

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

07-38444

54. TÍTULO

COMPUESTOS DE CARBAMATO PARA UTILIZAR EN EL TRATAMIENTO DE
PADECIMIENTOS NEURODEGENERATIVOS.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A61K 31/27; A61P 25/00.

71. SOLICITANTE

JANSSEN PHARMACEUTICA N.V.

DOMICILIO

BEERSE, BELGICA

74. APODERADO

JIMENA ESCOBAR URIBE

22. BOGOTÁ, D. C.,

(FORMA P-10)



FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

162

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒

Capítulo I

☐

Capítulo II

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **JANSSEN PHARMACEUTICA**
N.V.

Dirección: Turnhoutseweg 30, B-2340
Beerse, Bélgica

Nacionalidad o Domicilio: Beerse, Bélgica.

Lugar de Constitución: Bélgica

Teléfono: Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)

Nombre: **JIMENA ESCOBAR URIBE**

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

Teléfono: 6 162051/61 Fax: 6 161889

E-mail: tm-patent@escobaruribe.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Número 39.779.452T.P 68228

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: **VER ANEXOS**

Dirección:

Nacionalidad o domicilio:

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/036695

Fecha 14 de octubre de 2005

Publicación Internacional No. WO 2006/044472 A1

Fecha 27 de abril de 2006

6 **TÍTULO (54)**

COMPUESTOS DE CARBAMATO PARA UTILIZAR EN EL TRATAMIENTO DE
PADECIMIENTOS NEURODEGENERATIVOS.

7 **Clasificación Internacional (51)**

A61K 31/27 ; A61P 25/00

8 **Prioridad**

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

Estados Unidos de América

Estados Unidos de América

(32) Fecha

15 de octubre de 2004

12 de julio de 2005

(31) Número de Solicitud

60/619,402

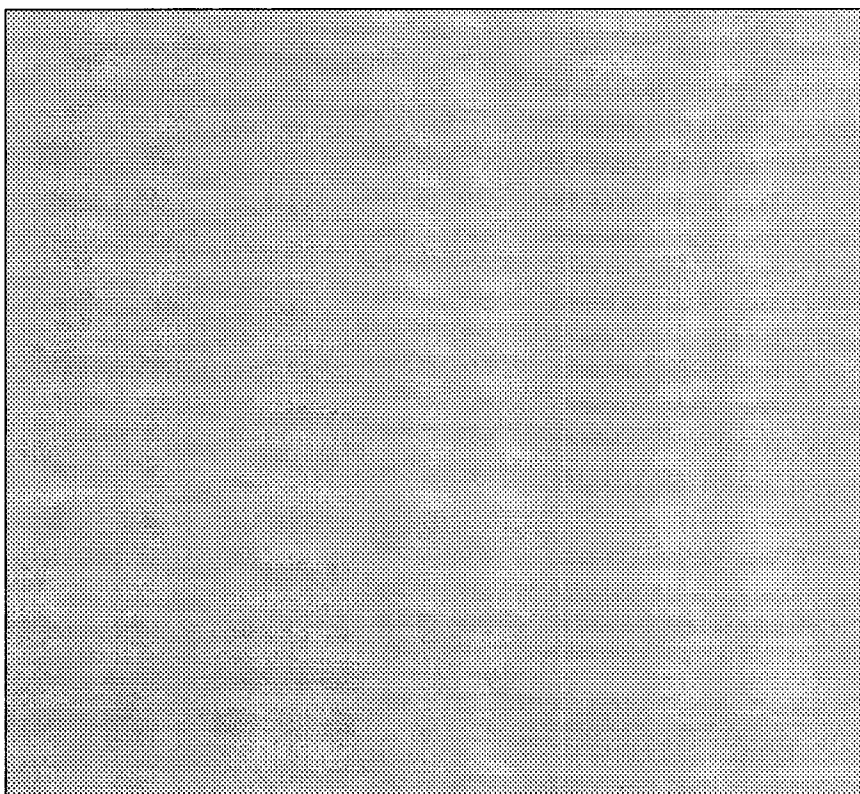
60/698,403

9 **Comprobante de pago No.** 07 - 22.271

Fecha 16 de marzo de 2007

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona
- ☒ Poderes si fuere el caso * Protocolo No. 17.154
- ☐ 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 deposito 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 * Opinión escrita

11 FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE: JIMENA ESCOBAR URIBE

FIRMA:

C.C. 39.779.452 DE Usaquén T.P. 68.228

As. 3051/PCT

3051

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 22,271
FECHA : MARZO 16 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-038444- -00000-0000
Fecha: 2007-04-18 16:33:03 Dep. 2020 NUCLEACION
Tra 11 PATENTE IYII Eve 378 FASE NACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios: 163

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	VAL. PAGO
ESCOBAR URIBE ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	63008214	15/03/2007	0,520,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL :	482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXOS

INVENTORES

1.)

TWYMAN, Roy, E.

(3355 Byron Drive, Doylestown, Pennsylvania 18901, Estados Unidos de América);

2.)

ZHAO, Boyu

(105 Weymouth Circle, Lansdale, Pennsylvania 19446, Estados Unidos de América).

4

Solicito expresamente a nombre de la sociedad
JANSSEN PHARMACEUTICA N.V., sociedad
constituida de conformidad con las leyes de Bélgica,
domiciliada en Turnhoutseweg 30, B-B2340 Beerse,
Bélgica, el otorgamiento de Patente para la invención
titulada **" COMPUESTOS DE CARBAMATO
PARA UTILIZAR EN EL TRATAMIENTO DE
PADECIMIENTOS NEURODEGENERATIVOS"**.

Clase: A61K 31/27


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

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención está dirigida a métodos para proveer neuroprotección que comprende la administración a un sujeto que lo necesita
5 de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto seleccionado del grupo que consiste de la Fórmula (I) y la Fórmula (II) ó una sal o éster farmacéuticamente aceptable de las mismas; la Fórmula (I), Fórmula (II), en donde el fenilo es sustituido en X con de uno a cinco átomos de halógeno seleccionados del grupo que consiste en flúor, cloro, bromo y yodo; y X₁, X₂,
10 X₃, X₄, X₅ y X₆ son seleccionados del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo de C₁-C₄, en donde el alquilo de C₁-C₄ es sustituido opcionalmente con fenilo (en donde el fenilo es opcionalmente sustituido con sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en halógeno, alquilo de C₁-C₄, alcoxi de C₁-C₄, amino, nitro y ciano).

15

IVP07-547F

COMPUESTOS DE CARBAMATO PARA UTILIZAR EN EL TRATAMIENTO
DE PADECIMIENTOS NEURODEGENERATIVOS

REFERENCIA CRUZADA PARA LAS SOLICITUDES RELACIONADAS

5

Estas Solicitudes reclaman el beneficio de la Solicitud Provisional de E.U.A Número de Serie 60/619,402 presentada el 12 de julio del 2005, y la Solicitud Provisional de E.U.A Número de Serie 60/698,403 presentada el 12 de julio del 2005. Estas dos solicitudes provisionales están incorporadas por
10 medio de la presente como referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere de forma general a los campos de
15 farmacología, neurología y psiquiatría y a los métodos de protección contra daño o lesión de las células de un sistema nervioso central de mamífero. Más específicamente, la presente invención proporciona los métodos para el uso de determinados compuestos de carbamato para neuroprotección.

20

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las lesiones o traumas de varias clases del sistema nervioso central (CNS) o el sistema nervioso periférico (PNS) que pueden producir

desordenes y síntomas psiquiátricos y/o neurológicos profundos y de larga duración. Una forma que esto puede tomar es la muerte progresiva de las neuronas u otras células del sistema nervioso central (CNS), es decir, la neurodegeneración o degeneración neuronal. La degeneración Neuronal
5 como un resultado de, por ejemplo; la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple, los accidentes vasculares-cerebrales, (CVAs) apoplejía, lesión cerebral traumática, lesiones de la columna vertebral, degeneración del nervio óptico; por ejemplo, degeneración de la retina ó neuropatía óptica isquémica, y otros desordenes del sistema nervioso central es un problema de salud
10 público y médico enorme, en virtud de tanto que, es tanto de incidencia alta como por la frecuencia de las secuelas a largo plazo. Los estudios animales y estudios clínicos han mostrado que el transmisor del aminoácido (de forma especial el glutamato), el esfuerzo de oxidación y las reacciones inflamatorias contribuyen fuertemente a la muerte celular en estas condiciones.

15 A partir del insulto por lesión o por isquemia, las neuronas dañadas liberan cantidades masivas del glutamato neurotransmisor, el cual es excitotóxico para las neuronas circundantes (Choi et al., (1988), Neuron 1: páginas 623 a 634; Rothman et al., (1984), J Neurosci. 4: páginas 1884 a 1891; Choi y Rothman. (1990), Ann. Rev. Neurosci. 13: páginas 171 a 182;
20 David et al., (1988), Exp. Eye Res. 46 Páginas 657 a 662; Drejer et al., (1985), J. Neurosci. 45: páginas 145 a 151. El Glutamato es un aminoácido cargado de forma negativa que es un transmisor sináptico excitativo en el sistema nervioso de los mamíferos. Aunque la concentración de glutamato

puede alcanzar el rango milimolar en las terminales nerviosas su concentración extracelular es mantenida a un nivel bajo para evitar la neurotoxicidad. Se ha observado que el glutamato puede ser tóxico para las neuronas si se presentó en una concentración alta. El término "excitotoxicidad" ha sido utilizado para describir el efecto citotóxico que el glutamato (y otros aminoácidos excitativos semejantes) puede tener en las neuronas cuando se aplicaron en dosis altas.

Fisiológicamente, la liberación excesiva, la inhibición de extracción, o ambas pueden lograr niveles de glutamato altos. De forma normal, una concentración de glutamato extracelular baja es mantenida en tanto por las neuronas como los astrocitos. Las neuronas almacenan glutamato en depósitos intracelulares y regulan su liberación. Véase la publicación de Reagan, R.F., Excitotoxicity and Central Nervous System Trauma, in The Neurobiology of Central Nervous Trauma, Nueva York, Oxford University Press, (1994), páginas 173 a 181 (Salzman SK, Faden AI, eds). Los astrocitos absorben el glutamato extracelular mediante transportadores específicos y convierten el glutamato en glutamina que es entonces liberada para la extracción neuronal. Véase la publicación de Robinson, M.B. & Dowd LA, Adv Pharmacol. (1997); 37: paginas 69 a 115. En el proceso de la excitotoxicidad, el glutamato es liberado en una manera que se auto-perpetua en las neuronas, que resulta en la activación prolongada o excesiva de los receptores de glutamato.

La conjunción de dicha estimulación excesiva de glutamato en las neuronas de energía-reducida tomada con la capacidad comprometida de los astrositos de soporte neuronal para aislar los niveles tóxicos del glutamato extracelular conduce a la muerte neuronal mediante necrosis y apoptosis.

- 5 Varias intervenciones son actualmente examinadas para reducir la muerte neuronal asociada con las enfermedades y lesiones del sistema nervioso central. Véase la publicación de Kermer et al., *Cell Tissue Res* 298: paginas 383 a 395, (1999). Dichas terapias incluyen a los inhibidores de liberación de glutamato, el antagonistas receptores de glutamato, bloqueadores de canales
- 10 Ca^{2+} , agonistas receptores de GABA, gangliósidos, factores neurotróficos, exhibidores de calpaina, inhibidores de caspasa, colectores de radicales libres, moduladores e inmunomoduladores de metabolismo celular.

- Por ejemplo, diversos estudios han mostrado la participación del glutamato en la patofisiología de: 1) enfermedad de Huntington (HD) (Coyle
- 15 and Schwartz, (1976) *Nature* 263: páginas 244 a 246; 2) enfermedad de Alzheimer (AD) (Maragos et al, (1987), *TINS* 10; páginas 65 a 68; 3) Epilepsia (Nadler et al., (1978), *Nature* 271: páginas 676 a 677; 4) latirismo (Spencer et al., (1986), *Lancet* 239: paginas 1066 a 1067; 5) esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y demencia Parkinsoniana de Guam (Caine et al., (1986), *Lancet* 2:
- 20 páginas 1067 a la 1070) así como también en la neuropatología asociada con apoplejía, la reperusión e isquemia (véase la publicación de Dykens et al., (1987), *J. Neurochem.* 49: páginas 1222 a 1228).

Por lo tanto, la lesión en neuronas puede ser causada por la sobre-estimulación de los receptores mediante aminoácidos excitativos incluyendo glutamato y aspartato. (Véase la publicación de Lipton et al. (1994) *New Engl. J Med.* 330: paginas 613 a 621). Ciertamente, el subtipo de N-metil-D-aspartato (NMDA) del receptor de glutamato está sugerido para tener papeles muy importante en la función normal del cerebro, que incluye la transmisión sináptica, aprendizaje y memoria, y el desarrollo neuronal (Véase la publicación de Lipston et al. (1994) *supra*; Meldrum et al. (1990) *Trends Pharm. Sci.* 11: páginas 379 a 387). Sin embargo, la sobre-estimulación del subtipo NMDA de receptor glutamato que conduce a incrementar la producción de radicales libres y la muerte celular neuronal, la cual puede ser modulada mediante antioxidantes. (Véase la publicación de Herin et al. (2001) *J Neurochem.* 78: páginas 1307 a 1314; Rossato et al. (2002) *Neurosci. Lett.* 318: páginas 137 a 140).

Además, en muchas condiciones neurodegenerativas crónicas, inflamación y esfuerzo de oxidación son componentes claves de la patología. Estas condiciones incluyen la enfermedad del Alzheimer (AD). La enfermedad de Alzheimer (AD) está caracterizada por la acumulación de complicaciones neurofibrilares y placas seniles, y una extensa degeneración progresiva de las neuronas en el cerebro. Las placas seniles que son ricas en proteína precursora amiloidea (APP) que está codificada por el gen APP localizado en el cromosoma 21. Una hipótesis aceptada de forma común subyacente a la patogénesis de AD es que la hendidura proteolítica anormal de APP conduce

a un exceso de acumulación extracelular de péptido beta-amiloideo ($A\beta$) que ha mostrado ser tóxico para las neuronas. (Véase la publicación de Selkoe et al., (1996), J. Biol. Chem, 271: paginas 487 a 498; Quinn et al., (2001), Exp. Neurol. 168: paginas 203 a 212; Mattson et al., (1997), Alzheimer Dis. Rev. 5 12: paginas 1 a 14; Fakuyama et al., (1994) Brain Res. 667: páginas 269 a 272).

La enfermedad de Parkinson (PD) es un padecimiento neurodegenerativo progresivo caracterizado por una disfunción de movimiento que consiste de aquinésia, rigidez, movimiento y deformidad de postura. Esta 10 enfermedad ha sido asociada con la pérdida de integridad neuronal dopaminérgica nigro-estriatal y la forma que funciona como se evidenció mediante la perdida sustancial de neuronas dopaminérgicas en los pares de sustancia nigra compacta (SNpc) (Véase la publicación de Pakkenberg et al., (1991) J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. 54: paginas 30 a 33), y una 15 disminución en un contenido, de transportadores sinápticos y vesiculares de dopamina en el estriatum. (Véase, por ejemplo, la publicación de Guttman et al., (1997) Neurology 48: paginas 1578 a 1583).

La muerte de las neuronas y de las células de soporte en el sistema nervioso central (CNS) o periférico (PNS) de mamíferos que incluye 20 humanos como un resultado del trauma, lesión de muchas clases, isquemia, trastorno metal metabólico, por ejemplo, hipoxia por diabetes, toxinas o la intervención quirúrgica provoca tanto la discapacidad como la pérdida de la función progresiva aguda y crónica. Por lo tanto, existe una necesidad para el

desarrollo de los métodos y compuestos que pueden proteger las células del sistema nervioso en mamíferos de esta degeneración, es decir, neuroprotección.

5

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en general a los métodos neuroprotectores, y más específicamente, a los métodos y compuestos para la prevención de daño a las células del sistema nervioso periférico y central de mamíferos que resulta de las lesiones, traumas, cirugía ó en el proceso de enfermedades crónicas o agudas.

La presente invención está basada, en parte, en el descubrimiento que la administración de uno o más miembros de una familia de compuestos de carbamato, ya sea solo o en combinación con uno o más de otros medicamentos neuroprotectores proporcionan un efecto neuroprotector en el sistema nervioso de los mamíferos.

La neuroprotección proporcionada por la presente invención, incluye la protección del daño que resulta de la lesión o insulto neural y de la neurotoxicidad, que incluye excitotoxicidad. Por lo tanto, la neuroprotección proporcionada por la presente invención será útil en el tratamiento de padecimientos neurodegenerativos crónicos y agudos que pueden involucrar la excitotoxicidad, por ejemplo, la excitotoxicidad de glutamato, que incluye la isquemia/apoplejía, trauma quirúrgico, lesión cerebral traumática (TBI), trauma

de cabeza áspero, cerrado, o penetrante, epilepsia, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), neuropatía diabética y encefalopatía hipoglucémica.

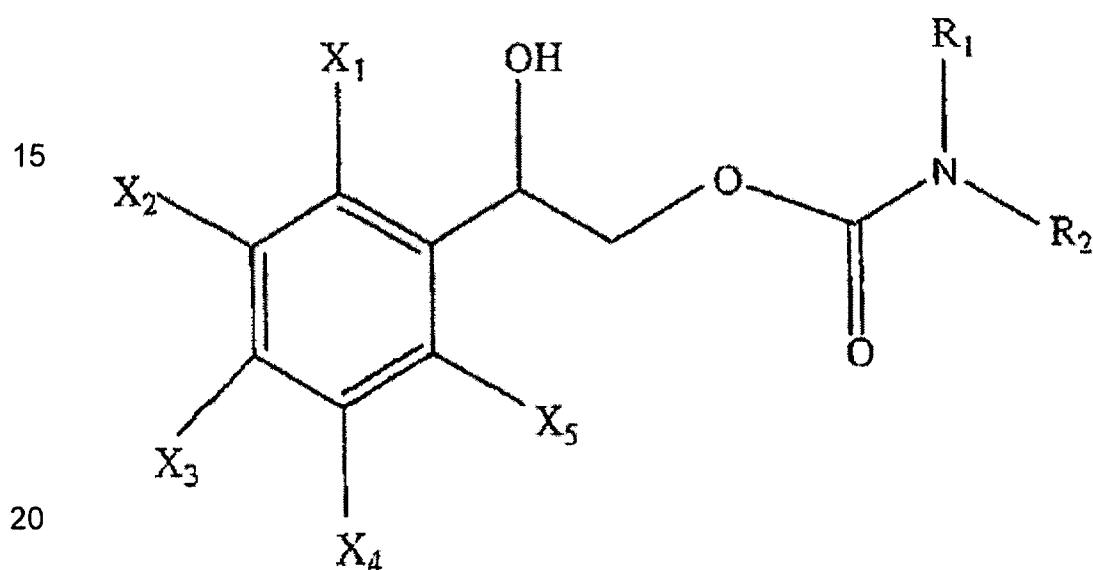
La neuroprotección proporcionada por la presente invención
5 puede ser producida bajo tejido lesionado o enfermo o en una manera preventiva previa a o durante los eventos que se espera conduzcan a un insulto neural.

La presente invención proporciona los métodos para proporcionar la neuroprotección; para inhibir la degeneración celular o muerte
10 celular; para tratamiento o profilaxis de una enfermedad neurodegenerativa; o para mejorar el efecto citotóxico de un compuesto (por ejemplo, un aminoácido excitativo, tal como glutamato; una toxina; o un compuesto profiláctico o terapéutico que ejerce un efecto secundaria citotóxico) en un sujeto en la necesidad del mismo, administrando al sujeto una cantidad
15 efectiva de un compuesto de la presente invención o su sal o éster farmacéuticamente aceptable ya sea solo o en combinación con otro medicamento junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable. En diversas modalidades, los métodos de la invención incluyen protección contra excitotoxicidad, por ejemplo, excitotoxicidad glutamática.

20 En diversas modalidades, el sujeto, por ejemplo, un humano, puede estar padeciendo de insulto o lesión neural; o puede estar padeciendo de una condición seleccionada de abuso de sustancias, trauma, apoplejía, isquemia, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad

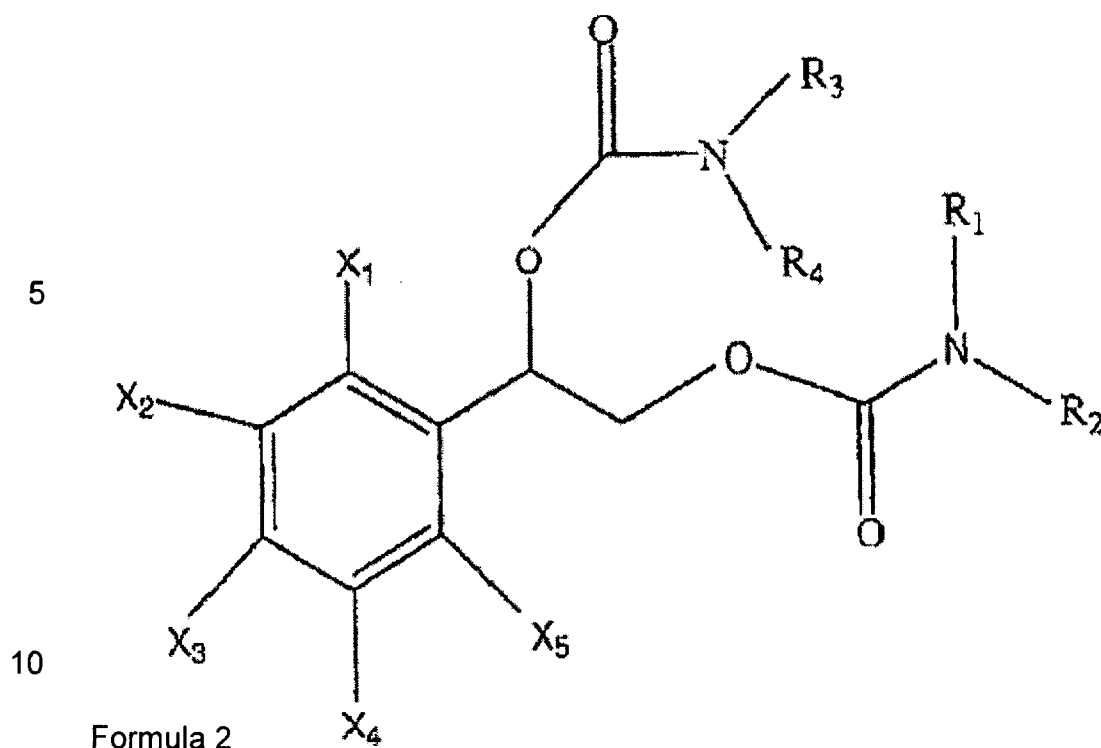
Parkinson, enfermedad de de prion, enfermedad variante de Creutzfeld/Jacob, encefalopatía amiotrófica o hipoglucémica; o puede estar experimentando una cirugía u otra intervención. El sujeto puede tener una condición ya existente que se puede beneficiarse mediante la neuroprotección o el paciente
5 puede ser tratado para reducir los efectos del deterioro de una lesión neural subsiguiente o simultánea, tal como puede ocurrir durante una cirugía u otra intervención.

Por consiguiente, la presente invención proporciona los métodos para proporcionar neuroprotección que comprenden administrar a un sujeto
10 que lo necesita, una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende por lo menos un compuesto que tiene la Formula 1 ó la Formula 2



Fórmula 1

10



en donde R_1 , R_2 , R_3 y R_4 , son, de forma independiente, hidrogeno ó alquilo de C_1 - C_4 ; y X_1 , X_2 , X_3 , X_4 y X_5 son, de forma independiente, hidrógeno, flúor, cloro, bromo o yodo. Dicho grupo alquilo de

15 C_1 - C_4 de la Formula 1 ó la Formula 2 pueden ser substituido o no substituido. En un aspecto de la presente invención, el grupo alquilo de C_1 - C_4 es substituido con un grupo fenilo. El grupo fenilo puede ser substituido o no substituido. En determinadas modalidades, el grupo fenilo es substituido o no substituido con halógeno, alquilo de C_1 - C_4 , alcoxi de C_1 - C_4 , amino, nitro, o

20 ciano.

En la presente invención, X_1 , X_2 , X_3 , X_4 y X_5 puede ser hidrógeno, flúor, cloro, bromo o yodo. En determinadas modalidades, X_1 , X_2 , X_3 , X_4 y X_5 son de forma independiente, hidrógeno o cloro. En una modalidad

preferida de la presente invención, X_1 es flúor, cloro, bromo o yodo. En un aspecto, X_1 es cloro y X_2 , X_3 , X_4 y X_5 son de forma independiente, hidrógeno. En otra modalidad preferida, R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son de forma independiente hidrógeno.

- 5 La presente invención proporciona enantiómeros de la Formula 1 ó la Formula 2 para proporcionar neuroprotección en un sujeto. En determinadas modalidades, un compuesto de la Formula 1 ó de la Formula 2 estará en la forma de un enantiómero simple del mismo. En otras modalidades, un compuesto de la Formula 1 ó Formula 2 estará en la forma
- 10 de una mezcla enantiomérica en la cual un enantiómero predomina con respecto a otro enantiómero. En un aspecto, el enantiómero predominará hasta el alcance del 90% o mayor o hasta el alcance del 98% o mayor.

La presente invención también proporciona los métodos que comprenden administrar a un sujeto una cantidad neuroprotectora de una

15 composición que comprende por lo menos un compuesto que tiene la Formula 1 ó la Formula 2 en donde R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son de forma independiente, hidrógeno ó alquilo de C_1 - C_4 ; y X_1 , X_2 , X_3 , X_4 y X_5 son de forma independiente, hidrógeno, flúor, cloro, bromo ó yodo. En una modalidad, antes de la administración de la composición al sujeto, se realizará una determinación

20 sobre si el sujeto padece o no de alguna forma de neurodegeneración aguda o crónica o lesión del sistema nervioso.

La presente invención también proporciona los métodos que comprenden, identificar a un paciente en riesgo de desarrollar la

neurodegeneración aguda o crónica o lesión del sistema nervioso o un paciente en necesidad del tratamiento con un fármaco neuroprotector (NPD), como se define a continuación y que se le administre una composición que comprende por lo menos un compuesto que tiene la Formula 1 ó la Formula 2

5 al sujeto.

En determinadas modalidades de la presente invención, una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto que tiene la Formula 1 ó la Formula 2 para proporcionar neuroprotección es la dosis desde aproximadamente 1.0 mg/Kg hasta aproximadamente la dosis de 150mg/Kg.

10 En un humano de 70 kg., esto puede corresponder a una dosis diaria desde aproximadamente 70 mg/día hasta aproximadamente 10,500 mg/día.

En determinadas modalidades una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica para proporcionar neuroprotección comprende uno o más de los enantiómeros de la presente invención o un

15 éster o sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable es administrado a un sujeto o paciente con la necesidad de tratamiento con un fármaco neuroprotector ó NPD.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden por lo menos un compuesto que tiene la Formula 1 y la Formula 2 son administrados los a

20 sujetos que los necesitan. En determinadas modalidades, un sujeto o paciente con necesidad del tratamiento con un fármaco neuroprotector ó NPD puede ser uno que ha experimentado alguna forma de trauma agudo o lesión en las células del sistema nervioso periférico o central o quien tiene alguna

forma de padecimiento neurodegenerativo crónico o agudo. En un aspecto, el sujeto o paciente será determinado por estar en riesgo de desarrollar un padecimiento neurodegenerativo crónico o agudo en el momento de la administración, es decir, un paciente en necesidad de tratamiento con un fármaco neuroprotector. En otras modalidades, un sujeto que necesita el mismo es un sujeto el cual tiene lesión o trauma agudo en las células de su sistema nervioso en el momento de administración.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

10

La Figura 1, es una gráfica que muestra los efectos de dosis incrementadas de TC en el número de neuronas en áreas diferentes del hipocampo contadas a los 14 días después del li-pilo SE. Los valores son expresados como el número de cuerpos celulares neuronales en dicha área de interés $\pm$ S.E.M.

15

La Figura 2, es una gráfica que muestra los efectos de dosis incrementadas de TC en el número de neuronas en diferentes núcleos de la amígdala contada a los 14 días después de li-pilo SE. Los valores son expresados como el número de cuerpos celulares neuronales en cada área de interés $\pm$ S.E.M.

20

La Figura 3, es una gráfica que muestra los efectos de dosis incrementadas de TC en el número de neuronas en núcleos diferentes del tálamo contadas a los 14 días después de li-pilo SE. Los valores son

expresados como el número de cuerpos celulares neuronales en cada área de interés $\pm$ S.E.M.

