



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 354 249**

51 Int. Cl.:
A61K 31/33 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01986053 .5**

96 Fecha de presentación : **30.11.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1339402**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.09.2003**

54

Título: **Derivados de azafenantridona y su uso como inhibidores de PARP.**

30

Prioridad: **01.12.2000 US 250132 P**
07.08.2001 US 310274 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.03.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.03.2011

73

Titular/es: **EISAI Inc.**
100 Tice Boulevard
Woodcliff Lake, New Jersey 07677, US

72

Inventor/es: **Zhang, Jie;**
Kalish, Vincent, J.;
Li, Jia-He y
Ferraris, Dana, V.

74

Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

ES 2 354 249 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

Derivados de azafenantridona y su uso como inhibidores de PARP.

5 La presente invención se refiere a inhibidores de la enzima nuclear poli(adenosin-5'-difosfo-ribosa) polimerasa [“poli(ADP-ribosa) polimerasa” o “PARP”, que también se denomina ADPRT (NAD:proteína (ADP-ribosil-transferasa (polimerizante)) y PARS (poli(ADP-ribosa) sintetasa) y proporciona compuestos y composiciones que contienen los compuestos dados a conocer. Además, la presente invención proporciona métodos de uso de los inhibidores de PARP dados a conocer para prevenir y/o tratar el daño tisular que resulta de la muerte o el daño celular debido a
 10 necrosis o apoptosis; daño tisular neural que resulta de, por ejemplo, lesión por isquemia y reperfusión, tal como ictus isquémico cerebral, traumatismo craneal o lesión de la médula espinal; trastornos neurológicos y enfermedades neurodegenerativas, tales como, por ejemplo, enfermedades de Alzheimer o Parkinson y esclerosis múltiple; para prevenir o tratar ictus vascular; para tratar o prevenir trastornos cardiovasculares, tales como, por ejemplo, infarto de miocardio; para tratar varios estados y/o trastornos tales como, por ejemplo, degeneración muscular relacionada con la edad, SIDA y otras enfermedades de senescencia inmunitaria, inflamación, artritis, gota, aterosclerosis, caquexia, cáncer, enfermedades degenerativas del músculo esquelético que implican senescencia replicativa, diabetes (tal como diabetes mellitus), trastornos inflamatorios del intestino (tales como colitis y enfermedad de Crohn), pancreatitis aguda, mucositis, choque hemorrágico, choque por oclusión de la arteria esplácnica, insuficiencia multiorgánica (tal como la que implica cualquiera de los sistemas del riñón, hígado, renal, pulmonar, retiniano, pancreático y/o músculo esquelético), tiroiditis autoinmunitaria aguda, distrofia muscular, artrosis, osteoporosis, dolor agudo y crónico (tal como dolor neuropático), insuficiencia renal, isquemia retiniana, choque septicémico (tal como choque endotóxico), disfunción celular endotelial local y/o remota (tales se reconocen mediante respuestas relajantes dependientes de endotelio y regulación por incremento de moléculas de adhesión), inflamación y envejecimiento de la piel; para extender el tiempo de vida y la capacidad proliferativa de las células, tal como, por ejemplo, como mediadores generales en la generación de compuestos oxidantes, mediadores proinflamatorios y/o citocinas, y mediadores generales de la infiltración de leucocitos, sobrecarga de iones calcio, peroxidación de fosfolípidos, metabolismo de óxido nítrico alterado y/o producción de ATP reducida; para alterar la expresión génica de células senescentes; o para radiosensibilizar células tumorales hipóxicas.

30 PARP (EC 2.4.2.30), también conocida como PARS (para poli(ADP-ribosa) sintetasa), o ADPRT (para NAD: proteína (ADP-ribosil) transferasa (polimerizante)) es una proteína nuclear principal de 116 kDa. Está presente principalmente en casi todos los eucariotas. La enzima sintetiza poli(ADP-ribosa), un polímero ramificado que puede consistir en más de 200 unidades de ADP-ribosa a partir de NAD. Los aceptores proteicos de poli(ADP-ribosa) están implicados directa o indirectamente en el mantenimiento de la integridad del ADN. Incluyen histonas, topoisomerasas, ADN y ARN polimerasas, ADN ligasas y endonucleasas dependientes de Ca^{2+} y Mg^{2+} . La proteína PARP se expresa a un alto nivel en muchos tejidos, lo más notablemente en el sistema inmunitario, corazón, cerebro y células de la línea germinal. En condiciones fisiológicas normales, existe una actividad PARP mínima. Sin embargo, el daño del ADN provoca una activación inmediata de PARP en hasta 500 veces. Entre las muchas funciones atribuidas a PARP está su papel principal en la facilitación de la reparación del ADN mediante ADP-ribosilación y por tanto la coordinación de varias proteínas para la reparación del ADN. Como resultado de la activación de PARP, los niveles de NAD disminuyen significativamente. Aunque se ha demostrado que muchos agentes endógenos y exógenos dañan el ADN y activan PARP, el peroxinitrito, formado a partir de una combinación de óxido nítrico (NO) y superóxido, parece que es un autor principal responsable de diversos estados patológicos notificados *in vivo*, por ejemplo, durante choque, ictus e inflamación.

45 La extensa activación de PARP conduce a un grave agotamiento de NAD en células que padecen daño masivo del ADN. La corta vida de la poli(ADP-ribosa) (semivida < 1 min.) da como resultado una tasa de recambio rápida. Una vez que se forma la poli(ADP-ribosa), se degrada rápidamente por la poli(ADP-ribosa) glicohidrolasa (PARG) activa constitutivamente, junto con fosfodiesterasa y (ADP-ribosa) proteína liasa. PARP y PARG forman un ciclo que convierte una gran cantidad de NAD en ADP-ribosa. En menos de una hora, la sobreestimulación de PARP puede provocar una caída de NAD y ATP hasta menos del 20% del nivel normal. Un escenario de este tipo es especialmente perjudicial durante la isquemia cuando la privación de oxígeno ya ha comprometido drásticamente la producción de energía celular. Se supone que la posterior producción de radicales libres durante la reperfusión es una causa principal de daño tisular. Parte de la caída de ATP, que es típica en muchos órganos durante la isquemia y reperfusión, puede estar ligada al agotamiento de NAD debido al recambio de poli(ADP-ribosa). Por tanto, se espera que la inhibición de PARP o PARG conserve el nivel de energía celular para potenciar la supervivencia de tejidos isquémicos tras el ataque.

60 La síntesis de poli(ADP-ribosa) también está implicada en la expresión inducida de varios genes esenciales para la respuesta inflamatoria. Los inhibidores de PARP suprimen la producción de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en macrófagos, selectina de tipo P y molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) en células endoteliales. Tal actividad subyace a los fuertes efectos antiinflamatorios mostrados por los inhibidores de PARP. La inhibición de PARP puede reducir la necrosis impidiendo la translocación e infiltración de neutrófilos en los tejidos lesionados. (Zhang, J. “PARP inhibition: a novel approach to treat ischaemia/reperfusion and inflammation-related injuries”, capítulo 10 en *Emerging Drugs* (1999) 4: 209-221 Ashley Publications Ltd., y referencias citadas en el mismo).

65 Los fragmentos de ADN dañado activan la producción de PARP la cual, una vez activada, cataliza la unión de hasta 100 unidades de ADP-ribosa a una variedad de proteínas nucleares, incluyendo histonas y la propia PARP.

Durante tensiones celulares importantes, la extensa activación de PARP puede conducir rápidamente a muerte o daño celular a través del agotamiento de las reservas de energía. Puesto que se consumen cuatro moléculas de ATP por cada molécula de NAD (la fuente de ADP-ribosa y el sustrato de PARP) regenerada, se agota el NAD por una activación de PARP masiva y, en los esfuerzos para volver a sintetizar NAD, también puede agotarse el ATP.

Se ha notificado que la activación de PARP desempeña un papel clave en la neurotoxicidad inducida tanto por NMDA como por NO. Esto se ha demostrado en cultivos corticales y en cortes de hipocampo en los que la prevención de la toxicidad se correlaciona directamente con la potencia de la inhibición de PARP (Zhang *et al.*, “Nitric Oxide Activation of Poly(ADP-Ribose) Synthetase in Neurotoxicity”, *Science*, 263: 687-89 (1994) y Wallis *et al.* “Neuroprotection Against Nitric Oxide Injury with Inhibitors of ADP-Ribosylation”, *NeuroReport*, 5:3, 245-48 (1993)). Por tanto, se ha reconocido el posible papel de los inhibidores de PARP en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y traumatismo craneal incluso si el mecanismo de acción exacto todavía no se ha aclarado (Endres *et al.*, “Ischemic Brain Injury is Mediated by the Activation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase”, *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 17: 1143-51 (1997) y Wallis *et al.*, “Traumatic Neuroprotection with Inhibitors of Nitric Oxide and ADP-Ribosylation”, *Brain Res.*, 710: 169-77 (1996)).

De manera similar, se ha demostrado que inyecciones únicas de los inhibidores de PARP han reducido el tamaño de infarto provocado por la isquemia y reperfusión del corazón o músculo esquelético en conejos. En estos estudios, una única inyección de 3-amino-benzamida (10 mg/kg), o bien un minuto antes de la oclusión o bien un minuto antes de la reperfusión, provocó reducciones similares en el tamaño de infarto en el corazón (32-42%) mientras que 1,5-dihidroxiisouquinolina (1 mg/kg), otro inhibidor de PARP, redujo el tamaño de infarto en un grado comparable (38-48%). Thiemermann *et al.*, “Inhibition of the Activity of Poly(ADP Ribose) Synthetase Reduces Ischemia-Reperfusion Injury in the Heart and Skeletal Muscle”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 679-83 (1997). Estos resultados hacen que sea razonable sospechar que los inhibidores de PARP podrían rescatar tejido de músculo esquelético o corazón previamente isquémico.

La activación de PARP también puede usarse como una medida del daño tras ataques neurotóxicos tras una sobreexposición a cualquiera de glutamato (por medio de la estimulación del receptor de NMDA), productos intermedios de oxígeno reactivos, proteína amiloide β , N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) o su metabolito activo N-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺), que participan en estados patológicos tales como ictus, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson. Zhang *et al.*, “Poly(ADP-Ribose) Synthetase Activation: An Early Indicator of Neurotoxic DNA Damage”, *J. Neurochem*, 65:3, 1411-14 (1995). Otros estudios han continuado explorando el papel de la activación de PARP en células granulares de cerebelo *in vitro* y en la neurotoxicidad por MPTP. Così *et al.*, “Poly(ADP-Ribose) polymerase (PARP) Revisited. A New Role for an Old Enzyme: PARP Involvement in Neurodegeneration and PARP Inhibitors as Possible Neuroprotective Agents”. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 825: 366-79 (1997); y Così *et al.*, “Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors Protect Against MPTP-induced Depletions of Striatal Dopamine and Cortical Noradrenaline in C57B1/6 Mice”, *Brain Res.*, 729: 264-69 (1996). Se produce una exposición neural excesiva a glutamato, que sirve como neurotransmisor predominante del sistema nervioso central y actúa sobre los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) y otros subtipos de receptores, lo más a menudo como resultado de ictus u otros procesos neurodegenerativos. Las neuronas privadas de oxígeno liberan glutamato en grandes cantidades durante un ataque cerebral isquémico tal como durante un ictus o ataque al corazón. A su vez, este exceso de liberación de glutamato provoca una sobreestimulación (excitotoxicidad) de receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), AMPA, kainato y MGR, que abren canales iónicos y permiten un flujo de iones no controlado (por ejemplo, Ca²⁺ y Na⁺ al interior de las células y K⁺ fuera de las células), lo que conduce a una sobreestimulación de las neuronas. Las neuronas sobreestimuladas secretan más glutamato, creando un efecto dominó o bucle de retroalimentación que da como resultado en última instancia muerte o daño celular por medio de la producción de proteasas, lipasas y radicales libres. Se ha atribuido una activación excesiva de receptores de glutamato en diversos estados y enfermedades neurológicas incluyendo epilepsia, ictus, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Huntington, esquizofrenia, dolor crónico, isquemia y pérdida neuronal tras hipoxia, isquemia por hipoglicemia, traumatismo y ataque nervioso. También se ha implicado la estimulación y la exposición a glutamato como base para trastornos compulsivos, particularmente drogodependencia. Las pruebas incluyen hallazgos en muchas especies animales, así como en cultivos de corteza cerebral tratados con glutamato o NMDA, de que antagonistas de receptores de glutamato (es decir, compuestos que bloquean que el glutamato se una a o active su receptor) bloquean el daño neural tras ictus vascular. Dawson *et al.*, “Protection of the Brain from Ischemia”, *Cerebrovascular Disease*, 319-25 (H. Hunt Batjer ed., 1997). Los intentos de prevenir la excitotoxicidad bloqueando los receptores de NMDA, AMPA, kainato y MGR han demostrado ser difíciles debido a que cada receptor tiene múltiples sitios a los que puede unirse el glutamato y por tanto ha sido difícil encontrar una mezcla eficaz de antagonistas o un antagonista universal que impida la unión del glutamato a todos los receptores y permita someter a prueba esta teoría. Además, muchas de las composiciones que son eficaces en el bloqueo de los receptores también son tóxicas para los animales. Como tal, actualmente no existe ningún tratamiento eficaz conocido para las anomalías por glutamato.

La estimulación de receptores de NMDA por glutamato, por ejemplo, activa la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), lo que conduce a la formación de óxido nítrico (NO), que también media la neurotoxicidad. Puede prevenirse la neurotoxicidad por NMDA mediante tratamiento con inhibidores de óxido nítrico sintasa (NOS) o a través de alteración genética dirigida de nNOS *in vitro*. Dawson *et al.*, “Nitric Oxide Mediates Glutamate Neurotoxicity in Primary Cortical Cultures”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 6368-71 (1991); y Dawson *et al.*, “Mechanisms of Nitric Oxide-mediated Neurotoxicity in Primary Brain Cultures”. *J. Neurosci.*, 13:6, 2651-61 (1993),

Dawson *et al.*, "Resistance to Neurotoxicity in Cortical Cultures from Neuronal Nitric Oxide Synthase-Deficient Mice", *J. Neurosci.*, 16:8, 2479-87 (1996), Iadecola, "Bright and Dark Sides of Nitric Oxide in Ischemic Brain Injury", *Trends Neurosci.*, 20:3, 132-39 (1997), Huang *et al.* "Effects of Cerebral Ischemia in Mice Deficient in Neuronal Nitric Oxide Synthase", *Science*, 265: 1883-85 (1994), Beckman *et al.*, "Pathological Implications of Nitric Oxide, Superoxide and Peroxynitrite Formation", *Biochem. Soc. Trans.*, 21: 330-34 (1993), y Szabó *et al.*, "DNA Strand Breakage, Activation of Poly(ADP-Ribose) Synthetase, and Cellular Energy Depletion are Involved in the Cytotoxicity in Macrophages and Smooth Muscle Cells Exposed to Peroxynitrite", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 1753-58 (1996).

10 También se sabe que los inhibidores de PARP, tales como 3-aminobenzamida, afectan a la reparación del ADN generalmente en respuesta, por ejemplo, a peróxido de hidrógeno o radiación gamma. Cristovao *et al.*, "Effect of a Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor on DNA Breakage and Cytotoxicity Induced by Hydrogen Peroxide and γ -Radiation", *Terato., Carcino., and Muta*, 16: 219-27 (1996). Específicamente, Cristovao *et al.* observaron una recuperación dependiente de PARP de las roturas de hebras de ADN en leucocitos tratados con peróxido de hidrógeno.

15 Se ha notificado que los inhibidores de PARP son eficaces en la radiosensibilización de células tumorales hipóxicas y eficaces en la prevención de que células tumorales se recuperen del daño potencialmente letal del ADN tras radioterapia, presumiblemente por su capacidad para prevenir la reparación del ADN. Patentes estadounidenses n.ºs 5.032.617; 5.215.738; y 5.041.653.

20 También existen pruebas de que los inhibidores de PARP son útiles para tratar trastornos inflamatorios del intestino, tales como colitis. Salzman *et al.*, "Role of Peroxynitrite and Poly(ADP-Ribose) Synthase Activation Experimental Colitis", *Japanese J. Pharm.*, 75, supl. 1:15 (1997). Específicamente, se indujo colitis en ratas mediante administración intraluminal del hapteno ácido trinitrobenzenosulfónico en etanol al 50%. Las ratas tratadas recibieron 3-aminobenzamida, un inhibidor específico de la actividad de PARP. La inhibición de la actividad de PARP redujo la respuesta inflamatoria y restauró la morfología y el estado energético del colon distal. Véanse también, Southan *et al.*, "Spontaneous Rearrangement of Aminoalkylthioureas into Mercaptoalkylguanidines, a Novel Class of Nitric Oxide Synthase Inhibitors with Selectivity Towards the Inducible Isoform". *Br. J. Pharm.*, 117: 619-32 (1996); y Szabó *et al.*, "Mercaptoethylguanidine and Guanidine Inhibitors of Nitric Oxide Synthase React with Peroxynitrite and Protect Against Peroxynitrite-induced Oxidative Damage", *J. Biol. Chem.*, 272: 9030-36 (1997).

25 También existen pruebas de que los inhibidores de PARP son útiles para tratar la artritis. Szabó *et al.*, "Protective Effects of an Inhibitor of Poly(ADP-Ribose) Synthetase in Collagen-Induced Arthritis", *Japanese J. Pharm.*, 75, supl. 1:102 (1997); Szabó *et al.*, "DNA Strand Breakage, Activation of Poly(ADP-Ribose) Synthetase, and Cellular Energy Depletion are Involved in the Cytotoxicity in Macrophages and Smooth Muscle Cells Exposed to Peroxynitrite". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 1753-58 (marzo de 1996); y Bauer *et al.*, "Modification of Growth Related Enzymatic Pathways and Apparent Loss of Tumorigenicity of a ras-transformed Bovine Endothelial CeU Line by Treatment with 5-Iodo-6-amino-1,2-benzopyrone (INH2BP)", *Intl. J. Oncol.*, 8: 239-52 (1996); y Hughes *et al.*, "Induction of T Helper Cell Hyporesponsiveness in an Experimental Model of Autoimmunity by Using Nonmitogenic Anti-CD3 Monoclonal Antibody", *J. Immuno.*, 153: 3319-25 (1994).

35 Además, parece que los inhibidores de PARP son útiles para tratar la diabetes. Heller *et al.*, "Inactivation of the Poly(ADP-Ribose) Polymerase Gene Affects Oxygen Radical and Nitric Oxide Toxicity in Islet Cells", *J. Biol. Chem.*, 270:19, 11176-80 (Mayo de 1995). Heller *et al.* usaron células de ratones con genes de PARP inactivados y encontraron que estas células mutantes no mostraban agotamiento de NAD⁺ tras la exposición a radicales que dañaban el ADN. También se encontró que las células mutantes eran más resistentes a la toxicidad del NO.

40 Se ha demostrado que los inhibidores de PARP son útiles para tratar el choque endotóxico o choque septicémico. Zingarelli *et al.*, "Protective Effects of Nicotinamide Against Nitric Oxide-Mediated Delayed Vascular Failure in Endotoxic Shock: Potential Involvement of PolyADP Ribosyl Synthetase", *Shock*, 5: 258-64 (1996), sugieren que la inhibición del ciclo de reparación del ADN desencadenado por la poli(ADP ribosa) sintetasa tiene efectos protectores contra la insuficiencia vascular en el choque endotóxico. Zingarelli *et al.* encontraron que la nicotinamida protege contra la insuficiencia vascular mediada por NO retardada en el choque endotóxico. Zingarelli *et al.* encontraron también que las acciones de la nicotinamida pueden estar relacionadas con la inhibición de la activación mediada por NO del ciclo de reparación del ADN con consumo de energía, desencadenado por la poli(ADP ribosa) sintetasa. Cuzzocrea, "Role of Peroxynitrite and Activation of Poly(ADP-Ribose) Synthetase in the Vascular Failure Induced by Zymosan-activated Plasma", *Brit. J. Pharm.*, 122: 493-503 (1997).

55 Se han usado inhibidores de PARP para tratar el cáncer. Suto *et al.*, "Dihydroisoquinolinones: The Design and Synthesis of a New Series of Potent Inhibitors of Poly(ADP-Ribose) Polymerase", *Anticancer Drug Des.*, 7: 107-17 (1991). Además, Suto *et al.*, patente estadounidense n.º 5.177.075, tratan varias isoquinolinas usadas para intensificar los efectos letales de la radiación ionizante o los agentes quimioterápicos sobre células tumorales. Weltin *et al.*, "Effect of 6(5H)-Phenanthridinone, an Inhibitor of Poly(ADP-ribose) Polymerase, on Cultured Tumor Cells", *Oncol. Res.*, 6:9, 399-403 (1994), tratan la inhibición de la actividad de PARP, la proliferación reducida de células tumorales y un efecto sinérgico marcado cuando se tratan conjuntamente células tumorales con un fármaco alquilante.

Aún otro uso para los inhibidores de PARP es el tratamiento de lesiones de nervios periféricos, y el síndrome de dolor patológico resultante conocido como dolor neuropático, tal como el inducido por una lesión por constricción crónica (CCI) del nervio ciático común y en la que se produce una alteración trans-sináptica del asta dorsal de la médula espinal caracterizada por hiper cromatosis del citoplasma y nucleoplasma (denominadas neuronas "oscuras").
5 Mao *et al.*, Pain, 72: 355-366 (1997).

También se han usado los inhibidores de PARP para extender el tiempo de vida y la capacidad proliferativa de las células incluyendo el tratamiento de enfermedades tales como envejecimiento de la piel, enfermedad de Alzheimer, aterosclerosis, artrosis, osteoporosis, distrofia muscular, enfermedades degenerativas del músculo esquelético que implican senescencia replicativa, degeneración muscular relacionada con la edad, senescencia inmunitaria, SIDA y otras enfermedades de senescencia inmunitaria; y para alterar la expresión génica de células senescentes. Documento WO 98/27975.

Se ha descrito un gran número de inhibidores de PARP conocidos en Banasik *et al.*, "Specific Inhibitors of Poly (ADP-Ribose) Synthetase and Mono(ADP-Ribosyl)-Transferase". J. Biol. Chem., 267: 3, 1569-75 (1992), y en Banasik *et al.*, "Inhibitors and Activators of ADP-Ribosylation Reactions", Molec. Cell. Biochem., 138: 185-97 (1994). Sin embargo, el uso eficaz de estos inhibidores de PARP, de las maneras tratadas anteriormente, se ha visto limitado por la producción simultánea de efectos secundarios no deseados (Milam *et al.*, "Inhibitors of Poly(Adenosine Diphosphate-Ribose) Synthesis: Effect on Other Metabolic Processes", Science, 223: 589-91 (1984)).

Además de lo anterior, se han dado a conocer inhibidores de PARP y se han descrito en las siguientes solicitudes de patente internacional: WO 00/42040; WO 00/39070; WO, 00139104; WO 99/11617; WO 99/11628; WO 99/11622; WO 99/59975; WO 99/11644; WO 99/11945; WO 99/11649; y WO 99/59973.

Li y Zhang han publicado una reciente revisión exhaustiva del estado de la técnica en IDrugs 2001, 4 (7): 804-812 (PharmaPress Ltd ISSN 1369-7056).

Continúa existiendo una necesidad de inhibidores de PARP potentes y eficaces que produzcan efectos secundarios mínimos. La presente invención proporciona compuestos, composiciones para y métodos de inhibición de la actividad de PARP para tratar y/o prevenir el daño celular, tisular y/o a órganos que resulta de la muerte o el daño celular debido a, por ejemplo, necrosis o apoptosis. Los compuestos y las composiciones de la presente invención son específicamente útiles en la mejora, el tratamiento y/o la prevención del daño celular o tisular neural, incluyendo el que sigue a una lesión por isquemia y reperusión focal. Generalmente, la inhibición de la actividad de PARP le evita a la célula una pérdida de energía, previniendo la despolarización irreversible de las neuronas y, por tanto, proporciona neuroprotección. Sin querer restringirse a ninguna teoría mecanicista, se cree que la inhibición de la actividad de PARP mediante el uso de los compuestos, las composiciones y los métodos de la presente invención protege a las células, el tejido y los órganos mediante su protección contra los efectos nocivos de óxido nítrico y radicales libres reactivos. Por tanto, la presente invención también proporciona métodos de tratamiento y/o prevención de células, tejido y/o órganos de una lesión o un daño inducido por óxido nítrico y/o radicales libres reactivos.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona compuestos descritos en el presente documento y sus usos para inhibir la poli (ADP-ribosa) polimerasa ("PARP"), composiciones que contienen estos compuestos y métodos para preparar y usar estos inhibidores de PARP para tratar, prevenir y/o mejorar los efectos de los estados descritos en el presente documento.

En particular, la presente invención proporciona los compuestos de la reivindicación 1 adjunta y también se refiere al uso de los mismos y a composiciones farmacéuticas que contienen los mismos.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la distribución de la zona de infarto en corte transversal a niveles representativos a lo largo del eje rostrocaudal, tal como se mide desde la línea interaural en animales no tratados y en animales tratados con 10 mg/kg de 3,4-dihidro-5-[4-(1-piperidinil)-butoxil]-1(2H)-isoquinolinona.

