

ESCOBAR-URIBE ASOCIADOS
P.O. BOX 94948
BOGOTÁ (8) - COLOMBIA

PCT

03-9952
REPUBLICA DE COLOMBIA

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

PATENTES PCT

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación: 03009952 00000000 Folios: 114
Fecha (ARB): 2003-02-07 16:53:45
Trámite: 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TITULO PATENTE

COMPOSICIONES DE 2-PIRIDINAMINA Y MÉTODOS RELACIONADOS.

SOLICITANTE

Ortho-McNeil Pharmaceutical, Inc.

DE

Raritan, New Jersey, Estados Unidos de América

CLASE

A 61 K 31/44

APODERADO

JIMENA ESCOBAR URIBE

BOGOTÁ, D.C. 7 de febrero del 2003

SS

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

73 009862 00

Radicación : 03009952 00000000 Folios: 114
Fecha (RAD): 2003-02-07 16:53:45
Trámite : 011 PCI-PATENT 2/9 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2030 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

SOLICITUD DE:

1



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I.



Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: **Ortho-McNeil Pharmaceutical, Inc.**

Dirección: U.S. Route 202,

Nacionalidad o Domicilio: **Raritan, New Jersey 08869, Estados Unidos de América.**

Lugar de Constitución : **Delaware**

Teléfono: **717-849-8554** Fax: **717-849-8541**

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número

3

**REPRESENTANTE
O AP DERADO
(74)**

Nombre: **JIMENA ESCOBAR URIBE**

Dirección: Cra. 11A No. 94-76 (Of. 305)

Teléfono: **6 162051/61** Fax: **6 161889**

E-mail: **escobaru@elsitio.net.co**

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número **39.779.452 T.P.68.228**

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: **VER ANEXOS**

Dirección:

Nacionalidad o domicilio:

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. **PCT/US01/41565** Fecha **Agosto 6, 2001**

Publicación Internacional No. **WO 02/011724 A3** Fecha **Febrero 14, 2002**

6

TÍTULO (54) COMPOSICIONES DE 2-PIRIDINAMINA Y METODOS RELACIONADOS.

7

Clasificación Internacional (51) A 61K31/44

8

Prioridad

SI



NO



(33) País de Origen

Estados Unidos de América

(32) Fecha

Agosto 8, 2000

(31) Número de Solicitud

60/223.795

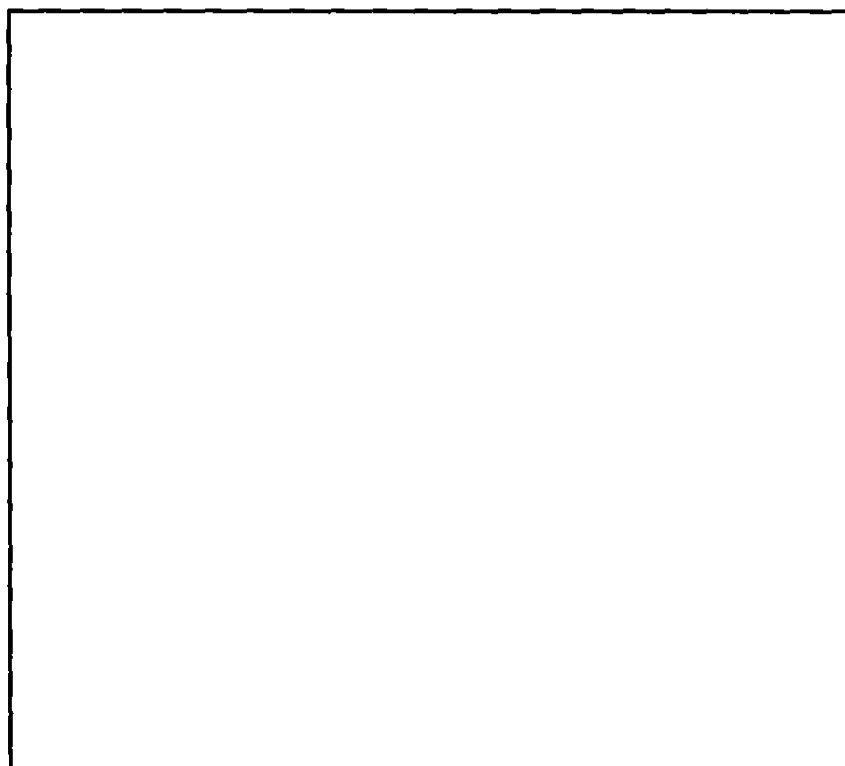
9

Comprobante de pago No. 03 - 7.195

Fecha 4 de febrero de 2003

- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica No. 19.164
- ☐ Poderes si fuere el caso Protocolo No. 19.164
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros

11 FIGURA CARACTERÍSTICA



12 S lícito la concesión de la patente

NOMBRE: JIMENA ESCOBAR URIBE

FIRMA: 

C.C. 39.779.452 de Usaquén T.P. 68.228

2528/PCT

ANEXOS**INVENTORES**

- 1.) **ELFRIDA R. GRANT**
(Flemington, New Jersey 08822, Estados Unidos de América);
- 2.) **FRANK K. BROWN**
(Whitehouse Station, New Jersey 08889, Estados Unidos de América);
- 3.) **ROBERT ALLAN ZIVIN**
(Skillman, New Jersey 08558, Estados Unidos de América);
- 4.) **MICHAEL McMILLIAN**
(Somerville, New Jersey 08876, Estados Unidos de América);
- 5.) **ZHONG ZHONG**
(Bridgewater, New Jersey 08807, Estados Unidos de América);^a
- 6.) **DANIEL BENJAMIN**
(Barnegat, New Jersey 08005, Estados Unidos de América).

13

Solicito expresamente a nombre de la sociedad
Ortho-McNeil Pharmaceutical, Inc., sociedad
constituida de conformidad con las leyes del estado de
Delaware, domiciliada en U.S. Route #202, Raritan,
New Jersey 08869 Estados Unidos de América, el
otorgamiento de Patente para la invención titulada
**"COMPOSICIONES DE 2-PIRIDINAMINA Y METODOS
RELACIONADOS"**.

Clase: A 61


JIMENA ESCOBAR URIBE
C.C. 39.779.452 de Usaquen
T.P . 68.228

9528

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 7,195
FECHA : FEBRERO 4 DE 2003

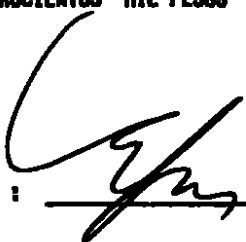
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ESCORBAR URIBE ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	9934069	03/02/2003	12,065,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	400,000.00
	TOTAL :	\$ 400,000.

SON: CUATROCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
14 February 2002 (14.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/011724 A3

(51) International Patent Classification: A61K 31/44, 31/5355, 31/443, 31/4433, 31/4439, A61P 9/10, 25/00

(21) International Application Number: PCT/US01/41565

(22) International Filing Date: 6 August 2001 (06.08.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/223,795 8 August 2000 (08.08.2000) US

(71) Applicant: ORTHO-MCNEIL PHARMACEUTICAL, INC. [US/US]; U.S. Route 202, Raritan, NJ 08869 (US).

(72) Inventors: GRANT, Efrida, R.; 9 Lake Court, Flemington, NJ 08822 (US). BROWN, Frank, K.; 12 Clubhouse Drive, Whitehouse Station, NJ 08889 (US). ZIVIN, Robert, Allan; 9 Pebble Beach Court, Skillman, NJ 08558 (US). MCMILLAN, Michael; 70 Brookside Avenue, #3A, Somerville, NJ 08876 (US). ZHONG, Zhong; 31 Whitehead Road, Bridgewater, NJ 08807 (US). BENJAMIN, Daniel; 206 Eleventh Street, Bernegat, NJ 08005 (US).

(74) Agents: JOHNSON, Philip, S. et al.; Johnson & Johnson, 1 Johnson & Johnson Plaza, New Brunswick, NJ 08933 (US).

(51) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, ZA, ZW.

(54) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

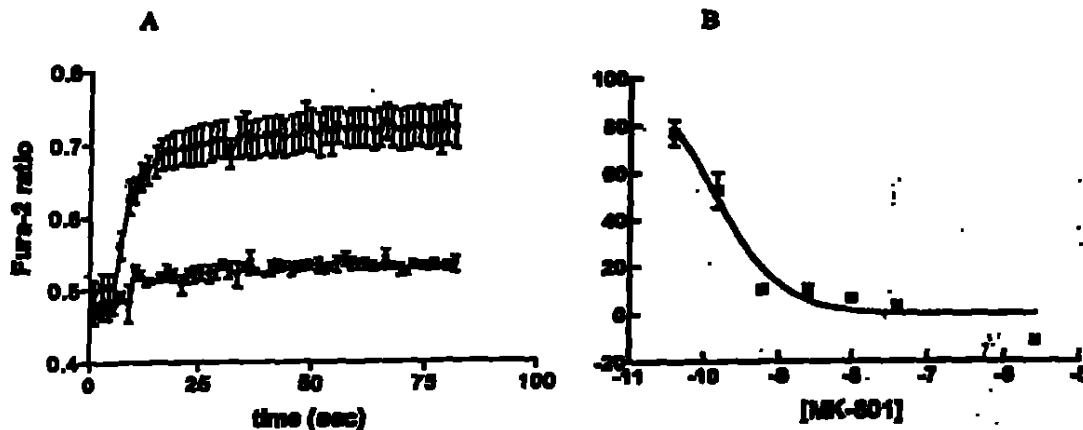
Published:

— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(80) Date of publication of the international search report: 15 August 2002

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: NEUROPROTECTIVE 2-PYRIDINAMINE COMPOSITIONS AND RELATED METHODS



(57) Abstract: This invention provides neuroprotective pharmaceutical compositions comprising 2-pyridinamines. This invention also provides methods of using these compositions to prevent ischemic cell death, particularly neuronal cell death, and reduce the likelihood of neuronal cell death in a subject due to a traumatic event. Finally, this invention provides an apparatus for administering

WO 02/011724 A3

INTERNATIONAL SEARCH REP RT

International Application No.

PCT/US 01/41565

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K31/44 A61K31/5355 A61K31/443 A61K31/4433 A61K31/4439 A61P9/10 A61P25/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, MPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, SCISEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 000 816 A (BEECHAM GROUP LTD) 21 February 1979 (1979-02-21) abstract page 2, line 3 - line 23 page 8, line 1 - line 23 page 10, line 34 - page 11, line 16 claims 1,7-10	1,5,6, 44,45
X	WO 98 25660 A (LEE CHUNG SIL ;KIM HAN WOOK (KR); LEE HYUNG IL (KR)) 18 June 1998 (1998-06-18) abstract page 1, line 5 - line 9 claims figure 1	44,45
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of text C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority, novelty or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to substantiate the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 6 June 2002		Date of mailing of the international search report 17/06/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 2911, D-69001 Heidelberg 2 DE - 69001 Heidelberg Tel. (+49-714) 940-1000, Telex 91 891 epo de, Fax (+49-714) 940-1010		Authorized officer Cislen, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Serial Application No
PCT/US 01/41565

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Classification of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 949 242 A (CHUSAI PHARMACEUTICAL CO LTD) 13 October 1999 (1999-10-13) abstract page 2, line 5 - line 15 page 4, line 11 - line 55 page 11, line 12 - line 35 examples 501, 539 page 110, line 35 - line 44	1, 5, 6, 29-45
A	US 5 536 718 A (ALBRIGHT JAY D ET AL) 16 July 1996 (1996-07-16) table L column 121, line 24 - line 38 column 122, line 17 - line 42 claims 35-37	1, 29-45
P, A	WO 00 68198 A (MERCK FROSST CANADA INC ; BLOUIN MARC (CA); DUCHARME YVES (CA); GIR) 16 November 2000 (2000-11-16) page 3, line 5 - page 4, line 32 page 17, line 21 - line 25 page 18, line 16 - line 24 page 19, line 20 - line 28 page 21, line 25 - line 33 examples 68, 69, 73 claims 1, 17, 18	1, 29-45
P, A	WO 01 32174 A (CLAIBORNE CHRISTOPHER F ; MCCAULEY JOHN A (US); MERCK & CO INC (US)) 10 May 2001 (2001-05-10) page 3, line 1 - line 23 page 10, line 23 - line 33 example 55 claims 9, 10, 12	1, 2, 29-45

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA 210

Continuation of Box I.2

Present claims 29-43 relate to a therapeutic application which actually is not well-defined. The use of the definitions "reducing ischemic death", "reducing neuronal death in response to a traumatic event", "a medical disorder", "a physical trauma", "a chemical trauma" and "a biological trauma" in the present context is considered to lead to a lack of clarity within the meaning of Article 6 PCT. The lack of clarity is such as to render a meaningful complete search impossible. Consequently, the search has been restricted to the diseases specifically mentioned in the description p. 11, lines 18-23 and p. 13, line 24 - p. 14, line 21.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Serial Application No
PCT/US 01/41565

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0000816	A	21-02-1979	AU 3862078 A	07-02-1980
			DK 346278 A	07-02-1979
			EP 0000816 A1	21-02-1979
			ES 472384 A1	01-10-1979
			ES 479931 A1	01-12-1979
			ES 479932 A1	01-12-1979
			ES 479933 A1	01-12-1979
			IT 1106623 B	11-11-1985
			JP 54041881 A	03-04-1979
			ZA 7804463 A	25-07-1979
WO 9825660	A	18-06-1998	EP 1011762 A1	28-06-2000
			WO 9825660 A1	18-06-1998
			US 6352522 B1	05-03-2002
EP 0949242	A	13-10-1999	AU 742388 B2	03-01-2002
			AU 5339498 A	17-07-1998
			EP 0949242 A1	13-10-1999
			NO 993109 A	24-08-1999
			PL 334304 A1	14-02-2000
			US 6331553 B1	18-12-2001
			HU 0000321 A2	28-08-2000
			WO 9828257 A1	02-07-1998
			JP 10237028 A	08-09-1998
US 5536718	A	16-07-1996	AU 707982 B2	22-07-1999
			AU 4769896 A	07-08-1996
			BR 9607182 A	11-11-1997
			CA 2210631 A1	25-07-1996
			CN 1198746 A , B	11-11-1998
			CZ 9702249 A3	17-12-1997
			EP 0804438 A1	05-11-1997
			HU 9800646 A2	28-08-1998
			IL 116775 A	17-08-1999
			JP 11500106 T	06-01-1999
			NZ 302111 A	29-04-1999
			TW 403752 B	01-09-2000
			WO 9622293 A1	25-07-1996
			US 5610156 A	11-03-1997
			US 5612334 A	18-03-1997
			US 5700796 A	23-12-1997
			US 5753648 A	19-05-1998
			ZA 9600297 A	15-07-1997
WO 0068198	A	16-11-2000	AU 4282900 A	21-11-2000
			WO 0068198 A2	16-11-2000
			EP 1177175 A2	06-02-2002
			US 6200993 B1	13-03-2001
WO 0132174	A	10-05-2001	AU 1345001 A	14-05-2001
			WO 0132174 A1	10-05-2001
			US 6316474 B1	13-11-2001

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
14 February 2002 (14.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/11724 A2

(51) International Patent Classification: A61K 31/44,
31/5355, 31/443, 31/4433, 31/4439, A61P 9/10, 25/00

(21) International Application Number: PCT/US01/41565

(22) International Filing Date: 6 August 2001 (06.08.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/223,795 8 August 2000 (08.08.2000) US

(71) Applicant: ORTHO-McNEIL PHARMACEUTICAL,
INC. [US/US]; U.S. Route 302, Raritan, NJ 08869 (US).

(72) Inventors: GRANT, Elyda, R.; 9 Lake Court, Flem-
ington, NJ 08823 (US). BROWN, Frank, K.; 13 Club-
house Drive, Whitehouse Station, NJ 08889 (US). ZIVIN,

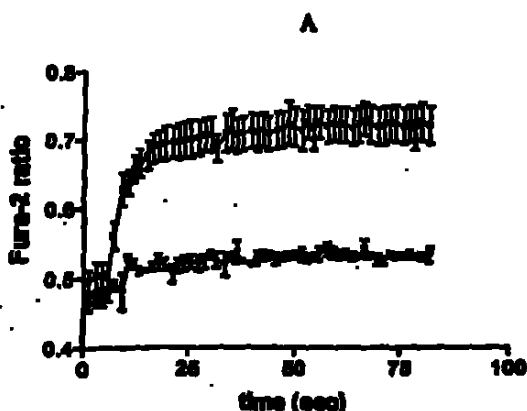
Robert, Allan; 9 Pebble Beach Court, Skillman, NJ 08558
(US). MCMILLAN, Michael; 70 Brookside Avenue, #3A,
Somerville, NJ 08876 (US). ZHONG, Zhong; 31 White-
head Road, Bridgewater, NJ 08807 (US). BENJAMIN,
Daniel; 208 Eleventh Street, Barnegat, NJ 08005 (US).

(74) Agents: JOHNSON, Philip, S. et al.; Johnson & Johnson,
1 Johnson & Johnson Plaza, New Brunswick, NJ 08933
(US).

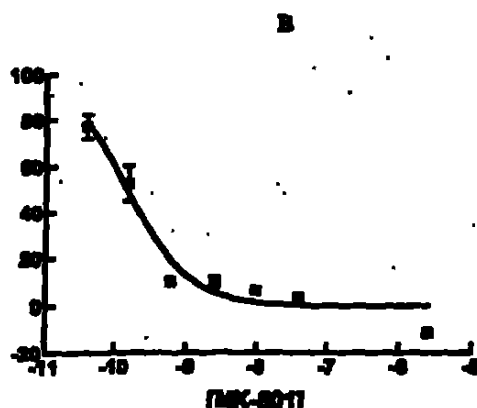
(51) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TC, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

[Continued on next page]

(54) Title: 2-PYRIDINAMINE COMPOSITIONS AND RELATED METHODS



(57) Abstract: This invention provides neuroprotective pharmaceu-
tical compositions comprising 2-pyridinamines. This invention also
provides methods of using these compositions to prevent ischemic cell
death, particularly neuronal cell death, and reduce the likelihood of
neuronal cell death in a subject due to a traumatic event. Finally, this
invention provides an apparatus for administering to a subject the in-
stant pharmaceutical compositions.



WO 02/11724 A2

(24) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TI, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

To:

JOHNSON & JOHNSON
Attn. Johnson, Philip, S.
One Johnson & Johnson Plaza
New Brunswick, NJ 08933
UNITED STATES OF AMERICA

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Search
Response
8-17-02

Date of mailing (day/month/year)	17/06/2002
Applicant's or agent's file reference ORT-1483PCT	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US 01/41565	International filing date (day/month/year) 06/08/2001
Applicant ORTHO-MCNEIL PHARMACEUTICAL, INC.	

1. ☒ The applicant is hereby notified that the International Search Report has been established and is transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 18:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 48):

When? The time limit for filing such amendments is normally 2 months from the date of transmittal of the International Search Report; however, for more details, see the notes on the accompanying sheet.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Switzerland
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no International Search Report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect is transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Office.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Further action(s): The applicant is reminded of the following:

Shortly after 18 months from the priority date, the International application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the International application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 80bis.1 and 80bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for International publication.

Within 19 months from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later).

Within 20 months from the priority date, the applicant must perform the prescribed acts for entry into the national phase before all designated Offices which have not been elected in the demand or in a later election within 19 months from the priority date or could not be elected because they are not bound by Chapter II.

Name and mailing address of the International Searching Authority



European Patent Office, P.B. 6818 Patentkan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-3040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Joëlle Gerber

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and these requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the PCT Applicant's Guide, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the letter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 48.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 48.2).

Where a demand for international preliminary examination has been filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 28, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under Article 18(1)" (Rule 48.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 18(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 18(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequences if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments under Article 18, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the same time of filing the amendments with the International Bureau, also file a copy of such amendments with the International Preliminary Examining Authority (see Rule 62.2(a), first sentence).

Consequences with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, where upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 18 may have to be furnished to the designated/selected Office, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/selected Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference ORT-1483PCT	FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 6 below.	
International application No. PCT/US 01/41565	International filing date (day/month/year) 06/08/2001	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 08/08/2000
Applicant ORTHO-MCNEIL PHARMACEUTICAL, INC.		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 5 sheets.



It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.



the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:



contained in the international application in written form.



filed together with the international application in computer readable form.



furnished subsequently to this Authority in written form.



furnished subsequently to this Authority in computer readable form.



the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.



the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box II).

4. With regard to the title,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established by this Authority to read as follows:

NEUROPROTECTIVE 2-PYRIDINAMINE COMPOSITIONS AND RELATED METHODS

5. With regard to the abstract,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No.



as suggested by the applicant.



because the applicant failed to suggest a figure.



because this figure better characterizes the invention.

1



None of the figures.