La Figura 4, es una gráfica que muestra los efectos de dosis incrementadas de TC en el número de neuronas en áreas diferentes de la corteza contadas a los 14 días después de li-pilo SE. Los valores son expresados como el número de cuerpos celulares neuronales en cada área de interés $\pm$ S.E.M.

La Figura 5, es una gráfica que muestra los efectos de dosis incrementadas de TC en el estado latente para la primera convulsión espontánea. Los valores son expresados como la latencia media en días para cada grupo $\pm$ S.E.M.

La Figura 6, es una gráfica que muestra los efectos de dosis incrementadas de TC en las frecuencias de convulsiones espontáneas grabadas en video durante un período de 4 semanas. Los valores son expresados como el número medio de convulsiones $\pm$ S.E.M. El total representa el número total de convulsiones observadas durante las 4 semanas de video grabación y la media representa el número medio de convulsiones por semana. La prueba Anova demostró un efecto del tratamiento en el número total de convulsiones ($p=0.045$) y el número medio de las convulsiones por semana ($p=0.045$).

La Figura 7, muestra en número total de convulsiones grabadas en video para cuatro semanas graficadas de acuerdo con el período de latencia para la primera convulsión espontánea (SL = período de latencia

corto, LL = período de latencia largo). Los valores son expresados como el número medio de las convulsiones para cada subgrupo $\pm$ S.E.M. La prueba ANOVA no mostró efecto significativo alguno del tratamiento.

La Figura 8, muestra la correlación entre el período de latencia para la primera convulsión espontánea y el número total de convulsiones observadas durante las cuatro semanas siguientes.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

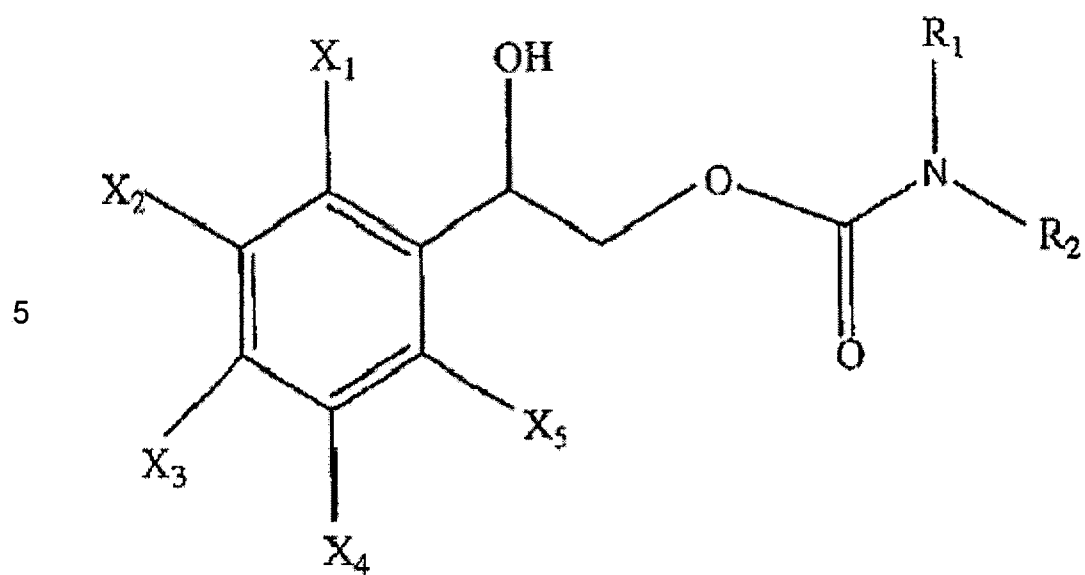
Los compuestos de carbamato de la presente invencion

La presente invención provee métodos para utilizar determinados monocarbamatos y dicarbamatos de 2-fenil-1,2-etanodiol para proveer neuroprotección a mamíferos que la necesitan.

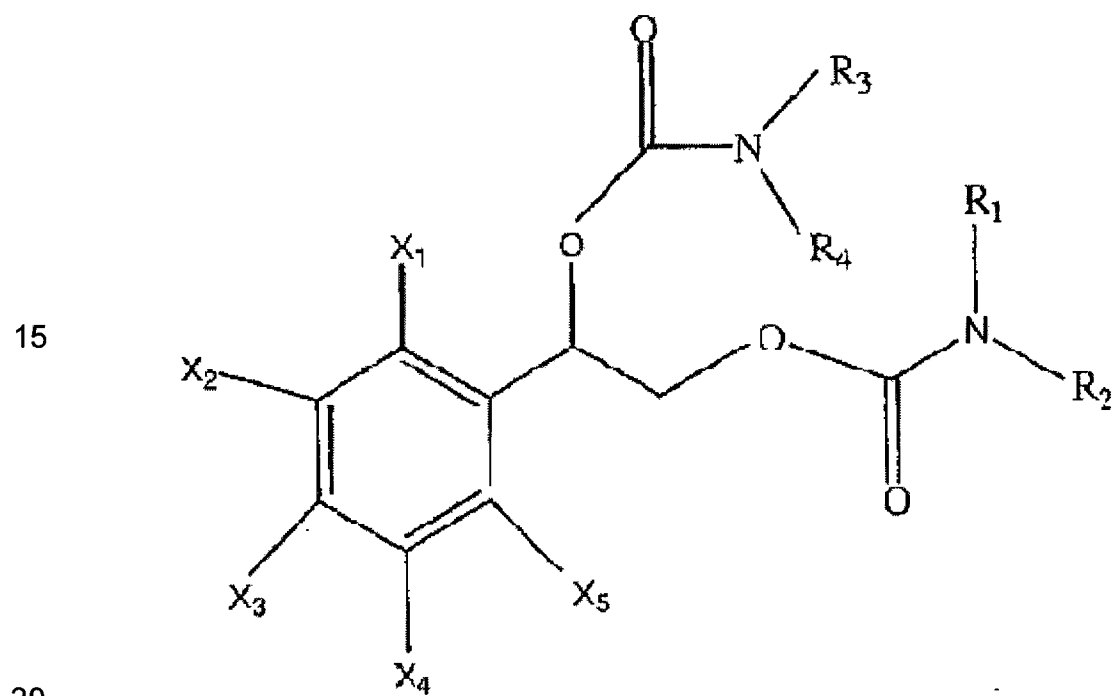
Los métodos adecuados para sintetizar y purificar los compuestos de carbamato, que incluyen enantiómeros de carbamato, utilizados en los métodos de la presente invención son bien conocidos para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, las formas enantioméricas puras y las mezclas enantioméricas de monocarbamatos y dicarbamatos de 2-fenil-1,2-etanodiol se describen en las Patentes de E.U.A. Nos. 5,854,283, 5,698,588 y 6,103,759, cuyas descripciones están incorporadas en la presente descripción como referencia en su totalidad.

Los compuestos de carbamato representativos de acuerdo con la presente invención incluyen aquellos que tienen la Fórmula 1 o la Fórmula 2:

16



10 Fórmula 1



Fórmula 2

En donde R_1 , R_2 , R_3 y R_4 , son, de manera independiente, hidrógeno o alquilo de C_1 - C_4 , y X_1 , X_2 , X_3 , X_4 y X_5 son, de manera independiente, hidrógeno, flúor, cloro, bromo o yodo.

El término "alquilo de C_1 - C_4 " como se utiliza en la presente, se
5 refiere a hidrocarburos alifáticos sustituidos o no sustituidos que tienen de 1 a 4 átomos de carbono. Incluidos de manera específica dentro de la definición de "alquilo" están aquellos hidrocarburos alifáticos que son opcionalmente sustituidos. En una modalidad preferida de la presente invención, el alquilo de C_1 - C_4 , es ya sea, sustituido o no sustituido con fenilo.

10 El término "fenilo" como se utiliza en la presente, ya sea utilizado solo o como parte de otro grupo está definido como un grupo de anillo de hidrocarburo aromático que tiene 6 átomos de carbono. Incluidos de manera específica dentro de la definición de "fenilo" están aquellos grupos fenilo que son opcionalmente sustituidos. Por ejemplo, en una modalidad preferida de la
15 presente invención, el grupo "fenilo" es, ya sea sustituido o no sustituido con halógeno, alquilo de C_1 - C_4 , alcoxi de C_1 - C_4 , amino, nitro o ciano.

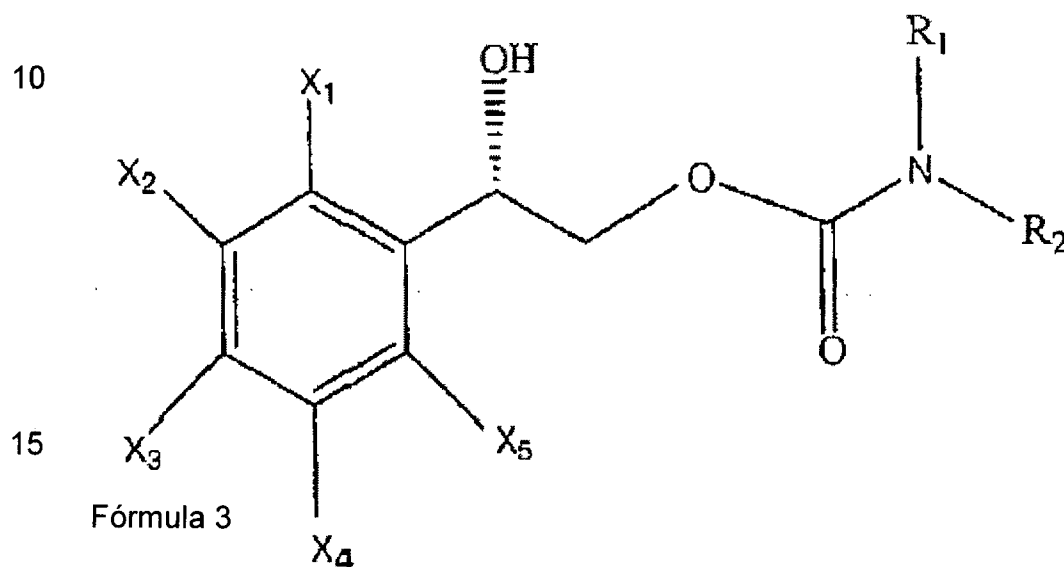
En una modalidad preferida de la presente invención, X_1 , es flúor, cloro, bromo o yodo y X_2 , X_3 , X_4 y X_5 son hidrógeno.

En otra modalidad preferida de la presente invención, X_1 , X_2 , X_3
20 X_4 y X_5 son de manera independiente cloro o hidrógeno.

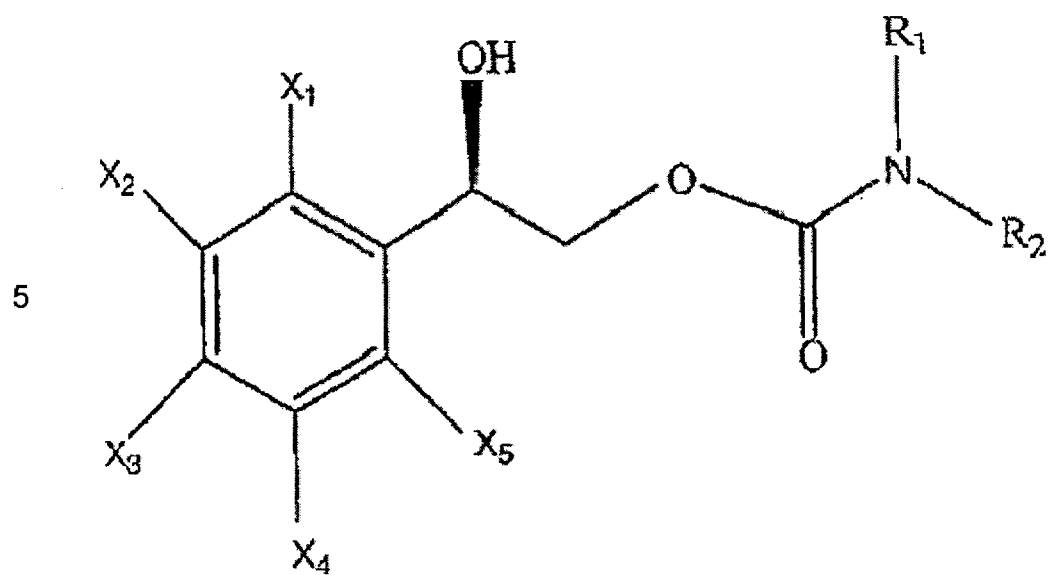
En otra modalidad preferida de la presente invención, R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son todas, hidrógeno.

Se debe comprender que los sustituyentes y patrones de sustitución en los compuestos de la presente invención pueden ser seleccionados por un experto en la materia para proveer los compuestos que son estables en forma química y que pueden ser sintetizados fácilmente mediante las técnicas conocidas en la materia, así como también los métodos provistos en la presente.

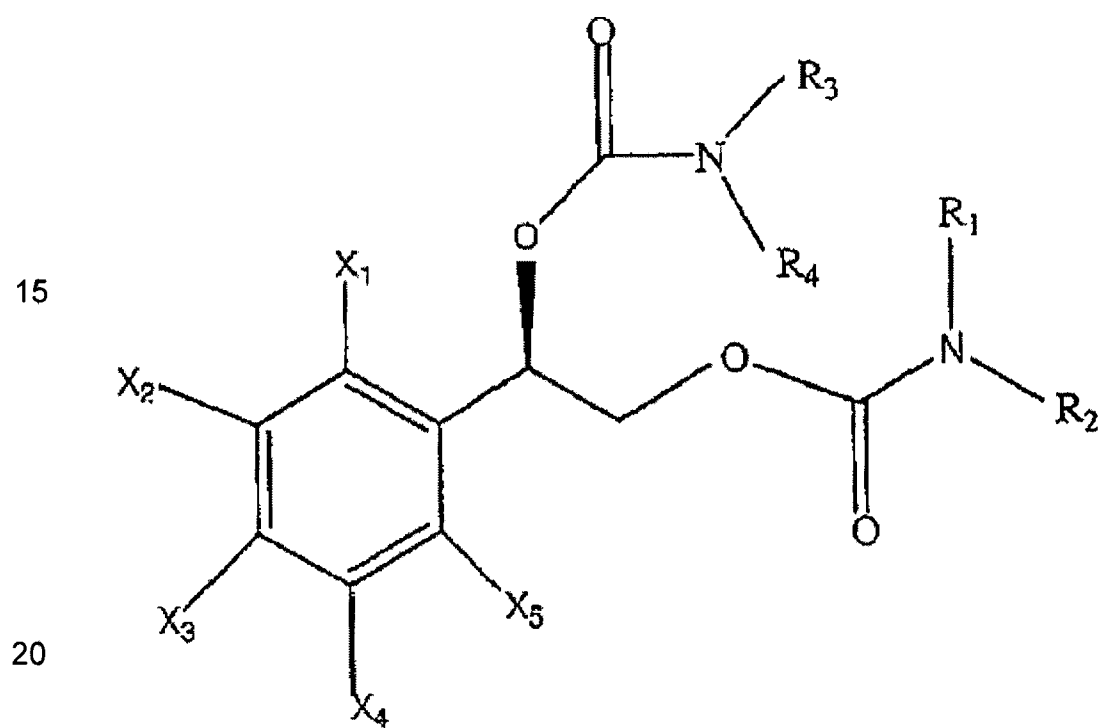
Los monocarbamatos y dicarbamatos de 2-fenil-1, 2-etanodiol representativos, incluyen, por ejemplo, a los siguientes compuestos.



19

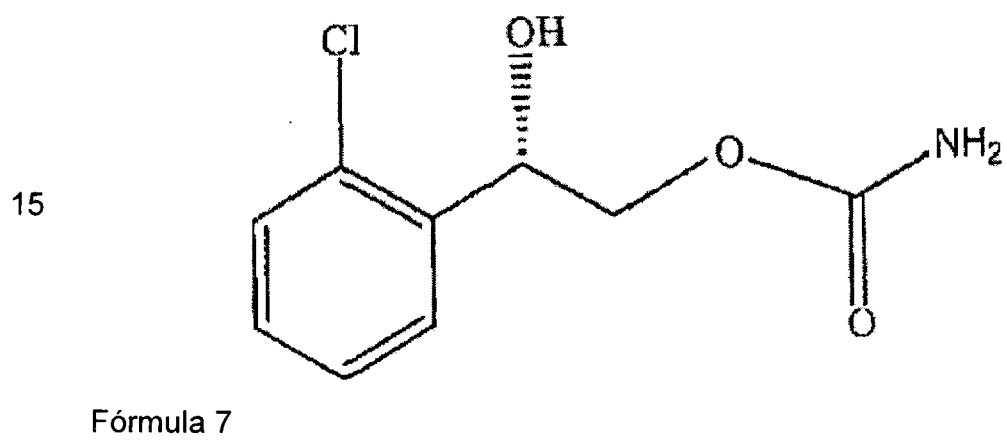
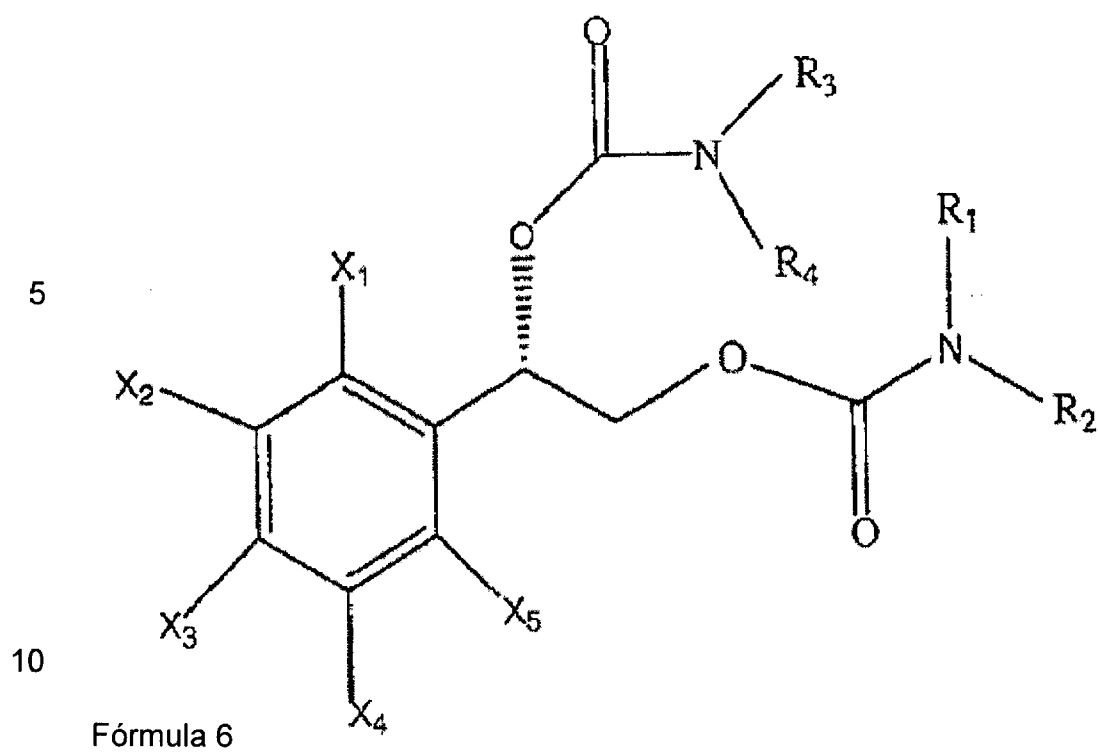


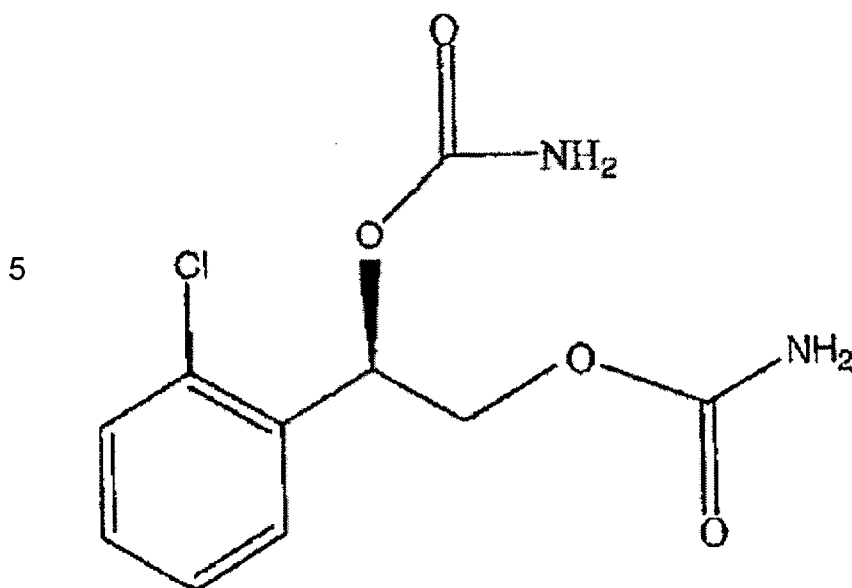
10 Fórmula 4



Fórmula 5

20





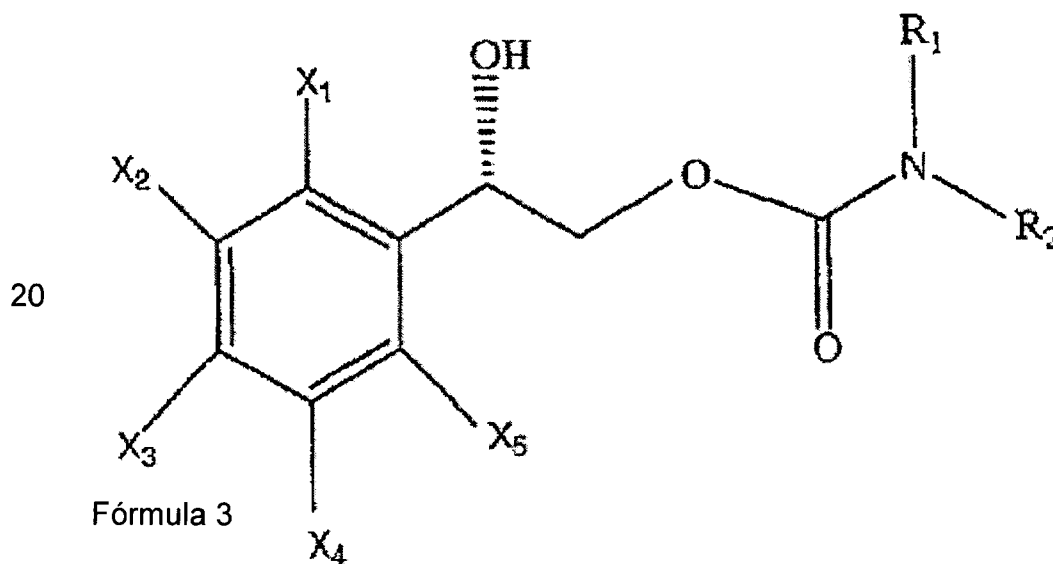
Fórmula 8

La presente invención incluye el uso de enantiómeros aislados de la Fórmula 1 ó la Fórmula 2. En una modalidad preferida, una composición farmacéutica que comprende el enantiómero S aislado de la Fórmula es utilizada para proveer neuroprotección en un sujeto. En otra modalidad preferida, una composición farmacéutica que comprende el enantiómero R aislado de la Fórmula 2 es utilizada para proveer neuroprotección en un sujeto. En otra modalidad, una composición farmacéutica comprende el enantiómero S aislado de la Fórmula 1 y el enantiómero R aislado de la Fórmula 2 se pueden utilizar para proveer neuroprotección en un sujeto.

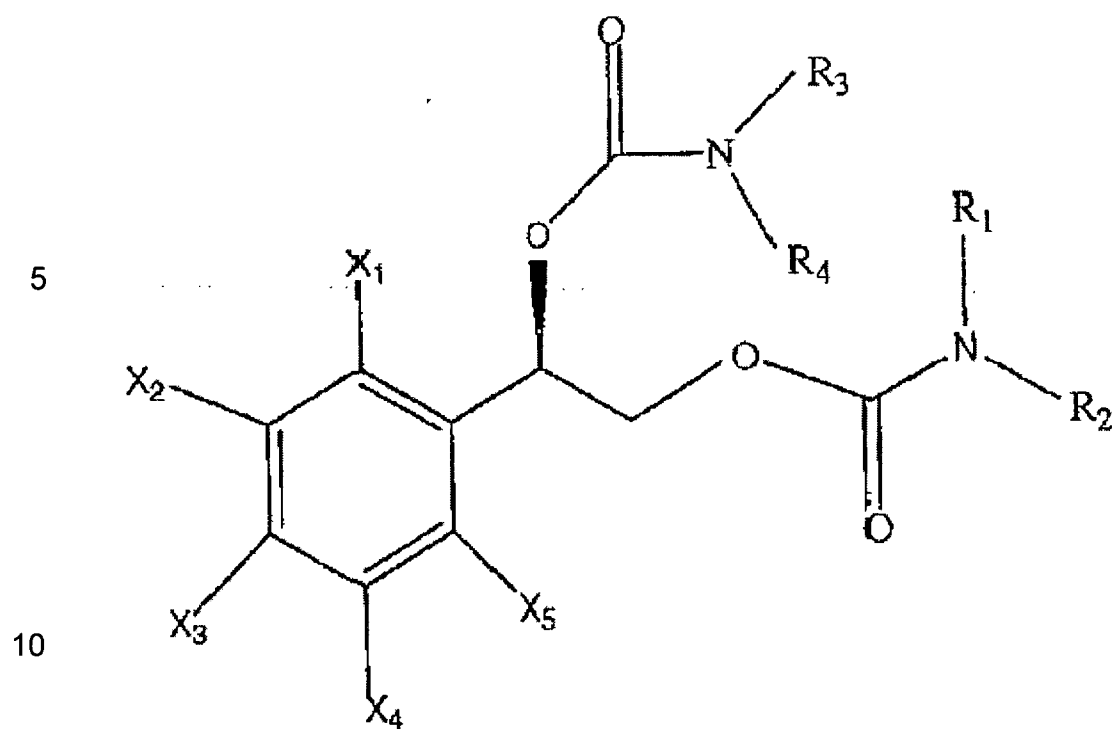
La presente invención incluye también el uso de mezclas de enantiómeros de la Fórmula 1 ó la Fórmula 2. En un aspecto de la presente invención, un enantiómero predominará. Un enantiómero que predomina en

la mezcla es uno que está presente en la mezcla en una cantidad mayor que cualquier otro de los enantiómeros presentes en la mezcla, por ejemplo, en una cantidad mayor que el 50%. En un aspecto, un enantiómero predominará hasta un alcance del 90% o hasta un alcance del 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 5 96%, 97% ó 98% o mayor. En una modalidad preferida, el enantiómero que predomina en una composición que comprende un compuesto de la Fórmula 1 es el enantiómero S de la Fórmula 1. En otra modalidad preferida, el enantiómero que predomina en una composición que comprende un compuesto de la Fórmula 2 es el enantiómero R de la Fórmula 2.

10 En una modalidad preferida de la presente invención, el enantiómero que está presente como el enantiómero único o como el enantiómero predominante en una composición de la presente invención es representado por la Fórmula 3 ó la Fórmula 5, en donde X_1 , X_2 , X_3 , X_4 y X_5 , R_1 , R_2 , R_3 y R_4 , son como se definieron anteriormente, o por la Fórmula 7 ó la 15 Fórmula 8.