La figura 2 muestra el efecto de la administración intraperitoneal de 3,4-dihidro-5-[4-(1-piperidinil)-butoxil]-1(2H)-isoquinolinona sobre el volumen de infarto.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a compuestos, a composiciones farmacéuticas que contienen los mismos, a métodos de uso de los mismos y a un procedimiento de preparación de los mismos, incluyendo métodos de preparación de medicamentos que contienen los compuestos descritos en el presente documento para su uso en los métodos descritos, en los que tales compuestos son útiles como inhibidores de poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP). Como tales, tratan o previenen el daño tisular neural que resulta de la muerte o el daño celular debido a necrosis o apoptosis, lesión por isquemia y reperusión cerebral o enfermedades neurodegenerativas en un animal; extienden el tiempo de vida y la capacidad proliferativa de las células y por tanto pueden usarse para tratar o prevenir enfermedades asociadas con las

5 mismas; alteran la expresión génica de células senescentes; y radiosensibilizan células tumorales hipóxicas. Preferiblemente, los compuestos de la invención tratan o previenen el daño tisular que resulta de la muerte o el daño celular debido a necrosis o apoptosis, y/o efectúan actividad neuronal, o bien mediada o bien no mediada por toxicidad por NMDA. Se cree que estos compuestos interfieren en más que la neurotoxicidad por glutamato y las rutas biológicas
5 mediadas por NO. Además, los compuestos de la invención pueden tratar o prevenir otro daño tisular relacionado con la activación de PARP. La presente invención proporciona compuestos que inhiben la poli(ADP-ribosa) polimerasa ("PARP"), composiciones que contienen estos compuestos y métodos para usar estos inhibidores de PARP para tratar, prevenir y/o mejorar los efectos de los estados descritos en el presente documento.

10 Preferiblemente, los compuestos de la invención presentan una CI_{50} para inhibir PARP *in vitro*, tal como se mide mediante los métodos descritos en el presente documento, de aproximadamente 100 μM , o menor, preferiblemente menor de aproximadamente 50 μM , más preferiblemente menor de aproximadamente 10 μM , o menor de 1 μM , lo más preferiblemente menor de aproximadamente 0,1 μM .

15 Realizaciones específicas de la presente invención incluyen los compuestos mostrados a continuación en el ejemplo y la tabla III, y formas neutras y/o de sal de los mismos, así como mezclas enantioméricas y racémicas de los mismos, cuando sea apropiado.

20 En general, los compuestos y las composiciones de la presente invención pueden usarse para tratar o prevenir la muerte o el daño celular debido a necrosis o apoptosis, lesión por isquemia y reperfusión cerebral o enfermedades neurodegenerativas en un animal, tal como un ser humano. Los compuestos y las composiciones de la presente invención pueden usarse para extender el tiempo de vida y la capacidad proliferativa de las células y por tanto pueden usarse para tratar o prevenir enfermedades asociadas con las mismas; alteran la expresión génica de células senescentes; y radiosensibilizan células tumorales hipóxicas. Preferiblemente, los compuestos y las composiciones de la invención
25 pueden usarse para tratar o prevenir el daño tisular que resulta de la muerte o el daño celular debido a necrosis o apoptosis, y/o efectúan actividad neuronal, o bien mediada o bien no mediada por toxicidad por NMDA. Los compuestos de la presente invención no se limitan a ser útiles en el tratamiento de neurotoxicidad mediada por glutamato y/o rutas biológicas mediadas por NO. Además, los compuestos de la invención pueden usarse para tratar o prevenir otro daño tisular relacionado con la activación de PARP, tal como se describe en el presente documento.

30 La presente invención proporciona compuestos que inhiben la actividad polimerasa *in vitro* y/o *in vivo* de la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP), y composiciones que contienen los compuestos dados a conocer.

35 La presente invención proporciona métodos para inhibir, limitar y/o controlar la actividad polimerasa *in vitro* y/o *in vivo* de la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) en cualquiera de disoluciones, células, tejidos, órganos o sistemas de órganos. En una realización, la presente invención proporciona métodos de limitación o inhibición de la actividad de PARP en un mamífero, tal como un ser humano, o bien localmente o bien sistémicamente.

40 La presente invención proporciona métodos para tratar y/o prevenir enfermedades, síndromes y/o estados exacerbados por o que implican la generación aumentada de PARP. Estos métodos implican la aplicación o administración de los compuestos de la presente invención a células, tejidos, órganos o sistemas de órganos de una persona que necesita tal tratamiento o prevención.

45 En una realización, la presente invención proporciona métodos para tratar y/o prevenir el daño tisular cardiovascular que resulta de una lesión por isquemia o reperfusión cardíaca. Por ejemplo, la lesión por reperfusión se produce al término de procedimientos de derivación cardíaca o durante un paro cardíaco cuando el corazón, una vez impedido de recibir sangre, comienza a reperfundirse y estos métodos implican la administración de los compuestos y las composiciones de la presente invención preferiblemente antes de, o inmediatamente tras la reperfusión, de manera que se prevenga, se trate o se reduzca esa lesión por reperfusión. La presente invención también proporciona métodos de
50 prevención y/o tratamiento de ictus vascular, trastornos cardiovasculares.

55 En otra realización, la presente invención proporciona métodos *in vitro* o *in vivo* para extender o aumentar el tiempo de vida y/o la capacidad de proliferación de las células y por tanto también los métodos tratan y/o previenen enfermedades asociadas con las mismas e inducidas o exacerbadas por la senescencia celular incluyendo envejecimiento de la piel, aterosclerosis, artrosis, osteoporosis, distrofia muscular, enfermedades degenerativas del músculo esquelético que implican senescencia replicativa, degeneración muscular relacionada con la edad, senescencia inmunitaria, SIDA y otras enfermedades de senescencia inmunitaria, y otras enfermedades asociadas con senescencia celular y envejecimiento, así como para alterar la expresión génica de células senescentes.

60 En una realización adicional, la presente invención proporciona métodos de tratamiento o prevención o mejora del efecto del cáncer y/o para radiosensibilizar células tumorales hipóxicas para hacer que las células tumorales sean más susceptibles a la radioterapia y para prevenir de ese modo que las células tumorales se recuperen del daño potencialmente letal del ADN tras la radioterapia. Un método de esta realización se refiere a radiosensibilizar específica y preferentemente células tumorales haciendo que las células tumorales se hagan más susceptibles a la radioterapia que
65 las células no tumorales.

Todavía en otra realización, la presente invención proporciona métodos de prevención y/o tratamiento de ictus vascular, trastornos cardiovasculares; para tratar otros estados y/o trastornos tales como degeneración muscular rela-

cionada con la edad, SIDA y otras enfermedades de senescencia inmunitaria, inflamación, artritis, gota, aterosclerosis, caquexia, cáncer, enfermedades degenerativas del músculo esquelético que implican senescencia replicativa, diabetes, traumatismo craneal, lesión de la médula espinal, senescencia inmunitaria, inflamación por gota, trastornos inflamatorios del intestino (tales como colitis y enfermedad de Crohn), pancreatitis aguda, mucositis, choque hemorrágico, 5 choque por oclusión de la arteria esplácnica, insuficiencia multiorgánica (tal como la que implica cualquiera de los sistemas de riñón, hígado, renal, pulmonar, retiniano, pancreático y/o músculos esqueléticos), tiroiditis autoinmunitaria aguda, distrofia muscular, artrosis, osteoporosis, dolor agudo y/o crónico (tal como dolor neuropático), insuficiencia renal, isquemia retiniana, choque septicémico (tal como choque endotóxico), disfunción celular endotelial local y/o remota (tales se reconocen por respuestas relajantes dependientes de endotelio y regulación por incremento de moléculas 10 de adhesión), inflamación y envejecimiento de la piel.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse, por ejemplo, por vía parenteral, a una persona con diagnóstico de isquemia retiniana aguda o ictus vascular agudo, mediante administración intravenosa o bien intermitente o bien continua, mediante o bien una dosis única o bien una serie de dosis divididas. Los compuestos de la 15 invención pueden usarse en combinación o secuencialmente. El compuesto de la invención puede administrarse mediante administración intermitente o continua por medio de implantación de un sistema de administración de matriz polimérica biodegradable, biocompatible que contiene un compuesto según la reivindicación 1 o por medio de una bomba subdural insertada para administrar el compuesto directamente a la zona de infarto del cerebro.

En una realización adicional, la presente invención proporciona métodos para extender el tiempo de vida y la capacidad proliferativa de las células, tal como, por ejemplo, en el uso de los compuestos de la invención como mediadores 20 generales en la generación de compuestos oxidantes, mediadores proinflamatorios y/o citocinas, y/o mediadores generales de infiltración de leucocitos, sobrecarga de iones calcio, peroxidación de fosfolípidos, metabolismo de óxido nítrico alterado y/o producción de ATP reducida.

Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden tratar o prevenir el daño tisular cardiovascular que resulta de una lesión por isquemia o reperfusión cardiaca. Por ejemplo, la lesión por reperfusión se produce al término de procedimientos de derivación cardiaca o durante un paro cardiaco cuando el corazón, una vez impedido de recibir 25 sangre, comienza a reperfundirse.

Los compuestos de la presente invención también puede usarse para extender o aumentar el tiempo de vida o la proliferación de las células y por tanto para tratar o prevenir enfermedades asociadas con las mismas e inducidas o exacerbadas por la senescencia celular incluyendo envejecimiento de la piel, aterosclerosis, artrosis, osteoporosis, distrofia muscular, enfermedades degenerativas del músculo esquelético que implican senescencia replicativa, degeneración 30 muscular relacionada con la edad, senescencia inmunitaria, SIDA y otras enfermedades de senescencia inmunitaria, y otras enfermedades asociadas con senescencia celular y envejecimiento, así como para alterar la expresión génica de células senescentes. Estos compuestos también pueden usarse para tratar el cáncer y para radiosensibilizar células tumorales hipóxicas para hacer que las células tumorales sean más susceptibles a la radioterapia y para prevenir que las células tumorales se recuperen del daño potencialmente letal del ADN tras la radioterapia, presumiblemente por su capacidad para prevenir la reparación del ADN. Los compuestos de la presente invención pueden usarse para prevenir o tratar ictus vascular; para tratar o prevenir trastornos cardiovasculares, para tratar otros estados y/o trastornos 35 tales como degeneración muscular relacionada con la edad, SIDA y otras enfermedades de senescencia inmunitaria, inflamación, artritis, gota, aterosclerosis, caquexia, cáncer, enfermedades degenerativas del músculo esquelético que implican senescencia replicativa, diabetes, traumatismo craneal, senescencia inmunitaria, gota, trastornos inflamatorios del intestino (tales como colitis y enfermedad de Crohn), distrofia muscular, artrosis, osteoporosis, dolor agudo y/o crónico (tal como dolor neuropático), insuficiencia renal, isquemia retiniana, choque septicémico (tal como choque 40 endotóxico) y envejecimiento de la piel.

Preferiblemente, los compuestos de la invención actúan como inhibidores de PARP para tratar o prevenir el daño 45 tisular que resulta del daño o la muerte celular debido a necrosis o apoptosis; para tratar o prevenir el daño tisular neural que resulta de una lesión por isquemia y reperfusión cerebral o enfermedades neurodegenerativas en un animal; para extender y aumentar el tiempo de vida y la capacidad proliferativa de las células; para alterar la expresión génica de células senescentes; y para radiosensibilizar células tumorales.

Otra realización especialmente preferida de la invención es una composición farmacéutica que comprende (i) una 50 cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según la reivindicación 1.

Los compuestos de la presente invención pueden tener uno o más centro(s) asimétrico(s) y por tanto pueden producirse como mezclas (racémicas y no racémicas) de estereoisómeros, o como enantiómeros o diastereómeros 55 individuales. Los estereoisómeros individuales pueden obtenerse usando un material de partida ópticamente activo, resolviendo una mezcla racémica o no racémica de productos intermedios en alguna fase apropiada de la síntesis, o mediante resolución de un compuesto según la reivindicación 1. Se entiende que los estereoisómeros individuales así como las mezclas (racémicas y no racémicas) de estereoisómeros quedan abarcados por el alcance de la presente invención. 60

La expresión “enfermedades neurodegenerativas” incluye la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson 65 y enfermedad de Huntington.

ES 2 354 249 T3

La expresión “ataque nervioso” se refiere a cualquier daño al tejido nervioso y cualquier discapacidad o la muerte que resulte del mismo. La causa del ataque nervioso puede ser metabólica, tóxica, neurotóxica, iatrogénica, térmica o química, e incluye sin limitación, isquemia, hipoxia, accidente cerebrovascular, traumatismo, cirugía, presión, efecto de masa, hemorragia, radiación, vasoespasmos, enfermedad neurodegenerativa, infección, enfermedad de Parkinson, 5 esclerosis lateral amiotrófica (ELA), proceso de mielinización/desmielinización, epilepsia, trastorno cognitivo, anomalía por glutamato y efectos secundarios del mismo.

El término “neuroprotector” se refiere al efecto de reducción, detención o mejora del ataque nervioso, y protección, resucitación o reactivación del tejido nervioso que ha sufrido un ataque nervioso. 10

La expresión “prevenir la neurodegeneración” incluye la capacidad de prevenir la neurodegeneración en pacientes con diagnóstico de enfermedad neurodegenerativa o que están en riesgo de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa. La expresión también abarca prevenir la neurodegeneración adicional en pacientes que ya están padeciendo o que tienen síntomas de una enfermedad neurodegenerativa. 15

El término “tratar” se refiere a:

- (i) prevenir que se produzca una enfermedad, un trastorno o un estado en un animal que puede estar predis- 20 puesto a la enfermedad, el trastorno y/o el estado, pero que todavía no se ha diagnosticado que lo tiene;
- (ii) inhibir la enfermedad, el trastorno o el estado, es decir, detener su desarrollo; y
- (iii) aliviar la enfermedad, el trastorno o el estado, es decir, provocar la regresión de la enfermedad, el trastorno 25 y/o el estado.

La expresión “daño tisular neural que resulta de una lesión por isquemia y reperfusión y enfermedades neurodegenerativas” incluye neurotoxicidad, tal como la observada en el ictus vascular y la isquemia focal y global. 30

Un rasgo característico de muchas de estas transformaciones es que los productos metabólicos son más polares que los fármacos originales, aunque algunas veces un fármaco polar produce un producto menos polar. Las sustancias con altos coeficientes de reparto lípido/agua, que atraviesan fácilmente las membranas, también difunden de nuevo rápidamente desde la orina tubular a través de las células tubulares renales al plasma. Por tanto, tales sustancias tienden a tener un bajo aclaramiento renal y una larga persistencia en el cuerpo. Si un fármaco se metaboliza para dar 35 un compuesto más polar, uno con un coeficiente de reparto inferior, su reabsorción tubular se reducirá enormemente. Además, el mecanismo secretor específico para aniones y cationes en los túbulos renales proximales y en las células hepáticas parenquimales funciona para sustancias altamente polares.

Como ejemplo específico, la fenacetina (acetofenetidina) y acetanilida son ambos agentes antipiréticos y analgésicos suaves, pero se transforman cada uno dentro del cuerpo en un metabolito más eficaz y más polar, p-hidroxiacetanilida (paracetamol), que se usa ampliamente hoy en día. Cuando se administra una dosis de acetanilida a una persona, los metabolitos sucesivos alcanzan picos y disminuyen en el plasma secuencialmente. Durante la primera hora, la acetanilida es el principal componente plasmático. En la segunda hora, a medida que cae el nivel de acetanilida, la concentración del metabolito paracetamol alcanza un pico. Finalmente, tras unas pocas horas, el principal componente plasmático es un metabolito adicional que es inerte y puede excretarse del cuerpo. Por tanto, las concentraciones plasmáticas de uno o más metabolitos, así como del propio fármaco, pueden ser farmacológicamente importantes. 45

Las reacciones implicadas en el metabolismo de fármacos a menudo se clasifican en dos grupos, tal como se muestra en la tabla II. Las reacciones de fase I (o funcionalización) consisten generalmente en (1) reacciones de oxidación y reducción que alteran y crean nuevos grupos funcionales y (2) reacciones hidrolíticas que escinden ésteres y amidas para liberar grupos funcionales enmascarados. Estos cambios habitualmente son en la dirección de un aumento de la polaridad. 50

Las reacciones de fase II son reacciones de conjugación en las que el fármaco, o a menudo un metabolito del fármaco, se acopla a un sustrato endógeno, tal como ácido glucurónico, ácido acético o ácido sulfúrico. 55

60

65

ES 2 354 249 T3

TABLA II

5	Reacciones de fase I (reacciones de funcionalización):
	<hr/>
	(1) Oxidación por medio del sistema P450 microsomal
10	hepático:
	Oxidación alifática
	Hidroxilación aromática
15	N-Desalquilación
	O-Desalquilación
20	S-Desalquilación
	Epoxidación
25	Dominación oxidativa
	Formación de sulfóxido
	Desulfuración
30	N-Oxidación y N-hidroxilación
	Deshalogenación
35	(2) Oxidación por medio de mecanismos no
	microsomales:
40	Oxidación de alcoholes y aldehídos
	Oxidación de purinas
	Desaminación oxidativa (monoamina oxidasa y diamina
45	oxidasa)
	(3) Reducción:
50	Reducción de grupos azo y nitro
	(4) Hidrólisis:
	Hidrólisis de ésteres y amidas
55	Hidrólisis de enlaces peptídicos
	Hidratación de epóxidos

60

65

Reacciones de fase II (reacciones de conjugación):

- (1) Glucuronidación
- (2) Acetilación
- (3) Formación de ácido mercaptúrico
- (4) Conjugación de sulfatos
- (5) N-, O- y S-metilación
- (6) Trans-sulfuración

Los compuestos de la presente invención presentan actividad farmacológica y por tanto, son útiles como productos farmacéuticos. En particular, los compuestos presentan actividad en los sistemas vesicular cardiaco y nervioso central.

Se entiende que están incluidas en la invención, cuando sea posible, formas tautoméricas.

Muchos de los inhibidores de PARP de la presente invención pueden sintetizarse mediante métodos conocidos a partir de materiales de partida que se conocen.

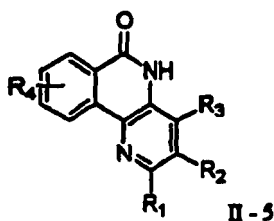
Normalmente, los inhibidores de PARP usados en la composición de la invención tendrán una CI_{50} para inhibir poli (ADP-ribosa) polimerasa *in vitro* de aproximadamente $20 \mu M$ o menor, preferiblemente menor de aproximadamente $10 \mu M$, más preferiblemente menor de aproximadamente $1 \mu M$, o preferiblemente menor de aproximadamente $0,1 \mu M$, lo más preferiblemente menor de aproximadamente $0,01 \mu M$.

Por ejemplo, Suto *et al.*, citados anteriormente, han notificado que el inhibidor de PARP 3,4-dihidro-5-[4-(1-piperidinil)butoxil]-1(2H)-isoquinolinona inhibe PARP con una CI_{50} de 40 nM.

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse tal como sigue.

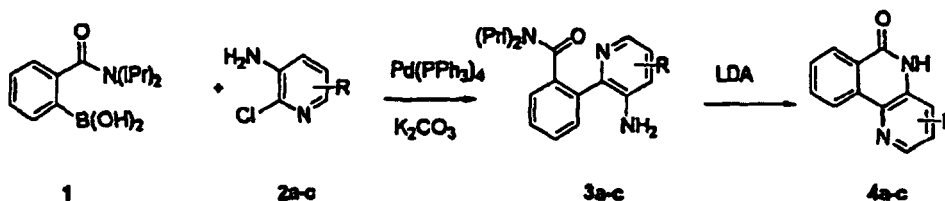
Ejemplo 1

Pueden sintetizarse compuestos de la siguiente fórmula general II-5, por ejemplo, mediante los siguientes métodos.



Esquema 1-5

Esquema general para la síntesis de azafenantridonas 4a-c



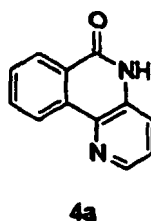
Procedimiento general para la síntesis de aminas 3a-c. Se añadió el ácido borónico 1 (2,0 g, 8,0 mmoles) preparado según Brimble, M. A; Chan, S. H. Aust. J. Chem. 1998, 51, 235-242 a una disolución de carbonato de potasio (2,2 g en 8 ml de H_2O) y 2-cloro-3-amino-piridina (0,94 g, 7,3 mmoles) en 100 ml de tolueno/EtOH (8:1). Se desoxigenó esta mezcla a vacío y se rellenó con nitrógeno. Tras agitar la mezcla bajo nitrógeno durante 30 min., se añadió tetrakis-

ES 2 354 249 T3

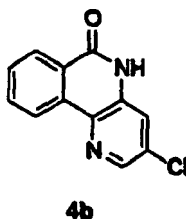
trifenilfosfina de paladio (250 mg) a la mezcla. Se calentó la disolución hasta 80°C hasta conversión completa según CCF (hexanos/EtOAc 50/50). Entonces se extrajo la reacción con agua y se secó la capa de tolueno y se concentró produciendo un sólido bruto que se trituroó con dietil éter (10-20 ml) produciendo 1,84 g (85%) de la amina deseada 3a. ¹H-RMN (CDCl₃) δ 8,05 (d, 1H), 7,45 (m, 3H), 7,28 (d, 1H), 7,06 (m, 1H), 7,00 (d, 1H), 4,01 (s, 2H), 3,78 (m, 1H), 3,31 (m, 1H), 1,48 (d, 3H), 1,13 (d, 3H), 1,01 (d, 3H), 0,84 (d, 3H).

R = 5-cloro-amina 3b. Se sintetizó la amida 3b a partir de 3-amino-2,5-dicloro-piridina 2b (X = Cl, R = 5-Cl) tal como se mencionó anteriormente con la excepción de la purificación mediante cromatografía ultrarrápida en la mínima cantidad de gel de sílice (EtOAc al 10%/hexanos → EtOAc al 50%/hexanos). El rendimiento en seco fue 1,40 g (70%). ¹H-RMN (CDCl₃) δ 7,98 (s, 1H), 7,45 (m, 2H), 7,26 (m, 2H), 7,00 (d, 1H), 3,76 (m, 1H), 3,35 (m, 1H), 1,48 (d, 3H), 1,19 (d, 3H), 1,04 (d, 3H), 0,91 (d, 3H).

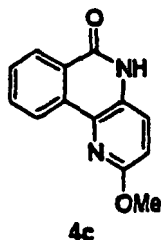
R = 6-metoxi-amina 3c. Se sintetizó la amida 3c a partir de 3-amino-2-bromo-6-metoxipiridina 2c y ácido borónico 1 tal como se mencionó anteriormente. El rendimiento en seco fue del 74%. ¹H-RMN (CDCl₃) δ 7,43 (m, 3H), 7,27 (m, 1H), 7,08 (d, 1H), 6,61 (d, 1H), 3,83 (s, 3H), 3,70 (m, 1H), 3,30 (m, 1H), 1,49 (d, 3H), 1,13 (d, 3H), 0,99 (d, 3H), 0,75 (d, 3H).



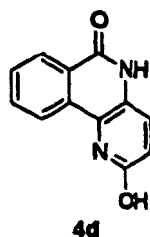
Azafenantridona 4a. (Comparativo). Se disolvió la amida 3a (1,74 g, 5,8 mmoles) en tetrahidrofurano seco (25 ml) y se enfrió hasta -78°C bajo nitrógeno. Se añadió diisopropilamida de litio (2,0 M, 7,6 ml) gota a gota a la disolución y se agitó esta mezcla durante varias horas y se calentó hasta temperatura ambiente durante la noche. Se extinguió la reacción con agua (50 ml) y se extrajo con MeOH al 10%/DCM. Se secaron las fases orgánicas combinadas y se concentraron produciendo el sólido bruto que se trituroó con dietil éter en ebullición produciendo el material puro 4a, 0,95 g (89%). P.f. = 300-320°C (desc.); ¹H-RMN (d₆-DMSO) δ 11,78 (s, 1H), 8,77 (d, 1H), 8,55 (d, 1H), 8,32 (d, 1H), 7,93 (d, 1H), 7,74 (m, 2H), 7,54 (m, 1H). Análisis calculado para C₁₂H₈N₂O: C, 73,46; H, 4,11; N, 14,28. Hallado: C, 72,80; H, 4,19; N, 14,06.



Cloroazafenantridona 4b. Se preparó el cloruro 4b de manera análoga al compuesto 4a. Rendimiento = 74%; P.f. = 295-300°C; ¹H-RMN (d₆-DMSO) δ 11,80 (sa, 1H), 8,69 (d, 1H), 8,56 (s, 1H), 8,31 (d, 1H), 7,94 (t, 1H), 7,78 (m, 2H). Análisis calculado para C₁₂H₇ClN₂O: C, 62,49; H, 3,06; N, 12,15. Hallado: C, 61,53; H, 3,21; N, 11,87.



Metoxiazafenantridona 4c. Se preparó el compuesto 4c a partir de la amida 3c de manera similar a 4a. Rendimiento del 99%; P.f. = 290-300°C; ¹H-RMN (d₆-DMSO) δ 11,67 (sa, 1H), 8,69 (d, 1H), 8,30 (d, 1H), 7,93 (t, 1H), 7,72 (m, 2H), 7,03 (d, 1H), 4,01 (s, 3H). Análisis calculado para C₁₃H₁₀N₂O₂: C, 69,02; H, 4,46; N, 12,38. Hallado: C, 67,89; H, 4,49; N, 12,08.



