

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 648**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 14/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2018** **PCT/EP2018/076178**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2019** **WO19068538**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2018** **E 18772837 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2024** **EP 3688019**

54 Título: **Nuevos compuestos y su uso como inhibidores selectivos de caspasa-2**

30 Prioridad:

26.09.2017 EP 17306270

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

27.11.2024

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE(CNRS) (25.0%)**

**3, rue Michel Ange
75016 Paris, FR;**

**SORBONNE UNIVERSITÉ (25.0%);
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (25.0%) y
UNIVERSITÉ PARIS CITÉ (25.0%)**

72 Inventor/es:

**JACOTOT, ETIENNE y
BOSC, ELODIE**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 989 648 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

Nuevos compuestos y su uso como inhibidores selectivos de caspasa-2

- 5 La presente invención se refiere a compuestos novedosos que son útiles como inhibidores selectivos de caspasa-2. Esta invención también se refiere al uso terapéutico de estos compuestos y a su uso como sondas basadas en la actividad (ABP, por sus siglas en inglés) para la caspasa-2.
- 10 Las caspasas son una familia de endoproteasas intracelulares que usan un residuo de cisteína en el inicio de la escisión de los sustratos peptídicos. Se sabe ampliamente que tienen implicaciones importantes en la regulación de la inflamación, así como un papel crucial en el control de la muerte celular programada por apoptosis.
- 15 Las caspasas se clasifican en dos grupos principales: las implicadas en la regulación de los procesos inflamatorios (1, 4, 5, 11, 12) y las que son fundamentales para el inicio y la ejecución de la apoptosis. Existen dos grupos entre las caspasas apoptóticas, las "iniciadoras" que tienen un prodominio en el extremo N largo (caspasa-2, 8, 9, 10), y las que tienen un prodominio corto (residuos 20-30) que son las "ejecutoras" de la apoptosis (caspasa-3, 6, 7). Las caspasas implicadas en la inflamación y el inicio de la apoptosis tienen unidades estructurales implicadas en la transducción de la señal apoptótica, tal como el "dominio efector de muerte" (DED) y el "dominio de reclutamiento de caspasa" (CARD). Cada uno de estos dominios permite la interacción homotípica con otras proteínas asociadas.
- 20 Las propiedades enzimáticas de las caspasas están regidas por la existencia de una díada catalítica (cisteína, histidina) donde la cisteína actúa como nucleófilo para el inicio de la escisión de los enlaces peptídicos. El sitio activo de las caspasas está muy conservado, con la cisteína catalítica incluida en una secuencia peptídica QACXG (donde X es arginina (R), glutamina (Q) o glicina (G)) y un subsitio básico S1, que les da especificidad para la escisión del sustrato después de un residuo de aspartato, que es único entre las proteasas de mamíferos, excepto por la serina proteasa granzima B. Generalmente, las caspasas reconocen un motivo tetrapeptídico, P1-P4 en el extremo N del enlace escindible, reconocidos respectivamente por los subsitios S1-S4 de la enzima. Las posiciones cadena abajo del aspartato (P'1 y P'2) también están implicadas en el reconocimiento y la especificidad vis-a-vis de las caspasas.
- 25 Las caspasas se han clasificado en tres grupos según las secuencias peptídicas del sustrato que reconocen preferentemente. Las caspasas del grupo I (1, 4 y 5) tienen preferencia por un residuo hidrófobo en P4. Mientras que las enzimas del grupo II (2, 3, 7) tienen una marcada preferencia por un aspartato en esta posición, el grupo III (6, 8, 9, 10) favorece las pequeñas cadenas alifáticas P4. En el grupo II, la caspasa-2 tiene una modalidad de reconocimiento única; de hecho, requiere el reconocimiento de un residuo en la posición P5 (preferentemente una leucina, isoleucina, valina o alanina) para ejercer su actividad catalítica. Las caspasas-3 y 7 también reconocen un residuo P5 de manera no obligatoria.
- 30 Originalmente denominada Nedd-2, "célula precursora neuronal expresada en el desarrollo regulada negativamente 2" en ratones e Ich-1, "homólogo ICE y CED3" en los seres humanos, la caspasa-2, codificada por el gen CASP2 (cr. 7q34-q35), es el miembro más conservado de esta familia de enzimas. Su actividad está finamente regulada durante el desarrollo neuronal en los seres humanos. Existen dos isoformas de la caspasa-2: una proapoptótica (2L) y una antiapoptótica (2S). La isoforma 2L es la forma predominante en la mayoría de los tejidos, pero la isoforma 2S se expresa en niveles similares en el cerebro, el músculo esquelético y el corazón.
- 35 La caspasa-2 actúa como una caspasa iniciadora que escinde de forma deficiente otras caspasas, pero puede iniciar la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y que regula diversas vías de señalización inducidas por estrés, incluyendo el choque térmico, el daño del ADN, el estrés oxidativo mitocondrial y la alteración del citoesqueleto.
- 40 Además de la apoptosis, la caspasa-2 participa en la regulación del estrés oxidativo. Por ejemplo, los ratones Casp-2^{-/-} de edad avanzada muestran una actividad reducida de la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa. En algunas circunstancias específicas, la caspasa-2 puede actuar como un supresor tumoral. De hecho, el bajo estrés oncogénico (como en el modelo de ratón transgénico Eμ-Myc), la deficiencia de caspasa-2 potencia la tumorigénesis. Algunos datos también sugieren que la caspasa-2 podría inhibir la autofagia (Tiwari M *et al.*, J Biol Chem 2011; 286: 8493-8506; Tiwari M *et al.* Autophagy 2014; 10: 1054-1070).
- 45 Se encontró que la inhibición genética de la caspasa-2 era neuroprotectora en ratones recién nacidos expuestos a estimulaciones hipóxicas-isquémicas o excitotóxicas, lo que sugiere que la muerte celular mediada por la caspasa-2 podría contribuir a la fisiopatología de la lesión cerebral perinatal (Carlsson *et al.*, Annals of Neurology 2011, 70(5):781-9). Además, la inhibición genética de la caspasa-2 confiere neuroprotección ocular (Amhed Z *et al.*, Cell Death Dis. 16 de junio de 2011;2:e173) y recientemente se ha demostrado que la caspasa-2 media en la muerte de células ganglionares de la retina en sitios específicos después de una lesión ocular cerrada (Thomas CN *et al.*, Invest Ophthalmol Vis Sci. 4 de septiembre de 2018;59(11):4453-4462).
- 50 En modelos celulares de la enfermedad de Alzheimer (Carol M. Troy *et al.* The Journal of Neuroscience, 15 de febrero de 2000, 20(4): 1386-1392), la caspasa-2 es un efector clave de la muerte neuronal inducida por el péptido amiloide Aβ (Ribe EM *et al.*, Biochem J. 2012 444(3):591-9).

Además, usando ratones transgénicos con proteína precursora amiloide, Pozueta *et al.* (Nat. Commun. 2013;4:1939) han demostrado que:

- 5 (i) La caspasa-2 es necesaria para el deterioro cognitivo en este modelo animal de Alzheimer,
- (ii) las neuronas hipocampales cultivadas que carecen de caspasa-2 son inmunes a los efectos sinaptotóxicos de A β , y
- 10 (iii) la caspasa-2 es un mediador crítico en la activación de la vía de señalización RhoA/ROCK-II, lo que conduce al colapso de las espinas dendríticas,

sugiere así que la caspasa-2 es un impulsor clave de la disfunción sináptica en la enfermedad de Alzheimer.

- 15 También se encontró que la caspasa-2 escinde directamente la proteína Tau y, por lo tanto, parece estar implicada en la generación de Δ tau34, que podría tener una influencia en la disfunción sináptica observada en la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías (Zhao *et al.* Nat. Med. 2016).

La caspasa-2 también parece estar implicada en los déficits conductuales en la enfermedad de Huntington (Caroll *et al.*, Mol. Neurodegener. 19 de agosto de 2011;6:59).

La caspasa-2 también parece promover la obesidad, el síndrome metabólico y la esteatosis hepática no alcohólica. De hecho, se ha demostrado que los ratones deficientes en caspasa-2 estaban protegidos de estas afecciones (Machado MV *et al.* Cell Death Dis. 18 de febrero de 2016;7:e2096).

25 Las primeras generaciones de inhibidores de caspasas fueron péptidos aldehído que inhiben reversiblemente las caspasas. Se han desarrollado varias secuencias que supuestamente confieren efectos preferenciales con respecto a algunos miembros de la familia de las caspasas, incluyendo Ac-DEVD-CHO (un inhibidor preferencial de la caspasa-3 y la caspasa-7) y Ac-VDVAD-CHO (un inhibidor preferencial de la caspasa-2, 3 y 7).

30 En la segunda generación de inhibidores de caspasas, el grupo aldehído ha sido reemplazado por cetonas α -sustituidas con un grupo fluorometilcetona (fmk). Este tipo de inhibidor inactiva la enzima formando un aducto con la cisteína del sitio activo. Z (benzoxilcarbonyl)-VAD-fmk es un inhibidor de amplio espectro de esta generación. Estas moléculas son tóxicas *in vivo*, porque la liberación del grupo fluoroacetato, particularmente en el hígado, conduce a la inhibición de la aconitasa. Por lo tanto, el desarrollo de inhibidores con un grupo fmk, fue abandonado en la fase preclínica debido a su hepatotoxicidad. Posteriormente, se han sintetizado en la técnica varios inhibidores de caspasas (Poreba *et al.*, Chem Rev. 2015 Nov 25; 115(22): 12546-629). En particular, se han descrito compuestos capaces de inhibir la actividad de la caspasa-2, por ejemplo, en los documentos WO 2005/105829 y EP2670774. Sin embargo, estos inhibidores conocidos de la caspasa-2 también tienen una actividad demasiado alta con respecto a la caspasa-3. Por lo tanto, no pueden calificarse como inhibidores selectivos de caspasa-2.

45 Más recientemente, se ha informado una serie de inhibidores reversibles de caspasa-2. Cuando se evaluaron *in vitro* en caspasas recombinantes humanas, se encontró que estos compuestos inhiben preferentemente la caspasa-2, pero tienen efectos moderados en ensayos celulares y propiedades estructurales que son incompatibles con el uso *in vivo* (Maillard *et al.*, Biorganic & Medicinal Chemistry 19 (2011) 5833-5851).

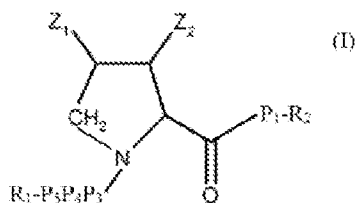
50 Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad de inhibidores potentes y selectivos de caspasa-2, más particularmente con una actividad significativamente reducida contra la caspasa-3. En particular, sería muy ventajoso proporcionar inhibidores de caspasa-2 más selectivos y eficientes para su uso en la prevención y/o tratamiento de enfermedades y/o lesiones en las que está implicada la actividad de la caspasa-2, tal como isquemia cerebral neonatal, isquemia cardíaca y enfermedades degenerativas crónicas como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer.

También sería muy ventajoso proporcionar inhibidores de caspasa-2 más eficaces y selectivos para su uso como sonda basada en la actividad para detectar específicamente la actividad de la caspasa-2.

55 Los compuestos de la invención pretenden satisfacer estas necesidades.

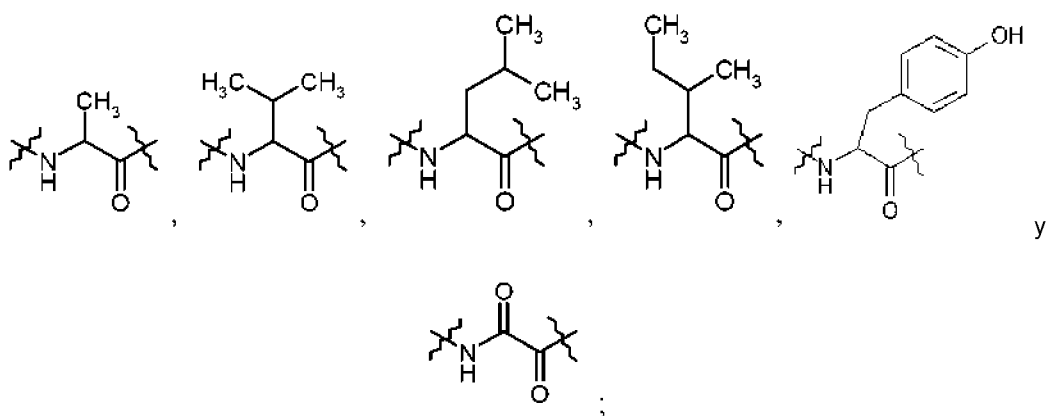
Por lo tanto, de acuerdo con uno de sus aspectos, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) como se define en las reivindicaciones. En particular, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I):

60

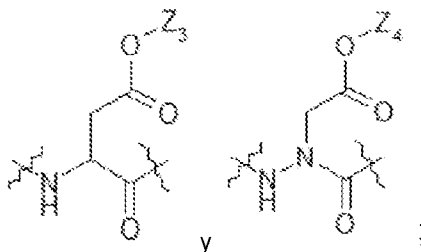


en la que:

- 5
- Z_1 y Z_2 , idénticos o diferentes, se seleccionan de un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo (C_1-C_6) y un grupo alcoxi (C_1-C_6);
 - P_5 se selecciona de los siguientes residuos de aminoácidos o estructuras similares a aminoácidos:

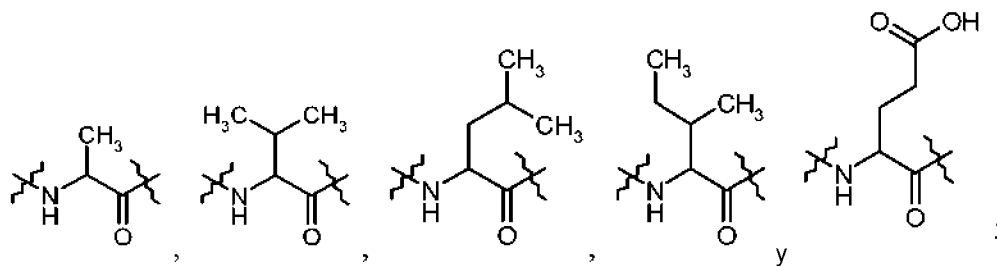


- 15
- P_1 y P_4 , idénticos o diferentes, se seleccionan de las siguientes estructuras similares a aminoácidos:

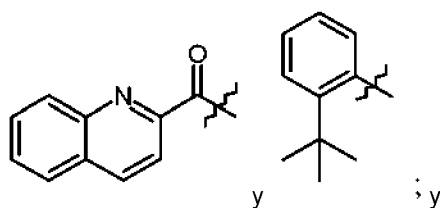


en las que Z_3 y Z_4 , idénticos o diferentes, se seleccionan de un átomo de hidrógeno y un grupo alquilo (C_1-C_6);

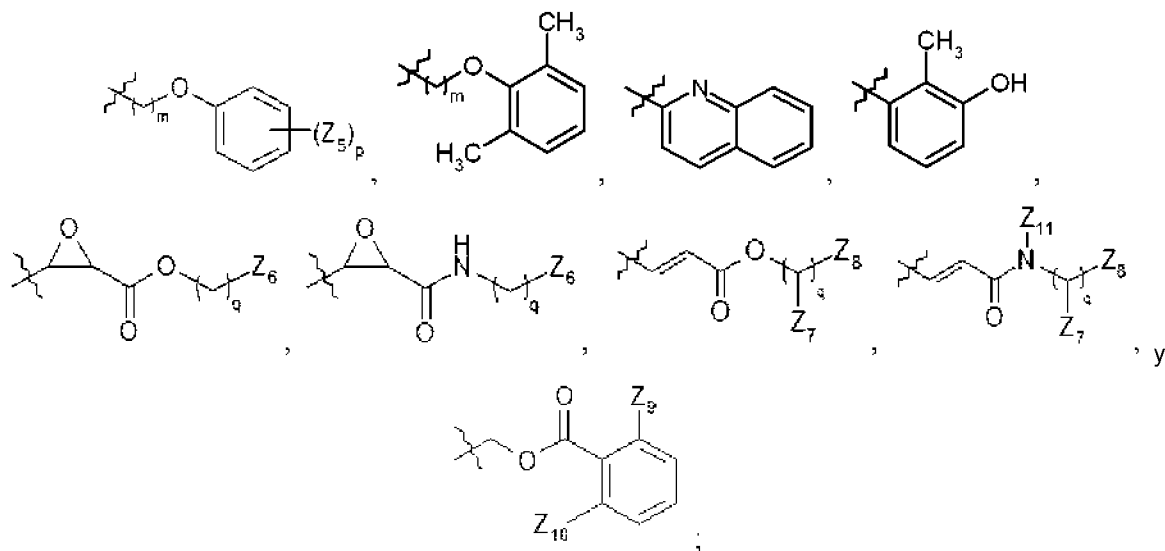
- 20
- P_3 se selecciona de los siguientes residuos de aminoácidos:



- 25
- R_1 se selecciona de:



- R₂ se selecciona de:



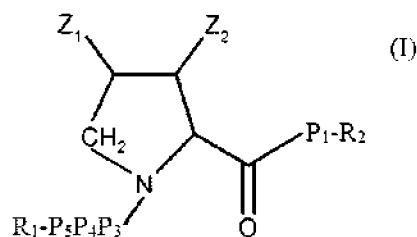
en las que:

- 10 • m es 0, 1 o 2;
- p es 1, 2, 3 o 4;
- 15 • Z₅ es un átomo de halógeno;
- q es 0 o 1;
- Z₆ se selecciona de un grupo alquilo (C₁-C₆) y un grupo fenilo, estando dicho grupo fenilo opcionalmente sustituido por un grupo amino;
- 20 • Z₇, Z₈ y Z₁₁, idénticos o diferentes, se seleccionan de un átomo de hidrógeno, un alquilo (C₁-C₄), un tetrahidroquinolinilo y un grupo -(CH₂)_i-arilo, siendo i 0, 1 o 2, estando dicho grupo arilo opcionalmente sustituido por uno, dos, tres o cuatro átomos de halógeno o un grupo alquilo (C₁-C₄); y
- 25 • Z₉ y Z₁₀, idénticos o diferentes, se seleccionan de un átomo de halógeno y un grupo alquilo (C₁-C₆);

o una de sus sales;

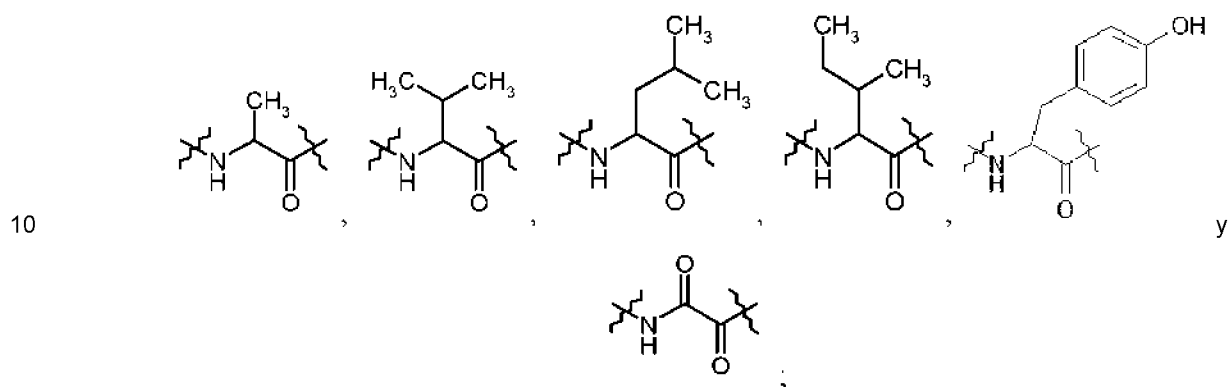
estando dicho compuesto de fórmula (I) en todas las formas isoméricas racémicas, enantioméricas y diastereoisoméricas posibles.