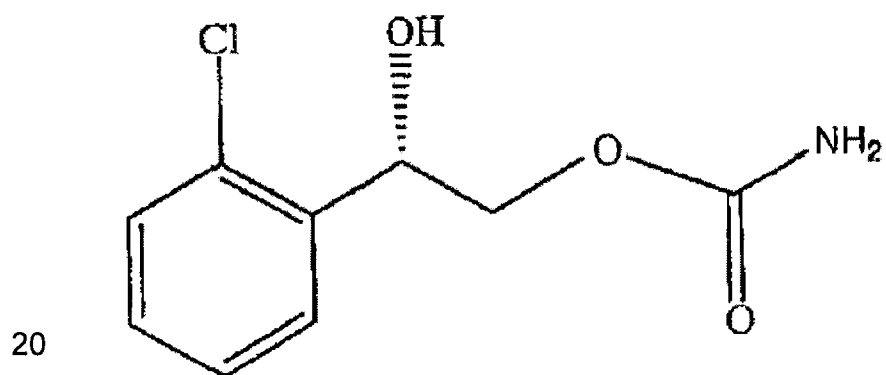


23

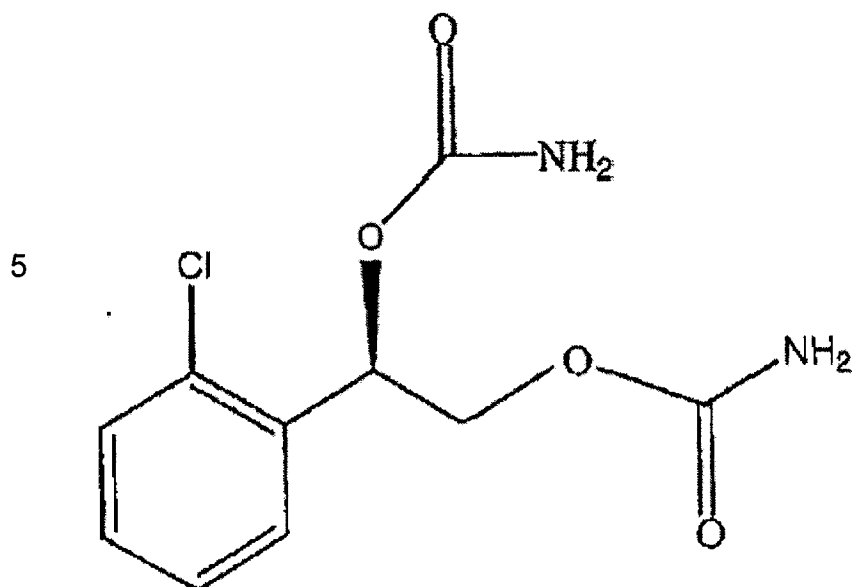


Fórmula 5

15



Fórmula 7



Fórmula 8

La presente invención provee métodos para el uso de enantiómeros y mezclas enantioméricas de los compuestos representados por la Fórmula 1 y la Fórmula 2. Un enantiómero de carbamato de la Fórmula 1 ó
15 la Fórmula 2 contiene un carbono quiral asimétrico en la posición bencílica, el cual es el carbono alifático adyacente al anillo de fenilo.

Un enantiómero que es aislado es uno que es substancialmente libre del enantiómero correspondiente. Por lo tanto, un enantiómero aislado se refiere a un compuesto que es separado por medio de técnicas de
20 separación o es preparado libre del enantiómero correspondiente. La forma "substancialmente libre", como se utiliza en la presente, significa que el compuesto está elaborado con hasta una proporción significativamente mayor de un enantiómero. En las modalidades preferidas, el compuesto incluye por

lo menos aproximadamente el 90% por peso de un enantiómero preferido. En otras modalidades de la presente invención, el compuesto incluye por lo menos aproximadamente el 99% por peso de un enantiómero preferido. Los enantiómeros preferidos pueden ser aislados a partir de mezclas racémicas
5 mediante cualquier método conocido por aquellos expertos en la materia, que incluyen cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) y la formación y cristalización de sales quirales, o los enantiómeros preferidos pueden ser preparados mediante los métodos descritos en la presente.

Los métodos para la preparación de los enantiómeros preferidos
10 podrían ser conocidos por un experto en la materia y están descritos, por ejemplo, en las publicaciones de Jacques, et al., Enantiomers, racemates and resolutions (Wiley interscience, Nueva York, 1981); Wilen, S.H., et al, Tetrahedron 33: página 2725 (1977); Eliel, E.L. Stereochemistry of carbon compounds (McGraw-Hill, NY, 1962); y Wilen S.H., Tables of resolving agents
15 and optical resolutions p. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. Of Notre Dame Press, Notre Dame, IN 1972).

Adicionalmente, los compuestos de la presente invención pueden ser preparados como se describió en la Patente de E.U.A. No. 3,265,728 (la descripción de la cual está incorporada en la presente como
20 referencia en su totalidad y para todos los propósitos), 3,313,692 (la descripción de la cual está incorporada en la presente como referencia en su totalidad y para todos los propósitos) y las Patentes de E.U.A. Nos. 5,854,283; 5,698,588 y 6,103,759 a las que se hizo referencia anteriormente

(las descripciones de las cuales están incorporadas en la presente como referencia en su totalidad y para todos los propósitos).

La naturaleza de la neuroproteccion

5 Los pacientes con lesión o daño de cualquier tipo al sistema nervioso central (CNS) o periférico (PNS) que incluyen a la retina pueden beneficiarse de estos métodos de neuroprotección. Esta lesión al sistema nervioso puede tomar la forma de un insulto abrupto o una lesión aguda al sistema nervioso está en, por ejemplo, los padecimientos neurodegenerativos
10 agudos que incluyen, aunque no están limitados a: lesión aguda, hipoxia-isquémica o la combinación de los mismos que tiene como resultado la muerte celular neuronal o la comprometen. La lesión aguda incluye, aunque no está limitada a, Lesión cerebral traumática (TBI) que incluye, trauma cerebral cerrado, brusco o penetrante, trauma cerebral local, daño cerebral difuso,
15 lesión de la médula espinal, lesiones intracraneales o intravertebrales (que incluyen, aunque no están limitadas a lesiones de contusión, penetración, corte, compresión o laceración de la médula espinal o síndrome de hiperextensión de infante sacudido.

Además, la privación de suministro de oxígeno o sangre en
20 general puede producir una lesión aguda como en el caso de la hipoxia y/o isquemia que incluye, aunque no está limitado a, insuficiencia cerebrovascular, isquemia cerebral o infarto cerebral (que incluye isquemia cerebral o infartos que se originan a partir de la oclusión embólica o trombosis,

isquemia retinal (diabética o de otra forma), glaucoma, degeneración retinal, esclerosis múltiple, neuropatía óptica tóxica e isquémica, reperfusión después de la isquemia aguda, lesión hipóxica-isquémica perinatal, paro cardíaco o hemorragia intracraneal de cualquier tipo (incluyendo, aunque sin limitarse a, 5 hemorragia epidural, subdural subaracnoide o intracerebral).

El trauma o lesión a los tejidos del sistema nervioso también puede tomar la forma de padecimientos neurodegenerativos más crónicos y progresivos, tales como aquellos asociados con la muerte o compromiso celular neuronal durante un período de tiempo que incluye, aunque no está 10 limitado a, enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Pick, enfermedad de cuerpos de Lewy difusa, parálisis supranuclear progresiva (síndrome de Steel-Richardson) degeneración multisistema (síndrome de Shy-Drager), condiciones epilépticas crónicas asociadas con la neurodegeneración, enfermedades de neuronas motoras (esclerosis lateral amiotrófica), esclerosis 15 múltiple, ataxias degenerativas, degeneración basal cortical, complejo ALS-de Parkinson-Demencia de Guam, panencefalitis esclerosante subaguda, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, sinucleinopatías (que incluyen atrofia de sistema múltiple), afasia progresiva primaria, degeneración striatonigral, enfermedad de Machado-Joseph o ataxia espinocerebelar tipo 3 20 y degeneraciones olivopontocerebelar, parálisis bulbar y pseudobulbar, atrofia muscular espinal y espinobulbar (enfermedad de Kennedy), esclerosis lateral primaria, paraplejia espástica familiar, enfermedad de Werdnig-Hoffman, enfermedad de Kugelberg-Welander, enfermedad de Tay-Sack, enfermedad

de Sandhoff, enfermedad espástica familiar, enfermedad de Wohlfart-Kugelberg-Welander, paraptesis espástica, leucoencefalopatía multifocal progresiva, disautonomía familiar (síndrome de Riley-Day) o enfermedades de Prion (incluyendo, aunque sin limitarse a enfermedad de Creutzfeld-Jakob, 5 enfermedad de Gerstmann-Strussler-Scheinker, enfermedad de Kuru o insomnio familiar fatal).

Además, el trauma o lesión progresiva al sistema nervioso puede ocurrir en diversos padecimientos psiquiátricos, que incluyen aunque no se limitan a progresivos, formas de deterioro de desorden Bipolar, o desorden 10 esquizoafectivo o esquizofrenia, desórdenes de control de impulso, desorden obsesivo compulsivo (OCD), cambios de conducta en epilepsia del lóbulo temporal y desórdenes de personalidad.

En una modalidad preferida, los compuestos de la presente invención podrían ser utilizados para proveer neuroprotección en 15 padecimientos que involucran trauma y lesión progresiva del sistema nervioso en diversos padecimientos psiquiátricos. Estos padecimientos podrían ser seleccionados del grupo que consiste en: desorden esquizoafectivo, esquizofrenia, desórdenes de control de impulsos, desorden obsesivo compulsivo (OCD) y desórdenes de personalidad.

20 Además, el trauma o lesión puede tomar la forma de padecimientos asociados con pérdida de memoria palpable y extensiva que incluye pero no está limitado a padecimientos neurodegenerativos asociados con demencia relacionada con la edad, demencia vascular, enfermedad de

materia blanca difusa (enfermedad de Binswanger), demencia de origen endócrino o metabólico, demencia de trauma de cabeza y daño cerebral difuso, demencia pugilística o demencia del lóbulo frontal, que incluye, aunque no está limitada a enfermedad de Pick.

- 5 Otros padecimientos asociados con la lesión neuronal incluyen, aunque no están limitados a, padecimientos asociados con lesión química, tóxica, infecciosa o de radiación del sistema nervioso que incluye la retina, lesión durante el desarrollo fetal, ser prematuro en el momento del nacimiento, isquemia anóxica, lesión de origen hepático, glucémico, urémico, electrolito y
- 10 endócrino, lesión de origen psiquiátrico (incluyendo, aunque sin limitarse a, psicopatología, depresión o ansiedad), lesión a partir de enfermedades periféricas y plexopatías (que incluyen parálisis del plexo) o lesión a partir de neuropatía (que incluye neuropatía seleccionada de neuropatías multifocal, sensorial, motriz, sensorial-motriz, autonómica, sensorial-autonómica o de
- 15 desmielización (que incluyen, aunque no están limitadas a síndrome de Guillian-Barre o poliradiculoneuropatía de desmielinización inflamatoria crónica) o aquellas neuropatías que se originan por infecciones, inflamación, padecimientos inmunes, abuso de fármacos, tratamientos farmacológicos, toxinas, trauma (incluyendo, aunque sin limitarse a traumas por compresión,
- 20 aplastamiento, laceración o segmentación), padecimientos metabólico (que incluyen, aunque sin limitarse a, endócrino o paraneoplástico), enfermedad de Charcot-marie-Tooth (que incluye, aunque sin limitarse a tipo 1a, 1b, 2, 4a ó enlazado de 1-X), ataxia de Friedreich, leucodistrofia metacromática,

enfermedad de Refsum, adrenomieloneuropatía, ataxia-telangiectasia, Djerine-Sottas (incluyendo, aunque sin limitarse a los tipos A ó B), síndrome de Lambert-Eaton o padecimientos de los nervios craneales).

Por lo tanto, el término “neuroprotección” como se utiliza en la presente significará, inhibición, prevención, mejoramiento o reducción de la
5 severidad de la disfunción, degeneración o muerte de las células nerviosas, axones, o sus células de soporte en el sistema nervioso central o periférico de un mamífero, que incluye a un humano. Este incluye el tratamiento o profilaxis de una enfermedad neurodegenerativa; protección contra
10 excitotoxicidad o mejoramiento del efecto citotóxico de un compuesto (por ejemplo, un aminoácido excitativo, tal como glutamato; una toxina; o un compuesto profiláctico o terapéutico que ejerce un efecto secundario citotóxico inmediato o demorado que incluyen, aunque no se limita a, la inducción de apoptosis inmediata o demorada) en un paciente que necesita
15 del mismo.

Por lo tanto, el término “un paciente que necesita del tratamiento con un fármaco neuroprotector (NPD)” como se utiliza en la presente, se referirá a cualquier paciente que actualmente tiene o puede desarrollar cualquiera de los síndromes o padecimientos anteriores, o cualquier
20 padecimiento en el cual, la condición clínica presente o prognosis del paciente podría beneficiarse de proporcionar neuroprotección para evitar el desarrollo, extensión, empeoramiento o resistencia incrementada al tratamiento de cualquier padecimiento neurológico o psiquiátrico.

El término "fármaco antiepiléptico" (AED) se utilizará de manera intercambiable con el término "agente anticonvulsivo", y como se utiliza en la presente, ambos términos se refieren a un agente con la capacidad de inhibir (por ejemplo, evitar, disminuir, detener o invertir) la actividad convulsiva o ictogénesis cuando el agente es administrado a un sujeto o paciente.

El término "tratar" o "tratamiento" como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier índice de éxito en la prevención o mejoramiento de una lesión, patología o condición que incluye cualquier parámetro objetivo o subjetivo, tal como desagravación; reducción; disminución de los síntomas o que hacen de la lesión, patología o condición, más fácil de tolerar para el paciente; disminuyendo el índice de degeneración o deterioro; hacer el punto final de la degeneración menos debilitante; o mejorando un bienestar físico o mental del sujeto. El tratamiento o mejoramiento de síntomas se puede basar en parámetros objetivos o subjetivos; incluyendo los resultados de un examen físico, examen neurológico, y/o evaluaciones psiquiátricas. Por consiguiente, el término "tratar" o "tratamiento" incluye la administración de los compuestos o agentes de la presente invención para proveer neuroprotección. En algunos casos, el tratamiento con los compuestos de la presente invención se realizará en combinación con otros compuestos neuroprotectores ó AED's para evitar, inhibir o detener la progresión de muerte neuronal o daño o disfunción cerebral o hiperexcitabilidad cerebral.

El término "efecto terapéutico" como se utiliza en la presente, se refiere a la provisión efectiva de efectos de neuroprotección para evitar o

reducir al mínimo la muerte o daño o disfunción de las células del sistema nervioso central o periférico del paciente.

El término "una cantidad terapéuticamente efectiva" como se utiliza en la presente significa una cantidad suficiente de uno o más de los
5 compuestos de la presente invención para producir un efecto terapéutico, como se definió anteriormente, en un sujeto o paciente que necesita dicho tratamiento de neuroprotección.

Los términos "sujeto" o "paciente" son utilizados en la presente en forma intercambiable y como se utilizan en la presente significan cualquier
10 mamífero que incluyen, aunque no están limitados a seres humanos, que incluyen un paciente o sujeto humano al cual pueden ser administradas las composiciones de la presente invención. El término mamíferos incluye pacientes humanos y primates no humanos, así como también animales experimentales, tales como conejos, ratas y ratones, y otros animales.

15 En algunas modalidades, los métodos de la presente invención serán utilizados de manera ventajosa para tratar a un paciente que no está padeciendo o no sabe que padece de una condición que es conocida en la materia para ser tratada de manera efectiva con compuestos de carbamato o compuestos neuroprotectores conocidos actualmente o AED's. En estos
20 casos, la decisión de utilizar los métodos y compuestos de la presente invención se realizará con base en la determinación de si el paciente es un "paciente con la necesidad de un tratamiento con un fármaco neuroprotector (NPD)", como ese término fue definido anteriormente.

En algunas modalidades, la presente invención provee métodos de neuroprotección. En determinadas modalidades, estos métodos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de carbamato de la presente invención a un paciente que aún no
5 ha desarrollado signos clínicos o síntomas palpables de lesión o daño a las células del sistema nervioso, aunque puede estar en un grupo de alto riesgo para el desarrollo de daño neuronal debido a la lesión o trauma al sistema nervioso o debido a alguna predisposición conocida ya sea bioquímica o genética o el descubrimiento de un bioindicador verificado de uno o más de
10 estos padecimientos.

Por lo tanto, en algunas modalidades, los métodos y composiciones de la presente invención están dirigidos hacia la neuroprotección en un sujeto que está en riesgo de desarrollar un daño neuronal, aunque no ha desarrollado aún una evidencia clínica. Este
15 paciente, simplemente puede estar en un "riesgo mayor" como fue determinado mediante el reconocimiento de cualquier factor en una historia médica, examen físico o pruebas del paciente o sus familiares, que es indicativo de un riesgo mayor que el promedio para desarrollar daño neuronal. Por lo tanto, esta determinación de que un paciente puede estar en un riesgo
20 mayor mediante cualesquiera métodos disponibles se pueden utilizar para determinar si el paciente deberá ser tratado con los métodos de la presente invención.

Por consiguiente, en una modalidad de ejemplo, el sujeto que se puede beneficiar del tratamiento mediante los métodos y compuestos de la presente invención pueden ser identificados utilizando los métodos de clasificación aceptados para determinar los factores de riesgo para el daño neuronal. Estos métodos de clasificación incluyen, por ejemplo, el desarrollo convencional para determinar los factores de riesgo que incluyen, aunque no están limitados a; por ejemplo, trauma de cabeza, ya sea cerrado o de penetración, infecciones CNS, bacteriales o virales, enfermedad cerebrovascular que incluye, aunque no está limitado a, apoplejía, tumores cerebrales, edema cerebral, cisticercosis, Porfirio, encefalopatía metabólica, retiro de drogas, que incluyen, aunque no están limitados a hipnosis por sedantes o retiro del alcohol, historia perinatal anormal que incluye anoxia durante el nacimiento o lesión durante el nacimiento de cualquier tipo, parálisis cerebral, discapacidades de aprendizaje, hiperactividad, historio de convulsiones febriles de niño, historio de estados epilépticos, historia familiar de epilepsia de o cualquiera de un desorden relacionado con convulsiones, enfermedad inflamatoria del cerebro que incluye lupus, intoxicación por fármacos ya sea directa o mediante transferencia placentaria, que incluye aunque no está limitada a envenenamiento por cocaína, consanguinidad de los padres, y tratamiento con medicamentos que son tóxicos para el sistema nervioso incluyendo medicamentos psicotrópicos.

La determinación de cuáles pacientes se pueden beneficiar del tratamiento con un NPD en pacientes que no tienen señales o síntomas

clínicos se puede basar en una variedad de "indicadores secundarios" o "bioindicadores".

Como se utiliza en la presente, los términos "indicador secundario" y "bioindicador" se utilizan en forma intercambiable y se refieren a cualquier indicador o marcador anatómico, bioquímico, estructural, eléctrico, genético o químico que puede ser correlacionado de manera confiable con la existencia presente o desarrollo futuro de daño neuronal. En algunos casos, las técnicas de formación de imágenes, tales como una tomografía computarizada (CT), formación de imágenes de resonancia magnética (MRI) o tomografía de emisión de positrones (PET), puede ser empleada para determinar si un sujeto está en riesgo de daño neuronal.

Los bioindicadores adecuados para los métodos de la presente invención incluyen, aunque no están limitados a: la determinación por MRI, CT u otras técnicas de formación de imágenes, de esclerosis, atrofia o pérdida de volumen en el hipocampo o esclerosis temporal mesial palpable (MTS) o patologías anatómicas relevantes similares; la detección en la sangre, suero o tejidos del paciente de una especie molecular tal como una proteína u otro bioindicador bioquímico, por ejemplo, niveles elevados de factor neurotrófico ciliar (CNTF) o niveles de suero elevados de un producto de degradación neuronal; u otra evidencia de indicadores secundarios de que el paciente necesita el tratamiento con un fármaco neuroprotector.

Se espera que muchos más bioindicadores que utilizan una variedad amplia de técnicas de detección sean desarrollados en el futuro. Se

pretende que cualquiera de dichos marcadores o indicadores de la existencia o posible desarrollo futuro de daño neuronal, como el último término que se utiliza en la presente, se puede utilizar en los métodos de la presente invención para determinar la necesidad de tratamiento con los compuestos y
5 métodos de la presente invención.

Una determinación que tiene un sujeto, o puede estar en riesgo de desarrollar daño neuronal también podría incluir, por ejemplo, una evaluación médica que incluye una historia completa, una examinación física, y una serie de pruebas de sangre relevantes. Esta también incluye una
10 exploración de electroencefalograma (EEG), CT, MRI ó PET. Una determinación de un riesgo incrementado de desarrollo de daño neuronal o lesión también se puede realizar por medio de pruebas genéticas, que incluyen perfil de expresión genética o técnicas proteómicas. (Véase la publicación Schmidt, D. Rogawski, M. A. Epilepsy research 50; páginas 71-78
15 (2002), y Loscher, W. Schmidt D. Epilepsy Research 50; páginas 3 a 16 (2002)).

Para desórdenes psiquiátricos que pueden ser estabilizados o mejorados mediante un fármaco neuroprotector, por ejemplo, desorden bipolar, desorden esquizoafectivo, esquizofrenia, desórdenes del control de
20 impulso, etc., las pruebas anteriores también pueden incluir un examen de estado presente y una historia detallada del curso de los síntomas de pacientes, tales como síntomas de desorden del estado anímico y síntomas sicóticos durante el tiempo y en relación con otros tratamientos que el

paciente puede haber recibido durante el tiempo, por ejemplo, una gráfica de vida. Estos y otros métodos especializados y de rutina permiten al médico seleccionar a los pacientes que necesitan terapia utilizando los métodos y formulaciones de la presente invención.

5 En algunas modalidades de la presente invención, los compuestos de carbamato adecuados para utilizar en la práctica de la presente invención serán administrados ya sea en forma unitaria o de manera conjunta con por lo menos uno o más de otros compuestos o agentes terapéuticos, por ejemplo, con otros fármacos neuroprotectores o fármacos
10 antiepilépticos, fármacos anticonvulsivos. En estas modalidades, la presente invención provee métodos para tratar o evitar la lesión neuronal en un paciente. El método incluye el paso de: administrar a un paciente que necesita el tratamiento, una cantidad efectiva de uno de los compuestos de carbamato descritos en la presente en combinación con una cantidad efectiva
15 de uno o más de otros compuestos o agentes terapéuticos que tienen la capacidad de proporcionar neuroprotección o tratar o evitar convulsiones o epileptogénesis o la capacidad de aumentar los efectos neuroprotectores de los compuestos de la presente invención.

 Como se utiliza en la presente, el término "administración en
20 forma conjunta" o "administración de combinación" de un compuesto, agente terapéutico o fármaco conocido con un compuesto de la presente invención significa la administración del fármaco y el uno o más compuestos en tal momento, que tanto el fármaco conocido como el compuesto tendrán un

efecto terapéutico. En algunos casos, este efecto terapéutico será sinérgico. Dicha administración concomitante puede involucrar la administración en forma conjunta (es decir, al mismo tiempo), antes o subsiguiente del fármaco con respecto a la administración de un compuesto
5 de la presente invención. Un experto en la materia, podría no tener dificultad para determinar el duración, secuencia y dosificación de administración adecuadas para fármacos y compuestos particulares de la presente invención.

Dicho uno o más compuestos o agentes terapéuticos pueden ser seleccionados de compuestos que tienen una o más de las siguientes
10 propiedades: actividad antioxidante, actividad del antagonista del receptor NMDA, aumento de inhibición GABA endógena, actividad del inhibidor de sintasa NO, capacidad de enlace de hierro, por ejemplo, un quelador de hierro, una capacidad de enlace de calcio, por ejemplo un quelador de Ca (II), una capacidad de enlace de zinc, por ejemplo, un quelador Zn (II), la
15 capacidad de bloquear los canales iónicos de sodio o calcio de manera efectiva, o abrir los canales iónicos de potasio o cloro en el CNS de un paciente.

En algunas modalidades preferidas, el uno o más compuestos o agentes terapéuticos podrían antagonizar a los receptores de NMDA mediante
20 el enlace a los receptores de NMDA (por ejemplo, mediante el enlace al sitio de enlace de glicina de los receptores NMDA) y/o el agente podría aumentar la inhibición de GABA disminuyendo la recolección de GABA glial.

Además de dicho uno o más compuestos o agentes terapéuticos puede ser cualquier agente conocido para suprimir la actividad de convulsiones aún si ese compuesto no es conocido para proveer neuroprotección. Dichos agentes podrían incluir, aunque no están limitados a cualquier AED efectivo conocido para un experto en la materia o descubierto en el futuro, por ejemplo, los agentes adecuados incluyen, aunque no están limitados a: carbamazepina, clobazam, clonazepam, etosuximida, felbamato, gabapentina, lamotigina, levetiracetam, oxcarbazepina, fenobarbital, fenitoína, pregabalina, primidona, retigabina, talampanel, tiagabina, topiramato, valproato, vigabatrina, zonisamida, benzodiazepinas, barbituratos o hipnóticos sedantes en general.

Además, en algunas modalidades, los compuestos de la presente invención serán utilizados, ya sea solos o en combinación, con los otros o en combinación con uno o más de otros medicamentos terapéuticos como se describieron anteriormente, o sus sales o ésteres, para fabricar un medicamento con el propósito de proporcionar neuroprotección a un paciente o sujeto que la necesita.

Compuestos de carbamato como farmacéuticos

La presente invención provee mezclas enantioméricas y enantiómeros aislados de la Fórmula 1 y/o la Fórmula 2 como farmacéuticos. Los compuestos de carbamato son formulados como farmacéuticos para
5 proveer neuroprotección en un sujeto.

En general, los compuestos de carbamato de la presente invención pueden ser administrados como composiciones farmacéuticas mediante cualquier método conocido en la materia para la administración de fármacos terapéuticos que incluyen oral, bucal, tópica, sistémica (por ejemplo,
10 transdérmica, intranasal o por supositorio), o parenteral (por ejemplo, inyección intramuscular, subcutánea o intravenosa). La administración de los compuestos directamente al sistema nervioso puede incluir, por ejemplo, administración por rutas de administración intracerebrales, intraventriculares, intracerebroventriculares, intratecales, intracisternales, intraspinal o período
15 de tiempo-espinal mediante la administración por medio de agujas o catéteres intracraneales o intravertebrales con o sin dispositivos de bomba.

Además, en el caso de enfermedades o desórdenes del ojo, que incluyen aunque no están limitadas a; isquemia retinal (diabética o de otra forma), glaucoma, degeneración retinal, degeneración macular, esclerosis
20 múltiple, neuropatía óptica tóxica e isquémica, los compuestos de la presente invención, incluyen combinaciones de los compuestos, pueden ser administrados por medio de aplicación exógena directa al ojo, es decir, a la esclerosis o de otra forma, por ejemplo, gotas para los ojos o mediante

implante ocular u otro dispositivo de administración lento que incluye microesferas que incluyen inyección directa en la humor vítreo, etc.

Las composiciones pueden tomar la forma de tabletas, píldoras, cápsulas, semisólidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, 5 soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes, elixires, aerosoles, o cualesquiera otras composiciones adecuadas; y comprende por lo menos un compuesto de la presente invención en combinación con por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia, y éstos y los métodos para formular 10 las composiciones, se pueden encontrar en referencias estándar tales como la publicación de Alfonso AR: Remington's Pharmaceutical Sciences. 17a. edición, Mack Publishing company, Easton PA, 1985, cuya descripción está incorporada en la presente como referencia en su totalidad y para todos los propósitos. Los vehículos líquidos adecuados, especialmente para soluciones 15 que se pueden inyectar, incluyen agua, solución salina acuosa, solución de dextrosa acuosa y glicoles.

Los compuestos de carbamato pueden ser provistos como suspensiones acuosas. Las suspensiones acuosas de la presente invención pueden contener un compuesto de carbamato en mezcla con excipientes 20 adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes pueden incluir, por ejemplo, un agentes de suspensión, tal como carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma de acacia, y

agentes de dispersión o humectación, tal como un fosfatido de ocurrencia natural (por ejemplo, lectina), un producto de condensación de un óxido de alquileo con un ácido graso (por ejemplo, estearato de polioxietileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de

5 cadena larga (por ejemplo, oxicetanol heptadecaetileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un hexitol (por ejemplo, mono-oleato de polioxietileno sorbitol), o un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de

10 ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ejemplo, mono-oleato de polioxietileno sorbitán).

La suspensión acuosa también puede contener uno o más conservadores tales como etil o n-propil p-hidroxibenzoato, uno o más agentes de coloración, uno o más agentes saborizantes, y uno o más agentes endulzantes, tales como, sacarosa, aspartamo o sacarina. Las formulaciones

15 pueden ser ajustadas para lograr osmolaridad.

Suspensiones de aceite para utilizar en los métodos presentes pueden ser formulados mediante la suspensión de un compuesto de carbamato en un aceite vegetal, tal como aceite de arachis, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco o en un aceite mineral, tal como parafina

20 líquida; o una mezcla de éstos. Las suspensiones de aceite pueden contener un agente de espesamiento, tal como cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Los agentes endulzantes pueden ser agregados para proveer una preparación oral apetitosa, tal como glicerol, sorbitol o sacarosa. Estas

formulaciones pueden ser conservadas mediante la adición de un antioxidante, tal como, ácido ascórbico. Como un ejemplo de un vehículo de aceite que se puede inyectar, véase, por ejemplo, la publicación de Minto, J. Pharmacol. Exp. Ther. 281: páginas 93 a 102, 1997. Las formulaciones

5 farmacéuticas de la presente invención también pueden tener la forma de emulsiones de aceite en agua. La fase de aceite puede ser un aceite vegetal o un aceite mineral, descrito anteriormente, o una mezcla de éstos.