5

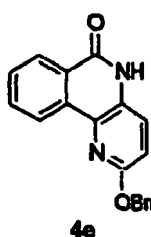
10

15

Hidroxiazafenantridona 4d. Se disolvió el metil éter 4c (50 mg, 2,2 mmoles) en 10 ml de HBr (al 48% en HOAC) en un tubo sellado. Se calentó la reacción hasta 100°C durante 10 h. Tras enfriar, se filtró la reacción y se lavó con ácido acético (3 x 10 ml) y se secó a vacío. El peso seco de la sal bromhidrato 4d fue de 424 mg (90%). ¹H-RMN (d₆-DMSO) δ 11,61 (sa, 1H), 10,50 (sa, 1H), 8,62 (d, 1H), 8,30 (d, 1H), 7,89 (t, 1H), 7,71 (t, 1H), 7,65 (d, 1H), 6,81 (d, 1H). Análisis calculado para C₁₂H₉BrN₂O₂: C, 49,17; H, 3,09; N, 9,56. Hallado: C, 48,73; H, 3,15; N, 9,36.

20

25



30

35

Benciloxiazafenantridona 4e. (Comparativo) Se disolvió la sal bromhidrato 4d (100 mg, 0,34 mmoles) en 3 ml de DMF. Se añadieron carbonato de potasio (100 mg) y bromuro de bencilo (60 μl, 0,50 mmoles) a la disolución y se calentó la mezcla hasta 60°C durante 14 h. Se eliminó el disolvente a vacío y se lavó el residuo con agua (5 ml) y MeOH en ebullición (10 ml) y se filtró. El sólido 4e (47 mg, 46%) era puro mientras que el filtrado contenía una mezcla de isómeros. P.f. = 271-276°C ¹H-RMN (d₆-DMSO) δ 11,68 (sa, 1H), 8,71 (d, 1H), 8,30 (d, 1H), 7,93 (t, 1H), 7,74 (m, 2H), 7,55 (d, 2H), 7,40 (t, 2H), 7,32 (t, 1H), 7,09 (d, 1H), 5,54 (s, 2H). Análisis calculado para C₁₉H₁₄N₂O₂ (H₂O): C, 71,24; H, 5,03; N, 8,74. Hallado: C, 71,28; H, 4,83; N, 8,38.

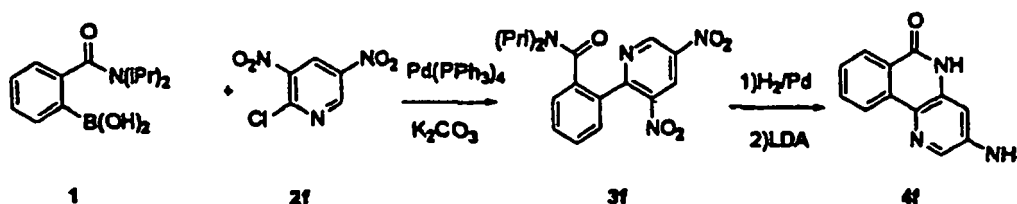
40

Esquema 2

Síntesis de aminoazafenantridona 4f

45

50



55

Dinitroamida 3f. Se logró el acoplamiento de 2-cloro-3,5-dinitropiridina 2f con ácido bórico 1 tal como se explicó resumidamente en el procedimiento para 3a-c. ¹H-RMN (CDCl₃) δ 9,55 (s, 1H), 9,04 (s, 1H), 7,41 (m, 2H), 7,39 (t, 1H), 7,28 (d, 1H), 3,99 (m, 1H), 3,40 (m, 1H), 1,58 (da, 3H), 1,50 (da, 3H), 1,33 (da, 3H), 1,20 (da, 3H).

60

65

Aminoazafenantridona 4f. Se disolvió la dinitroamida 3f (700 mg, 1,88 mmoles) en 25 ml de MeOH y se añadió a un matraz Parr bajo nitrógeno con 100 mg de paladio sobre carbono. Se redujo esta mezcla bajo una atmósfera de 30 psi de hidrógeno durante 2 h. Se eliminó por filtración el paladio a través de un tapón de celite y se concentró el filtrado a vacío y se usó la diamina en bruto (550 mg, 94%) en la ciclación sin ninguna purificación adicional. Se redisolvió la diamina en tetrahidrofurano seco y se cicló con LDA (3 eq.) de manera similar a las amidas 3a-c. Se aisló el compuesto 4f con un rendimiento del 56% (227 mg), p.f. = >300°C (desc.); ¹H-RMN (d₆-DMSO) δ 11,46 (sa, 1H), 8,49 (d, 1H), 8,17 (d, 1H), 7,95 (s, 1H), 7,77 (t, 1H), 7,51 (t, 1H), 6,79 (s, 1H), 5,92 (d, 2H). Análisis calculado para C₁₂H₉N₃O₂: C, 62,87; H, 4,84; N, 18,33. Hallado: C, 62,18; H, 4,74; N, 18,17.

ES 2 354 249 T3

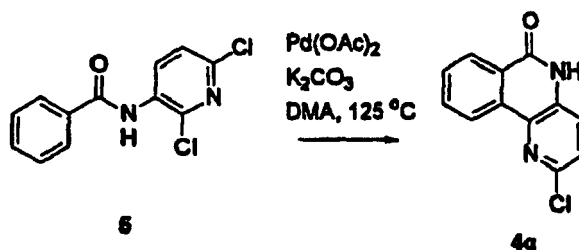
Esquema 3-5

Síntesis de cloroazafenantridonas 4g

5

10

15



20

25

Cloroazafenantridona 4g. (Comparativo) Se preparó la amida 5 a partir de reactivos comerciales, cloruro de benzoílo y 3-amino-2,6-dicloropiridina en DCM en alto rendimiento. Se preparó el producto deseado 4g disolviendo la amida 5 (4,45 g 16,7 mmoles) en DMA (35 ml) y añadiendo carbonato de sodio (1,8 g, 16,7 mmoles) y acetato de paladio (400 mg, cantidad catalítica). Se calentó la mezcla de reacción hasta 125°C durante varias horas hasta que el material de partida ya no estaba presente mediante CCF. Entonces se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se concentró a vacío y se suspendió el residuo bruto en EtOAc en ebullición (100 ml) y se filtró a través de un tapón de celite. Se concentró el filtrado y se eliminó por filtración el sólido que precipitó y se determinó que era el compuesto 4g (520 mg, rendimiento del 13%). P.f. = 285-295 (desc.) °C; ¹H-RMN (d₆-DMSO) δ 11,92 (sa, 1H), 8,62 (d, 1H), 8,32 (d, 1H), 7,95 (t, 1H), 7,77 (m, 2H), 7,62 (d, 1H). Análisis calculado para C₁₂H₇ClN₂O: C, 62,49; H, 3,06; N, 12,15. Hallado: C, 61,40; H, 3,19; N, 11,77.

Esquema 4

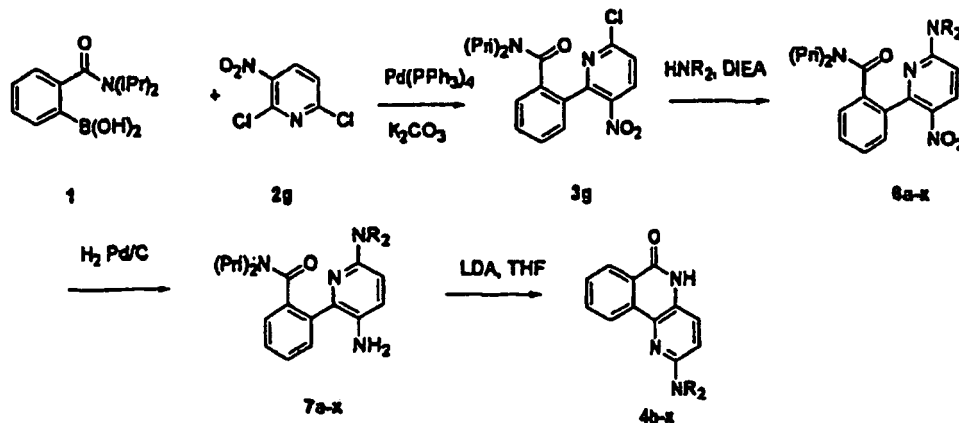
30

Esquema general para la síntesis de aminas de azafenantridona 4h-x

35

40

45



50

55

Procedimiento general para la síntesis del nitro-compuesto 3g. Se añadió el ácido borónico 1 (2,0, 9,0 mmoles) preparado según la bibliografía a una disolución de carbonato de potasio (2,2 g en 8 ml de H₂O) y 2,5-dicloro-3-nitro-piridina 2g (1,4 g 7,3 mmoles) en 100 ml de tolueno/EtOH (8:1). Se desoxigenó esta mezcla a vacío y se rellenó con nitrógeno. Tras agitar la mezcla bajo nitrógeno durante 30 min., se añadió tetrakis(trifenil)fosfina de paladio (250 mg) a la mezcla. Se calentó la disolución hasta 80°C hasta conversión completa (sin material de partida) según CCF (hexanos/EtOAc 50/50). Entonces se extrajo la reacción con agua y se secó la capa de tolueno y se concentró produciendo un aceite bruto que se colocó en una columna de gel de sílice proporcionando el isómero deseado 3g con un rendimiento del 45% (1,20 g). ¹H-RMN (CDCl₃) δ 8,26 (d, 1H), 7,45 (m, 3H), 7,34 (m, 2H), 3,99 (m, 1H), 3,41 (m, 1H), 1,38 (sa, 9H), 1,21 (d, 3H).

60

65

Procedimiento general para la síntesis de aminas 6a-x. Se disolvió el cloruro 3g (300 mg, 0,83 mmoles) en THF (5 ml) seguido por la adición de diisopropiletilamina (160 μl, 0,91 mmoles) y 2-(4-aminoetil)morfolina (220 μl, 1,66 mmoles). Se calentó la reacción hasta 65°C durante la noche y el análisis por CCF indicó una mancha de bajo recorrido en el nivel inicial (EtOAc). Se añadió agua (5 ml) a la mezcla seguido por extracción con DCM (3 x 10 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas y se concentraron produciendo una espuma en bruto que solidificó tras secado a vacío. Se trituró el sólido con hexanos y se filtró produciendo 320 mg (85%) de la amina deseada 6a.

ES 2 354 249 T3

$NR_2 = \text{aminoetilmorfolina (6a)}$. Rendimiento = 85%; $^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6) δ 8,21 (m, 1H), 7,40 (m, 5H), 6,36 (d, 1H), 3,97 (m, 1H), 3,70 (m, 6H), 3,47 (m, 2H), 3,31 (m, 1H), 2,45 (m, 6H), 1,48 (sa, 3H), 1,24 (sa, 3H), 1,06 (sa, 3H), 0,87 (sa, 3H).

5 $NR_2 = N\text{-metilpiperazina (6b)}$. Rendimiento = 72%; EM (ES+) = 426,21.

$NR_2 = N\text{-boc-[2.2.1]-diazabicycloheptano (6c)}$. Rendimiento = 72%, EM (ES+) = 486,43.

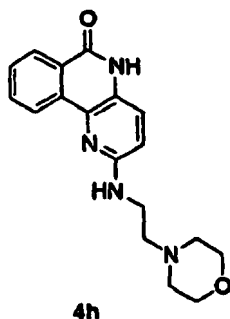
$NR_2 = N\text{-boc-piperazina (6d)}$. Rendimiento = 72%, EM (ES+) = 473,23.

10

$NR_2 = \text{amino (6e)}$. Rendimiento = 72%, EM (ES+) = 343,31.

15 *Procedimiento general para la síntesis de anilinas 7a-x*. Se disolvió el nitro-compuesto 6a (300 mg, 0,66 mmoles) en MeOH (20 ml) con Pd/C (100 mg) y se hidrogenó a 30 psi durante 2 h. La CCF indicó conversión completa del nitro-compuesto (MeOH al 10%/EtOAc). Se filtró la mezcla de reacción a través de un tapón de celite y se concentró el filtrado y se secó. Se usó la espuma en bruto en la etapa de ciclación sin purificación adicional. El rendimiento en seco de la anilina 7a fue de 275 mg (99%). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl $_3$) δ 7,41 (m, 3H), 6,98 (d, 1H), 6,31 (d, 1H), 4,75 (sa, 2H), 3,78 (m, 1H), 3,70 (m, 4H), 3,28 (m, 3H), 2,56 (m, 2H), 2,47 (m, 4H), 1,50 (d, 3H), 1,19 (d, 3H), 1,00 (d, 3H), 0,83 (d, 3H).

20



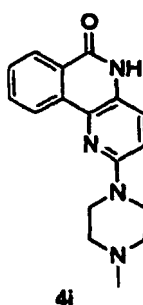
25

30

35 *Procedimiento general para la ciclación de anilinas 7a-x*. Se disolvió la anilina en bruto 7a (270 mg, 0,64 mmoles) en THF (20 ml) y se enfrió hasta -78°C . Se añadió una disolución 2,0 M de LDA (1 ml) a la anilina y se calentó lentamente la reacción hasta temperatura ambiente durante la noche. Se extinguió la mezcla con agua (10 ml) y se extrajo varias veces con EtOAc (3 x 15 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas y se concentraron y se trituró el sólido resultante con EtOAc (3 ml) y se filtró produciendo 125 mg (58%) de la amina deseada 4b. $^1\text{H-RMN}$ (DMSO d_6) δ 11,46 (s, 1H), 8,70 (d, 1H), 8,32 (d, 1H), 7,92 (t, 1H), 7,71 (t, 1H), 7,49 (d, 1H), 6,82 (d, 1H), 6,63 (t, 1H), 3,66 (m, 4H), 3,58 (m, 2H), 2,60 (m, 4H), EM (ES+ = 324,97). P.f. = 250-255°C. Análisis calculado para C $_{18}$ H $_{20}$ N $_4$ O $_2$ (0,5 H $_2$ O) C, 64,85; H, 6,35; N, 16,81. Hallado C, 65,44; H, 6,27; N, 16,71.

40

45

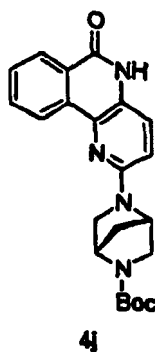


50

55

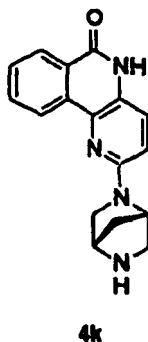
60 $NR_2 = N\text{-metilpiperazina (4i)}$. Rendimiento = 46%; P.f. = 285-288°C; $^1\text{H-RMN}$ (CDCl $_3$) δ 11,50 (s, 1H), 8,65 (d, 1H), 8,27 (d, 1H), 7,88 (t, 1H), 7,69 (t, 1H), 7,56 (d, 1H), 7,14 (d, 1H), 3,56 (t, 4H), 2,46 (t, 4H), 2,24 (s, 3H). Análisis calculado para C $_{17}$ H $_{18}$ N $_4$ O: C, 69,37; H, 6,16; N, 19,03; Hallado: C, 69,38; H, 6,15; N, 18,84.

65



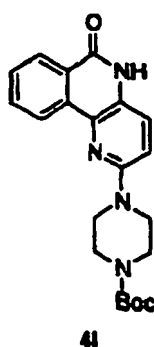
20

$NR_2 = (S,S)$ -*N*-Boc-[2.2.1]diazabicycloheptano (4j). Rendimiento = 36%; P.f. = 259-26°C, 1H -RMN (DMSO- d_6) δ 11,44 (s, 1H), 8,65 (d, 1H), 8,26 (d, 1H), 7,67 (t, 1H), 7,45 (d, 1H), 6,85 (t, 1H), 4,92 (dd, 2H), 3,38 (m, 2H), 3,30 (s, 1H), 3,23 (m, 1H), 1,96 (d, 2H), 1,60 (s, 9H). Análisis calculado para $C_{22}H_{24}N_4O_3$: C, 67,33; H, 6,16; N, 14,28. Hallado: C, 67,30; H, 6,19; N, 14,21.



40

$NR_2 = [2.2.1]$ -diazabicycloheptano (4k). Se preparó este compuesto mediante la desprotección del grupo boc por TFA al 10%/DCM (16 h). Rendimiento = 98%; P.f. = 160-163°C; 1H -RMN (DMSO- d_6) δ 11,54 (s, 1H), 8,68 (d, 1H), 8,59 (d, 1H), 7,90 (t, 1H), 7,72 (t, 1H), 7,61 (d, 1H), 6,92 (d, 1H), 5,04 (s, 1H), 4,33 (s, 1H), 3,68 (m, 2H), 3,29 (m, 2H), 2,19 (d, 1H), 2,00 (d, 1H). Análisis calculado para $C_{17}H_{16}N_4O$ (1,1 $C_2HF_3O_2$)(0,4 H_2O): C, 54,41; H, 4,00; N, 13,22. Hallado: C, 54,12; H, 4,26; N, 12,98.

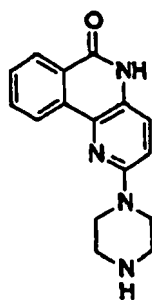


60

$NB_2 =$ Boc-piperazina (4l). Rendimiento = 48%; P.f. = 231-235°C, 1H -RMN (DMSO- d_6) δ 11,52 (s, 1H), 8,67 (d, 1H), 8,27 (d, 1H), 7,89 (t, 2H), 7,70 (t, 2H), 7,58 (d, 1H), 3,50 (dd, 8H), 1,44 (s, 9H) Análisis calculado para $C_{21}H_{24}N_4O_3$ (0,5 H_2O): C, 64,77; H, 6,47; N, 14,39. Hallado: C, 64,83; H, 6,39; N, 14,23.

65

ES 2 354 249 T3



4m

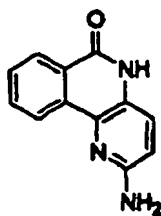
5

10

15

20

$NB_2 = \text{piperazina (4m)}$. Se preparó este compuesto mediante la desprotección del grupo boc con TFA al 10%/DCM (16 h). Rendimiento = 99%; P.f. = 250-252°C; $^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6) δ 11,56 (s, 1H), 8,93 (sa, 1H), 8,65 (d, 1H), 8,27 (d, 1H), 7,87 (t, 1H), 7,70 (t, 1H), 7,61 (d, 1H), 7,21 (d, 1H), 3,61 (t, 4H), 3,26 (sa, 4H). Análisis calculado para $C_{16}H_{16}N_4O$ (0,5 H_2O) (1,9 TFA): C, 47,18; H, 3,40; N, 11,11. Hallado: C, 47,39; H, 3,64; N, 11,18.



4n

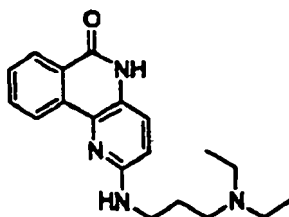
25

30

35

$NR_2 = \text{amino (4n)}$. Rendimiento = 50%; P.f. = 310-315°C; $^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6) δ 11,42 (s, 1H), 8,30 (d, 1H), 8,26 (d, 1H), 7,85 (t, 1H), 7,66 (t, 1H), 7,44 (d, 1H), 6,70 (d, 1H), 6,02 (d, 2H). Análisis calculado para $C_{12}H_9N_3O$ (0,11 EtOAc): C, 67,64; H, 4,31; N, 19,02. Hallado: C, 67,98; H, 4,57; N, 18,67.

40



4o

45

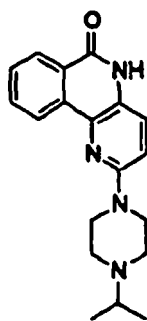
50

55

$NR_2 = \text{N,N-dietil-aminopropil (4o)}$ (Comparativo) Rendimiento = 45%; P.f. = 114-116°C; $^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6) 8 300 MHz 0,96 (t, 6H, J = 7,07, 7,73), 1,72 (m, 2H), 2,49 (m, 6H), 3,39 (m, 2H), 6,70 (d, 1H, J = 8,84), 7,41 (d, 1H, J = 8,84), 7,65 (t, 1H, J = 8,08, 8,09), 7,84 (t, 1H J = 8,09, 8,34), 8,24 (d, 1H, J = 7,83), 8,83 (d, 1H, J = 7,83), 11,4 (s, 1H).

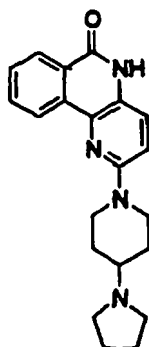
60

65



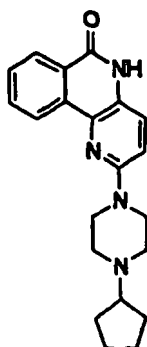
4p

$NR_2 = N$ -isopropil-piperazina (4p). P.f. = 260-264°C. 1H -RMN (DMSO- d_6) δ 300 MHz 11,48 (s, 1H), 8,63 (d, J = 7,44 Hz, 1H), 8,25 (d, J = 7,25 Hz, 1H), 7,86 (t, J = 8,2, 8,39 Hz, 1H), 7,67 (t, J = 8,20, 6,87 Hz, 1H), 7,53 (d, J = 9,15 Hz, 1H), 7,10 (d, J = 9,16 Hz, 1H), 3,55 (t, J = 4,96, 4,58 Hz, 4H), 2,68 (m, 1H), 2,56 (t, J = 4,77, 4,77 Hz, 4H), 1,00 (d, J = 6,48 Hz, 6H). Análisis calculado para $C_{19}H_{24}N_4O$: C, 70,8; H, 6,9; N, 17,2. Hallado: C, 70,9; H 6,9; N, 17,2.



4q

$NR_2 =$ pirrolilpiperidina (4q). P.f. = 170-175°C; 1H -RMN (D $_2$ O) δ 300 MHz 7,89 (d, J = 7,63 Hz, 1H), 7,80 (d, J = 7,82 Hz, 1H), 7,34 (t, J = 7,06, 7,63 Hz, 1H), 7,43 (t, J = 6,48, 7,44 Hz, 1H), 6,94 (d, J = 8,21 Hz, 1H), 6,54 (d, J = 7,25 Hz, 1H), 4,08 (d, J = 12,21 Hz, 2H), 3,63 (t, J = 9,72, 8,01 Hz, 2H), 3,31 (m, 1H), 3,13 (m, 2H), 2,70 (t, J = 9,92, 12,02 Hz, 2H), 2,11-2,2 (m, 4H), 1,94 (q, 2H), 1,63 (q, 2H). Análisis calculado para $C_{21}H_{24}N_4O$ (1 H $_2$ O) (1,4 HCl): C, 58,4; H, 6,4; N, 13,0; Cl, 11,5. Hallado: C, 58,7; H, 6,8; N, 12,8. Cl, 11,1.

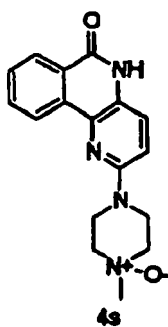


4r

$NR_2 = N$ -ciclopentilpiperazina (4r). P.f. = 29-1-290°C; 1H -RMN (DMSO- d_6) δ 300 MHz 11,50 (s, 1H), 8,65 (d, J = 7,82 Hz, 1H), 8-28 (d, J = 8,01 Hz, 1H), 7,88 (t, J = 7,06, 6,86 Hz, 1H), 7,70 (t, J = 7,06, 7,06 Hz, 1H), 7,56 (d, J = 8,96 Hz, 1H), 7,13 (d, J = 9,16 Hz, 1H), 3,58 (t, J = 4,96, 4,20 Hz, 4H), 2,57 (t, J = 4,38, 4,57 Hz, 4H), 1,83 (m, 2H), 1,64 (m, 2H), 1,57 (m, 1H), 1,50 (m, 2H), 1,37 (m, 2H). Análisis calculado para $C_{21}H_{24}N_4O$ (0,2 H $_2$ O): C, 71,7; H, 7,0; N, 15,9. Hallado: C, 71,6; H, 7,0; N, 15,7.

ES 2 354 249 T3

5

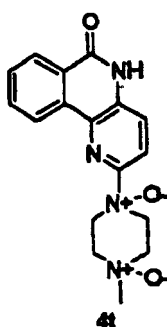


10

15

$NR_2 = N$ -oxo- N -metilpiperazina (4s). (Comparativo) La síntesis de este compuesto y 4t se realizó mediante la oxidación de 4i con un exceso de mCPBA. 1H -RMN (D_2O) δ 300 MHz 7,62 (d, $J = 6$ Hz, 1H), 7,52 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 7,33 (m, 2H), 6,59 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 6,14 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 3,73 (m, 4H), 3,62 (t, 2H), 3,55 (s, 3H), 3,08 (t, 2H).

