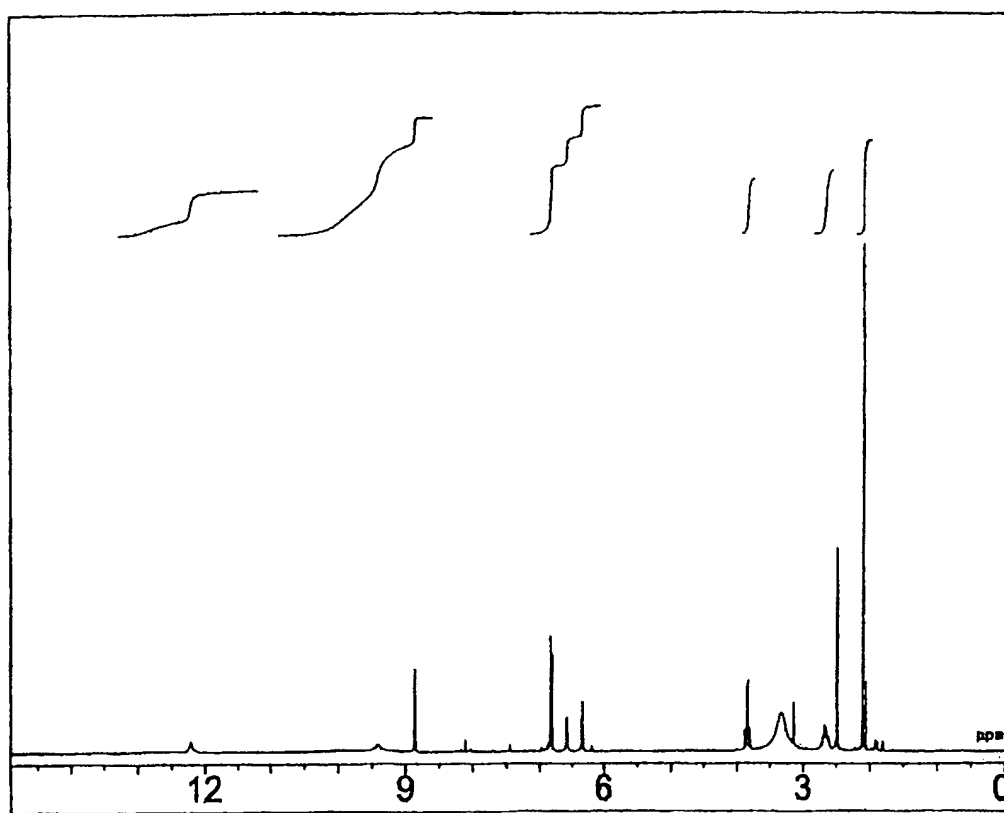


Figura 6

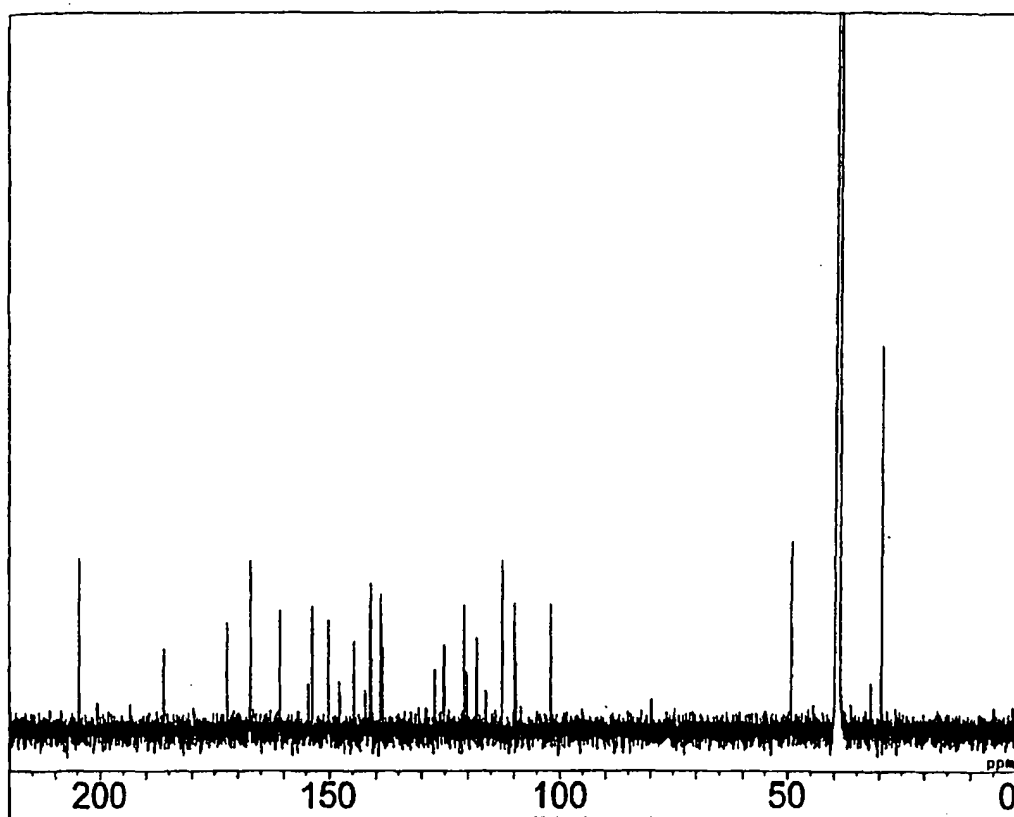