Los agentes emulsionantes adecuados incluyen gomas de ocurrencia natural, tales como goma de acacia y goma de tragacanto,

10 fosfatidas de ocurrencia natural, tal como lecitina de aceite de soya, ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, tales como mono-oleato sorbitán, y productos de condensación de estos ésteres parciales con óxido de etileno, tal como mono-oleato polioxietileno sorbitán. La emulsión también puede contener agentes endulzantes y agentes

15 saborizantes, como en la formulación de jarabes y elíxires. Dichas formulaciones también pueden contener un emoliente, un conservador o un agente de color.

El compuesto de elección, solo o en combinación con otros componentes adecuados, puede ser elaborado en formulaciones de aerosol

20 (es decir, pueden ser "nebulizados") a ser administrados por medio de inhalación. Las formulaciones de aerosol pueden ser colocados en propulsores presurizados aceptables, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y los similares.

Las formulaciones de la presente invención adecuadas para la administración parenteral, tal como, por ejemplo, mediante rotas intraarticulares (en las articulaciones), intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal y subcutánea, puede incluir la inyección de

5 soluciones acuosas y no acuosas, estériles isotónicas, las cuales pueden contener antioxidantes, reguladores, bacteriostatos y solutos que producen la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, agentes de espesamiento, estabilizadores y conservadores. Entre los

10 vehículos y solventes adecuados que pueden emplearse están el agua y la solución de Ringer, un cloruro de sodio isotónico. Además, los aceites fijos estériles pueden ser empleados convencionalmente como un solvente o medio de suspensión. Para este propósito cualquier aceite fijo suave puede ser empleado incluyendo diglicéridos o monoglicéridos sintéticos. Además,

15 los ácidos grasos tales como ácido oléico de la misma manera pueden ser utilizados en la preparación de formulaciones que se pueden inyectar. Estas soluciones son estériles y generalmente libres de materiales indeseables.

En donde los compuestos son suficientemente solubles, éstos pueden ser disueltos directamente en solución salina normal con o sin el uso

20 de solventes orgánicos deseables, tales como propilén glicol o polietilén glicol. Las dispersiones de los compuestos divididos finamente pueden estar compuestas en almidón acuoso o solución de carboximetilcelulosa de sodio, o en aceite adecuado, tal como aceite de arachis. Estas formulaciones pueden

ser esterilizadas mediante las técnicas de esterilización bien conocidas convencionales. Las formulaciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según es requerido para condiciones fisiológicas aproximadas, tales como agentes de ajuste y reguladores de pH, 5 agentes de ajuste de toxicidad, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y los similares.

La concentración de un compuesto de carbamato en estas formulaciones puede variar ampliamente, y será seleccionado principalmente con base en los volúmenes, viscosidades, peso corporal y los similares del 10 fluido, de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado y las necesidades del paciente. Para la administración IV, la formulación puede ser una preparación que se puede inyectar estéril, tal como una suspensión acuosa u oleaginosa que se puede inyectar estéril. Esta suspensión puede ser formulada de acuerdo con la técnica conocida que utilizan aquellos 15 agentes de dispersión o humectación adecuados y agentes de suspensión. La preparación que se puede inyectar estéril también puede ser una solución o suspensión que se puede inyectar estéril en diluyentes o solventes parenteralmente aceptables no tóxicos, tales como una solución de 1,3-butanodiol. Las formulaciones recomendables pueden ser presentadas en 20 contenedores sellados de dosis unitarias o dosis múltiples, tales como ampolletas y frascos. Las soluciones y suspensiones de inyección pueden ser preparadas a partir de polvos, gránulos y tabletas estériles del tipo descrito anteriormente.

Un compuesto de carbamato adecuada para utilizar en la práctica de la presente invención puede ser y es administrado preferentemente oralmente. La cantidad de un compuesto de la presente invención en la composición puede variar ampliamente dependiendo del tipo
5 de composición, tamaño de una dosificación unitaria, clase de excipientes y otros factores bien conocidos por aquellos expertos en la materia. En general, la composición final puede comprender, por ejemplo, desde el 0.000001 por ciento por peso (% p) hasta el 10% p del compuesto de carbamato, preferentemente del 0.00001 % p, hasta el 1% p, con el resto siendo el
10 excipiente o los excipientes.

Las formulaciones farmacéuticas para administración oral pueden ser formuladas utilizando vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la materia en dosis adecuadas para administración oral. Dichos vehículos permiten que las formulaciones farmacéuticas sean
15 formuladas en formas de dosificación unitarias, tales como tabletas, píldoras, polvo, grageas, cápsulas, líquidos, pastillas, geles, jarabes, suspensiones, etc., adecuadas para ser ingeridas por un paciente.

Las formulaciones adecuadas para la administración oral pueden consistir en (a) soluciones líquidas, tales como una cantidad efectiva de la
20 formulación farmacéutica suspendida en un diluyente, tal como agua, solución salina ó PEG 400; (b) cápsulas, almohadillas o tabletas, cada una conteniendo una cantidad previamente determinada del ingrediente activo, tal como

líquidos, sólidos, gránulos o gelatinas; (c) suspensiones en un líquido adecuado; y (d) emulsiones adecuadas.

Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener a través de la combinación de los compuestos de la presente

5 invención con un excipiente sólido, opcionalmente moliendo una mezcla resultante, y procesamiento de la mezcla de gránulos, después de agregar los compuestos adicionales adecuados, si se desea, para obtener tabletas o núcleos de grageas. Los excipientes sólidos adecuados son carbohidratos o

10 materiales de relleno de proteína e incluyen, aunque no están limitados a azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, papa u otras plantas; la celulosa tal como la metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa de sodio; y las gomas que incluyen goma arábica y tragacanto; así como también

15 proteínas tales como gelatina y colágeno. Si se desea, los agentes desintegrantes o solubilizantes pueden ser agregados, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar, ácido algínico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio. Las formas de tabletas pueden incluir una o más de

20 lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, fosfatos de calcio, almidón de maíz, almidón de papa, celulosa microcristalina, gelatina, dióxido de silicón coloidal, talco, estearato de magnesio, ácido esteárico, y otros excipientes, colorantes, materiales de relleno, aglutinadores, diluyentes, agentes reguladores, agentes de humectación, conservadores, agentes saborizantes, tintes, agentes desintegrantes, y vehículos farmacéuticamente aceptables. Las

formas de pastillas pueden comprender el ingrediente activo en un sabor, por ejemplo, sacarosa, así como también pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina o emulsiones de sacarosa y acacia, geles y los similares que contienen, además del
5 ingrediente activo, los vehículos conocidos en la materia.

Los compuestos de la presente invención también pueden ser administrados en la forma de supositorios para administración retal del fármaco. Estas formulaciones pueden ser preparadas mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperaturas
10 ordinarias aunque es líquido en las temperaturas del recto y por lo tanto se fundirán en el recto para liberar el fármaco. Dichos materiales son mantequilla de cacao y polietilenglicoles.

Los compuestos de la presente invención también pueden ser administrados mediante ruta intranasal, intraocular, intravaginal e intrarectal
15 que incluyen supositorios, insuflación polvos y formulaciones en aerosol (por ejemplo, de anhelantes de esteroides, véase la publicación de Rohatagi, J. Clin. Pharmacol. 35: páginas 1187 a 1193, 1995; Tjwa, Ann. Allergy Asthma immunol. 75: páginas 107 a 111, 1995).

Los compuestos de la presente invención pueden ser
20 administrados en forma transdérmica, por medio de una ruta tópica, formulada en forma de varitas aplicadoras, soluciones, suspensiones, emulsiones, geles, cremas, ungüentos, pastas, jaleas, pinturas, polvos y aerosoles.

Los materiales de encapsulación también pueden ser empleados con los compuestos de la presente invención y el término "composición" puede incluir el ingrediente activo en combinación con un material encapsulador como una formulación, con o sin otros vehículos. Por ejemplo, 5 los compuestos de la presente invención también pueden ser administrados en la forma de microesferas para liberación lenta en el cuerpo. En una modalidad, las microesferas pueden ser administradas por medio de inyección intradérmica del fármaco (por ejemplo, mifepristone) que contiene las microesferas, las cuales liberan lentamente en forma subcutánea (véase la 10 publicación de Rao, J. Biomater Sci. Polym. Ed. 7: páginas 623 a 645, 1995); en la forma de formulaciones de gel biodegradables o que se pueden inyectar (véase por ejemplo, la publicación de Gao, Pharm. Res 12: páginas 857 a 863, 1995); o en la forma de microesferas para administración oral (véase, por ejemplo, la publicación de Eyles, J. Pharm. Pharmacol. 49: páginas 669 a 674, 15 1997). Las rutas de administración tanto transdérmica como intradérmica producen la administración constante durante semanas o meses. Las cápsulas también pueden ser utilizadas en la administración de los compuestos de la presente invención.

En otra modalidad, los compuestos de la presente invención 20 pueden ser administrados mediante el uso de liposomas, las cuales se funden con la membrana celular o son endocitosadas, es decir, empleando los ligandos enlazados al liposoma que se enlaza a la superficie de los receptores de proteína de membrana de la célula que tiene como resultado la

endocitosis. Utilizando las liposomas, particularmente en los casos en que la superficie del liposoma transporta ligandos específicos para células objetivo, o son de otra forma dirigidas de manera preferencial a un órgano específico, se puede enfocar la administración del compuesto de carbamato en las células
5 objetivo, in vivo. (véase, por ejemplo, la publicación de Al-Mahammed, J. Microencapsul, 13: páginas 293 a 306, 1996; Chonn, Curr. Opin. Biotechnol, 6: páginas 698 a 708, 1995; Ostro, Am. J. Hosp.. Pharm. 46: páginas 1576 a 1587, 1989).

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención
10 pueden ser provistas como una sal y pueden ser formadas con muchos ácidos, que incluyen aunque sin limitarse a clorhídrico, sulfúrico, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en solventes acuosos u otros solventes protónicos que son las formas de base libre correspondientes. En otros casos, la preparación preferida puede ser un
15 polvo liofilizado el cual puede contener, por ejemplo, cualquiera o todos de los siguientes: 1 mM-50 mM de histidina, el 0.1% al 2% de sacarosa, del 2% al 7% de manitol, a un pH dentro del intervalo de 4.5 a 5.5, que es combinado con regulador antes del uso.

Las sales y ésteres farmacéuticamente aceptables se refiere a
20 sales y ésteres que son farmacéuticamente aceptables y tienen las propiedades farmacológicas deseadas. Dichas sales incluyen sales que pueden ser formadas en donde los protones ácidos presentes en los compuestos tienen la capacidad de reaccionar con bases orgánicas e

inorgánicas. Las sales inorgánicas adecuadas incluyen a aquellas formadas con los metales alcalinos, por ejemplo, sodio y potasio, magnesio, calcio y aluminio. Las sales orgánicas adecuadas incluyen aquellas formadas con bases orgánicas como las bases de amina, por ejemplo, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina y los similares.

5 las sales farmacéuticamente aceptables también pueden incluir sales de adición de ácido de la reacción de porciones de amina en el compuesto de origen con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácidos clorhídrico y bromhídrico) y ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido cítrico, ácido maléico y

10 ácidos alcano y areno-sulfónicos tales como ácido metanosulfónico y ácido bencenosulfónico. Los ésteres farmacéuticamente aceptables incluyen a los ésteres formados a partir de los grupos carboxi, sulfoniloxi y fosfonoxi presentes en los compuestos. En donde existen dos grupos ácidos presentes, una sal o éster farmacéuticamente aceptable puede ser una sal

15 monoácida mono sal o éster o un adicionalmente-sal o éster; y de manera similar, en donde existen más de dos grupos ácidos presentes, algunos o todos dichos grupos pueden ser salificados o esterificados.

Los compuestos nombrados en la presente invención pueden estar presentes en forma no salificada o no esterificada o en forma salificada

20 y/o esterificada, y los nombres de dichos compuestos pretenden incluir a las sales y ésteres tanto en su forma original (no salificada o no esterificada) como en sus sales o ésteres farmacéuticamente aceptables. La presente invención incluye las formas de sal y éster farmacéuticamente aceptables de

la Fórmula 1 y la Fórmula 2. Más de una forma de cristal de un enantiómero de la Fórmula 1 o la Fórmula 2 puede existir y como tal, también está incluido en la presente invención.

Una composición farmacéutica de la presente invención
5 opcionalmente puede contener, además de un compuesto de carbamato, por lo menos uno de otro agente terapéutico es útil en el tratamiento de una enfermedad o condición asociada con proporcionar neuroprotección.

Los métodos para formular las composiciones farmacéuticas han sido descritos en numerosas publicaciones tales como "Pharmaceutical
10 dosage forms: tablets", Segunda edición, Revised and expanded, Volúmenes 1-3, editado por Lieberman et al; "Pharmaceutical dosage forms: Parenteral medications", volúmenes 1-2, editado por Avis et al; y "Pharmaceutical dosage forms: disperse systems". Volúmenes 1-2, editado por Lieberman et al; publicado por Marcel Dekker, Inc., cuyas descripciones están incorporadas en
15 la presente descripción como referencia en su totalidad y para todos los propósitos.

Las composiciones farmacéuticas son formuladas de manera general como estériles, substancialmente isotónicas y en cumplimiento con todas las regulaciones Good Manufacturing Practice (GMP) de la
20 Administración de alimentos y fármacos de E.U.A.

Regímenes de dosificación

La presente invención provee métodos para proporcionar neuroprotección en un mamífero, que incluyen a un sujeto o paciente humano, utilizando los compuestos de carbamato de la presente invención. La
5 cantidad del compuesto de carbamato necesario para proveer la neuroprotección se define como una dosis terapéuticamente o farmacéuticamente efectiva. La programación de dosificación y las cantidades efectivas para su uso, es decir, la dosificación o régimen de dosificación dependerá de una variedad de factores que incluyen la etapa de la
10 enfermedad, el estado físico del paciente, edad y los similares. Durante el cálculo del régimen de dosificación para un paciente, el modo de administración también se toma en cuenta. Con el objeto de lograr este objetivo, los compuestos o composiciones de la presente invención deben ser utilizados en la cantidad o dosis efectiva terapéuticamente correcta, como se
15 describió anteriormente.

La programación de dosificación y las cantidades efectivas para este uso, es decir, la dosificación o régimen de dosificación, dependerá de una variedad de factores que incluyen la naturaleza precisa de la enfermedad o lesión, el estado físico del paciente, peso, edad y los similares. Al calcular el
20 régimen de dosificación para un paciente, el modo de administración también se toma en cuenta.

El intervalo de las dosis que se esperan sean efectivos para la producción de un efecto neuroprotector en humanos en las situaciones

clínicas severas y agudas que son análogas para el modelo de rata litio-pilocarpina en los Ejemplos 1 y 2, y el modelo de rata de oclusión de arteria cerebral (MCAO) media de isquemia cerebral transitoria en el Ejemplo 4 debajo son determinados mediante la comparación de dosis efectivas
5 conocidas con los niveles de sangre en ratas y humanos.

Farmacocinéticos

En los humanos, se sabe que la farmacocinética de uno de los compuestos de la presente invención referidos en la presente descripción
10 como el Compuesto de prueba (TC), es decir, la Fórmula 7, son lineales siguiendo la administración oral única y repetida en hombres adultos saludables (véase el Ejemplo 5).

Niveles de sangre en humanos

15 En los estudios de toxicología en humanos, la administración oral del compuesto de prueba (TC) en diversas dosificaciones durante 7 días produjeron los máximos C y el AUC (0-24):

1) A 100 mg. b.i.d. (200 mg en 24 horas o 2.85 mg/kg/día en un humano de 70 kg.) el C máximo fue de 3.6-microgramos/mL y el AUC fue de
20 42.2 microgramos-hora/mL;

2) A 250 mg b.i.d. (500 mg en 24 horas o 7.14 mg/kg/día en un humano de 70 kg.) el C máximo fue de 8.2 microgramos/mL y el AUC fue de 102.3 microgramos-hora/mL;

3) A 500 mg b.i.d. (1000 mg en 24 horas o 14.28 mg/kg/día en un humano de 70 kg.) el C máximo fue de 17.2 microgramos/mL y el AUC fue de 204.1 microgramos-hora/mL;

4) A 750 mg b.i.d. (1500 mg en 24 horas o 21.4 mg/kg/día en un humano de 70 kg.) el C máximo fue de 28.2 microgramos/mL y el AUC fue de 322.7 microgramos-hora/mL;

Niveles de sangre en rata

En los estudios de toxicología en ratas, la administración oral del Compuesto de prueba (TC) durante 8 días, produjo los niveles C máximos y el AUC;

1) a 30 mg/kg/día, el C máximo fue 9.33 microgramos/mL y el AUC fue de 97.32 microgramos-hora/mL;

2) a 100 mg/kg/día, el C máximo fue 20.63 microgramos/mL y el AUC fue de 230.33 microgramos-hora/mL;

3) a 300 mg/kg/día, el C máximo fue 70.34 microgramos/mL y el AUC fue de 525.95 microgramos-hora/mL;

Las dosis probadas en ratas para los efectos anti-epileptogénicos y neuroprotectores en el Ejemplo 2, varió 30 mg/kg/día hasta 120 mg/kg/día. La dosis más baja probada en este Ejemplo, es decir, 30 mg/kg/día, produjo determinados efectos protectores medidos, mientras que la dosis más baja probada en el Ejemplo 1 fue de 10 mg/kg/día y produjo efectos protectores mínimos (Véanse los Ejemplos 1 y 2 que se encuentran más

adelante). Sin embargo, en el tratamiento del modelo de rata de oclusión de arteria cerebral (MCAO) media de isquemia cerebral transitoria en el Ejemplo 4, una dosis de 10 mg/kg en ratas mostró una reducción moderada aunque significativa en el tamaño del infarto.

- 5 En las ratas, las dosis de 30 mg/kg/día el compuesto de prueba (TC) se podría esperar produzca niveles de sangre de; C máximo de 9.33 microgramos/mL y un AUC de 97.32 microgramos-hora/mL. En humanos, estos niveles de sangre se podrían esperar de dosis de aproximadamente 500 mg/día hasta aproximadamente 600 mg/día o desde aproximadamente 7.1
- 10 hasta aproximadamente 8.6 mg/kg/día en un humano de 70 kg.

- Sin embargo, en los Ejemplos 1 y 2, se requirieron dosis y niveles de sangre relativamente altos debido al modelo de animal agudo y muy severo que fue utilizado y la necesidad de producir los efectos anti-epileptogénicos neuroprotectores demostrados. También, en este modero de
- 15 animal agudo, el compuesto se administró después de la ocurrencia de un evento o lesión traumático, es decir, la inducción del estado epiléptico mediante la administración de Li-Pilocarpina. En el modelo de rata de oclusión arterial cerebral media (MCAO) de isquemia cerebral transitoria en el Ejemplo 4, el compuesto también fue administrado 1 hora después de la
- 20 oclusión de la arteria cerebral media. Este tipo de modelo de lesión posterior es probable se correlacione con las situaciones clínicas agudas y severas en forma análoga en pacientes humanos, de tal manera que no empiezan con la medicación hasta después de que ya ha ocurrido la lesión al CNS severa. En

dichas situaciones, se espera que las dosificaciones necesarias para el efecto neuroprotector y anti-epiléptico será mayor que la que probablemente sería necesaria en circunstancias menos agudas o severas o en situaciones crónicas y especialmente en donde la medicación se utiliza en forma

5 profiláctica.

En situaciones en las que la medicación es utilizada en forma profiláctica en un paradigma de prevención o pre-tratamiento primario, las dosis y niveles sanguíneos requeridos para producir efectos neuroprotectores clínicamente importantes que se podrían esperar de alguna forma fueran

10 menores que el equivalente humano de la dosificación de 10 mg/kg utilizada en el Ejemplo 4 y significativamente más baja que la dosificación de 30 mg/kg/día que se descubrió efectiva en el Ejemplo 2. Como tal, las dosis que se espera sean terapéuticamente efectivas en la práctica clínica en humanos, en la mayoría de los casos, podría ser menos que aquel identificado en estos

15 modelos de animal severos. El ED50 para el compuesto de prueba para evitar las convulsiones en ratas es de aproximadamente 4 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg (dependiendo del tiempo y tipo de experimento) de tal manera que una dosis efectiva mínima de 10 mg/kg en los modelos de rata de neuroprotección no es esperado. Con base en estos datos, una dosis

20 humana neuroprotectora efectiva esperada, podría ser similar a la dosis mínima requerida para la eficacia anticonvulsiva en los humanos. En un paradigma de prevención primario, en donde la dosificación se realiza bien antes de cualquier procedimiento de insulto o patológico sea iniciado, las

dosis efectivas y los niveles sanguíneos en humanos se podría esperar fueran de alguna manera menores que el equivalente humano de la dosis de 10 mg/kg que se descubrió mínimamente efectivo en el modelo de rata de oclusión de arteria cerebral mínima (MCAO) de isquemia cerebral transitoria en el Ejemplo 4.

En pacientes humanos, en un paradigma de prevención primario en donde la medicación podría empezar antes de cualquier lesión o daño para el sistema nervioso humano, los límites inferiores de una dosis neuroprotectora se podría esperar fuera de aproximadamente 100 mg/día hasta aproximadamente 200 mg/día o de aproximadamente 1.43 mg/kg/día hasta aproximadamente 2.85 mg/kg/día en un humano de 70 kg, produciendo un valor C máximos esperado (a 200 mg/día) de aproximadamente 3.6 microgramos/mL y el AUC de aproximadamente el 42.2 microgramos-hora/mL).

En situaciones en las que la medicación se inició después de la lesión, se ha sostenido el intervalo de dosificación que podría ser esperado ser de alguna manera mayor, por ejemplo, desde aproximadamente 200 mg/día hasta aproximadamente 400 mg/kg o desde aproximadamente 2.85 hasta aproximadamente 5.71 mg/kg/día en un humano de 70 kg.

Los compuestos y composiciones de la presente invención no tienen un extremo superior teórico para su intervalo de dosificación clínicamente efectivo. Por lo tanto, el extremo superior del intervalo terapéuticamente efectivo sería determinado por la cantidad máxima que

podría ser tolerada por el paciente. Sin embargo, la dosis más alta probada en ratas, es decir, 120 mg/kg, la cual mostró efectos neuroprotectores y anti-epileptogénos muy marcados, se podría esperar, con base en los datos anteriores, tener un C máximo y un AUC similar o por debajo de aquellos
5 producidos en humanos a una dosificación de 750 mg dos veces al día (dosis diaria total de 1500 mg, o aproximadamente 21.4 mg/kg/día). Una dosis de 750 mg dos veces al día (dosis diaria total de 1500 mg) se ha utilizado en humanos y se descubrió ser tolerado fácilmente. Sobre esta base, se podría esperar que la dosificación que se puede tolerar máxima sea
10 considerablemente más alta que para muchos de los pacientes, posiblemente de 2500 mg/día hasta 3000 mg/día o de aproximadamente 35.7 mg/kg/día hasta aproximadamente 42.9 mg/kg/día en un humano de 70 kg.

Por lo tanto, con el propósito de proporcionar neuroprotección a un sujeto o paciente humano, los compuestos y composiciones farmacéuticas
15 de la presente invención pueden ser administrado a una dosificación desde aproximadamente 1.4 mg/kg/día hasta aproximadamente 43.0 mg/kg/día (100 mg/día hasta 3000 mg/día en un humano de 70 kg), preferentemente desde aproximadamente 2.9 mg/kg/día hasta aproximadamente 35.7 mg/kg/día (200 mg/día hasta 2500 mg/día en un humano 70 kg), más preferentemente desde
20 aproximadamente 3.6 mg/kg/día hasta aproximadamente 28.6 mg/kg/día (250 mg/día hasta 2000 mg/día en un humano de 70 kg), o incluso más preferentemente desde aproximadamente 4.3 mg/kg/día hasta aproximadamente 21.4 mg/kg/día (300 mg/día hasta 1500 mg/día en un

humano de 70 kg) o más preferentemente desde aproximadamente 5.0 mg/kg/día hasta aproximadamente 17.1 mg/kg/día (350 mg/día hasta 1200 mg/día en un humano de 70 kg). Sin embargo, estas dosificaciones se pueden variar dependiendo de las características y tolerancias individuales del
5 sujeto y la naturaleza precisa de la condición que está siendo tratada.

Con base en esta descripción, un experto en la materia tendrá la capacidad de, sin una experimentación excesiva, que tiene esa habilidad para determinar una dosis terapéuticamente efectiva o cantidad de un compuesto de carbamato sustituido particular de la presente invención para tratar la
10 epilepsia y para producir un efecto neuroprotector clínicamente efectivo. (véase, por ejemplo, la publicación de Lieberman, Pharmaceutical dosage forms (Vols 1 a 3, 1992); Lloyd 1999, The art, science and technology of pharmaceutical compounds; y Picar, 1999, Dosage Calculations).

Una dosis terapéuticamente efectiva también es una en la cual
15 cualesquiera efectos secundarios tóxicos o perjudiciales del agente activo son superados en términos clínicos por los efectos terapéuticamente benéficos. Se debe observar adicionalmente que para cada sujeto en particular, los regimenes de dosificación específicos deben ser evaluados y ajustados durante el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional
20 que la persona que administra o supervisa la administración de los compuestos. También se espera que las composiciones de la presente invención pudieran ser iniciadas a una dosificación baja o moderada y

entonces ser incrementadas a una dosis terapéuticamente efectiva en su totalidad y un nivel sanguíneo durante un período de tiempo.

Para los propósitos del tratamiento, las composiciones o compuestos descritos en la presente pueden ser administrados al sujeto en
5 una administración de dosis de insulina única, por medio de una administración continua durante un período de tiempo extendido o en un protocolo de administración repetido (por ejemplo, mediante un protocolo de administración repetida por hora, diariamente, o semanal). Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser administradas, por
10 ejemplo, una, dos o más veces al día, tres veces por semana o semanalmente. En una modalidad de la presente invención, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención son administradas oralmente una o dos veces al día.

En algunas modalidades, un régimen de tratamiento con los
15 compuestos de la presente invención puede empezar, por ejemplo, después de que un sujeto que padece de una lesión con daño al cerebro u otro insulto inicial tal como una apoplejía. Todavía en otras modalidades, un régimen de tratamiento con los compuestos de la presente invención puede iniciar antes de que haya ocurrido daño alguno o lesión al sistema nervioso, aunque en un
20 momento en el que dicho daño o lesión se puede esperar o es probable que ocurra. Por ejemplo, dicho régimen de tratamiento puede empezar antes de que un sujeto experimente un procedimiento neuroquirúrgico o es probable que padezca de otras formas de trauma, o de cabeza o de cerebro, por

ejemplo, combate, deportes violentos o carreras de autores, golpes recurrentes, TIA's, etc.

En determinadas modalidades, los compuestos de carbamato de la presente invención pueden ser administrados diariamente durante un
5 período establecido (semana, mes, año) después de la ocurrencia de la lesión que daña al cerebro o un insulto inicial. Un médico sabrá cómo determinar que el compuesto de carbamato ha alcanzado un nivel terapéuticamente efectivo, por ejemplo, mediante un examen al paciente o midiendo los niveles del fármaco en la sangre o el fluido cerebro-espal. Un experto en la materia
10 podría tener la capacidad de determinar la dosis que se puede tolerar máxima por medio de un examen físico para determinar la presencia y severidad de efectos secundarios, tales como, hablar de manera poco clara, coordinación letárgica o dañada.

En este contexto, una dosis terapéuticamente efectiva del
15 agente(s) biológicamente activo puede incluir dosis repetidas dentro de un régimen de tratamiento prolongado que producirán resultados clínicamente significativos para proveer un efecto neuroprotector. La determinación de dosis efectivas en este contexto normalmente se basa en los estudios del modelo animal seguido por los ensayos clínicos en humanos y está guiada por
20 la determinación de dosis y protocolos de administración efectivos que reducen de manera significativa la ocurrencia o severidad de síntomas o condiciones de relación con el objetivo en un sujeto. Los modelos adecuados en este sentido incluyen, por ejemplo, ratones murine, ratas, cerdos, felinos,

primates no humanos y otros sujetos de modelo animal aceptados conocidos en la materia.