De acuerdo con uno de sus aspectos, la presente solicitud se refiere a un compuesto de fórmula (I):

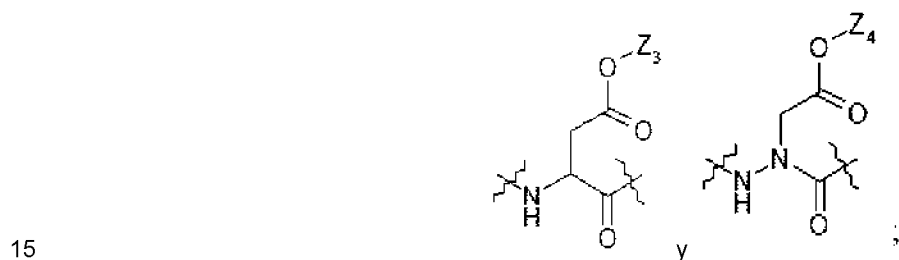


en la que:

- 5
- Z_1 y Z_2 , idénticos o diferentes, se seleccionan de un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo (C_1-C_6) y un grupo alcoxi (C_1-C_6);
 - P_5 se selecciona de los siguientes residuos de aminoácidos o estructuras similares a aminoácidos:

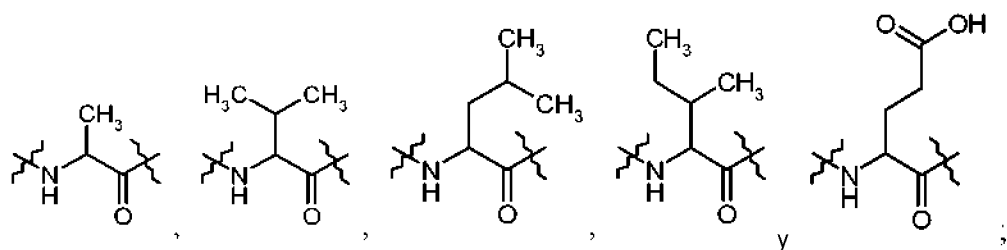


- P_1 y P_4 , idénticos o diferentes, se seleccionan de las siguientes estructuras similares a aminoácidos:

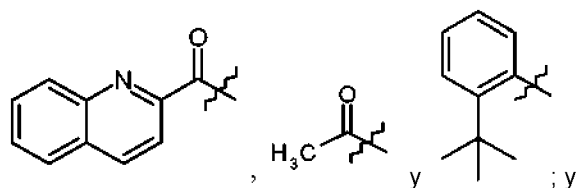


en las que Z_3 y Z_4 , idénticos o diferentes, se seleccionan de un átomo de hidrógeno y un grupo alquilo (C_1-C_6);

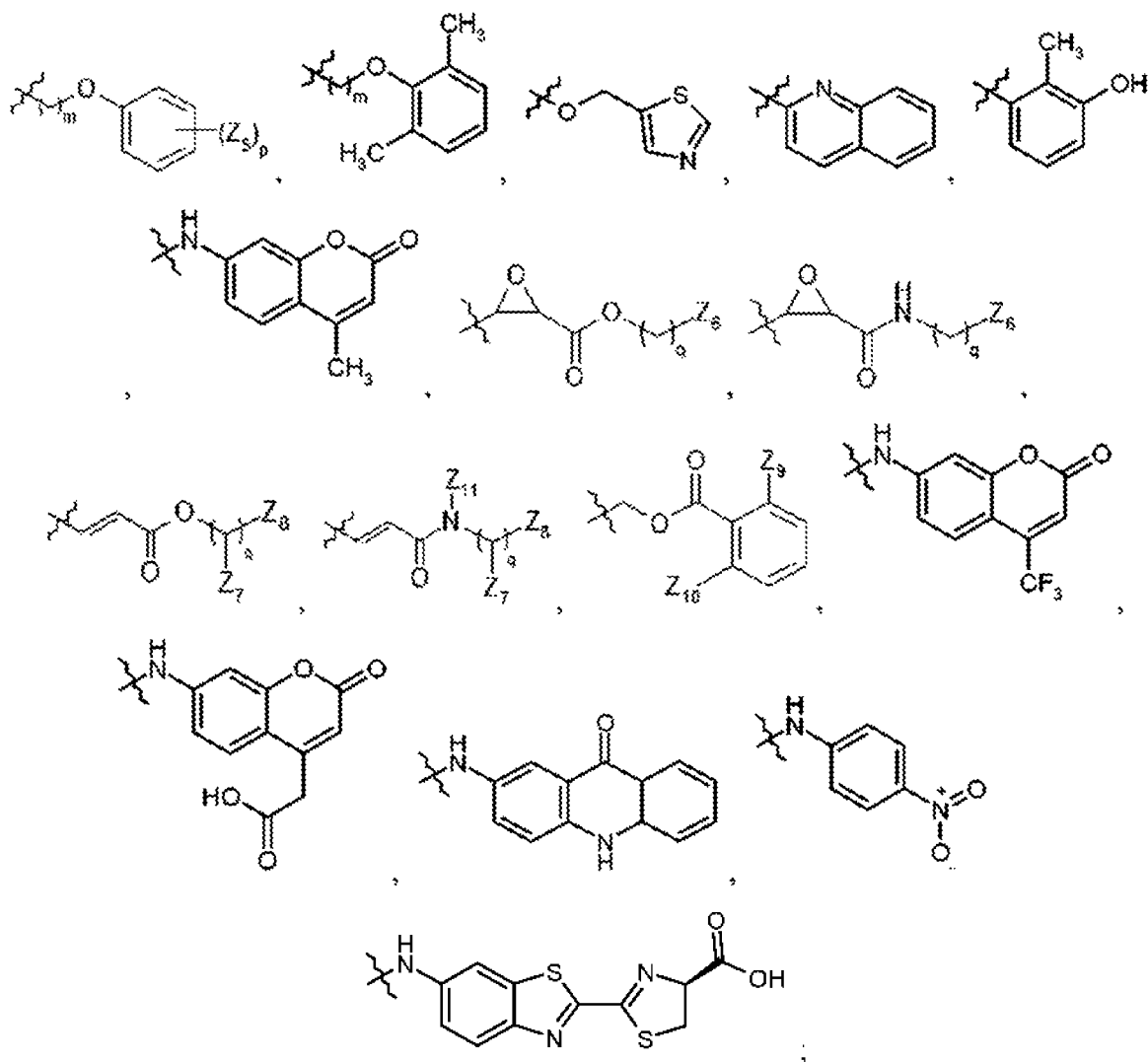
- 20
- P_3 se selecciona de los siguientes residuos de aminoácidos:



- R_1 se selecciona de



- R₂ se selecciona de:



5

y

en las que

- 10 • m es 0, 1 o 2;
- p es 1, 2, 3 o 4;
- 15 • Z₅ es un átomo de halógeno;
- q es 0 o 1;
- Z₆ se selecciona de un grupo alquilo (C₁-C₆) y un grupo fenilo, estando dicho grupo fenilo opcionalmente sustituido por un grupo amino;
- 20 • Z₇, Z₈ y Z₁₁, idénticos o diferentes, se seleccionan de un átomo de hidrógeno, un alquilo (C₁-C₄), un

tetrahydroquinolinilo y un grupo $-(CH_2)_i$ -arilo, siendo i 0, 1 o 2, estando dicho grupo arilo opcionalmente sustituido por uno, dos, tres o cuatro átomos de halógeno o un grupo alquilo (C_1 - C_4); y

- Z₉ y Z₁₀, idénticos o diferentes, se seleccionan de un átomo de halógeno y un grupo alquilo (C₁-C₆);

o una de sus sales:

estando dicho compuesto de fórmula (I) en todas las formas isoméricas racémicas, enantioméricas y diastereoisoméricas posibles.

Después de una extensa investigación, el inventor ha encontrado que estos compuestos de fórmula (I) actúan como inhibidores selectivos y eficaces de la actividad de la caspasa-2, como se demuestra en los siguientes ejemplos.

De hecho, los compuestos de la presente invención son mucho más eficaces para inhibir la caspasa-2 que para inhibir la caspasa-3.

En particular, como se muestra en los siguientes ejemplos, algunos compuestos de la invención exhiben un efecto inhibitor sobre la caspasa-2 al menos dos veces, preferentemente al menos 5 veces, más preferentemente al menos 10 veces, e incluso más preferentemente al menos 15 veces mayor que su efecto inhibitor sobre la caspasa-3.

El efecto inhibitor de los compuestos de la invención con respecto a la caspasa-2 y la caspasa-3 puede evaluarse mediante enfoques cinéticos usando caspasas recombinantes humanas. Para los inhibidores irreversibles, la relación k_{inact}/K_i se determina usando el método divulgado en el ejemplo 2. Para los inhibidores reversibles, se determinan la CI_{50} y la k_i .

Además, el hecho de que algunos de estos inhibidores sean irreversibles es muy ventajoso, ya que este tipo de inhibidores se pueden usar en la supresión prolongada de la caspasa-2, limitada únicamente por la tasa normal de resíntesis de proteínas, también llamada renovación.

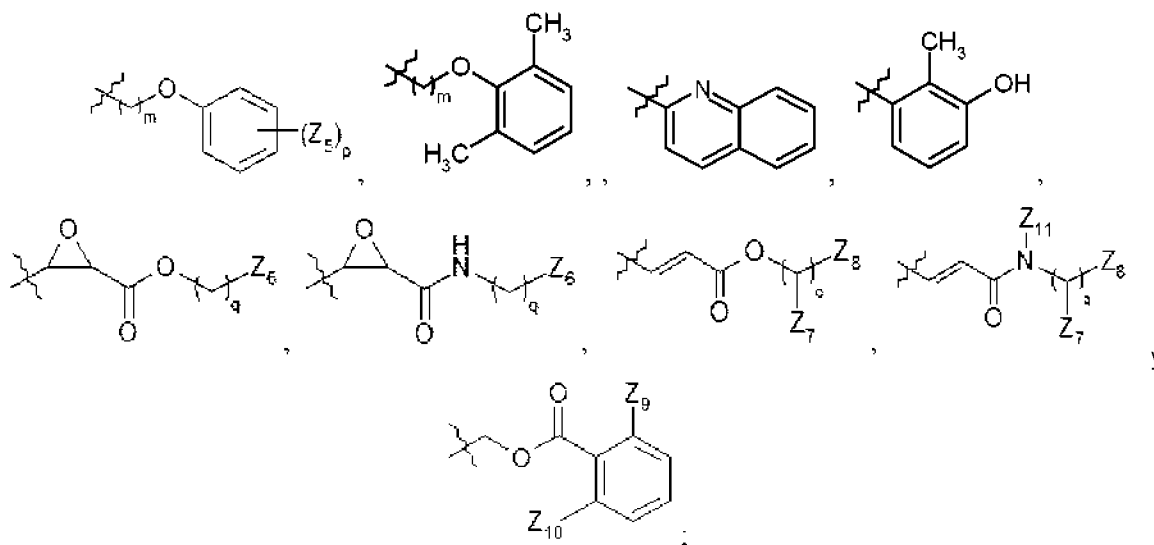
En el sentido de la presente invención:

- Un "inhibidor de caspasa" se refiere a un compuesto que reduce o suprime la actividad de la caspasa diana, en comparación con dicha actividad determinada sin dicho inhibidor.

- Un "inhibidor selectivo de caspasa-2" se refiere a un compuesto que disminuye la actividad de la caspasa-2 más que la actividad de otras caspasas, en particular la caspasa-3.

Por lo tanto, de acuerdo con un segundo aspecto, la invención se refiere a un compuesto de la invención para su uso como inhibidor selectivo de la caspasa-2.

De acuerdo con una realización, el radical R₂ de los compuestos de la invención se selecciona de:



en las que $m, p, q, Z_5, Z_6, Z_7, Z_8, Z_9, Z_{10}$ y Z_{11} son como se han definido anteriormente.

Estos compuestos pueden introducirse ventajosamente en una composición farmacéutica. Estos compuestos pueden

usarse como medicamento. Más particularmente, pueden usarse en la prevención y/o tratamiento de enfermedades y/o lesiones en las que está implicada la actividad de la caspasa-2.

A los efectos de la presente invención, el término "prevención" significa reducir, al menos parcialmente, el riesgo de manifestación de un fenómeno determinado, es decir, en la presente invención, una enfermedad y/o lesión en la que está implicada la actividad de la caspasa-2. Una reducción parcial implica que el riesgo persiste, pero en menor medida que antes de implementar la invención.

A los efectos de la presente invención, el término "tratamiento" pretende significar curar total o parcialmente un fenómeno determinado, es decir, en la presente invención, una enfermedad y/o lesión en la que está implicada la actividad de la caspasa-2, incluyendo disminuir, minimizar o reducir dicho fenómeno determinado.

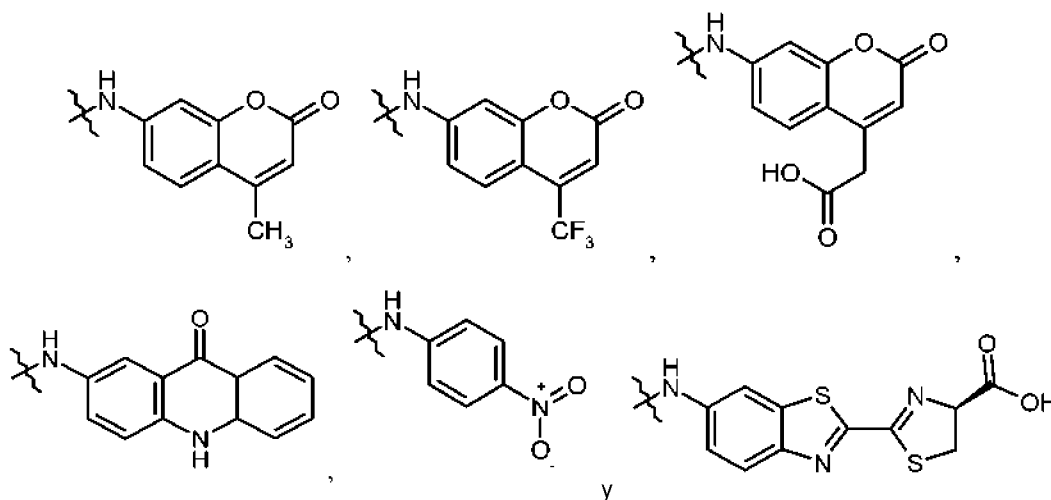
Por lo tanto, de acuerdo con un tercer aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de la invención, en donde R_2 es como se ha definido anteriormente y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con un cuarto aspecto, la invención se refiere a un compuesto de la invención, en donde R_2 es como se ha definido anteriormente, para su uso como medicamento.

De acuerdo con un quinto aspecto, la invención se refiere a un compuesto de la invención, en donde R_2 es como se ha definido anteriormente, para su uso en la prevención y/o tratamiento de enfermedades y/o lesiones en las que está implicada la actividad de la caspasa-2.

De acuerdo con un sexto aspecto, la invención se refiere a un compuesto de la invención, en donde R_2 es como se ha definido anteriormente, para su uso en la protección de células neuronales frente a la disfunción o toxicidad inducida por $A\beta$, más particularmente frente a la muerte celular inducida por $A\beta$, la degeneración axonal inducida por $A\beta$, la disfunción electrofisiológica inducida por $A\beta$ y/o la pérdida de sinapsis inducida por $A\beta$.

De acuerdo con otra realización de la solicitud, el radical R_2 de los compuestos de la solicitud se selecciona de:



Estos compuestos pueden usarse ventajosamente como sonda basada en la actividad para detectar selectivamente la actividad de la caspasa-2.

Por lo tanto, de acuerdo con un sexto aspecto, la solicitud se refiere al uso de un compuesto de la solicitud, en donde R_2 es como se ha definido anteriormente, como sonda basada en la actividad para detectar selectivamente la actividad de la caspasa-2.

En el contexto de la presente invención, se usan las siguientes abreviaturas y fórmulas empíricas:

- Boc *Terc*-butiloxicarbonilo

- °C Grados Celsius



- Me Metilo


- Bn Bencilo


	- AMC	7-amino-4-metilcumarina
	- PBS	Solución salina tamponada con fosfato
5	- Ac	Acetilo
	- UFR	Unidades de fluorescencia relativa
	- HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
10	- DTT	Ditiotreitol
	- EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
15	- CHAPS	(3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato)
	- DMSO	Dimetilsulfóxido

Además, cabe señalar que en todas las secuencias similares a aminoácidos que se representan en la presente invención mediante el uso de las abreviaturas mencionadas anteriormente, la orientación izquierda y derecha es en la dirección convencional del extremo amino al extremo carboxi.

Por consiguiente, parece evidente que, en una fórmula que define una estructura similar a un péptido de acuerdo con la invención, cuando se indica una secuencia como R₁-P₅P₄P₃- o -P₁-R₂:

25 (i) la parte  del residuo de aminoácido P₅ o residuo similar a aminoácido está unida a R₁;
la del residuo similar a aminoácido P₄ está unida al residuo de aminoácido P₅ o residuo similar a aminoácido;
30 la del residuo de aminoácido P₃ está unida al residuo similar a aminoácido P₄; y
la del residuo similar a aminoácido P₁ está unida a  en el lado opuesto de R₂ como se representa en la fórmula (I); y

35 (ii) la parte  del residuo de aminoácido P₅ o residuo similar a aminoácido está unida al residuo similar a aminoácido P₄;
la del residuo similar a aminoácido P₄ está unida al residuo de aminoácido P₃;

40 la del residuo de aminoácido P₃ está unida a  en el lado opuesto del residuo similar a aminoácido P₄ como se representa en la fórmula (I); y
la del residuo similar a aminoácido P₁ está unida a R₂.

45 Otras características y ventajas de la invención surgirán más claramente a partir de la descripción y de los siguientes ejemplos a modo de ilustración no limitante.

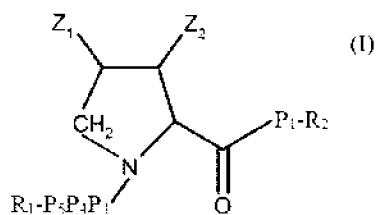
Figura

50 Figura 1: Protección de la sinapsis frente a la toxicidad de los oligómeros del péptido beta amiloide [1-42] con el compuesto 2. Co: control; [Aβ]_n: Neuronas intoxicadas con oligómeros del péptido beta amiloide [1-42], 10 nM; Aβ: Neuronas incubadas con beta amiloide no oligomérico (no tóxico), 10 nM; 2a: Neuronas intoxicadas con oligómeros del péptido beta amiloide [1-42], 10 nM pero tratadas previamente con el enantiómero a del compuesto 2 a razón de 0,1 μM o 1 μM (** p<0,01 (prueba *post hoc* de Kruskal-Wallis Dunn)).