20



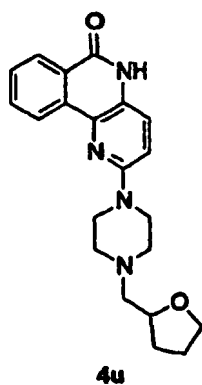
25

30

35

$NR_2 = N$ -oxo-metilpiperidina- N -óxido (4t). P.f. = 230-235°C; 1H -RMN (D_2O) δ 300 MHz 7,97 (m, 2H), 7,51 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 7,43 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 7,36 (t, $J = 9$ Hz, 1H), 7,27 (t, $J = 9$ Hz, 1H), 4,88 (ta, 2H), 4,56 (ta, 2H), 3,96 (da, 2H), 3,69 (s, 3H), 3,64 (da, 2H). Análisis calculado para $C_{17}H_{18}N_4O_3$ (1,25 H_2O): C, 50,1; H, 5,1; N, 13,8. Hallado: C, 50,7; H, 5,2; N, 13,8.

40



45

50

55

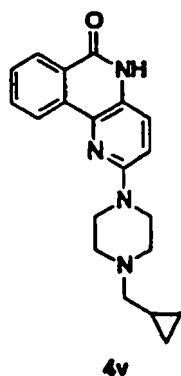
60

$NR_2 = N$ -metilfuranilpiperazina (4u). P.f. = 270-275°C; 1H -RMN ($DMSO-d_6$) 300 MHz 11,49 (s, 1H), 6,63 (d, $J = 8,01$ Hz, 1H), 8,25 (d, $J = 7,82$ Hz, 1H), 7,86 (t, $J = 8,20$, 8,21 Hz, 1H), 7,67 (t, $J = 7,06$, 7,06 Hz), 1H), 7,53 (d, $J = 8,96$, 1H), 7,11 (d, $J = 8,96$ Hz, 1H), 3,96 (m, 1H), 3,73 (q, 1H), 3,39 (q, 1H), 3,55 (t, $J = 4,96$, 3,44 Hz, 4H), 2,61 (m, 2H), 2,55 (m, 2H), 2,41 (m, 2H), 1,86-1,98 (m, 1H), 1,75-1,82 (m, 2H), 1,43-1,47 (m, 1H). Análisis calculado para $C_{23}H_{24}N_4O_2$ (0,3 H_2O): C, 68,2; H, 6,7; N, 15,2. Hallado: C, 68,2; H, 6,7; N, 15,0.

65

ES 2 354 249 T3

5



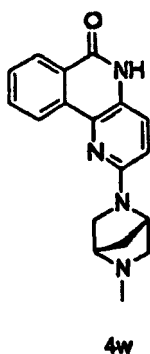
10

15

$NR_2 = N$ -ciclopropilmetilpiperazina (4v). (Comparativo) 1H -RMN (DMSO- d_6) 300 MHz 11,38 (sa, 1H), 8,55 (d, 1H), 8,17 (d, 1H), 7,76 (t, 1H), 7,58 (t, 1H), 7,46 (d, 1H), 7,05 (d, 1H), 3,49 (m, 4H), 2,40 (m, 4H), 2,12 (m, 2H), 0,77 (m, 1H), 0,39 (m, 2H), 0,00 (m, 2H).

20

25



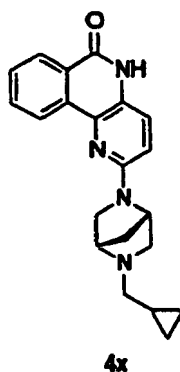
30

35

$NR_2 = N$ -metil-[2.2.1]-diazabicycloheptano (4w). (Comparativo) 1H -RMN (DMSO- d_6) 300 MHz 11,43 (sa, 1H), 8,66 (d, 1H), 8,27 (d, 1H), 7,84 (t, 1H), 7,70 (t, 1H), 7,53 (d, 1H), 6,81 (d, 1H), 4,73 (m, 1H), 3,52 (m, 1H), 3,48 (m, 1H), 3,37 (m, 1H), 3,34 (m, 1H), 2,87 (d, 1H), 2,28 (s, 3H), 1,86 (dd, 2H).

40

45



50

55

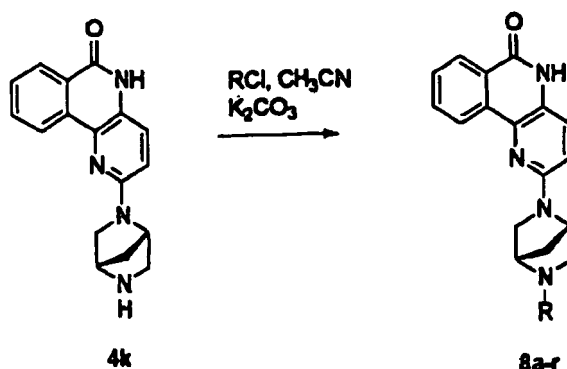
60

$NR_2 = N$ -ciclopropilmetil-[2.2.1]-diazabicycloheptano (4x). (Comparativo) EM (ES+) = 347,28.

65

Esquema 5

Síntesis de las aminas 8a-r (Comparativo)



Procedimiento general para la alquilación de amina 4k. Se colocaron la amina 4k (10 mg), un exceso de K_2CO_3 y el correspondiente cloruro de bencilo en tubos de ensayo en 1 ml de CH_3CN . Se calentaron esas mezclas hasta $60^\circ C$ en bloque de calor durante la noche. Se añadieron EtOAc y HCl al 10%. Se eliminó la fase orgánica y se basificó la fase acuosa con NaOH al 10%. Se extrajo con EtOAc y entonces se evaporó a presión reducida. Se prepararon los compuestos 8a-r de esta manera.

$R = CH_2CN$ (8a). EM (ES+) = 332,41.

$R = CH_2COOEt$ (8b). EM (ES+) = 378,45.

$R = CH_2$ -(2,5-dimetilfenilo) (8c). EM (ES+) = 311,51.

$R = CH_2$ -(4-fluorofenilo) (8d). EM (ES+) = 401,45.

$R = CH_2$ -(4-metoxifenilo) (8e). EM (ES+) = 413,49.

$R = CH_2$ -(3,4-dimetilfenilo) (8f). EM (ES+) = 411,23.

$R = CH_2$ -(3,4-diclorofenilo) (8g). EM (ES+) = 451,36.

$R = CH_2$ -(2-fluorofenilo) (8h). EM (ES+) = 401,42.

$R = CH_2$ -(3-metilfenilo) (8i). EM (ES+) = 397,49.

$R = CH_2$ -(3-clorofenilo) (8j). EM (ES+) = 417,83.

$R = CH_2$ -(2-metilfenilo) (8k). EM (ES+) = 397,41.

$R = CH_2$ -(2-clorofenilo) (8l). EM (ES+) = 417,73.

$R = CH_2$ -(4-carboxifenilo) (8m). EM (ES+) = 427,43.

$R = CH_2$ -(3-carboxifenilo) (8n). EM (ES+) = 427,41.

$R = CH_2$ -(4-metilfenilo) (8o). EM (ES+) = 397,42.

$R = CH_2$ -(4-benciloxifenilo) (8p). EM (ES+) = 489,44.

$R = CH_2$ -(3-fluorofenilo) (8q). EM (ES+) = 400,42.

$R = CH_2$ -(3-metilfenilo) (8r). EM (ES+) = 412,43.

ES 2 354 249 T3

Esquema 6-5

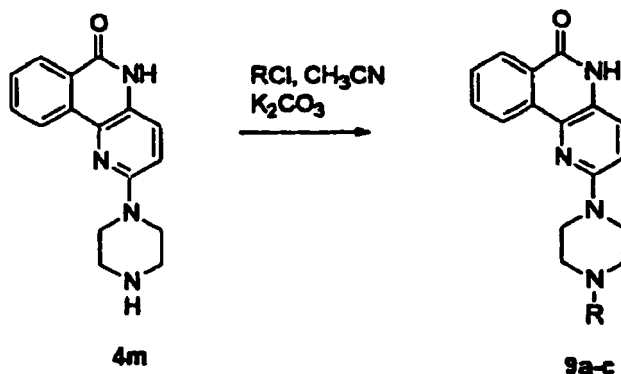
Síntesis de aminas 9a-c (Comparativo)

5

10

15

20



25

Procedimientos generales para la síntesis en paralelo de aminas 9a-c. (Comparativo) A una mezcla de la amina 4m, un exceso de K_2CO_3 y las correspondientes bromometilpiridinas se le añadió 1 ml de CH_3CN . Se calentaron las mezclas de reacción hasta 90°C durante 4 h. Se añadió la resina tris(2-aminoetil)amina y se calentó hasta 70°C durante 1 h para eliminar el exceso de bromometilpiridinas. Se filtraron las mezclas y se añadieron a agua (2 ml). Se extrajeron con EtOAc. Se secaron las fases orgánicas sobre Na_2SO_4 y se evaporaron a presión reducida.

30

$R = \text{CH}_2$ -(*o*-piridina) (9a). EM (ES+) = 372,41.

$R = \text{CH}_2$ -(*m*-piridina) (9b). EM (ES+) = 372,40.

$R = \text{CH}_2$ -(*o*-piridina) (9c). EM (ES+) = 372,41.

35

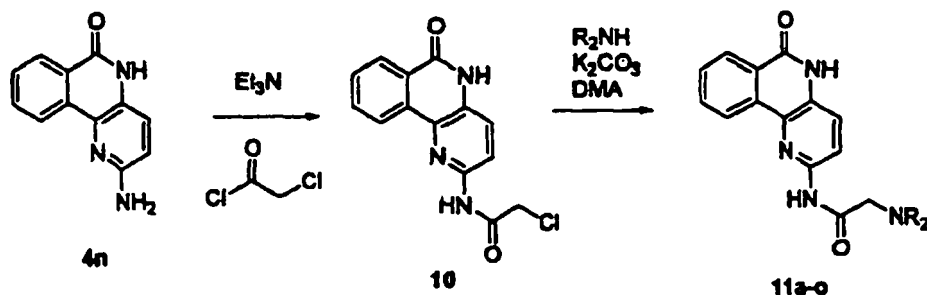
Esquema 7

Síntesis de aminas 11a-x

40

45

50

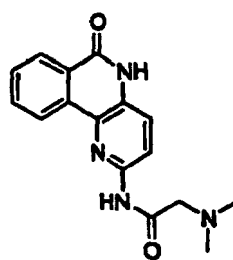


55

Procedimiento para sintetizar el derivado de cloroacetilo (10). Se disolvió la amina 4n en N,N'-dimetilacetamida y se enfrió hasta 0°C en un baño de hielo. Se añadieron trietilamina (1,1 eq.) y cloruro de cloroacetilo (0,44 ml, 5,5 mmoles). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante la noche. Se evaporó el disolvente a presión reducida y al residuo marrón resultante se le añadió agua y NaHCO_3 al 10%. Se recogió el sólido mediante filtración produciendo 1,03 g (rendimiento del 84%). P.f. = 287 - 290°C ; $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d_6) δ 300 MHz 11,81 (s, 1H), 10,94 (s, 1H), 8,66 (d, J = 8,39, 1H), 8,31 (d, J = 7,63, 1H), 8,20 (d, J = 8,01, 1H), 7,96 (t, J = 7,82, 7,44, 1H), 7,77 (m, 2H), 4,42 (s, 2H). Análisis calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{O}_2$: C, 58,5; H, 3,5; N, 14,6; Cl, 14,6. Hallado: C, 58,5; H, 3,6; N, 14,6; Cl, 14,6.

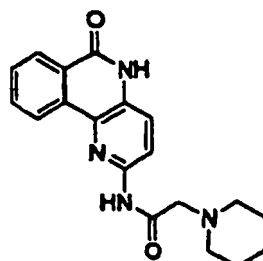
65

ES 2 354 249 T3



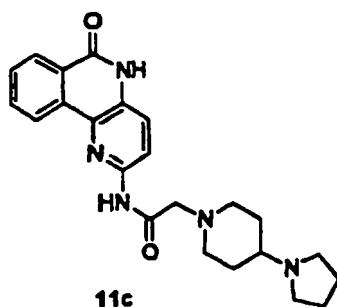
11a

Procedimiento general para la aminación del cloruro 10. Se llevó a cabo la aminación de manera similar a 8a-r. NR₂ = dimetilaminocetilo (11a) (Comparativo) P.f. = 195-198°C; ¹H-RMN (DMSO-d₆) δ 300 MHz 7,87 (d, J = 7,44 Hz, 1H), 7,76 (d, J = 7,82 Hz, 1H), 7,56 (t, J = 1,24, 7,25 Hz, 1H), 7,47 (m, 2H), 7,06 (d, J = 8,96 Hz, 1H), 4,15 (s, 2H), 3,00 (s, 6H). Análisis calculado para C₁₆H₁₆N₄O₂ (1,7 H₂O) (1,2 HCl): C, 50,8; H, 5,5; N, 14,8; Cl, 11,3. Hallado: C, 50,8; H, 5,5; N, 14,7; Cl, 11,2.



11b

NR₂ = piperidinilacetilo (11b). P.f. = 175-180°C; ¹H-RMN (DMSO-d₆) 8 400 MHz 8,03 (da, J = 8,33 Hz, 1H), 7,90 (d, J = 8,09 Hz, 1H), 7,66 (t, J = 7,33, 7,32 Hz, 1H), 7,59 (d, J = 7,83 Hz, 1H), 7,54 (t, J = 7,58, 7,33 Hz, 1H), 7,22 (d, J = 8,59 Hz, 1H), 4,12 (s, 2H), 3,63 (s, 2H), 3,13 (s, 2H), 1,86 (m, 6H). Análisis calculado para C₁₉H₂₀N₄O₂ (2 H₂O) (HCl): C, 54,4; H, 6,3; N, 13,4; Cl, 8,4. Hallado: C, 54,2; H, 6,0; N, 13,1; Cl, 8,6.



11c

NR₂ = pirrolidilpiperidinilacetilo (11c). (Comparativo) 300 MHz 7,61 (m, 2H), 7,47 (t, J = 9 Hz, 1H), 7,38 (m, 2H), 6,90 (d, J = 9 Hz, 1H), 3,68 (m, 2H), 3,50 (s, 2H), 3,33 (m, 4H), 2,68 (m, 2H), 2,39 (m, 3H), 1,87-2,12 (m, 6H). Análisis calculado para C₂₃H₂₇N₅O₂ (2 H₂O) (HCl): C, 57,8; H, 6,8 N, 14,7. Hallado: C, 57,8; H, 6,7 N, 14,6.

NR₂ = 2,3-tetrahidropiridina (11d). EM (ES-) = 333. (comparativo)

NR₂ = isoindol (11e). EM (ES-) = 369. (Comparativo)

NR₂ = difenilamina (11f). EM (ES-) = 407. (Comparativo)

NR₂ = N-metilanisol (11g). EM (ES-) = 387. (Comparativo)

NR₂ = N-metilbencilamina (11h). EM (ES-) = 371. (Comparativo)

NR₂ = N-bencil-N-fenetilamina (11i). EM (ES-) = 461. (Comparativo)

ES 2 354 249 T3

$NR_2 = N$ -hidroxietilpiperazina (11j). MS(ES-) = 381. (Comparativo)

$NR_2 = N,N$ -dipropilamina (11k). EM (ES-) = 331. (Comparativo)

5 $NR_2 = 4$ -oxopiperidina (11l). EM (ES-) = 349. (Comparativo)

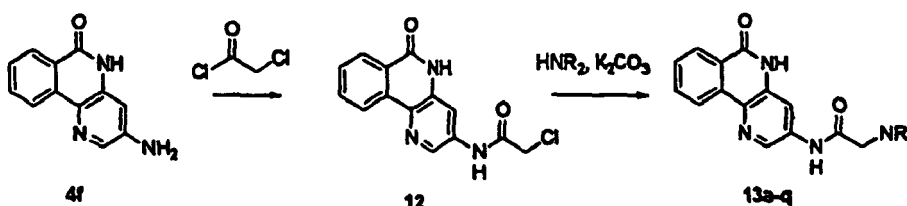
$NR_2 = N,N$ -dibutilamina (11m). EM (ES-) = 379. (Comparativo)

10 $NR_2 =$ morfolina (11n). EM (ES-) = 337. (Comparativo)

$NR_2 =$ imidazol (11o). EM (ES-) = 3 18.

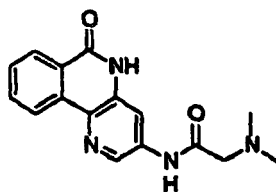
Esquema 8

Derivados de amida de anilina 4f



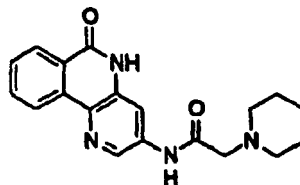
30 *Cloruro 12.* Se sintetizó el cloruro 12 de manera idéntica al cloruro 10. $^1\text{H-RMN}$ (d_6 -DMSO, 300 MHz): 11,81 (sa, 1H), 10,94 (s, 1H), 8,66 (s, 1H), 8,31 (s, 1H), 8,20 (d, 1H), 7,94 (t, 1H), 7,77 (m, 2H), 4,44 (s, 2H).

Procedimiento general para la aminación del cloruro 12. Se llevó a cabo la aminación de manera similar a la aminación del cloruro 10 mencionado anteriormente.



45 **13a**

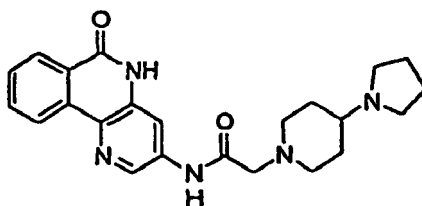
$NR_2 =$ clorhidrato de dimetilamina (13a). (Comparativo) $^1\text{H-RMN}$ (D_2O , 300 MHz): 7,82 (d, $J = 7,44$ Hz, 1H), 7,76 (d, $J = 7,63$ Hz, 1H), 7,70 (d, $J = 2,10$ Hz), 7,63 (t, $J = 7,05, 7,63$ Hz, 1H), 7,50 (t, $J = 7,06, 7,82$ Hz, 1H), 7,40 (d, $J = 2,29$ Hz, 1H), 4,16 (s, 2H), 3,03 (s, 6H).



60 **13b**

65 $NR_2 =$ clorhidrato de piperidina (13b). $^1\text{H-RMN}$ (D_2O , 300 MHz): 400 MHz 8,03 (da, $J = 8,33$ Hz, 1H), 7,90 (d, $J = 8,09$ Hz, 1H), 7,66 (t, $J = 7,33, 7,32$ Hz, 1H), 7,59 (d, $J = 7,83$ Hz, 1H), 7,54 (t, $J = 7,58, 7,33$ Hz, 1H), 7,22 (d, $J = 8,59$ Hz, 1H), 4,12 (s, 2H), 3,63 (s, 2H), 3,13 (s, 2H), 1,86 (m, 6H).

ES 2 354 249 T3



13c

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

$NR_2 = \text{pirrolilpiperidina (13c)}$. (Comparativo) $^1\text{H-RMN (D}_2\text{O, 300 MHz)}$ δ 7,48 (d, J = 9 Hz, 1H), 7,31 (d, J = 9 Hz, 1H), 7,29 (m, 2H), 7,17 (t, J = 9 Hz, 1H), 6,99 (s, 1H), 3,58 (s, 2H), 3,43-3,31 (m, 5H), 3,22 (m, 2H), 2,91 (m, 2H), 2,74 (m, 2H), 2,48 (s, 6H), 2,14 (m, 2H), 1,89-1,65 (m, 6H). Análisis calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_2$ (2 H_2O) (2 MsOH): C, 50,2; H, 5,9; N, 11,7. Hallado: C, 50,2; H, 6,0; N, 11,6.

$NR_2 = N\text{-isopropilpiperidina (13d)}$. (Comparativo) $^1\text{H-RMN (D}_2\text{O, 300 MHz)}$ 8 300 MHz 7,78 (d, J = 9 Hz, 1H), 7,60 (m, 3H), 7,50 (t, J = 9 Hz, 1H), 7,23 (s, 1H), 3,74 (m, 3H), 3,47 (s, 2H), 3,40 (m, 4H), 2,90 (m, 2H), 1,55 (d, J = 6 Hz, 6H). Análisis calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_2$ (2,25 H_2O) (1 HCl): C, 55,4; H 6,5; N, 15,4. Hallado: C, 55,4; H, 6,6; N, 15,4.

$NR_2 = \text{aminoetilpirrolidina (13e)}$. EM (ES+) = 366,35. (Comparativo)

$NR_2 = 2\text{-aminopropil-N-metilpirrolidina (13f)}$. EM (ES+) = 394,41. (Comparativo)

$NR_2 = o\text{-aminoetilpiridina (13g)}$. EM (ES+) = 374,30. (Comparativo)

$NR_2 = m\text{-aminoetilpiridina (13h)}$. EM (ES+) = 374,25. (Comparativo)

$NR_2 = N\text{-bencilpiperazina (13i)}$. EM (ES+) = 428,42. (Comparativo)

$NR_2 = \text{aminoetilmorfolina (13j)}$. EM (ES+) = 382,32. (Comparativo)

$NR_2 = N,N\text{-dietiletilendiamina (13k)}$. EM (ES+) = 368,31. (Comparativo)

$NR_2 = N,N\text{-dimetiletilendiamina (13l)}$. EM = (ES+) = 340,21. (Comparativo)

$NR_2 = N,N''\text{dietilpropilendiamina, (13m)}$. EM (ES+) = 382,41. (Comparativo)

$NR_2 = N,N,N\text{-trimetilpropilendiamina (13n)}$. EM (ES+) = 368,32. (Comparativo)

$NR_2 = \text{homopiperazina (13o)}$. EM (ES+) = 352,23. (Comparativo)

$NR_2 = N\text{-metilpiperazina (13p)}$. EM (ES+) = 352,32. (Comparativo)

$NR_2 = \text{piperonilpiperazina (13q)}$. EM (ES+) = 472,44. (Comparativo)

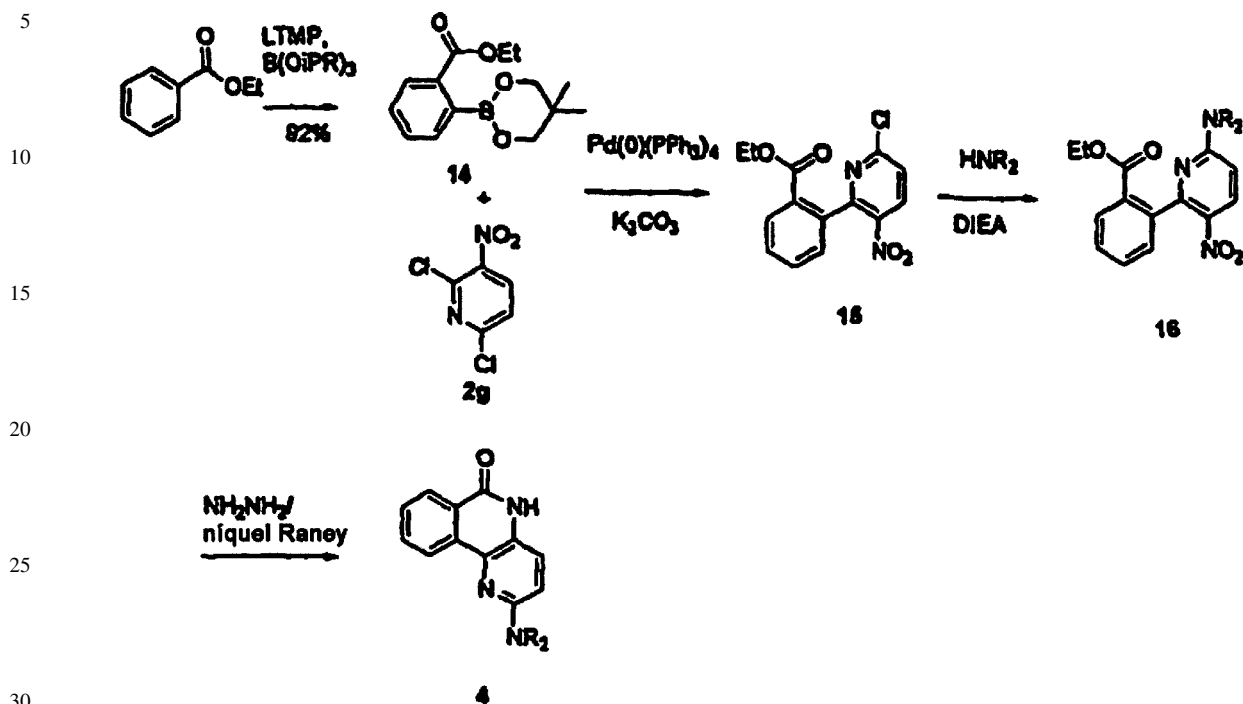
$NR_2 = \text{aminoetilpirrolidin-2-ona (13r)}$. EM (ES+) = 394,40. (Comparativo)

$NR_2 = \text{aminoetilpiperidina (13s)}$. EM (ES+) = 380,32. (Comparativo)

ES 2 354 249 T3

Esquema 9

Síntesis alternativa de aminas 4a-x



35 *Síntesis alternativa general de aminas 4a-x (ejemplo 4i).* La síntesis propuesta a continuación sería más susceptible de ampliarse a escala. El éster borónico 14 puede prepararse a gran escala (20 g) según la referencia bibliográfica (Kristensen, J. *et al.* Org. Lett. 2001, 3(10), 1435-1437). Esta síntesis elimina una etapa, la ciclación de LDA dado que la reducción/ciclación debe hacerse en la misma etapa.