16
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K31/44 A61K31/5355 A61K31/443 A61K31/4433 A61K31/4439
A61P9/10 A61P25/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

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

(electronic data bases consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used))

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, SCISEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 000 816 A (BEECHAM GROUP LTD) 21 February 1979 (1979-02-21) abstract page 2, line 3 - line 23 page 8, line 1 - line 23 page 10, line 34 - page 11, line 16 claims 1,7-10	1,5,6, 44,45
X	WO 98 25660 A (LEE CHUNG SIL ;KIM HAN WOOK (KR); LEE HYUNG IL (KR)) 18 June 1998 (1998-06-18) abstract page 1, line 5 - line 9 claims figure 1	44,45

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 June 2002

Date of mailing of the international search report

17/06/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. Box 5818, Patenkamp 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 881 apo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cielen, E

17

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 949 242 A (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD) 13 October 1999 (1999-10-13) abstract page 2, line 5 - line 15 page 4, line 11 - line 55 page 11, line 12 - line 35 examples 501,539 page 110, line 35 - line 44	1,5,6, 29-45
A	US 5 536 718 A (ALBRIGHT JAY D ET AL) 16 July 1996 (1996-07-16) table L column 121, line 24 - line 38 column 122, line 17 - line 42 claims 35-37	1,29-45
P,A	WO 00 68198 A (MERCK FROSST CANADA INC ;BLOUIN MARC (CA); DUCHARME YVES (CA); GIR) 16 November 2000 (2000-11-16) page 3, line 5 -page 4, line 32 page 17, line 21 - line 25 page 18, line 16 - line 24 page 19, line 20 - line 28 page 21, line 25 - line 33 examples 68,69,73 claims 1,17,18	1,29-45
P,A	WO 01 32174 A (CLAIBORNE CHRISTOPHER F ;MCCAULEY JOHN A (US); MERCK & CO. INC (US)) 10 May 2001 (2001-05-10) page 3, line 1 - line 23 page 10, line 23 - line 33 example 55 claims 9,10,12	1,2, 29-45

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Present claims 29-43 relate to a therapeutic application which actually is not well-defined. The use of the definitions "reducing ischemic death", "reducing neuronal death in response to a traumatic event", "a medical disorder", "a physical trauma", "a chemical trauma" and "a biological trauma" in the present context is considered to lead to a lack of clarity within the meaning of Article 6 PCT. The lack of clarity is such as to render a meaningful complete search impossible. Consequently, the search has been restricted to the diseases specifically mentioned in the description p. 11, lines 18-23 and p. 13, line 24 - p. 14, line 21.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 29-31, 36-43 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 8.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0000816	A	21-02-1979	AU 3862078 A	07-02-1980
			DK 346278 A	07-02-1979
			EP 0000816 A1	21-02-1979
			ES 472384 A1	01-10-1979
			ES 479931 A1	01-12-1979
			ES 479932 A1	01-12-1979
			ES 479933 A1	01-12-1979
			IT 1106623 B	11-11-1985
			JP 54041881 A	03-04-1979
			ZA 7804463 A	25-07-1979
WO 9825660	A	18-06-1998	EP 1011762 A1	28-06-2000
			WO 9825660 A1	18-06-1998
			US 6352522 B1	05-03-2002
EP 0949242	A	13-10-1999	AU 742388 B2	03-01-2002
			AU 5339498 A	17-07-1998
			EP 0949242 A1	13-10-1999
			NO 993109 A	24-08-1999
			PL 334304 A1	14-02-2000
			US 6331553 B1	18-12-2001
			HU 0000321 A2	28-08-2000
			WO 9828257 A1	02-07-1998
			JP 10237028 A	08-09-1998
US 5536718	A	16-07-1996	AU 707982 B2	22-07-1999
			AU 4769896 A	07-08-1996
			BR 9607182 A	11-11-1997
			CA 2210631 A1	25-07-1996
			CN 1198746 A ,B	11-11-1998
			CZ 9702249 A3	17-12-1997
			EP 0804438 A1	05-11-1997
			HU 9800646 A2	28-08-1998
			IL 116775 A	17-08-1999
			JP 11500106 T	06-01-1999
			NZ 302111 A	29-04-1999
			TW 403752 B	01-09-2000
			WO 9622293 A1	25-07-1996
			US 5610156 A	11-03-1997
			US 5612334 A	18-03-1997
			US 5700796 A	23-12-1997
			US 5753648 A	19-05-1998
			ZA 9600297 A	15-07-1997
WO 0068198	A	16-11-2000	AU 4282900 A	21-11-2000
			WO 0068198 A2	16-11-2000
			EP 1177175 A2	06-02-2002
			US 6200993 B1	13-03-2001
WO 0132174	A	10-05-2001	AU 1345001 A	14-05-2001
			WO 0132174 A1	10-05-2001
			US 6316474 B1	13-11-2001

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

McCORMACK, Myra H.
JOHNSON & JOHNSON
One Johnson & Johnson Plaza
New Brunswick, NJ 08933
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Response due 8-10-02

PCT
JUL 15 2002
WRITTEN OPINION
(PCT Rule 66)

21
MH/M
out 1-
MH/M
5-2-02

Applicant's or agent's file reference ORT-1483PCT		Date of mailing (day/month/year) 10/07/2002
International application No. PCT/US 01/41565		REPLY DUE within 1/00 months/days from the above date of mailing
International filing date (day/month/year) 06/08/2001	Priority date (day/month/year) 08/08/2000	
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC A61K31/44		
Applicant ORTHO-McNEIL PHARMACEUTICAL, INC.		

1. This written opinion is the first drawn up by this International Preliminary Examining Authority.

2. This opinion contains indications relating to the following items:

I ☒ Basis of the opinion

II ☐ Priority

III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

IV ☐ Lack of unity of invention

V ☒ Reasoned statement under Rule 66.3(a)(8) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

VI ☐ Certain documents cited

VII ☐ Certain defects in the international application

VIII ☐ Certain observations on the international application

3. The applicant is hereby invited to reply to this opinion.

When? See the time limit indicated above. The applicant may, before the expiration of that time limit, request this Authority to grant an extension, see Rule 66.2(d).

How? By submitting a written reply, accompanied, where appropriate, by amendments, according to Rule 66.3. For the form and the language of the amendments, see Rules 66.5 and 66.9.

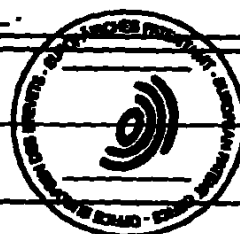
Also For an additional opportunity to submit amendments, see Rule 66.4. For the examiner's obligation to consider amendments and/or arguments, see Rule 66.4bis. For an informal communication with the examiner, see Rule 66.5.

If no reply is filed, the international preliminary examination report will be established on the basis of this opinion.

4. The final date by which the international preliminary examination report must be established according to Rule 69.2 is: **08/12/2002**

Name and mailing address of the IPEA/  European Patent Office D-80298 Munich Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 opmu d Fax: (+49-89) 2399-4463	Authorized officer Examiner Formalities officer (incl. extension of time limits) Tel. (+49-89) 2399 2828
---	---

Form PCT/IPEA/408 (cover sheet) (march 2002)



I. Basis of the opinion

The basis of this written opinion is the application as originally filed.

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The question of whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step, or to be industrially applicable has not been and will not be the subject of the international preliminary examination in respect of the claims which have not been searched (Article 17(2)(a) or (3) and Rule 66.1(e) PCT; see also international search report).

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(II) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability

1. To the extent that the international preliminary examination has been carried out (see item III above), the following is pointed out:
2. In light of the documents cited in the international search report, it is considered that the invention as defined in at least some of the claims, which have been the subject of an international search report, does not appear to meet the criteria mentioned in Article 33(1) PCT, i.e. does not appear to be novel and/or to involve an inventive step (see international search report, in particular the documents cited X and/or Y and corresponding claim references).
3. If amendments are filed, the applicant should comply with the requirements of Rule 66.8 PCT and indicate the basis of the amendments in the documents of the application as originally filed (Article 34 (2) (b) PCT) otherwise these amendments may not be taken into consideration for the establishment of the international preliminary examination report. The attention of the applicant is drawn to the fact that if the application contains an unnecessary plurality of independent claims, no examination of any of the claims will be carried out.

NB: Should the applicant decide to request detailed substantive examination, then an international preliminary examination report will normally be established directly. Exceptionally the examiner may draw up a second written opinion, should this be explicitly requested.

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicants : Grant et al

Serial No. : 09/922,658

Art Unit: 1617

Filed : August 6, 2001

Examiner: Criares

For : 2-PYRIDINAMINE COMPOSITIONS AND RELATED METHODS

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the
United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed
to: Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231 on

January 10, 2003

(Date)

Myra H. McCormack

Name of applicant, assignee, or Registered Representative

Myra McCormackJanuary 10, 2003

(Date of Signature)

Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Response to Restriction Requirement

Dear Sir:

In response to the Restriction Requirement mailed November 12, 2002, the time for response being extended until January 12, 2003, Applicants elect Group II directed to claims 1-22 and claims 44-45 drawn to a composition and related devices with traverse.

24

Should the Examiner have questions regarding this response to the Restriction Requirement, he is invited to contact the undersigned at the number provided below.

Respectfully submitted,

Myra McCormack

Myra H. McCormack
Reg. No. 36,602
Attorney for Applicant(s)

Johnson & Johnson
One Johnson & Johnson Plaza
New Brunswick, NJ 08933-7003
(732) 524-6932
DATE: January 10, 2003

2578

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY SEP 17 2002PCT
HHM
8-27-02

25

To:

MCCORMACK, Myra H.
JOHNSON & JOHNSON
 One Johnson & Johnson Plaza
 New Brunswick, NJ 08933
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

TO REFER TO

**NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year)

02/09/2002

Applicant's or agent's file reference

ORT-1483PCT

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/US 01/41565

International filing date (day/month/year)

06/08/2001

Priority date (day/month/year)

08/08/2000

Applicant

ORTHO-MCNEIL PHARMACEUTICAL, INC.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
4. **REMINDER**

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices)(Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/001).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

For the purpose of deciding whether the claimed invention is patentable or not, the elected Offices may apply criteria additional to or different from the criteria on which the international preliminary examination report is based (see Articles 27 (3), 33 (3)). Additional criteria may include e.g. exceptions from patentability and the requirements of enabling disclosure and of clarity and support of claims.

Name and mailing address of the IPBA/

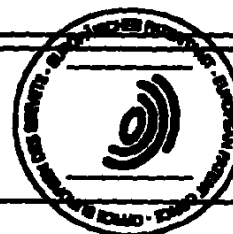


European Patent Office
 D-80298 Munich
 Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523456 opma d
 Fax: (+49-89) 2399-4445

Authorized officer

FERRO VASCONCELOS M

Tel. (+49-89) 2399 2828



Form PCT/IPEA/416 (28/06/2002) P20473

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

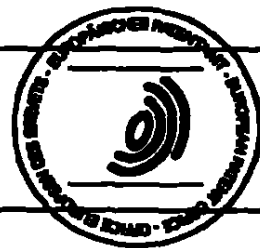
(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference ORT-1483PCT	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/US 01/41565 ✓	International filing date (day/month/year) 06/08/2001	Priority date (day/month/year) 08/08/2000
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K31/44		
Applicant ORTHO-MCNEIL PHARMACEUTICAL, INC.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>2</u> sheets, including this cover sheet. ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consists of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I ☒ Basis of the report II ☐ Priority III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV ☐ Lack of unity of invention V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI ☐ Certain documents cited VII ☐ Certain defects in the international application VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 06/02/2002	Date of completion of this report 28/08/2002
Name and mailing address of the IPEA/  European Patent Office D-80298 Munich Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 513656 opmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Authorized officer MEYLAERTS H Tel. (+49-89) 2399 2828

Form PCT/IPEA/409 (cover sheet) (July 1998)



I. Basis of the report

The basis of this international preliminary examination is the application as originally filed.

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The question of whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step, or to be industrially applicable has not been the subject of the international preliminary examination in respect of the claims which have not been searched (Article 17(2)(a) or (3) and Rule 66.1(e) PCT); see also international search report).

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(II) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability

To the extent that the international preliminary examination has been carried out (see item III above), the following is pointed out:

In light of the documents cited in the international search report, it is considered that the invention as defined in at least some of the claims, which have been the subject of an international search report, does not appear to meet the criteria mentioned in Article 33(1) PCT, i.e. does not appear to be novel and/or to involve an inventive step (see international search report, in particular the documents cited X and/or Y and corresponding claim references).

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES
PCT
INFORME EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL
(PCT artículo 36 y regla 70)

Referencia del solicitante o agente ORT-1483PCT	Ver notificación de la transmisión del examen preliminar Internacional (formato PCT/IPEA/416) PARA PROSEGUIR	
No. Solicitud Internacional PCT/US 01/41585	Fecha de presentación Internacional (día/mes/año) 06/08/2001	Fecha de prioridad (día/mes/año) 08/08/2000
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC A61K31/44		
Solicitante ORTHO-MCNEIL PHARMACUTICAL, INC.		

1. Este examen preliminar Internacional ha sido preparado por esta Autoridad encargada del Examen Preliminar Internacional y es transmitida al solicitante de acuerdo con el artículo 36.

2. Este INFORME consiste de un total de 2 páginas, incluyendo esta hoja.

Este informe también está acompañado por ANEXOS, esto es hojas de la descripción, reivindicaciones y/o dibujos, los cuales han sido modificados y son la base para este informe y/o hojas que contienen rectificaciones presentadas ante esta Autoridad (ver Regla 70.16 y Sección 807 de las Instrucciones Administrativas bajo el PCT).

Estos anexos consisten en un total de __ hojas.

3. Este Informe contiene indicaciones que se relacionan con los siguientes puntos:

I.	☒ Base del Informe
II.	☐ Prioridad
III.	☒ El no-establecimiento de opinión en relación con la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial
IV.	☐ Falta de unidad de invención
V.	☒ Declaración motivada bajo el Art. 35(2) con relación a la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial; citaciones y explicaciones que soportan dicha declaración
VI.	☐ Ciertos documentos citados
VII.	☐ Ciertos defectos en la solicitud Internacional
VIII.	☐ Ciertas observaciones en la solicitud Internacional

Fecha de presentación de la demanda 06/02/2002	Fecha en que se completó este informe 28/08/2002
Nombre y dirección de la autoridad encargada del examen preliminar Internacional: Oficina de Patentes Europea D-80298 Munich Tel. +49 89 2399-0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Oficial autorizado MEYLAERTS H Teléfono: +49 89 2399 2828

**INFORME DEL EXAMEN
PRELIMINAR INTERNACIONAL**

Solicitud internacional No. PCT/US 01/41565

I. BASE DEL INFORME

La base de este Informe del examen preliminar internacional es la solicitud como fue presentada originalmente.

III. El no-establecimiento de opinión en relación con la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial

La pregunta de si la presente invención reivindicada aparenta ser novedosa, si tiene altura inventiva, o es aplicable industrialmente no ha sido objeto del examen preliminar internacional en relación con las reivindicaciones que no han sido buscadas (Art. 17(2) (a) o (3) y Regla 66.1 (e) PCT); ver también el Informe de búsqueda internacional).

V. Declaración motivada bajo la Regla 66.2 (a) (II) con relación a la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha declaración

Si se llevare a cabo el examen preliminar internacional (ver el ítem III mencionado anteriormente), se señala lo siguiente:

A la luz de los documentos citados en el Informe de búsqueda internacional, se considera que la invención como es definida en por lo menos algunas de las reivindicaciones, las cuales han sido materia del Informe de búsqueda internacional, no aparentan cumplir con los criterios mencionados en el Artículo 33 (1) PCT, esto es, no aparenta ser novedosa y/o tener nivel inventivo (ver Informe de búsqueda internacional, en especial los documentos citados X y/o Y, y las referencias de las reivindicaciones correspondientes).

Rev.
1.
- 1:

2.
-

3.

INV-
nfo//
PCT
3026
3114

3A:
3:
" 1)

4.
-

5.

6.
7.
8.
9.

COMPOSICIONES DE 2-PIRIDINÁMINA Y METODOS RELACIONADOS

REFERENCIAS DE LA SOLICITUD RELACIONADA

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos expediente No. 60/223,795, radicada en Agosto 8 de 2000, la cual se encuentra aquí referenciada.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones neuroprotectoras de 2-piridinamina, y métodos de uso de la misma, para prevenir la muerte celular después de un evento isquémico. Estas composiciones tienen particular importancia en la prevención de la muerte de células neuronales y los desórdenes que ella ocasiona.

Antecedentes de la invención

El glutamato es el mejor neurotransmisor de excitación rápida del sistema nervioso central en los mamíferos. Éste despolariza las neuronas abriendo tres clases de canales de iones receptores: receptores AMPA, cainato y NMDA. Incrementos transitorios en los niveles de glutamato sináptico ocurren durante la transmisión excitatoria normal. Sin embargo, incrementos excesivos en los niveles de glutamato sináptico son tóxicos para las neuronas, y dispara el proceso de muerte de las células neuronales, comúnmente denominado como excitotoxicidad por glutamato (Meldrum and Garthwaite 1990). La excitotoxicidad por glutamato contribuye al daño

cerebral inducido por la isquemia, epilepsia, y varias enfermedades neurodegenerativas crónicas (Meldrum and Garthwaite 1990).

De las tres clases de canales receptores de glutamato, es específicamente la sobreactivación del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) la primeramente responsable de disparar la muerte neuronal por excitotoxicidad en varios tipos de neuronas (Meldrum and Garthwaite 1990). En modelos de ataques fulminantes de animales, el daño cerebral por isquemia inducida puede ser ampliamente aliviado por pretratamiento con un antagonista del receptor NMDA específico, MK-801 (Park et al. 1988). Se cree que la excitotoxicidad por glutamato, en muchos tipos de neuronas, resulta primeramente de la afluencia excesiva de iones calcio, debido a la alta permeabilidad del receptor NMDA por el calcio (Schneggenburger et al. 1993). Niveles altos de calcio intracelular pueden inducir la sobreactivación de enzimas calcio-reguladas tales como la sintetasa óxido nítrico, fosfolipasas, proteasas, quinasas. Además, los altos niveles de calcio intracelular pueden mediar en la excitotoxicidad.

El señalamiento del glutamato a través del receptor NMDA induce la fosforilación y la activación de las proteínas quinasas mitógeno-activadas (MAPK) en cultivos de neuronas primarias. (Bading and Greenberg 1991; Xia et al. 1995). Modelos de daño cerebral por isquemia en animales sugieren que la actividad incrementada de los miembros de la familia de las MAPK puede mediar en el daño neuronal (Alessandri et al. 1999; Yang et al. 1997). La supresión del Jnk3, un miembro de la

familia de las JNK de las quinasas MAP, la cual se expresa predominantemente en el cerebro, protege las neuronas del hipocampo, de la excitotoxicidad inducida *in vivo* por el ácido caínico; aun cuando el papel del receptor de la NMDA en esta forma de toxicidad no es claro (Yang et al. 1998). La inhibición específica de las quinasas de ERK1/2, y la quinasa MAP (p44/42) que activan corriente arriba, protegen contra el daño neuronal causado por la isquemia cerebral focal (Alessandrini et al. 1999). En neuronas primarias del hipocampo cultivadas, la inhibición de las ERK1/2 (p44/42 MAPK) que señalan la vía, protege contra la muerte cerebral inducida por la remoción del quinuronato, un antagonista de amplio espectro de los receptores de glutamato (Murray et al. 1998). La toxicidad oxidativa inducida por glutamato no mediada por receptores, también se bloquea mediante la inhibición de las ERK1/2 señalamas de la vía (Stanciu et al. 2000). Colectivamente, éstos reportes indican claramente el importante papel de señalización de las ERK1/2 MAPK en la toxicidad neuronal inducida por glutamato. Sin embargo, sigue siendo incierto qué clase de receptor de glutamato puede disparar la cascada de señalización excitotóxica, en la cual la vía ERK1/2MAPK está tan críticamente involucrada.

Evidencia sustancial de la literatura sugiere que la inhibición de la MEK (Quinasa MAP o quinasa ERK, una quinasa treonina-tirosina activadora de ERK1 y ERK2) es una estrategia efectiva de neuroprotección *in vivo* (Alessandrini et al. 1999; Hu and Wieloch. 1994; Kindy 1993). Estos reportes indican que la isquemia cerebral transitoria induce fosforilación de la quinasa p42 MAP en el cerebro de los roedores. Un inhibidor selectivo de MEK1/2, el PD 098059, puede bloquear esta inducción en

la fosforilación y puede reducir la extensión del daño neuronal (Alessandrini et al. 1999). La literatura sobre cultivos de neuronas primarias también sugiere que la vía de la quinasa MAP es relevante en el daño excitotóxico *in vitro*, (Bading and Greenberg 1991; Fiore et al. 1993; Kurino et al. 1995; Murray et al. 1998; Rosen et al. 1994; Xia et al. 1996). Estos reportes indican que el señalamiento del glutamato a través de sus varios receptores ionotrópicos y metabotrópicos produce la activación de la quinasa p44/42 MAP. La activación incrementada de la quinasa P44/42 MAP induce la transcripción de genes inmediata y temprana (Xia et al. 1996) y está implicada en ataques que inducen la muerte celular de las neuronas del hipocampo cultivadas (Murray et al. 1998).

Las vías señaladoras que unen el receptor NMDA con la activación de la quinasa p42/44 MAP, o las vías corriente abajo que unen la quinasa p42/44 con la neurotoxicidad retardada, no están bien entendidas. Los activadores corriente arriba de las quinasas p42/44 MAP son el MEK1 y el MEK2 (Anderson et al. 1990; Crews, Alessandrini, and Erikson 1992; Zheng and Guan 1993). Las MEK1/2 son fosforiladas por la familia Raf de quinasas (Jaiswal et al. 1994; Moodie et al. 1993) las cuales son activadas por la familia Ras de pequeñas proteínas unidas por GTP. (Papin et al. 1995).

Una molécula intermedia candidata que puede unirse al receptor NMKA para activar la cascada señaladora de las Ras/Raf/MEK/p42/44MAPK es la quinasa tirosina calcio-dependiente PYK2 (Lev et al. 1995). Los niveles incrementados de calcio

intracelular pueden activar la PYK2, la cual puede activar la quinasa MAP señaladora.