55

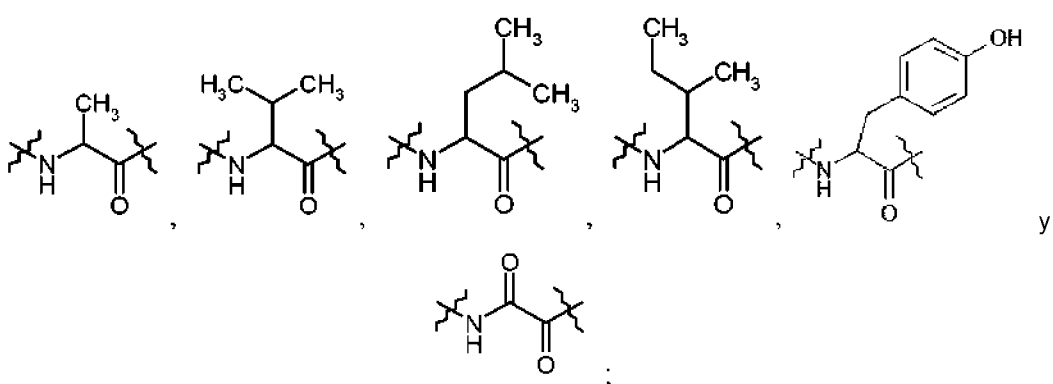
COMPUESTOS DE LA INVENCION

Como se ha mencionado anteriormente, los compuestos de acuerdo con la invención corresponden a la fórmula general (I):

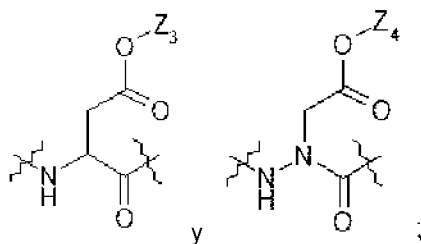


en la que:

- Z₁ y Z₂, idénticos o diferentes, se seleccionan de un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo (C₁-C₆) y un grupo alcoxi (C₁-C₆);
- P₅ se selecciona de los siguientes residuos de aminoácidos o estructuras similares a aminoácidos:

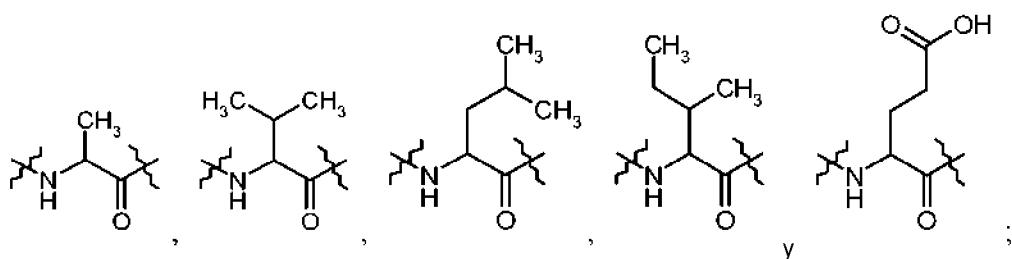


- P₁ y P₄, idénticos o diferentes, se seleccionan de las siguientes estructuras o compuestos similares a aminoácidos:

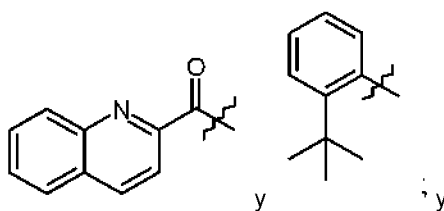


en las que Z₃ y Z₄, idénticos o diferentes, se seleccionan de un átomo de hidrógeno y un grupo alquilo (C₁-C₆);

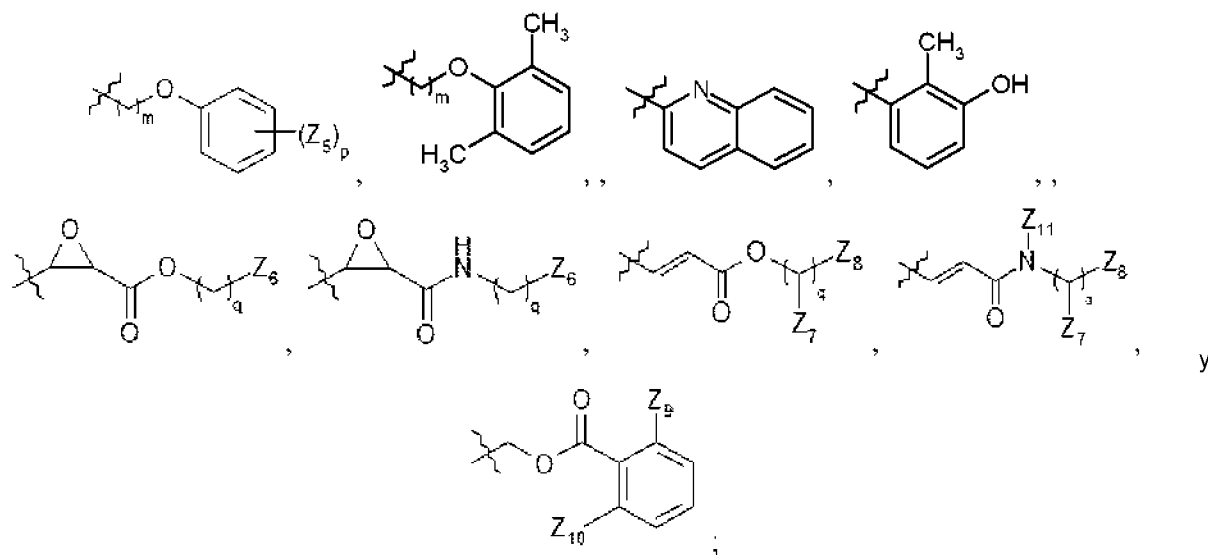
- P₃ se selecciona de los siguientes residuos de aminoácidos:



- R₁ se selecciona de:



- R₁ se selecciona de:



en las que:

- 10 • m es 0, 1 o 2;
- p es 1, 2, 3 o 4;
- 15 • Z₅ es un átomo de halógeno;
- q es 0 o 1;
- Z₆ se selecciona de un grupo alquilo (C₁-C₆) y un grupo fenilo, estando dicho grupo fenilo opcionalmente sustituido por un grupo amino;
- 20 • Z₇, Z₈ y Z₁₁, idénticos o diferentes, se seleccionan de un átomo de hidrógeno, un alquilo (C₁-C₄), un tetrahidroquinolinilo y un grupo -(CH₂)_i-arilo, siendo i 0, 1 o 2, estando dicho grupo arilo opcionalmente sustituido por uno, dos, tres o cuatro átomos de halógeno o un grupo alquilo (C₁-C₄); y
- 25 • Z₉ y Z₁₀, idénticos o diferentes, se seleccionan de un átomo de halógeno y un grupo alquilo (C₁-C₆);

o una de sus sales;

estando dicho compuesto de fórmula (I) en todas las formas isoméricas racémicas, enantioméricas y diastereoisoméricas posibles.

En una realización particular, el átomo de carbono asimétrico del anillo de pirrolidina unido a tiene la configuración (S), y los demás carbonos alfa asimétricos del aminoácido como P1, P3, P4 y P5 tienen la configuración (S).

35 En otra realización particular, el átomo de carbono asimétrico del anillo de pirrolidina unido a tiene la configuración (R), y los demás carbonos alfa asimétricos del aminoácido como P1, P3, P4 y P5 tienen la configuración (S).

Por consiguiente, los compuestos de la invención comprenden varios átomos de carbono asimétricos. Por lo tanto, pueden existir en forma de enantiómeros o diastereoisómeros. Estos enantiómeros y diastereoisómeros, y también mezclas de los mismos, incluyendo mezclas racémicas, forman parte de la invención.

- 5 Los compuestos de la invención también pueden existir en forma de bases o de sales de adición de ácidos. Estas sales pueden prepararse con ácidos farmacéuticamente aceptables, pero las sales de otros ácidos que son útiles, por ejemplo, para purificar o aislar los compuestos de fórmula (I), también forman parte de la invención.

- 10 La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa lo que es útil para preparar una composición farmacéutica generalmente segura, no tóxica y ni biológicamente ni de otro modo no deseada, e incluye lo que es aceptable para uso farmacéutico veterinario, así como humano.

- 15 Los compuestos de la invención también pueden existir en forma de hidratos o solvatos, es decir, en forma de asociaciones o combinaciones con una o más moléculas de agua o con un disolvente. Dichos hidratos y solvatos también forman parte de la invención.

En el contexto de la presente invención, se aplican las siguientes definiciones:

- 20 - un átomo de halógeno: un átomo de flúor, un átomo de cloro, un átomo de bromo o un átomo de yodo. Los átomos de halógeno pueden ser más particularmente átomos de flúor.

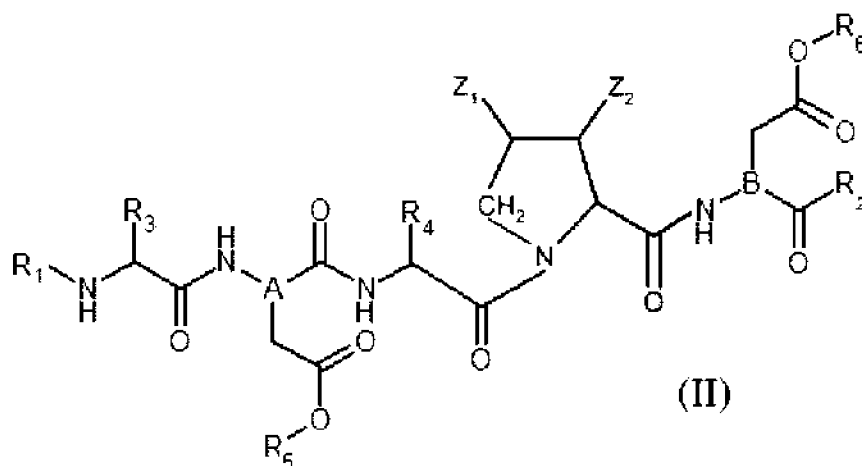
- C_t-C_z: una cadena a base de carbono que puede contener de t a z átomos de carbono, en la que t y z pueden adoptar valores de 1 a 10; por ejemplo, C₁-C₃ es una cadena a base de carbono que contiene posiblemente de 1 a 3 átomos de carbono.

- 25 - un alquilo: un grupo alifático saturado, lineal o ramificado, que comprende en particular de 1 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos que se pueden mencionar incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *tert*-butilo, pentilo, neopentilo, etc.

- 30 - un alcoxi: un radical -O-alquilo en el que el grupo alquilo es como se ha definido anteriormente.

- un arilo: un grupo aromático monocíclico o bicíclico que contiene entre 5 y 10 átomos de carbono, en particular entre 6 y 10 átomos de carbono. A modo de ejemplo de un grupo arilo, se puede mencionar el grupo fenilo o naftilo. Preferentemente, el grupo arilo es fenilo.

- 35 Entre los compuestos de fórmula general (I) de acuerdo con la invención, un subgrupo de compuestos está constituido por los compuestos de fórmula (II):




- 40 en donde:


- R_1 y R_2 son como se definen en la fórmula (I);
- 45 - Z_1 y Z_2 son como se definen en la fórmula (I);
- R_3 se selecciona de un grupo $-CH_3$, un grupo $-CH(CH_3)_2$, un grupo $-CH_2CH(CH_3)_2$, un grupo $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ y un grupo 4-hidroxifenilo;

- A y B, idénticos o diferentes, se seleccionan de un átomo de nitrógeno y un grupo -CH-;
- R₅ y R₆, idénticos o diferentes, se seleccionan de un átomo de hidrógeno y un grupo alquilo (C₁-C₆); y
- 5 - R₄ se selecciona de un grupo -CH₃, un grupo -CH(CH₃)₂, un grupo -CH₂CH(CH₃)₂, un grupo -CH(CH₃)CH₂CH₃ y un grupo -(CH₂)₂CO₂H;

o una de sus sales;

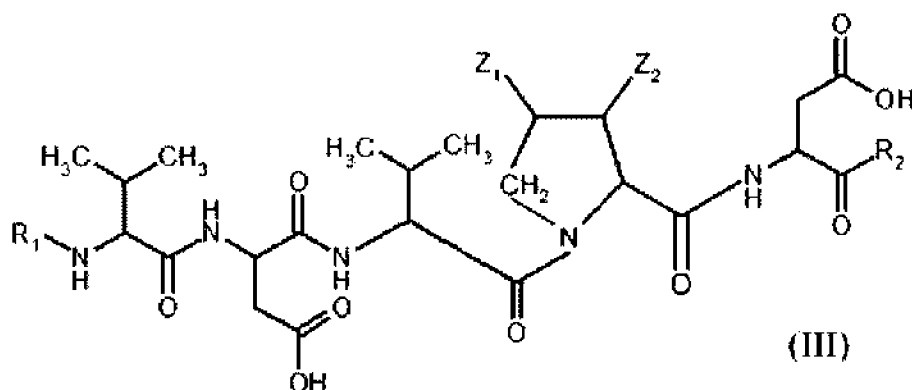
- 10 estando dicho compuesto de fórmula (II) en todas las formas isoméricas racémicas, enantioméricas y diastereoisoméricas posibles.

15 En una realización particular, el átomo de carbono asimétrico del anillo de pirrolidina unido a  tiene la configuración (S), y los demás carbonos alfa asimétricos del aminoácido como P1, P3, P4 y P5 tienen la configuración (S).

En otra realización particular, el átomo de carbono asimétrico del anillo de pirrolidina unido a  tiene la configuración (R), y los demás carbonos alfa asimétricos del aminoácido como P1, P3, P4 y P5 tienen la configuración (S).

- 20 Preferentemente en la fórmula (II), al menos uno de A y B es un grupo -CH, más preferentemente A y B son grupos -CH.

De acuerdo con un modo preferido de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención pueden ser de fórmula (III):

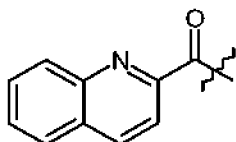


en donde R₁ y R₂ son como se definen en la fórmula (I);

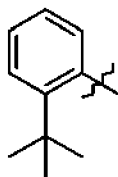
o una de sus sales;

estando dicho compuesto de fórmula (III) en todas las formas isoméricas racémicas, enantioméricas y diastereoisoméricas posibles.

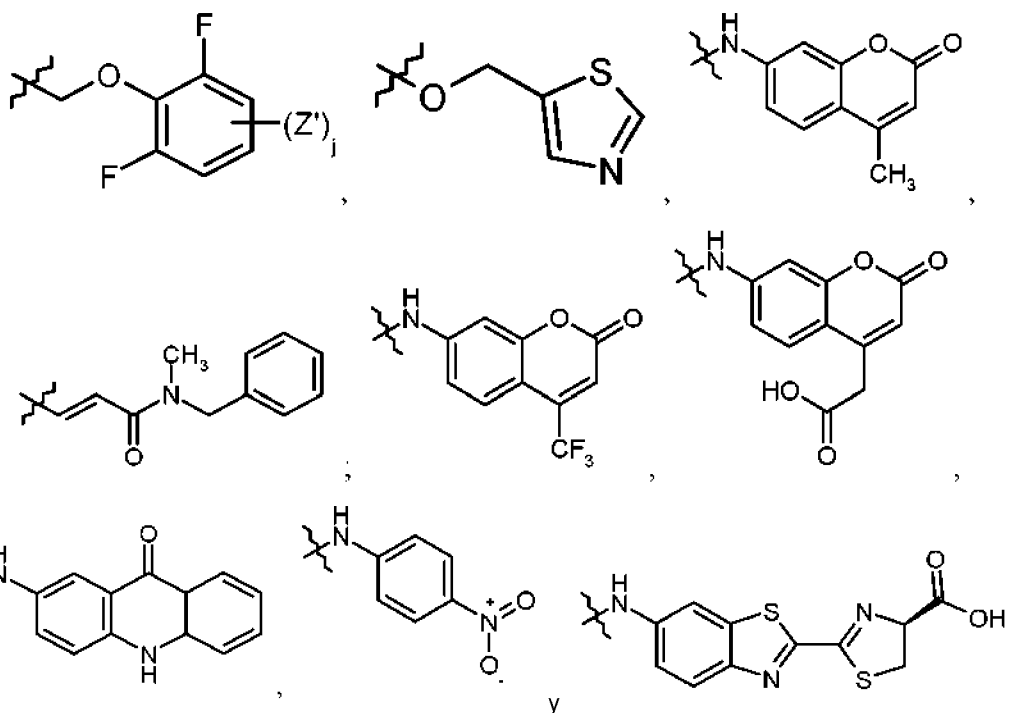
De acuerdo con otra realización preferida, en la fórmula (I), (II) y/o (III), R₁ es:



De acuerdo con otra realización preferida, en la fórmula (I), (II) y/o (III), R₁ es:

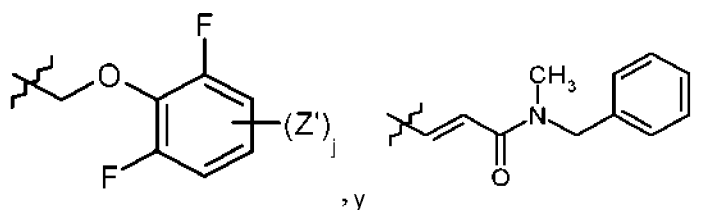


De acuerdo con otra realización preferida de la solicitud, en la fórmula (I), (II) y/o (III), R_2 se selecciona de:



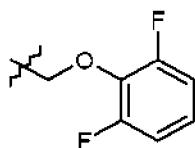
en las que Z' es un átomo de flúor y j es 0, 1 o 2.

10 De acuerdo con otra realización preferida de la invención, en la fórmula (I), (II) y/o (III), R_2 se selecciona de:




en las que Z' es un átomo de flúor y j es 0, 1 o 2.

Preferentemente, R_2 es:




20 En una realización particular, cuando R_2 es un metoxifenilo como se ha definido anteriormente, el anillo fenilo está sustituido con 2, 3, 4 o 5 átomos de halógeno, preferentemente dicho halógeno se selecciona de átomos de flúor o cloro.

De acuerdo con otra realización preferida, los compuestos de acuerdo con la invención tienen al menos uno, preferentemente al menos tres átomos de carbono asimétricos de configuración (S).

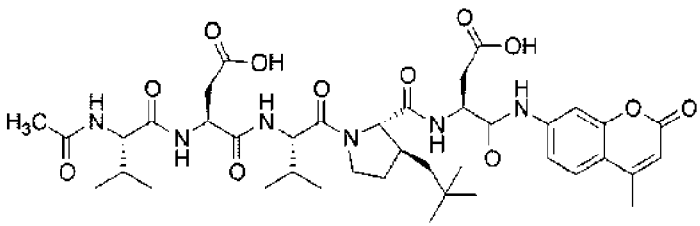
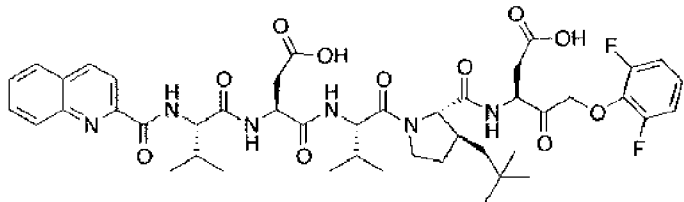
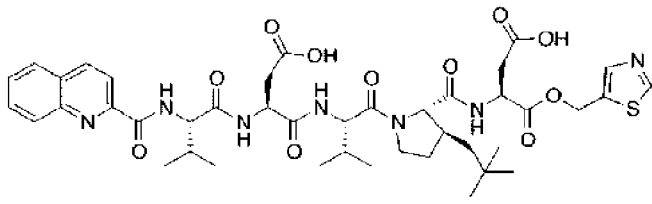
- 5 En una realización particular, el átomo de carbono asimétrico del anillo de pirrolidina unido a  tiene la configuración (S), y los demás carbonos alfa asimétricos del aminoácido como P1, P3, P4 y P5 tienen la configuración (S).