40 *Síntesis de nitro-cloruro 15.* Se disolvieron el éster borónico 14 (16,0 g, 61,0 mmoles), dinitro-cloruro 2g (11,7 g, 61 mmoles) y carbonato de potasio (21 g, 152 mmoles) en tolueno/EtOH (20: 1, 300 ml). Se evacuó esta mezcla y se relleno varias veces con nitrógeno. Entonces, se añadió tetrakis(trifenilfosfina) de paladio (~2 g) seguido por calentamiento de la mezcla hasta 80°C durante la noche. Entonces se concentró la reacción a vacío y se repartió entre EtOAc (200 ml) y H₂O (200 ml). Se secó la fase orgánica con sulfato de sodio y se concentró a vacío. Se sometió a cromatografía el residuo bruto usando un sistema en gradiente (EtOAc al 5%/hexanos→EtOAc al 20%/hexanos). Se aisló el producto final ($R_f = 0,3$, EtOAc al 10%/hexanos) como un sólido/espuma de bajo punto de fusión (7,12 g, 38%). Se aislaron otros 1,3 g (7,0%) de una mezcla de isómeros (otro isómero $R_f = 0,25$, EtOAc al 10%/hexanos) a partir de la columna. ¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 8,40 (d, 1H), 8,14 (d, 1H), 7,65 (t, 1H), 7,55 (m,2H), 7,32 (d, 1H), 4,16 (q, 2H), 1,19 (t, 3H).

50 *Síntesis de diamina 16.* Se disolvió el cloruro 14 (7,12 g 23,2 mmoles) en DCM (250 ml). Se añadió diisopropil-etilamina (3,3 g, 25,5 mmoles) a esta disolución seguida por N-metilpiperazina (4,6 g, 46,4 mmoles). Se agitó esta mezcla durante la noche hasta que la conversión completa del cloruro era evidente mediante CCF (R_f de diamina 0,1, EtOAc). Se sometió a tratamiento final la reacción mediante extracción con agua (2 x 100 ml). Se secó la fase orgánica con sulfato de sodio y se concentró a vacío produciendo la diamina en bruto 16 (6,56 g, 77%). ¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 8,32 (d, 1H), 8,07 (d, 1H), 7,58 (t, 1H), 7,48 (1,1H), 7,26 (d, 1H), 6,60 (d, 1H), 4,13 (q, 2H), 3,73 (t, 4H), 2,46 (t, 4H), 2,33 (s, 3H), 1,13 (t, 3H).

55 *Reducción/ciclación para formar (4i).* Se disolvió la diamina en bruto 16 en MeOH (300 ml). Se añadió níquel Raney húmedo (500 mg, cantidad catódica) seguido por adición gota a gota de hidrato de hidrazina (4,1 g, 82 mmoles). Se calentó la mezcla hasta reflujo y se monitorizó mediante CCF hasta su terminación (aproximadamente 3 h). El valor R_f del producto fue 0,1 en MeOH al 10%/EtOAc. Entonces se eliminó por filtración el níquel Raney y se concentró el filtrado y se suspendió en HCl 1 N/EtOAc (150 ml/100 ml) y se eliminó por filtración el sólido que resultó y se trituró con 50 ml de CH₃CN y se filtró. Se secó el sólido amarillo claro resultante a alto vacío durante 2 h produciendo 4,1 g (rendimiento del 84%) de GPI 16539. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ 11,50 (sa, 1H), 8,67 (d, 1H), 8,28 (d, 1H), 7,88 (t, 1H), 7,69 (t, 1H), 7,58 (d, 1H), 7,15 (d,1H), 3,58 (t, 4H), 2,46 (t, 4H), 2,24 (s, 3H).

65 *Formación de la sal mesilato (4i').* A una disolución de la diamina 4i (2,85 g, 9,7 mmoles) en 500 ml de THF seco se le añadió ácido metanosulfónico (0,65 ml, 10 mmoles). Se agitó la mezcla de reacción bajo N₂ a temperatura ambiente durante la noche. Se recogió un sólido de color hueso mediante filtración y se lavó con éter. Se secó a vacío el sólido produciendo 3,2 g (rendimiento del 85%).

Los compuestos de esta invención contienen uno o más átomos de carbono asimétricos. Por tanto, la invención incluye los estereoisómeros individuales y mezclas de los mismos así como los compuestos racémicos. Los isómeros individuales pueden prepararse o aislarse mediante métodos conocidos en la técnica.

5 Los compuestos de la invención presentan actividad farmacológica y, por tanto, son útiles como productos farmacéuticos. En particular los compuestos presentan actividad en los sistemas vesicular cardiaco y nervioso central.

Otras variaciones y modificaciones de esta invención usando las rutas sintéticas descritas anteriormente resultarán obvias para los expertos habituales en la técnica.

10

Métodos de uso de los compuestos de la invención

15 Los compuestos de la presente invención pueden tratar o prevenir el daño tisular que resulta de la muerte o el daño celular debido a necrosis o apoptosis; pueden mejorar el daño tisular cardiovascular o neural, incluyendo el que sigue a isquemia focal, infarto de miocardio y lesión por reperfusión; pueden tratar diversas enfermedades y estados provocados o exacerbados por la actividad de PARP; pueden extender o aumentar el tiempo de vida o la capacidad proliferativa de las células; pueden alterar la expresión génica de células senescentes; y pueden radiosensibilizar células. Generalmente, la inhibición de la actividad de PARP le evita a la célula una pérdida de energía, previniendo, en el caso de células neurales, la despolarización irreversible de las neuronas y, por tanto, proporciona neuroprotección. Sin querer restringirse a ninguna teoría particular, se cree que la activación de PARP puede desempeñar un papel común en todavía otros mecanismos excitotóxicos, tal vez aún no descubiertos, además de la producción de radicales libres y NO.

25 Por los motivos anteriores, la presente invención se refiere además a un método de administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos anteriormente identificados en una cantidad suficiente para inhibir la actividad de PARP, para tratar o prevenir el daño tisular que resulta de la muerte o el daño celular debido a necrosis o apoptosis, para efectuar una actividad neuronal no mediada por toxicidad por NMDA, para efectuar una actividad neuronal mediada por toxicidad por NMDA, para tratar el daño tisular neural que resulta de una lesión por isquemia y reperfusión, trastornos neurológicos y enfermedades neurodegenerativas; para prevenir o tratar ictus vascular; para tratar o prevenir trastornos cardiovasculares; para tratar otros estados y/o trastornos tales como degeneración muscular relacionada con la edad, SIDA y otras enfermedades de senescencia inmunitaria, inflamación, gota, artritis, aterosclerosis, caquexia, cáncer, enfermedades degenerativas del músculo esquelético que implican senescencia replicativa, diabetes, traumatismo craneal, senescencia inmunitaria, inflamación, gota, trastornos inflamatorios del intestino (tales como colitis y enfermedad de Crohn), distrofia muscular, artrosis, osteoporosis, dolor agudo y/o crónico (tal como dolor neuropático), insuficiencia renal, isquemia retiniana, choque septicémico (tal como choque endotóxico), y envejecimiento de la piel; para extender el tiempo de vida y la capacidad proliferativa de las células; para alterar la expresión génica de células senescentes; o para radiosensibilizar células tumorales hipóxicas. La presente invención también se refiere al tratamiento de enfermedades y estados en un animal que comprende administrar a dicho animal una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos anteriormente identificados.

45 En particular, la presente invención se refiere a un método de tratamiento, prevención o inhibición de un trastorno neurológico en un animal, que comprende administrar a dicho animal una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos anteriormente identificados. En una realización particularmente preferida, el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en neuropatía periférica provocada por un estado patológico o una lesión física, lesión cerebral traumática, daño físico a la médula espinal, ictus asociado con daño cerebral, isquemia focal, isquemia global, lesión por reperfusión, enfermedad desmielinizante y trastorno neurológico relacionado con neurodegeneración. Otra realización preferida es cuando la lesión por reperfusión es un ictus vascular. Aún otra realización preferida es cuando la neuropatía periférica está provocada por el síndrome de Guillain-Barre. Todavía otra realización preferida es cuando la enfermedad desmielinizante y el trastorno neurológico se refieren a neurodegeneración. Otra realización preferida es cuando la lesión por reperfusión es un ictus vascular. Todavía otra realización preferida es cuando la enfermedad desmielinizante es esclerosis múltiple. Otra realización preferida es cuando el trastorno neurológico relacionado con neurodegeneración se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica.

55

Aún otra realización preferida es un método de tratamiento, prevención o inhibición de una enfermedad cardiovascular en un animal, tal como angina de pecho, infarto de miocardio, isquemia cardiovascular y daño tisular cardiovascular relacionado con la activación de PARP, administrando a dicho animal una cantidad eficaz de los compuestos de la presente invención.

60

La presente invención también contempla el uso de compuestos según la reivindicación 1 para inhibir la actividad de PARP, para tratar, prevenir o inhibir el daño tisular que resulta de la muerte o el daño celular debido a necrosis o apoptosis, para tratar, prevenir o inhibir un trastorno neurológico en un animal.

65 En una realización particularmente preferida, el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en neuropatía periférica provocada por un estado patológico o una lesión física, lesión cerebral traumática, daño físico a la médula espinal, ictus asociado con daño cerebral, isquemia focal, isquemia global, lesión por reperfusión, enfermedad desmielinizante y trastorno neurológico relacionado con neurodegeneración.

ES 2 354 249 T3

Otra realización preferida es cuando la lesión por reperfusión es un ictus vascular. Aún otra realización preferida es cuando la neuropatía periférica está provocada por el síndrome de Guillain-Barre. Todavía otra realización preferida es cuando la enfermedad desmielinizante es esclerosis múltiple. Otra realización preferida es cuando el trastorno neurológico relacionado con neurodegeneración se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica.

La presente invención también contempla el uso de compuestos según la reivindicación 1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades y los trastornos en un animal descrito en el presente documento.

En una realización particular, la enfermedad o el trastorno es un trastorno neurológico.

En una realización particularmente preferida, el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en neuropatía periférica provocada por un estado patológico o una lesión física, lesión cerebral traumática, daño físico a la médula espinal, ictus asociado con daño cerebral, isquemia focal, isquemia global, lesión por reperfusión, enfermedad desmielinizante y trastorno neurológico relacionado con neurodegeneración. Otra realización preferida es cuando la lesión por reperfusión es un ictus vascular. Aún otra realización preferida es cuando la neuropatía periférica está provocada por el síndrome de Guillain-Barre.

Todavía otra realización preferida es cuando la enfermedad desmielinizante es esclerosis múltiple. Otra realización preferida es cuando el trastorno neurológico relacionado con neurodegeneración se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica.

La expresión “prevenir la neurodegeneración” incluye la capacidad para prevenir la neurodegeneración en pacientes con diagnóstico reciente de enfermedad neurodegenerativa, o en riesgo de desarrollar una nueva enfermedad degenerativa, y para prevenir la neurodegeneración adicional en pacientes que ya están padeciendo o tienen síntomas de una enfermedad neurodegenerativa.

El término “tratamiento” tal como se usa en el presente documento cubre cualquier tratamiento de una enfermedad y/o un estado en un animal, particularmente un ser humano, e incluye:

- (i) prevenir que se produzca una enfermedad y/o un estado en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad y/o al estado pero que todavía no se ha diagnosticado que lo tiene;
- (ii) inhibir la enfermedad y/o el estado, es decir, detener su desarrollo; o
- (iii) aliviar la enfermedad y/o el estado, es decir, provocar la regresión de la enfermedad y/o el estado.

Tal como se usa en el presente documento, el término “daño tisular neural que resulta de una lesión por isquemia y reperfusión” incluye neurotoxicidad, tal como la observada en el ictus vascular y la isquemia focal y global. Tal como se usa en el presente documento, la expresión “enfermedades neurodegenerativas” incluye enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington.

El término “isquemia” se refiere a la anemia de tejido localizado debido a la obstrucción del flujo de entrada de sangre arterial. La isquemia global se produce en condiciones en las que el flujo sanguíneo a todo el cerebro cesa durante un periodo de tiempo, de tal manera que puede dar como resultado un paro cardíaco. La isquemia focal se produce en condiciones en las que una parte del cerebro se ve privada de su suministro de sangre normal, de manera que puede dar como resultado oclusión tromboembólica de un vaso cerebral, traumatismo craneoencefálico, edema y tumores cerebrales.

La expresión “enfermedad cardiovascular” se refiere a infarto de miocardio, angina de pecho, isquemia miocárdica o vascular y estados relacionados tal como conocerían los expertos en la técnica que implican disfunción de o daño tisular al corazón o la vasculatura y, especialmente, pero sin limitarse a, daño tisular relacionado con la activación de PARP.

El término “radiosensibilizador”, tal como se usa en el presente documento, se define como un una molécula, preferiblemente una molécula de bajo peso molecular, administrada a animales en cantidades terapéuticamente eficaces para aumentar la sensibilidad de las células que van a radiosensibilizarse a la radiación electromagnética y/o para promover el tratamiento de enfermedades que pueden tratarse con radiación electromagnética. Las enfermedades que pueden tratarse con radiación electromagnética incluyen enfermedades neoplásicas, tumores benignos y malignos y células cancerosas. El tratamiento con radiación electromagnética de otras enfermedades no enumeradas en el presente documento también se contempla por la presente invención. Los términos “radiación electromagnética” y “radiación” tal como se usan en el presente documento incluyen, pero sin limitarse a, la radiación que tiene la longitud de onda de 10^{-20} a 10^0 metros. Realizaciones preferidas de la presente invención emplean la radiación electromagnética de: radiación gamma (de 10^{-20} a 10^{-13} m), radiación de rayos X (de 10^{-11} a 10^{-9} m), luz ultravioleta (de 10 nm a 400 nm), luz visible (de 400 nm a 700 nm), radiación infrarroja (de 700 nm a 1,0 mm), o radiación de microondas (de 1 mm a 30 cm).

Composiciones y métodos para efectuar la actividad neuronal

Preferiblemente, los compuestos de la invención inhiben la actividad de PARP y, por tanto, se cree que son útiles para tratar el daño tisular neural, particularmente el daño que resulta de una lesión por isquemia y reperfusión cerebral o enfermedades neurodegenerativas en animales. La expresión “tejido nervioso” se refiere a los diversos componentes que constituyen el sistema nervioso incluyendo, sin limitación, neuronas, células de soporte neuronal, glía, células de Schwann, vasculatura contenida dentro de y que suministra a estas estructuras, el sistema nervioso central, el cerebro, el tronco encefálico, la médula espinal, la unión del sistema nervioso central con el sistema nervioso periférico, el sistema nervioso periférico y estructuras relacionadas.

Además, según la invención, una cantidad terapéutica eficaz de los compuestos y las composiciones descritas anteriormente se administran a animales para efectuar una actividad neuronal, particularmente una que no está mediada por neurotoxicidad por NMDA. Tal actividad neuronal puede consistir en la estimulación de neuronas dañadas, la promoción de la regeneración neuronal, la prevención de la neurodegeneración y el tratamiento de un trastorno neurológico. Por consiguiente, la presente invención se refiere además a un método para efectuar una actividad neuronal en un animal, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto según la reivindicación 1 a dicho animal.

Ejemplos de trastornos neurológicos que pueden tratarse mediante el método de usar la presente invención incluyen, sin limitación, neuralgia del trigémino; neuralgia glossofaríngea; parálisis de Bell; miastenia grave; distrofia muscular; esclerosis lateral amiotrófica; atrofia muscular progresiva; atrofia muscular hereditaria bulbar progresiva; síndromes de disco intervertebral prolapsado o roto, herniado; espondilosis cervical; trastornos del plexo; síndromes de destrucción de la salida torácica; neuropatías periféricas tales como las provocadas por plomo, dapsona, garrapatas, porfiria o síndrome de Guillain-Barré; enfermedad de Alzheimer; enfermedad de Huntington y enfermedad de Parkinson.

El método de la presente invención es particularmente útil para tratar un trastorno neurológico seleccionado del grupo que consiste en neuropatía periférica provocada por un estado patológico o una lesión física; traumatismo craneal, tal como lesión cerebral traumática; daño físico a la médula espinal; ictus asociado con daño cerebral, tal como ictus vascular asociado con hipoxia y daño cerebral, isquemia cerebral focal, isquemia cerebral global y lesión cerebral por reperfusión; enfermedades desmielinizantes, tales como esclerosis múltiple; y trastornos neurológicos relacionado con neurodegeneración, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y esclerosis lateral amiotrófica (ALS).

Tratamiento de otros trastornos relacionados con PARP

Los compuestos, las composiciones y los métodos de la presente invención son particularmente útiles para tratar o prevenir el daño tisular que resulta del daño o la muerte celular debido a necrosis o apoptosis.

Los compuestos, las composiciones y los métodos de la invención también pueden usarse para tratar un trastorno cardiovascular en un animal, administrando una cantidad eficaz de un compuesto según la reivindicación 1 al animal. Tal como se usa en el presente documento, la expresión “trastornos cardiovasculares” se refiere a aquellos trastornos que pueden o bien provocar isquemia o bien están provocados por reperfusión del corazón. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, arteriopatía coronaria, angina de pecho, infarto de miocardio, daño tisular cardiovascular provocado por paro cardíaco, daño tisular cardiovascular provocado por derivación cardíaca, choque cardiogénico y estados relacionados que conocerán los expertos habituales en la técnica o que implican disfunción de o daño tisular al corazón o la vasculatura, especialmente, pero sin limitarse a, el daño tisular relacionado con la activación de PARP.

Por ejemplo, se cree que los métodos de la invención son útiles para tratar el daño tisular cardíaco, particularmente el daño que resulta de la isquemia cardíaca o provocado por lesión por reperfusión en animales. Los métodos de la invención son particularmente útiles para tratar trastornos cardiovasculares seleccionados del grupo que consiste en: arteriopatía coronaria, tal como aterosclerosis; angina de pecho; infarto de miocardio; isquemia miocárdica y paro cardíaco; derivación cardíaca; y choque cardiogénico. Los métodos de la invención son particularmente útiles en el tratamiento de las formas agudas de los trastornos cardiovasculares anteriores.

Además, los métodos de la invención pueden usarse para tratar el daño tisular que resulta de la muerte o el daño celular debido a necrosis o apoptosis, el daño tisular neural que resulta de una lesión por isquemia y reperfusión, los trastornos neurológicos y las enfermedades neurodegenerativas; para prevenir o tratar ictus vascular; para tratar o prevenir trastornos cardiovasculares; para tratar otros estados y/o trastornos tales como degeneración muscular relacionada con la edad, SIDA y otras enfermedades de senescencia inmunitaria, inflamación, gota, artritis, aterosclerosis, caquexia, cáncer, enfermedades degenerativas del músculo esquelético que implican senescencia replicativa, diabetes, traumatismo craneal, senescencia inmunitaria, trastornos inflamatorios del intestino (tales como colitis y enfermedad de Crohn), distrofia muscular, artrosis, osteoporosis, dolor agudo y/o crónico (tal como dolor neuropático), insuficiencia renal, isquemia retiniana, choque septicémico (tal como choque endotóxico) y envejecimiento de la piel; para extender el tiempo de vida y la capacidad proliferativa de las células; para alterar la expresión génica de células senescentes; o para radiosensibilizar células tumorales.

Todavía adicionalmente, los métodos de la invención pueden usarse para tratar el cáncer y para radiosensibilizar células tumorales. El término “cáncer” se interpreta en líneas generales. Los compuestos de la presente invención pueden ser un “agente anticancerígeno”, término que también abarca “agentes contra el crecimiento de células tumorales” y “agentes antineoplásicos”. Por ejemplo, los métodos de la invención son útiles para tratar cánceres y radiosensibilizar células tumorales en cánceres tales como tumores productores de ACTH, leucemia linfocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, cáncer de la corteza suprarrenal, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer cervical, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, cáncer colorrectal, linfoma cutáneo de células T, cáncer endometrial, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, cáncer de vesícula biliar, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (de células pequeñas y/o no pequeñas), derrame peritoneal neoplásico, derrame pleural neoplásico, melanoma, mesotelioma, mieloma múltiple, neuroblastoma, linfoma de no Hodgkin, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer de ovario (célula germinal), cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer de pene, retinoblastoma, cáncer de piel, sarcoma de tejidos blandos, carcinomas de células escamosas, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides, neoplasmas trofoblásticos, cáncer uterino, cáncer vaginal, cáncer de la vulva y tumor de Wilm.

El término “radiosensibilizador”, tal como se usa en el presente documento, se define como una molécula, preferiblemente una molécula de bajo peso molecular, administrada a animales en cantidades terapéuticamente eficaces para aumentar la sensibilidad de las células que van a radiosensibilizarse a la radiación electromagnética y/o para promover el tratamiento de enfermedades que pueden tratarse con radiación electromagnética. Las enfermedades que pueden tratarse con radiación electromagnética incluyen enfermedades neoplásicas, tumores benignos y malignos, y células cancerosas. Tratamiento con radiación electromagnética de otras enfermedades no enumeradas en el presente documento también se contempla por la presente invención. Los términos “radiación electromagnética” y “radiación” tal como se usan en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, radiación que tiene la longitud de onda de 10^{-20} a 10^0 metros. Realizaciones preferidas de la presente invención emplean la radiación electromagnética de radiación gamma (de 10^{-20} a 10^{-13} m), radiación de rayos X (de 10^{-11} a 10^{-9} m), luz ultravioleta (de 10 nm a 400 nm), luz visible (de 400 nm a 700 nm), radiación infrarroja (de 700 nm a 1,0 mm), y radiación de microondas (de 1 mm a 30 cm).

Se sabe que los radiosensibilizadores aumentan la sensibilidad de células cancerosas a los efectos tóxicos de la radiación electromagnética. Se han sugerido en la bibliografía varios mecanismos para el modo de acción de los radiosensibilizadores incluyendo: los radiosensibilizadores de células hipóxicas (por ejemplo, compuestos de 2-nitroimidazol, y compuestos de dióxido de benzotriazina) promueven la reoxigenación del tejido hipóxico y/o catalizan la generación de radicales de oxígeno perjudiciales; los radiosensibilizadores de células no hipóxicas (por ejemplo, pirimidinas halogenadas) pueden ser análogos de bases de ADN y se incorporan preferentemente en el ADN de células cancerosas y de ese modo promueven la rotura inducida por radiación de moléculas de ADN y/o impiden los mecanismos de reparación del ADN normales; y se han supuesto otros diversos mecanismos de acción posibles para radiosensibilizadores en el tratamiento de la enfermedad.

Muchos protocolos de tratamiento del cáncer emplean actualmente radiosensibilizadores activados por la radiación electromagnética de rayos X. Los ejemplos de radiosensibilizadores activados por rayos X incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: metronidazol, misonidazol, desmetilmisonidazol, pimonidazol, etanidazol, nimorazol, mitomicina C, RSU 1069, SR 4233, EO9, RB 6145, nicotinamida, 5-bromodesoxiuridina (BUdR), 5-yododesoxiuridina (IUdR), bromodesoxicidina, fluorodesoxiuridina (fudR), hidroxurea, cisplatino y análogos terapéuticamente eficaces y derivados de los mismos.

La terapia fotodinámica (PDT) de cánceres emplea luz visible como activador de radiación del agente de sensibilización. Los ejemplos de radiosensibilizadores fotodinámicos incluyen los siguientes, pero no se limitan a: derivados de hematoporfirina, Photofrin, derivados de benzoporfirina, NPe6, etioporfirina de estaño SnET2, feoforbida-a, bacterioclorofila-a, naftalocianinas, ftalocianinas, ftalocianina de cinc y análogos terapéuticamente eficaces y derivados de los mismos.

Los radiosensibilizadores pueden administrarse conjuntamente con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o varios otros compuestos, incluyendo pero sin limitarse a: compuestos que promueven la incorporación de radiosensibilizadores a las células diana; compuestos que controlan el flujo de agentes terapéuticos, nutrientes, y/u oxígeno a las células diana; agentes quimioterápicos que actúan sobre el tumor con o sin radiación adicional; u otros compuestos terapéuticamente eficaces para tratar el cáncer u otra enfermedad. Los ejemplos de agentes terapéuticos adicionales que pueden usarse conjuntamente con radiosensibilizadores incluyen, pero no se limitan a: 5-fluorouracilo, leucovorina, 5'-amino-5'-desoxitimidina, oxígeno, carbógeno, transfusiones de glóbulos rojos, perfluorocarbonos (por ejemplo, Fluosol-DA), 2,3-DPG, BW12C, bloqueantes de canales de calcio, pentoxifilina, compuestos antiangiogénesis, hidralazina y LBSO. Los ejemplos de agentes quimioterápicos que pueden usarse conjuntamente con radiosensibilizadores incluyen, pero no se limitan a: adriamicina, camptotecina, carboplatino, cisplatino, daunorubicina, docetaxel, doxorubicina, interferón (alfa, beta, gamma), interleuquina 2, irinotecan, paclitaxel, topotecan y análogos terapéuticamente eficaces y derivados de los mismos.

65 Composiciones farmacéuticas de la invención

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según la reivindicación 1 y (ii) un portador farmacéuticamente aceptable.

ES 2 354 249 T3

La discusión anterior referente a la utilidad de las realizaciones preferidas y a la administración de los compuestos de la presente invención también se aplica a la composición farmacéutica de la presente invención.