De manera alternativa, las dosis pueden ser determinadas utilizando modelos *in Vitro* (por ejemplo, ensayos inmunológicos e histopatológicos). Utilizando dichos modelos, únicamente los cálculos ordinarios y los ajustes son requeridos de manera normal para determinar una concentración adecuada y una dosis para administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del agente(s) biológicamente activo (por ejemplo, cantidades que son efectivas en forma intranasal, transdérmicamente efectivas, intravenosamente efectivas o intramuscularmente efectivas para obtener una respuesta deseada).

En una modalidad de ejemplo de la presente invención, las formas de dosificación unitarias de los compuestos, son preparadas para los regímenes de administración estándar. En este sentido, la composición puede ser subdividida fácilmente en dosis más pequeñas bajo la dirección del médico. Por ejemplo, las dosificaciones unitarias pueden ser integradas en polvos empaquetados, frascos o ampolletas y preferentemente en forma de cápsula o tableta.

El compuesto activo presente en estas formas de dosificación unitaria de la composición pueden estar presentes en una cantidad de, por ejemplo, desde aproximadamente 25 mg hasta aproximadamente 800 mg o preferentemente en cantidades de dosificación unitarias de aproximadamente 50, 100, 200, 250, 400, 450, 500 y 600 mg de uno o más compuestos de

carbamato activos de la presente invención, para administración diaria única o múltiple, de acuerdo con la necesidad particular del paciente.

Los métodos de la presente invención también se proveen para equipos que se utilizan para proporcionar neuroprotección. Después de que
5 una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos de carbamato de la presente invención, con la posible adición de uno o más de otros compuestos de beneficio terapéutico se ha formulado en un vehículo adecuado, ésta se puede colocar en un contenedor adecuado y ser etiquetada para proveer neuroprotección. Adicionalmente, otros productos farmacéuticos
10 que comprenden por lo menos un agente terapéutico diferente útil para proveer neuroprotección, tratamiento de epileptogénes, epilepsia u otro padecimiento o condición asociado con lesión neuronal puede ser colocado en el contenedor también y ser etiquetado para el tratamiento de la enfermedad indicada. Dicha etiquetación puede incluir, por ejemplo, instrucciones con
15 respecto a la cantidad, frecuencia y método de administración de cada compuesto farmacéutico.

Aunque la invención anterior ha sido descrita con detalle a modo de ejemplo, con el objeto de lograr claridad de la comprensión, será evidente para el experto que determinados cambios y modificaciones están
20 comprendidos por la descripción y pueden ser practicados sin experimentación excesiva dentro del alcance de las Reivindicaciones anexas, las cuales son presentadas a modo de ilustración, no de limitación. Los

siguientes ejemplos se proveen para ilustrar los aspectos específicos de la presente invención y no pretenden ser limitantes.

EJEMPLOS EXPERIMENTALES

5

Las actividades de un compuesto de la Fórmula (I) y la Fórmula (II) para utilizarse para proveer neuroprotección fueron evaluadas en los siguientes ejemplos experimentales. La actividad de un enantiómero S aislado de la Fórmula 1 (por ejemplo, Fórmula 7 mostrada anteriormente), en la presente denominada como el "compuesto de prueba" o "TC" o "compuesto de examen" se evaluó en los siguientes experimentos para determinar la eficacia del compuesto para neuroprotección y en el tratamiento de epileptogénesis en el modelo de epilepsia de lóbulo temporal inducida por litio y pilocarpina en la rata en los Ejemplos 1 y 2, y en otros modelos de animal útiles para la predicción de efectos neuroprotectores. Estos ejemplos tienen la intención de ser una forma que ilustra diversas modalidades de la presente invención aunque no tiene la intención de limitar la presente invención en sentido alguno.

20

EJEMPLO 1

El modelo de litio-pilocarpina de la epilepsia de lóbulo temporal

El modelo inducido en ratas mediante la pilocarpina asociada
5 con litio (Li-Pilo) reproduce la mayoría de las características clínicas y
neurofisiológicas de la epilepsia de lóbulo temporal humana (Turski et al.,
1989, Synapse 3: páginas 154 a 171; Cavalheiro, 1995, Ital J Neurol Sci 16:
páginas 33-37). En ratas adultas, la administración sistémica de pilocarpina
conduce a estado epiléptico (SE). El índice de letalidad alcanza del 30 al 50%
10 durante los primeros días. En los animales que sobreviven, el daño neuronal
predomina dentro de la formación del hipocampo, las cortezas piriformes y
entorinales, el tálamo, complejo amigdalóide, neocorteza y sustancia nigra.
Este período de convulsiones agudas es seguido por una fase libre de
convulsiones "silenciosa" que tiene una duración media de 14 a 25 días
15 después de lo cual todos los animales exhiben convulsiones recurrentes a una
frecuencia normal de 2 a 5 por semana (Turku et al., 1989, Synapse 3:
páginas 154 a 171; Cavalheiro, 1995, Ital J Neurol Sci 16: páginas 33 a 37;
Dubé et al., 2001, Exp Neurol 167: páginas 227 a 241).

20

Litio-carpina y tratamiento con el compuesto de prueba

Las ratas Wistar macho con un peso de 225 a 250 g, provistas
por Janvier Breeding Center (Le Genest-St.Iste, France) fueron alojadas bajo
condiciones estándar controladas (ciclo luz/oscuridad, luces encendidas de

7.00 a.m a 7.00 p.m.), con alimentos y agua disponibles *ad libitum*. Toda la experimentación con animales se realizó de acuerdo con las reglas de la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas del 24 de noviembre de 1986 (86/609/EEC), y el Departamento de Agricultura Francés (licencia No. 5 67-97). Para la implantación de electrodos, las ratas fueron anestesiadas mediante una inyección i.p. de 2.5 mg/kg de diazepam (DZP, Valium, Roche, France) y 1 mg/kg de Clorhidrato de cetamina (Imalgene 1000, Rhone Merrieux, Francia). Cuatro electrodos de registro de contacto único se colocaron en el cráneo, sobre la corteza parietal, dos a cada lado.

10

Inducción de estado epiléptico: tratamiento con el compuesto de prueba y ocurrencia de convulsiones recurrentes espontáneas (srs)

Todas las ratas recibieron cloruro de litio (3 meq/kg, i.p., Sigma, St Louis, Mo, E.U.A.); aproximadamente 20 horas después, los animales 15 fueron colocados en cajas de plexiglás, con el objeto de registrar el EEG cortical en el punto de partida. Se administro bromuro de metilscopolamina (1 mg/kg, s.c., Sigma) para limitar los efectos periféricos de los convulsivos. Se indujo SE mediante la inyección de clorhidrato de pilocarpina (25 mg/kg, s.c., Sigma) 30 minutos después de metil-escopolamina. La actividad cortical EEG 20 bilateral se registro durante la duración completa de la SE y los cambios de conducta fueron observados.

Los efectos de dosis incrementadas del Compuesto de prueba fueron estudiadas en 3 grupos de ratas. Los animales del primer grupo

recibieron 10 mg/kg del compuesto de prueba, i.p., 1 hora después del inicio de SE (pilo-TC10) mientras que los animales de los grupos 2 y 3 recibieron 30 y 60 mg/kg del Compuesto de prueba (pilo-TC30 y pilo-TC60), respectivamente.

- 5 A otro grupo se inyectaron 2 mg/kg de diazepam (DZP, i.m.) una hora después del inicio de SE, el cual es el tratamiento estándar para mejorar la supervivencia de los animales después de SE (pilo-DZP). El grupo de control recibió solución salina en lugar de pilocarpina y el compuesto de prueba (solución salina – solución salina). Las ratas con pilo-Compuesto de
- 10 prueba supervivientes al SE entonces recibieron una inyección aproximadamente 10 horas después de la inyección del primer compuesto de prueba con una segunda inyección i.p. de la misma dosis del compuesto de prueba y se mantuvieron bajo un tratamiento dos veces al día con el compuesto de prueba durante 6 días adicionales. El grupo Pilo-DZP recibió
- 15 una segunda inyección de 1 mg/kg de DZP en el día de las SE aproximadamente 10 horas después de la primera de éstas. Después de lo cual, las ratas con pilo-DZP y solución salina – solución salina, recibieron dos veces diariamente un volumen equivalente de solución salina.

- Los efectos del compuesto de prueba en el EEG y en la latencia
- 20 para la ocurrencia de SRS se investigaron mediante video grabación diaria de los animales durante 10 horas al día y la grabación de la actividad electrográfica dos veces a la semana durante 8 horas.

Cuantificaciones de densidades celulares

La cuantificación de densidades celulares se realizó 6 días después del SE en las 8 ratas pilo-DZP, 8 ratas pilo-TC10, 7 ratas pilo-TC30, 7 ratas pilo-TC60 y 6 ratas solución salina – solución salina. A los 14 días después del SE, los animales fueron anestesiados profundamente con 1.8 g/kg de pentobarbital (Dolenthal®, Vetoquinol, Lure, Francia). Los cerebros fueron entonces removidos y congelados. Se cortó una serie de cortes de 20 µm en un criostato, se secaron al aire durante varios días antes del manchado con tionina.

10 * La cuantificaciones de las densidades celulares se realizó con una rejilla microscópica de 1 cm² de cuadros de 10 x 10 en las secciones coronales de acuerdo con las coordenadas estereotáficas del atlas de cerebro de rata. (Véase la publicación de Paxinos G. Watson C (1986), The rat brain en estereotaxic coordinates, 2da edición, Academic press, San Diego)

15 * Los conteos celulares fueron realizados dos veces en forma ciega y fueron conteos promediados involucrados únicamente en células mayores a 10 µm, las más pequeñas se consideraron células gliales.

Manchado de timm

20 2 meses después del inicio de las convulsiones recurrentes espontáneas, el brote de fibra musgosa se examinó en las ratas en el período crónico expuestas al compuesto de prueba o DZP en las 3 ratas solución salina-solución salina. Los animales fueron anestesiados profundamente e

inundadas transcárdialmente con solución salina seguido por 100 ml de Na₂S al 1.15% (p/v) en 0.1 M de regulador de fosfato, y 100 ml de formaldehído al 4% /v/v). Los cerebros fueron removidos del cráneo, se les colocó posteriormente en formaldehído al 4% durante un período de 3 a 5 horas y se
5 cortaron secciones de 40 µm en un vibratomo deslizante y se montaron sobre piezas cubiertas con gelatina.

Al día siguiente, las secciones se desarrollaron en la oscuridad en una solución a una temperatura de 26°C de goma arábica al 50% (p/v) (160 ml), regulador de citrato de sodio (30 ml), hidroquinona al 5.7% (p/v) (80
10 ml) y nitrato de plata al 10% (p/v) (2.5 ml) durante un período de 40 a 45 minutos. Las secciones fueron entonces lavadas con agua del grifo a una temperatura de 40°C durante por lo menos 45 minutos, se enjuagó rápidamente con agua destilada y se les dejó secar. Fueron deshidratados en etanol y se cubrieron ligeramente.

15 El brote de fibra de musgo se evaluó de acuerdo con los criterios descritos anteriormente en el hipocampo dorsal (Cavazos, et al., 1991, J. Neurosci 11: páginas 2795 a 2803), los cuales son de la siguiente manera: 0 – sin gránulos entre las puntas y la cresta del DG; 1 – gránulos escasos en la región supergranular en una distribución desigual entre las puntas y la cresta
20 de DG; 2 – gránulos más numerosos en una distribución continua entre las puntas y la cresta de DG; 3 - gránulos prominentes en un patrón continuo entre las puntas y la cresta, con parches ocasionales de gránulos confluentes entre las puntas y la cresta; 4 – gránulos prominentes que forman una banda

laminar densa confluyente entre las puntas y la cresta y 5 – banda laminar densa confluyente de gránulos que se extienden en la capa molecular interior.

Análisis de los datos

5 Para la comparación de las características de SE en los animales con pilo – solución salina y pilo – compuesto de prueba, se utilizó una prueba t de estudiantes no dispuesta en pares. La comparación entre el número de ratas con convulsiones en ambos grupos se realizó por medio de una prueba de Chi cuadrada. Para el daño neuronal, el análisis estadístico
10 entre los grupos se realizó utilizando ANOVA seguido de una prueba de Fisher para las comparaciones múltiples utilizando el software Statview (Fisher RA, 1946a, Statistical methods for research workers (10ava. Edición) Oliver & Boyd, Edinburgh; Fisher RA, 1946b, The design of experiments (4ta. edición) Oliver & Boyd, Edinburgh).

15

Características de conducta y EEG de estado epiléptico litio-pilocarpina

Un número total de ratas Sprague-Dawle que pesan de 250 a 330 g, se sometieron a SE inducida por Li-pilo. Las características de
20 conducta de SE fueron idénticas en los grupos de compuestos tanto pilo-salina como pilo-prueba. Dentro de 5 minutos después de la inyección de pilocarpina, las ratas desarrollaron diarrea, piloerección y otras señales de estimulación colinérgica. Durante los siguientes 15 a 20 minutos, las ratas

exhibieron balanceo de cabeza, rascadura, masticado y conducta exploradora. Las convulsiones recurrentes empezaron aproximadamente a los 15 a 20 minutos después de la administración de pilocarpina. Estas convulsiones, las cuales fueron asociadas con los episodios de mioclonia de pata delantera de

5 cabeza y bilateral con crianza y caídas que progresaron a SE en aproximadamente 35-40 minutos después de la pilocarpina, como se describió anteriormente (Tursky, et al., 1983, Behav brain res 9: páginas 315 a 335).

Patrones EGG durante SE

Durante la primera hora de SE, en la ausencia de tratamiento farmacológico, la amplitud del EGG incrementó en forma progresiva mientras que disminuyó la frecuencia. Dentro de un período de 5 minutos después de la inyección de pilocarpina, la actividad EEG de antecedente normal se reemplazó con una actividad rápida de voltaje bajo en la corteza, mientras que el ritmo theta (5 a 7 Hz) apareció en el hipocampo. Durante 15 a 20 minutos, la actividad rápida de voltaje alta se sobrepuso al ritmo theta del hipocampo y los picos de voltaje alto aislados se registraron únicamente en el hipocampo mientras que la actividad de la corteza no cambio de manera substancial.

35 a 40 minutos después de la inyección de pilocarpina, los animales desarrollaron convulsiones electrográficas típicas con actividad rápida de voltaje alto presente tanto en el hipocampo y la corteza, el cual ocurrió primero en la forma de ráfagas de actividad que preceden a las convulsiones y fueron seguidas por una serie continua de picos y polípicos de voltaje alto que duran hasta la administración de DZP o el compuesto de prueba. Aproximadamente de 3 a 4 horas de SE, el EEG del hipocampo se caracterizó por descargas electrográficas periódicas (PEDs, aproximadamente de un/seg) en el grupo pilo-DZP y en el grupo pilo-10 tanto en el hipocampo como en la corteza. La amplitud de actividad antecedente de EEG fue baja en los animales pilo-TC60. A las 6 a 7 horas del SE, la actividad de picos todavía estaba presente en la corteza y el hipocampo en las ratas tratadas DZP- y TC-10, mientras que la amplitud del EEG disminuyó y volvió a los

niveles del punto de partida en el hipocampo de las ratas TC30 y en ambas estructuras de las ratas tratadas con TC60. No existió diferencia entre los grupos TC10, TC30 y TC60. A las 9 horas del SE, los puntos aislados todavía se registraron en el hipocampo de las ratas tratadas con el compuestos de
5 prueba y ocasionalmente en la corteza. En ambas estructuras, la actividad antecedente fue de amplitud muy baja en ese momento.

Mortalidad inducida por SE

Durante las primeras 48 horas después del SE, el grado de
10 mortalidad fue similar en las ratas pilo-DZP (23%, 5/22), ratas pilo-TC10 (26%, 6/23), ratas pilo-TC30 (20%, 5/25). El índice de mortalidad se redujo en gran medida en las ratas pilo-TC60 en el cual únicamente alcanzó el 4% (1/23). La diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.01$).

15 Características EEG de la fase silenciosa y la ocurrencia de convulsiones recurrentes espontáneas

Los patrones EEG durante el período silencioso fueron similares en las ratas pilo-DZP y pilo-TC10, 30 ó 60. A las 24 y 48 horas, (días) después de SE, la EEG de punto de partida aún se caracterizó por la
20 ocurrencia de PEDs sobre los cuales, las ondas grades o puntas podrían ser superimpuestas. Entre 1 y 8 horas después de la inyección del compuesto de prueba o vehículo de inyección, no existió cambio en los grupos pilo-DZP ó pilo-TC10. En las ratas TC30 y TC60, la frecuencia y amplitud de PEDs

disminuyó tanto como 10 minutos después de la inyección y fueron reemplazados por los picos amplitud grande en el grupo TC30 y de amplitud baja en el grupo TC60. 4 horas después de la inyección, el EEG regresó a los niveles de punto de partida en los dos últimos niveles. 6 días después del SE, el EEG todavía fue de amplitud menor que antes de la inyección de pilocarpina y en la mayoría de los grupos los picos pueden aún ser registrados, ocasionalmente en las ratas pilo-DZP, TC10 y TC30. En las ratas pilo-TC60, la frecuencia de los picos de amplitud grande fue mayor que en todos los demás grupos.

Después de que el compuesto de prueba o vehículo-inyección, el registro EEG no fue afectado por la inyección en los grupos pilo-DZP y pilo-TC10. Las ratas pilo-TC30, la inyección indujo la ocurrencia de las ondas lentas en el EEG, tanto del hipocampo y la corteza y una frecuencia disminuida de los picos en las ratas pilo-TC60.

Todas las ratas expuestas a DZP, TC10 y TC30 y que fueron estudiadas hasta que la fase crónica desarrolló convulsiones recurrentes espontáneas (SRS) con una latencia similar. La latencia fue 18.2 ± 6.9 días ($n = 9$) en ratas pilo-DZP, 15.4 ± 5.1 días ($n = 7$) en ratas pilo-TC10, 18.9 ± 9.0 días ($n = 10$) en las ratas pilo-TC30. En el grupo de las ratas sometidas a TC60, un subgrupo de ratas se volvieron epilépticas con una latencia similar a aquella de los otros grupos, es decir, 17.6 ± 8.7 días ($n = 7$) mientras que otro grupo de ratas se volvió epiléptico con una demora mucho más larga que varía de 109 a 191 días posteriores al SE (149.8 ± 36.0 días, $n = 4$) y una rata

no se volvió epiléptica en una demora de 9 meses posteriores al SE. La diferencia en la latencia del SRS entre los subgrupos pilo-DZP, pilo-TC10, pilo-TC30 y el primer subgrupo de ratas pilo-TMP60 no fue estadísticamente significativo. Ninguna de las ratas solución salina – solución salina (n = 5) desarrollaron SRS.

Para calcular la frecuencia de convulsiones recurrentes espontáneas (SRS) en ratas expuestas a pilocarpina, se midió la severidad de la convulsión y la etapa III distinguida (convulsiones clínicas de los músculos faciales y los limbos anteriores) y convulsiones de etapa IV-V (formación y caída). La frecuencia de SRS etapa III por semana en las ratas tratadas con el compuesto DZP y pilo-prueba, fue variable entre los grupos. Esta fue baja, constante en los grupos pilo-DZP y pilo-TC60 (con inicio SRS temprano) durante las primeras tres semanas y desapareció durante la cuarta semana en el grupo tratado con pilo-DZP. La frecuencia de SRS en la etapa III fue mayor en el grupo pilo-TC10 que fue significativamente incrementada sobre los valores pilo-DZP durante las semanas 3 y 4. La frecuencia del SRS de etapa más severa IV-V, fue más alta durante la primera semana en la mayoría de los grupos, excepto los grupos tratados con pilo-TC30 y TC60 con inicio de convulsiones tardío en donde la frecuencia SRS fue constante durante la totalidad de las 4 semanas en el grupo TC30 y durante las primeras dos semanas en el grupo tratado con pilo-TC60 con inicio SRS tardío en el cual, ninguna de las convulsiones de etapa IV-V fueron convulsiones registrada después de la segunda semana. La frecuencia de SRS de etapa IV-V fue

reducida significativamente en los grupos tratados con TC10, TC30 y TC60 (con inicio de SRS temprana) (2.3-6.1 SRS por semana) en comparación con el grupo tratado con pilo-DZP (11.3 SRS por semana) durante la primera semana. Durante las semanas 2-4v, la frecuencia de SRS de etapas IV-V se redujo en todos los grupos en comparación con la primera semana, alcanzando valores de 2 a 6 convulsiones por semana, excepto en el grupo tratado con pilo-TC60 con inicio SRS temprano, en donde la frecuencia de las convulsiones se redujo de manera significativa a 0.6 a 0.9 convulsiones por semana en comparación con el grupo tratado con pilo-DZP en el cual, la frecuencia de SRS varió de 3.3 a 5.8.

Densidades celulares en el hipocampo, tálamo y corteza

En las ratas tratadas con pilo-DZP para las ratas tratadas con solución salina – solución salina, el número de células se disminuyó masivamente en la región CA1 del hipocampo (70% de pérdida celular en la capa celular piramidal) mientras que la región CAS fue dañada de manera menos extensiva (54% de pérdida celular en CA3a y el 31% en CA3b). En la circunvolución dentada, las ratas tratadas con pilo-DZP experimentaron pérdida celular extensiva en el pelo (73%) mientras que la capa celular de gránulo no mostró daño visible. Se observó el daño celular en el hipocampo ventral, aunque los conteos celulares no se realizaron en esta región. Se observó daño similar en el hipocampo ventral, aunque no se realizaron los conteos celulares en esta región. También se registró el daño extensivo en el

núcleo talámico lateral (91% de pérdida celular) mientras que el núcleo talámico mediodorsal se dañó de manera más moderada (56%). En la corteza piriforma, la pérdida celular fue total en las capas III-IV, que ya no fue visible y alcanzó el 53% en la capa II en las ratas pilo-DZP. En la corteza entorinal dorsal, las capas II y III-IV experimentaron un daño ligero (del 9 y el 15%, respectivamente). La capa II de la corteza entorinal ventral se preservó en su totalidad mientras las capas III-IV superaron una pérdida celular del 44%.

En el hipocampo de los animales tratados con el pilo-compuesto de prueba, la pérdida celular se redujo en comparación con las ratas tratadas con pilo-DZP en la capa piramidal CA1, en la cual, la pérdida celular alcanzó el 75% en los animales tratados con pilo-DZP y 35 y 16% en los animales tratados con pilo-TC30 ó pilo-TC60, respectivamente. Esta diferencia fue estadísticamente significativa en las dos dosis del compuesto de prueba. En la capa piramidal CAS, el compuesto de prueba no produjo protección alguna en el área CA3a, mientras que los 60 mg/kg de la dosis del compuesto de prueba fue significativamente neuroprotector en CA2b. En la circunvolución dentada, la pérdida en el pelo fue similar en los animales tratados con el pilo-compuesto de prueba (69-72%) y pilo-DZP (73%). En los dos núcleos talámicos, la dosis de 60 mg/kg también fue protectora para reducir el daño neuronal en el 65 y 42% en el núcleo lateral y mediodorsal, respectivamente. En la corteza cerebral, el tratamiento con el compuesto de pruebas produjo protección neuronal en comparación con el DZP únicamente en la dosis más alta, 60 mg/kg. En las dos dosis más bajas, 10 y 30 mg/kg, la pérdida total de

células y la desorganización del tejido observada en las capas III-IV de la corteza piriforme fue idéntica en las ratas tratadas con pilo-DZP y las ratas tratadas con pilo-compuesto de prueba y no permitió conteo alguno en ninguno de los grupos. En las capas II y III-IV de la corteza piriforme, el

5 tratamiento TC60 redujo el daño neuronal registrado en las ratas con pilo-DZP, el tratamiento con TC60 redujo el daño neuronal registrado en las ratas tratadas con pilo-DZP en un 41 y 44%, respectivamente. En la corteza entorinal ventral, la neuroprotección fue inducida mediante la administración de TC60 en las capas III-IV y alcanzó el 31% en comparación con las ratas

10 tratadas con pilo-DZP. En la corteza entorinal, hubo un agravamiento ligero de pérdida celular en las ratas tratadas con pilo-TC10 en comparación con las ratas tratadas con pilo-DZP en las capas III-IV de la corteza entorinal dorsal (28% más de daño) y las capas III-IV de la corteza entorinal ventral (35% más de daño). En las otras dosis del compuesto de prueba, la pérdida celular en la

15 corteza entorinal fue similar a aquel registrado en las ratas pilo-DZP.

Brote de fibra de musgo en el hipocampo

Todas las ratas que exhibieron SRS en los grupos tratados con pilo-DZP y pilo-TPM mostraron una intensidad similar de manchado Timm en la capa molecular interior de la circunvolución dentada (calificaciones de 2 a 4). El manchado de Timm estuvo presente tanto en las hojas superior e inferior de la circunvolución dentada. El valor medio de la calificación Timm en la hoja superior alcanzó de 2.8 ± 0.8 en las ratas tratadas con pilo-DZP ($n = 9$), 1.5 ± 0.6 en las ratas tratadas con pilo-TC10 ($n = 7$), 2.6 ± 1.0 en las ratas tratadas con pilo-TC30 ($n = 10$), y 1.5 ± 0.7 en el grupo completo de ratas tratadas con pilo-TC60 ($n = 11$). Cuando el grupo tratado con pilo-compuesto de prueba a 60 mg/kg se subdividió de acuerdo con la latencia para el SRS, el subgrupo con ocurrencia de SRS temprana mostró una calificación Timm de 1.8 ± 0.6 ($n = 6$) y el subgrupo de ratas con ocurrencia tardía o ausencia de SRS tuvo una calificación de Timm de 1.2 ± 0.6 ($n = 5$). Los valores registrados en las ratas tratadas con pilo-DZP fueron estadísticamente diferentes de manera significativa a partir de los valores en el subgrupo tratado con pilo-TC10 ($p = 0.032$) y pilo-TC60 con convulsiones tardías o sin ellas ($p = 0.016$).

Planteamiento y conclusiones

Los resultados del estudio presente muestran que un tratamiento de 7 días con el compuesto de prueba que empieza 1 hora después del inicio del SE, tiene la capacidad de proteger algunas áreas del cerebro del daño neuronal, por ejemplo, en la capa celular piramidal del área CA1 y CA3b, el tálamo mediodorsal, las capas II y II MV de la corteza piriforme y las capas III-IV de la corteza entorinal ventral, aunque únicamente en la dosis más alta del compuesto de prueba, es decir, 60 mg/kg. La última dosis del compuesto de prueba también tiene la capacidad de demorar la ocurrencia de SRS, por lo menos en un subgrupo de animales que se volvieron epilépticos con una demora media que fue de aproximadamente 9 pliegues más larga que en los otros grupos de animales y un animal no se volvió epiléptico en una demora de 9 meses después del SE.

Estos resultados muestran que un compuesto con propiedades anti-ictales, las cuales son las propiedades clásicas de la mayoría de los fármacos comercializados como antiepilépticos, también tiene la capacidad de demorar la epileptogénesis, es decir, de ser antiepileptogénico. Los datos del estudio presente, muestran que también el tratamiento con el compuesto de prueba, cualquiera que sea la dosis utilizada, disminuye la severidad de la epilepsia, debido a que disminuye el número de convulsiones de la etapa IV-V, particularmente durante la primera semana de ocurrencia y durante el período completo de 4 semanas de observación con el compuesto de prueba a 60 mg/kg de tratamiento. Además, en el grupo TC10, existe un cambio a un

incremento en la ocurrencia de convulsiones de etapa III menos severas que no más numerosas que el grupo tratado con pilo-DZP.

EJEMPLO 2

5

El propósito de esta porción extendida del estudio fue de conformidad con el estudio reportado en el Ejemplo 1 anterior, en las propiedades neuroprotectoras potenciales y antiepileptogénica del mismo Compuesto de prueba (TC) en el modelo de litio-pilocarpina (Li-Pilo) de epilepsia del lóbulo temporal. En el primer estudio se mostró que el TC tuvo la capacidad de proteger las áreas CA1 y CA3 del hipocampo, la corteza entorinal piriforme y ventral del daño neuronal inducido por estado epiléptico (SE) Li-Pilo. La mayoría de estas propiedades neuroprotectoras ocurren en la dosis más alta estudiada, 60 mg/kg y el tratamiento tuvo la capacidad de demorar la ocurrencia de convulsiones espontáneas en un 36% (4 de 11) de las ratas. En el presente ejemplo, se estudiaron las consecuencias del tratamiento de dosis más altas de TC en el daño neuronal y epileptogénesis.