Más preferentemente, todos los átomos de carbono asimétricos de los compuestos de acuerdo con la invención tienen la configuración (S).

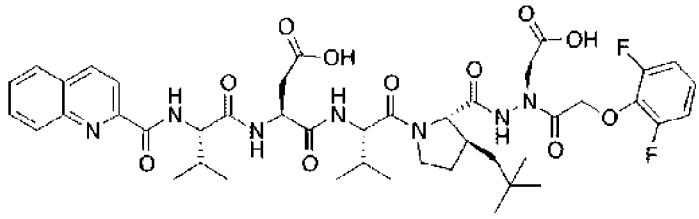
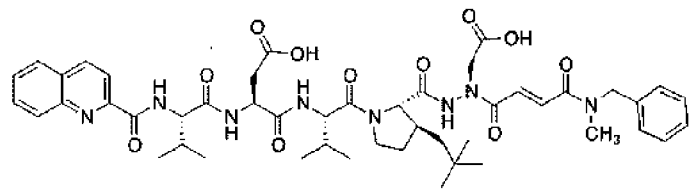
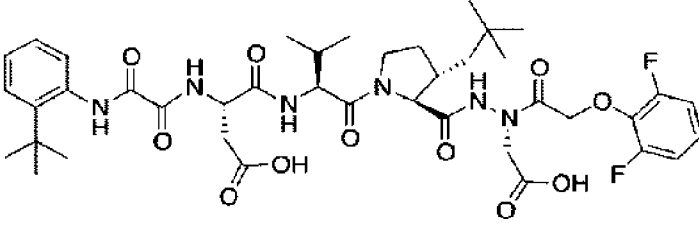
- 10 En otra realización particular, el átomo de carbono asimétrico del anillo de pirrolidina unido a  tiene la configuración (R), y los demás carbonos alfa asimétricos del aminoácido como P1, P3, P4 y P5 tienen la configuración (S).

Entre los compuestos de fórmula general (I) de acuerdo con la solicitud, se pueden mencionar especialmente los siguientes compuestos:

15

ESTRUCTURA/N.º de compuesto	NOMBRE IUPAC
 <p style="text-align: center;">1</p>	<p>ácido (S)-3-((S)-2-acetamido-3-metilbutanamido)-4-(((S)-1-((2S,3S)-2-(((S)-3-carboxi-1-((4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-il)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamoil)-3-neopentilpirrolidin-1-il)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-4-oxobutanoico</p>
 <p style="text-align: center;">2</p>	<p>ácido (S)-4-(((S)-1-((2S,3S)-2-(2-(carboximetil)-2-(2-(2,6-difluorofenoxi)acetil)hidrazinacarbonil)-3-neopentilpirrolidin-1-il)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-((S)-3-metil-2-(quinolin-2-carboxamido)butanamido)-4-oxobutanoico</p>
 <p style="text-align: center;">3</p>	<p>ácido (S)-4-(((5)-1-((2S,3S)-2-(((S)-3-carboxi-oxo-1-(tiazol-5-ilmetoxi)propan-2-il)carbamoil)-3-neopentilpirrolidin-1-il)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-((S)-3-metil-2-(quinolin-2-carboxamido)butanamido)-4-oxobutanoico</p>

(continuación)

ESTRUCTURA/N.º de compuesto	NOMBRE IUPAC
 <p style="text-align: center;">4</p>	<p>ácido (S)-4-(((S)-1-((2S,3S)-2-(2-(carboximetil)-2-(2-(2,6-difluorofenoxy)acetil)hidrazinacarbonil)-3-neopentilpirrolidin-1-il)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-((S)-3-metil-2-(quinolin-2-carboxamido)butanamido)-4-oxobutanoico</p>
 <p style="text-align: center;">5</p>	<p>ácido (S)-4-(((S)-1-((2S,3S)-2-(2-((E)-4-bencil(metil)amino)-4-oxobut-2-en-1-il)-3-neopentilpirrolidin-1-il)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-3-((S)-3-metil-2-(quinolin-2-carboxamido)butanamido)-4-oxobutanoico</p>
 <p style="text-align: center;">6</p>	<p>ácido (S)-3-(2-((2-(tert-butil)fenil)amino)-2-oxoacetamido)-4-(((S)-1-((2S,3S)-2-(2-(carboximetil)-2-(2-(2,6-difluorofenoxy)acetil)hidrazinacarbonil)-3-neopentilpirrolidin-1-il)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-4-oxobutanoico</p>

Por consiguiente, en una realización particular, un compuesto de acuerdo con la solicitud se selecciona de los compuestos 1 a 6 indicados anteriormente.

5

Por consiguiente, en una realización particular, un compuesto de acuerdo con la invención se selecciona de los compuestos 2, 4, 5 y 6 indicados anteriormente.

PREPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE LA INVENCION

10

Los compuestos de la invención pueden prepararse mediante síntesis orgánica y peptídica. El ensamblaje de la estructura mediante síntesis peptídica pertenece al conocimiento general del experto en la técnica y se describen más detalles en Linton *et al.*, J. Med. Chem. 2005, 48, 6779-6782 y en Chauvier *et al.* Cell Death Dis 2011, 2:e203. Los precursores de R₁, R₂, P₁, X, P₃, P₄ y P₅ que conducen a los compuestos de la invención se introducen en las diferentes etapas del proceso.

15

El precursor puede ser un producto comercial o un producto comercial que se ha funcionalizado de acuerdo con protocolos ya conocidos por el experto en la técnica. Se pueden encontrar más detalles y referencias en "Design of Caspase inhibitors as potential clinical agents;

20

CRC press; CRC Enzyme inhibitors series, editado por Tom O'Brien y Steven D. Linton, capítulo 7 de BR Ullman".

En particular, el ejemplo 1 de la presente invención ilustra el protocolo de preparación del compuesto 2 de acuerdo

con la invención.

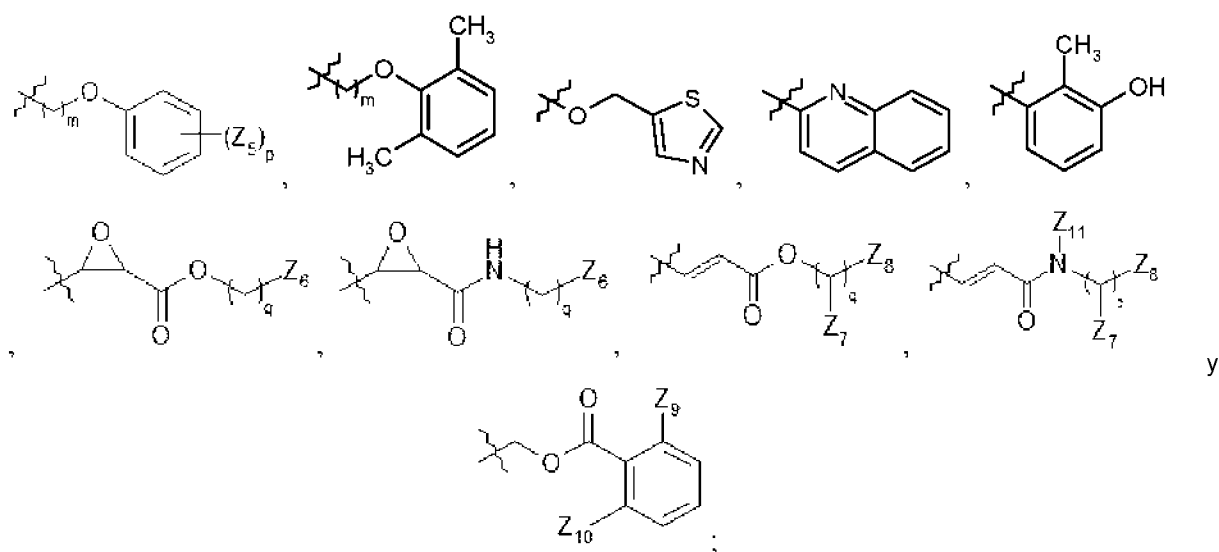
APLICACIONES

- 5 Como se ha especificado previamente y se ilustra claramente mediante los siguientes ejemplos, los compuestos de acuerdo con la presente invención son útiles como inhibidores selectivos de la caspasa-2.

De hecho, como se señala mediante los ejemplos, muestran un efecto inhibitor mucho mejor para la caspasa-2 que para la caspasa-3 a pesar de que estas dos tienen el sitio activo más parecido entre todas las caspasas. Como
10 consecuencia, son eficientes para inhibir selectivamente la caspasa-2.

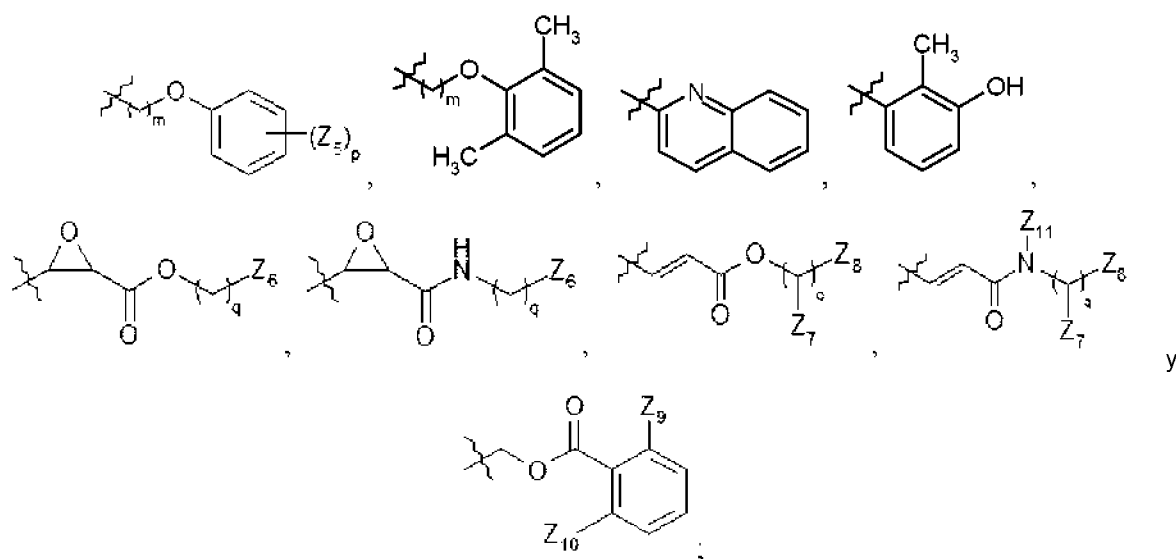
a) *Campo terapéutico*

- En vista de lo anterior, los compuestos de la presente solicitud, y más particularmente los compuestos para los que el
15 radical R_2 se selecciona de:



- 20 en las que m , p , q , Z_5 , Z_6 , Z_7 , Z_8 , Z_9 , Z_{10} y Z_{11} son como se han definido anteriormente, pueden usarse en el campo terapéutico.

En vista de lo anterior, los compuestos de la presente invención, y más particularmente los compuestos para los que
25 el radical R_2 se selecciona de:



en las que m , p , q , Z_5 , Z_6 , Z_7 , Z_8 , Z_9 , Z_{10} y Z_{11} son como se han definido anteriormente, pueden usarse en el campo

terapéutico.

De acuerdo con uno de sus aspectos, por lo tanto, la presente invención se refiere a un compuesto de la invención en donde R_2 es como se ha definido anteriormente, para su uso como medicamento, en particular un medicamento

En otros términos, la invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con la invención en el que R_2 es como se ha definido anteriormente para la preparación de un medicamento, en particular de un fármaco para inhibir selectivamente la actividad de la caspasa-2.

En otras palabras, la presente invención se refiere a un medicamento que comprende al menos un compuesto de acuerdo con la invención en el que R_2 es como se ha definido anteriormente, en particular un medicamento para inhibir selectivamente la actividad de la caspasa-2.

Por lo tanto, de acuerdo con otro de sus aspectos, la invención se refiere a un compuesto de la invención, en donde R_2 es como se ha definido anteriormente, para su uso en la prevención y/o tratamiento de enfermedades y/o lesiones en las que está implicada la actividad de la caspasa-2.

En otros términos, la invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con la invención en el que R_2 es como se ha definido anteriormente para la preparación de un medicamento destinado a prevenir y/o tratar enfermedades y/o lesiones en las que está implicada la actividad de la caspasa-2.

En particular, dichas enfermedades y/o lesiones pueden seleccionarse entre patologías con muerte celular, particularmente entre:

- enfermedades degenerativas crónicas tales como enfermedad de Alzheimer u otras tauopatías, enfermedad de Huntington y enfermedad de Parkinson;

- daño cerebral neonatal, en particular isquemia cerebral neonatal;

- traumatismo craneoencefálico;

- isquemia renal;

- lesiones por hipoxia-isquemia (H-I);

- lesiones cerebrales en situaciones similares a accidentes cerebrovasculares;

- isquemia cardíaca;

- infarto de miocardio;

- esclerosis lateral amiotrófica (ELA);

- daños retinianos;

- enfermedades oftálmicas, tales como traumatismo ocular cerrado, neuropatía óptica isquémica y glaucoma;

- daños cutáneos;

- enfermedades inflamatorias estériles, tales como diabetes, aterosclerosis, isquemia cardíaca, gota, pseudogota, aflojamiento articular, aterosclerosis, síndromes desencadenados por sales de aluminio, neuropatía óptica isquémica no arterítica (NAION, por sus siglas en inglés), glaucoma y enfermedades metabólicas;

- enfermedades inflamatorias no estériles, tales como infecciones bacterianas, en particular, con bacterias productoras de toxinas formadoras de poros, infecciones por el virus de la gripe e infecciones por *Rhabdoviridae* de ARN monocatenario (mc), tal como el virus Maraba o el virus de la estomatitis vesicular (VSV);

- enfermedades causadas por bacterias patógenas, tales como *Brucella*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella*;

- dislipidemias;

- obesidad;

- síndrome metabólico; y

- esteatosis hepática no alcohólica.

Más particularmente, dichas enfermedades y/o lesiones se seleccionan entre enfermedades neurodegenerativas crónicas. Preferentemente, se eligen entre la enfermedad de Alzheimer, otras tauopatías conocidas (como tauopatía primaria relacionada con la edad, encefalopatía traumática crónica, parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, demencia frontotemporal, parkinsonismo ligado al cromosoma 17, enfermedad de Lytico-Bodig, ganglioglioma y gangliocitoma, meningioangiomatosis, parkinsonismo postencefalítico, panencefalitis esclerosante subaguda, encefalopatía plúmbica, esclerosis tuberosa, neurodegeneración asociada a la antotenato cinasa, lipofuscinosis), enfermedad de Huntington y enfermedad de Parkinson, más específicamente enfermedad de Alzheimer.

De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a un compuesto de la invención, en donde R_2 es como se ha definido anteriormente, para su uso en la sinaptoprotección, más particularmente en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, incluso más particularmente de la enfermedad de Alzheimer o de tauopatías.

En una realización de la solicitud, la solicitud se refiere a un compuesto seleccionado del compuesto 2, compuesto 3, compuesto 4, compuesto 5 y/o compuesto 6, como se ha definido anteriormente, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer u otras tauopatías.

En una realización de la invención, la invención se refiere a un compuesto seleccionado del compuesto 2, compuesto 4, compuesto 5 y/o compuesto 6, como se ha definido anteriormente, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer u otras tauopatías.

En una realización adicional, la invención se refiere al compuesto 2, como se ha definido anteriormente, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer u otras tauopatías.

En una realización adicional, la solicitud se refiere al compuesto 3, como se ha definido anteriormente, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer u otras tauopatías.

En una realización adicional, la invención se refiere al compuesto 4, como se ha definido anteriormente, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer u otras tauopatías.

En una realización adicional, la invención se refiere al compuesto 5, como se ha definido anteriormente, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer u otras tauopatías.

En una realización adicional, la invención se refiere al compuesto 6, como se ha definido anteriormente, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer u otras tauopatías.

En una realización particular, la presente invención se refiere a un compuesto como se ha definido anteriormente para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

En una realización de la solicitud, la solicitud se refiere a un compuesto seleccionado del compuesto 2, compuesto 3, compuesto 4, compuesto 5 y/o compuesto 6, como se ha definido anteriormente, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

En una realización de la invención, la invención se refiere a un compuesto seleccionado del compuesto 2, compuesto 4, compuesto 5 y/o compuesto 6, como se ha definido anteriormente, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

En una realización adicional, la invención se refiere al compuesto 2, como se ha definido anteriormente, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

En una realización adicional, la solicitud se refiere al compuesto 3, como se ha definido anteriormente, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

En una realización adicional, la invención se refiere al compuesto 4, como se ha definido anteriormente, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

En una realización adicional, la invención se refiere al compuesto 5, como se ha definido anteriormente, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

En una realización adicional, la invención se refiere al compuesto 6, como se ha definido anteriormente, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Incluso más particularmente, como se muestra en la sección experimental, los compuestos de la invención en los que R_2 es como se ha definido anteriormente son eficaces para proteger las células neuronales de la disfunción o toxicidad

inducida por oligómeros A β .

Por consiguiente, de acuerdo con un aspecto adicional, la invención se refiere a un compuesto de la invención, en donde R₂ es como se ha definido anteriormente, para su uso en la protección de células neuronales frente a la

5 disfunción o toxicidad inducida por A β , más particularmente frente a la muerte celular inducida por A β , la degeneración axonal inducida por A β , la disfunción electrofisiológica inducida por A β y/o la pérdida de sinapsis inducida por A β .

En una realización de la solicitud, la solicitud se refiere a un compuesto seleccionado del compuesto 2, compuesto 3, compuesto 4, compuesto 5 y/o compuesto 6 como se ha definido anteriormente para su uso en la protección de células

10 neuronales de la disfunción o toxicidad inducida por A β , más particularmente frente a la muerte celular inducida por A β , la degeneración axonal inducida por A β , la disfunción electrofisiológica inducida por A β y/o la pérdida de sinapsis inducida por A β .

En una realización de la invención, la invención se refiere a un compuesto seleccionado del compuesto 2, compuesto 4, compuesto 5 y/o compuesto 6 como se ha definido anteriormente para su uso en la protección de células neuronales de la disfunción o toxicidad inducida por A β , más particularmente frente a la muerte celular inducida por A β , la degeneración axonal inducida por A β , la disfunción electrofisiológica inducida por A β y/o la pérdida de sinapsis

15 inducida por A β .

En una realización adicional, la invención se refiere al compuesto 2 como se ha definido anteriormente para su uso en la protección de células neuronales de la disfunción o toxicidad inducida por A β , más particularmente frente a la muerte celular inducida por A β , la degeneración axonal inducida por A β , la disfunción electrofisiológica inducida por A β y/o la pérdida de sinapsis inducida por A β .

20 En una realización adicional, la invención se refiere al compuesto 2 como se ha definido anteriormente para su uso en la protección de células neuronales de la disfunción o toxicidad inducida por A β , más particularmente frente a la muerte celular inducida por A β , la degeneración axonal inducida por A β , la disfunción electrofisiológica inducida por A β y/o la pérdida de sinapsis inducida por A β .