5 La expresión “portador farmacéuticamente aceptable” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier portador, diluyente, excipiente, agente de suspensión, agente lubricante, adyuvante, vehículo, sistema de administración, emulsionante, disgregante, absorbente, conservante, tensioactivo, colorante, aromatizante o edulcorante.

10 Para estos fines, la composición de la invención puede administrarse por vía oral, por vía parenteral, por aerosol para inhalación, adsorción, absorción, por vía tópica, por vía rectal, por vía nasal, por vía bucal, por vía vaginal, por vía intraventricular, por medio de un depósito implantado en formulaciones farmacéuticas que contienen portadores farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales o por cualquier otra forma farmacéutica conveniente. El término parenteral tal como se usa en el presente documento incluye técnicas de infusión o inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intraesternal e intracraneal.

15 Cuando se administra por vía parenteral, la composición estará normalmente en una forma farmacéutica unitaria, inyectable estéril (disolución, suspensiones o emulsión) que es preferiblemente isotónica con la sangre del receptor con un portador farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de tales formas inyectables estériles son suspensiones oleaginosas o acuosas inyectables estériles. Estas suspensiones pueden formularse según técnicas conocidas en la técnica usando agentes de suspensión y agentes humectantes o de dispersión adecuados. Las formas inyectables estériles también pueden ser suspensiones o disoluciones inyectables estériles en disolventes o diluyentes parenteralmente aceptables no tóxicos, por ejemplo, como disoluciones en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución salina, solución de Ringer, disolución de dextrosa, disolución isotónica de cloruro de sodio y solución de Hank. Además, se emplean convencionalmente aceites fijos, estériles como disolventes o medios de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite fijo blando incluyendo mono- o di-glicéridos sintéticos, aceite de maíz, semilla de algodón, cacahuate y sésamo. Ácidos grasos tales como oleato de etilo, miristato de isopropilo y ácido oleico y sus derivados de glicérido, incluyendo aceite de oliva y aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxiethyladas, son útiles en la preparación de inyectables. Estas suspensiones o disoluciones de aceite también pueden contener dispersantes o diluyentes de alcohol de cadena larga.

30 La solución salina estéril es un portador preferido y los compuestos son a menudo suficientemente solubles en agua como para constituirse como una disolución para todas las necesidades previsibles. El portador puede contener cantidades minoritarias de aditivos, tales como sustancias que potencian la solubilidad, isotonicidad y capacidad química, por ejemplo, compuestos antioxidantes, tampones y conservantes.

35 Formulaciones adecuadas para administración bucal o nasal (tales como formulaciones de dispensación de polvo autopropelentes) pueden comprender aproximadamente del 0,1% a aproximadamente el 5% p/p, por ejemplo el 1% p/p de principio activo. Las formulaciones para uso médico humano de la presente invención comprenden un principio activo en asociación con un portador farmacéuticamente aceptable y opcionalmente otro(s) principio(s) terapéutico(s).

40 Cuando se administra por vía oral, la composición se formulará habitualmente en formas farmacéuticas unitarias tales como comprimidos, cápsulas con forma de sello, polvo, gránulos, perlas, pastillas masticables, cápsulas, líquidos, disolución o suspensiones acuosas, o formas farmacéuticas similares, usando equipo y técnicas convencionales conocidos en la técnica. Tales formulaciones normalmente incluyen un portador líquido, semisólido o sólido. Los portadores a modo de ejemplo incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato de calcio, aceite mineral, manteca de cacao, aceite de teobroma, alginatos, tragacanto, gelatina, almíbar, metilcelulosa, monoburato de polioxiethylensorbitano, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y similares.

50 La composición de la invención se administra preferiblemente como una cápsula o un comprimido que contiene una dosis dividida o única del inhibidor. Preferiblemente, la composición se administra como una disolución, suspensión o emulsión estéril, en una dosis dividida o única. Los comprimidos pueden contener portadores tales como lactosa y almidón de maíz, y/o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio. Las cápsulas pueden contener diluyentes incluyendo lactosa y almidón de maíz secado.

55 Puede prepararse un comprimido comprimiendo o moldeando el principio activo opcionalmente con uno o más componentes adicionales. Pueden prepararse comprimidos fabricados por compresión comprimiendo, en una máquina adecuada, el principio activo en una forma de flujo libre tal como en polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, tensioactivo o agente de dispersión. Pueden prepararse comprimidos moldeados moldeando en una máquina adecuada una mezcla del principio activo en polvo y un portador adecuado humedecido con un diluyente líquido inerte.

60 Los compuestos de esta invención también pueden administrarse por vía rectal en forma de supositorios. Estas composiciones pueden prepararse mezclando el fármaco con un excipiente no iniciador adecuado que es sólido a temperatura ambiente pero líquido a la temperatura del recto y, por tanto, se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales incluyen manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.

Las composiciones y los métodos de la invención también pueden utilizar tecnología de liberación controlada. Por tanto, por ejemplo, los compuestos de la invención pueden incorporarse en una matriz de polímero hidrófobo

para su liberación controlada a lo largo de un periodo de días. La composición de la invención puede moldearse entonces para dar un implante sólido o un parche aplicado externamente, adecuado para proporcionar concentraciones eficaces de los inhibidores de PARP a lo largo de un periodo de tiempo prolongado sin la necesidad de redosificación frecuente. Tales películas de liberación controlada se conocen bien en la técnica. Se prefieren particularmente sistemas de administración transdérmica. Otros ejemplos de polímeros comúnmente empleados para este fin que pueden usarse en la presente invención incluyen copolímero de etileno-acetato de vinilo no degradable y copolímeros de ácido láctico-glicólico degradables que pueden usarse externa o internamente. Ciertos hidrogeles tales como poli(metacrilato de hidroxietilo) o poli(alcohol vínlico) también pueden ser útiles, pero para ciclos de liberación más cortos que los otros sistemas de liberación poliméricos, tales como los mencionados anteriormente.

En una realización preferida, el portador es un polímero biodegradable sólido o una mezcla de polímeros biodegradables con cinética de liberación y características de liberación temporal apropiadas. Entonces, la composición de la invención puede moldearse para dar un implante sólido adecuado para proporcionar concentraciones eficaces de los compuestos de la invención a lo largo de un periodo de tiempo prolongado sin la necesidad de redosificación frecuente. La composición de la presente invención puede incorporarse en el polímero biodegradable o mezcla de polímeros de cualquier manera adecuada conocida para un experto habitual en la técnica y puede formar una matriz homogénea con el polímero biodegradable, o puede encapsularse de alguna manera dentro del polímero, o puede moldearse para dar un implante sólido.

En una realización, el polímero biodegradable o la mezcla de polímeros se usa para formar un “depósito” blando que contiene la composición farmacéutica de la presente invención que puede administrarse como un líquido que puede fluir, por ejemplo, mediante inyección, pero que permanece suficientemente viscoso como para mantener la composición farmacéutica dentro de la zona localizada alrededor del sitio de inyección. El tiempo de degradación del depósito así formado puede variar desde varios días hasta algunos años, dependiendo del polímero seleccionado y su peso molecular. Usando una composición de polímero en forma inyectable, puede eliminarse incluso la necesidad de realizar una incisión. En cualquier caso, un “depósito” de administración que puede fluir o flexible se ajustará a la forma del espacio que ocupa dentro del cuerpo con un traumatismo mínimo a los tejidos circundantes. La composición farmacéutica de la presente invención se usa en cantidades que son terapéuticamente eficaces, y pueden depender del perfil de liberación deseada, la concentración de la composición farmacéutica requerida para el efecto sensibilizante y la duración del tiempo durante el que la composición farmacéutica tiene que liberarse para el tratamiento.

Los inhibidores de PARP se usan en la composición en cantidades que son terapéuticamente eficaces. Las composiciones pueden estar esterilizadas y/o contener adyuvantes, tales como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsificantes, promotores de la disolución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Además, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Las composiciones se preparan según métodos convencionales de mezclado, granulado o recubrimiento, y contienen de aproximadamente el 0,1 al 75% en peso, preferiblemente de aproximadamente el 1 al 50% en peso del principio activo.

Para ser terapéuticamente eficaces como dianas del sistema nervioso central, los compuestos de la presente invención deben penetrar fácilmente en la barrera hematoencefálica cuando se administran de manera periférica. Pueden administrarse eficazmente compuestos que no pueden penetrar en la barrera hematoencefálica mediante una vía intraventricular u otro sistema de administración apropiado adecuado para su administración al cerebro.

Las dosis de los compuestos incluyen preferiblemente unidades de dosificación farmacéutica que comprenden una cantidad eficaz del compuesto activo. Por una cantidad eficaz quiere decirse una cantidad suficiente para inhibir PARP y derivar sus efectos beneficiosos a través de la administración de uno o más de las unidades de dosificación farmacéutica. Preferiblemente, la dosis es suficiente para prevenir o reducir los efectos del ictus vascular u otras enfermedades neurodegenerativas.

Para uso médico, la cantidad requerida del principio activo para lograr un efecto terapéutico variará con el compuesto particular, la vía de administración, el mamífero en tratamiento y el trastorno o enfermedad particular que está tratándose. Una dosis sistemática adecuada de un compuesto de la presente invención o una sal farmacológicamente aceptable del mismo para un mamífero que padece, o probablemente padece, cualquier estado tal como se describió anteriormente en el presente documento está en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg del compuesto principio activo, siendo la dosificación más preferida de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/kg.

Sin embargo, se entiende que un nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad particular que está tratándose y la forma de administración.

Se entiende que el médico o veterinario habitualmente experto determinará y prescribirá fácilmente la cantidad eficaz del compuesto para el tratamiento profiláctico o terapéutico del estado para el que se administra el tratamiento. Al hacer esto, el médico o veterinario podría emplear un bolo intravenoso seguido por una infusión intravenosa y administraciones repetidas, por vía parenteral o por vía oral, según se considere apropiado. Aunque es posible que un principio activo se administre solo, es preferible presentarlo como una formulación.

ES 2 354 249 T3

Al preparar la forma farmacéutica que incorpora las composiciones de la invención, los compuestos también pueden combinarse con excipientes convencionales tales como aglutinantes, incluyendo gelatina, almidón pregelatinizado y similares; lubricantes, tales como aceite vegetal hidrogenado, ácido esteárico y similares; diluyentes, tales como lactosa, manosa y sacarosa; disgregantes, tales como carboximetilcelulosa y glicolato sódico de almidón; agentes de suspensión, tales como povidona, poli(alcohol vinílico) y similares; absorbentes, tales como dióxido de silicio; conservantes, tales como metilparabeno, propilparabeno y benzoato de sodio; tensioactivos, tales como laurilsulfato de sodio, polisorbato 80 y similares; colorantes tales como colorantes F.D.& C. y similares; aromatizantes; y edulcorantes.

La presente invención se refiere al uso de un compuesto según la reivindicación 1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno en un animal descrito en el presente documento.

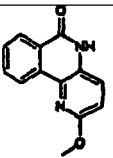
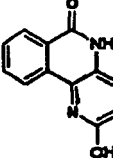
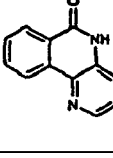
Ensayos de PARP

CI_{50}

Un método conveniente para determinar la CI_{50} de un compuesto inhibidor de PARP es un ensayo de PARP usando PARP humana recombinante purificada de Trevigan (Gaithersburg, MD), tal como sigue: el ensayo de enzima PARP se establece sobre hielo en un volumen de 100 microlitros que consiste en Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), $MgCl_2$ 1 mM, KCl 28 mM, NaCl 28 mM, 3,0 mg/ml de ADN de esperma de arenque activado con ADNasa I (Sigma, MO), [3H] nicotinamida adenina dinucleótido 30 micromolar (62,5 mci/mmoles), enzima PARP 15 microgramos/ml y diversas concentraciones de los compuestos que van a someterse a prueba. Se inicia la reacción añadiendo la enzima e incubando la mezcla a 25°C. Tras 2 minutos de incubación, se finaliza la reacción añadiendo 500 microlitros de ácido tricloroacético al 30% (p/v) enfriado con hielo. Se transfiere el precipitado formado sobre un filtro de fibra de vidrio (Packard Unifilter-GF/C) y se lava varias veces con etanol al 70%. Tras secarse el filtro, se determina la radiactividad mediante recuento de centelleo. Se encontró que los compuestos de esta invención tenían una potente actividad enzimática en el intervalo de algunos nM a 20 mM en CI_{50} en este ensayo de inhibición.

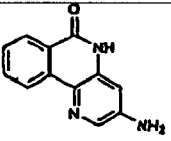
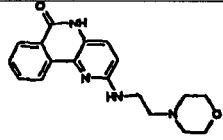
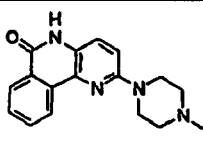
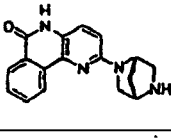
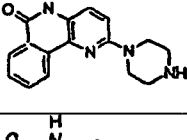
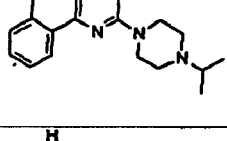
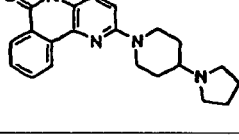
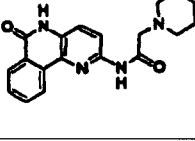
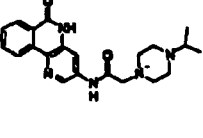
Usando el ensayo de PARP descrito anteriormente, se obtuvieron los valores de CI_{50} (mM) aproximados tal como se muestra en la siguiente tabla III, que también incluye realizaciones específicas de los compuestos de la presente invención:

TABLA III

ESTRUCTURA	CI_{50} (μ M)
	0,216
	0,114
	0,292

ES 2 354 249 T3

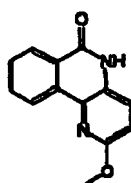
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50

	0,18
	0,339
	0,076
	0,042
	0,045
	0,179
	0,079
	0,150
	0,086

55

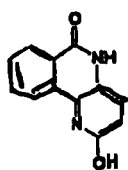
Los compuestos adicionales, que son realizaciones a modo de ejemplo de la presente invención, incluyen los siguientes:

60

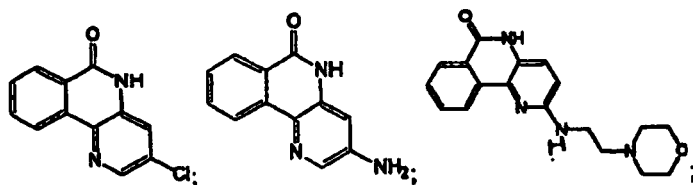


65

5

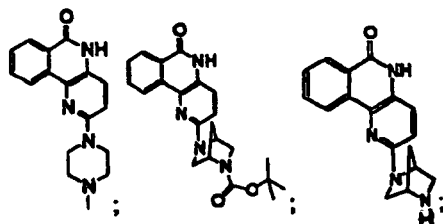


10



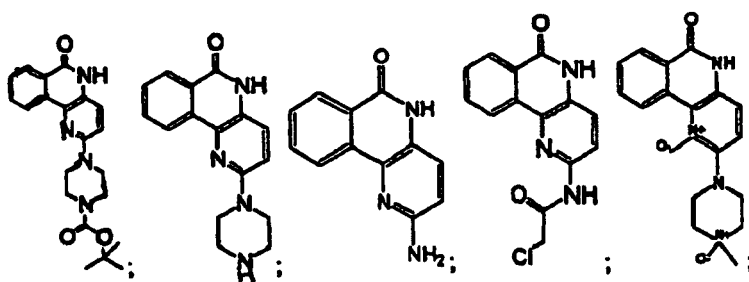
15

20



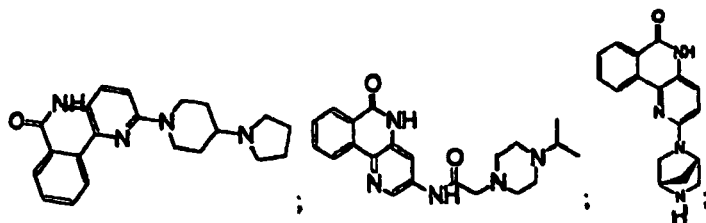
25

30



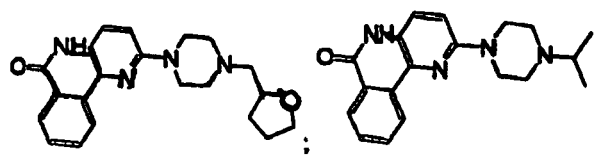
35

40



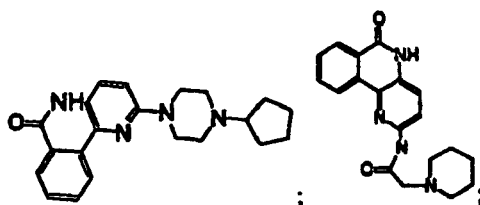
45

50



55

60



65

Isquemia cerebral focal

El siguiente ensayo de isquemia cerebral local es útil para determinar los efectos de inhibición de PARP de los compuestos de la presente invención. Los siguientes ejemplos demuestran que los relacionados con los de la presente invención son eficaces en la inhibición de la actividad PARP.

La isquemia cerebral focal se produce por cauterización de la ACM (arteria cerebral media) distal derecha con oclusión de arteria carótida común temporal bilateral en ratas Long-Evans macho durante 90 minutos. Todos los procedimientos realizados en los animales se aprobaron por el University Institutional Animal Care and Use Committee de la Universidad de Pennsylvania. Se usaron un total de 42 ratas (pesos: 230-340 g) obtenidas de Charles River en este estudio. Los animales ayunaron durante la noche con libre acceso al agua antes del procedimiento quirúrgico.

Dos horas antes de la oclusión de la ACM, se disolvieron cantidades variables (control, n = 14; 5 mg/kg, n = 7; 10 mg/kg, n = 7; 20 mg/kg, n = 7; y 40 mg/kg n = 7) del compuesto 3,4-dihidro-5-[4-(1-piperidinil)-butoxi]-1(2H)-isoquinolinona ("DPQ") en dimetilsulfóxido (DMSO) usando un sonicador. Se inyectó un volumen de 1,28 ml/kg de la disolución resultante por vía intraperitoneal en catorce ratas.

Entonces se anestesiaron las ratas con halotano (el 4% para la inducción y el 0,8%-1,2% para el procedimiento quirúrgico) en una mezcla del 70% de óxido nitroso y 30% de oxígeno. Se monitorizó la temperatura corporal mediante una sonda rectal y se mantuvo a $37,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ con una manta de calentamiento regulada por una unidad de control de manta homeotérmica (Harvard Apparatus Limited, Kent, R.U.). Se colocó un catéter (PE-50) en la arteria de la cola, y se monitorizó y registró de manera continua la tensión arterial en un registrador poligráfico Grass (modelo 7D, Grass Instruments, Quincy, Massachusetts). También se tomaron muestras para el análisis de gases de la sangre (pH arterial, PaO₂ y PaCO₂) del catéter de la arteria de la cola y se midió con un analizador de gases de la sangre (ABL 30, Radiometer, Copenhagen, Dinamarca). Se obtuvieron muestras de sangre arterial 30 minutos tras la oclusión de la ACM.

Se colocó la cabeza del animal en un marco estereotáxico y se hizo una incisión parietal derecha entre el canto lateral derecho y el meato auditivo externo. Usando una fresa dental enfriada constantemente con solución salina, se preparó un orificio de trépano de 3 mm sobre la corteza suministrada por la ACM derecha, 4 mm lateral con respecto a la sutura sagital y 5 mm caudal con respecto a la sutura coronal. Se mantuvieron la duramadre y una capa delgada de hueso interno, teniendo cuidado de colocar la sonda sobre una zona de tejido carente de vasos sanguíneos grandes. La sonda de flujo (diámetro de la punta de 1 mm, separación de la fibra de 0,25 mm) se hizo descender hasta la parte inferior del orificio de trépano craneal usando un micromanipulador. Se sujetó la sonda de manera estacionaria mediante un soporte de sonda sujeto al cráneo con cemento dental. Se monitorizó de manera continua el flujo sanguíneo microvascular en la corteza parietal derecha con un medidor de flujo doppler láser (FloLab, Moor, Devon, R.U., y Periflux 4001, Perimed, Estocolmo, Suecia).

Se produjo la isquemia cerebral focal por la cauterización de la parte distal de la ACM derecha con oclusión de la arteria carótida común (ACC) temporal bilateral mediante el procedimiento de Chen *et al.*, "A Model of Focal Ischemic Stroke in the Rat: Reproducible Extensive Cortical Infarction". *Ictus* 17:735-43 (1986) y/o Liu *et al.*, "Polyethylene Glycol-conjugated Superoxide Dismutase and Catalase Reduce Ischemic Brain Injury". *Am. J. Physiol.* 256:H589-93 (1989), ambos de los cuales se incorporan al presente documento como referencia.

Específicamente, se aislaron las ACC bilaterales y se pasaron cuidadosamente lazos hechos de catéter de polietileno (PE-10) alrededor de las ACC para la posterior oclusión remota. Se extendió la incisión realizada anteriormente para la colocación de la sonda de láser para permitir la observación del extremo rostral del arco cigomático en el punto de fusión usando una fresa dental, y se cortó la duramadre que recubría la ACM. Se levantó la ACM distal con respecto a su cruce con la vena cerebral inferior mediante un gancho de acero inoxidable fino acoplado a un micromanipulador y, tras la oclusión de la ACC bilateral, se cauterizó la ACM con un electrocoagulador. Se recubrió el orificio de trépano con un pequeño trozo de Gelform y se suturó la herida para mantener la temperatura del cerebro dentro del intervalo normal o casi normal.

Tras 90 minutos de oclusión, se liberaron los lazos carótideos, se retiró el catéter de la arteria de la cola y se suturaron todas las heridas. Se aplicó por vía tópica sulfato de gentamicina (10 mg/ml) a las heridas para prevenir la infección. Se suspendió el anestésico y el animal se devolvió a su jaula después de que se despertara. Se permitieron agua y alimento a voluntad.

Dos horas tras la oclusión de la ACM, se administraron a los animales las mismas dosis del inhibidor de PARP que en el tratamiento previo. Veinticuatro horas tras la oclusión de la ACM, se sacrificaron las ratas con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (150 mg/kg). Se extrajo cuidadosamente el cerebro del cráneo y se enfrió en CSF artificial enfriado con hielo durante cinco minutos. Entonces se seccionó el cerebro enfriado en el plano coronal a intervalos de 2 mm usando a matriz de cerebro de roedor (RBM-4000C, ASI Instruments, Warren, Michigan). Se incubaron los cortes de cerebro en solución salina tamponada con fosfato que contenía cloruro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio (TTC) al 2% a 37°C durante diez minutos. Se tomaron fotografías en color de la superficie posterior de los cortes teñidos y se usaron para determinar el área dañada en cada nivel de sección transversal usando un analizador de imágenes informatizado (NIH Image 1.59). Para evitar artefactos debidos a edema, se calculó el área dañada restando el área del tejido normal en el hemisferio ipsilateral con respecto al ictus del área del hemisferio contrala-

teral con respecto al ictus, mediante el método de Swanson *et al.*, “A Semiautomated Method for Measuring Brain Infarct Volume”, J. Cereb. Blood Flow Metabol. 10:290-93 (1990), cuya descripción se incorpora por el presente documento como referencia. Se calculó el volumen total de infarto mediante la suma del volumen dañado de los cortes de cerebro.

5

La cauterización de la parte distal de la ACM derecha con oclusión de la ACC temporal bilateral produjo consecuentemente un infarto cortical bien reconocido en el territorio de la ACM derecha de cada animal de prueba. Hubo una aparente uniformidad en la distribución del área dañada tal como se midió mediante tinción de ITC en cada grupo, tal como se muestra en la figura 1.

10

En la figura 1, se midió la distribución de la zona de infarto en corte transversal a niveles representativos a lo largo del eje rostrocaudal desde la línea interaural en animales no tratados y en animales tratados con 10 mg/kg de 3,4-dihidro-5-[4-(1-piperidinil)-butoxi]-1(2H)-isoquinolinona. Se expresó el área de daño como media \pm desviación estándar. Se indicaron las diferencias significativas entre el grupo tratado con 10 mg y el grupo control (* $p < 0,02$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Las curvas de 5 mg/kg y de 20 mg/kg cayeron aproximadamente a medio camino entre las curvas control y la de 10 mg/kg, mientras que la curva de 40 mg/kg estaba cerca del control. Se omitieron las curvas de 5, 20 y 40 mg/kg por claridad.

15

La inhibición de PARP condujo a una disminución significativa en el volumen dañado en el grupo tratado con 5 mg/kg ($106,7 \pm 23,2 \text{ mm}^3$, $p < 0,001$), el grupo tratado con 10 mg/kg ($76,4 \pm 16,8 \text{ mm}^3$, $p < 0,001$) y el grupo tratado con 20 mg/kg ($110,2 \pm 42,0 \text{ mm}^3$, $p < 0,01$), en comparación con el grupo control ($165,2 \pm 34,0 \text{ mm}^3$). Se expresaron los datos como media \pm desviación estándar. Se determinó la significación de las diferencias entre los grupos usando un análisis de la varianza (ANOVA) seguido por la prueba de la t de Student para comparaciones individuales.