Un segundo intermedio candidato que puede unir la activación del canal de ion a la quinasa MAP señaladora es la quinasa calmodulina (CaM-K). Dos tipos de CaM-Ks se encuentran altamente expresados en las neuronas, CaM-KII y CaM-KIV (Sakagami and Kondo 1993; Sola, Tussel, and Serratosa 1999). Estas proteínas quinasa son activadas mediante la unión de calcio y calmodulina, y ellas pueden regular la actividad de la p38, la JNK, y la quinasa P42/44 MAP (Enslen et al. 1996).

Una tercera molécula intermedia candidata puede ser el óxido nítrico (NO). En neuronas corticales, el receptor NMDA unido a la producción de NO mediante PSD-95 se necesita para la neurotoxicidad disparada por el receptor NMDA (Sattler et al. 1999). La producción aumentada del NO también puede incrementar la actividad de la quinasa p42/44 MAP (Lander et al. 1996).

Las Moléculas que están corriente debajo de la quinasa p42/44 MAP incluyen factores de transcripción tales como CREB, Elk-1, c-Jun, y c-Fos (Vanhoutte et al. 1999). La vía de la quinasa p42/44 MAP también puede inducir la fosforilación de los componentes del citoesqueleto tales como neurofilamentos (Li et al. 1999), regular las interacciones en la sinapsis I-actina (Jovanovic et al. 1996), fosforilar la proteína básica mielina (Ahn et al. 1991), y regular la secreción del amiloide precursor de proteína (Desdouits-Magnen et al. 1998). Por lo tanto, hay muchos

mediadores potenciales de neurotoxicidad corriente abajo de la activación de la quinasa p42/44 MAP.

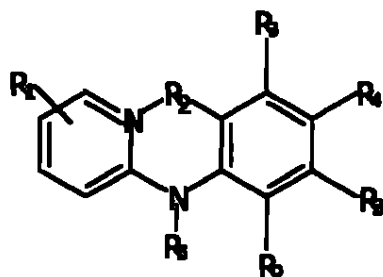
Un entendimiento detallado de las vías señaladoras que son activadas corriente abajo de la estimulación receptora por glutamato podría ser útil para determinar medios eficientes para prevenir el daño neuronal inducido por la hipoxia/isquemia. Se han hecho numerosos intentos para estudiar estas vías con el fin señalado. En Lipton, U.S. Patent 5, 506,231, se describe un método para reducir el daño de las neuronas CNS en un paciente infectado con el virus de la inmunodeficiencia humana, mediante la administración de un compuesto que antagoniza con el receptor NMDA. Esta patente no sugiere efectos neuroprotectores por la administración de un compuesto que modula componentes en la vía de la señal de transducción, corriente abajo del receptor de NMDA. En Maise, U.S. Patent 5,519,035, se describen inhibidores de la proteína quinasa C como neuroprotectores de la isquemia cerebral inducida por administración de óxido nítrico. Se describe un modelo utilizando cultivos de neuronas del hipocampo. En Mahanthappa, WO/99/00117, se describen compuestos, que incluyen H89, que imitan los efectos Hedgehog sobre las señales mediadas por remiendo, particularmente inhibidores de la proteína quinasa A (PK A) como agentes neuroprotectores. En Liu WO 99/58982 se describen métodos para identificar compuestos neuroprotectores que antagonizan con la quinasa c-Jun N-terminal (JNK) o la quinasa de linaje mixto (MLK) en células neuronales, particularmente en células neuronales del hipocampo HN33. Finalmente, en Alessandrini, WO

99/34792, se describe un modelo de ataque fulminante en ratones por isquemia cerebral inducida, y se administran inhibidores MEK 1 para monitorear los efectos neuroprotectores.

A pesar de lo que se conoce sobre la excitotoxicidad mediada por receptores de glutamato, aún queda mucho por aprender acerca de sus mecanismos de acción y componentes que pueden inhibir selectivamente la muerte de células neuronales por ella causada.

Resumen de la invención

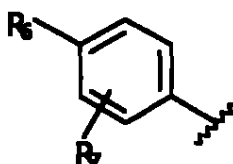
Esta invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un compuesto que tiene la siguiente fórmula



o una sal del mismo, farmacéuticamente aceptable, en la que

- a) R_1 es H o un sustituyente unido a cualquiera de las posiciones 5 o 6 del anillo y seleccionado del grupo que consiste de alquilo, alquenilo, alquinilo, tienilo, furanilo, pirrolilo, fenilo, pirimidinilo, pirimidinilo sustituido, piridinil, piridinil sustituido, fenil-alquenilo, fenil-alquenilo sustituido, benzo [b] tien-2-il, 2-benzofuranil y fenilo sustituido,

dicho fenilo sustituido tiene la siguiente fórmula



- en la que (i) R_6 es seleccionado del grupo que consiste de H, OH, halógeno, alquilamino, dialquilamino, hidroxí-dialquilamino sustituido, alquilo bajo, alquilo ácido bajo, alcoxi, alcoxi bajo halógeno sustituido, fenilo y morfolinilo, y (ii) R_7 representa entre uno y cuatro sustituyentes, los cuales pueden ser el mismo o diferentes, y son seleccionados del grupo que consiste de H, halógeno, amino, alquilo, alquilo bajo, alquilo bajo halógeno sustituido, alquilamino, dialquilamino, alcoxi bajo ácido, alcoxi, alcoxi bajo halógeno sustituido, alcoxi y fenilalcoxi, con la condición que R_6 y R_7 pueden ser unidos para formar 2-naftilo o 1,3-benzodioxililo;
- b) Cada R_2 es independientemente H o alquilo bajo;
- c) Cada R_3 es independientemente seleccionado del grupo que consiste de H, alquilo bajo, amino, dialquilamino y alcoxi bajo;
- d) R_4 es H, alcoxi o morfolinilo, con la condición que R_4 puede ser unido con R_3 para formar 2,3-dihidro-1,4-benzodioxinilo o 9-alquil 9H carbazolilo; y
- e) R_5 es H o alquilo bajo.

Esta invención también proporciona un método para reducir la muerte por isquemia en una población celular que comprende contacto de las células con una cantidad

profilácticamente efectiva del compuesto contenido en la presente composición farmacéutica.

Esta invención además proporciona un método para reducir la muerte celular en respuesta a un evento traumático que comprende el contacto de la célula neuronal con una cantidad profilácticamente efectiva del compuesto contenido en la presente composición farmacéutica, antes de, durante o dentro de un período adecuado de tiempo posterior al evento traumático.

Esta invención además proporciona un método para reducir la muerte celular en respuesta a un evento traumático en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad profilácticamente efectiva del compuesto contenido en la presente composición farmacéutica, antes de, durante o dentro de un período adecuado de tiempo posterior al evento traumático.

Finalmente, esta invención proporciona un aparato para administrar al sujeto la presente composición farmacéutica, que comprende un contenedor y la composición farmacéutica respectiva, en donde el contenedor tiene un dispositivo que libera al sujeto una dosis profiláctica de la composición farmacéutica.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: A: respuesta funcional intracelular del calcio por recepción mediada del NMDA. Los símbolos de cuadrado relleno representan el control, los símbolos de triángulo relleno representan MK-80-1 100 μ M; B: [3 H]-MK-801 unidas a las neuronas P19 diferenciadas.

Figura 2: A: Experimento de viabilidad de las neuronas P19 usando medidas de fluorescencia Azul Alamar. B: Respuesta a la muerte por dosis de glutamato leída con azul alamar. Los datos se presentan como % del control. C:MK-801 Bloque de dependencia de la dosis MK-801.

Figura 3: A: Compuesto A, un inhibidor de p38, respuesta a la dosis de pretratamiento. B: U0126, un inhidor de MEK1/2, respuesta a la dosis de pretratamiento.

Figura 4: A: U0126 no bloquea las respuestas del calcio inducidas por glutamato. B: U0126 no bloquea las uniones [3 H]-MK-801 en neuronas P19.

Figura 5: A: Seguimiento de la eficacia en el tiempo del postratamiento con U0126.

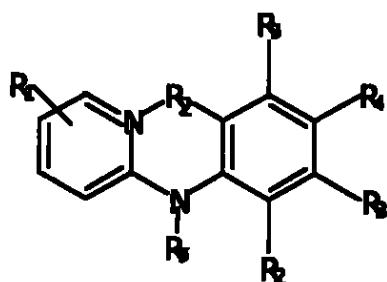
Figura 6: A: El U0126 no inhibe la toxicidad inducida por estaurosporina. Los símbolos de cuadrado relleno no representan compuesto alguno; los símbolos de

triángulo relleno representan U0126 10 μ M. B: El U0126 no bloquea la toxicidad inducida por A23187. C: El U0126 no afecta la viabilidad basal de las neuronas P19.

Figura 7: Los compuestos de 2-piridinamina y 4 pirimidinamina (listados por número de compuesto) muestran neuroprotección retardada en el postratamiento. La eficacia que se alcanza a las 2 horas posteriores del tratamiento con glutamato es equivalente a la que se alcanza cuando las neuronas P19 son pretratadas con estos compuestos. Este perfil temporal corresponde a aquel del inhibidor MEK, U0126. Las barras punteadas abiertas representan el % NP en el pretratamiento; las barras rellenas representan el %NP dos horas después del tratamiento.

Descripción detallada de la invención:

Esta invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un compuesto que tiene la siguiente fórmula

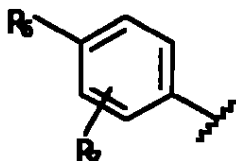


o una sal del mismo, farmacéuticamente aceptable, en la que

- a) R_1 es H o un sustituyente unido a cualquiera de las posiciones 5 o 6 del anillo y seleccionado del grupo que consiste de alquilo, alquenilo, alquinilo, tienilo, furanilo, pirrolilo, fenilo, pirimidinilo, pirimidinilo

substituido, piridinil, piridinil substituido, fenil-alquenilo, fenil-alquenilo substituido, benzo [b] tien-2-il, 2-benzofuranil y fenilo substituido,

dicho fenilo substituido tiene la siguiente fórmula



en la que (i) R_6 es seleccionado del grupo que consiste de H, OH, halógeno, alquilamino, dialquilamino, hidroxí-dialquilamino substituido, alquilo bajo, alquilo acídico bajo, alcoxi, alcoxi bajo halógeno substituido, fenilo y morfolinilo, y (ii) R_7 representa entre uno y cuatro sustituyentes, los cuales pueden ser el mismo o diferentes, y son seleccionados del grupo que consiste de H, halógeno, amino, alquilo, alquilo bajo, alquilo bajo halógeno substituido, alquilamino, dialquilamino, alcoxi bajo acídico, alcoxi, alcoxi bajo halógeno substituido, alcoxi y fenilalcoxi, con la condición que R_6 y R_7 pueden ser unidos para formar 2-naftilo o 1,3-benzodioxililo;

- b) Cada R_2 es independientemente H o alquilo bajo;
- c) Cada R_3 es independientemente seleccionado del grupo que consiste de H, alquilo bajo, amino, dialquilamino y alcoxi bajo;
- d) R_4 es H, alcoxi o morfolinilo, con la condición que R_4 puede ser unido con R_3 para formar 2,3-dihidro-1,4-benzodioxinilo o 9-alquil 9H carbazolilo; y
- e) R_5 es H o alquilo bajo.

En una formulación de la presente composición farmacéutica, R₁ es un fenilo sustituido en la posición 5 del anillo, y cada R₂ es H. En otra formulación, R₄ es morfolinilo. En otra formulación, cada R₃ es un alcoxi bajo y R₄ es un alcoxi bajo. Aún en otra formulación, R₁ está en la posición 6 del anillo, cada R₂ es H, y preferiblemente, cada R₃ y R₄ son alcoxi bajo.

En la formulación preferida de la presente composición farmacéutica, el compuesto contenido en ella se selecciona del siguiente grupo, cuyas estructuras están establecidas abajo en los Detalles Experimentales:

5-(3-etoxifenil)-N-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-piridinamina;

N-[4-(4-morfolinil)fenil]-5-(2-naftil)-2-piridinamina;

5-benzo[b]tien-2-il-N-[4-(4-morfolinil)fenil]-2-piridinamina;

5-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]-N-[4-(4-morfolinil)fenil]-2-piridinamina;

5-[4-(4-morfolinil)fenil]-N-[4-(pentoxi)fenil]-2-piridinamina;

5-[4-(dimetilamino)fenil]-N-[4-(pentoxi)fenil]-2-piridinamina;

5-[4-(dimetilamino)fenil]-N-(4-metoxifenil)-2-piridinamina;

5-(1,3-benzodioxol-5-il)-N-[4-(pentoxi)fenil]-2-piridinamina;

Ácido 4-[6-[4-(pentoxi)fenil]amino]-3-piridinil]-benzopropanoico;

5-(2-metoxifenil)-N-[4-(pentoxi)fenil]-2-piridinamina;

N-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxina-6-il)-5-[(E)-2-feniletetil]-2-piridinamina;

N-[6-[3-(dimetilamino)fenil]-2-piridinil]-9-etil-9H-carbazol-3-amina;

6-(3-etoxifenil)-N-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-piridinamina;

6-[3-(trifluorometoxi)fenil]-N-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-piridinamina;

6-(1,3-benzodioxol-5-il)-N-(3,4,5- trimetoxifenil)-2-piridinamina;
 6-fenil-N-(3,4,5- trimetoxifenil)-2-piridinamina;
 6-(3,4-dimetoxifenil)-N-(3,4,5- trimetoxifenil)-2-piridinamina;
 6-(3,4-dimetilfenil)-N-(3,4,5- trimetoxifenil)-2-piridinamina;
 N-(4,5-dimetoxi-2-metilfenil)-6-(3,4-dimetilfenil)-2-piridinamina;
 6-(2-naftil)-N-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-piridinamina;
 6-(2-fenoxifenil)-N-(3,4,5- trimetoxifenil)-2-piridinamina; y
 6-[(E)-2-feniletetil]-N- (3,4,5-trimetoxifenil)-2-piridinamina;

A menos que se especifique otra cosa, el término aquí usado como "alquilo", se refiere a saturados lineales, sustituyentes ramificados o cíclicos consistentes solamente de carbono y H. El alquilo bajo se refiere a un alquilo que contiene entre 1 y 4 átomos de carbono. El término "alquenilo" se refiere a insaturados lineales, sustituyentes ramificados o cíclicos consistentes solamente de carbono y H que contienen al menos un doble enlace. El término "alquinilo" se refiere a insaturados lineales, sustituyentes ramificados o cíclicos consistentes solamente de carbono y H que contienen al menos un triple enlace.

El término "alcoxi" se refiere a O-alquilo, donde el alquilo se entiende según lo antes definido. El término "alquiltio" se refiere a S-alquilo, donde el alquilo se entiende según lo antes definido. Un alquil ácido es una cadena de carbono con un grupo terminal COOH.

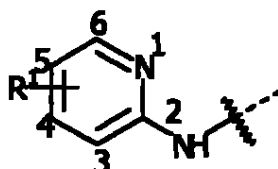
Como se usa aquí, el término "alquilamino" significa un alquilo sustituido por un grupo amino. Similarmente, el término "dialquilamino" significa un grupo amino sustituido con dos grupos alquilo seleccionados independientemente. El término "hidroxi dialquilamino sustituido" se refiere a un grupo dialquilamino en el que alguno o dos de los grupos alquilo están independientemente sustituidos con un grupo hidroxilo, independientemente en alguno de los átomos de carbono del grupo(s) alquilo.

El término "halo" significa flúor, cloro, bromo y yodo. El símbolo "Ph" o "PH" se refiere al fenilo.

Cuando un grupo particular está "sustituido" (e.g., arilo, heterocicloalquilo, heteroarilo, y similares), dicho grupo puede tener uno más sustituyentes, preferiblemente de uno a cinco sustituyentes, más preferiblemente de uno a tres sustituyentes, aún más preferiblemente de uno a dos sustituyentes, seleccionados independientemente de la lista de sustituyentes.

Haciendo referencia a los sustituyentes, el término "independientemente" significa que cuando más de uno de tales sustituyentes es posible, tales sustituyentes pueden ser el mismo o diferentes entre sí.

Para los propósitos de esta invención, el sistema anillo de piridina tendrá la siguiente numeración:



Los compuestos contenidos en la presente composición farmacéutica están ejemplificados en la sección de Detalles Experimentales más adelante. Esos compuestos están comercialmente disponibles en BioFocus PCC (Reino Unido) formando parte de la biblioteca química. Alternativamente, los compuestos ejemplificados más adelante, pueden prepararse usando métodos conocidos.

Como es aquí usada, la frase "sal farmacéuticamente aceptable" significa una sal de la base libre, la cual posee la actividad farmacológica deseada de la base libre, la cual no es ni biológicamente, ni de ninguna otra manera indeseable. Estas sales pueden derivarse de ácidos inorgánicos u orgánicos. Ejemplos de ácidos inorgánicos son el ácido clorhídrico, el ácido nítrico, el ácido bromhídrico, el ácido sulfúrico y el ácido fosfórico. Ejemplos de ácidos orgánicos son el ácido acético, el ácido propiónico, el ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maléico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido metilsulfónico, ácido salicílico y similares.

La presente composición farmacéutica se puede preparar de acuerdo con las técnicas farmacéuticas convencionales. El vehículo farmacéuticamente aceptable allí dentro, puede tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la preparación deseada según la forma de administración, tal como la administración sistémica, que incluye pero no se limita a intravenosa, oral, nasal o parenteral. Al preparar las composiciones para dosificar en forma oral, se pueden emplear algunos de los vehículos farmacéuticos usuales, tales como agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes saborizantes, preservativos, agentes colorantes, jarabes y similares en el caso de preparaciones líquidas orales (por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones), o vehículos tales como almidones, azúcares, diluyentes, agentes granuladores, lubricantes, ligantes, agentes desintegrantes y similares en el caso de preparaciones orales sólidas (por ejemplo, polvos, cápsulas y tabletas).

Por su fácil administración, las tabletas y cápsulas representan una ventajosa forma unitaria de dosificación oral, en la cual se emplean vehículos farmacéuticos sólidos. Si se desea, las tabletas pueden cubrirse con azúcar o entéricos mediante las técnicas estándar. Para parenterales, el vehículo usualmente comprende agua estéril, aún cuando pueden incluirse otros ingredientes para propósitos de solubilidad o preservación. Las suspensiones inyectables también se pueden preparar empleando vehículos líquidos apropiados, agentes de suspensión y similares. Los compuestos también se pueden suministrar en forma de aerosol.

Esta invención también proporciona un método para reducir la probabilidad de desarrollo de muerte cerebral por isquemia, que comprende el contacto de la célula con una cantidad efectiva profilácticamente del compuesto contenido en la presente composición farmacéutica.

Como es aquí usado, el término "muerte isquémica", cuando se refiere a una célula, significa muerte causada por falta de oxígeno. La muerte celular por isquemia puede ser causada, por ejemplo, por condiciones hipóxicas. La isquemia *in vivo* o *ex vivo* de células o tejidos enteros, puede resultar, entre otras cosas, de la anemia localizada debida a la interferencia del suministro sanguíneo causada por obstrucción, destrucción o constricción de los vasos sanguíneos. La muerte isquémica y sus características morfológicas son bien conocidas e identificables por aquellos versados en el arte.

Como es aquí usado, una "cantidad profilácticamente efectiva" de la presente composición farmacéutica, o sus compuestos, significa una cantidad que reduce la incidencia de la muerte celular en una población de células. La presente composición farmacéutica generalmente contendrá dosis por unidades (e.g., tableta, cápsula, polvo, inyección, cucharaditas y similares) de cerca de 0.001 a cerca de 100 mg/kg. En una formulación, la presente composición farmacéutica contiene una dosis por unidad de cerca de 0.01 a cerca de 50 mg/kg de compuesto, y preferiblemente de cerca de 0.05 a cerca de 20 mg/kg. En el arte se conocen métodos para determinar las dosis efectivas profilácticamente para la presente

composición farmacéutica. La dosis efectiva para administrar la composición farmacéutica en humanos, por ejemplo, se puede determinar farmacéuticamente a partir de los resultados de estudios en animales.

Una "población celular" se usa aquí para referirse a células *in vitro*, tal como en un recipiente de cultivo, o *in vivo* como parte de un fluido corporal o como un tejido u órgano intactos. La población celular puede ser homogénea (comprende un tipo de células) o heterogénea (comprende una población de células tipo mezcladas). Las poblaciones de células preferidas son las poblaciones de células heterogéneas que comprenden al menos una célula tipo que ha sido identificada como protegida de la muerte isquémica, por la presencia de los compuestos de esta invención.

En una formulación del presente método, las células que conforman la población celular son preferiblemente células de mamíferos y más preferiblemente células humanas. Las células que conforman una población celular que demuestran reducción del daño por isquemia en respuesta a un evento traumático, incluyen pero no se limitan a, poblaciones celulares que comprenden al menos una célula seleccionada del grupo que consiste de una célula neuronal, una célula glial, una célula cardíaca, un linfocito, un macrófago y un fibroblasto. En la formulación preferida, la célula es una célula neuronal.

Esta invención también proporciona un método para producir la muerte celular neuronal en respuesta a un evento traumático que comprende el contacto de la

célula neuronal con una cantidad profilácticamente efectiva del compuesto contenido en la presente composición farmacéutica, antes de, durante, o dentro de un período de tiempo apropiado posterior al evento traumático.