En una realización adicional, la solicitud se refiere al compuesto 3 como se ha definido anteriormente para su uso en la protección de células neuronales de la disfunción o toxicidad inducida por A β , más particularmente frente a la muerte celular inducida por A β , la degeneración axonal inducida por A β , la disfunción electrofisiológica inducida por A β y/o la pérdida de sinapsis inducida por A β .

25 En una realización adicional, la solicitud se refiere al compuesto 3 como se ha definido anteriormente para su uso en la protección de células neuronales de la disfunción o toxicidad inducida por A β , más particularmente frente a la muerte celular inducida por A β , la degeneración axonal inducida por A β , la disfunción electrofisiológica inducida por A β y/o la pérdida de sinapsis inducida por A β .

En una realización adicional, la invención se refiere al compuesto 4 como se ha definido anteriormente para su uso en la protección de células neuronales de la disfunción o toxicidad inducida por A β , más particularmente frente a la muerte celular inducida por A β , la degeneración axonal inducida por A β , la disfunción electrofisiológica inducida por A β y/o la pérdida de sinapsis inducida por A β .

30 En una realización adicional, la invención se refiere al compuesto 4 como se ha definido anteriormente para su uso en la protección de células neuronales de la disfunción o toxicidad inducida por A β , más particularmente frente a la muerte celular inducida por A β , la degeneración axonal inducida por A β , la disfunción electrofisiológica inducida por A β y/o la pérdida de sinapsis inducida por A β .

En una realización adicional, la invención se refiere al compuesto 5 como se ha definido anteriormente para su uso en la protección de células neuronales de la disfunción o toxicidad inducida por A β , más particularmente frente a la muerte celular inducida por A β , la degeneración axonal inducida por A β , la disfunción electrofisiológica inducida por A β y/o la pérdida de sinapsis inducida por A β .

35 En una realización adicional, la invención se refiere al compuesto 5 como se ha definido anteriormente para su uso en la protección de células neuronales de la disfunción o toxicidad inducida por A β , más particularmente frente a la muerte celular inducida por A β , la degeneración axonal inducida por A β , la disfunción electrofisiológica inducida por A β y/o la pérdida de sinapsis inducida por A β .

En una realización adicional, la invención se refiere al compuesto 6 como se ha definido anteriormente para su uso en la protección de células neuronales de la disfunción o toxicidad inducida por A β , más particularmente frente a la muerte celular inducida por A β , la degeneración axonal inducida por A β , la disfunción electrofisiológica inducida por A β y/o la pérdida de sinapsis inducida por A β .

40 En una realización adicional, la invención se refiere al compuesto 6 como se ha definido anteriormente para su uso en la protección de células neuronales de la disfunción o toxicidad inducida por A β , más particularmente frente a la muerte celular inducida por A β , la degeneración axonal inducida por A β , la disfunción electrofisiológica inducida por A β y/o la pérdida de sinapsis inducida por A β .

De acuerdo con otro más de sus aspectos, la invención se refiere a un método para prevenir y/o tratar enfermedades y/o lesiones en las que está implicada la actividad de la caspasa-2, que comprende al menos una etapa de administrar a un individuo que lo necesite al menos una cantidad eficaz de al menos un compuesto de acuerdo con la invención, en el que R₂ es como se ha definido anteriormente.

45 De acuerdo con otro más de sus aspectos, la invención se refiere a un método para prevenir y/o tratar enfermedades y/o lesiones en las que está implicada la actividad de la caspasa-2, que comprende al menos una etapa de administrar a un individuo que lo necesite al menos una cantidad eficaz de al menos un compuesto de acuerdo con la invención, en el que R₂ es como se ha definido anteriormente.

De acuerdo con otro de sus aspectos, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de acuerdo con la invención en el que R₂ es como se ha definido anteriormente, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

50 De acuerdo con otro de sus aspectos, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de acuerdo con la invención en el que R₂ es como se ha definido anteriormente, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener más particularmente una dosis eficaz de al menos un compuesto de acuerdo con la invención en el que R₂ es como se ha definido anteriormente.

55 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener más particularmente una dosis eficaz de al menos un compuesto de acuerdo con la invención en el que R₂ es como se ha definido anteriormente.

Una "dosis eficaz" significa una cantidad suficiente para inducir una modificación positiva en la afección o lesión que se va a regular o tratar, pero lo suficientemente baja como para evitar efectos secundarios graves. Una dosis eficaz puede variar con el efecto farmacéutico a obtener o con la afección particular que se está tratando, la edad y la condición física del usuario final, la gravedad de la afección o lesión que se está tratando/previendo, la duración del tratamiento, la naturaleza de otros tratamientos, el compuesto o composición específicos empleados, la vía de administración y factores similares.

60 Una "dosis eficaz" significa una cantidad suficiente para inducir una modificación positiva en la afección o lesión que se va a regular o tratar, pero lo suficientemente baja como para evitar efectos secundarios graves. Una dosis eficaz puede variar con el efecto farmacéutico a obtener o con la afección particular que se está tratando, la edad y la condición física del usuario final, la gravedad de la afección o lesión que se está tratando/previendo, la duración del tratamiento, la naturaleza de otros tratamientos, el compuesto o composición específicos empleados, la vía de administración y factores similares.

Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la invención en la que R₂ es como se ha definido anteriormente puede administrarse en una dosis eficaz mediante cualquiera de los modos de administración aceptados en la técnica.

65 Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la invención en la que R₂ es como se ha definido anteriormente puede administrarse en una dosis eficaz mediante cualquiera de los modos de administración aceptados en la técnica.

En una realización, este compuesto puede usarse en una composición destinada a ser administrada por vía oral, nasal, sublingual, oftálmica, tópica, rectal, vaginal, uretral o inyección parenteral.

La vía de administración y la formulación galénica serán adaptadas por un experto en la técnica de acuerdo con el efecto farmacéutico deseado.

Un experto en la técnica de formulaciones terapéuticas podrá, sin demasiada experimentación y confiando en el conocimiento personal, determinar una dosis terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención para una indicación determinada.

Una composición farmacéutica de la invención puede formularse con cualquier excipiente farmacéuticamente aceptable conocido y adecuado según la dosis, la forma galénica, la vía de administración y similares.

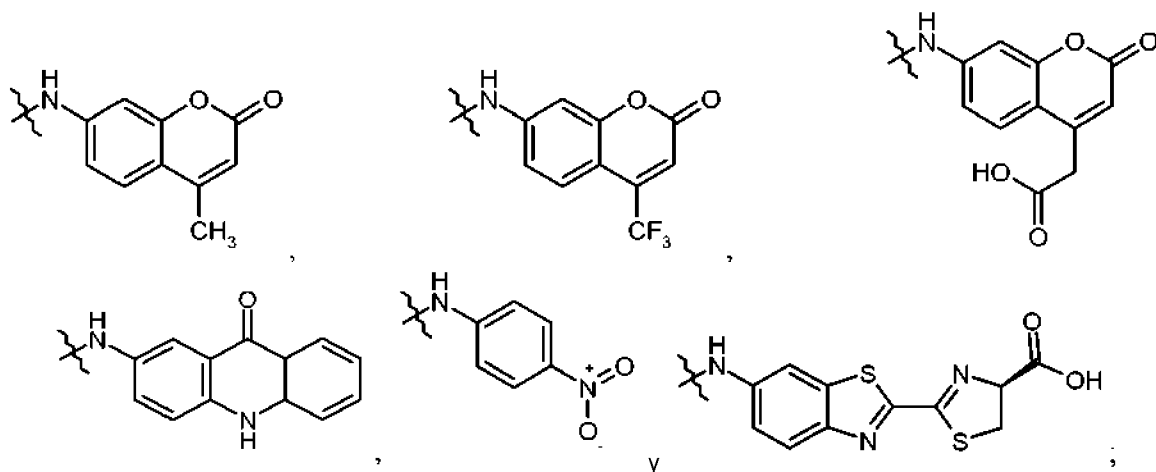
Como se usan en el presente documento, los "excipientes farmacéuticamente aceptables" incluyen cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares. Excepto en la medida en que cualquier excipiente convencional sea incompatible con los compuestos activos, se contempla su uso en un medicamento o composición farmacéutica de la invención.

Un medicamento o composición farmacéutica de la invención puede estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, pastillas para chupar, sobres, obleas, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles, pulverizadores, ungüentos, geles, cremas, barras, lociones, pastas, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, soluciones inyectables estériles, polvos envasados estériles y similares.

De acuerdo con una realización, una composición farmacéutica de la invención puede estar destinada a administrarse por separado, secuencial o simultáneamente con un agente útil para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad, en particular, la enfermedad de Alzheimer, siendo dicho agente diferente del compuesto de fórmula (I) de la invención.

b) Sonda basada en la actividad

Los compuestos de la presente solicitud, y más particularmente los compuestos para los que el radical R_2 se selecciona de:



pueden usarse como sonda basada en la actividad para detectar selectivamente la actividad de la caspasa-2.

Por lo tanto, de acuerdo con uno de sus aspectos, la presente solicitud se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con la solicitud en el que R_2 es como se ha definido anteriormente, como sonda basada en la actividad (ABP) para detectar selectivamente la actividad de la caspasa-2.

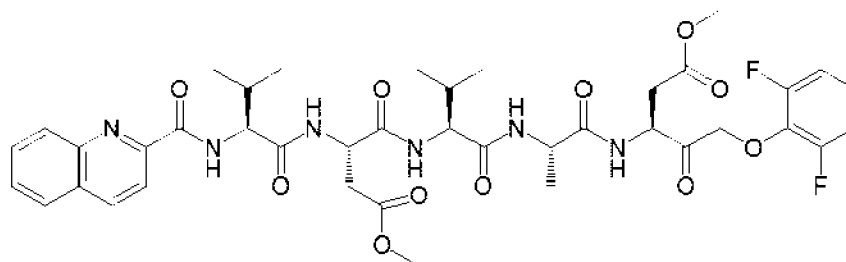
La presente invención se entenderá mejor haciendo referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera de la presente invención.

Ejemplos

EJEMPLO 1: Preparación del compuesto 2 de acuerdo con la invención

La síntesis de compuestos de acuerdo con la invención se inspira en el proceso de preparación del compuesto TRP601

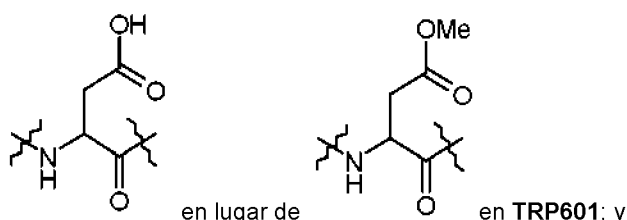
representado a continuación:



TRP601

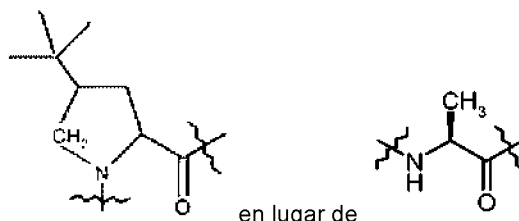
5 La síntesis de **TRP601** se describe en D. Chauvier *et al.*, Cell Death and Disease (2011) 2, e203.

Por ejemplo, el compuesto 2 de la presente invención difiere de **TRP601** en que:



P₁ y P₄ se representan por en lugar de en **TRP601**; y

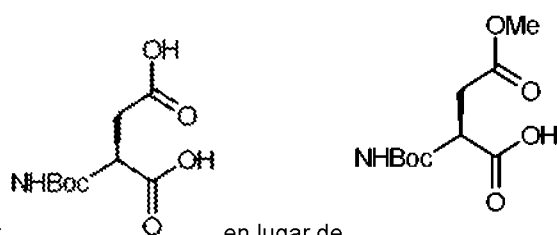
10



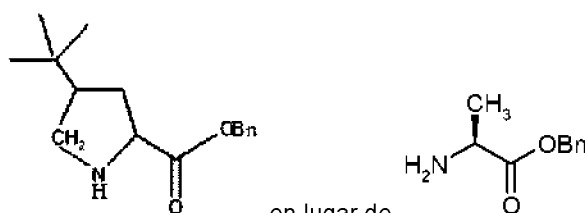
- se usa el residuo similar a prolina en lugar de en **TRP601**.

Por lo tanto, el compuesto 2 se ha obtenido reproduciendo las etapas divulgadas en el artículo mencionado anteriormente para dar lugar a **TRP601** excepto que:

15



- se ha usado el precursor en lugar de para introducir los radicales P₁ y P₄; y



- se ha usado el precursor en lugar de para introducir el radical similar a

prolina con la configuración (R o S) del átomo de carbono asimétrico del anillo de pirrolidina unido a


20

El precursor de P₁ y P₄ se ha preparado a partir del ácido (S)-aspártico disponible comercialmente en el que la función amina se ha protegido mediante un grupo Boc de acuerdo con un protocolo ya conocido por el experto en la técnica.

El precursor de prolina se ha obtenido según se describe por Maillard *et al.*, en Bioorganic & Medicinal Chemistry 19 (2011):5833-5851.

Los demás componentes básicos del compuesto 2 se han introducido de la misma manera que para **TRP601** en las publicaciones mencionadas anteriormente, es decir, con los mismos reactivos, en las mismas condiciones y con las mismas cantidades.

Por lo tanto, el compuesto 2 se ha obtenido con un rendimiento de más del 90 % y se ha caracterizado por HPLC, con

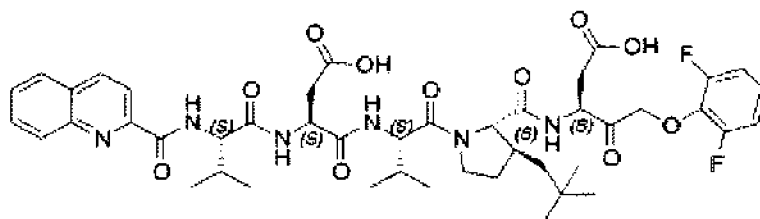
la configuración (*R* o *S*) del átomo de carbono asimétrico del anillo de pirrolidina unido a .

EJEMPLO 2: Ensayos de inhibición de la caspasa-2 y la caspasa-3 (*in vitro*) para inhibidores irreversibles

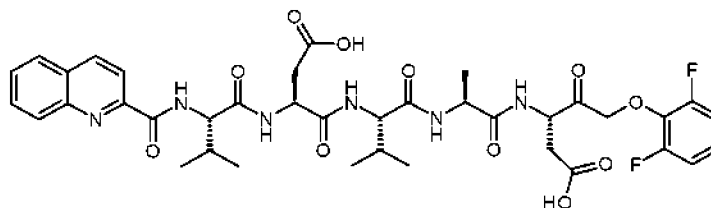
La eficacia inhibidora de los compuestos de la invención que son inhibidores irreversibles de la caspasa-2 y la caspasa-3 se puede evaluar usando el protocolo explicado a continuación. El compuesto 2, así como los compuestos 4, 5, 6 son inhibidores irreversibles y se han evaluado en consecuencia.

La eficacia del compuesto comparativo $\Delta 2\text{Me-TRP601}$, que es un inhibidor de la caspasa del grupo II ya conocido (inhibidor de la caspasa-2, la caspasa-3 y la caspasa-7), se ha evaluado mediante un protocolo similar descrito en Chauvier *et al.*, 2011 Cell Death Dis 2011, 2:e203.

Estos compuestos ensayados se representan a continuación:



Compuesto 2



$\Delta 2\text{Me-TRP601}$ (compuesto comparativo)

En este ejemplo, la caspasa-2 y la caspasa-3 son enzimas activas recombinantes humanas que se proporcionan, respectivamente, por Enzo Life® (ALX-201-057-U100) y R&D Systems® (707-C3-010/CF).

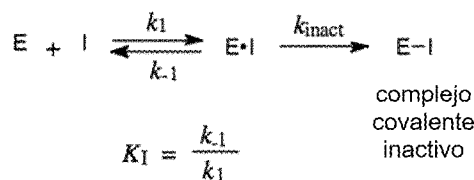
La caspasa-2 se usa a una concentración final de 0,1 nM en un "tampón de caspasa-2" que contiene HEPES 20 mM (pH 7,4), DTT 5 mM, EDTA 2 mM, CHAPS al 0,1 % y succinato 800 mM. La caspasa-3 se usa a una concentración final de 0,5 nM en un "tampón de caspasa-3" que contiene HEPES 20 mM (pH 7,4), CHAPS al 0,1 %, DTT 5 mM y EDTA 2 mM.

Los sustratos peptídicos usados para las mediciones de la actividad enzimática son Ac-DEVD-AMC y Ac-VDVAD-AMC comercializados por EnzoLife® (con la referencia, respectivamente, ALX-260-031-M005 y ALX-260-060-M005). Son fluorogénicos debido a la presencia de su grupo terminal AMC (7-amino-4-metilcumarina). La liberación de AMC permite seguir la actividad enzimática en la unidad de fluorescencia UFR en el tiempo en una microplaca de 96 pocillos.

Los valores de fluorescencia se miden a 37 °C con un espectrofluorómetro con un lector de microplacas BMG FLUOstar OPTIMA. Este aparato está controlado por el software Biolise® y está equipado con un dispositivo de enfriamiento termoelectrónico por efecto Peltier. Los análisis matemáticos de los datos experimentales se realizan con el software Kaleidagraph®.

Las propiedades inhibitorias de los compuestos ensayados se evalúan mediante la determinación de la relación k_{inact}/K_i con respecto a la caspasa-2 o la caspasa-3, en donde:

- k_{inact} es la constante de velocidad de inactivación máxima, y
- K_i es la constante de disociación de acuerdo con:



5

que refleja la afinidad del inhibidor con respecto a una enzima.

- 10 Por consiguiente, cuanto mayor sea la relación, más eficiente será el inhibidor.

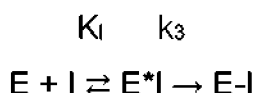
Dicha relación se mide de acuerdo con el método continuo (Allison RD. Curr Protoc Protein Sci. Mayo de 2001; Capítulo 3: Unidad 3.5.; Chauvier *et al.*, 2011 Cell Death Dis 2:e203; Tan *et al.*, J Med Chem 2015, 58:598-312).

- 15 Brevemente, las actividades de las caspasas se determinaron mediante la monitorización de la hidrólisis de los sustratos fluorogénicos ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$) en función del tiempo, en presencia de caspasas no tratadas (control) o caspasas que se habían incubado con un compuesto de ensayo, durante 30 min como mínimo a 37 °C usando un lector de microplacas BMG Fluostar (microplacas negras de 96 pocillos) y la velocidad inicial (V_0) se determinó a partir de la porción lineal de la curva de progreso.

20

Los sustratos y compuestos se disolvieron previamente en DMSO a 10 mM, con la concentración final de disolvente mantenida por debajo del 4 % (v/v). V_0 , las velocidades relativas, K_m y la CI_{50} se determinaron a partir de datos experimentales usando los programas informáticos Mars Data Analysis 2.0 y Kaleidagraph.

- 25 Para inhibidores irreversibles como el compuesto 2, la inactivación se puede representar mediante el esquema cinético mínimo, donde E e I son las formas libres de la enzima y el inhibidor, $E \cdot I$ una quimera cinética del complejo de Michaelis y E-I el complejo covalente o enzima inactivada.



30

Se determinaron los parámetros de afinidad de unión del inhibidor (constante de disociación, K_i) y constante de velocidad de primer orden (k_3) para la caspasa-2 y la caspasa-3 usando el método de curva de progreso. La relación k_3/K_i se obtuvo ajustando los datos experimentales a las ecuaciones (U.F., unidad de fluorescencia):

$$U.F. = \int_0^t v_i dt + U.F._0 \frac{-v_0 \times e^{-\pi \cdot t}}{\pi} + U.F._0$$

$$\text{con } \pi = \frac{k_i \times [I]'}{K_i + [I]} \quad \text{y} \quad [I]' = \frac{[I]}{1 + [S]/K_m}$$

35

Se realizaron ajustes de regresión lineal y no lineal de los datos experimentales a las ecuaciones con el software Kaleidagraph.