10

15

El modelo de litio-pilocarpina de epilepsia del lóbulo temporal

El modelo de epilepsia inducido en ratas mediante pilocarpina asociada con litio (Li-pilo) reproduce la mayoría de las características neurofisiológicas de la epilepsia del lóbulo temporal humano (véase, la
5 publicación de Turski L., Ikonomidou C, Turski WA, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA (1989) Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy, Synapse 3: páginas 154 a 171; Cavalheiro EA (1995) The pilocarpine model of epilepsy. Ital J Neurol Sci 16: páginas 33 a 37.

10 En ratas adultas, la administración sistémica de pilocarpina conduce a SE, el cual puede durara hasta 24 horas. El índice de letalidad alcanza del 30 al 50% durante los primeros días. En los animales supervivientes, el daño neuronal predomina dentro de la formación del hipocampo, las cortezas piriforme y entorinal, talamo y complejo amigdaloides,
15 la neocorteza y la sustancia nigra. Este período de convulsiones agudo es seguido por una fase libre de convulsiones "silencioso" que tiene una duración media de 14 a 25 días después de los cual, todos los animales exhibieron convulsiones recurrentes espontáneas a una frecuencia usual de 2 a 5 por semana (véase la publicación de Turski L, Ikonomidou C. Turski WA,
20 Bortolotto ZA, Cavalheiro EA (1989) Review: Cholinergic mechanisms and epileptogenesis, The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy Synapse 3: páginas 154 a 171; Cavalheiro EA (1995) The pilocarpine model of epilepsy. Ital J Neurol Sci 16: páginas 33 a

37; Dubé C. Boyet S, Marescaux C, Nehlig A (2001) Relationship between neuronal loss and interictal glucose metabolism during the chronic phase of the lithium-pilocarpine model of epilepsy in the immature and adult rat. *Exp Neurol* 167: páginas 227 a 241)).

5 Los fármacos anti-epilépticos actuales (AED's) no evitan la epileptogénesis y únicamente son eficientes en forma temporal en convulsiones recurrentes.

 En nuestro estudio anterior, se estudiaron los efectos neuroprotectores y antepileptogénicos potenciales de incrementar las dosis
10 del Compuesto de prueba (TC) que se administran en la monoterapia y en comparación con nuestro tratamiento de diazepam (DZP) estándar, en la mayoría de los casos evitó la mortalidad alta. Estos datos muestran que un tratamiento de 7 días con 10, 30 ó 60 mg/kg del TC empezando 1 hora después del inicio de SE, tiene la capacidad de proteger algunas áreas del
15 cerebro del daño neuronal. Este efecto es estadísticamente significativo en la capa celular piramidal del área CA1 y CA3b, el tálamo mediodorsal, las capas II y III-IV de la corteza piriforme y las capas III-IV de la corteza entorinal ventral, aunque únicamente en la dosis más alta del TC, es decir, 60 mg/kg. Adicionalmente, parece que la última dosis del TC también es la única que
20 tiene la capacidad de demorar la ocurrencia de convulsiones recurrentes espontáneas (SRS), por lo menos en un subgrupo de animales que se volvieron epilépticos con una demora media que fue de aproximadamente 9

dobles más larga que en los otros grupos de animales, y un animal no se volvió epiléptico en una demora de 9 meses después del SE.

En el presente estudio, los efectos de las dosis diferentes del Compuesto de prueba (TC), es decir, 30, 60, 90 y 120 mg/kg (TC30, TC60, TC90 y TC120) se probaron durante el uso del mismo diseño como en el estudio anterior. El tratamiento se inició una hora después del inicio de SE y los animales fueron tratados con una segunda inyección de la misma dosis del fármaco. Este tratamiento temprano de SE fue seguido por un tratamiento con TC de 6 días. Este reporte se refiere a los efectos de las cuatro dosis diferentes de TC en el daño neuronal evaluado en el hipocampo, cortezas parahipocampales, talamo y amígdala a 14 días después del SE y en la latencia para y la frecuencia de convulsiones epilépticas espontáneas.

Métodos

15

Animales

Las ratas Sprague-Dawley machos adultos provistas por Janvier Breeding Center (Le Genest-St-Isle, Francia) se alojaron bajo condiciones estándar controladas, en grupos pequeños a una temperatura de 20 a 22°C (ciclo de luz/oscuridad, 7.00 a.m. a 7.00 p.m., con las luces encendidas), con alimentos y agua disponible *ad libitum*. Toda la experimentación con animales se realizó de acuerdo con las reglas de la Directiva del Consejo de las

20

Comunidades Europeas del 24 de noviembre de 1986 (86/609/EEC), y el Departamento de Agricultura Francés (licencia No. 67-97).

Inducción de estado epiléptico: tratamiento con el compuesto de

5 prueba y ocurrencia de (SRS)

- Todas las ratas recibieron cloruro de litio (3 meq/kg, i.p., Sigma, St Louis, Mo, E.U.A.); y aproximadamente 20 horas después, todos los animales recibieron también bromuro de metilesopolamina (1 mg/kg, s.c., Sigma) se administró para limitar los efectos periféricos de los convulsivos.
- 10 Se indujo SE mediante la inyección de clorhidrato de pilocarpina (25 mg/kg, s.c., Sigma) 30 minutos después de metilescopolamina. Los efectos de dosis incrementadas del TC fueron estudiados en 5 grupos de ratas. Los animales del primer grupo recibieron ya sea 2.5 mg/kg de DZP, i.m., o 30, 60, 90 ó 120 mg/kg del TC, (TC30, TC60, TC90, TC120) i.p., hora después del inicio de S.
- 15 El grupo de control recibió el vehículo en lugar de la pilocarpina y el TC. Las ratas supervivientes al SE fueron entonces inyectadas aproximadamente 10 horas después de la primera inyección de TC con una segunda inyección i.p. de 1.25 mg/kg de DZP para el grupo tratado con DZP ó de la misma dosis de TC como en la mañana y se mantuvieron bajo un tratamiento de TC dos veces
- 20 al día durante 6 días adicionales mientras que las ratas tratadas con DZP recibieron una inyección de vehículo.

Los efectos del DZP y las 4 dosis de TC en la epileptogénesis se investigaron mediante la grabación en video diaria de los animales durante 10

horas al día. La grabación en video se realizó durante 4 semanas durante las cuales, la ocurrencia de la primera convulsión fue observada, así como también el número total de convulsiones durante el período completo. Los animales fueron entonces sacados del sistema de grabación en video y se mantuvieron durante 4 semanas adicionales en nuestras instalaciones para animales antes que fueran sacrificados después de un período total de 8 semanas de epilepsia. Las ratas que no exhibieron convulsiones fueron sacrificadas después de 5 meses de grabación en video.

10 Cuantificación de densidades celulares

La cuantificación de densidades celulares se realizó en dos ocasiones después del SE: se estudió un primer grupo 14 días después del SE y se compuso por 7 ratas tratadas con DZP, 8 ratas tratadas con TC30, 11 ratas tratadas con TC60, 10 ratas tratadas con TC90, 8 ratas tratadas con TC120, 8 ratas de control que no se sometieron a SE. Un segundo grupo utilizado para el estudio de la latencia de SRS se sacrificó ya sea a las 8 semanas después de la primera SRS ó a los 5 meses, cuando no se pudo observar SRS en esa demora de tiempo y se compuso por 14 ratas tratadas con DZP, 8 ratas tratadas con TC30, 10 ratas tratadas con TC60, 11 ratas tratadas con TC90, 9 ratas tratadas con TC120. Hasta el momento, el conteo neuronal todavía se encuentra en progreso en el segundo grupo de animales estudiados para epileptogénesis y conteo a largo plazo y los datos conciernen a aquella parte del estudio que no estará incluida en el reporte actual.

Para el conteo neuronal, los animales fueron anestesiados profundamente con 1.8 g/kg de pentobarbital (Dolethal®, Vétoquinol, Lure, Francia). Los cerebros fueron entonces removidos y congelados. Una serie de cortes de 20 μm fueron cortados en un criostato, secados al aire durante

5 varios días antes del manchado con tionina. La cuantificación de densidades celulares se realizó con una rejilla microscópica de 1 cm^2 con cuadros de 10 x 10 sobre las secciones coronales de acuerdo con las coordenadas esterotáxicas del atlas de cerebro de rata (Paxinos G, Watson C (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2da. Edición., Academic press, San

10 Diego). La rejilla de conteo fue colocada en un área definida del depósito de la estructura cerebral de interés y el conteo fue realizado con un aumento microscópico de 200- ó 400 veces, definido para cada estructura cerebral única. Los conteos celulares fueron realizados dos veces a cada lado de tres secciones adyacentes para cada región mediante un observador no informado

15 del tratamiento de los animales. El número de células obtenido en los 12 campos contados en cada estructura cerebral fue promediado. Este procedimiento se utilizó para reducir al mínimo los errores potenciales que podrían resultar del conteo doble que conduce a una sobreestimación de los números de células. Las neuronas que tocan los bordes inferior y derecho de

20 la rejilla no se contaron. Los conteos involucraron únicamente a las neuronas con cuerpos celulares más largos de 10 μm . Las células con cuerpos celulares pequeños fueron consideradas como células glial y no fueron contadas.

Análisis de los datos

Para el daño neuronal y la epileptogénesis, el análisis estadístico entre los grupos se realizó por medio de un análisis de una vía de variación seguido por una prueba post-hoc de Dunnett o Fisher utilizando el Software

5 Statistica.

Resultados

Características de conducta de estado epiléptico de litio-

10 pilocarpina

Un número total de 143 ratas Sprague-Dawley que pesan de 250 a 330 g, se sometieron a SE inducido por litio-pilocarpina (Li-pilo). En este número, 10 no desarrollaron SE mientras que 133 ratas desarrollaron un SE Li-pilo característico completo. Las características de conducta del SE fueron

15 idénticas, tanto en los grupos li-pilo-DZP como li-pilo-TC. Dentro de 5 minutos después de la inyección de pilocarpina, las ratas desarrollaron diarrea, piloerección y otros signos de estimulación colinérgica. Durante los siguientes 15 a 20 minutos, las ratas exhibieron balanceo de cabeza, rasguños, masticar y conducta exploradora. Las convulsiones recurrentes empezaron

20 aproximadamente de 15 a 20 minutos después de la administración de pilocarpina. Estas convulsiones, que se asociaron con episodios de mioclonia las patas delanteras bilaterales y cabeza con crianza y caída progresadas a SE en aproximadamente de 35 a 40 minutos después de la pilocarpina como

se describió anteriormente (Turski L., Ikonomidou C, Turski WA, Bortolotto ZA, Cavaleiro EA (1989) Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy, *Synapse* 3: páginas 154 a 171; Dubé C. Boyet S, Marescaux C, 5 Nehlig A (2001) Relationship between neuronal loss and interictal glucose metabolism during the chronic phase of the lithium-pilocarpine model of epilepsy in the immature and adult rat. *Exp Neurol* 167: páginas 227 a 241)). André V, Rigoulot MA, Koning E, Ferrandon A, Nehlig A (2003) Long term pregabalin treatment protects basal cortices and delays the occurrence of 10 spontaneous seizures in the lithium-pilocarpine model in the rat. *Epilepsia* 44: páginas 893 a 903). El grupo de control no se sometió a SE y que recibió litio y composición salina estuvo compuesto de 20 ratas.

En el grupo de 57 animales dedicados al conteo celular a los 14 días después de SE, un número total de 13 ratas murió durante las primeras 15 48 horas después del SE. El grado de mortalidad varió con el tratamiento: 36% (4/11) de las ratas tratadas con DZP, el 33% (4/12) de las ratas tratadas con TC30, el 8% (1/12) de las ratas tratadas con TC60, el 0% (0/10) de las ratas tratadas con TC90 y el 33% (4/12) de las ratas tratadas con TC120 murieron. En el grupo de las ratas tratadas con DZP, las 4 ratas murieron en 20 las primeras 24 horas después del SE. En el grupo de las ratas tratadas con TC30, una rata murió en el día del SE, una rata murió 24 horas después del SE. En el grupo de las ratas tratadas con TC120, dos ratas murieron a las 24 horas y dos a las 48 horas después del SE.

En el grupo de 55 animales dedicados al estudio de latencia para el SRS y el conteo celular tardío, el grado de mortalidad durante las primeras 48 horas después del SE fue el siguiente: el 7% (4/14) de las ratas tratadas con DZP, el 27% (3/11) de las ratas tratadas con TC30, el 0% (0/10) de las ratas tratadas con TC60, el 0% (0/11) de las ratas tratadas con TC90 y el 0% (0/9) de las ratas tratadas con TC120 murieron. En el grupo de las ratas tratadas con DZP, una rata murió en las primeras 24 horas después del SE. En el grupo de las ratas tratadas con TC30, dos ratas murieron a las 24 horas y una rata a las 48 horas después del SE.

En las ratas tratadas con DZP en comparación con las ratas de control, el número de neuronas fue disminuido masivamente en la región CA1 del hipocampo (85% cayeron en la capa celular piramidal) mientras que la región CA3 fue dañada de manera menos extensiva (40% de pérdida) (Cuadro 1 y la Figura 1). En la circunvolución dentada, las ratas tratadas con DZP experimentaron pérdida neuronal extensiva en el pelo (65%) mientras que la capa celular granular no mostró daño palpable. La misma distribución del daño se observó en el hipocampo ventral aunque los conteos celulares no fueron realizados en esta región.

En el tálamo, la pérdida neuronal fue moderada en el mediodorsal central y lateral, el dorsolateral medial dorsal y en el núcleo medial central (18, 24, 40 y 34% cayeron, respectivamente), más marcado en el núcleo mediodorsal (49%) y mayor en la división lateral ventral del núcleo dorsolateral (90% (Cuadro 1 y Figura 2). En la amígdala, la pérdida neuronal

fue moderada en el núcleo posterior ventral medial (38%) y más marcado en el núcleo anterior basolateral y medial dorsal (73 y 53% de caída, respectivamente). No existe daño neuronal en el núcleo central (Cuadro 1 y Figura 3).

- 5 En la corteza piriforme, la pérdida neuronal fue casi total en la capa III (94%) la cual ya no fue realmente visible y alcanzó el 66 y el 89% en la capa II dorsal y ventral, respectivamente en las ratas tratadas con DZP en comparación con las ratas tratadas con solución salina de control. En la corteza entorinal dorsal, las capas II y III-IV experimentaron un daño ligero (18 y 24%, respectivamente) y en las capas ventrales II y III/IV, el daño alcanzó el 22 y el 74%, respectivamente (Cuadro 1 que se encuentra a continuación y la Figura 4).
- 10

CUADRO 1

**Efectos del dosis incrementadas del Compuesto de Prueba (TC) en el
número de cuerpos celulares neuronales en el hipocampo, talamo,
amígdala y corteza cerebral de las ratas sometidas a SE por li-pilo**

5		Control (n=10)	Pilo- DZP (N=7)	Pilo- TC30 (N=8)	Pilo- TC60 (N=11)	Pilo- TC90 (N=10)	Pilo- TC120 (N=8)
	Hipocampo						
	Área CA1	74.8 ± 1.5	10.9 ± 1.9 **	39.3 ± 4.4 **○○	31.9 ± 4.4 ** ○○	47.7 ± 6.6 *○	65.5 ± 2.9 ○○
	Área CA3	52.1 ± 2.7	31.3 ± 2.9 **	35.7 ± 1.8 **	31.6 ± 1.4 **	35.1 ± 2.9 **	39.8 ± 1.5 **
10	Pelo	96.4 ± 3.5	33.5 ± 3.0 **	33.0 ± 3.2 **	32.8 ± 3.3 **	37.5 ± 3.1 **	44.8 ± 2.9 **
	Tálamo						
	Mediodorsal medial	31.9 ± 0.9	16.4 ± 1.9 **	11.5 ± 2.5 **	19.1 ± 2.6 **	23.1 ± 2.8 ○○	28.6 ± 0.8 ○○
	Mediodorsal central	31.9 ± 1.2	26.3 ± 1.8 **	26.9 ± 0.6 *	24.1 ± 1 **	27.4 ± 1.5	29.9 ± 1.7 ○
15	Mediodorsal lateral	25.9 ± 0.6	19.6 ± 0.8 **	20.5 ± 0.7 **	18.9 ± 0.6 **	22 ± 1.2 *○	24.4 ± 1.1 ○○
	Dorsolateral, medial, dorsal	102.2 ± 2.5	61 ± 6.3 **	64.2 ± 9.3 **○○	77.5 ± 3.9 **○○	79.4 ± 3.1 **○○	89.8 ± 3.7 *○
	Dorsolateral, ventral lateral	97.8 ± 1.7	9.7 ± 2.5 **	8.8 ± 2.8 **	56.7 ± 8.7 **	71.8 ± 5.3 ○○*	79.0 ± 4.7 ○○
20	Central medial	113.1 ± 5.9	74.2 ± 7.4 *	75.6 ± 7.7 *	83.7 ± 9.6 *	88.2 ± 8.5	108.2 ± 6.6 ○

	Control (n=10)	Pilo- DZP (N=7)	Pilo- TC30 (N=8)	Pilo- TC60 (N=11)	Pilo- TC90 (N=10)	Pilo- TC120 (N=8)
Amígdala						
Basolateral	46.7 ± 1.2	12.8 ± 5.3 **	27.3 ± 4.9 **○	27.8 ± 4.3 **○○	40.7 ± 1.6 ○○	42.7 ± 1.3 ○○
Medial, dorsal anterior	84.3 ± 3.8	40.0 ± 2.5 **	46.8 ± 5.0 **	58.4 ± 2.8 **○	72.2 ± 5.7 ○○	80.2 ± 2.6 ○○
Medial, ventral posterior	35.1 ± 1.7	21.8 ± 2.4 **	22.3 ± 1.8 **	26.2 ± 2.9 **	30.7 ± 3.7 ○○	34.7 ± 1.7 ○○
Corteza cerebral						
Piriforme, capa II, dorsal	36.6 ± 0.8	12.6 ± 4.2 **	15.7 ± 2.9 **	27.5 ± 2.8 **○○	32.4 ± 1.1 ○○	35.2 ± 1.1 ○○
Piriforme, capa II, ventral	33.0 ± 0.8	3.6 ± 0.7 **	7.2 ± 3.8 **	13.7 ± 4.2 **	18.4 ± 4.0 ○○	30.5 ± 1.3 ○○
Piriforme, capa III	19.2 ± 0.7	1.2 ± 1.2 **	1.8 ± 1.8 **	6.4 ± 2.3 **	9 ± 3.0 ○○	15 ± 2.2 ○○
Entorinal, capa II, dorsal	29 ± 0.6	23.5 ± 0.7 **	23.4 ± 0.6 **	23.9 ± 0.5 **	26.3 ± 0.9 **	27.3 ± 0.5 ○○
Entorinal, capa II, ventral	26.8 ± 0.7	21.7 ± 1.3 **	22.7 ± 0.9	23.3 ± 0.8 **	25.4 ± 1.1 ○	25.1 ± 0.6
Entorinal, capa III/IV, dorsal	29.2 ± 0.9	22.3 ± 0.5 **	22.3 ± 0.5 **	23.2 ± 0.8 **	26.7 ± 0.8 *	26.4 ± 0.7 ○○
Entorinal, capa III/IV, ventral	28.7 ± 1.7	7.7 ± 2.3 **	13.2 ± 1.9 **	16.5 ± 2.2 **	23.7 ± 1.5 ○○	24.5 ± 1.4 ○○

* p < 0.05, ** p < 0.01, diferencia estadísticamente significativa entre las ratas

20 tratadas con pilo-TC y grupo de control li-solución salina.

○ p < 0.05, ○○ < 0.01, diferencias estadísticamente significativas entre las ratas

tratadas con pilo-TC y pilo-DZP

En el hipocampo de los animales tratados con TC, la pérdida celular se redujo de manera significativa en comparación con las ratas tratadas con DZP en la capa celular piramidal CA1. Esta reducción fue marcada en las ratas tratadas con TC30, 60, ó 90 (36 al 47% de pérdida celular) y prominente en el grupo de ratas tratadas con TC120 (12% de pérdida celular). Las diferencias fueron estadísticamente significativas en todas las dosis TC (Cuadro 1 y Figura 1). En la capa piramidal CA3, existió una tendencia a una neuroprotección ligera inducida por el Compuesto de prueba, únicamente en la dosis de 120 mg/kg aunque la diferencia con el grupo DZP no fue significativa. En la circunvolución dentada, la pérdida celular en la circunvolución en los grupos de DZP y TC30, 60 y 90 (caída del 61-66%) y existió una tendencia ligera al daño reducido en el grupo TC120 (pérdida neuronal del 53%) en comparación con los animales tratados con DZP (caída del 66%). Ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa.

En el tálamo, la pérdida neuronal fue similar en las ratas tratadas con DZP y TC30 y TC60. La TC fue significativamente protectora en la dosis de 60 mg/kg en el núcleo dorsal medial dorsolateral y las dos dosis más altas, 90 y 120 mg/kg en todo el núcleo talámico, aunque la diferencia no alcanzó un valor significativo en el núcleo central mediodorsal y medial central en las ratas tratadas con TC90. En el grupo tratado con TC120, la caída neuronal se redujo de manera considerable en comparación con las ratas tratadas con DZP. Esta caída varió del 4 al 19% y el número de neuronas ya no fue

significativamente diferente de los animales de control, excepto en el núcleo dorsal medial dorsolateral (Cuadro 1 y Figura 2). En la amígdala, la TC fue significativamente protectora en la dosis de 30 mg/kg en el núcleo basolateral y en una dosis de 60 mg, también en el núcleo anterior dorsal medial. En la
5 dosis más alta, la TC fue neuroprotectora en gran medida, el número de neuronas ya no fue significativamente diferente del nivel de control y alcanzó del 86 al 99% del nivel de control en todos los núcleos de amígdala (Cuadro 1 y la Figura 3).

En la corteza cerebral, el tratamiento con TC no protege de
10 manera significativa área cortical alguna en comparación con el tratamiento DZP en la dosis de 30 mg/kg. En una dosis de 60 mg/kg, el TC redujo de manera significativa la pérdida neuronal únicamente en la capa II de la corteza piriforme dorsal (caída del 25% en comparación con el 66% en el grupo tratado con DZP). En 90 y 120 mg/kg, el TC protegió de manera significativa
15 las tres áreas de la corteza piriforme en comparación con el tratamiento DZP y en la dosis más alta de TC, 120 mg/kg, la densidad neuronal alcanzó del 78 al 96% de los niveles de control, aún en la corteza piriforme, la capa II dorsal y la capa III fueron la población neuronal casi fue reducida en su totalidad en el grupo tratado con DZP. En todas las capas de la corteza entorinal dorsal y
20 ventral, las dos dosis más bajas de TC 30 y 60 mg/kg no produjo neuroprotección alguna. La dosis de 90 mg/kg de TC protegió de manera significativa las capas II y III/IV de la corteza entorinal ventral el 4 y el 17% de daño permaneció en las capas II y II/IV de la parte dorsal y en la capa II de la

parte ventral en comparación con el 19 y el 73% en el grupo tratado con DZP). En la dosis más alta de TC, 120 mg/kg, todas las partes de la corteza entorinal, tanto la parte dorsal como ventral fueron protegidas y el número de neuronas en estas áreas ya no fue significativamente diferente del nivel en los animales de control (del 85 al 94% de neuronas supervivientes en comparación con del 27 al 81% en el grupo tratado con DZP).

Latencia y frecuencia de convulsiones recurrentes

La latencia para convulsiones espontáneas alcanzó un valor medio de 15.5 ± 2.3 días en el grupo DZP (14 ratas) y fue similar 11.6 ± 2.5 días) en el grupo tratado con TC30 (8 ratas). A concentraciones más altas de TC, los animales podrían ser subdivididos en subgrupos con latencias cortas y largas. Una latencia corta fue considerada como cualquier duración más corta que 40 días después del SE. Algunas ratas exhibieron una latencia a la primera convulsión espontánea que fue similar a aquella grabada en los grupos tratados con DZP y TC, aunque el número de ratas exhibió estos valores de latencia cortos disminuyó de manera progresiva con el incremento en la concentración de TC. Por lo tanto, en la dosis de 30 mg/kg, el 70% de las ratas (7/10) tuvieron latencias cortas a las convulsiones aunque a 90 y 120 mg/kg, este porcentaje alcanzó el 36% (4/11) y 11% (1/9), respectivamente (Cuadro 2 que se encuentra a continuación y la Figura 5).

CUADRO 2**Efecto de dosis incrementadas de TC en la latencia de convulsiones espontáneas**

5

Tratamiento	Número de animales	Latencia para la primera convulsión espontánea (días)		
DZP	14	15.5 ± 2.34		
Pilo-TC30	8	11.6 ± 2.5		
Pilo-TC60	10	2 grupos		
		Latencia corta (N=7)	Latencia larga (n=3)	
		17.4 ± 5.4	76.7 ± 15.6 ** ○○	
Pilo-TC90	11	3 grupos		
		Latencia corta (n=4)	Latencia larga (n=2)	No epiléptico (n=5)
		14.8 ± 5.7	52.0 ± 1.0 *○	150**○○
Pilo-TC120	9	3 grupos		
		Latencia corta (n=1)	Latencia larga (n=4)	No epiléptico (n=4)
		13.0	84.5 ± 16.7 **○○	150**○○

10

** p < 0.01, * p < 0.05, diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo pilo-DZP

○○ p < 0.01, ○ < 0.05, diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de latencia corta

20

En los grupos TC60, 90 y 120, el valor medio de las ratas con latencias largas fue similar y varió de 52 a 85 días. Finalmente, en las dos dosis más altas de TC, se pudo identificar un porcentaje de ratas que no

desarrollaron convulsión alguna durante un período de 150 días posteriores al SE. El porcentaje de ratas epilépticas alcanzó el 45% en ambas dosis.

La frecuencia de convulsiones espontáneas fue similar durante las cuatro semanas de grabación. Esta mostró una tendencia a ser más alta en los grupos tratados con DZP y TC30, mientras que fue menor en los grupos tratados con TC60, 90 y 120 (Figura 6). Estas diferencias no alcanzaron un significado estadístico en el nivel de cada frecuencia semanal individual, aunque alcanzaron significado para el número total o medio de convulsiones durante las cuatro semanas.

El número de convulsiones también fue graficado de acuerdo con la duración de la latencia para la primera convulsión espontánea. Los animales con latencia corta mostraron una tendencia para desplegar de 2 a 3 veces más convulsiones durante las cuatro semanas de grabación que las ratas con un período de latencia largo. No se pudo realizar análisis estadístico debido a que el ANOVA no mostró significado alguno, más probablemente debido a que únicamente existe un animal en el sub-grupo de latencia corta para los animales tratados con TC120 (Figura 7). Sin embargo, cuando todos los valores de latencia fueron graficados contra el número de convulsiones, no existió una correlación inversa significativa que conduzca a una línea recta con un coeficiente de correlación de -0.4 (Figura 8).

Para finalizar este análisis, se realizarán dos mediciones más. La primera es un conteo celular en los animales que fueron grabados en video y seguidos durante 2 meses después de la primera convulsión espontánea o

fueron sacrificados a los 5 meses para estudiar la correlación potencial entre el alcance y ubicación del daño cerebral y la ocurrencia de y/o latencia para las convulsiones espontáneas. El segundo será realizar un seguimiento de un año de la ocurrencia de convulsiones en un grupo de ratas para estudiar si o
5 no, los animales que se declararon "no epilépticos" a los 5 meses permanecerán libres de convulsiones.