Los dos métodos presentes pueden ser ejecutados *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*. Como aquí se usa, el contacto de una célula con un agente "*in vitro*" incluye, a manera de ejemplo, el contacto de dicho agente con una célula que está en un cultivo celular individual, un cultivo celular mixto, o un cultivo de tejido de células primarias. El contacto de una célula con un agente *ex vivo*, incluye a manera de ejemplo, el contacto de dicho agente con una célula que es parte de un tejido organizado o un órgano mantenido por fuera del cuerpo del sujeto de quien proviene. El contacto de la célula con un agente *in vivo*, significa el contacto de dicho agente con una célula presente en un sujeto.

Esta invención además proporciona un método para reducir la muerte de células neuronales en respuesta a un evento traumático en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad profilácticamente efectiva de la presente composición farmacéutica, antes de, durante o dentro de un adecuado período de tiempo posterior al evento traumático. El término "sujeto" incluye, pero no se limita a, algún animal o animal artificialmente modificado. En la formulación preferida, el sujeto es un humano.

La vía de administración de la presente composición farmacéutica a un sujeto, es preferiblemente sistémica, que incluye, por ejemplo, administración intravenosa (iv), subcutánea (sc) y oral. En una formulación la presente composición se administra directamente al sistema nervioso. Esta vía de administración incluye, pero no se limita a, la intracerebral, intraventricular, intracerebroventricular, intratecal, intracisternal, intraespinal, y/o periespinal; la cual puede emplear agujas intracraneales e intravertebrales, y catéteres con o sin dispositivos de bombeo. Las dosis por infusión pueden estar dentro del rango, por ejemplo, de cerca de 1.0 a 1.0×10^4 $\mu\text{g/kg/min}$ del presente compuesto, durante un período que oscila entre algunos minutos y varios días. Para administración tópica, el presente compuesto puede mezclarse con un vehículo farmacéutico en una concentración de por ejemplo, cerca de 0.1 a cerca de 10% de droga por vehículo.

En el presente método, la muerte de células neuronales causada por un evento traumático incluye, por ejemplo, un desorden médico, un trauma físico, un trauma químico y un trauma biológico.

Ejemplos de desórdenes médicos que ocasionan la muerte de células neuronales incluyen daño hipóxico-isquémico perinatal, paro cardíaco, ataque fulminante/isquémico, neuropatía inducida por la hipoglicemia, isquemia cerebral inducida por cirugía cardíaca, desórdenes por estrés postraumático, deterioro de la memoria inducida por estrés, epilepsia crónica, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, neuropatía periférica diabética, dolor neuropático, parálisis de Bells,

síndrome de la enfermedad del seno, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, enfermedad de cuerpo difuso de Lewy, enfermedad de Cruzeiro, Jacobs y otras enfermedades de agregación de proteínas, parálisis supranuclear progresiva (síndrome de Steele-Richardson), degeneración multisistémica (síndrome de Shy-Drager), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), ataxias degenerativas, degeneración basal cortical, ALS-Parkinson-complejo de demencia de UAM, panencefalitis esclerótica subaguda, enfermedad de Huntington, sinucleinopatías (incluyendo atrofia multisistémica), afasia progresiva primaria, degeneración estriatonigral, enfermedad de Machado-Joseph, ataxia espinocerebelar tipo 3, degeneraciones olivopontocerebelares, enfermedad de Gilles De La Tourette, parálisis bulbar y pseudobulbar, atrofia muscular espinal y espinobulbar (enfermedad de Kennedy), esclerosis primaria lateral, paraplegia espasmódica de familia, enfermedad de Werdnig-Hoffman, enfermedad de Kugelberg-Welander, enfermedad de Tay-Sach, enfermedad de Sandhoff, enfermedad espasmódica familiar, síndrome maligno neuroléptico, enfermedad de Wohlfart-Kugelberg-Welander, paraparesis espasmódica, leucoencefalopatía, demencia relacionada con el SIDA, síndrome de la enfermedad del seno, neuropatía post-herpética, meningitis viral, meningitis bacteriana, enfermedades causadas por priones, y disautonomía familiar (síndrome de Riley-Day).

Los traumas físicos que causan la muerte de células neuronales incluyen, por ejemplo, trauma focal del cerebro, trauma difuso del cerebro, daño del cordón espinal, infarto cerebral, oclusión embólica, oclusión trombótica, reperusión,

hemorragia intracraneal, latigazo, síndrome del infante agitado, y daño del nervio periférico inducido por radiación.

Los traumas químicos que causan la muerte de células neuronales incluyen, por ejemplo, exposición al alcohol, agentes quimioterapéuticos, gases de guerra, plomo, cianoacrilatos, poliacrilamida, e inhalantes tóxicos. Finalmente traumas biológicos que causan la muerte de células neuronales incluyen, por ejemplo, exposición al VIH, virus del herpes y meningitis causada por virus y bacterias.

Poniendo en práctica el presente método, la composición farmacéutica puede ser administrada al sujeto, antes, durante o subsecuente al evento traumático. Como es aquí usado, el término "subsecuente" se refiere a algún punto en el tiempo comenzando con el evento traumático, y continuando hasta que se disminuya el potencial de la muerte celular causada por el evento traumático.

Finalmente, esta invención proporciona un aparato para administrar a un sujeto la presente composición farmacéutica, que comprende un contenedor y la composición farmacéutica respectiva, en donde el contenedor tiene un dispositivo que libera al sujeto una dosis profiláctica de la composición farmacéutica. En la formulación preferida, el dispositivo que libera la composición farmacéutica es una jeringa.

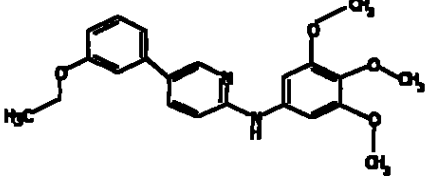
Idealmente, el presente aparato es un dispositivo predosificado autoinyectable para un uso único, el cual contiene la composición presente. Tal dispositivo sería útil, por ejemplo, en una unidad ambulatoria móvil o para administrar a una persona en riesgo por un evento neurotóxico. Los dispositivos mecánicos autoinyectables son bien conocidos en el arte; un ejemplo de éstos es el dispositivo EpiPen® (Meridian Medical Technologies Inc.), el cual es un dispositivo autoinyectable que contiene epinefrina para individuos sujetos a choques anafilácticos.

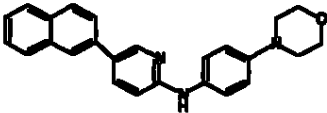
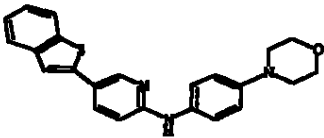
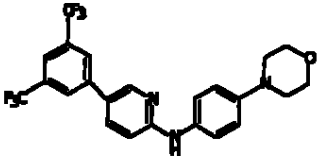
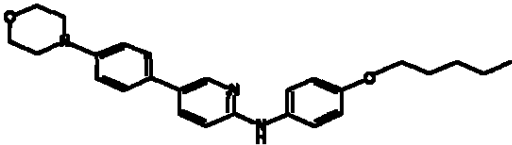
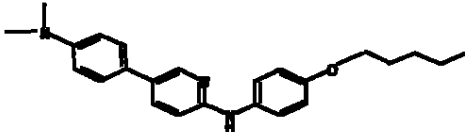
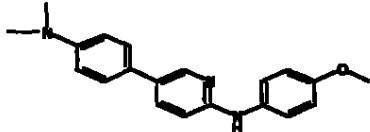
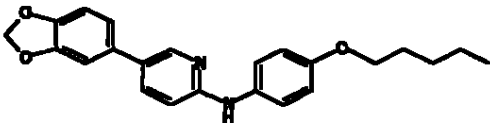
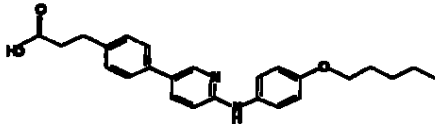
Esta invención será mejor entendida al leer los Detalles Experimentales que siguen, pero aquellos versados en el arte rápidamente apreciarán que éstos son solamente ilustrativos de la invención como se describe en forma completa en las reivindicaciones que se encuentran más adelante. Adicionalmente, se han citado varias publicaciones a lo largo de esta solicitud. Las divulgaciones de éstas publicaciones están citadas en la presente solicitud para describir el estado del arte correspondiente.

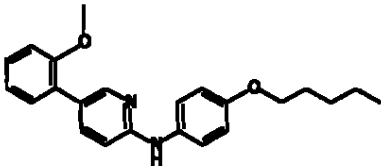
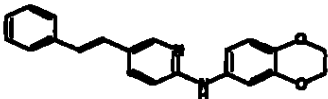
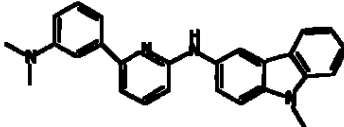
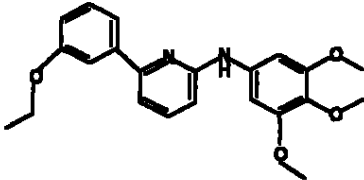
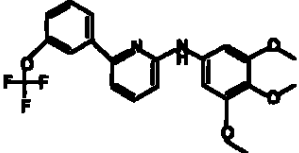
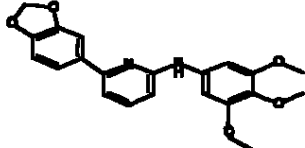
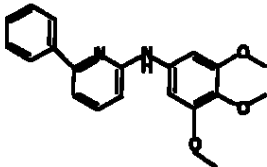
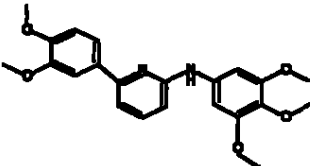
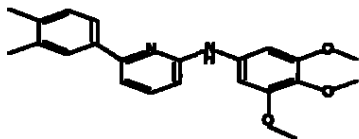
Detalles Experimentales

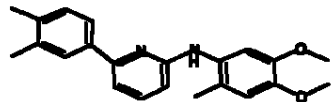
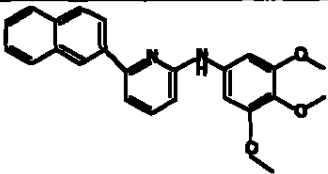
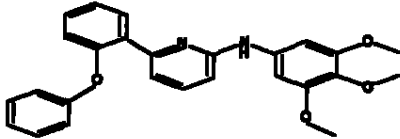
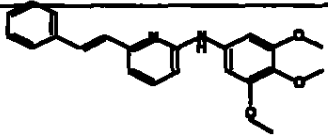
Ejemplo 1

2-Piridinaminas comercialmente disponibles

	2-piridinamina, 5-(3-etoxifenil)-N-(3,4,5-trimetoxifenil)- (Compuesto 12)
---	--

	2-piridinamina, N-[4-(4-morfolinil)fenil]-5-(2-naftil)- (Compuesto 25)
	2-piridinamina, 5-benzo[b]fien-2-il-N-[4-(4-morfolinil)fenil]- (Compuesto 22)
	2-piridinamina, 5-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]-N-[4-(4-morfolinil)fenil]- (Compuesto 21)
	2-piridinamina, 5-[4-(4-morfolinil)fenil]-N-[4-(pentoxi)fenil]- (Compuesto 6)
	2-piridinamina, 5-[4-(dimetilamino)fenil]-N-[4-(pentoxi)fenil]- (Compuesto 7)
	2-piridinamina, 5-[4-(dimetilamino)fenil]-N-(4-metoxifenil)- (Compuesto 8)
	2-piridinamina, 5-(1,3-benzodioxol-5-il)-N-[4-(pentoxi)fenil]- (Compuesto 13)
	Ácido 4-[6-[[4-(pentoxi)fenil]amino]-3-piridinil] benzopropanoico (Compuesto 10)

	2-piridinamina,5-(2-metoxifenil)-N-[4-(pentoxi)fenil]- (Compuesto 14)
	2-piridinamina,N-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)-5-[(E)-2-feniletetil]- (Compuesto 88)
 	9H-carbazol-3-amina,N-[6-[3-(dimetilamino)fenil]-2-piridinil]-9-etil- (Compuesto 104) 2-piridinamina,6-(3-etoxifenil)-N-(3,4,5-trimetoxifenil)- (Compuesto 114)
	2-piridinamina,6-[3-(trifluorometoxi)fenil]-N-(3,4,5-trimetoxifenil)- (Compuesto 118)
	2-piridinamina,6-(1,3-benzodioxol-5-il)-N-(3,4,5-trimetoxifenil)- (Compuesto 120)
	2-piridinamina,6-fenil-N-(3,4,5-trimetoxifenil)- (Compuesto 122)
	2-piridinamina,6-(3,4-dimetoxifenil)-N-(3,4,5-trimetoxifenil)- (Compuesto 124)
	2-piridinamina,6-(3,4-dimetilfenil)-N-(3,4,5-trimetoxifenil)- (Compuesto 126)

	2-piridinamina, N-(4,5-dimetoxi-2-metilfenil)-6-(3,4-dimetilfenil)- (Compuesto 127)
	2-piridinamina,6-(2-naftil)-N-(3,4,5-trimetoxifenil)- (Compuesto 135)
	2-piridinamina,6-(2-fenoxifenil)-N-(3,4,5-trimetoxifenil)- (Compuesto 138)
	2-piridinamina,6-[(E)-2-feniletetil]-N-(3,4,5-trimetoxifenil)- (Compuesto 144)

Ejemplo 2

Caracterización de Células P19 Diferenciadas

Diferenciación de Células P19

Las células P19 son una línea de carcinoma embrional pluripotente que pueden ser inducidas a diferenciarse relativamente rápido, entre las neuronas postmióticas en presencia de altas dosis de ácido retinóico (Jones-Velleneuve et al.1982; Jones-Velleneuve et al. 1983; McBurney and Rogers 1982). Ellas son múnido equivalentes de la neuronas humanas NT-2N, las cuales también se derivan por diferenciación ácido retinoica de células precursoras de teratocarcinoma. Las neuronas NT-2N diferenciadas, que quizás son las más conocidas de las dos líneas neuronales derivadas de teratocarcinoma, expresan una amplia variedad de marcadores neuronales, y experimentan muerte celular excitotóxica, hipoxia-inducida, mediada

por receptores NMDA (Pleasure and Lee 1993; Pleasure, Page and Lee 1992; Rootwelt et al. 1998). Igual que las NT-2Ns, las neuronas P19 también expresan una amplia variedad de marcadores neuronales; muestran respuesta de calcio intracelular mediada por receptor NMDA a sus agonistas; y experimentan excitotoxicidad (Canzoniero et al. 1996; Grobin et al. 1999; Morley et al. 1995; Ray and Gottlieb 1993; Turetsky et al. 1993).

Las células P19 fueron compradas en ATCC (Manassas, VA.) Estas crecieron en frascos de cultivo de tejidos de 150cm² en el medio "Modified Eagle Medium" de Dulbecco (DMEM, Gibco BRL) suplementado con 10% de suero bovino fetal, glutamina, (2mM), piruvato de sodio (1mM), bicarbonato de sodio (0.15% p/v), y penicilina/estreptomicina (50 unidades/mL) en una atmósfera de 5% de CO₂ A 37°C. En el día 1 del protocolo de diferenciación, células P19 confluentes se dividieron en 50-70% de confluencia en un medio de crecimiento. En el segundo día de protocolo, se adicionaron, al medio de crecimiento, ácido todo-trans-retinóico 10µM (ATRA, Sinma) y MK-801 10µM. El MK-801 10µM se adicionó en esta etapa para prevenir la muerte celular de neuronas en diferenciación que comienzan a manifestar los receptores NMDA. En el día 4, se puso a las células un medio de crecimiento fresco, con ATRA y MK-801 frescos. En el día 5, se disociaron células del frasco de cultivo de tejido, lavando 4 veces con un amortiguador salino de calcio y magnesio, libre de fosfato y adicionando 4 mL de solución de disociación celular no enzimática (Sigma).

Una vez dissociadas, las células se colocaron en 40mL de un medio de diferenciación. El medio de diferenciación consistía de medio neurobasal (Gibco BRL) suplementado al 1% con suplemento N-2(Gibco BRL), 01% de elementos traza B (Mediatech), 1mM de sulfato de calcio (Sigma), 2mM de glutamina, piruvato de sodio (1mM), bicarbonato de sodio (0.15% p/v), y 1% de antibiótico/antimicótico (Gibco BRL). Al medio de diferenciación se añadió 10 μ M de citosina-D-arabinofuranósido para prevenir el crecimiento de células no diferenciadas. En lo sucesivo no se agregó más MK-801. Las células se trituraron 20 veces, luego se dividieron 1:4 en 96 pozos, o 1:3 en platos de cultivo de tejido de 100mm. Cuatro días después, las células estuvieron óptimas para la adición del compuesto y fueron ensayadas 24 horas más tarde.

RT-PCR

La totalidad del RNA fue separado de los platos de cultivo de tejido de 100mm de neuronas diferenciadas P19 o células no diferenciadas P19 usando el mini kit QUIAGEN Rneasy de acuerdo con los protocolos del fabricante. La amplificación del RT-PCR de las subunidades receptoras NMDA de m μ ridos fue obtenida de 250 ng totales del molde RNA separado de las células P19 no diferenciadas, células a los 4 días después de la inducción con ácido retinóico (ATRA) y células a los 9 días después de la inducción con ATRA. Las reacciones RT-PCR en una sola etapa fueron establecidas usando el LightCycler™-RNA kit de amplificación, SYBR Green I (Boehringer Mannheim), de acuerdo con los protocolos del fabricante. Las reacciones RT-PCR de tiempo real fueron llevadas a cabo en tubos capilares

LightCycler™ , usando el instrumento LightCycler™ y 250 ng de molde RNA (Boehringer Mannheim). La reacción de la transcriptasa inversa se llevó a cabo por 10 minutos a 55°C. Se hicieron 30 ciclos de PCR; a 50°C de temperatura de cocción; 72°C de temperatura de extensión y 80°C de temperatura de fusión. Las reacciones se compararon con un control negativo de agua en cada serie iniciadora. Se extrajeron 5µL del producto, y se corrieron en geles de agarosa 1x TBE. Las series iniciadoras de las subunidades receptoras NMDA de ratones utilizadas, incluyeron zeta 1 y epsilon 1-4.

Las muestras de RNA después de 4 días y 9 días de tratamiento con el ácido retinóico, las muestras no diferenciadas y las muestras control se separaron por electroforesis y se probaron con iniciadores internos zeta 1, epsilon 1 y epsilon 2.

El RT-PCR de las subunidades receptoras NMDA, de todas las muestras de RNA, revelaron que la inducción de la diferenciación por ácido retinóico también induce la expresión de los mRNA de zeta 1, epsilon 1 y epsilon 2. Los datos fueron resumidos utilizando 3 experimentos separados.

Papel secante

El medio fue retirado de las células sembradas en los platos de cultivo de tejido de 100mm. Las células se cosecharon en amortiguador de lisis RIPA (Tris HCl 100mM pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, Triton X-100 1%, deoxicolato de sodio 10%, sulfato, dodecil sulfato de sodio 0.1%). Cada muestra se sometió a ultrasonido por

20 segundos, el amortiguador de muestra Laemmli (BioRad) se agregó a una concentración final 1x, y las muestras se incubaron por 10 minutos a 95°C. Las muestras a ser probadas con anticuerpos receptores de NMDA (policlones contra ratas NR1, NR2A y NR2B obtenidas en Chemicon) se sometieron a electroforesis en geles matriz en tris-glicina al 6% (NOVEX). Las muestras a ser probadas con anticuerpos p42/44 de quinasa MAP (New England Biolabs) se sometieron a electroforesis con geles matriz en tris-glicina al 12% (NOVEX). La electroforesis se hizo en un aparato NOVEX por 1.5 horas a 200 voltios. Las proteínas se transfirieron a la membrana de polivinilideno difluorado (PVDF, NOVEX) usando un dispositivo de transferencia de humedad por 1 hora a 100 voltios. Antes de ser transferidas, las membranas PVDF fueron sumergidas en metanol al 100% por 1 minuto, luego se empaparon en amortiguador de transferencia por 5 minutos. Luego de la transferencia, las membranas se removieron y se agitaron suavemente en solución bloqueadora (leche 5%, tween-20 al 0.05% en amortiguador salino de fosfatos) a 4°C toda la noche. Luego las membranas se lavaron una vez con tween/PBS y, anticuerpos primarios 1:1000 en tween/PBS con 5% de leche que se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron 4 veces por 15 minutos a temperatura ambiente. Se incubaron anticuerpos secundarios acoplados con peroxidasa de rábano cerca de 45 minutos a temperatura ambiente en tween-PBS con 5% de leche. Las membranas se lavaron 4 veces por 15 minutos a temperatura ambiente. Los papeles fueron desarrollados usando plus ECL (Amesham) y expuestos en película.

El análisis de papel secante fue realizado para las subunidades proteínicas receptoras en lisados de células P19 cosechadas después de 4 días o 9 días de exposición al ácido retinoico. Las bandas de tamaño adecuado (Zeta1= $\sim$ 120kDa, Epsilon 1 y Epsilon 2= $\sim$ 180kDa) pudieron detectarse dentro de los lisados neuronales diferenciados P19, pero no pudieron detectarse dentro de los lisados de células no diferenciadas. Los datos representativos se obtuvieron de 3 experimentos separados con resultados similares.

El análisis de papel secante reveló que las neuronas P19 diferenciadas terminales muestran niveles detectables de proteínas zeta 1, epsilon 1 y epsilon 2. Las mRNAs epsilon 3 y epsilon 4 o proteínas no fueron detectadas en ningún momento en estas células.