- 40 Determinación de la relación k_{inact}/K_i para la actividad de la caspasa-2 y la caspasa-3

Se usó un método continuo de determinación de la relación k_{inact}/K_i para evaluar la actividad inhibidora de los compuestos ensayados contra la caspasa-2 y la caspasa-3.

- 45 La mezcla de reacción se prepara dejando incubar la enzima y el tampón a 37 °C.

Los compuestos inhibidores ensayados se preparan a diferentes concentraciones (1/4 de CI_{50} ; 1/2 de CI_{50} ; CI_{50} ; 2 CI_{50} ; 4 CI_{50}) y se colocan en la microplaca.

- 50 A continuación, la mezcla de reacción que comprende la enzima, el tampón y el sustrato se añade rápidamente en los pocillos.

Las actividades de la enzima se miden entre 45 y 60 minutos.

Las curvas de UFR (Unidades de fluorescencia relativa) = f (veces) se trazan para cada concentración de molécula ensayada de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$(((-V_0) * (\exp(-k_{obs} * m_0))) + V_0) / k_{obs} * UFR_0$$

en la que:

- V_0 corresponde a la velocidad inicial ($UFR \cdot s^{-1}$) en la concentración de 0 del compuesto inhibidor ensayado;
- k_{obs} es la constante de la tasa de inactivación;
- UFR_0 es el valor de fluorescencia en $t = 0$ min; y
- m_0 es la variable, es decir, la concentración del inhibidor.

A continuación se realiza el ajuste de la curva $f([I]) = k_{obs}$ en una hipérbola usando el software Kaleigagraph para obtener la relación k_{inact}/K_i en función de la siguiente ecuación:

$$K_{obs} = k_{inact} \times [I] / (K_i \times [I])$$

Para los compuestos, 2, 3, 5 y 6 y $\Delta 2Me-TRP601$, la comparación de las relaciones k_{inact}/K_i así obtenidas respecto a las caspasas 2 y 3 permite apreciar su selectividad.

Inhibidor	Selectividad para la caspasa 2
Compuesto 2	sí
Compuesto 4	sí
Compuesto 5	sí
Compuesto 6	sí
$\Delta 2Me-TRP-601$ (compuesto comparativo)	no

Tabla 1

Los compuestos ensayados son eficaces para inhibir la caspasa-2.

Sin embargo, el compuesto 2 reacciona de forma totalmente diferente a $\Delta 2Me-TRP-601$ con respecto a la caspasa-3 (véase la Tabla 2 a continuación).

	$k_3/K_i (M^{-1} \cdot s^{-1})$		
	Casp2	Casp3	Relación de selectividad (C2/C3)
$\Delta 2Me-TRP-601$	1 586 020	1 613 405	0,98
Compuesto 2 enantiómero a	1 894 076	2 625	721
Compuesto 2 enantiómero b	1 720	ND	+++

ND: No se detectó actividad inhibidora. +++: como no se detecta actividad inhibidora hacia casp3, la selectividad es muy importante (>1000).

Tabla 2

De hecho, el compuesto 2 es mucho más eficiente para inactivar la caspasa-2 que para inactivar la caspasa-3, mientras que $\Delta 2Me-TRP-601$ no exhibe esta selectividad.

En conclusión, el compuesto 2 no solo es eficiente para inhibir la caspasa-2, sino que también es selectivo respecto a la caspasa-2 con respecto a la caspasa-3. Curiosamente, cabe destacar que se observan niveles muy diferentes de inhibición de la caspasa 2 según la configuración (*R* o *S*) del átomo de carbono asimétrico del anillo de pirrolidina unido



a. A continuación, los compuestos de la invención proporcionan inhibidores moderados o fuertes, pero muy específicos, de la caspasa 2 (Tabla 2), lo que es de particular interés.

EJEMPLO 3: Detección de la actividad de las caspasas-2 y 3

Para determinar la eficiencia de un sustrato respecto a una caspasa individual se mide la relación k_{cat}/K_M que representa la eficiencia catalítica, donde k_{cat} (s^{-1}) es la constante catalítica o número de moléculas de sustrato convertidas en producto por unidad de tiempo por cada sitio activo cuando la enzima está saturada y K_M es la constante de Michaelis-Menten que representa la afinidad enzima-sustrato, representa la concentración de sustrato para $v = V_{máx}/2$.

La caspasa-2 (o caspasa-3) se incuba con el inhibidor o el tampón solo, adaptado a la enzima y al complejo de Michaelis-Menten, durante 30 min a 37 °C. La reacción se desencadena, en un volumen total de 100 μ l, cuando se añade la mezcla tampón-sustrato; a continuación, la actividad enzimática se mide durante 20 minutos. La liberación del grupo AMC fluorogénico se detecta usando las siguientes longitudes de onda: $\lambda_{exc} = 360$ nm y $\lambda_{em} = 460$ nm.

Enzimas	Sustratos AMC	k_{cat}/K_M (índice)
Casp-2 (0,1 nM) (62 kDa)	Ac-VDVAC-↓-AMC (25 μ M)	++++
Caspasa-3 (0,5 nM) (60 kDa)	Ac-VDVAD-↓-AMC (10 μ M)	++++
Casp-2 (0,1 nM) (62 kDa)	Compuesto 1 (25 μ M)	++++
Caspasa-3 (0,5 nM) (60 kDa)	Compuesto 1 (10 μ M)	+/-

↓: sitio de escisión de la enzima

Tabla 3

La actividad enzimática se caracteriza por los valores de velocidad inicial (V_i) que se definen a partir de la ecuación 1 (ec. 1), donde $V_{máx}$ es la velocidad a la que la enzima se satura con sustrato, $[S]$ es la concentración de sustrato. La velocidad inicial, expresada aquí en UFR. \min^{-1} , se obtiene experimentalmente a partir del valor de la pendiente en la porción lineal de la representación: $f(\text{tiempo}) = \text{UFR}$, un valor calculado directamente por el software Biolise®.

$$V_i = V_{máx} \times [S] / (K_M + [S]) \quad (\text{ec. 1})$$

La velocidad inicial obtenida para el control (V_0) se considera que es el 100 % de la actividad enzimática. Una inhibición se caracteriza por una actividad, después del tratamiento con el inhibidor, inferior al 100 %. El porcentaje de inhibición se calcula a partir de la ecuación 2 (ec. 2), donde V_0 es la velocidad inicial del control negativo, V_i es la velocidad inicial en presencia del inhibidor.

$$\% \text{ de inhibición} = (1 - (V_0 / V_i)) \times 100 \quad (\text{ec. 2})$$

EJEMPLO 4: Ensayos de inhibición de la caspasa-2 y la caspasa-3 (*in vitro*) para inhibidores reversibles

La eficacia inhibidora de los compuestos de la invención que son inhibidores reversibles de la caspasa-2 y la caspasa-3 se puede evaluar usando el protocolo explicado a continuación. El compuesto 3 es un inhibidor reversible y se ha evaluado en consecuencia.

Una etapa preliminar en la caracterización de un inhibidor es la determinación de su CI_{50} . La CI_{50} es la concentración necesaria de un inhibidor para disminuir la actividad enzimática en un 50 % de su valor máximo y no inhibido.

El compuesto, a diferentes concentraciones, se incuba con la enzima y el tampón durante 30 minutos a 37 °C para permitir la formación del complejo enzima-inhibidor. La reacción se inicia mediante la adición de tampón y sustrato y, a continuación, la actividad se mide durante 15 minutos para la determinación de las velocidades iniciales. El efecto inhibidor del compuesto analizado (en %) en función de su concentración sigue generalmente la ecuación 3 (ec. 3) que traduce una hipérbola. La ecuación se introduce en el software Kaleidagraph, para el ajuste de la curva $f([I]) = \%$

de inhibición, donde [I] es la concentración del inhibidor, a continuación se obtiene la CI_{50} .

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \times [I] / (CI_{50} + [I]) \quad (\text{ec. 3})$$

5 Evaluación de inhibidores reversibles

La reversibilidad de la inhibición se analiza por el método de dilución para Ac-VDVAD-CHO, Ac-DEVD-CHO y el compuesto 3. La enzima y el inhibidor (o DMSO como control) se incuban durante 30 minutos a 37 °C. El complejo formado de este modo se diluye al 100 % en la mezcla tampón/sustrato y a continuación se inicia la medición de la actividad durante 20 minutos. La tasa inicial obtenida para el DMSO representa el 100 % de actividad y servirá como referencia para la cuantificación de la actividad residual de la enzima en presencia del inhibidor.

Para caracterizar los inhibidores reversibles, se determina la constante de disociación K_i . Esta da cuenta de la afinidad del inhibidor por la enzima. Para este fin, el inhibidor compite con el sustrato con respecto al sitio activo de la enzima. Si, después de la dilución, la actividad se restablece a más del 50 %, se dice que el inhibidor es "reversible".

El inhibidor se incuba con la mezcla caspasa-tampón durante 30 minutos a 37 °C a diferentes concentraciones (1/4 de CI_{50} , 1/2 de CI_{50} , CI_{50} , 2 CI_{50} , 4 CI_{50}). La reacción se inicia durante 20 minutos tras la adición de la mezcla tampón-sustrato.

Los valores iniciales de velocidad en $UFR \cdot \min^{-1}$ se reducen a valores de actividad específica (AE) ($\text{pmol}/\min/\mu\text{g}$ de enzima) a partir de un intervalo estándar de AMC ($1 \text{ UFR} \rightarrow 0,02 \text{ pmol}$).

La evolución de la relación $1/SA$ en función de $1/[S]$ permite obtener el denominado gráfico inverso doble de Lineweaver-Burk a partir de la ecuación 4 (ec.4), donde $V_{\text{máx app}}$ y $K_{\text{M app}}$ son los parámetros que varían en función del tipo de inhibición y en función de la concentración de inhibidor. La intersección de las líneas obtenidas para concentraciones crecientes de inhibidor permite distinguir diferentes tipos de inhibidores.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_{\text{M app}}}{V_{\text{máx app}}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{máx app}}} \quad (\text{ec. 4})$$

Un gráfico secundario, obtenido a partir de los valores de las pendientes del gráfico de Lineweaver-Burk en función de la concentración de inhibidor, permite obtener el valor de K_i . Su valor viene dado por el punto de abscisa en el origen.

Las potencias inhibidoras de los compuestos con respecto a la Casp-2 y 3 se cuantifican mediante la determinación de la CI_{50} . Los resultados se presentan en la Tabla 3 (izquierda). Los valores de CI_{50} colocan al compuesto 3 a la cabeza, detrás del compuesto de referencia Ac-VDVAD-CHO ($CI_{50} = 6,9 \text{ nM}$), en términos de eficacia sobre la Casp-2. Además de actuar eficazmente sobre la Casp-2, el compuesto 3 parece ser considerablemente menos potente sobre la caspasa-3 que Ac-VDVAD-CHO ($CI_{50} = 7,23 \text{ nM}$). Por lo tanto, el compuesto 3 es selectivo para la Casp2.

El estudio en profundidad del mecanismo de inhibición se realizó de la siguiente manera.

La velocidad inicial V_0 se expresa a partir de la ecuación 8 (ec. 8), donde $V_{\text{máx}}$ es la velocidad máxima de reacción (alcanzada cuando la enzima está saturada con sustrato), $[S]$ la concentración de sustrato, K_M es la constante de Michaelis-Menten (concentración de sustrato correspondiente a $V_{\text{máx}}/2$), K_i es la constante de disociación que representa la afinidad del inhibidor por la enzima. La K_i permite cuantificar la potencia inhibidora, cuanto menor sea su valor, más fuerte es el inhibidor.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{\text{máx}}} + \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \times K_M}{V_{\text{máx}}} \times \frac{1}{[S]} \quad (\text{ec. 8})$$

La trayectoria secundaria obtenida a partir de los datos del gráfico de Lineweaver-Burk permitió determinar los valores de K_i . Los valores de K_i para los diversos inhibidores, así como los índices de selectividad, se presentan en la Tabla 4 (derecha).

Inhibidores	$CI_{50} \text{ (nM)}$		$K_i \text{ (nM)}$	
	Casp-2	Caspasa-3	Casp-2	Caspasa-3
Ac-VDVAD-CHO	$6,9 \pm 0,6$	$7,23 \pm 0,66$	6,31	7,68
Ac-DEVD-CHO	3907 ± 189	$0,7 \pm 0,03$	3222	0.159

Tabla 4

Inhibidores	Índices de selectividad
	(K_{iCasp3}/K_{iCasp2})
Ac-VDVAD-CHO	1,3
Ac-DEVD-CHO	62×10^{-6}
Compuesto 3	$>>1000$

Tabla 5

Las eficiencias inhibitoras se representan por los valores de CI_{50} para los inhibidores de referencia Ac-DEVD-CHO y Ac-VDVAD-CHO, así como los derivados de Ac-VDVAD-CHO de la variante P₂ (Tabla 4). La cuantificación de la inhibición viene dada por los valores de las constantes K_i que representan la afinidad del inhibidor por la enzima. Un valor bajo indica un inhibidor potente sobre su diana. Las relaciones de las constantes permiten cuantificar la selectividad (Tabla 5), cuanto mayor sea la relación, más selectivo es el inhibidor de la Casp-2.

Los valores de K_i confirman y complementan la información proporcionada por los datos de CI_{50} . Por lo tanto, el compuesto 3 es un inhibidor que sigue siendo potente sobre la Casp-2 con una selectividad respecto a esta última marcadamente aumentada en comparación con Ac-VDVAD-CHO (Tabla 5).

EJEMPLO 5: Ensayo de protección frente a la muerte celular

En este ejemplo, se ensaya el efecto protector del compuesto 2 de la invención frente a la muerte celular inducida por vincristina (un alcaloide de la vinca) usando un conocido ensayo de muerte celular por citometría de flujo basado en la tinción con yoduro de propidio.

a. Modelo celular

Para evaluar el efecto protector de los compuestos 2 y 3, se usa un modelo celular dependiente de caspasa.

En este modelo se usan células HeLa humanas. Las células HeLa (línea celular de cáncer de cuello del útero) se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, alto contenido de glucosa, GlutaMAX™, piruvato) (Gibco, Life Technologies), complementado con FCS al 10 % y antibióticos (Gibco, Life Technologies).

Las células HeLa humanas se tratan con una solución de vincristina (Sigma Aldrich) (diluida en agua a 5 mM). La vincristina actúa en parte uniéndose a la proteína tubulina, impidiendo que la célula separe sus cromosomas durante la metafase; a continuación, la célula experimenta apoptosis a través de un proceso dependiente de caspasa.

Se usa yoduro de propidio (PI) (Sigma Aldrich) para evaluar la permeabilización de la membrana plasmática, un signo de muerte celular.

b. Condiciones de tratamiento y marcaje

24 horas antes del tratamiento farmacológico, las células HeLa se colocaron en placas de 24 pocillos. A continuación, se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron con PBS y se añadió medio fresco que contenía el compuesto 2 o 3 a diferentes concentraciones 1 hora antes de la adición de vincristina. Las células se expusieron o no (control), a vincristina 20 nM durante 48 horas.

Se recoge el contenido de cada pocillo, se añade a PBS y a continuación se centrifuga (900 rpm; 5 min).

El sedimento obtenido se pone en 300 µl de un medio que comprende yoduro de propidio y se incuba (37 °C, CO₂ al 5 %) en la oscuridad durante 5 minutos y a continuación se somete a análisis por citometría de flujo.

c. Análisis de células

A continuación, las células se analizan mediante citometría de flujo con una excitación de 561 nm.

Se realizó una clasificación celular activada por fluorescencia usando un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Para cada muestra, se registraron los datos de 5000 células y se analizaron con el software CellQuest Pro™ (Becton Dickinson). El análisis incluyó los parámetros FSC (dispersión frontal/relacionado con el tamaño de las células) y SSC (dispersión lateral/relacionado con la granularidad de las células) junto con los canales FL-1 y FL-3.

Composición	Índice de muerte celular
Compuesto 2 y vincristina	++
Compuesto 3 y vincristina	++
Vincristina sola	++++

El número de "+" es indicativo de la mortalidad celular medida en el ensayo. Cuanto mayor sea el número de "+" representado, mayor será la mortalidad celular medida en el ensayo.

Tabla 6

- 5 El porcentaje de células positivas al yoduro de propidio permite estimar la muerte celular.

La composición de control, que no contiene vincristina ni inhibidor, permite estimar la cantidad de células que murieron de forma natural.

- 10 La composición que contiene vincristina pero no inhibidor proporciona el número total de células muertas que corresponde a la suma de células muertas de forma natural y de células apoptóticas inducidas por vincristina.

Los inventores observan claramente que los compuestos 2 y 3 protegen a las células contra la muerte apoptótica inducida por vincristina de manera dependiente de la dosis.

15

EJEMPLO 6: Protección contra la neurotoxicidad por beta-amiloide

a) Cultivos neuronales primarios

- 20 Se microdiseccciona el hipocampo de embriones E16 de ratones C57B16/J wt (Rene Janvier, Francia) en solución salina equilibrada de Gey (GBSS, Sigma) fría complementada con glucosa al 0,1 % (Life Technologies).

- 25 Las estructuras diseccionadas se digieren con papaína (20 U/ml en DMEM, Sigma; St. Louis, MO, EE. UU.) y se disocian mecánicamente en presencia de DNasa. A continuación, las células del hipocampo se aclaran y se suspenden de nuevo en DMEM (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, EE. UU.) a una densidad final de 18 millones de células/ml en Neurobasal (Life Technologies) y Glutamax (Life Technologies) al 0,1 % complementado con B27 (1/50) y penicilina/estreptomycin al 1 % (Gibco).

- 30 A continuación, esta suspensión celular se usa para llenar los depósitos de las cámaras de microfluído, como se describe (Peyrin et al, 2011 Lab Chips 11(21):3663; Deleglise et al., 2014 Acta Neuropathologica Comm. 2: 145). Los chips de microfluído se colocan en placas de Petri de plástico que contienen H₂O-EDTA para evitar la evaporación y se incuban a 37 °C en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5 %. El medio de cultivo se renueva cada siete días.

- 35 b) Preparación de oligómeros de péptidos A β

La forma oligomérica de A β ₁₋₄₂ (Tocris Bioscience, MN, EE. UU.), se produce de acuerdo con Stine WB et al. (2003) en J Biol Chem 278, págs. 11612-11622 y se puede controlar mediante microscopía electrónica como en Deleglise B et al. en Acta Neuropathol Commun. 2014;2: 145).

- 40 Brevemente, los péptidos liofilizados de A β ₁₋₄₂ se solubilizan a 1 mM en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP, Sigma Aldrich). Después de 30 min de incubación a TA, el HFIP se evapora durante 12 h bajo una campana química y los péptidos se desecan durante 1 h (con un Speed Vac a 4 °C). A continuación, se obtienen soluciones madre de péptidos A β de 5 mM mediante resolubilización en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich). Para obtener oligómeros, la solución madre de péptidos A β se diluye en medio DMEM-F12 frío sin fenol (Life Technologies) hasta una concentración final de 100 μ M. A continuación, la solución se incuba 24 h a 4 °C. La fracción de oligómeros A β solubles se recoge del sobrenadante después de una etapa de centrifugación a 20.000 g (10 min; 4 °C) y se almacena a -80 °C hasta su uso.