Los resultados del presente estudio muestran que un tratamiento con TC empezó 1 hora después del inicio del SE inducido por Li-pilo tiene propiedades neuroprotectoras en la capa celular piramidal CA1 del
10 hipocampo, y en todas las capas de la corteza piriforme y entorinal ventral y dorsal. El TC protege también el núcleo del tálamo y la amígdala. Sin embargo, el TC no es protector a una dosis de 30 mg/kg, excepto en el CA1, un núcleo talámico y una amígdala. En la dosis de 60 mg/kg, también se protegen la capa II de la corteza piriforme dorsal y un segundo núcleo de
15 amígdala. En las dosis de 90 y 120 mg/kg, el fármaco protege la mayoría de las regiones cerebrales estudiadas, excepto el CA3 del hipocampo y el pelo de la circunvolución dentada. Las últimas dos estructuras más el núcleo talámico dorsal ventral dorsolateral son las únicas regiones en donde el número de neuronas permanece significativamente diferente de los controles
20 en la dosis de 120 mg/kg del TC. A partir de estos datos, las propiedades de neuroprotección extremadamente poderosas del TC parecen ser claras. La molécula parece evitar la muerte neuronal en la mayoría de las regiones que pertenecen al circuito de la epilepsia límbica inducida por Li-pilo, es decir, el

hipocampo, tálamo, amígdala y cortezas del parahipocampo. Estas son todas las regiones en las cuales se ha detectado la señal MRI en el curso de la epileptogénesis en las ratas tratadas con Li-pilo (Roch C, Leroy C, Nehlig A, Namer IJ (2002a) Contribution of magnetic resonance imaging to the study of the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in adult rats. *Epilepsia* 43: páginas 325 a 335). Las únicas dos regiones que no son protegidas de manera eficiente por el TC son la capa celular piramidal CA3 y el pelo de la circunvolución dentada. La última región experimenta daño celular rápido y masivo (André V, Marescaux C, Nehlig A, Fritschy JM (2001) alterations of the hippocampal GABAergic system contribute to the development of spontaneous recurrent seizures in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 11: páginas 452 a 468; Roch C, Leroy C, Nehlig A, Namer IJ (2002a) Contribution of magnetic resonance imaging to the study of the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in adult rats. *Epilepsia* 43: páginas 325 a 335) y ninguna de la neuroprotección que se utilizó en los estudios anteriores tuvo la capacidad de proteger esta estructura. También, con base en estudios anteriores, se ha identificado esta estructura como un área clave en el inicio y mantenimiento de convulsiones epilépticas en el modelo LI-pilo. (Dubé C, Marescaux C, Nehlig A (2000) A metabolic and neuropathological approach to the understanding of plastic changes occurring in the immature and adult rat brain during lithium-pilocarpine induced epileptogénesis. *Epilepsia* 41 (Suppl 6): S36 a S43).

Obviamente, los datos presente demuestran que la epileptogénesis puede ser evitada aunque el daño permanece muy marcado en esta área. El conteo celular a largo plazo en el grupo de animales que ha sido grabado en video tendrá la capacidad de mostrar si o no es crítico el
5 alcance del daño en esta región para la epileptogénesis en este modelo.

El tratamiento no afecta la latencia de la primera convulsión espontánea en la dosis de 30 mg/kg. En las 3 dosis más altas, un porcentaje de los animales desarrollaron epilepsia tan pronto como las ratas tratadas con DZP ó TC30, aunque la importancia relativa de este subgrupo se relacionó de
10 manera inversa con la dosis del TC utilizada. Otro subgrupo, constante en el tamaño (2-4 animales por grupo) desarrollaron epilepsia después de una latencia de 4 a 6 veces más larga mientras que la dos dosis más altas del fármaco de 4 a 5 ratas no se volvieron epilépticas después de 5 meses, es decir, aproximadamente 10 veces la duración de la latencia corta y de 2 a 3
15 veces que la latencia larga. Esta demora en la ocurrencia de epilepsia se puede correlacionar con el número de neuronas protegidas en las cortezas basales en los animales. Esta suposición se basa en el hecho de que se ha observado cierta heterogeneidad en el alcance de la neuroprotección en las cortezas basales de los animales sometidos al conteo neuronal a corto plazo
20 14 días después del SE. Sin embargo, en este momento, no se ha desarrollado conteo neuronal en los animales utilizados para el estudio de epileptogénesis y por lo tanto, no se puede extraer conclusiones sobre la

relación potencial entre el número de neuronas supervivientes en las cortezas basales y el índice o regularidad de ocurrencia de epileptogénesis.

Los datos obtenidos en el presente estudio están alineados con el estudio anterior de este grupo que reporta que la dosis de 60 mg/kg del

5 Compuesto de prueba (TC) protegió el hipocampo y las cortezas basales del daño neuronal y demoró la ocurrencia de convulsiones recurrentes (véase el Ejemplo 1). Se confirma que la protección de las cortezas basales podría ser un factor clave para inducir un efecto modificador de enfermedad en el modelo de litio-pilocarpina de epilepsia. El papel clave de las cortezas basales como

10 los iniciadores del proceso epiléptico se demostró anteriormente mediante un grupo en el modelo de litio-pilocarpina (André V, Rigoulot MA, Koning E, Ferrandon A, Nehlig A (2003) Long term pregabalin treatment protects basal cortices and delays the occurrence of spontaneous seizures in the lithium-pilocarpine model in the rat. *Epilepsia* 44: páginas 893 a 903; Roch C, Leroy

15 C, Nehlig A, Namer IJ (2002a) Contribution of magnetic resonance imaging to the study of the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in adult rats. *Epilepsia* 43: páginas 325 a 335; Roch C, Leroy C, Nehlig A, Namer IJ (2002b) Predictive value of cortical injury for the developmen of temporal lobe epilepsy en P21-day old rats: a MRI approach using de lithium pilocarpine

20 model. *Epilepsia* 43: páginas 1129 a 1136.

Referenceas para el ejemplo 2

André V, Marescaux C, Nehlig A, Fritschy JM (2001) alterations
of the hippocampal GABAergic system contribute to the development of
5 spontaneous recurrent seizures in the lithium-pilocarpine model of temporal
lobe epilepsy. Hippocampus 11: páginas 452 a 468.

* André V, Rigoulot MA, Koning E, Ferrandon A, Nehlig A (2003)
Long term pregabalin treatment protects basal cortices and delays the
occurrence of spontaneous seizures in the lithium-pilocarpine model in the rat.
10 Epilepsia 44: páginas 893 a 903

* Cavaleiro EA (1995) The pilocarpine model of epilepsy, Ital J
Neurol Sci 16: páginas 33-37

* Dubé C, Marescaux C, Nehlig A (2000) A metabolic and
neuropathological approach to the understanding of plastic changes occurring
15 in the immature and adult rat brain during lithium-pilocarpine induced
epileptogenesis. Epilepsia 41 (Suppl 6): S36 a S43

* Dubé C, Boyet S, Marescaux C, Nehlig A (2001) Relationship
between neuronal loss and interictal glucose metabolism during the chronic
phase of the lithium-pilocarpine model of epilepsy in the immature and adult
20 rat. Exp Neurol 167: páginas 227 a 241

* Paxinos G, Watson C (1986), The rat brain en estereotaxic
coordinates, 2da edición, Academic Press, San Diego

* Roch C, Leroy C, Nehlig A, Namer IJ (2002a) Contribution of magnetic resonance imaging to the study of the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in adult rats. *Epilepsia* 43: páginas 325 a 335

5 * Roch C, Leroy C, Nehlig A, Namer IJ (2002b) Predictive value of cortical injury for the developmen of temporal lobe epilepsy en P21-day old rats: a MRI approach using de lithium pilocarpine model. *Epilepsia* 43: páginas 1129 a 1136

10 * Turski L., Ikonomidou C, Turski WA, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA (1989) Review: cholinergic mechanisms and epileptogénesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy, *Synapse* 3: páginas 154 a 171.

EJEMPLO 3

Modelo de extracción de suero celular PC12

15

La extracción de suero es un desafío ambiental citotóxico que tiene como resultado la muerte celular en las líneas celulares cultivadas, así como también en las células primarias de tejidos de orígenes diversos, incluyendo las células nerviosas. En particular, las células feocromocitoma (PC) 12, han sido empleadas ampliamente como un modelo celular neuronal in Vitro para una variedad amplia de padecimientos relacionados con muerte celular y degenerativa (Muriel, et al, Mitochondrial free calcium levels (Rhod-2 fluorescence) and ultrastructural alterations in neuronally differentiated PC12

20

cells during ceramide-dependent cell death, J. Comp Neurol., 2000 (426 (2),
paginas 297 a 315; Dermitzaki, et al, Opioids transiently prevent activation of
apoptotic mechanisms following short periods of serum withdrawal, J
Neurochem., 2000 74(3), páginas 960 a 969; Carlile, et al, Reduced apoptosis
5 after nerve growth factor and serum withdrawal: conversión of tetrameric
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to a dimer, Mol Pharmacol, 2000,
57(1), páginas 2 a 12). Las células PC12 fueron cultivadas en medio estéril
(RPMI 1640) complementado con suero de caballo inactivado de cabeza al
10% y suero bovino fetal al 5% (FBS). El medio de cultivo también contenía
10 antibiótico de Penicilina-estreptomicina-neomicina (50 .mu.g. 50 mu.g. 100
.mu.g, respectivamente). El medio fue cambiado cada día y las células fueron
pasadas en una confluencia cercana a fase de ingreso.

Las células de control fueron cultivadas en un medio regular sin
tratamiento alguno. Un enantiómero de la Fórmula 7 ó la Fórmula 8 (10
15 .mu.M) se mezcló bien en el medio y posteriormente se aplicó a las células.
Durante los dos días de ensayo, un enantiómero de la Fórmula 7 ó la Fórmula
8 (10 .mu.M) se aplicó a las células únicamente una vez en el momento de la
extracción de suero. Durante los 7 días del ensayo, un enantiómero de la
Fórmula 7 ó Fórmula 8 (10 mu.M) se aplicó a las células en el momento de la
20 extracción de suero y cada 48 horas después cuando las células fueron
cambiadas con suero fresco y nuevo-medio libre. En el grupo de extracción
de suero, las células fueron cultivadas en suero-medio libre sin enantiómero
adicional de la Fórmula 7 o la Fórmula 8. La supervivencia celular fue

determinada por el ensayo de sal interior de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboxi-metoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) en 2 ó 7 días después de la extracción de suero.

Al término del experimento, las células fueron lavadas con medio fresco e incubadas con solución MTS en una incubadora humidificada a una temperatura de 37 grados C con CO₂ al 5% durante 1.5 horas. Después del período de incubación, las células fueron analizadas inmediatamente utilizando un programa Softmax (Molecular devices). El ensayo MTS es un método calorimétrico para determinar el número de células viables en un parámetro experimental determinado. El ensayo se basa en la conversión celular de la sal de tetrazolio, MTS, en un formazan que es soluble en medio de cultivo de tejido y es medido directamente a 490 nm en placas de ensayo de 96 depósitos. La absorbancia es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo. La lectura de absorbancia arbitraria en las células de control es expresada con el índice de supervivencia del 100%.

El Cuadro 3 enlista los datos que demuestran el efecto del índice de supervivencia celular del enantiómero administrado en forma oral de la Fórmula 7 y la Fórmula 8 en el modelo de extracción de suero celular PC12

CUADRO 3**(% de índice de supervivencia celular)**

	Día 2 Índice de supervivencia (%)	Día 7 Índice de supervivencia (%)
Control	100	100
Libre de suero	49.6 ± 2.6	23.8 ± 2.6
Fórmula 7	69.4 ± 1.7^1	79.9 ± 4.0^2
Fórmula 8	66.4 ± 5.4^1	85.2 ± 0.6^2

EJEMPLO 4**El modelo de rata de isquemia cerebral transitoria**

El enantiómero de la Fórmula 7 (compuesto de prueba) se investigó en el modelo de rata de oclusión de arteria cerebral media (MCAO) de isquemia cerebral transitoria (como se describió en la publicación de Nagasawa H. y Kogure K., Stroke, 1989, 20, página 1037; y la publicación de Zea Longa E., Weinstein P. R., Carlson S. y Cummins R., Stroke, 1989, páginas 20 a 84) utilizando ratas Wistar macho a 10 y 100 mg/kg (i.v.). MK 801 (maleato de dizocilpine; Número de registro CAS 77086-22-7, un compuesto neuroprotector disponible comercialmente) se utilizó como un control positivo (3 mg/kg, i.p.)

Las ratas (n = 12) fueron asignadas de forma aleatoria a uno de cuatro grupos experimentales y fueron anestesiadas. El flujo sanguíneo de la arteria carótida interna, arteria cerebral anterior y arteria cerebral posterior en

la arteria cerebral media se bloqueó mediante este procedimiento. Una hora después del bloqueo, los animales fueron tratados durante un período de 1 hora con vehículo (administrado i.v. durante un período de una hora), control (administrado como una dosis unitaria i.p. en el inicio del período de una hora) y dos dosis del enantiómero de la Fórmula 7 (administrado i.v. durante el período de una hora). Dos horas después del bloqueo, se realizó la repercusión. Los animales fueron sacrificados y se prepararon secciones coronales de 20 mm de espesor de cada cerebro. Una de cada cuarenta secciones (es decir, cada 800 nM) del frente a la corteza occipital se utilizó para cuantificar el alcance de la lesión cerebral. Los pedazos fueron preparados utilizando secciones manchadas (de acuerdo con el procedimiento de Nissl) con cresilo violeta y se examinaron bajo un microscopio ligero.

Las áreas de superficie isquémica regional en las secciones coronales de las ratas individuales fueron determinadas de acuerdo con la presencia de células con cambios morfológicos. Las áreas de lesión o infarto neuronal fueron medidas y posteriormente agregadas. El volumen de la corteza y estriatum fueron calculados para cada animal (superficie isquémica total, área-veces 0.8 mm (espesor)).

20 Modelo de análisis MCAO

Los volúmenes medios ($\pm$ S.E.M.) para cada animal asignado en forma aleatoria a los cuatro grupos experimentales fueron comparados utilizando el ANOVA de una vía (el ANOVA de una vía es un método

estadístico el cual comparar 3 o más grupo no coincidentes) seguido por la prueba t de Dunnett (ambos métodos incorporados en el Software Statview 512+software, BarinPower, Calabasas, Calif., E.U.A.).

Como se muestra en el Cuadro 4 que se encuentra a continuación, los resultados fueron considerado estadísticamente significativos cuando el valor p fue de <0.05 en comparación con el grupo con vehículo ($^1 p < 0.01$; $^2 p < 0.05$).

CUADRO 4

10

Tratamiento	N	Volumen de infarto medio (mm ³) $\pm$ S.E.M.		
		Corteza	Estriatum	Volumen total
Vehículo, 10 mL/kg	12	275.5 $\pm$ 27.1	79.4 $\pm$ 3.6	354.9 $\pm$ 29.9
MK 801 @ 3 mg/kg	12	95.8 $\pm$ 24.5 ¹	56.1 $\pm$ 5.3 ²	151.9 $\pm$ 28.7 ¹
Fórmula 7 @ 10 mg/kg	12	201.0 $\pm$ 23.9	75.9 $\pm$ 2.6	276.9 $\pm$ 25.4
Fórmula 7 @ 100 mg/kg	12	98.8 $\pm$ 29.5 ¹	63.0 $\pm$ 5.9 ²	161.9 $\pm$ 34.3 ¹

15

EJEMPLO 5

20

El compuesto de prueba (TC) referido en el ejemplo anterior es el compuesto de la Fórmula 7 y el mismo compuesto que en los otros Ejemplos 1 y 2 anteriores.

El propósito de este estudio fue evaluar la farmacocinética (PK) del Compuesto de prueba (TC) después de la administración oral única y repetida en hombres adultos saludables en dosis clínicamente relevantes.

5 Métodos

Se condujeron dos estudios centro único, controlado por placebo, doble ciego, dosis ascendente en hombres saludables de ≥ 18 y ≤ 45 años. En el estudio 1 (N = 70), los sujetos fueron asignados en forma aleatoria a una dosis única del Compuesto de prueba (TC) ó placebo. Las
10 dosis escaladas fueron recibidas en la forma de 100, 250, 400, 750, 1000, 1250 y 1500 mg. Los parámetros PK fueron estimadas a partir de las muestras de plasma y orina recolectadas hasta 3 días después de la dosis. El Estudio 2 (N=53) evaluó el PK de las dosis repetidas del Compuesto de prueba (TC) en 4 grupos de dosificación (100, 250, 500 ó 750 mg). Dentro de
15 cada grupo, 12 sujetos fueron asignados al tratamiento q12h con fármaco o placebo durante 1 semana y se cruzaron después de un período de ineficacia de 14 días. Los parámetros PK fueron estimados para las muestras de plasma y orina en los días 1 y 7.

Resultados

Dosis única: El Compuesto de prueba (TC) fue absorbido rápidamente después de la administración oral. Los valores C_{max} y $AUC_{0-\infty}$ se incrementaron en proporción con la dosis sobre el intervalo de 100 a 1500 mg.

- 5 El valor medio t_{max} varió de 1.3-2.7 horas. Los valores medias de $t_{1/2}$ (11.5 – 13.9 horas) CL/F (2.87 a 3.67 L/h) y Vd/F (52.1 a 66.3 L/h) fueron similares para los 7 grupos de dosificación.

- Dosis repetidas: las concentraciones en plasma del Compuesto de prueba (TC) alcanzaron el estado estable después de 3-4 días como fue
10 predicho a partir de su vida media de dosis única. La media t_{max} ocurrió 1.3 – 1.8 horas después de la dosificación. Los valores de media $t_{1/2}$ (11.9-12.8 horas) y CL/F (3.40 a 3.78 L/h) en el estado estable se pudieron comparar con los parámetros PK después de la administración de dosis única en el día 1 y en el Estudio 1. Los valores de estado estable C_{max} y AUC_{0-12} se
15 incrementaron en proporción con la dosis.

- Como se esperaba, existió un grado moderado de acumulación del Compuesto de prueba (TC); los valores de C_{max} y AUC_{0-12} fueron de aproximadamente dos veces más altos en el día 7 contra el día 1 ($P < 0.001$). Los estimados de Media CL_R para el Compuesto de prueba (TC) fueron de
20 $< 5\%$ de la eliminación oral media, sugiriendo que no existe eliminación renal como el mecanismo primario para la eliminación del Compuesto de prueba (TC).

Conclusiones

El compuesto de prueba (TC) exhibió un PK lineal después de las dosis única (100-1500 mg) y repetidas (100-750). Este se absorbió rápidamente y tuvo una vida media de eliminación media de 11.5 – 13.9 horas, permitiendo la dosificación dos veces al día. Después de la administración de q12h, el Compuesto de prueba (TC) se acumuló dos veces y fue eliminado principalmente mediante una trayectoria no renal.

Referencias citadas

10 Todas las referencias citadas en la presente están incorporadas en la misma como referencia en su totalidad y para todos los propósitos hasta el mismo alcance en que si cada publicación individual o Patente o solicitud de Patente fuera indicada de manera específica e individual para ser incorporada como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

15 El planteamiento de las referencias en la presente únicamente tiene la intención de resumir las declaraciones realizadas por sus autores y no se hace admisión de que cualquier referencia constituye la técnica anterior. Los solicitantes se reservan el derecho de desafiar la precisión y pertinencia de las referencias citadas.

20 La presente invención no estará limitada en términos de las modalidades particulares descritas en esta solicitud, las cuales tienen la intención de ser ilustraciones únicas de aspectos individuales de la presente invención. Muchas modificaciones y variaciones de la presente invención

pueden ser realizadas sin alejarse de su espíritu y alcance, como será evidente para aquellos expertos en la materia. Los métodos y aparatos funcionalmente equivalentes dentro del alcance de la presente invención, además de aquellos enumerados en la presente serán evidentes para

5 aquellos expertos en la materia a partir de la descripción anterior y los dibujos que la acompañan. Dicha modificaciones y variaciones tienen la intención de encontrarse dentro del alcance de las Reivindicaciones anexas. La presente invención será limitada únicamente por los términos de las Reivindicaciones anexas, junto con el alcance completo de equivalentes para la cuales dichas

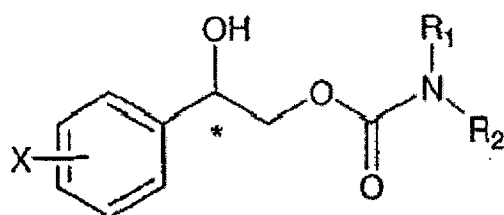
10 Reivindicaciones confieren derecho.

NOVEDAD DE LA INVENCION

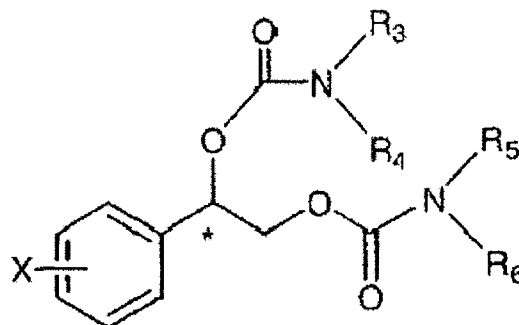
REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un método para proporcionar neuroprotección, caracterizado porque comprende administrar a un paciente que necesita tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de un fármaco neuroprotector (un NPD) de un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable o éster de la misma, seleccionada del grupo que consiste de la Fórmula (I) y la Fórmula (II)

10



15 Fórmula (I)



Fórmula (II)

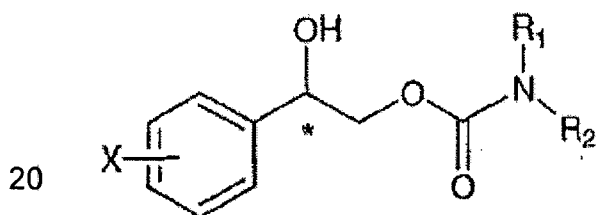
- en donde el fenilo es sustituido en X con de uno a cinco átomos de halógeno seleccionados del grupo que consiste de flúor, cloro, bromo y yodo; y R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 y R_6 , son seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo de C_1 - C_4 ; en donde el alquilo de C_1 - C_4 , está
- 20 opcionalmente sustituido con fenilo (en donde el fenilo está opcionalmente sustituido con sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de halógeno, alquilo de C_1 - C_4 , alcoxi de C_1 - C_4 , amino, nitro y ciano).

2.- El método de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado además porque X es cloro.

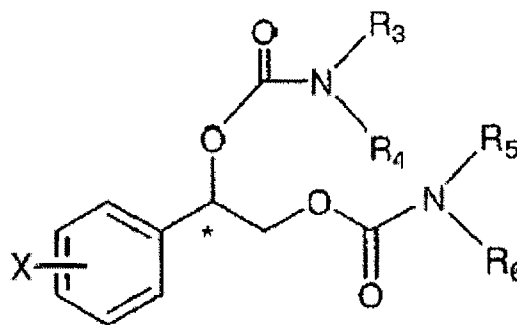
3.- El método de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado además porque X es sustituido en la posición orto del anillo de
5 fenilo.

4.- El método de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado además porque R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆, son seleccionados de hidrógeno.

5.- Un método para proporcionar neuroprotección, caracterizado
10 porque comprende administrar a un paciente que necesita tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de un fármaco neuroprotector (un NPD) de un enantiómero, o una sal farmacéuticamente aceptable o éster de la misma, seleccionada del grupo que consiste de la Fórmula (I) y la Fórmula (II) ó la mezcla enantiomérica, en donde uno enantiómero que es seleccionado del
15 grupo que consiste de la Fórmula (I) y la Fórmula (II) predomina:



Fórmula (I)



Fórmula (II)

en donde el fenilo es sustituido en X con de uno a cinco átomos de halógeno seleccionados del grupo que consiste de flúor, cloro, bromo y yodo; y R₁, R₂,

R₃, R₄, R₅ y R₆, son seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo de C₁-C₄; en donde el alquilo de C₁-C₄, está opcionalmente sustituido con fenilo (en donde el fenilo es opcionalmente sustituido con sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que
5 consiste de halógeno, alquilo de C₁-C₄, alcoxi de C₁-C₄, amino, nitro y ciano).

6.- El método de conformidad con la Reivindicación 5, caracterizado además porque X es cloro.

7.- El método de conformidad con la Reivindicación 5, caracterizado además porque X es sustituido en la posición orto del anillo de
10 fenilo.

8.- El método de conformidad con la Reivindicación 5, caracterizado además porque R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆, son seleccionados de hidrógeno.

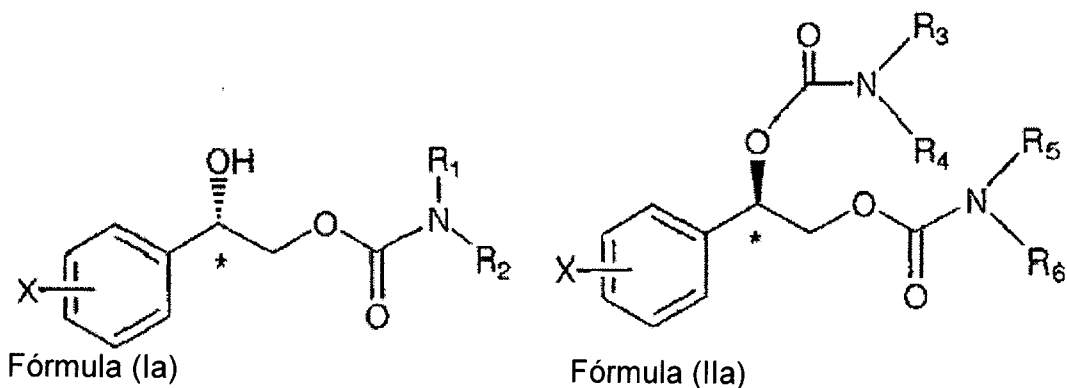
9.- El método de conformidad con la Reivindicación 5,
15 caracterizado además porque un enantiómero seleccionado del grupo que consiste de la Fórmula (I) y la Fórmula (II) predomina hasta un alcance del 90% ó mayor.

10.- El método de conformidad con la Reivindicación 5, caracterizado además porque un enantiómero seleccionado del grupo que
20 consiste de la Fórmula (I) y la Fórmula (II) predomina hasta un alcance del 98% ó mayor.

11.- El método de conformidad con la Reivindicación 5, caracterizado además porque el enantiómero seleccionado del grupo que

consiste de la Fórmula (I) y la Fórmula (II) es un enantiómero seleccionado del grupo que consiste de la Fórmula (Ia) y la Formula (IIa):

5



en donde el fenilo es sustituido en X con de uno a cinco átomos de halógeno
 10 seleccionados del grupo que consiste de flúor, cloro, bromo y yodo; y R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 y R_6 , son seleccionados independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilo de C_1 - C_4 ; en donde el alquilo de C_1 - C_4 , está opcionalmente sustituido con fenilo (en donde el fenilo está opcionalmente sustituido con sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que
 15 consiste de halógeno, alquilo de C_1 - C_4 , alcoxi de C_1 - C_4 , amino, nitro y ciano).

12.- El método de conformidad con la Reivindicación 11, caracterizado además porque X es cloro.

13.- El método de conformidad con la Reivindicación 11, caracterizado además porque X es sustituido en la posición orto del anillo de
 20 fenilo.

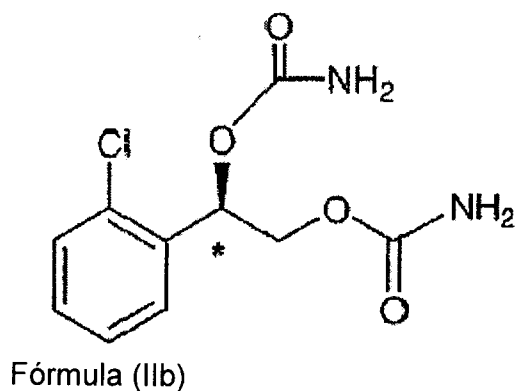
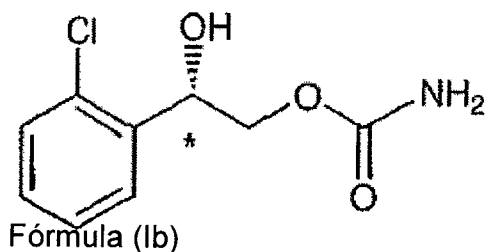
14.- El método de conformidad con la Reivindicación 11, caracterizado además porque R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 y R_6 , son seleccionados de hidrógeno.

15.- El método de conformidad con la Reivindicación 11, caracterizado además porque un enantiómero seleccionado del grupo que consiste de la Fórmula (Ia) y la Fórmula (IIa) predomina hasta un alcance de aproximadamente el 90% ó mayor.

5 16.- El método de conformidad con la Reivindicación 11, caracterizado además porque un enantiómero seleccionado del grupo que consiste de la Fórmula (Ia) y la Fórmula (IIa) predomina hasta un alcance del 98% ó mayor.

10 17.- El método de conformidad con la Reivindicación 5, caracterizado además porque el enantiómero seleccionado del grupo que consiste de la Fórmula (I) y la Fórmula (II) es un enantiómero seleccionado del grupo que consiste de la Fórmula (Ib) y la Formula (IIb):

15



20

18.- El método de conformidad con la Reivindicación 17, caracterizado además porque un enantiómero seleccionado del grupo que consiste de la Fórmula (Ib) y la Fórmula (IIb) predomina hasta un alcance de aproximadamente el 90% ó mayor.

19.- El método de conformidad con la Reivindicación 17, caracterizado además porque un enantiómero seleccionado del grupo que consiste de la Fórmula (Ib) y la Fórmula (IIb) predomina hasta un alcance del 98% ó mayor.