Estos datos demuestran que tales métodos de diferenciación de células P19 dentro de las neuronas, resultan exitosos en la expresión funcional de receptores NMDA a niveles de mRNA, proteína, respuestas del calcio intracelular inducidas por agonistas sensitivos al MK-801 y toxicidad por glutamato sensitivo al MK-801. Estos resultados están de acuerdo con la literatura. Resulta interesante, sin embargo, en adición a la expresión de zeta 1 y epsilon 2, haber alcanzado también una expresión confiable del receptor NMDA de la subunidad epsilon 1; la cual aún no ha sido alcanzada con otros métodos reportados de diferenciación de células P19 (Ray and Gottlieb 1993). La presencia de las tres subunidades más se parece a patrones de expresión observados en la región anterior del cerebro de los adultos roedores, que

incluyen la corteza y el hipocampo (Ishii et al. 1993; Laurie et al. 1995; Monyer et al. 1994; Monyer et al. 1992; Standaert et al. 1994).

Ejemplo 3

Ensayo de Excitotoxicidad en P19 Diferenciadas

Las células se cargaron con Fura-2-AM 5 μ M (Pruebas moleculares) por 1 hora a 37°C. Ellas se lavaron una vez con solución salina balanceada de Hanks (HBSS, Gibco BRL), y ensayadas en amortiguador HBSS. Las células se colocaron en el módulo de un ATTOFLUOR™ modificado (Atto Instruments, Rockville Pike, MD). La alta velocidad y doble excitación del fura-2, se obtuvo usando un excitador de alta velocidad RATIO ARC™ (Atto Instruments). Una luz de lámpara de mercurio se pasó a través de filtros de paso de banda de 334nm o 380nm (10nm de ancho de banda), y luego se pasó a través de un objetivo 20x (Zeiss, Plan-Apochromat, NA=0.75) a una velocidad de 2.5 Hz. La luz emitida fue transmitida a través de un espejo dicróico a 400nm, y recogida por una cámara CCD intensificada de ATTOFLUOR™. La intensidad promedio de las imágenes adquiridas, cuando se excita a 334nm y 380nm, fue analizada usando el programa de computador ATTOFLUOR RATIOVISION™ (Atto Instruments, Rockville, MD).

Los cambios de relación de intensidad del Fura-2 a 330nm/380nm fueron dibujados cuando las neuronas P19 de 9 días post ATRA, se trataron con glutamato 3nM, glicina 1nM en presencia o ausencia de MK-801 100 μ M. El MK-801 fue

administrado 24 horas antes del ensayo. Los trazos son el promedio $\pm$ el error estándar de 3 experimentos separados para cada condición. Las neuronas P19 diferenciadas terminales expresaron subunidades receptoras NMDA que forman los receptores funcionales NMDA, como se ilustró al usar imágenes fura-2 para detectar incrementos en los niveles de calcio intracelular mediante adición de agonistas receptores de NMDA. (Figura 1A) El bloqueador de canal receptor NMDA selectivo, MK-801, inhibición significativamente esta respuesta (Figura 1A). Adicionalmente las neuronas P19 expresaron sitios específicos de unión para el receptor NMDA. La inhibición MK-801 de la unión [3 H]-MK-801 se ensayó en membranas P19. Las concentraciones MK-801 son expresadas como 10^{-6} Molar. Los datos de los puntos representan la media $\pm$ el error estándar de ocho experimentos. El % de control = $((\text{CPM} - \text{CPM}_{\text{inferior}}) / (\text{CPM}_{\text{superior}} - \text{CPM}_{\text{inferior}})) \times 100$ (Figura 1B). La inhibición del MK-801 fue dependiente de la concentración y se alcanzó el 100% de la inhibición.

La célula neuronal de control P19 representa y procesa manchas brillantes con el colorante citoplásmico de células vivas, diacetato de carboxifluoresceína (CFDA). Las neuronas P19 9 días después de la inducción con ATRA, fueron marcadas con CDFA y convertidas en imagen en modo confocal usando un productor de imágenes ATTOFLUOR. Las células control fueron tratadas con vehículo por 24 horas, las células glutamato recibieron glutamato 3mM en presencia de glicina 1 mM por 24 horas y las células glutamato +U0126 recibieron U0126 10 μ M simultáneamente con glutamato 3mM y glicina 1mM por 24 horas. Se tomaron imágenes de células de

vivas de control, tratadas con glutamato, muertas y protegidas con U0126 teñidas con diacetato de fluoresceína en 3 experimentos separados. Las células neuronales P19 se representan característicamente como masas dentro de agregados apretados al ser colocados sobre tejidos planos en cultivos plásticos. Las redes de trabajo de procesos extensivos conectaron racimos de cuerpos de células neuronales. Las neuronas P19 tratadas con concentraciones tóxicas de glutamato y glicina por 24 horas mostraron manchado fluorescente en cuerpos celulares aislados, los procesos no se detectaron y el desecho celular extensivo fue evidente. Niveles relativos de muerte celular se midieron rápida y cuantitativamente sobre un plato lector usando colorante fluorescente de células vivas azul alamar (Figura 2B).

La fluorescencia azul alamar, un indicador de viabilidad celular, fue utilizada para determinar la viabilidad celular después de una agresión citotóxica inducida por NMDA. En la figura 2 A se muestra el conteo de un único plato de 96 pozos, donde 32 pozos recibieron el vehículo control, 32 pozos recibieron glutamato 3mM y glicina 1mM por 24 horas y 32 recibieron A23187 5µM. Las condiciones de glutamato y de A23187 fueron significativamente diferentes como se determinó por vía ANOVA con análisis Tukey post-hoc llevado a cabo con el programa de computador GRAPHARD™. Estos datos muestran una disminución típica en la fluorescencia de azul alamar cuando las células se trataron con glutamato y glicina. Sin embargo, teniendo en cuenta que la cuenta de fluorescencia en bruto varía de un experimento a otro, las Figuras 2 A, 2B y 2C están expresadas como un porcentaje del control.

La respuesta de dosis de toxicidad por glutamato en presencia de una concentración constante 1mM de glicina se midió en neuronas P19 diferenciadas. La curva generada mediante los datos es el promedio de 6 curvas separadas de respuesta a la dosis. Los datos están representados como el porcentaje de células control $\pm$ el error estándar. El % de control = $\frac{([Glutamato]_{exp} - [Glutamato]_{max})}{(control_{vehículo} - [Glutamato]_{max})} \times 100$. La toxicidad por glutamato EC50 fue calculada para ser 8.1 μ M [intervalo de confianza menor que 95% = 3.5 μ M; intervalo de confianza superior al 95% = 19 μ M]. Estos datos demuestran que 24 horas de tratamiento con glutamato mataron las neuronas P19 dosis-dependientes en presencia de una dosis constante de glicina (Figuras 2 A y 2B). La glicina sola no afecta la viabilidad de las neuronas P19.

El bloqueador del receptor NMDA, MK-801, dosis dependiente protegió las neuronas P19 contra la toxicidad por glutamato (Figura 2D). La inhibición dosis-dependiente del MK-801, del glutamato 3mM y glicina 1mM, indujo la muerte de las neuronas P19. El % de Neuroprotección = $\frac{([Inhibidor \text{ en presencia del } Glutamato]_{max} - [Glutamato]_{max})}{(Control_{vehículo} - [Glutamato]_{max})} \times 100$. Los datos son el promedio $\pm$ el error estándar de tres experimentos separados. La máxima protección alcanzada con el MK-801 estuvo cerca de los niveles de control.

Estos datos demuestran que la toxicidad por glutamato en las neuronas P19, requiere de la activación del receptor NMDA, teniendo en cuenta que la toxicidad se bloquea por completo en presencia del receptor específico NMDA antagonista del

MK-801. Sin embargo, los datos no excluyen la posibilidad que los receptores AMPA o cainato también puedan ser activados por glutamato y contribuyan a la excitotoxicidad. Esta posibilidad sería consistente con los datos del cultivo de neuronas primarias; la cual reporta que las respuestas del calcio intracelular a los agonistas del glutamato involucra componentes múltiples (Courtney, Lambert and Nicholls, 1990). Tales componentes incluyen receptores de activación AMPA/cainato, despolarización de membrana, activación del canal de calcio con apertura de voltaje, alivio del receptor NMDA bloqueado por magnesio y activación del receptor NMDA. Sin embargo, aún con tan alto nivel de complejidad, en muchos modelos de neuronas primarias, los signos de excitotoxicidad por glutamato a través del receptor NMDA y requiere su activación para producir muerte en las neuronas (Tymiansky et al. 1993), como es el caso para el sistema de modelo de neurona P19.

Estas células fueron usadas para medir los efectos de varios inhibidores de quinasa conocidos (Columna (ID) de Identificación Compuesta en la Tabla 1) mediante toxicidad inducida por NMDA. Primero, las células P19 fueron diferenciadas como se describió en el Ejemplo 2. Luego las células fueron expuestas al glutamato 3mM en presencia de glicina 1mM.

Se determinó la viabilidad celular. Los compuestos que previenen la excitotoxicidad fueron determinados midiendo el % de células viables, comparado con células P19 diferenciadas que no fueron sometidas a agresión tóxica (Tabla 1).

La viabilidad celular se midió usando dos métodos. El primer método fue confocal, método basado en imágenes de fluorescencia de una sola célula, usando el colorante para células vivas diacetato de carboxi-fluoresceína (CFDA). El CFDA marca los cuerpos celulares y procesos de las células vivas. Por tanto, las células vivas muestran una marcación extensiva por CFDA, mientras que las células muertas muestran mucha menos tinción. La fluorescencia CFDA se midió usando un dispositivo ATTOFLUOR productor de imágenes (Atto Instruments, Rockville Pike, MD). Las células fueron marcadas con CFDA 1mM por 15 minutos en el medio, luego se colocaron en el módulo del microscopio ATTOFLUOR. El colorante fue excitado por la luz de una fuente de lámpara de mercurio, pasada por un filtro de paso de banda de 488 nm con un ancho de banda de 10nm, pasada a través de un módulo de disco rotatorio confocal de tiempo real CARV (Atto Instruments, Rockville, MD), y luego, pasada a través de un objetivo de inmersión de aceite 40x (Zeiss Fluar, NA=1.3). La luz emitida fue transmitida a través de un espejo dicróico a 495nm, recogida en una cámara intensificada CCD Attofluor, y las imágenes fueron visualizadas usando el programa de computador Attofluor Ratio Vision (Atto Instruments, Rockville, MD).

El segundo método para medir la viabilidad celular fue un método de lectura de plato. Las células colocadas en el plato de 96 pozos (Packard viewplates) se cargaron con 5% de colorante azul alamar (Biosource International). El azul alamar es un colorante que toma ventaja de las reductasas mitocondriales para convertir la

resazurina no fluorescente en resorufina fluorescente (excitación 535nm, emisión 580nm). El conteo de fluorescencia de la línea base fue leída a temperatura ambiente en un plato lector Wallac inmediatamente después de la adición de azul alamar.

Los conteos de fluorescencia de viabilidad celular fueron tomados de la misma manera después de 1 hora de incubación a 37°C. La fluorescencia fue expresada como un porcentaje de control, células no tratadas después de la substracción del proceso de fluorescencia. Las células vivas y muertas fueron confirmadas con un microscopio de luz.

Como se usa en la Tabla 1 adelante, el Compuesto A se entenderá como el compuesto que tiene la siguiente fórmula

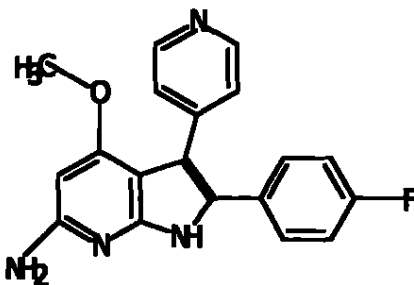


Tabla 1
Comparación de la Actividad del Inhibidor de Quinasa con la Actividad
Neuroprotectora

Compuesto ID	Enzima blanco	Actividad	Potencia	IC50 para Neuroprotección [inferior-superior 95% C.I.]	Eficacia máxima para neuro protección
Compuesto A	Quinasa p38	Inhibidor	IC50~10nM	9.7 µM [5.8-16.3]	>80%

U0126	MEK1/2	Inhibidor	IC ₅₀ ~0.5μM	1.1μM[0.74-1.27]	>80%
SB202474	Quinasa p38	Inactiva	No aplicable	>10μM	>50%
SB203580	Quinasa p38	Inhibidor	IC ₅₀ ~800nM	Inefectiva	<10%
Litio	Retomadora IP3	Inhibidor	Ki~0.5μM	Inefectiva	<10%
KN62	CAMKII	Inhibidor	Ki~800Nm	Inefectiva	<10%
Calfostin C	PKC PKA PKG p80 ^{c-ano}	Inhibidor Inhibidor Inhibidor Inhibidor	IC ₅₀ ~50nM IC ₅₀ >50μM IC ₅₀ ~25μM IC ₅₀ >50μM	>1μM	~50%
Lavendustina	Receptor EGF p80 ^{c-ano}	Inhibidor Inhibidor	IC ₅₀ ~11nM IC ₅₀ ~500nM	>10μM	<25%
H89	PKA CAMKII Caseína Quinasa I PKC	Inhibidor Inhibidor Inhibidor Inhibidor	Ki~48nM Ki~30μM Ki~38μM Ki~31.7μM	>10μM	<25%

Las potencias y actividades de inhibición de la quinasa se tomaron de la literatura (Chijiwa et al. 1990; Favata et al. 1998; Henry et al. 1998; Inhom and Majerus 1987; Kobasyashi et al. 1989; Lee et al. 1994; Onoda et al. 1989; Tokumitsu et al. 1990). Los IC₅₀s para neuroprotección son el promedio de tres curvas separadas con el intervalo de confianza (C.I.) superior e inferior al 95%, mostrado. Las curvas se ajustaron y los intervalos de confianza se determinaron usando el programa de computador GraphPad and Prism.

Ejemplo 4

Ensayo de Evaluación de un Inhibidor MEK ½ en las P19 Diferenciadas

El U0126 (bis[amino[(2-aminofenil)tio]metileno]butanodinitrilo) se reporta por ser altamente selectivo para MEK ½ (Favata et al. 1998), resultado que se confirma aquí. La única otra quinasa encontrada que se inhibe con PKC-γ, pero el IC₅₀ de

inhibición de esta enzima fue 60 veces mayor que el IC₅₀ publicado contra el tipo original MEK1/2 (Tablas II y III).

El procedimiento general utilizado para ensayar la actividad de la quinasa fue el siguiente: se preparó una mezcla de reacción de una quinasa en tris-HCl 50mM pH=8, MgCl₂ 10mM, Na₃VO₄ 0.1mM, DTT 1 mM, ATP 10μM, sustrato péptido biotinilado 0.25-1μM, 0.2-0.8 μCuries por pozo ³³P-γ-ATP[2000-3000 Ci/mmol]. Las condiciones de ensayo variaron levemente para cada quinasa proteica, por ejemplo, en su actividad, la quinasa receptora de insulina requiere MnCl₂ 10mM, la proteína quinasa calmodulina-dependiente requiere calmodulina y CaCl₂ 10mM. La mezcla de reacción se colocó en platos dentro de pozos de un plato recubierto con estreptavidina y se añadió 1 μl de la droga almacenada en DMSO al 100% a 100μl del volumen de reacción, resultando una concentración final del 1% de DMSO en la reacción. La enzima se diluyo en Tris-HCl 50mM pH=8.0, BSA al 0.1% y se adicionó a cada pozo. La reacción fue incubada por una hora a 30 °C en presencia de un compuesto. Después de una hora de reacción, la mezcla fue aspirada del plato y los platos se lavaron con PBS que contenía EDTA 100mM. Los platos se leyeron con un contador de centelleo para determinar el ³³P-γ-ATP incorporado dentro del péptido inmovilizado. Los compuestos fueron ensayados por duplicado en 8 concentraciones en el rango de 100μM a 10pM en un orden de etapas de magnitud. En cada plato se determinó una señal máxima y mínima para el ensayo. El IC₅₀ se calculó de la curva de respuesta a la dosis del porcentaje de inhibición de la señal máxima en el ensayo de acuerdo con la siguiente fórmula [señal máxima-

completa/señal del compuesto- completa X (100)]=porcentaje de inhibición mediante una gráfica del porcentaje de inhibición contra el logaritmo de la concentración del compuesto. Sobre cada plato también se incluyeron compuestos inhibidores conocidos, apropiados para la quinasa ensayada. Los resultados están dados en la Figura 3.

Definición y fuente de las enzimas quinasas

El VEGF-R32 (receptor-2 de factor de crecimiento endotelial vascular) es una proteína de fusión que contiene en el extremo N-terminal, polihistidina seguida por los aminoácidos 783-1343 del dominio de la quinasa VEGF-R2 en las ratas. La CDK1 (quinasa 1 ciclina-dependiente) es aislada de células de insectos expresando a la vez la subunidad catalítica CKD1 humana y su subunidad de ciclina B regulatoria positiva. La quinasa insulino-receptora consiste de residuos 941-1313 de dominio citoplasmático de la subunidad beta del receptor de insulina humana. La proteína quinasa A es la subunidad catalítica de la proteína quinasa A AMPc-dependiente, purificada a partir del corazón de bovinos. La PCK (quinasa C proteína) es la isoforma gamma o beta de la proteína humana producida en células de insectos. La quinasa 1 caseína es la isoforma delta del CK1 de las ratas producida en E. Coli, truncada en el aminoácido 318 de la porción C-terminal. La quinasa caseína 2 incluye las subunidades alfa y beta de la proteína CK2 humana producida en E. Coli. La quinasa calmodulina (quinasa 2 proteína calmodulina-dependiente) es una versión truncada de la subunidad alfa de la proteína en ratas producida en células de insectos. La quinasa-3 Glicógeno Sintetasa es la isoforma

beta de la enzima en conejos producida en E. Coli. La quinasa MAP es la isoforma ERK-2 en ratas que contiene una polihistidina en el extremo N-terminal producida en E. Coli y activada por fosforilación con MEK 1 antes de la purificación. El EGFR (receptor del factor de crecimiento epidermal) es purificado de membranas celulares humanas A431. El siguiente cuadro muestra las quinasas seleccionadas y sus inhibidores control.

Como se usa en la tabla III, el compuesto A significará el compuesto que tiene la fórmula siguiente:

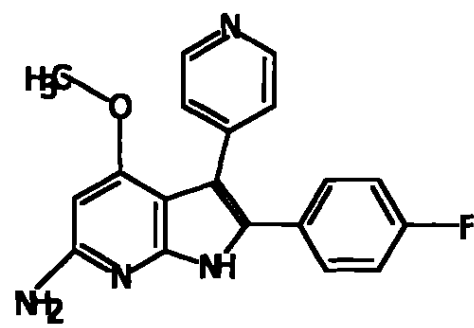


Tabla II

Quinasas Seleccionadas y sus Inhibidores Control

Quinasa	Inhibidor Control
CDK1	Butirolactona
EGFR	AG-1478
Quinasa A Proteína	H89
PKC	Estaurosporina
Quinasa 1 Caseína	H89
Quinasa 2 Caseína	
Quinasa Calmodulina	Estaurosporina
Quinasa Insulina	Estaurosporina

Tabla III

Selectividad Quinasa del Compuesto A y U0126

Compuesto ID	DK1 (μM)	EGFR (μM)	PKA (μM)	PKC- γ (μM)
Compuesto A	>100	>100	>100	8.35
U0126	>100	>100	>100	29.5
Compuesto ID	Quinasa 1 Caseína (μM)	Quinasa 2 Caseína (μM)	Quinasa Calmodulina (μM)	Quinasa Insulino Receptora (μM)
Compuesto A	0.116	>100	>100	>100
U0126	>100	>100	>100	ND

Los valores IC₅₀ de inhibición para la quinasa son el promedio de al menos dos curvas separadas y se determinaron usando el programa de computador GraphPad de ajuste de curvas.

Para determinar si el U0126 inhibe las enzimas MEK1/2 en las neuronas P19, se examinó su habilidad para bloquear la fosforilación inducida por glutamato del sustrato p42 MAPK(ERK2) de la MEK1/2. El papel secante se probó primero en lisados con ATRA de neuronas P19 9 días después del tratamiento con un anticuerpo específico para la forma fosforilada del p42/44 (ERK1/2) y luego despojada y reprobada con un anticuerpo que reconoció el p42/44 (ERK1/2) total. Los datos demostraron que las concentraciones de glutamato y glicina, que se usaron para inducir la toxicidad en las neuronas P19, también inducen un rápido y reproducible incremento en la fosforilación del p42 MAPK en esas células. En presencia de U0126, el fosfo-p42 MAPK se redujo, aunque no se evidenció cambio alguno en la cantidad del p42 MAPK total. En otro experimento de papel secante, lisados con ATRA de neuronas P19 se probaron 9 días después del tratamiento con un anticuerpo específico para la forma fosforilada p42/44 (ERK1/2). El mismo papel

secante fue despojado y reprobado con un anticuerpo que reconoció el p42/44 (ERK1/2) total. La elevación glutamato-inducida de la fosforilación del p42 MAPK se sostuvo, ya que estuvo aún claramente incrementada a las 24 horas frente al control. Estos papeles secantes son representativos de 3 experimentos separados con resultados similares. En este punto, el U0126 bloqueó los niveles incrementados de fosforilación. No se evidenció cambio en el p42 MAPK total.

Para asegurar que el U0126 no bloqueara directamente los receptores de NMDA, se probaron respuestas de calcio intracelular en las neuronas P19 a glutamato y glicina, en presencia de U0126 10 μ M. Trazos de imágenes Fura-2 de 9 días después del tratamiento con ATRA de neuronas P19 se trataron con glutamato 3mM, glicina 1mM, en presencia de U0126 10 μ M por 24 horas. El U0126 se administró simultáneamente con el glutamato y la glicina. Los trazos son el promedio $\pm$ el error promedio de 4 experimentos separados para cada condición.