- 50 c) Ensayo de toxicidad

Después de 18 días de cultivo en cámaras de microfluído, las células del hipocampo se incuban previamente durante 1 h con compuestos de la invención previamente diluidos en medio DMEM-F12 sin fenol o en medio DMEM-F12 sin fenol solo como solución de control. A continuación, las células se intoxican durante 3 h a 6 h o 24 h con 10 o 100 nm de oligómeros de A β ₁₋₄₂ (o con medio DMEM-F12 sin fenol solo como solución de control). Después de la etapa de intoxicación, las células se fijan en paraformaldehído al 4 % (PFA, Sigma; St. Louis, MO, EE. UU.) durante 20 min a TA y se marcan como se explica a continuación para evaluar el estado de las sinapsis, la muerte celular o la degeneración axonal.

- 55 d) Inmunofluorescencia

Brevemente, después de la etapa de fijación, las células de cultivo se lavan dos veces con PBS + Azida al 0,1 % durante 5 min y se permeabilizan durante 10 min con Triton X-100 al 0,2 % y BSA (albúmina de suero bovino, Sigma) al 0,1% en PBS + Azida al 0,1 %. A continuación, la etapa de saturación se realiza incubando las células durante 30 min en PBS + Azida al 0,1 % + BSA al 1 %. A continuación, se añaden los anticuerpos primarios y las muestras se incuban a 4 °C durante una noche en PBS. Posteriormente, las muestras se aclaran dos veces durante 5 min con PBS + Azida al 0,1 % y se incuban adicionalmente con el anticuerpo secundario correspondiente junto con faloidina conjugada con Alexa Fluor 555 durante 2 h a TA. A continuación, los chips se aclararon dos veces con PBS + Azida al 0,1 %.

Se usan los siguientes anticuerpos: anti MAP-2 policlonal de conejo (AB5622; 1/400, MILLIPORE), anti Bassoon monoclonal de ratón SAP7F407; 1:400, Enzo LifeSciences). Se usan anticuerpos secundarios específicos de la especie acoplados a Alexa 350, 488 o 500 (1/500, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, EE. UU.). Se usa faloidina conjugada con Alexa Fluor 555 (1/500, EnzoLifeTechnologies) para teñir la F-actina.

e) Adquisición de imágenes

Las imágenes se adquieren con un Axio-observer Z1 (Zeiss, Alemania) equipado con una cámara CCD refrigerada (CoolsnapHQ2, Roper Scientific). El microscopio se controla con el software Metamorph y Micro-manager. Las imágenes se analizaron usando el software ImageJ.

f) Resultados

En las células intoxicadas con A β , pero no tratadas previamente con compuestos de la invención, se observa una marcada disminución en el marcaje anti Bassoon tan pronto como 6 h de intoxicación en comparación con las muestras no intoxicadas. Esta pérdida de espinas dendríticas en neuronas hipocampales de ratones proporciona evidencia de neurodegeneración debido a la sinaptotoxicidad de A β y da como resultado la marcada disminución en el número de sinapsis (casi el 50 %, figura 1). Además, 24 horas después del tratamiento con A β , se observa degeneración axonal en neuronas hipocampales que no han sido tratadas previamente con compuestos de la invención. Se ha encontrado que los compuestos de la invención son eficaces para proteger a las células hipocampales de la muerte celular inducida por A β , la degeneración axonal inducida por A β , la disfunción electrofisiológica inducida por A β y/o la pérdida de sinapsis inducida por A β (Tabla 7 y figura 1).

Composición	Efecto protector contra la toxicidad de A β
Compuesto 2	+
Compuesto 3	+
Compuesto 4	+
Compuesto 5	+
Compuesto 6	+
A β solo	-

Tabla 7

+: Protección significativa contra la muerte celular inducida por A β , la degeneración axonal inducida por A β , la disfunción electrofisiológica inducida por A β y/o la pérdida de sinapsis inducida por A β .

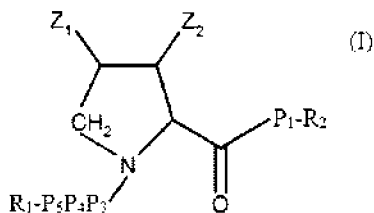
Estos experimentos proporcionan evidencias de que los compuestos de la invención, que son capaces de modular la actividad de la caspasa-2 (Tablas 1 y 5), son eficientes para tratar o prevenir la aparición de trastornos asociados con la neurotoxicidad de A β .

Conclusión:

Por lo tanto, los compuestos de la invención son compuestos valiosos para el tratamiento de enfermedades asociadas con la muerte o disfunción celular mediada por la actividad de la caspasa-2. Más particularmente, se ha encontrado que son eficientes en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (EA), siendo conocida la sinaptotoxicidad de A β por desempeñar un papel importante en la fisiopatología de esta enfermedad. Además, se sabe en la técnica que la caspasa 2 media en la escisión de tau que genera Δ tau314, que se encuentra implicada en el deterioro cognitivo en la EA, lo que hace que los compuestos de la invención sean compuestos valiosos para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades que implican toxicidad por tau y/o A β .

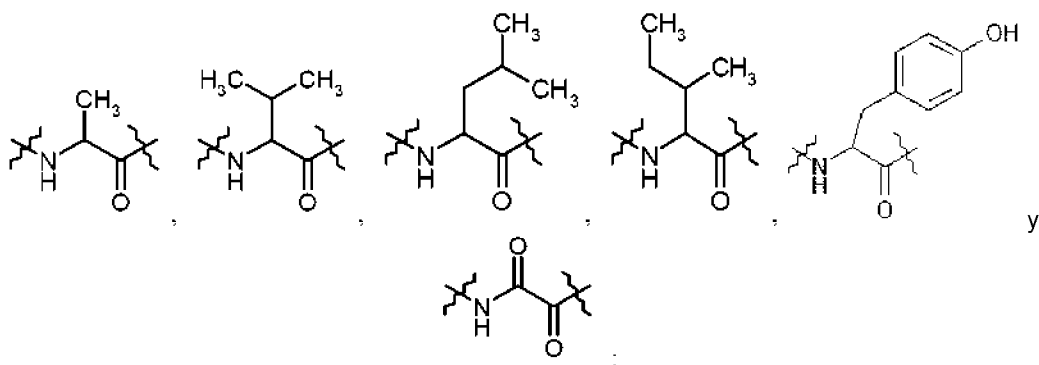
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):

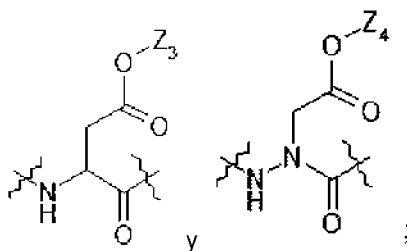


en la que:

- Z_1 y Z_2 , idénticos o diferentes, se seleccionan de un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo (C_1-C_6) y un grupo alcoxi (C_1-C_6);
- P_5 se selecciona de los siguientes residuos de aminoácidos o estructuras similares a aminoácidos:

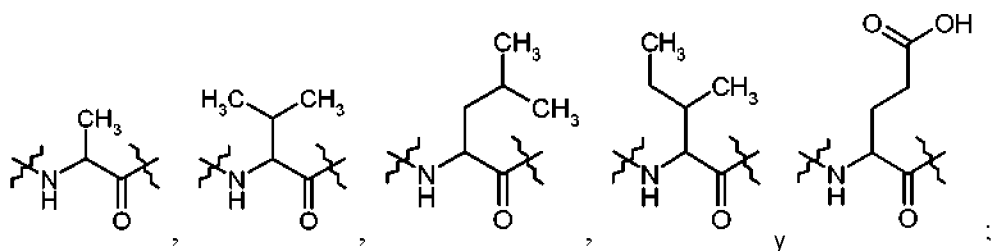


- P_1 y P_4 , idénticos o diferentes, se seleccionan de las siguientes estructuras similares a aminoácidos:

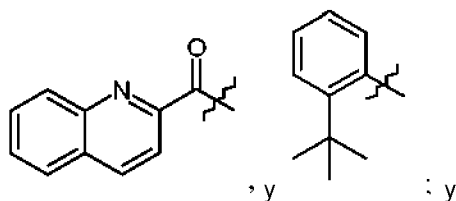


en las que Z_3 y Z_4 , idénticos o diferentes, se seleccionan de un átomo de hidrógeno y un grupo alquilo (C_1-C_6);

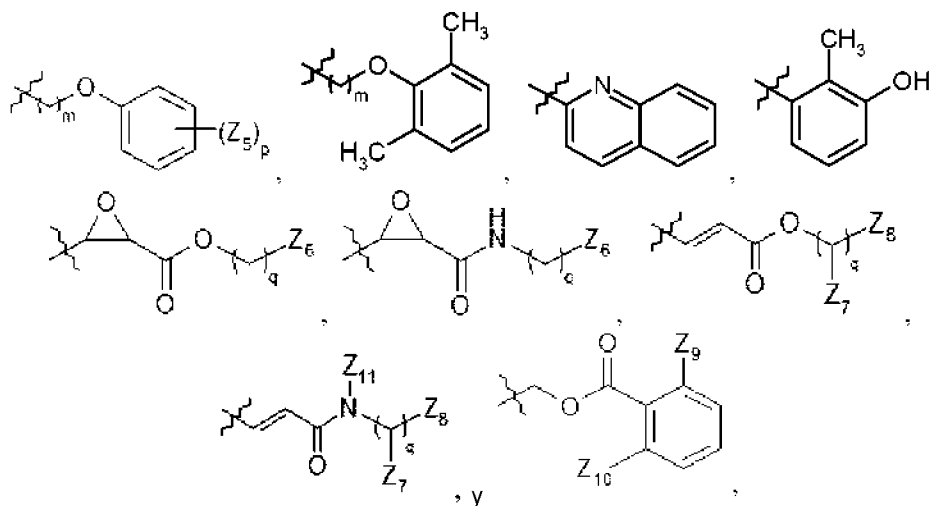
- P_3 se selecciona de los siguientes residuos de aminoácidos:



- R_1 se selecciona de:



R₂ se selecciona de:



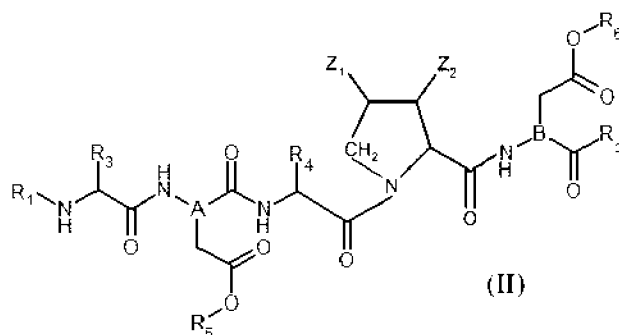
en las que:

- 10 • m es 0, 1 o 2;
- p es 1, 2, 3 o 4;
- 15 • Z₅ es un átomo de halógeno;
- q es 0 o 1;
- Z₆, se selecciona de un grupo alquilo (C₁-C₆) y un grupo fenilo, estando dicho grupo fenilo opcionalmente sustituido por un grupo amino;
- 20 • Z₇, Z₈ y Z₁₁, idénticos o diferentes, se seleccionan de un átomo de hidrógeno, un alquilo (C₁-C₄), un tetrahidroquinolinilo y un grupo -(CH₂)_i-arilo, siendo i 0, 1 o 2, estando dicho grupo arilo opcionalmente sustituido por uno, dos, tres o cuatro átomos de halógeno o un grupo alquilo (C₁-C₄); y
- 25 • Z₉ y Z₁₀, idénticos o diferentes, se seleccionan de un átomo de halógeno y un grupo alquilo (C₁-C₆);

o una de sus sales;

estando dicho compuesto de fórmula (I) en todas las formas isoméricas racémicas, enantioméricas y diastereoisoméricas posibles.

2. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 de fórmula (II):



en donde:

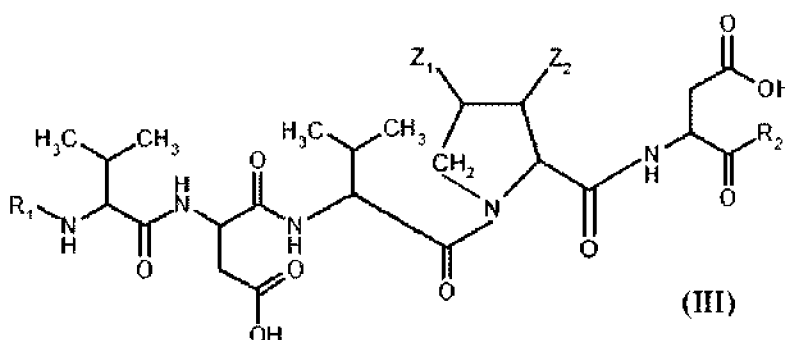
- 5 - R_1 y R_2 son como se definen en la fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1;
- Z_1 y Z_2 son como se definen en la fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1;
- 10 - R_3 se selecciona de un grupo $-CH_3$, un grupo $-CH(CH_3)_2$, un grupo $-CH_2CH(CH_3)_2$, un grupo $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ y un grupo 4-hidroxifenilo;
- A y B, idénticos o diferentes, se seleccionan de un átomo de nitrógeno y un grupo $-CH-$;
- 15 - R_5 y R_6 , idénticos o diferentes, se seleccionan de un átomo de hidrógeno y un grupo alquilo (C_1-C_6); y
- R_4 se selecciona de un grupo $-CH_3$, un grupo $-CH(CH_3)_2$, un grupo $-CH_2CH(CH_3)_2$, un grupo $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ y un grupo $-(CH_2)_2CO_2H$;

o una de sus sales;

estando dicho compuesto de fórmula (II) en todas las formas isoméricas racémicas, enantioméricas y diastereoisoméricas posibles.

3. Compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la reivindicación 2, en donde al menos uno de A y B es un grupo $-CH$, preferentemente A y B son grupos $-CH$.

4. Compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores de fórmula (III):

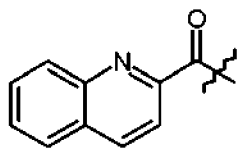


en donde R_1 y R_2 son como se definen en la fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1;

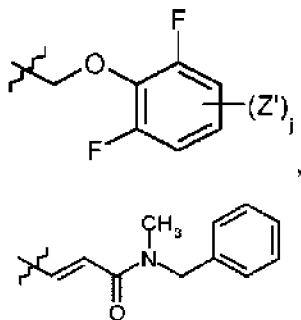
o una de sus sales;

estando dicho compuesto de fórmula (III) en todas las formas isoméricas racémicas, enantioméricas y diastereoisoméricas posibles.

5. Compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde R_1 es:



6. Compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde R_2 se selecciona de:

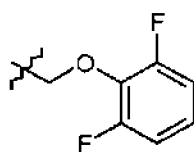


5

en las que Z' es un átomo de flúor y j es 0, 1 o 2;

y preferentemente R_2 es:

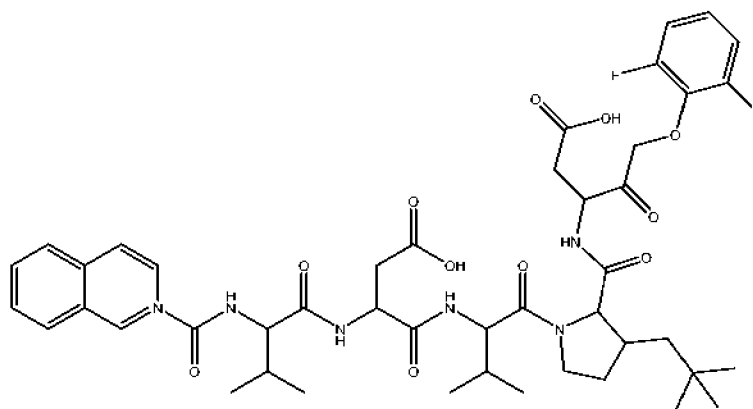
10



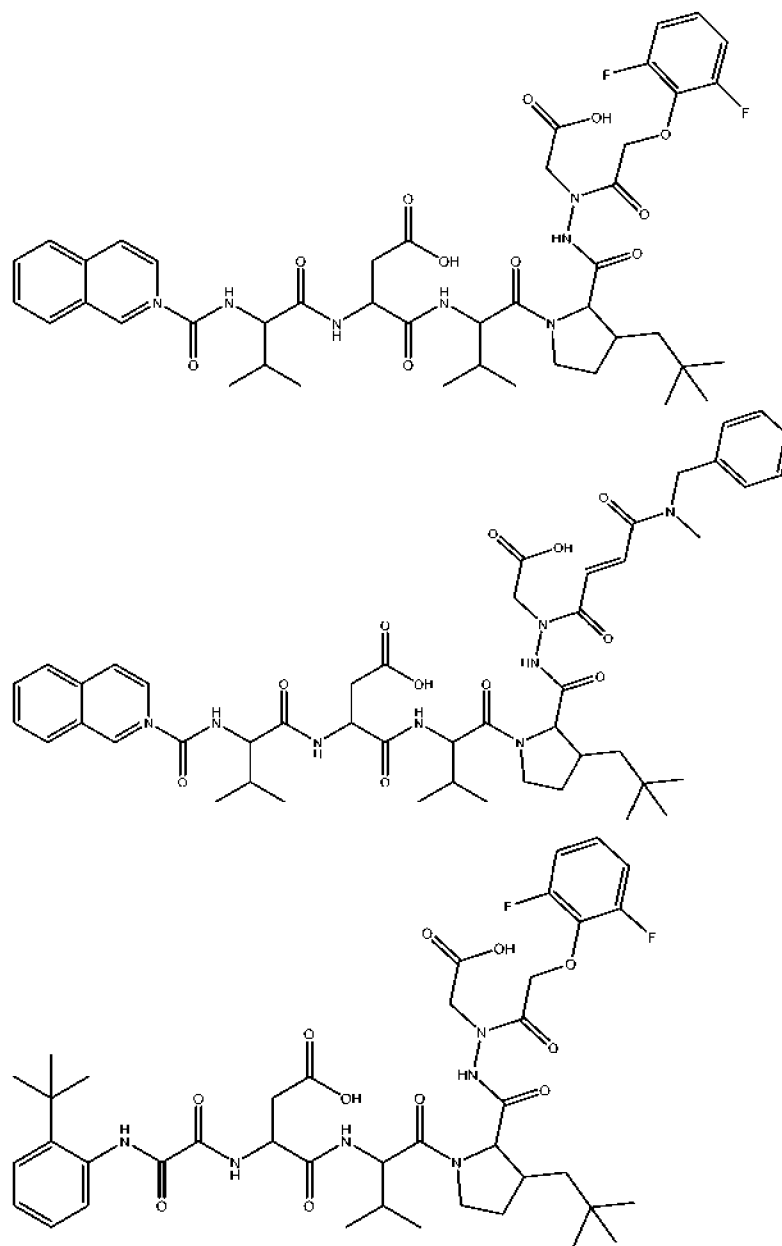
7. Compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que tiene al menos uno, preferentemente al menos tres átomos de carbono asimétricos de configuración (S), y más preferentemente todos los átomos de carbono asimétricos de configuración (S).