20

No hubo ninguna diferencia significativa entre el control y el grupo tratado con 40 mg/kg ($135,6 \pm 44,8 \text{ mm}^3$). Sin embargo, hubo diferencias significativas entre el grupo tratado con 5 mg/kg y el grupo tratado con 10 mg/kg ($p < 0,02$), y entre el grupo tratado con 10 mg/kg y el grupo tratado con 40 mg/kg ($p < 0,01$), tal como se muestra en la figura 2.

25

En la figura 2, se representó gráficamente el efecto de la administración intraperitoneal de 3,4-dihidro-5-[4-(1-piperidinil)-butoxi]-1(2H)-isoquinolinona sobre el volumen de infarto. Se expresaron los volúmenes de infarto como media \pm desviación estándar. Se indicaron las diferencias significativas entre los grupos tratados y el grupo control ($p < 0,01$, ** $p < 0,001$). No está claro por qué una alta dosis (40 mg/kg del inhibidor de PARP, 3,4-dihidro-5-(4-(1-piperidinil)-butoxi)-1(2H)-isoquinolinona), era menos neuroprotector. La curva de dosis-respuesta en forma de U puede sugerir dobles efectos del compuesto.

30

Sin embargo, globalmente, la administración *in vivo* del inhibidor condujo a una reducción sustancial en el volumen de infarto en el modelo de isquemia cerebral focal en la rata. Este resultado indicó que la activación de PARP desempeña un importante papel en la patogénesis del daño cerebral en la isquemia cerebral.

35

Los valores de gases de la sangre arterial (PaO_2 , PaCO_2 y pH) estaban dentro del intervalo fisiológico en los grupos control y tratado sin ninguna diferencia significativa en estos parámetros entre los cinco grupos, tal como se muestra a continuación en la tabla IV. Se tomó la TAM “en estado estacionario” tras la finalización de la preparación quirúrgica, justo antes de la oclusión; se tomó una TAM de “isquemia” como TAM promedio durante la oclusión.

40

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

ES 2 354 249 T3

TABLA IV

	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)	pH	Estado estacionario de isquemia de TAM (mm Hg)	
5					
10	Grupo control (n=4)	125±21	38,6±4,6	7,33±0,05	79±14 91±13**
15	Grupo tratado con 5 mg/kg (n=7)	126±20	38,0±2,8	7,36±0,02	78±5 91±12**
20	Grupo tratado con 10 mg/kg (n=7)	125±16	39,3±5,2	7,34±0,03	80±9 90±14*
25	Grupo tratado con 20 mg/kg (n=7)	122±14	41,3±2,8	7,35±0,23	79±10 91±12**
30	Grupo tratado con 40 mg/kg (n=7)	137±17	39,5±4,7	7,33±0,24	78±4 88±12*
35					
40	* = Significativamente diferente del valor de estado estacionario, p<0,05.				
45	** = Significativamente diferente del valor de estado estacionario, p<0,01.				

No hubo diferencias significativas en ningún parámetro fisiológico, incluyendo la tensión arterial media (TAM), antes de la oclusión de la ACM y la ACC entre los cinco grupos. Aunque se elevó significativamente la TAM tras la oclusión en los cinco grupos, no hubo diferencias significativas en la TAM durante el periodo de oclusión entre los grupos.

Dado que los valores de flujo sanguíneo obtenidos a partir del láser doppler estaban en unidades arbitrarias, solamente se notificaron los cambios en porcentaje desde el nivel inicial (antes de la oclusión). La oclusión de la ACM derecha y la ACC bilateral produjo una disminución significativa en el flujo sanguíneo relativo en la corteza parietal derecha hasta el $20,8 \pm 7,7\%$ del nivel inicial en el grupo control (n = 5), el $18,7 \pm 7,4\%$ en el grupo tratado con 5 mg/kg (n = 7), el $21,4 \pm 7,7\%$ en el grupo tratado con 10 mg/kg (n = 7) y el $19,3 \pm 11,2\%$ en el grupo tratado con 40 mg/kg (n = 7). No hubo diferencias significativas en la respuesta del flujo sanguíneo a la oclusión entre los cuatro grupos. Además, el flujo sanguíneo no mostró ningún cambio significativo durante todo el periodo de oclusión en cualquier grupo.

Tras la liberación de las oclusiones carotídeas, se observó una buena recuperación del flujo sanguíneo (algunas veces hiperemia) en el territorio de la ACM derecha de todos los animales. La reperfusión del tejido isquémico dio como resultado la formación de NO y peroxinitrito, además de radicales libres derivados del oxígeno. Se ha demostrado que todos estos radicales provocan roturas de la cadena de ADN y activan PARP.

Este ejemplo proporcionó pruebas de que los compuestos relacionados de la presente invención son eficaces en la inhibición de la actividad de PARP.

ES 2 354 249 T3

Pueden someterse a prueba compuestos a modo de ejemplo de la presente invención para determinar su capacidad para reducir la isquemia cerebral focal en el siguiente procedimiento simplificado. Se deja que las ratas tengan libre acceso a agua y comida para ratas (Wayne, Chicago, IL) hasta la cirugía. El alojamiento y la anestesia coinciden con directrices establecidas por el Institutional Animal Studies Committee y están de acuerdo con la guía PHS para el cuidado y uso de animales de laboratorio, normativas USDA y el panel de la AVMA sobre directrices de eutanasia.

Se anestesian los animales con isoflurano (inducción, 3%, mantenimiento, 1,25% en mezcla de 30% de O₂ y 70% de NO₂ a través de una máscara facial. Se mantiene la temperatura rectal a 37°C con un manta homeotérmica (Harvard Apparatus, South Natick, MA). En primer lugar, se inserta un catéter i.v. en la vena femoral izquierda y la línea discurre hasta la nuca del cuello para su conexión con una placa giratoria anclada (Instech Laboratories, Plymouth Meeting, PA) y una bomba de infusión remota (Stoelting Inc. Wood Dale, IL). En algunos casos, la arteria femoral derecha está canulada para monitorizar la tensión arterial y la frecuencia cardíaca y para obtener muestras de sangre para determinar el gas de sangre arterial.

Entonces se expone la arteria cerebral media derecha (ACM) haciendo una incisión vertical en la piel a medio camino entre el oído y el ojo derecho y se extirpa el cráneo circundante con una fresa dental (Chen *et al*, 1986). Tras la incisión de la duramadre, se coagula la arteria al nivel de la vena cerebral inferior con una unidad de cauterio bipolar (Valleylab NS2000, Boulder, CO), y se corta para prevenir la reperfusión espontánea (Takahashi *et al.*, 1997). Ambas arterias carótidas comunes (ACC) que se habían aislado y liberado previamente de nervios y tejidos blandos se ligan entonces usando pinzas de aneurisma no traumático. Tras cerrar las heridas con pinzas quirúrgicas, se deja que los animales se recuperen de la anestesia y se devolvieron a su jaula que se calienta hasta 27°C con un empapador de agua calentada y una carpa caliente humidificada.

El inhibidor de PARP que va a someterse a prueba se administra en primer lugar 30 min. tras la MCAO como un bolo i.v., 10 infundidos lejos a lo largo de 5 min., seguido por 12 mediante una infusión continua de 2 mg/kg/h (0,3 ml/h). Noventa minutos tras la MCAO, se liberan los animales de la atadura para infusión, vuelven a anestesiarse brevemente con isoflurano y se retiran las pinzas de la carótida. Se devuelve el animal a su jaula caliente y vuelve a conectarse a la bomba de infusión i.v. durante la duración del experimento.

A las 24 h tras la MCAO permanente, se sedan los animales con ketamina y se extirpan las cabezas con guillotina. Se extraen los cerebros, se enfrían en solución salina enfriada con hielo y se cortan en secciones coronales de 2 mm usando una matriz de cerebro de rata (Harvard Bioscience, South Natick, MA). Se incuban los cortes de cerebro en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) que contiene TTC al 2% a 37°C durante 10 min. y entonces se almacenan en formalina tamponada neutra al 10%. Se determina el área de sección trasversal de la región no teñida con TTC para cada corte de cerebro usando un analizador de imágenes (MetaMorph, Universal Imaging Corp., West Chester, PA). Se calcula el volumen total de infarto en el hemisferio derecho mediante la suma de las mediciones directas (negativo para TTC) e indirectas de las zonas de infarto en los cortes de cerebro componentes. Se someten a prueba los volúmenes de infarto en los grupos tratados con fármaco y con vehículo (n = 8) para determinar la diferencia estadísticamente significativa usando una prueba de la t de Student para datos independientes.

Pueden someterse a prueba diversas dosis de los compuestos de la invención en este modelo. Los compuestos se administran o bien en una única dosis o bien en una serie de múltiples dosis, i.v. o i.v. a diferentes tiempos, ambas antes o después de la aparición de la isquemia. Se espera que los compuestos de la invención proporcionen protección frente a la isquemia en el intervalo de aproximadamente el 0 al 80%.

45

Isquemia del corazón/lesión por reperfusión

Se realizan los experimentos del modelo de isquemia del corazón/lesión por reperfusión usando ratas Sprague-Dawley hembra que pesan 250-300 g que se anestesian con pentobarbital sódico a una dosis de 65 mg/kg por vía intraperitoneal. Se mantiene la temperatura rectal a 37°C usando un sistema de manta homeotérmica (Harvard Apparatus, South Natick, MA). Se canula la tráquea y se ventila la rata con aire ambiente usando un ventilador de roedores Harvard (Harvard Apparatus, South Natick, MA). La vena yugular izquierda se canula con un tubo de PE-50 para la administración de fármacos. La arteria carótida derecha se canula para la medición de la TA. Se expone el corazón abriendo el pecho en el 4º espacio intercostal izquierdo. Se obstruye una rama izquierda principal de la arteria coronaria (LAD) mediante una ligadura de seda 4-0 durante 30 min. de isquemia y se libera durante 90 min. de reperfusión. Durante el experimento, se monitorizan la TA y el EKG mediante un sistema cardiovascular Micro-Med (Louisville, KY).

Al final de la reperfusión, vuelve a obstruirse la arteria coronaria LAD y se inyectan aproximadamente 2 ml de colorante azul de Evans al 5% a través de la línea i.v. para distinguir el área isquémica del área no isquémica del corazón. Entonces se extrae inmediatamente el corazón y se congela en el congelador. Tras al menos 30 min. de congelación, se corta el corazón en cinco secciones con 2 mm de espesor y se tiñen en disolución de TTC al 1% durante 30 min. a 37°C. Se recorta el ventrículo derecho. Se miden el área de infarto, el área de riesgo y el área ventricular izquierda total en cada cara de la sección usando un sistema de análisis de imágenes (BIOQUANT, Nashville, TN). Se calcula el tamaño de infarto como el volumen de infarto total en porcentaje respecto al volumen en riesgo total.

65

ES 2 354 249 T3

Para el grupo tratado con fármaco, se administran compuestos según los siguientes tres protocolos: 1. Se administra una única dosis de compuesto 60 min. antes de la aparición de la isquemia a través de inyección i. p. 2. Se administra el compuesto a través de bolo i.v. 1 min. antes de la aparición de la isquemia seguido por infusión i.v. hasta el final de la reperfusión. 3. Se administra el compuesto a través de bolo i.v. 1 min. antes de la aparición de la reperfusión seguido por infusión i.v. hasta el final de la reperfusión. Para cada grupo tratado con fármaco, existe un grupo tratado con vehículo correspondiente con n= 6 o n= 8. Se compara la diferencia entre los grupos tratados con fármaco y con vehículo usando la prueba de la t para datos independientes con p<0,05. Se someten a prueba diversas dosis de compuestos en este modelo. Los compuestos se administran en dosis o bien únicas o bien múltiples, i.p. o i.v., a diferentes tiempos antes o después de la aparición de la isquemia. Se espera que los compuestos de esta invención tengan protección frente a la lesión por isquemia/reperfusión en el intervalo del 10 al 40% en este ensayo.

Como resultado de la actividad de inhibición de PARP, se espera que los compuestos de esta invención protejan contra la degeneración inducida por isquemia de neuronal corticales de rata *in vitro* y por tanto que puedan ser útiles en trastornos que surgen de isquemia cerebral tales como ictus, choque septicémico o trastornos degenerativos del SNC. También pueden ser útiles en la protección de la médula espinal tras traumatismo. Como resultado experimental de la lesión por isquemia/reperfusión en ratas, la presente invención además se refiere a un método de tratamiento profiláctico o terapéutico del ataque al corazón, el paro cardíaco, la derivación cardíaca, la diabetes, o el riesgo de daño que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención para la inhibición de PARP en forma farmacéutica unitaria.

Radiosensibilización in vitro

Puede medirse la radiosensibilización *in vitro* con el uso de una línea celular de cáncer de próstata humano, PC-3s, que se siembra en placa en placas de 6 pocillos y se hace crecer en cultivos monocapa en RPMI1640 complementado con FCS al 10%. Se mantienen las células a 37°C en 5% de CO₂ y 95% de aire. Se exponen las células a una respuesta a la dosis (de 0,1 mM a 0,1 μM) de 3 inhibidores de PARP diferentes antes de la irradiación a un nivel de dosis subletal. Para todos los grupos de tratamiento, se exponen las placas de seis pocillos a temperatura ambiente en un irradiador Seifert de 230kV/15mA con una Cu/l mm de 0,5 mm. Se examina la viabilidad celular mediante exclusión de azul tripano al 0,4%. Se evalúa visualmente la exclusión del colorante mediante microscopia y se calculó el número de células viables restando el número de células del número de células viables y dividiendo por el número total de células. Se calculan las tasas de proliferación celular mediante la cantidad de incorporación de ³H-timidina tras la irradiación. Se esperan que los inhibidores de PARP radiosensibilicen las células.

Medición de la expresión génica alterada en ARNm de células senescentes

Puede medirse la alteración de la expresión génica con células BJ de fibroblastos humanos que, a una duplicación de la población (DPL) de 94, se siembran en placa en medio de crecimiento regular y entonces se cambian a un medio bajo en suero para reflejar condiciones fisiológicas tal como se describe en Linskens, *et al.*, Nucleic Acids Res. 23:16:3244-3231 (1993). Se usa un medio de DMEM/199 complementado con suero de ternero bovino al 0,5%. Se tratan diariamente las células durante 13 días. Se tratan las células control con y sin el disolvente usado para administrar el inhibidor de PARP. Se someten a prueba las células control jóvenes y viejas no tratadas para su comparación. Se prepara ARN a partir de las células control y tratadas según las técnicas descritas en la publicación PCT n.º 96/13610 y se realiza transferencia de tipo Northern. Se analizan sondas específicas para genes relacionados con senescencia y se comparan las células control y tratadas. Al analizar los resultados, el nivel más bajo de expresión génica se fija arbitrariamente en 1 para proporcionar una base para la comparación. Tres genes particularmente relevantes para cambios relacionados con la edad en la piel son colágeno, colagenasa y elastina. West, Arch Derm. 130:97-95 (1994). Se espera que la expresión de elastina de las células tratadas con el inhibidor de PARP aumente significativamente en comparación con las células control. La expresión de elastina debe ser significativamente superior en células jóvenes en comparación con células senescentes, y por tanto el tratamiento con el inhibidor de PARP debe provocar que los niveles de expresión de elastina en células senescentes cambien a niveles similares encontrados en células mucho más jóvenes. De manera similar, debe observarse un efecto beneficioso en la expresión de colagenasa y colágeno con el tratamiento con los inhibidores de PARP.

Efectos neuroprotectores de inhibidores de PARP sobre lesión por constricción crónica (CCI) en ratas

Se anestesian ratas Sprague-Dawley macho adultas, de 300-350 g, con pentobarbital sódico 50 mg/kg intraperitoneal. Se realiza la ligación de nervios exponiendo un lado de los nervios ciáticos de ratas y diseccionando un segmento de nervio de 5-7 mm de longitud y cerrando con cuatro ligaduras flojas a 1,0-1,5-mm, seguido por la implantación de un catéter intratecal y la inserción de un tubo de polietileno (PE-10) lavado con sulfato de gentamicina en el espacio subaracnoideo a través de una incisión en la cisterna magna. Se introduce cuidadosamente el extremo caudal del catéter en la intumescencia lumbosacra y se sujeta el extremo rostral con cemento dental a un tornillo incrustado en el cráneo y se cierra la herida de la piel con pinzas para heridas.

Se evalúa la hiperalgesia térmica al calor radiante usando una prueba de retirada de la pata. Se coloca la rata en un cilindro de plástico sobre una placa de vidrio de 3 mm de espesor con una fuente de calor radiante de una bombilla

ES 2 354 249 T3

de proyección colocada directamente bajo la superficie plantar de la pata trasera de la rata. Se define la latencia de retirada de la pata como el tiempo que pasa desde la aparición de la estimulación con calor radiante hasta la retirada de la pata trasera de la rata.

5 Se evalúa la hiperalgesia mecánica colocando la rata en una jaula con una parte inferior hecha de lámina metálica perforada con muchos agujeros cuadrados pequeños. Se registra la duración de la retirada de la pata tras pinchar la superficie plantar media de la pata trasera de la rata con la punta de un alfiler insertado a través de la parte inferior de la jaula.

10 Se evalúa la alodinia mecánica colocando una rata en una jaula similar a la prueba anterior y aplicando filamentos de von Frey en orden ascendente de fuerza de doblado que oscila desde 0,07 hasta 76 g a la superficie plantar media de la pata trasera de la rata. Se aplica un filamento de von Frey perpendicular a la piel y se aprieta lentamente hasta que se dobla. Se define una fuerza umbral de respuesta como el primer filamento en la serie que provoca al menos una clara retirada de la pata de cinco aplicaciones.

15 Se observan neuronas oscuras bilateralmente dentro del asta dorsal de la médula espinal, particularmente en la lámina I-II, de las ratas 8 días tras la ligación del nervio ciático unilateral en comparación con ratas operadas de manera simulada. Se someten a prueba diversas dosis de inhibidores de PARP en este modelo y se muestra que reducen tanto la incidencia de neuronas oscuras como el comportamiento de dolor neuropático en ratas CCl.

20

Tratamiento y prevención de la gota y síntomas de gota

25 La deposición de cristales de urato monosódico (cristales de MSU) en el espacio articular particular es la causa etiológica de patologías inflamatorias tales como gota y pseudogota. Clínicamente, estas enfermedades inflamatorias están asociadas con edema y eritema de las articulaciones con dolor intenso por consiguiente. Una fuerte infiltración de leucocitos en el espacio periarticular e intraarticular que conduce a: 1) inflamación periarticular y articular episódica, aguda y 2) cambios articulares crónicos, es también característica de esta patología. Ha estado claro durante mucho tiempo que los neutrófilos son el tipo celular predominante recuperado a partir de estas articulaciones inflamatorias (Dieppe *et al.*, (1979). Synovial fluid crystals. *Q. J. Med.* XLVIII: 533-553; Terkeltaub, (1991). El factor quimiotáctico de neutrófilos derivado de monocitos/interleucina-8 es un mediador potencial de la inflamación inducida por cristales Arth. Rheum. 34: 894-903.). Un mejor entendimiento de los procesos inflamatorios provocados por cristales de MSU y el hecho que haya una clara relación entre estos cristales y la artritis gotosa, ha dado lugar a la caracterización de modelos experimentales de inflamación inducida por cristales. Ejemplos de modelos en los que la exposición a cristales ha conducido al reclutamiento de células en cavidades específicas, son articulaciones caninas (Phelps & McCarty, 1966, *Ann Int. Med* 9: 115-125), pleuresía de rata (Deporter *et al.*, 1979, *Br. J. Pharmacol* 65: 165; Sedgwick *et al.*, 1985, *Agents Actions* 17: 209-213), y la utilización de una almohadilla de aire para ratas preformada (Brookes *et al.*, 1987). El último sistema experimental ha mostrado que la acumulación de neutrófilos estaba relacionada con la generación de quimioatrayentes tales como LTB₄, que se inhibió posteriormente por colchicina (Brooks *et al.*, 1987, *Br. J. Pharmacol.* 90: 413-419).

40 Se ha demostrado que los neutrófilos se activan mediante cristales de MSU, liberando una serie de mediadores que pueden ser responsables, en parte, de las manifestaciones inflamatorias sistemáticas y locales encontradas en trastornos articulares inducidos por cristales. Los cristales interaccionan con neutrófilos conduciendo a la liberación de la enzima lisomal (Hoffstein *et al.*, 1975, *Arth. Rheum* 18: 153-165), liberación de radicales libres derivados de oxígeno (Simchowitz *et al.*, 1982, *Arth. Rheum* 25: 181-188; Abramson *et al.*, 1982, *Arth Rheum* 25: 174-180), inducción de fosfolipasa A₂(PLA₂) en leucocitos (Bomalaski *et al.*, 1990, *J. Immunol.* 145: 3391-3397), y activación de síntesis de productos de 5-lipoxigenasa (Poubelle *et al.*, 1987, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149: 649-657).

50 *In vitro*, se ha demostrado que los cristales de MSU liberan la citocina interleucina-1 β (IL-1 β) a partir de neutrófilos humanos, añadiendo este estímulo a una lista de otros que también liberan esta citocina, tales como zimosan LPS, ésteres de forbol, hormona estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y TNF-alfa. Además, también se ha demostrado que los monocitos y sinoviocitos humanos pueden sintetizar y liberar diversas citocinas tales como IL-6 y IL-8 (Guerne *et al.*, 1989, *Arth Rheum* 32: 1443-1452; Terkeltaub *et al.*, 1991, *Arth. Rheum* 34: 894-903). Además, la colchicina inhibe selectivamente la liberación de IL-1 β inducida por cristales de MSU y TNF- β (Roberge *et al.*, 1994, *J. Immunol.* 152: 5485-5494).

60 En modelos experimentales de gota, también se ha observado la síntesis de una quimiocina CXC selectiva para neutrófilos, tal como IL-8, pero no la de una quimiocina CC proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) (Hachicha *et al.*, 1995, *J. Exp. Med.* 182: 2019-2025). Estos resultados sugieren que la producción de IL-8 y la abolición de la liberación de MCP-1 conducirán a un caso en el que teóricamente existirá un reclutamiento de neutrófilos pero no de células mononucleares. Esta hipótesis está de acuerdo con el estado patológico de la gota y pseudogota, en el que la célula inflamatoria predominante es el neutrófilo (Hachicha *et al.*, 1995). Además, la activación por cristales de MSU de fagocitos mononucleares, que se encuentran normalmente en el espacio articular, también induce la secreción de IL-8 (Terkeltaub *et al.*, 1991). Se ha mostrado la importancia de IL-8 en esta patología en líquidos sinoviales de pacientes con artritis gotosa aguda en la que se produce en cantidades elevadas (Terkeltaub *et al.*, 1991; di Giovine *et al.*, 1991, *J. Clin. Invest.* 87: 1375-1381). Se ha mostrado que el uso de un anticuerpo neutralizante contra IL-8 atenúa

significativamente la hinchazón de las articulaciones inducida por cristales a las 12 h y la infiltración de neutrófilos en articulaciones artríticas a las 12 y 24 h en un modelo de conejo (Nishimura *et al.*, 1997, *J. Leukoc. Biol.* 62: 444-449).

5 Estos estudios demuestran la importancia tanto de la migración de neutrófilos como de la quimiocina IL-8, así como la liberación de esta y otras citocinas a partir de células residentes tales como los sinoviocitos, macrófagos y mastocitos en el tratamiento de la gota. Dado que los neutrófilos no están presentes o son extremadamente raros en el líquido sinovial normal, es necesario un aumento de la adhesión endotelial de neutrófilos para que se produzca la gota (Terkeltaub, 1996, In. Koopman, W.J. editor. *Arthritis and allied conditions: a textbook of rheumatology*. Baltimore: Williams y Wilkins: págs. 2085-2102, y Terkeltaub, 1992. En *Inflammation. Basic Principles and Clinical Correlates*, ed. by J.I. Gallin, I.M. Goldstein y R. Snyderman, págs. 977-981, Raven Press, Nueva York). La IL-16 y el TNF-alfa pueden ser críticos en la medicación de la rápida regulación por incremento del principal ligando endotelial para neutrófilos. Por ejemplo, se ha demostrado la expresión rápida y prolongada de E-selectina en respuesta a la inyección de cristales de urato en piel de cerdo (Chapman *et al.*, 1996. *Br. J. Rheumatol.* 35: 323-334). La liberación de citocinas, quimiocinas y productos del sistema de la cascada del ácido araquidónico conducen al reclutamiento de neutrófilos en esta patología, y la inhibición de estos conduce a una atenuación de la patología.

Pueden usarse el siguiente modelo de gota para someter a prueba un inhibidor de PARP según la presente invención.

20 Se adquirieron ratones albinos suizos no consanguíneos macho (peso corporal 20-22 g) de Banton y Kingsman (cepa T.O.; Hull, Humberstone) y se mantuvieron con una dieta de comida en bolas convencional con agua corriente a voluntad y un ciclo luz/oscuridad de 12:00 h. Se alojaron todos los animales durante 1 semana antes de la experimentación para permitir que el peso corporal alcanzase 28-30 g.