Los datos demostraron que el U0126 no bloquea esta respuesta al calcio intracelular (Figura 4 A). También se demostró que el U0126 no inhibe las uniones [3H]-MK-801 en neuronas P19. No se observó inhibición significativa a ninguna concentración de U0126. Los datos representan la media $\pm$ el error estándar de 8 experimentos. El control por porcentaje se define como se describe en la Figura 1B (Figura 4B). En conjunto, estos datos además demuestran que el U0126 actúa sobre una vía de señalización corriente debajo de la activación del receptor NMDA.

Los inhibidores de p42/44 MAPK, U0126, muestran neuroprotección retardada.

La eficacia en el transcurso del tiempo es un parámetro extremadamente relevante para una agente terapéutico neuroprotector potencial, ya que el terapéutico debería ser administrado horas o días después del evento isquémico y aún retener la eficacia. La siguiente serie de experimentos examinó si el U0126, inhibidor MEK1/2, retiene la eficacia neuroprotectora cuando se adiciona en varios momentos después del ataque con glutamato. Los ensayos se realizaron esencialmente como se describieron, aunque el tiempo de administración del U0126 fue tardío en relación con la excitotoxicidad inicial. Los datos demostraron que el U0126 tuvo la máxima actividad neuroprotectora 6 horas después del ataque con glutamato (Figura 5 A). Sin embargo, un inhibidor p38 perdió eficacia a los 15 minutos después del ataque con glutamato (Figura 5B). El U0126 tuvo la máxima actividad neuroprotectora aún cuando se adicionó varias horas después del comienzo del ataque con glutamato. Esto puede ser porque el glutamato media un incremento sostenido en la fosforilación del p42 MAPK en neuronas P19, detectable aún 24 horas posteriores a la adición del glutamato. La inhibición por el U0126 de la enzima activadora corriente arriba, MEK, puede favorecer la defosforilación fosfatasa del p42 MAPK, varias horas después del ataque con glutamato, y restabilizar la vía de señalización p42/44MAPK con suficiente tiempo para prevenir la muerte cerebral.

Así, la activación de la vía de la quinasa p42/44MAPK es necesaria para la toxicidad inducida por glutamato en neuronas P19 diferenciadas. La muerte celular inducida por glutamato ocurre dentro de 24 horas, depende de la dosis, y es mediada por

receptores NMDA. El glutamato induce la fosforilación de la quinasa p42MAPK, la cual es bloqueada por el U0126, un inhibidor de quinasa corriente arriba, MEK. El U0126 también bloquea la toxicidad por glutamato en una manera que depende de la dosis. Este es efectivo cuando se administra antes, o aún varias horas después del comienzo del ataque con glutamato.

Una propiedad especialmente buscada en un agente terapéutico contra los ataques fulminantes, consiste en que el compuesto sea capaz de ejercer neuroprotección retardada, aún cuando se adicione después del evento isquémico. Muchos compuestos con diversos mecanismos son reportados por mostrar neuroprotección retardada en el post tratamiento. Entre éstos están antagonistas del receptor de glutamato (Li et al. 1999b; Takahashi et al. 1998; Turski et al. 1998), antioxidantes (Callaway et al. 1999; Pazos et al. 1999; Sakakibara et al. 2000), anticonvulsiantes (Schwartz-Bloom et al. 1998; Wasterlain et al. 1996; Yang et al. 1998), inhibidores de proteasa (Cheng et al. 1998), inhibidores de quinasa (Tatlisumak et al. 1998) y magnesio (Heath and Vink 1999). Sin embargo, esta es la primera demostración de excitotoxicidad mediada por el receptor NMDA en un modelo de cultivo celular, en la cual un inhibidor específico de la vía de quinasa p42/44 MAP muestra neuroprotección retardada, y donde la ventana de tiempo de eficacia se extendió bien después del inicio del ataque tóxico.

La Neuroprotección U0126 es Selectiva para la Toxicidad Inducida por Glutamato.

Para determinar si el U0126 protege contra una variedad de agresiones tóxicas no específicas o si la eficacia de este compuesto es selectiva para toxicidad inducida por glutamato, sus efectos fueron probados contra una variedad de otros inductores de muerte de neuronas P19. La Figura 6 A muestra neuronas P19 tratadas con varias concentraciones de A23187 por 24 horas en presencia o ausencia de U0126 10 μ M. Las células fueron entonces analizadas por fluorescencia azul alamar. La curva generada por los puntos es el promedio de 3 curvas separadas de respuesta a la dosis. Los puntos están representados como porcentaje de las células control $\pm$ el error estándar. El EC50 para la toxicidad con A23187 en ausencia del U0126 se calculó para ser 520nM[340nM-784nM]. El EC50 para la toxicidad con A23187 en presencia del U0126 10 μ M se calculó para ser 833nM[440nM-1.6 μ M].

La figura 6B muestra que la toxicidad inducida por estaurosporina en neuronas P19 1 μ M podría no ser protegida por el U0126 10 μ M, como se midió por fluorescencia de azul alamar 24 horas después de la adición. Las células que recibieron el vehículo en lugar de la estaurosporina, exhibieron los niveles de control de fluorescencia de azul alamar. Sin embargo ninguna concentración de U0126 devolvió fluorescencia a los niveles de control en células tratadas con estaurosporina.

La Figura 6C muestra la fluorescencia de azul de alamar ensayada en neuronas P19 tratadas con vehículo o con U0126 10 μ M en ausencia de varios inductores de

toxicidad. El U0126, solo, no afectó esos niveles de control de fluorescencia. Los datos demuestran que el U0126 no protegió contra la muerte inducida por estaurosporina o por A23187 (Figuras 6 A, 6B). Adicionalmente, el U0126 no afectó la viabilidad basal de las neuronas P19 (Figura 6C).

Ejemplo 5

Ensayo para la Selección de Drogas Usando Células P19 Diferenciadas

Se seleccionaron librerías químicas comercialmente disponibles (BioFocus PLC, Reino Unido) usando los métodos aquí descritos. La concentración de los compuestos almacenados fue cerca de 400µM en DMSO. La concentración de los compuestos usados en la selección primaria fue 1µM. Se asignó como compuesto positivo, aquel que demostró 70% o más de neuroprotección. La prueba de respuesta a las dosis se llevó a cabo en 96 platos de pozo donde la columna 1 fue el vehículo control, la columna 2 recibió glutamato 3mM y glicina 1mM, y la columna 3 recibió glutamato 3mM, glicina 1mM y U0126 10µM. Las columnas 4 a 11 recibieron compuestos en las siguientes concentraciones finales (µM): 3, 1.2, 0.48, 0.192, 0.077, 0.031, 0.012 y 0.005. Cada fila contenía un compuesto diferente para confirmación. Solamente las filas B-G recibieron compuestos y las filas A y H se mantuvieron sin tratar. Los datos se expresan como % de neuroprotección $=((\text{compuesto-glutamato promedio})/(\text{U0126 glutamato promedio})) \times 100$. Los compuestos de dos géneros, 4-pirimidinaminas y 2-piridinaminas, fueron encontrados para exhibir las propiedades neuroprotectoras como lo muestran los

datos. Solamente las 2-piridinaminas son objeto de la presente invención, aunque así mismo se presentan algunos datos de las 4-pirimidinaminas. Los resultados de las pruebas biológicas están resumidos en las siguientes tablas. El "%Inh" indica el % de supervivencia de células control después de 24 horas y representa el efecto neuroprotector de los compuestos seleccionados en concentración 1µM. El IC50 relaciona los datos de experimento de respuesta a la dosis. Los valores IC50, que se listan como >1 indican un máximo no observado con la más alta dosis probada (3µM), aún indican actividad biológica. El ND se refiere a compuestos no probados en experimentos de respuesta a la dosis.

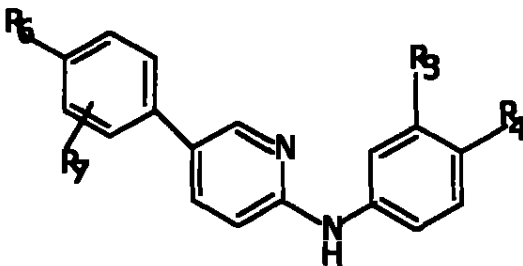
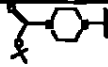
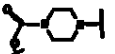
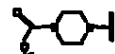


Tabla IV

Derivados de N-5-difenil-2-piridinamina

Compuesto	R ₆	R ₇	R ₄	R ₃	IC ₅₀ (µM)	%Inh
1	OH	H	Morfolinil	H	1.08	84
2	OH	H	OCH ₃	H	0.56	94
3	OCF ₃	H	OCH ₃	H	0.51	94
4	OCF ₃	H	Fusionado con R ₆ para formar 2,3 dihidro-1,4-	Fusionado con R ₄ para formar 2,3	0.38	86

			benzodioxinil	dihidro-1,4-benzodioxinil		
5	Morfolinil	H	Fusionado con R ₃ para formar 2,3 dihidro-1,4-benzodioxinil	Fusionado con R ₄ para formar 2,3 dihidro-1,4-benzodioxinil	0.284	80
6	Morfolinil	H	Pentoxi	H	0.22	83
7	N(CH ₃) ₂	H	Pentoxi	H	0.24	88
8	N(CH ₃) ₂	H	metoxi	H	0.2	83
9	OH	H	Pentoxi	H	0.56	84
10	(CH ₂) ₂ COOH	H	Pentoxi	H	0.23	105
11	H	2-metoxi	Fusionado con R ₃ para formar 2,3 dihidro-1,4-benzodioxinil	Fusionado con R ₄ para formar 2,3 dihidro-1,4-benzodioxinil	0.87	83
12	H	3-etoxi	Metoxi	3,5-dimetoxi	0.047	87
13	Fusionado con R ₇ para formar 1,3-benzodioxinil	Fusionado con R ₆ para formar 1,3-benzodioxinil	Pentoxi	H	0.26	98
14	H	2-	Pentoxi	H	0.22	90
25	Fusionado con R ₇ para formar 2-naftilo	Fusionado con R ₆ para formar 2-naftilo	Morfolinilo	H	0.084	100
28	H	2-fenoxi	Morfolinilo	H	>1	83
29	Cl	H	Morfolinilo	H	>1	82
30	Fusionado con R ₇ para formar 1,3-benzodioxinil	Fusionado con R ₆ para formar 1,3-benzodioxinil	Morfolinilo	H	>1	84
31	F	3-Cl	Morfolinilo	H	>1	83
32	H	2-metoxi	Morfolinilo	H	>1	100
33	H	3-OCF ₃	Morfolinilo	H	>1	89
34		H	Metoxi	H	>1	88
35	H	2-metoxi	Metoxi	H	>1	82
36	H	3-amina	Pentoxi	H	>1	98

68	-OCF ₃	H	Fusionado con R ₃ para formar 2,3 dihidro-1,4-benzodioxinil	Fusionado con R ₄ para formar 2,3 dihidro-1,4-benzodioxinil	0.38	86
17	-OCF ₃	H	Morfolinil	H	ND	74
18	H	3-OCF ₃	Metoxi	H	ND	74
38		H	H	-N(CH ₃) ₂	ND	89
40		H	Metoxi	3,5-dimetoxi	ND	77
69		H	Fusionado con R ₃ para formar 2,3 dihidro-1,4-benzodioxinil	Fusionado con R ₄ para formar 2,3 dihidro-1,4-benzodioxinil	ND	99
70	OH	H	Fusionado con R ₃ para formar 2,3 dihidro-1,4-benzodioxinil	Fusionado con R ₄ para formar 2,3 dihidro-1,4-benzodioxinil	ND	93
71	H	2-metoxi	Metoxi	3,5-dimetoxi	ND	77
72	H	2-metoxi	Fusionado con R ₃ para formar 2,3 dihidro-1,4-benzodioxinil	Fusionado con R ₄ para formar 2,3 dihidro-1,4-benzodioxinil	0.87	83
73	H	3-etoxi	Fusionado con R ₃ para formar 2,3 dihidro-1,4-benzodioxinil	Fusionado con R ₄ para formar 2,3 dihidro-1,4-benzodioxinil	ND	76
74	H	3-N(CH ₃) ₂	Metoxi	3,5-dimetoxi	ND	95
75	H	3-N(CH ₃) ₂	Pentoxi	H	ND	88
76	H	3-N(CH ₃) ₂	Fusionado con R ₃ para formar 2,3 dihidro-1,4-benzodioxinil	Fusionado con R ₄ para formar 2,3 dihidro-1,4-benzodioxinil	ND	95
77	Morfolinil	H	Fusionado con R ₃ para formar 6etil 6H-carbazol	Fusionado con R ₄ para formar 6etil 6H-carbazol	ND	82
78	Fenil	H	Morfolinil	H	0.47	109
79	Metoxi	3-metoxi	Morfolinil	H	0.46	110
80	CH ₃	3-CH ₃	Morfolinil	H	0.75	94
81	Fusionado con R ₇ para formar 2-naftilo	Fusionado con R ₆ para formar 2-naftilo	Fusionado con R ₃ para formar 2,3 dihidro-1,4-benzodioxinil	Fusionado con R ₄ para formar 2,3 dihidro-1,4-benzodioxinil	0.47	107

82	H	H	Metoxi	H	ND	72
83	Morfolinil	H	Metoxi	H	ND	71
84	CH ₃	3-CH ₃	Metoxi	3,5-dimetoxi	0.49	85
85	CH ₃	3-CH ₃	Fusionado con R ₃ para formar 2,3 dihidro-1,4-benzodioxinil	Fusionado con R ₄ para formar 2,3 dihidro-1,4-benzodioxinil	>1	86
86	CH ₃	3-CH ₃	Metoxi	H	>1	80
87	CH ₃	3-CH ₃	H	N(CH ₃) ₂	>1	84
94	COOH	H	Pentoxi	H	0.78	104
95	H	3-N(CH ₃) ₂	Morfolinil	H	>1	101
96	H	3-COOH	Pentoxi	H	0.5	106

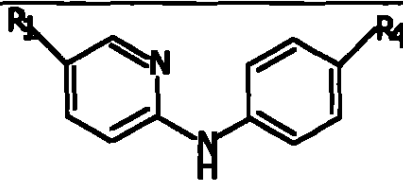


Tabla V

Derivados de N-fenil-2-piridinamina

Compuesto	R ₁	R ₄	IC ₅₀ (μM)	%Inh
19	2,4-dimetoxi-5-pirimidinil	Pentoxi	0.99	99
20	3-tienil	Morfolinil	0.68	105
21	3,5-bis(trifluorometil)fenil	Morfolinil	0.21	95
22	2,7a-dihidrobenczo[b]tien-2-il	Morfolinil	0.09	98

23	3a,7a-dihidro-2-benzofuranil	Morfolinil	0.92	96
24	3,4,5-trimetoxifenil	Morfolinil	1.76	94
26	2,3-diclorofenil	Morfolinil	>1	107
37		Pentoxi	ND	84

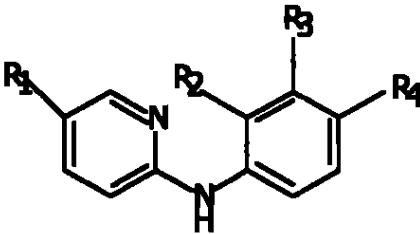


Tabla VI

Derivados de 5-R1-N-fenil-2-piridinamina

Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	IC ₅₀ (μM)	%inh
88	-(CH ₂) ₂ Ph	H	Fusionado con R ₄ para formar 2,3 dihidro-1,4-benzodioxinil	Fusionado con R ₃ para formar 2,3 dihidro-1,4-benzodioxinil	0.23	85
89		H	Fusionado con R ₄ para formar 2,3 dihidro-1,4-benzodioxinil	Fusionado con R ₃ para formar 2,3 dihidro-1,4-benzodioxinil	1.0	83
90	-(CH ₂) ₂ Ph	CH ₃	H	Metoxi	ND	73
91	Furanil	H	Metoxi	3,5-dimetoxi	0.5	90
92	Furanil	H	Fusionado con R ₄ para formar 2,3 dihidro-1,4-benzodioxinil	Fusionado con R ₃ para formar 2,3 dihidro-1,4-benzodioxinil	ND	74
93	Furanil	H	Metoxi	H	ND	78

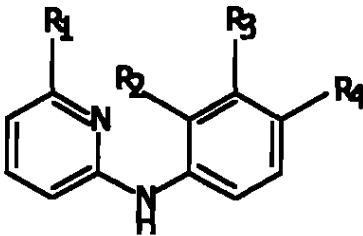
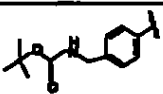
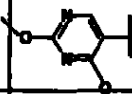


Tabla VII						
Derivados de 6-R1-N-fenil-2-piridinamina						
Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	IC ₅₀ (µM)	%Inh
94	4-(OH)Ph-	H	H	Metoxi	ND	86
95	(4-tienil)-	H	H	Metoxi	0.54	110
96	3-((CF ₃)O)Ph-	H	H	Metoxi	ND	76
97	(2-naftil)-	H	H	Metoxi	ND	71
98	4-((CH ₃) ₂ N)Ph-	H	H	Metoxi	ND	71
99	3-(NH ₂)Ph-	H	Fusionado con R ₄ para formar 9etil 9H-carbazol	Fusionado con R ₃ para formar 9etil 9H-carbazol	0.33	105
100	3-(NH ₂)Ph-	H	H	Metoxi	ND	79
101	2-(PhO)Ph-	H	H	Metoxi	ND	78
102		H	H	Metoxi	0.94	103
103	4-(Cl)Ph-	H	H	Metoxi	ND	75
104	3-((CH ₃) ₂ N)Ph-	H	Fusionado con R ₄ para formar 9etil 9H-carbazol	Fusionado con R ₃ para formar 9etil 9H-carbazol	0.09	89
105	3-((CH ₃) ₂ N)Ph-	H	H	Metoxi	0.4	98
106	4-morfolinil-fenil	H	3,5-dimetoxi	Metoxi	0.66	84
107		H	3,5-dimetoxi	Metoxi	ND	71
108	4-((CF ₃)O)Ph-	CH ₃	Metoxi	Metoxi	>1	84
109	4-((CH ₃) ₂ N)Ph-	CH ₃	Metoxi	Metoxi	ND	79
110	(2-benzo furanil)-	H	3,5-dimetoxi	Metoxi	0.14	91
111	(2-benzo furanil)-	CH ₃	Metoxi	Metoxi	>1	90
112	3,4,5-((CH ₃)O) ₃ Ph-	H	3,5-dimetoxi	Metoxi	0.9	90
113	3-((CH ₃) ₂ N)Ph-	H	3,5-dimetoxi	Metoxi	0.54	91

114	3-(CH ₃ CH ₂ O)Ph-	H	3,5-dimetoxi	Metoxi	0.14	96
115	3-(CH ₃ CH ₂ O)Ph-	CH ₃	Metoxi	Metoxi	1.1.	83
116	(benzo[b]tien-2-il)-	CH ₃	Metoxi	Metoxi	1.5	83
117	4-(OH)Ph-	H	3,5-dimetoxi	Metoxi	ND	78
118	3-((CF ₃)O)Ph-	H	3,5-dimetoxi	Metoxi	0.05	91
119	4-(OH)Ph-	CH ₃	Metoxi	Metoxi	ND	73
120	(1,3-benzodioxol-5-il)-	H	3,5-dimetoxi	Metoxi	0.05	97
121	4-(Ph)Ph-	H	3,5-dimetoxi	Metoxi	0.65	96
122	Ph-	H	3,5-dimetoxi	Metoxi	0.007	84
123	Ph-	H	H	Metoxi	0.65	90
124	3,4-(CH ₃ O) ₂ Ph-	H	3,5-dimetoxi	Metoxi	0.23	86
125	3,4-(CH ₃ O) ₂ Ph-	CH ₃	Metoxi	Metoxi	0.23	76
126	3,4-(CH ₃) ₂ Ph-	H	3,5-dimetoxi	Metoxi	0.08	90
127	3,4-(CH ₃) ₂ Ph-	CH ₃	Metoxi	Metoxi	0.19	86
128	3,4-(CH ₃) ₂ Ph-	H	H	Metoxi	1.54	84
129	3,4-(CH ₃ O) ₂ Ph-	H	Fusionado con R ₄ para formar 9etil 9H-carbazol	Fusionado con R ₃ para formar 9etil 9H-carbazol	0.34	92
130	3,4-(CH ₃ O) ₂ Ph-	H	H	Metoxi	0.85	96
131	(2-furanil)-	H	H	Metoxi	0.24	95
132	(2-furanil)-	H	Fusionado con R ₄ para formar 9etil 9H-carbazol	Fusionado con R ₃ para formar 9etil 9H-carbazol	>1	105
134		H	Fusionado con R ₄ para formar 9etil 9H-	Fusionado con R ₃ para formar 9etil 9H-	1.59	92

			carbazol	carbazol		
135	(2-naftil)-	H	3,5-dimetoxi	Metoxi	0.21	86
136	(2-naftil)-	CH ₃	Metoxi	Metoxi	>1	86
137	3,5-(CF ₃) ₂ Ph-	H	3,5-dimetoxi	Metoxi	0.59	82
138	2-(PhO)Ph-	H	3,5-dimetoxi	Metoxi	0.23	90
139	(1,3-benzodioxol)-5-il	H	Fusionado con R ₄ para formar 9etil 9H-carbazol	Fusionado con R ₃ para formar 9etil 9H-carbazol	ND	72
140	(1,3-benzodioxol)-5-il	H	H	-O(Ph)-	ND	79
141	4-(Cl)Ph-	H	3,5-dimetoxi	Metoxi	ND	76
142	3-(Cl),4-(Fl)Ph-	H	3,5-dimetoxi	Metoxi	ND	94
143	3-(Cl),4-(Fl)Ph-	CH ₃	Metoxi	Metoxi	0.8	85
144	Ph(CH) ₂ -	H	3,5-dimetoxi	Metoxi	0.03	110
145	Ph(CH) ₂ -	CH ₃	Metoxi	Metoxi	0.28	96
146	3,4-(Cl) ₂ Ph-	H	3,5-dimetoxi	Metoxi	0.32	99

Ejemplo 6

Los Derivados de la 2-Piridinamina y de la 4-Pirimidinamina

No Inhiben la Actividad MEK en Neuronas P19

Los compuestos comercialmente disponibles de 2- Piridinamina y de la 4- Pirimidinamina aquí probados no inhiben la actividad de las quinasas MEK1/2 en neuronas P19, puesto que ellas no inhiben la fosforilación inducida por glutamato de la quinasa p44/42 MAP en estas células. Sin embargo el U0126 inhibió esta actividad como se esperaba (Figura 8). La actividad MEK en neuronas P19 se

indujo por adición de glutamato 3mM y glicina 1mM y se midió ensayando el sustrato MEK por fosforilación de la quinasa p44/42MAP. Las células se trataron con los compuestos aquí descritos o con U0126 en presencia o ausencia de glutamato/glicina, y cosechadas 5 minutos después del tratamiento, para luego ser analizadas con papel secante. Los datos mostraron la efectividad del U0126 en la inhibición de la fosforilación del sustrato MEK, tal y como se esperaba; pero, la 2-Piridinamina y de la 4-Pirimidinamina no lo hicieron. En consecuencia, la 2-Piridinamina y de la 4-Pirimidinamina no son inhibidores para el MEK.