15

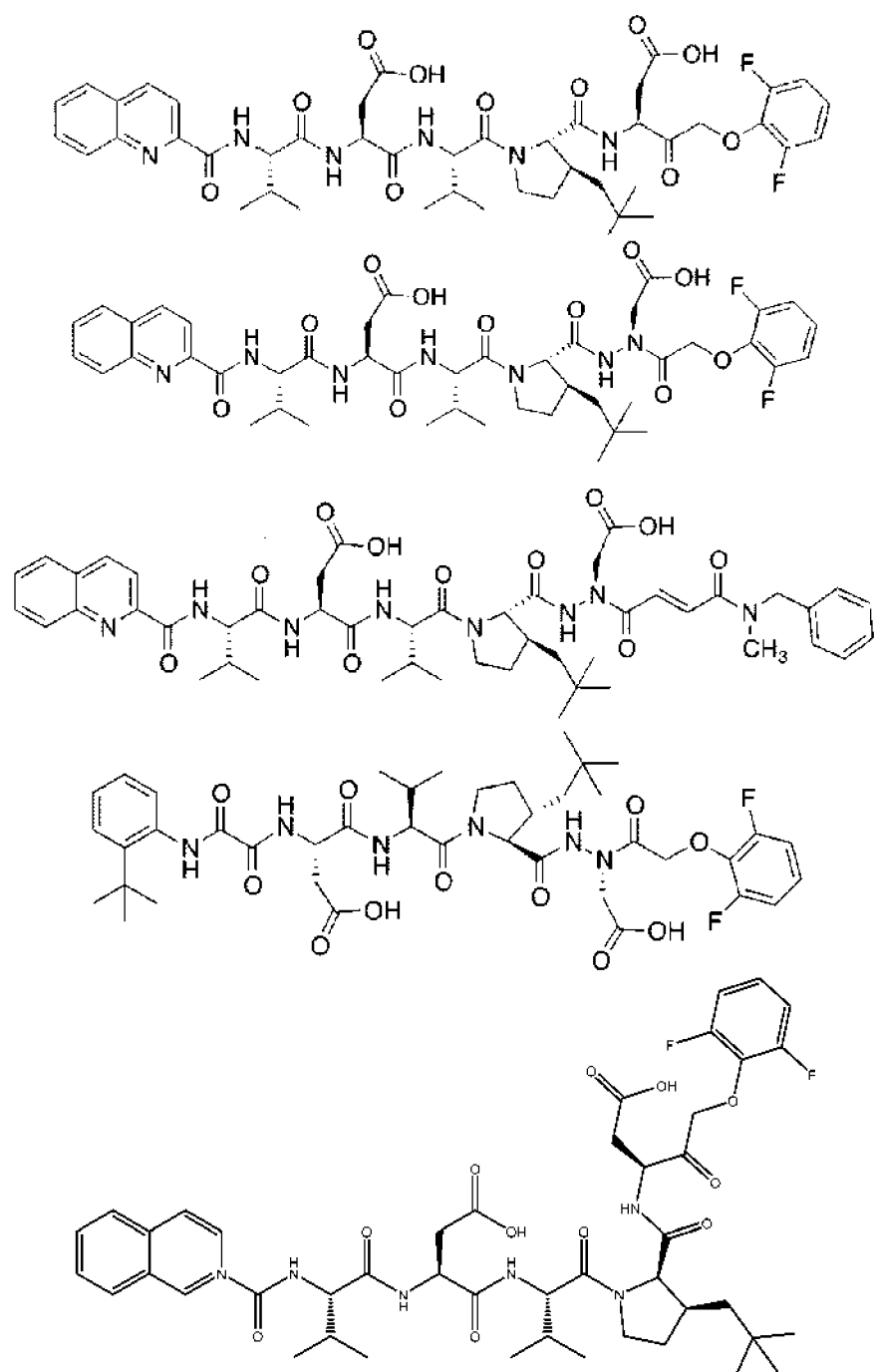
8. Compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, seleccionado de:

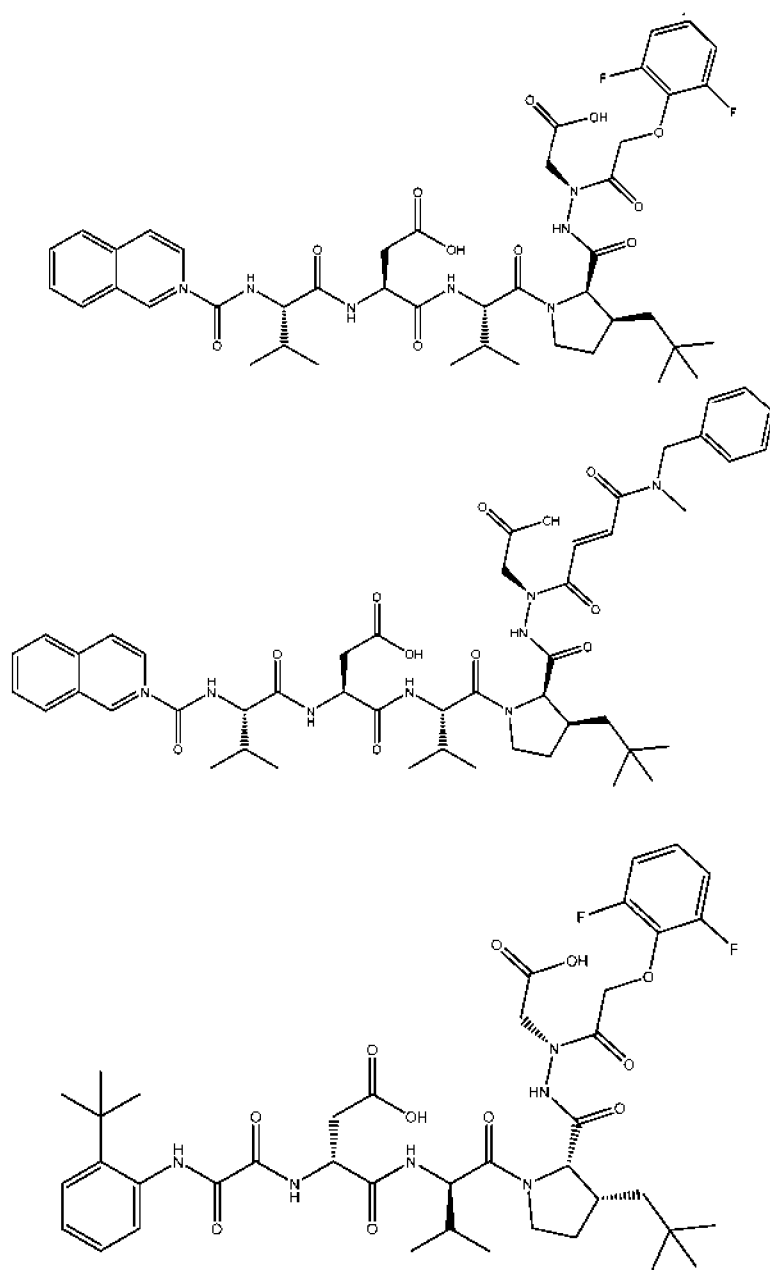


20

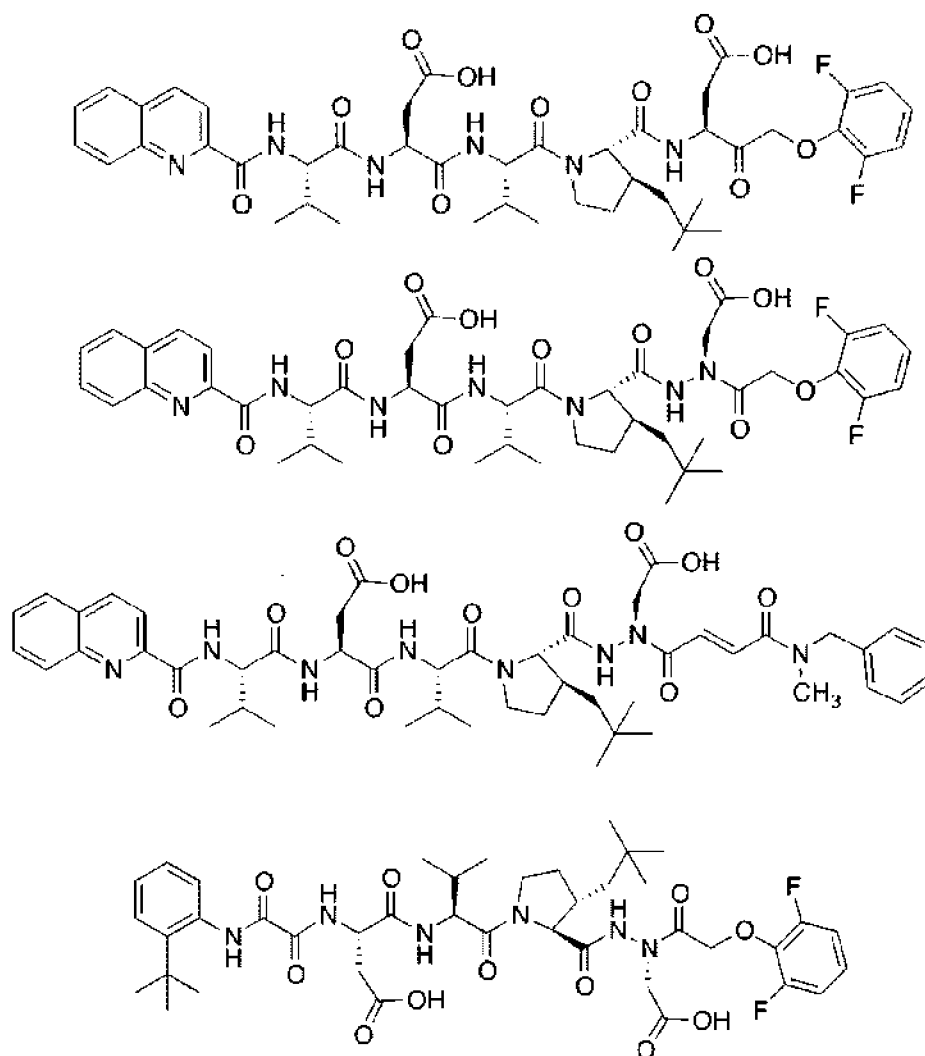


9. Compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, seleccionado de:





5 10. Compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, seleccionado de:

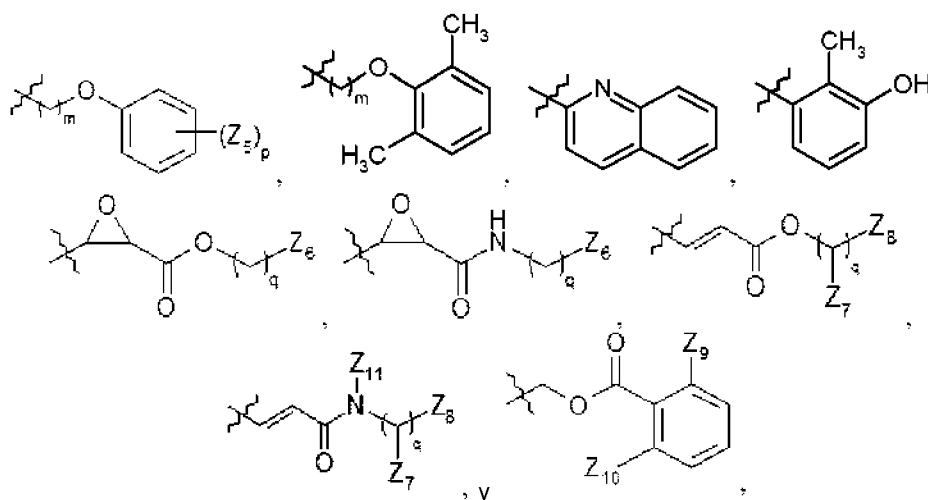


y

5 11. Compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso como inhibidor selectivo de la caspasa-2.

12. Composición farmacéutica, que comprende al menos un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde R_2 se selecciona de:

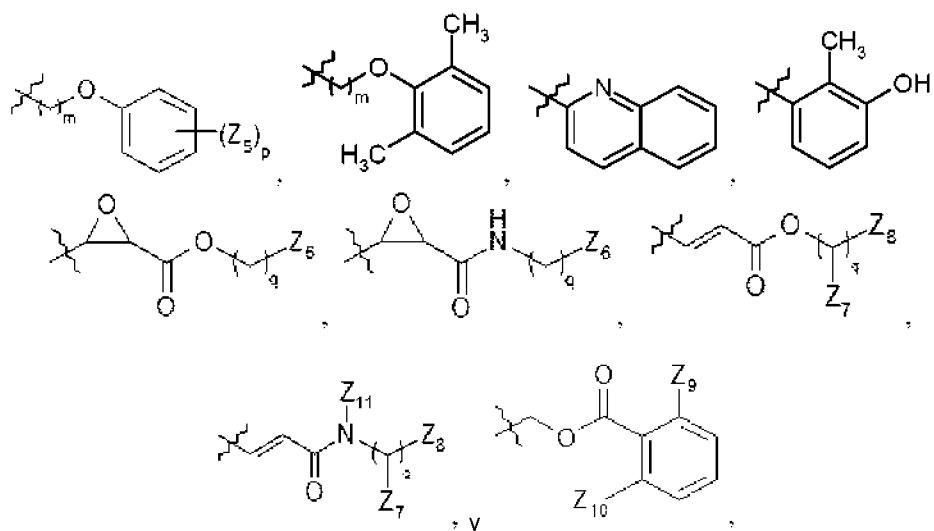
10



en las que m, p, q, Z_5 , Z_6 , Z_7 , Z_8 , Z_9 , Z_{10} y Z_{11} son como se definen en la fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación

1.

13. Compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso como medicamento,

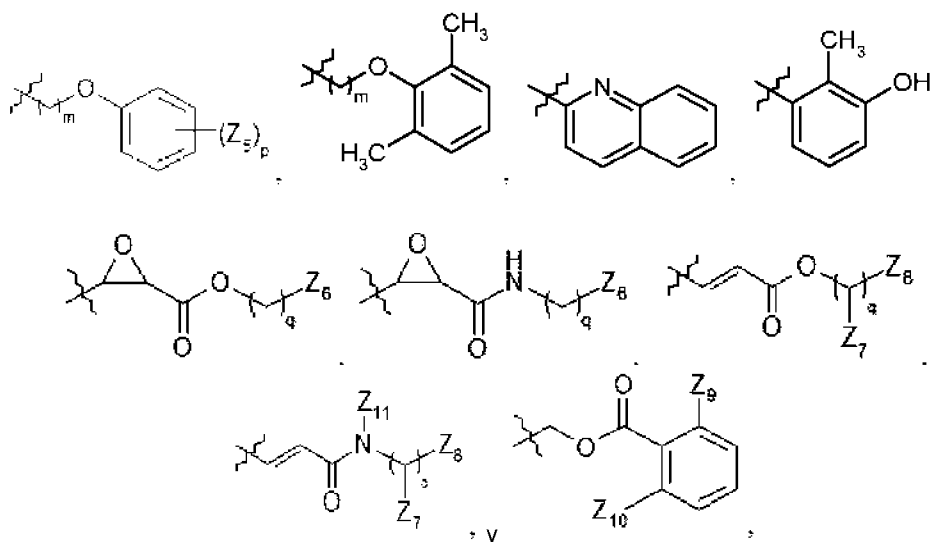
5 en donde R_2 se selecciona de:

10

en las que m, p, q, Z_5 , Z_6 , Z_7 , Z_8 , Z_9 , Z_{10} y Z_{11} son como se definen en la fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1.

14. Compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso en la prevención y/o

15 tratamiento de enfermedades y/o lesiones en las que está implicada la actividad de la caspasa-2,

en donde R_2 se selecciona de:

20

en las que m, p, q, Z_5 , Z_6 , Z_7 , Z_8 , Z_9 , Z_{10} y Z_{11} son como se definen en la fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1.

25

15. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 14 en la prevención y/o tratamiento de patologías con muerte celular, particularmente en enfermedades degenerativas crónicas tales como enfermedad de Alzheimer u otras tauopatías, enfermedad de Huntington y enfermedad de Parkinson; daño cerebral neonatal, en particular isquemia cerebral neonatal; traumatismo craneoencefálico; isquemia renal; lesiones por hipoxia-isquemia (H-I); lesiones cerebrales en situaciones similares a accidentes cerebrovasculares; isquemia cardíaca; infarto de miocardio; esclerosis lateral amiotrófica (ELA); daños retinianos; enfermedades oftálmicas, tales como traumatismo ocular cerrado, neuropatía óptica isquémica y glaucoma; daños cutáneos; enfermedades inflamatorias estériles, tales como

30

- diabetes, aterosclerosis, isquemia cardíaca, gota, pseudogota, aflojamiento articular, aterosclerosis, síndromes desencadenados por sales de aluminio, neuropatía óptica isquémica no arterítica (NAION), glaucoma y enfermedades metabólicas; enfermedades inflamatorias no estériles, tales como infecciones bacterianas, en particular, con bacterias productoras de toxinas formadoras de poros, infección por el virus de la gripe e infección por *Rhabdoviridae* de ARN monocatenario (mc), tal como el virus Maraba o el virus de la estomatitis vesicular (VSV); enfermedades causadas por bacterias patógenas, tales como *Brucella*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella*; dislipidemias; obesidad; síndrome metabólico; y esteatosis hepática no alcohólica.
- 5
16. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de
- 10 Alzheimer.
17. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en la protección de células neuronales frente a la disfunción o toxicidad inducida por A β , más particularmente frente a la muerte celular inducida por A β , la degeneración axonal inducida por A β y/o la pérdida de sinapsis inducida por A β .

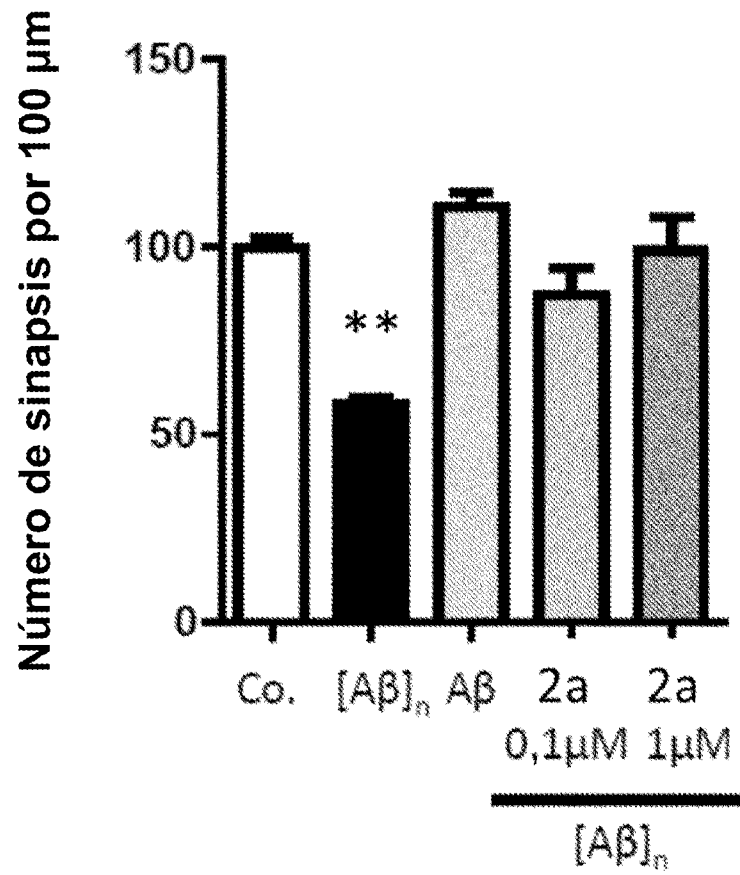


Figura 1