25 Se disolvió 1,11b-dihidrobencopirano[4,3,2-*de*]isoquinolin-1-ona, como ejemplo de inhibidor de PARP, en DMSO al 100% a temperatura ambiente a una concentración de 45 mg en 2 ml. Entonces se inyectó el compuesto en la cavidad peritoneal, de modo que cada ratón recibió una única dosis correspondiente a 45 mg/2 ml/kg (por ejemplo, 60 μ l para un ratón de 30 g). Los ratones control recibieron DMSO a 2 ml/kg i.p. Un tercer grupo de ratones que se dejaron sin tratar se añadieron al control para determinar posibles efectos del vehículo. El estudio implicó por tanto los siguientes tres grupos: grupo A, ratones sin tratar, n = 6, grupo B, ratones tratados con DMSO, n = 8, y grupo C, ratones tratados con 1,11b-dihidrobencopirano[4,3,2-*de*]isoquinolin-1-ona, n = 8.

30 Se sometió a prueba el reclutamiento de neutrófilos inducido por cristales de MSU tal como sigue. En todos los casos, se trataron los ratones 1 h tras el tratamiento anteriormente indicado con cristales de MSU. Se obtuvo una suspensión homogénea de cristales de MSU mediante una rotación de 30 min. Se indujo la peritonitis mediante inyección de 3 mg de cristales de MSU en 0,5 ml de PBS (0,1 M, pH 7,4) y se evaluó el reclutamiento de neutrófilos en la cavidad en el punto de tiempo de 6 h (Getting *et al.*, 1997. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283: 123-130). Entonces se sometieron a eutanasia los animales mediante exposición a CO₂ y se lavó la cavidad peritoneal con 3 ml de PHS complementado con EDTA 3 mM y heparina 25 U/ml.

40 Entonces se diluyó 1:10 una alícuota (100 μ l) del fluido de lavado en disolución de Turk (cristal violeta al 0,01% en ácido acético al 3%). Entonces se agitaron con vórtex las muestras y se colocaron 10 μ l de la disolución celular teñida en un hematocitómetro Neubauer y se contaron los números de neutrófilos usando un microscopio óptico (Olympus B061). Se han preparado sobrenadantes libres de células mediante centrifugación y se han almacenado para un posible análisis futuro.

45 Se muestran los datos para ratones individuales, y también se muestran como media \pm D.E. de (n) ratones por grupo. Se determinaron las diferencias estadísticas mediante ANOVA, más la prueba de Bonferroni. Se tomó como significativo a un valor de P<0,05.

50 La tabla V notifica el número de neutrófilos tal como se mide 6 h tras la inyección de cristales de MSU en los tres grupos experimentales.

55

60

65

ES 2 354 249 T3

TABLA V

Efecto de 1,11b-dihidrobenzopirano[4,3,2-de]isoquinolin-1-ona sobre la migración de neutrófilos inducida por cristales de MSU tal como se evaluó en el punto de tiempo de 6 h

N.º de Grupo ratón	Números de neutrófilos	de Grupo	Números de neutrófilos	de Grupo	Números de neutrófilos	de
1	A	4,9	B	6,0	C	5,1
2	A	5,4	B	6,6	C	2,1
3	A	6,3	B	7,5	C	2,4
4	A	6,9	B	7,8	C	2,4
5	A	5,7	B	5,1	C	3,0
6	A	6,0	B	5,7	C	3,0
7			B	5,7	C	2,7
8			B	6,0	C	2,1

Leyenda: Los ratones se dejaron sin tratar (grupo A), recibieron vehículo de DMSO (2 ml/kg i.p.; grupo B) o 1,11b-dihidrobenzopirano[4,3,2-de]isoquinolin-1-ona (45 mg/kg i.p.; grupo C), 1 h antes de la inyección peritoneal de 3 mg de cristales de MSU a tiempo 0. Se midió el flujo de entrada de neutrófilos en la cavidad peritoneal en el punto de tiempo de 6 h tras la recogida de los fluidos de lavado y la tinción específica tal como se describió en la sección experimental. Los valores para los números de neutrófilos son 10^6 por ratón.

La tabla VI ilustra estos datos como media \pm D.E. Puede observarse que el DMSO produjo un aumento no significativo modesto en la migración celular (+7%). Por el contrario, el compuesto a modo de ejemplo de la presente invención, a la dosis de 45 mg/kg, redujo significativamente el flujo de entrada de células, con un 55% calculado de inhibición frente al grupo de vehículo.

TABLA VI

Acumulación de datos para el efecto del compuesto a modo de ejemplo de la presente invención (medias)

Grupo experimental	Estímulo	Neutrófilos (10^6 por ratón)
A	Cristales de MSU (3 mg)	$5,87 \pm 0,29$ (6)
B	Cristales de MSU (3 mg)	$6,30 \pm 0,33$ (8)
C	Cristales de MSU (3 mg)	$2,856 \pm 0,34$ (8)*

Leyenda: como en la tabla V. Los valores son la media \pm D.E. de (n) ratones por grupo

* $P < 0,05$ frente al grupo B

Estos resultados demuestran que los compuestos y las composiciones de la presente invención pueden ser útiles en el tratamiento de y/o la prevención de la gota, tal como reduciendo o eliminando el reclutamiento de neutrófilos inducido por cristales de urato.

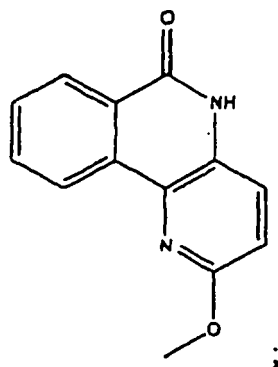
REIVINDICACIONES

1. Compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

5

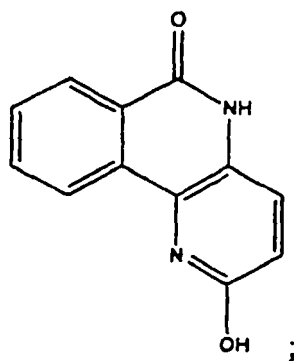
10

15



20

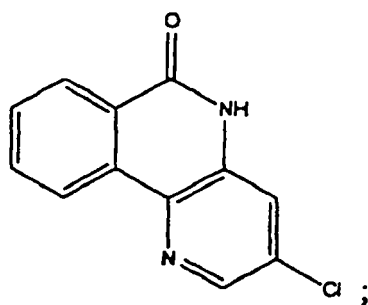
25



30

35

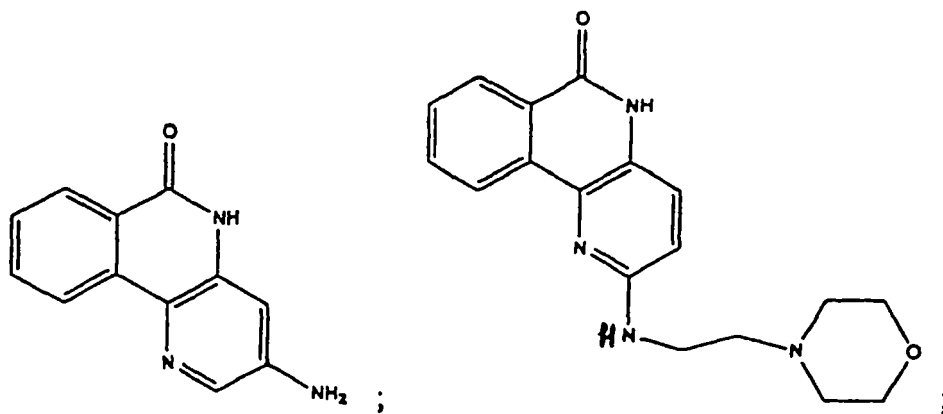
40



45

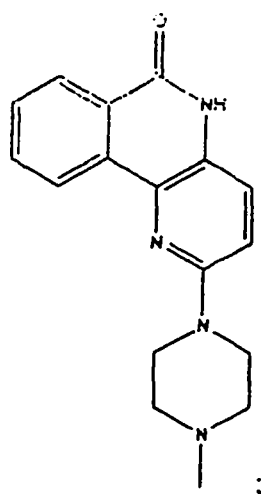
50

55



65

5

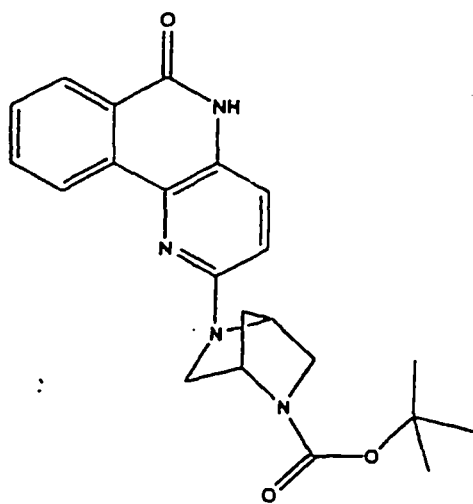


10

15

20

25

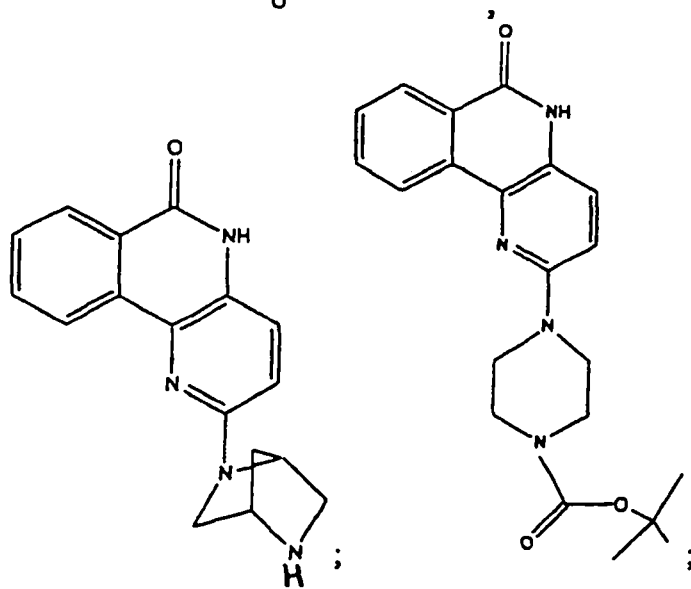


30

35

40

45



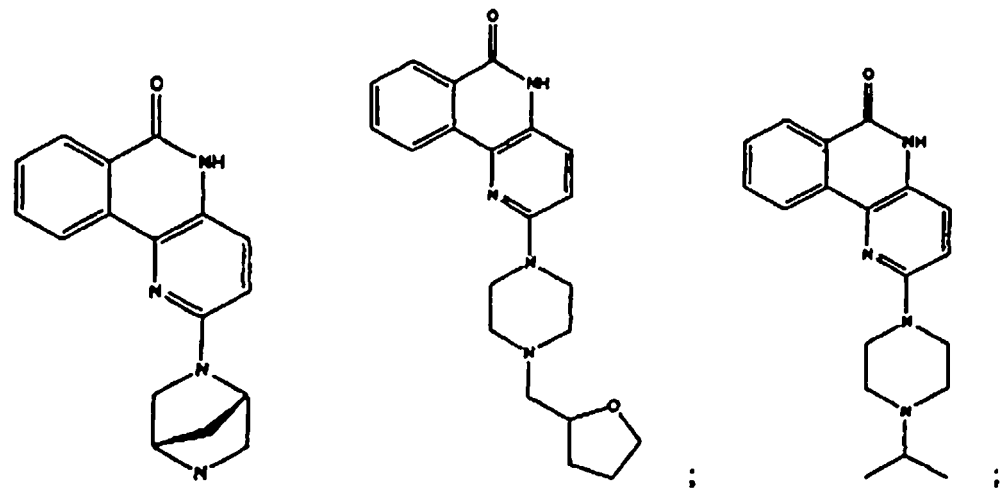
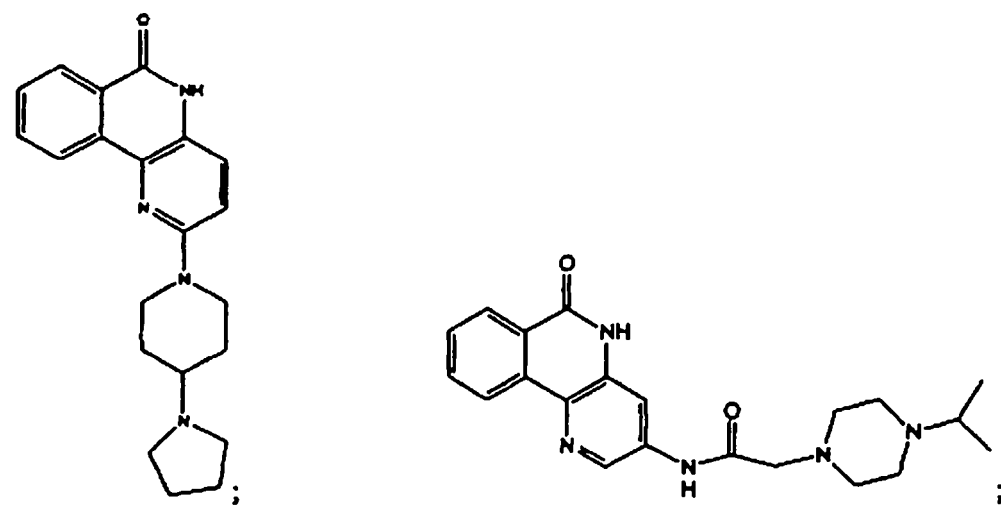
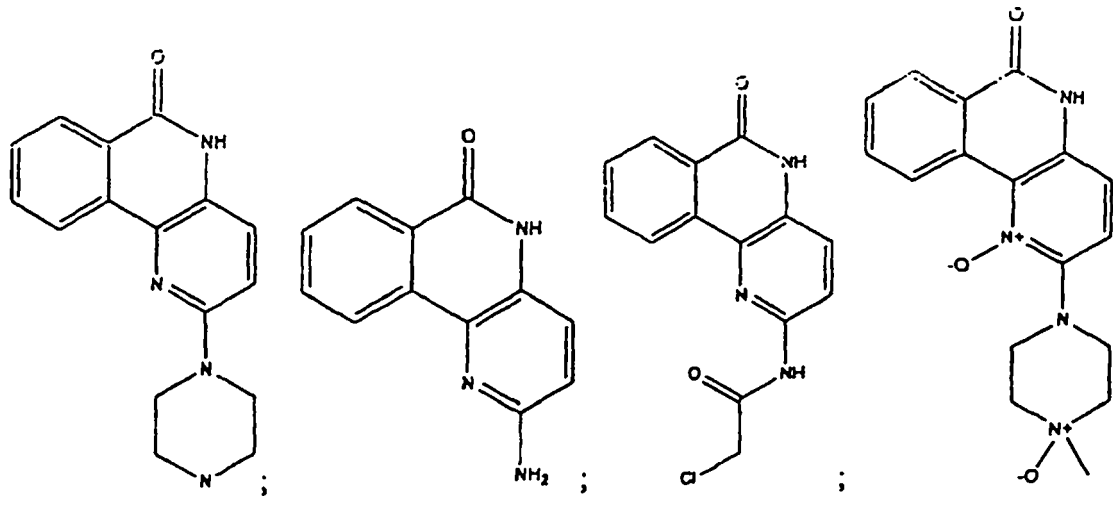
50

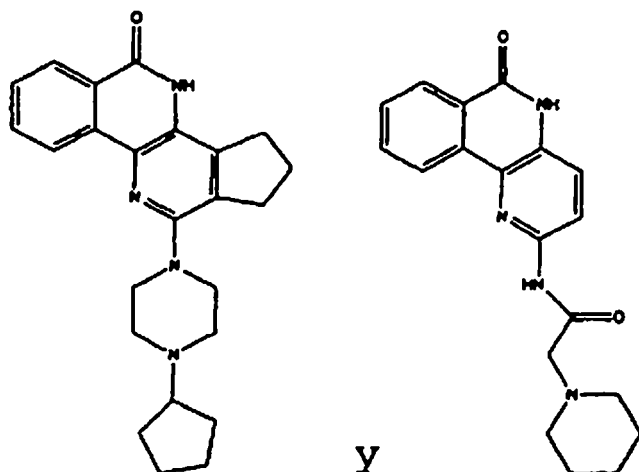
55

60

65

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65





2. Uso de un compuesto según la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para inhibir la actividad de PARP en un mamífero.

3. Uso de un compuesto según la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o estados seleccionados del grupo que consiste en daño tisular que resulta de la muerte o el daño celular debido a necrosis o apoptosis, enfermedades o daño tisular mediados neuronalmente, daño tisular neural que resulta de lesión por isquemia y reperfusión, degeneración macular relacionada con la edad, SIDA y otras enfermedades de senescencia inmunitaria, artritis, gota, caquexia, cáncer, enfermedades degenerativas del músculo esquelético que implican senescencia replicativa, diabetes, senescencia inmunitaria, distrofia muscular, artrosis, osteoporosis, dolor neuropático, ataque nervioso, lesión de nervio periférico, insuficiencia renal, isquemia retiniana, choque septicémico y envejecimiento de la piel, enfermedades o trastornos que se relacionan con el tiempo de vida o la capacidad proliferativa de las células, y enfermedades o estados patológicos inducidos o exacerbados por la senescencia celular.

4. Composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y al menos un compuesto según la reivindicación 1.

5. Uso de un compuesto según la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para tratar al menos uno de tejido neural de un mamífero dañado como resultado de una lesión por isquemia o reperfusión, o trastornos neurológicos o enfermedades neurodegenerativas; tratar ictus vascular; tratar trastornos cardiovasculares; tratar al menos un estado seleccionado de degeneración muscular relacionada con la edad, SIDA, una enfermedad de senescencia inmunitaria, inflamación, gota, artritis, aterosclerosis, caquexia, cáncer o enfermedad degenerativa del músculo esquelético que implica senescencia replicativa, diabetes, traumatismo craneal, senescencia inmunitaria, inflamación, gota, trastornos inflamatorios del intestino (tales como colitis y enfermedad de Crohn), distrofia muscular, artrosis, osteoporosis, dolor agudo y/o crónico (tal como dolor neuropático), insuficiencia renal, isquemia retiniana, choque septicémico (tal como choque endotóxico) o envejecimiento de la piel; extender el tiempo de vida y/o la capacidad proliferativa de las células; alterar la expresión génica de células senescentes; radiosensibilizar células tumorales hipóxicas, o tratar una enfermedad cardiovascular en un animal, tal como angina de pecho, infarto de miocardio, isquemia cardiovascular o daño tisular cardiovascular relacionado con la activación de PARP.

6. Uso según la reivindicación 5, en el que dicho trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en neuropatía periférica provocada por un estado patológico o una lesión física, tal como síndrome de Guillain-Barre, lesión cerebral traumática, daño físico a la médula espinal, ictus asociado con daño cerebral, isquemia focal, isquemia global, lesión por reperfusión, enfermedad desmielinizante, tal como esclerosis múltiple, y trastorno neurológico relacionado con neurodegeneración, tal como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica; siendo dicha lesión por reperfusión un ictus vascular.

7. Uso según la reivindicación 3, en el que dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en tumores productores de ACTH, leucemia linfocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, cáncer de la corteza suprarrenal, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer cervical, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, cáncer colorrectal, linfoma cutáneo de células T, cáncer endometrial, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, cáncer de vesícula biliar, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (de células pequeñas y/o no pequeñas), derrame peritoneal neoplásico, derrame pleural neoplásico, melanoma, mesotelioma, mieloma múltiple, neuroblastoma, linfoma de no Hodgkin, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer de ovario (célula germinal), cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer de pene, retinoblastoma, cáncer de piel, sarcoma de tejidos blandos, carcinomas de células escamosas, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides, neoplasmas trofoblásticos, cáncer uterino, cáncer vaginal, cáncer de la vulva y tumor de Wilm.

ES 2 354 249 T3

8. Uso según la reivindicación 7, en el que dichos cánceres se seleccionan del grupo que consiste en cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer testicular y cáncer de tiroides.

5 9. Uso según la reivindicación 7, que comprende además irradiar dicho cáncer con una dosis terapéuticamente eficaz de radiación.

10 10. Uso según la reivindicación 9, en el que dicha radiación comprende rayos X, y que comprende además administrar a dicho cáncer un radiosensibilizador activado por rayos X seleccionado del grupo que consiste en metronidazol, misonidazol, desmetilmisonidazol, pimonidazol, etanidazol, nimorazol, mitomicina C, RSU 1069, SR4233, E09, RB 6145, nicotinamida, 5-bromodesoxiuridina (BUdR), 5-yododesoxiuridina (IUdR), bromodesoxicidina, fluorodesoxiuridina (FudR), hidroxiurea, cisplatino y mezclas de los mismos.

15 11. Uso según la reivindicación 9, en el que dicha radiación comprende luz visible, y que comprende además administrar a dicho cáncer un radiosensibilizador activado por luz visible seleccionado del grupo que consiste en derivados de hematoporfirina, Photofrin, derivados de benzoporfirina, NPe6, etioporfirina de estaño SnET2, feoforbida-a, bacterioclorofila-a, naftalocianinas, ftalocianinas, ftalocianina de cinc y mezclas de los mismos.

20 12. Uso según la reivindicación 9, que comprende además administrar a dicho cáncer un agente terapéutico adicional seleccionado del grupo que consiste en 5-fluorouracilo, leucovorina, 5'-amino-5'desoxitimidina, oxígeno, carbógeno, transfusiones de glóbulos rojos, perfluorocarbonos (por ejemplo, Fluosol-DA), 2,3-DPG, BW12C, bloqueantes de canales de calcio, pentoxifilina, compuestos antiangiogénesis, hidralazina, LBSO y mezclas de los mismos.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

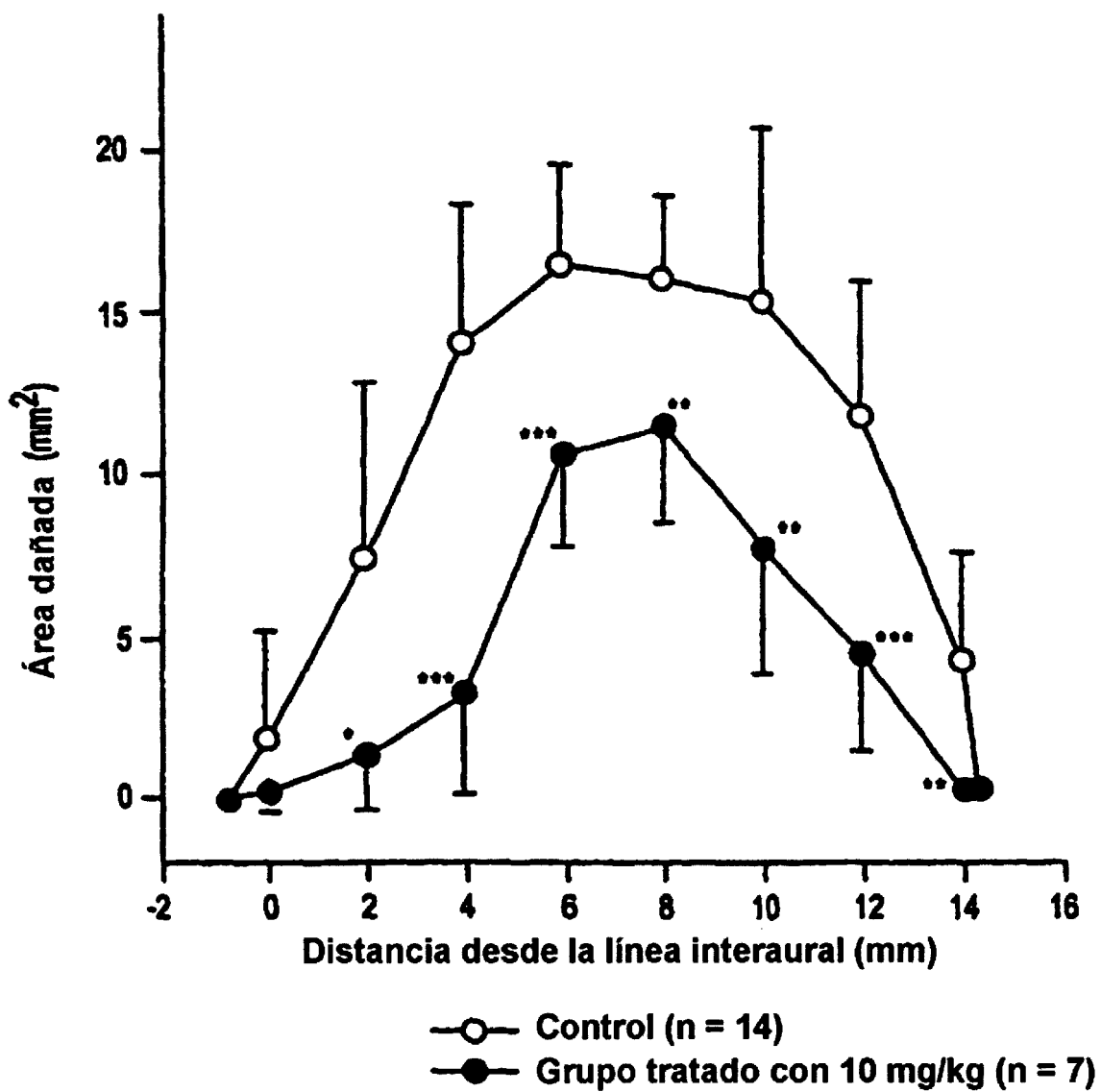


FIG. 2