La 2- Piridinamina y de la 4-Pirimidinamina tuvieron su máxima actividad neuroprotectora, al menos 2 horas después del comienzo de la excitotoxicidad. Los compuestos fueron suministrados en concentraciones 1μM cada uno, 15 minutos antes o dos horas después de la adición de glutamato/glicina. El U0126 se probó como un control positivo. De manera similar al U0126, los compuestos de 2-Piridinamina y de 4-Pirimidinamina retuvieron la máxima eficacia neuroprotectora en ambos tiempos, a pesar de mostrarse activos frente a blancos diferentes.

Ejemplo 7

Modelo de Neuroprotección In Vivo

Protocolo de Oclusión de la Arteria Media Cerebral

Las ratas macho con hipertensión espontánea (SHR), de aproximadamente de 90 a 100 días de edad (~250-300 g), se pesaron y anestesiaron con un coctel de

quetamina (100mg/mL)/xilazina (20mg/mL), (1.2mL/kg; i.p.), seguido por la administración subcutánea de un antibiótico de duración prolongada (e.g. combiótico). Los niveles de anestésico son evaluados por reflejo de la córnea (aire resoplado en el ojo) y tirón de pierna en respuesta al pinchazo de la cola o el pie. Una vez que la rata ha sido anestesiada, se coloca en una pequeña de cirugía animal y se amarra durante el procedimiento quirúrgico. La temperatura del cuerpo de la rata es monitoreada con un termómetro rectal y mantenida a 37°C con un cojín de calentamiento homeostático. Las áreas de incisión son rasuradas y refregadas con betadina. El área quirúrgica es aséptica. Todo el instrumental quirúrgico se esteriliza en autoclave y/o en una burbuja de vidrio esterilizadora de instrumentos secos, luego se juaga con solución salina estéril o alcohol antes de ser usado.

(1) Catéter de la Arteria Femoral. Un catéter permanente se coloca en la arteria femoral para muestreo periódico de sangre y para medir la presión de la sangre arterial. Se hace una incisión sobre el área de la arteria femoral. El tejido es disecado romo para aislar la arteria. La terminal distal de la arteria se liga con sutura estéril y se coloca una ligadura suelta alrededor de la terminal proximal para asegurar el catéter en el lugar. Se hace una pequeña incisión en la arteria para insertar el catéter. La terminal biselada de un tubo PE50 se inserta 5mm dentro de la arteria y se asegura en el lugar con sutura estéril. El tubo PE es atado a una jeringa de 1cc llena con solución salina heparinizada que se usa minimamente para mantener la arteria patente. La sangre arterial se muestrea 3 veces: 10 minutos antes de la isquemia, 2 horas después del inicio de la isquemia y 15 minutos

después de la reperfusión. Todas las muestras de sangre se toman en volúmenes entre 100-300 μ L para determinar pH, PaO₂, PaCO₂, hematocrito y glucosa. La cantidad máxima de sangre extraída a lo largo del experimento no excede a 1mL por animal. Cuando no se está tomando muestras de sangre, se coloca un transductor de presión sanguínea atado al catéter para medir la presión arterial media. Al final del procedimiento quirúrgico, se remueve el catéter, se desamarra la arteria y se cierra con sutura el área de incisión.

(2) El Modelo de Oclusión en Cascada CCA-MCA de Isquemia Focal Cerebral. Las ratas Wistar macho con hipertensión espontánea (SHRs) se preparan para isquemia focal cerebral reversible por oclusión unilateral de ambas arterias carótidas comunes (CCA) y la arteria cerebral media (MCA), usando una modificación de la técnica descrita por Brint y otros (J. Cereb Blood Flow Metab 8:474-485, 1998). La CCA izquierda se aísla a través de una incisión en la superficie ventral del cuello. Para aislar la MCA ipsilateral, se realiza una segunda incisión entre el ángulo lateral del ojo izquierdo y el correspondiente canal auditivo externo para descubrir el cráneo demarcado. La MCA es expuesta a través de un hueco de 5mm taladrado en el rostro de 2-3mm, para la fusión del arco zigomático y el hueso esquamosal bajo visualización directa con un microscopio operante Zeiss. La dura es abierta con una aguja estéril de 26g y un cable de platino (0.1mm de diámetro) se inserta debajo de la MCA apenas superior a la vena cortical inferior. La MCA se ocluye temporalmente por elevación y compresión de los vasos a través del alambre de platino, como lo describe Aronowski y colegas (Stroke, 25:2235-2240,

1994). Simultáneamente la CCA es ocluida con un gancho para aneurismas. La duración de la oclusión de la CCA y la MCA es de 2 horas. Al final de este período, el alambre y el gancho se remueven cuidadosamente para permitir la reperusión de los vasos y se cierra con sutura el área de incisión. La rata se coloca en una jaula aislada para recuperarse antes de retornarla a su jaula hogar. La rata se monitorea de cerca por 2 a 4 horas, luego de la cirugía para asegurar una recuperación, sin contratiempos, de la anestesia y del procedimiento quirúrgico. Luego de la recuperación de la anestesia, la rata es protegida de acuerdo con el protocolo establecido como en las pautas LAM, hasta que lo requiera el análisis experimental.

(3) Los compuestos de prueba se administran por cualquier ruta adecuada: intravenosa, subcutánea o intraperitoneal. Las dosis y el tiempo de administración del compuesto se basan en los resultados de los ensayos *in vitro* o en las referencias de la literatura.

(4) Dos medidas de resultado son utilizadas para evaluar la eficacia del compuesto: (a) rendimiento del comportamiento sobre varios paradigmas CNS tales como el Laberinto de Agua Morris, actividad motriz espontánea, laberinto de brazo radial y perfil de comportamiento general CNS; y (b) examen histológico de la talla del infarto cortical cerebral. Veinticuatro horas después de la isquemia, las ratas se prueban en un paradigma de comportamiento y luego se aplica la eutanasia para la histología cerebral. Las ratas son profundamente anestesiadas con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (100mg/kg, i.p.). La profundidad de la

anestesia es controlada por la carencia del reflejo córneo y el pinchazo de la cola. La eutanasia se aplica en las ratas por perfusión transcardial con aproximadamente 50mL de solución salina fisiológica heparinizada. Después de la perfusión, el cerebro es removido, bloqueado y seccionado en trozos de 1mm. Cada trozo se coloca en solución TTC, un colorante de viabilidad celular, por 15 minutos. Los trozos teñidos se visualizan con un microscopio de disección Nikon SMZ-U y el análisis de las áreas afectadas del cerebro se cuantifican usando el programa de computador ImagePro 2.1. El volumen de infarto se expresa como % de hemisferio contralateral. Se realizan comparaciones estadísticas a través de grupos de tratamiento (ANOVA una vía).

Ejemplo 8

Estudio In Vivo: Modelo Transitorio de Isquemia Cerebral

Las ratas macho Wistar (Iffa Créo, Francia), que pesan entre 250 y 300gm son alojadas de 2 por jaula bajo ciclos de luz-oscuridad de 12 horas a 12 horas (luz prendida a las 7:00 a.m., apagada a las 7:00 pm) a temperatura ambiente de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con $50 \pm 15\%$ de humedad, por un mínimo de 5 días antes de los experimentos. Durante este tiempo las ratas tienen libre acceso a la comida comercial para ratas (Trouw Nutrition France, Vigny, France, ref. 811002) y consumo libre de agua.

Los animales son anestesiados por inducción con halotano al 5% en aire y luego con halotano al 1-2% durante la cirugía. La temperatura del cuerpo de las ratas se

mantiene a 37°C con un cojín de calentamiento. Se realiza una incisión de 2 cm en el centro del cuello y la arteria carótida común derecha (CCA), la arteria carótida externa (ECA) y la arteria carótida interna (ICA) se exponen bajo un microscopio en operación. La ICA es además disecada para identificar la rama de la arteria pterigopalatina (PA) y la rama ICA intracraneal. La CCA se liga. Una sutura de seda 3-0 es amarrada en el origen de la ECA y se liga. Se introduce un catéter (id=0.58mm) dentro de la CCA a través de una pequeña perforación y se conduce a la rama intracraneal de la ICA. Una sutura de nylon quirúrgico de 4-0 es introducida dentro del catéter. Una longitud de aproximadamente 19mm de sutura de nylon es suavemente conducida desde la CCA al lumen de la ICA hasta que la sutura bloquea el origen del MCA. La sutura se sella dentro del catéter por calor, dejando 1 cm del catéter por fuera de manera que la sutura pueda ser retirada para permitir la perfusión. La incisión se cierra utilizando ganchos de piel. Se termina la anestesia y los animales se colocan bajo una lámpara de calentamiento hasta que se recuperan de la anestesia. Las ratas despiertan 10-15 minutos más tarde. Después de 2 horas de isquemia, la reperfusion es desarrollada retirando la sutura hasta que la punta despeja el lumen de la ICA. El vehículo o compuesto de prueba es administrado intraperitonealmente (i.p.) una hora después del inicio de la isquemia.

Veinticuatro horas después del inicio de la oclusión, las ratas son decapitadas. Los cerebros se extraen inmediatamente, se congelan en isopentano y se almacenan a -20°C. Los cerebros son luego cortados en secciones de 20µm de espesor en un criocortador. Cada veinteava rebanada es utilizada para medir el área de infarto.

Las secciones son teñidas con violeta de cresilo y las áreas del infarto en el striatum y la corteza son determinadas por planimetría usando el programa de computador de análisis de imagen (Image NIH) después de que las imágenes de las secciones son digitalizadas. Los resultados son expresados como volumen de corteza y striatum (mm^3) desde la corteza frontal hasta la occipital. Los datos son analizados por el análisis de variancia (ANOVA una vía) seguido por la prueba T de Dunnett.

Mientras la anterior especificación enseña los principios de la presente invención, con ejemplos proporcionados con el propósito de ilustrar, se entenderá que la práctica de la invención abarca todas las variaciones usuales, adaptaciones y/o modificaciones como vienen dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones y sus equivalentes.

Resumen:

Esta invención proporciona composiciones farmacéuticas neuroprotectoras que comprenden 2-piridinaminas. Esta invención también proporciona métodos de uso de estas composiciones para prevenir la muerte celular isquémica, particularmente la muerte de células neuronales, y reducir la probabilidad de muerte de células neuronales en un sujeto ocasionada por un evento traumático. Finalmente esta invención proporciona un aparato para administrar a un sujeto las presentes composiciones farmacéuticas.

REFERENCIAS

- Ahn, N., et al. (1991) *J. Biol. Chem.* 266:4220-4227.
- Alessandrini, A., et al. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12866-9.
- Anderson, N., et al. (1990) *Nature* 343:651-653.
- Bading, H., Greenberg, M. E. (1991) *Science* 253:912-914.
- 5 Callaway, J., et al. (1999) *Stroke* 12:2704-2712.
- Canzoniero, L., et al. J. (1996) *J. Neurosci. Res.* 45:226-236.
- Cheng, Y., et al. (1998) *J. Clin. Invest.* 101:1992-1999.
- Chijiwa, T., et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:5267-5272.
- Courtney, M., et al. (1990) *J Neurosci.* 10:3873-3879.
- 10 Crews, C., Alessandrini, A., Erikson, R. (1992). *Science* 258:478-480.
- Desdouits-Magnen, J., et al. (1998) *J. Neurochem.* 70:524-530.
- Enalen, H., et al. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10803-10808.
- Favata, M. F., et al., (1998) *J. Biol. Chem.* 273:18623-18632.
- Fiore, R. S., et al. (1993) *J Neurochem* 61:1626-1633.
- 15 Grobin, A. C., (1999). *Brain Research* 827:1-11.
- Heath, D., Vink, R. (1999). *J. Neurosurg.* 90:504-509.
- Henry, J., et al. (1998) *J. Med. Chem.* 41:4196-4198.
- Hu, B., Wieloch, T. (1994) *J. Neurochem.* 62:1357-1367.
- Inhorn, R., Majerus, P. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:15946-15952.
- 20 Ishii, T., et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:2836-2843.
- Jaiswal, R., et al. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14:6944-6953.
- Jones-Villeneuve, et al. (1982) *J. Cell Biol.* 94:253-262.
- Jones-Villeneuve, et al. (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2271-2279.
- Jovanovic, J., et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:3679-3683.
- 25 Kindy, M. (1993) *J Cereb Blood Flow Metab* 13:372-377.
- Kobayashi, E., et al. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159:548-553.
- Kurino, M., et al. (1995) *J Neurochem* 65:1282-1289.
- Lander, H., et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271:19705-19709.
- Laurie, D., et al. (1995) *Brain Res. Mol. Brain Res.* 32:94-108.
- 30 Lee, J., et al. (1994) *Nature* 372:739-746.
- Lev, S., et al. (1995) *Nature* 376:737-745.
- Li, B., et al. (1999a) *Eur. J. Biochem.* 262:211-217.
- Li, M., et al. (1999b) *Brain Res.* 1999:44-52.

- McBurney, M. W., et al. (1982) *Dev. Biol.* 89:503-508.
- Meldrum, B., Garthwaite, J. (1990) *Trends Pharmacol Sci* 11:379-387.
- Monyer, H., et al. (1994) *Neuron* 12:529-540.
- Monyer, H., et al. (1992) *Science* 256:1217-1221.
- 5 Moodie, S., et al. (1993) *Science* 260:1658-1661.
- Morley, P., et al. (1995) *J. Neurochem.* 65:1093-1099.
- Murray, B., et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:11975-11980.
- Onoda, T., et al. (1989) *J. Nat. Prod.* 52:1252-1257.
- Papin, C., et al. (1995) *Oncogene* 10:1647-1651.
- 10 Park, C., et al. (1988) *Ann. Neurol.* 24:543-551.
- Pazos, A., et al. (1999) *Brain Res.* 846:186-195.
- Pleasure, S., Lee, V.-Y. (1993) *Journal of Neurosci. Res.* 35:585-602.
- Pleasure, S., et al. (1992) *J. Neurosci.* 12:1802-1815.
- Ray, W. J., Gottlieb, D. I. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 197:1475-1482.
- 15 Rootwelt, T., et al. (1998) *J. Neurochem.* 71:1544-1553.
- Rosen, L., et al. (1994) *Neuron* 12:1207-1221.
- Sakagami, H., Kondo, H. (1993) *Brain Res Mol Brain Res* 19:215-218.
- Sakakibara, Y., et al. (2000) *Neurosci Lett* 281:111-114.
- Sattler, R., et al. (1999) *Science* 284:1845-1848.
- 20 Schneggenburger, R., et al. (1993) *Neuron* 11:133-143.
- Schwartz-Bloom, R., et al. (1998) *J Cereb Blood Flow Metab* 18:548-558.
- Sola, C., et al. (1999) *J Neurosci. Res.* 57:651-652.
- Stanciu, M., et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275:12200-12206.
- Standaert, D., et al. (1994) *J. Comp. Neurol.* 343:1-16.
- 25 Takahashi, M., et al. (1998) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287:559-566.
- Tatlisumak, T., et al. (1998) *Stroke* 29:1952-1958.
- Tokumitsu, H., et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:4315-4320.
- Turetsky, D. M., et al. (1993) *J. Neurobiol.* 24:1157-1169.
- Turski, L., et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:10960-10965.
- 30 Tymianski, M., et al. (1993) *J. Neurosci.* 13:2085-2104.
- Vanhoutte, P., et al. (1999) *Mol. Cell. Biol.* 19:136-146.
- Wasterlain, C., et al. (1996) *Stroke* 27:1236-1240.
- Xia, Z., et al. (1995) *Science* 270:1326-1331.

Xia, Z., et al. (1996) *J. Neurosci.* 16:5425-5436.

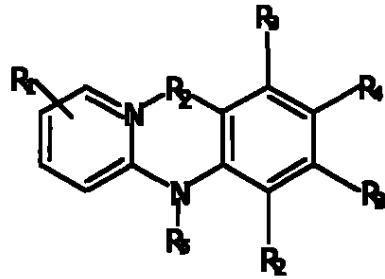
Yang, D. D., et al. (1997) *Nature* 389:865-870.

Yang, Y., et al. (1998) *Brain Res.* 804:169-176.

Zheng, C., et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:23933-23939.

Lo que se reivindica:

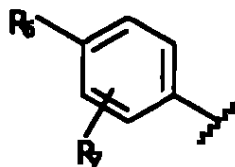
1. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un compuesto que tiene la siguiente fórmula



o una sal del mismo, farmacéuticamente aceptable, en la que

- a) R_1 es H o un sustituyente unido a cualquiera de las posiciones 5 o 6 del anillo y seleccionado del grupo que consiste de alquilo, alquenilo, alquinilo, tienilo, furanilo, pirrolilo, fenilo, pirimidinilo, pirimidinilo sustituido, piridinil, piridinil sustituido, fenil-alquenilo, fenil-alquenilo sustituido, benzo [b] tien-2-il, 2-benzofuranilo y fenilo sustituido,

dicho fenilo sustituido tiene la siguiente fórmula



en la que (i) R_6 es seleccionado del grupo que consiste de H, OH, halógeno, alquilamino, dialquilamino, hidroxi-dialquilamino sustituido, alquilo bajo, alquilo ácido bajo, alcoxi, alcoxi bajo halógeno sustituido, fenilo y morfolinilo, y (ii) R_7 representa entre uno y cuatro sustituyentes,

los cuales pueden ser el mismo o diferentes, y son seleccionados del grupo que consiste de H, halógeno, amino, alquilo, alquilo bajo, alquilo bajo halógeno sustituido, alquilamino, dialquilamino, alcoxi bajo ácido, alcoxi, alcoxi bajo halógeno sustituido, alcoxi y fenilalcoxi, con la condición que R₆ y R₇ pueden estar fusionados para formar 2-naftilo o 1,3-benzodioxililo;

- b) Cada R₂ es independientemente H o alquilo bajo;
- c) Cada R₃ es independientemente seleccionado del grupo que consiste de H, alquilo bajo, amino, alquilamino, dialquilamino y alcoxi bajo;
- d) R₄ es H, alcoxi o morfolinilo, con la condición que R₄ puede estar fusionado con R₃ para formar 2,3-dihidro-1,4-benzodioxinilo o 9-alquil 9H carbazolilo; y
- e) R₅ es H o alquilo bajo.

- 2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que R₁ es un fenilo sustituido en la posición 5 del anillo, y cada R₂ es H.
- 3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, en la que R₄ es morfolinilo.
- 4. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, en la que cada R₃ es alcoxi bajo y R₄ es alcoxi bajo.

5. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que R_1 está en la posición 6 del anillo y cada R_2 es H.
6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en la que cada R_3 y R_4 son alcoxi bajos.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto es 5-(3-etoxifenil)-N-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-piridinamina.
8. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto es N-[4-(4-morfolinil)fenil]-5-(2-naftil)-2-piridinamina.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto es 5-benzo[b]fien-2-il-N-[4-(4-morfolinil)fenil]-2-piridinamina.
10. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto es 5-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]-N-[4-(4-morfolinil)fenil]-2-piridinamina.
11. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto es 5-[4-(4-morfolinil)fenil]-N-[4-(pentoxi)fenil]-2-piridinamina.
12. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto es 5-[4-(dimetilamino)fenilo]-N-[4-(pentoxi)fenil]-2-piridinamina.

13. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto es 5-[4-(dimetilamino)fenil]-N-(4-metoxifenil)-2-piridinamina.
14. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto es 5-(1,3-benzodioxol-5-il)-N-[4-(pentoxi)fenil]-2-piridinamina.
15. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto es ácido 4-[6-[[4-(pentoxi)fenil]amino]-3-piridinil] benzopropanóico.
16. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto es 5-(2-metoxifenil)-N-[4-(pentoxi)fenil]-2-piridinamina.
17. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto es N-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxina-6-il)-5-[(E)-2-feniletetil]-2-piridinamina.
18. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto es N-[6-[3-(dimetilamino)fenil]-2-piridinil]-9-etilo-9H-carbazol-3-amina.
19. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto es 6-(3-etoxifenil)-N-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-piridinamina.

20. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto es 6-[3-(trifluorometoxi)fenil]-N-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-piridinamina.
21. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto es 6-(1,3-benzodioxol-5-il)-N-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-piridinamina.
22. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto es 6-fenil-N-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-piridinamina.
23. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto es 6-(3,4-dimetoxifenil)-N-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-piridinamina.
24. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto es 6-(3,4-dimetilfenil)-N-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-piridinamina.
25. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto es N-(4,5-dimetoxi-2-metilfenil)-6-(3,4-dimetilfenil)-2-piridinamina.
26. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto es 6-(2-naftil)-N-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-piridinamina.
27. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto es 6-(2-fenoxifenil)-N-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-piridinamina.

28. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto es 6-[(E)-2-feniletenil]-N-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-piridinamina.
29. Un método para reducir la muerte por isquemia en una población de células que comprende poner en contacto una célula en la población celular, con una cantidad profilácticamente efectiva del compuesto de la reivindicación 1.
30. El método de la reivindicación 29, en el que la célula se selecciona del grupo que consiste de una célula neuronal, una célula glial, una célula cardíaca, un linfocito, un macrófago y un fibroblasto.
31. Un método para reducir la muerte de células neuronales en respuesta a un evento traumático, que comprende poner en contacto la célula neuronal con una cantidad profilácticamente efectiva del compuesto de la reivindicación 1, antes de, durante o dentro de un período de tiempo adecuado, luego del evento traumático.
32. El método de la reivindicación 29, en el que el contacto es realizado *in vitro*.
33. El método de la reivindicación 31, en el que el contacto es realizado *in vitro*.
34. El método de la reivindicación 29, en el que el contacto es realizado *ex vivo*.

35. El método de la reivindicación 31, en el que el contacto es realizado *ex vivo*.
36. El método de la reivindicación 29, en el que el contacto es realizado *in vivo*.
37. El método de la reivindicación 31, en el que el contacto es realizado *in vivo*.
38. Un método para reducir la muerte de células neuronales en respuesta a un evento traumático, que comprende la administración al sujeto de una cantidad profilácticamente efectiva de la composición farmacéutica de la reivindicación 1, antes de, durante o dentro de un período de tiempo adecuado, luego del evento traumático.
39. El método de la reivindicación 38, en el que el sujeto es un humano.
40. El método de la reivindicación 38, en el que el evento traumático es seleccionado del grupo que consiste de un desorden médico, un trauma físico, un trauma químico y un trauma biológico.
41. El método de la reivindicación 38, en el que la composición farmacéutica es administrada antes del evento traumático.

42. El método de la reivindicación 38, en el que la composición farmacéutica es administrada durante el evento traumático.
43. El método de la reivindicación 38, en el que la composición farmacéutica es administrada después del evento traumático.
44. Un aparato para administrar a un sujeto la composición farmacéutica de la reivindicación 1 que comprende un contenedor, y la composición farmacéutica dentro de él, en donde el contenedor tiene un dispositivo para liberar al sujeto la dosis profiláctica de la composición farmacéutica.
45. El aparato de la reivindicación 44, en el que el dispositivo para liberar la composición farmacéutica es una jeringa.

FIGURE 1 (Panel 1)

Figure 1A

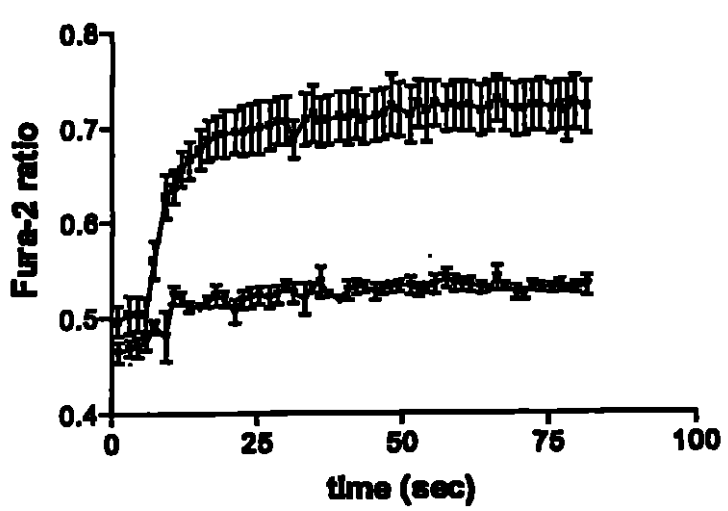


Figure 1B

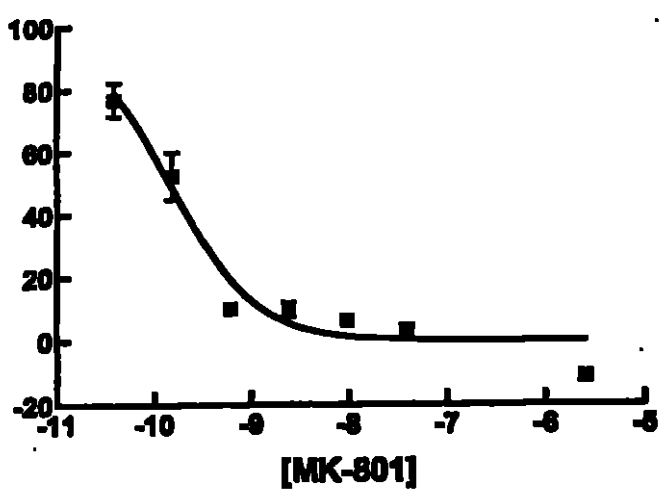


FIGURE 2 (Panel 1)

Figure 2A

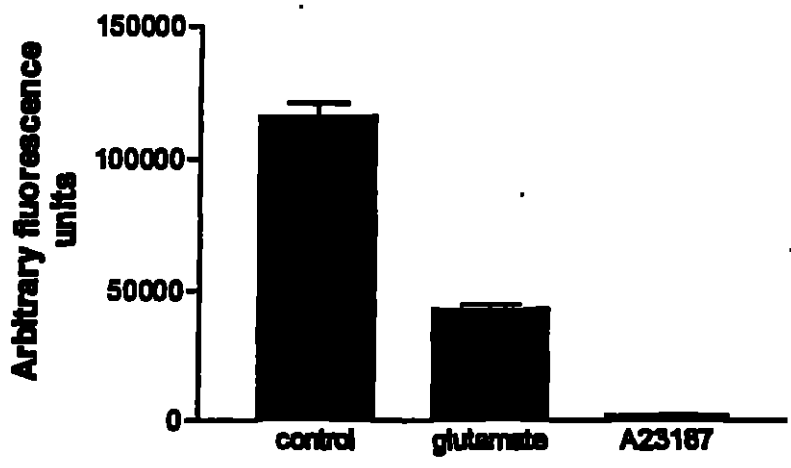


Figure 2B

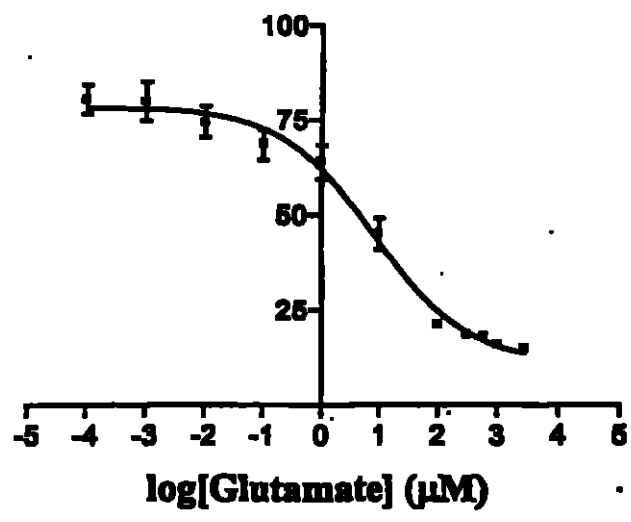
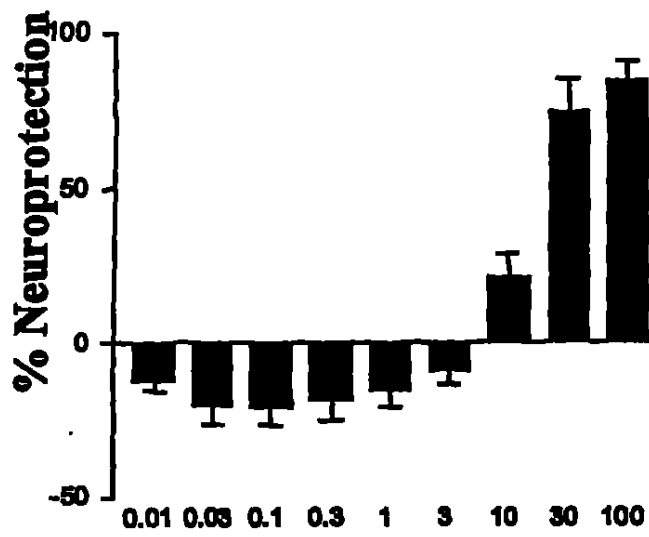


FIGURE 2 (Panel 2)

Figure 2C



[MK-801] (μM) in the Presence of
3 mM Glutamate & 1 mM Glycine

FIGURE 3

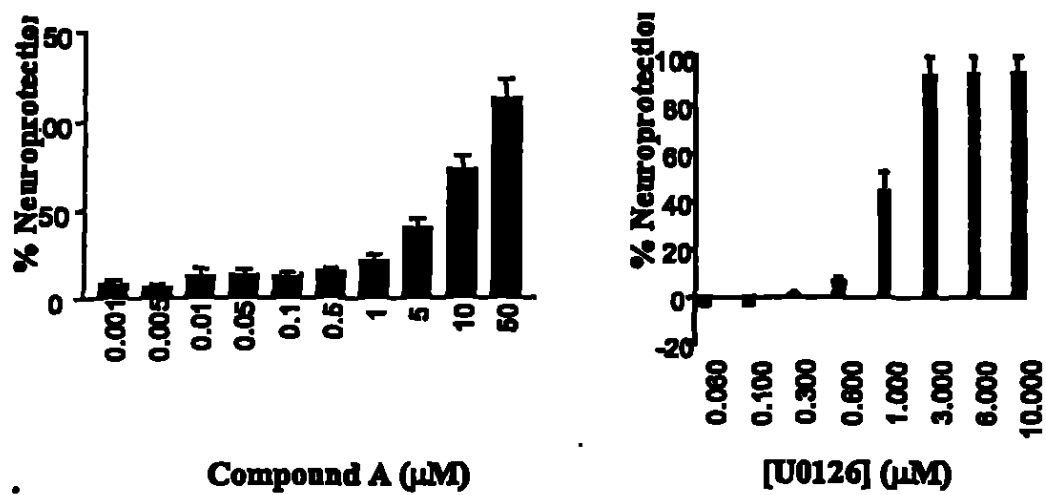


FIGURE 4 (Panel 1)

Figure 4A

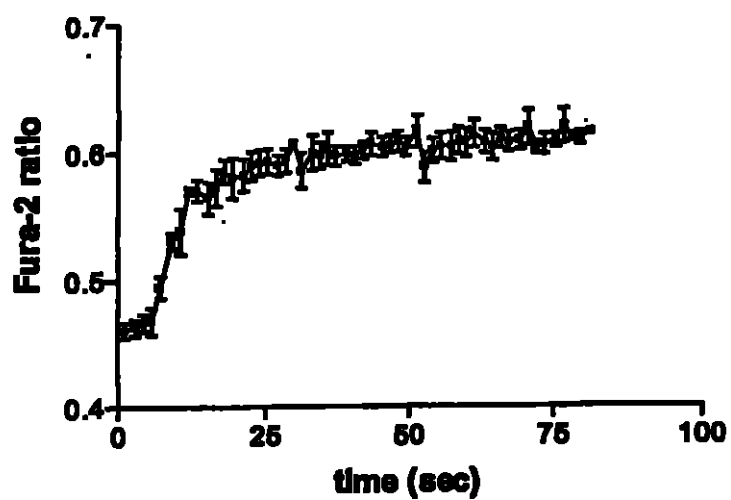


Figure 4B

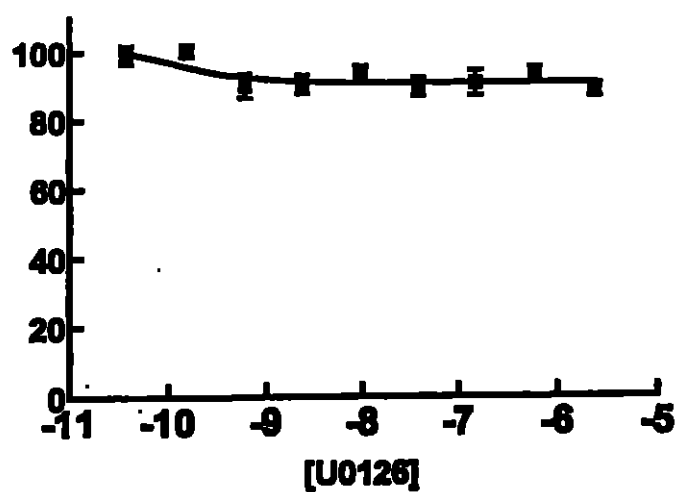


FIGURE 5

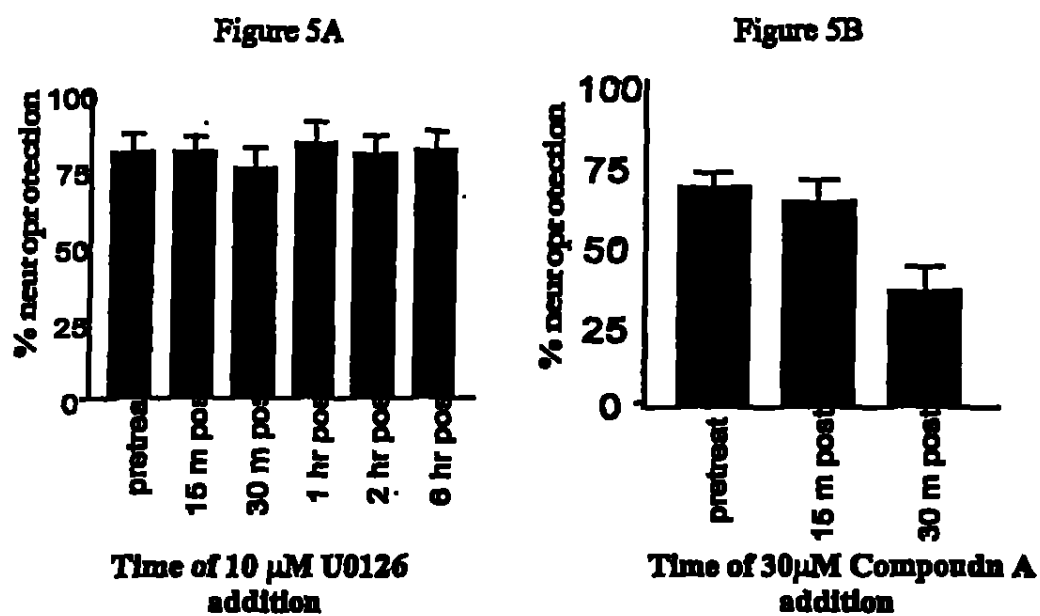


FIGURE 6 (Panel 1)

Figure 6A

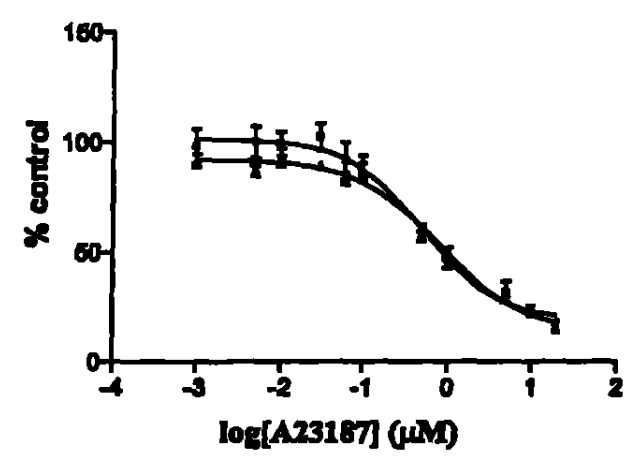
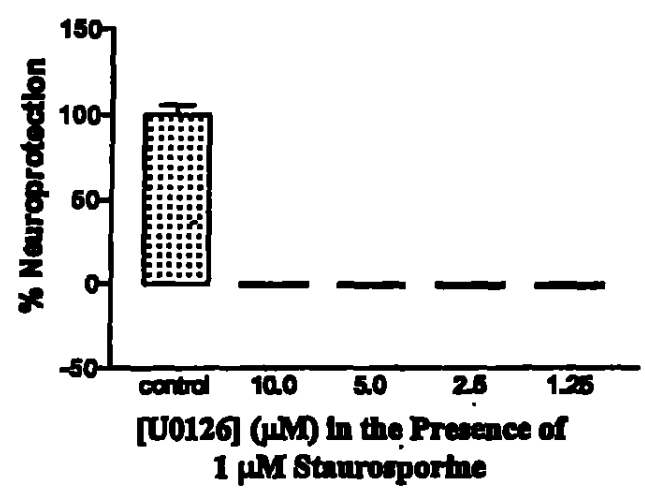


Figure 6B



WO 02/11724

PCT/US01/41563

FIGURE 6 (Panel 2)

Figure 6C

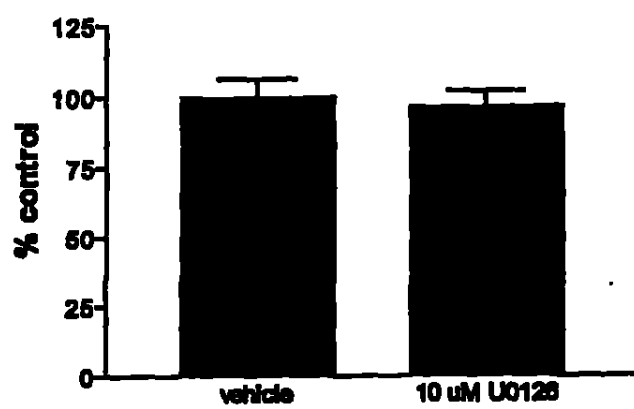
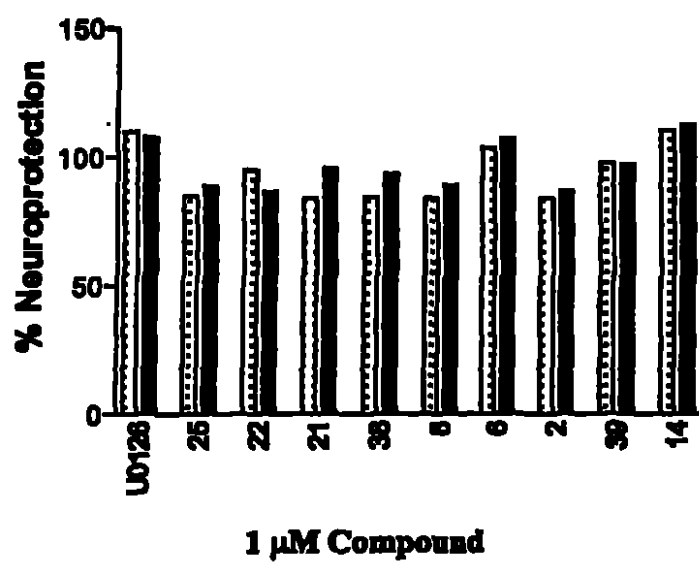


FIGURE 7



REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

		USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCIÓN	MODELO DE UTILIDAD	()	(X)
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.		()	(X)
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.		()	()
- Descripción de la invención.		()	(X)
- Dibujos de ser estos pertinentes.		()	(X)
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.			
COMPLETA (X)	INCOMPLETA ()		

DISEÑO INDUSTRIAL ()			
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()	
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()	
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()	
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()	
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()		

ESQUEMA DE TRAZADO ()			
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()	
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	()	()	
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()	
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()	
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()		

Edwson Novarro
 Firma Responsable:

07-02-2003
 Fecha:

INFORME DE PROTOCOLO

Expediente 03-9952

Fecha: 8 de julio del 2003

Se certifica que:

Desde fecha 16 de Marzo de 1999,
del folio 104727 al folio 104732 del
libro de Protocolo N° 363, obra el poder
N° 19164 conferido por ORTHO-McNEIL
PHARMACEUTICAL INC.

domiciliado(a) en Raritan, New Jersey,
Estados Unidos de América

al doctor JIMENA ESCOBAR URIBE Y/O IGNACIO
ESCOBAR URIBE Y/O JULIANA ESCOBAR URIBE

Facultad para desistir Si.

Revisado _____.

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 350 5220
E-mail: info@slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia



2020
Bogotá, D.C.,

Doctor:
JIMENA ESCOBAR URIBE
Apoderado.
ORTHO McNEIL PHARMACEUTICAL, INC.

Oficio N° 05562

ASUNTO:	Radicación N°	03-08952
	Solicitud Internacional	PCT/US2001/41565
	Fecha inicio fase nacional	08/03/2003
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	330
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- ☐ La solicitud no contiene los dibujos. (Art. 26-d) Decisión 486 y numeral 5.2.5, capítulo quinto del título décimo de la Circular Única de la SIC).
- ☐ La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486).

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha, 78 .32. 2003.