Figura 7

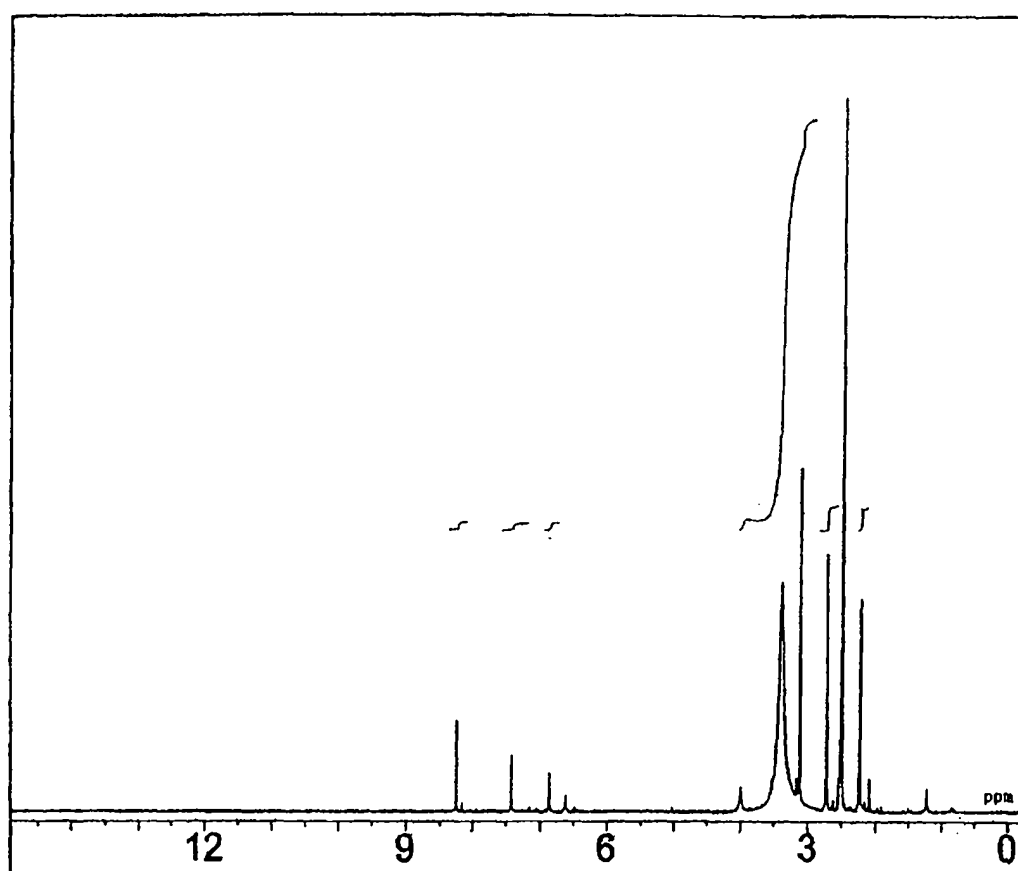


Figura 8