- 5 20.- El método de conformidad con las Reivindicaciones 1 ó 5, caracterizado además porque la causa(s) posible(s) de daño neuronal que presenta el paciente que necesita neuroprotección es seleccionada del grupo que consiste de Lesión cerebral traumática (TBI), lesión o trauma de cualquier tipo al CNS ó PNS incluyendo trauma cerebral brusco o penetrante,
- 10 infecciones del CNS; anoxia; apoplejía (CVAs); enfermedades autoinmunes que afectan el CNS; por ejemplo, lupus, lesiones de nacimiento, por ejemplo, asfixia perinatal, paro cardíaco; procedimientos quirúrgicos vasculares terapéuticos o de diagnóstico, por ejemplo, endarterectomía carótida o angiografía cerebral; lesión de la médula espinal; hipotensión; lesión al CNS
- 15 por embolia, hiper o hipo perfusión; padecimientos metabólicos, por ejemplo, diabetes, hipoxia; predisposición genética conocida por los padecimientos conocidos para responder al NPDs; lesiones que ocupan espacio del CNS; tumores cerebrales, por ejemplo, glioblastomas; sangrado o hemorragia en o circundante al CNS, por ejemplo, sangrados intracerebrales o hematomas
- 20 subdurales; edema cerebral; convulsiones febriles; hipertemia; abuso de sustancias, trauma, apoplejía, isquemia, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de prion variante de la enfermedad de Creutzfeld-Jakob, esclerosis lateral amiotrófica

(ALS), neuropatía diabética, atrofia olivopontocerebelar, epilepsia, convulsiones, hipoglucemia, cirugía u otras intervenciones, isquemia retinal (diabética o de otra forma), glaucoma, degeneración retinal, esclerosis múltiple, neuropatía óptica tóxica e isquémica, degeneración macular, 5 exposición del CNS ó PNS a agentes tóxicos o venenosos; intoxicación o retiro de drogas, por ejemplo, cocaína o alcohol; historia familiar de padecimientos neurodegenerativos o una condición relacionada; historia de estado epiléptico; evidencia de indicadores o bioindicadores secundarios de que el paciente necesita tratamiento con un fármaco neuroprotector (NPD), 10 por ejemplo, la exploración MRI muestra una patología estructural o funcional, niveles de suero elevados de productos de degradación neuronal, niveles elevados de factor neurotrófico ciliar.

21.- El método de conformidad con la Reivindicación 20, caracterizado además porque el(los) factor(es) de predisposición que 15 presentan los pacientes que necesitan neuroprotección son seleccionados del grupo que consiste: lesión cerebral traumática (TBI), trauma de cabeza áspero, cerrado y penetrante; cirugía, apoplejía u otro accidente vascular cerebral (CVA); estado epiléptico y lesiones que ocupan espacio del CNS.

22.- El método de conformidad con la Reivindicación 21, 20 caracterizado además porque dicho(s) factor(es) de predisposición es lesión cerebral traumática (TBI), que incluye trauma de cabeza áspero, cerrado o penetrante e intervención quirúrgica.

23.- El método de conformidad con la Reivindicación 21, caracterizado además porque dicho(s) factor(es) de predisposición es apoplejía u otro accidente cerebral-vascular (CVA).

24.- El método de conformidad con la Reivindicación 23,
5 caracterizado además porque dicho factor de predisposición es una enfermedad neurodegenerativa.

25.- Los métodos de conformidad con las Reivindicaciones 1 ó 5, caracterizados además porque dicho compuesto (o enantiómero) o una sal farmacéuticamente aceptable o éster de la misma se administró en
10 combinación con la administración de uno o más de otros compuestos o agentes terapéuticos.

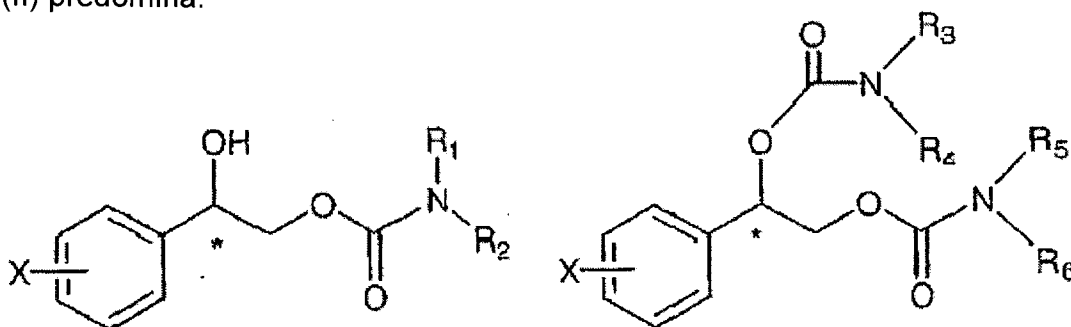
26.- Los métodos de conformidad con la Reivindicación 25, caracterizados además porque dicho uno o más compuestos diferentes o agentes terapéuticos son seleccionados del grupo que consiste en los
15 compuestos que tienen una o más de las siguientes propiedades: actividad antioxidante; antagonismo de receptor NMDA; capacidad para aumentar la inhibición GABA endógena; actividad de inhibidor de sintasa NO; capacidad de enlace de hierro, por ejemplo, un quelador de hierro; capacidad de enlace de calcio, por ejemplo, un quelador de Ca (II), capacidad de enlace de zinc,
20 por ejemplo, un quelador de Zn (II), la capacidad de bloquear los canales iónicos de sodio o calcio; la capacidad de abrir los canales iónicos de potasio o cloro; de tal manera que los efectos neuroprotectores se proveen al paciente.

27.- Los métodos de conformidad con la Reivindicación 26, caracterizados además porque dicho uno o más compuestos pueden, además, ser seleccionados del grupo que consiste de fármacos anti-epilépticos (AEDs).

5 28.- Los métodos de conformidad con la Reivindicación 27, caracterizados además porque dicho fármaco anti-epiléptico (AED) es seleccionado del grupo que consiste de carbamazepina, clobazam, conazepam, etosuximida, felbamato, gabapentina, lamotigina, levetiracetam, oxocarbazepina, fenobarbital, fenitoina, pregabalina, primidona, retigabina,
10 talampanel, tiagabina, tiopiramato, valproato, vigabatrina, zonisamida, benzodiazepinas, barbituratos o un sedante hipnótico.

29.- Una composición farmacéutica para proveer neuroprotección, caracterizada porque comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de un enantiómero, o una sal o éster
15 farmacéuticamente aceptable del mismo, seleccionado del grupo que consiste de la Fórmula (I) y la Fórmula (II) ó una mezcla enantiomérica en donde un enatiómero seleccionado del grupo que consiste en la Fórmula (I) y la Fórmula (II) predomina:

20



Fórmula (I)

Fórmula (II)

en donde, el fenilo es sustituido en X con de uno a cinco átomos de halógeno seleccionados del grupo que consiste de flúor, cloro, bromo y yodo; y R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆, son seleccionados independientemente del grupo que
5 consiste de hidrógeno y alquilo de C₁-C₄; en donde el alquilo de C₁-C₄, está opcionalmente sustituido con fenilo (en donde el fenilo es opcionalmente sustituido con sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste de halógeno, alquilo de C₁-C₄, alcoxi de C₁-C₄, amino, nitro y ciano) y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 30.- Un equipo, caracterizado porque comprende formas de dosificación terapéuticamente efectivas de la composición farmacéutica de conformidad con la Reivindicación 29 en un paquete o contenedor adecuado junto con información o instrucciones del uso adecuado del mismo para proveer neuroprotección a un paciente que la necesita.

15 31.- El método de conformidad con las Reivindicaciones 1 ó 5, caracterizado además porque la cantidad terapéuticamente efectiva es desde aproximadamente 1.0 mg/kg/día hasta aproximadamente 150 mg/kg/día.

20 32.- El método de conformidad con las Reivindicaciones 1 ó 5, caracterizado además porque dicho paciente no ha desarrollado signos o síntomas clínicos de lesión o disfunción neuronal en el momento de dicha administración.

33.- El método de conformidad con la Reivindicación 1 ó 5, caracterizado además porque dicho paciente está en riesgo de desarrollar lesión o disfunción neuronal en el momento de dicha administración.

5 34.- El método de conformidad con la Reivindicación 1 ó 5, caracterizado además porque dicho paciente tiene un padecimiento neurodegenerativo o evidencia clínica de lesión neuronal en el momento de dicha administración.

35.- El método de conformidad con las Reivindicaciones 1 ó 5, caracterizado además porque la cantidad terapéuticamente efectiva es desde
10 aproximadamente 1.4 mg/kg/día hasta aproximadamente 43.0 mg/kg/día.

36.- El método de conformidad con las Reivindicaciones 1 ó 5, caracterizado además porque la cantidad terapéuticamente efectiva es desde aproximadamente 2.9 mg/kg/día hasta aproximadamente 35.7 mg/kg/día.

37.- El método de conformidad con las Reivindicaciones 1 ó 5,
15 caracterizado además porque la cantidad terapéuticamente efectiva es desde aproximadamente 3.6 mg/kg/día hasta aproximadamente 28.6 mg/kg/día.

38.- El método de conformidad con las Reivindicaciones 1 ó 5, caracterizado además porque la cantidad terapéuticamente efectiva es desde aproximadamente 4.3 mg/kg/día hasta aproximadamente 21.4 mg/kg/día.

20 39. El método de conformidad con las Reivindicaciones 1 ó 5, caracterizado además porque la cantidad terapéuticamente efectiva es desde aproximadamente 5.0 mg/kg/día hasta aproximadamente 17.1 mg/kg/día.

40.- El método de conformidad con las Reivindicaciones 1 ó 5, caracterizado además porque la cantidad terapéuticamente efectiva es desde aproximadamente 100 mg/kg/día hasta aproximadamente 3000 mg/kg/día.

5 41.- El método de conformidad con las Reivindicaciones 1 ó 5, caracterizado además porque la cantidad terapéuticamente efectiva es desde aproximadamente 200 mg/kg/día hasta aproximadamente 2500 mg/kg/día.

42.- El método de conformidad con las Reivindicaciones 1 ó 5, caracterizado además porque la cantidad terapéuticamente efectiva es desde aproximadamente 250 mg/kg/día hasta aproximadamente 2000 mg/kg/día.

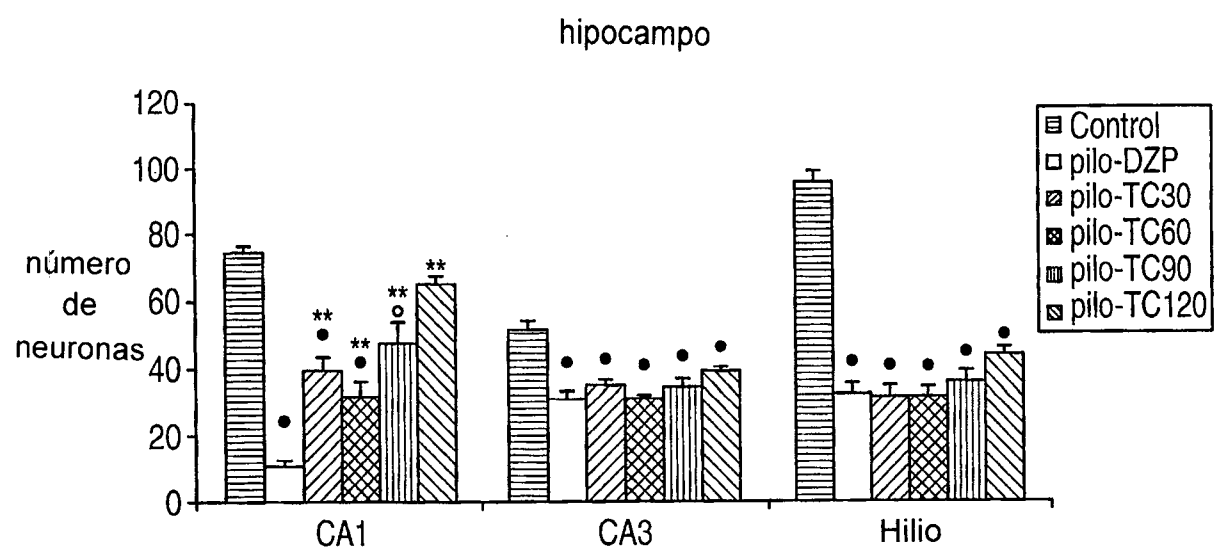
10 43.- El método de conformidad con las Reivindicaciones 1 ó 5, caracterizado además porque la cantidad terapéuticamente efectiva es desde aproximadamente 300 mg/kg/día hasta aproximadamente 1500 mg/kg/día.

44.- El método de conformidad con las Reivindicaciones 1 ó 5, caracterizado además porque la cantidad terapéuticamente efectiva es desde
15 aproximadamente 350 mg/kg/día hasta aproximadamente 1200 mg/kg/día.

45.- El método de conformidad con las Reivindicaciones 1 ó 5, caracterizado además porque la cantidad terapéuticamente efectiva es disminuida en forma progresiva con el tiempo.

44.- El método de conformidad con las Reivindicaciones 25, 26,
20 27 ó 28, caracterizado además porque la cantidad de dicho uno o más compuestos o agentes terapéuticos administrados en combinación con dicho compuesto (o enantiómero) o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo es disminuido de manera progresiva con el tiempo.

1/8

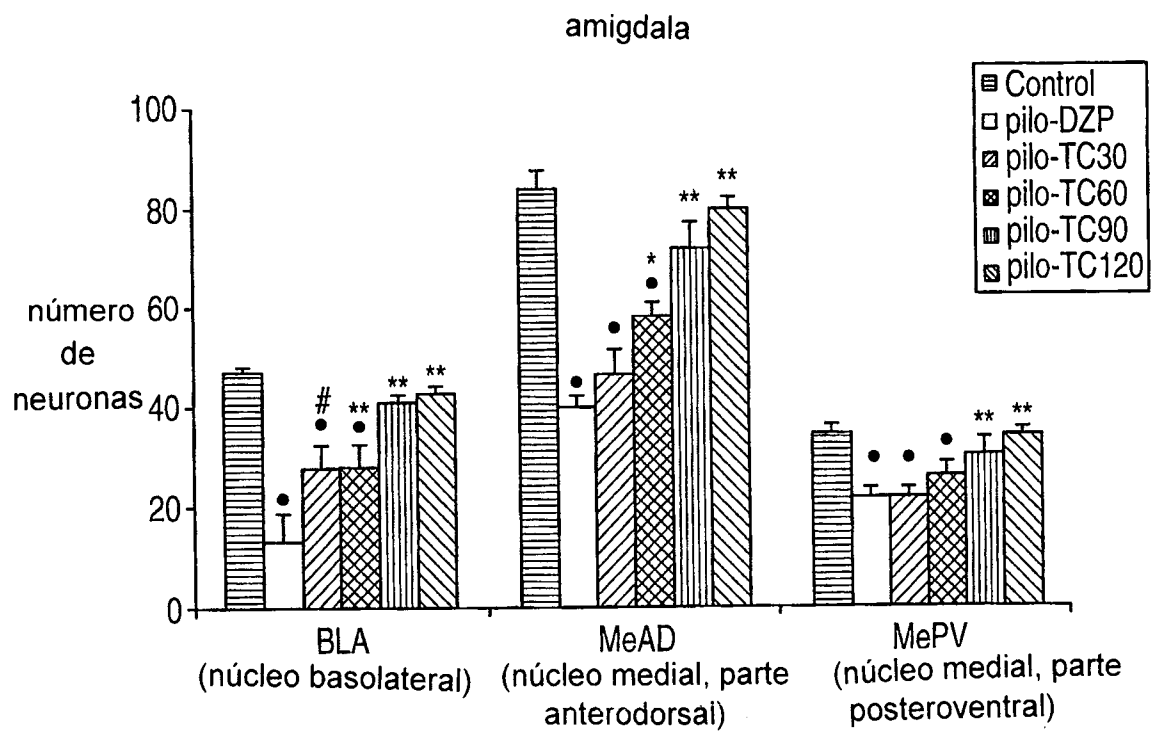
FIG. 1

○ $p < 0.05$, ● $p < 0.01$, diferencias estadísticamente significativas entre las ratas tratadas con pilo-TC y de control tratadas con li-solución salina.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, diferencia estadísticamente significativa entre las ratas tratadas con pilo-TC y ratas tratadas con pilo-DZP.

2/8

FIG. 2

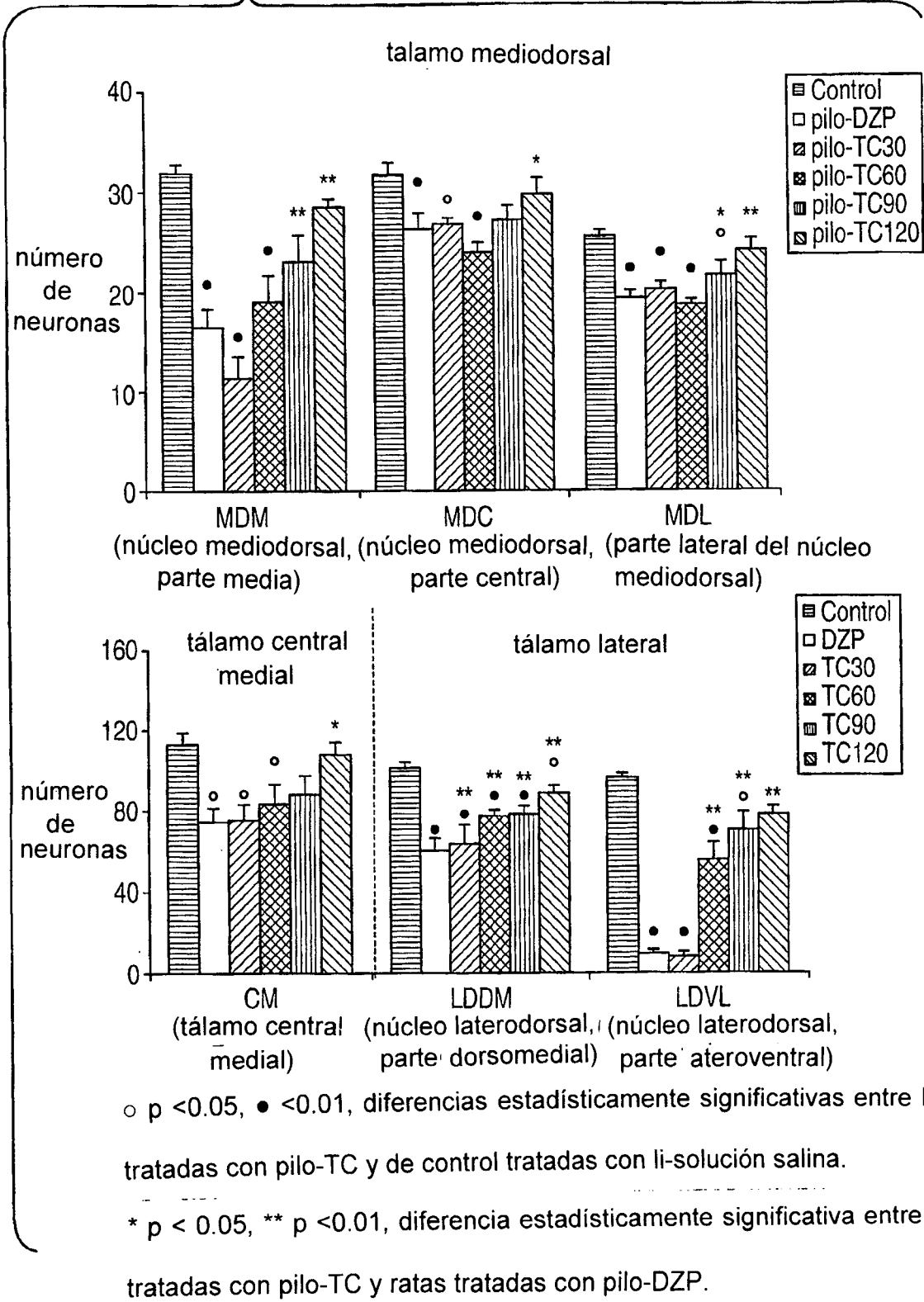


○ $p < 0.05$, ● < 0.01 , diferencias estadísticamente significativas entre las ratas tratadas con pilo-TC y de control tratadas con li-solución salina.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, diferencia estadísticamente significativa entre las ratas tratadas con pilo-TC y ratas tratadas con pilo-DZP.

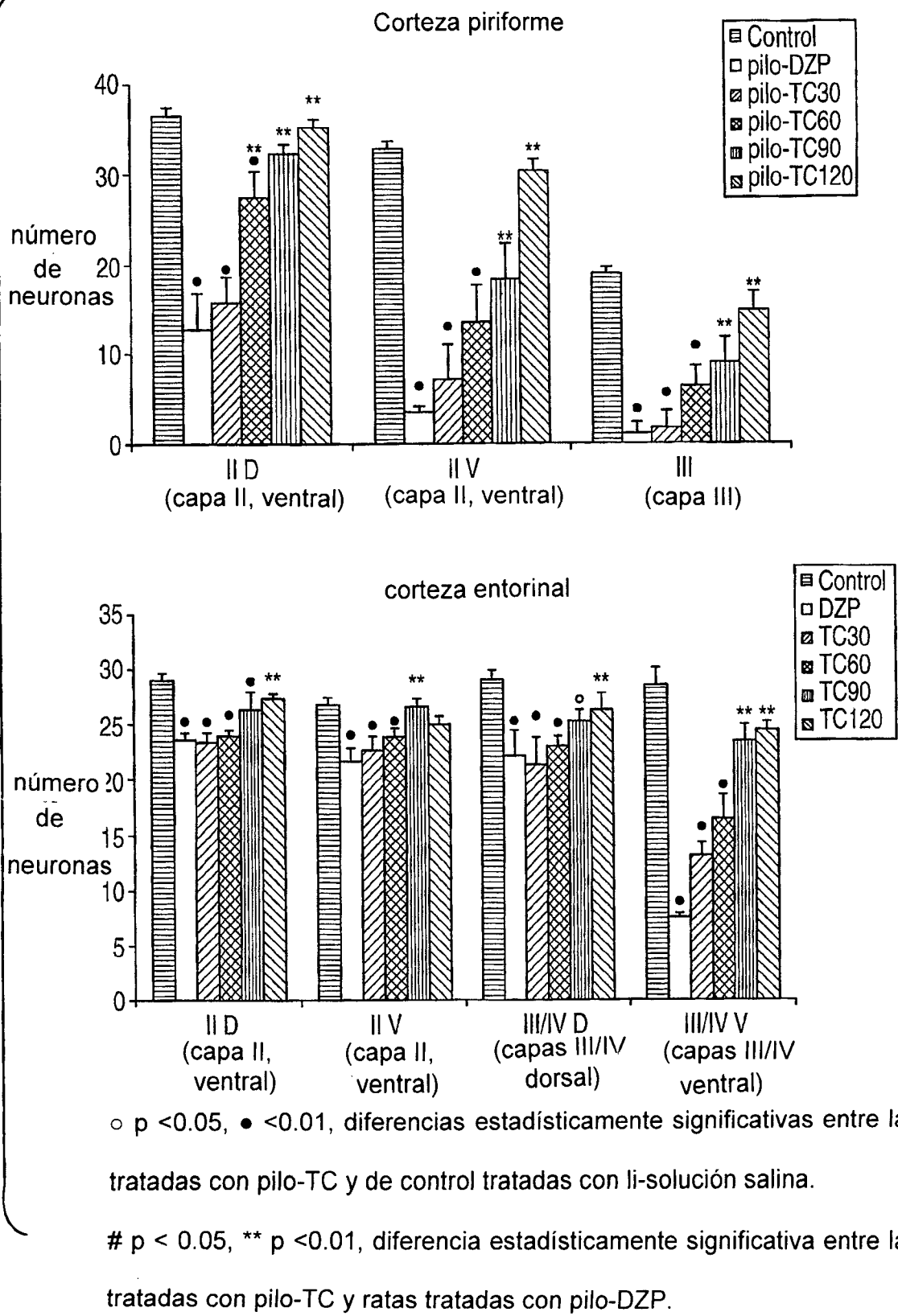
3/8

FIG. 3

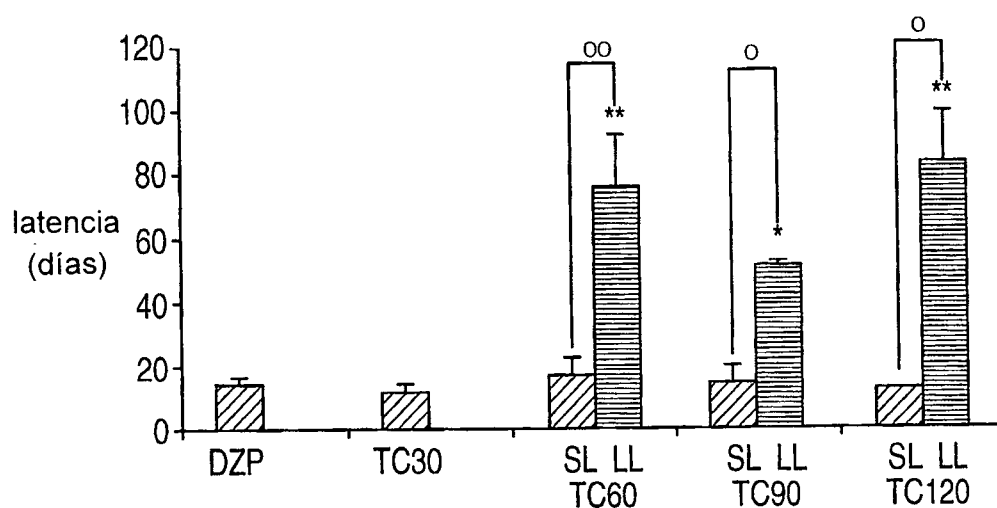


4/8

FIG. 4



5/8

FIG. 5

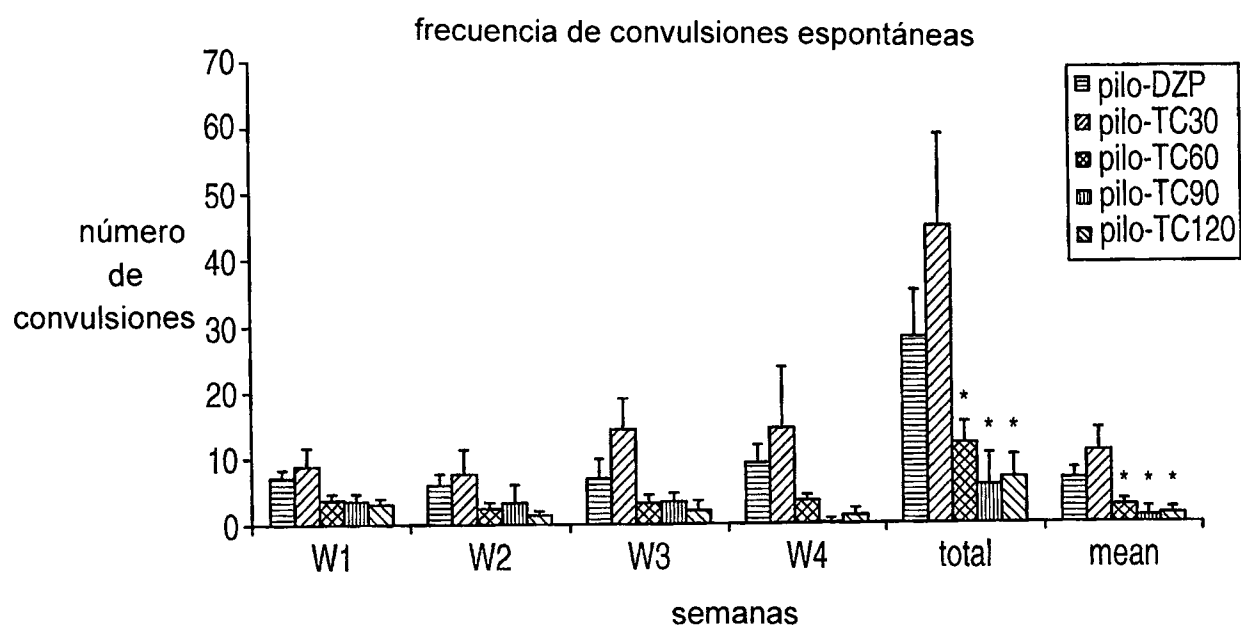
SL : latencia corta

LL : latencia larga

** $p < 0.01$ * $p < 0.05$, diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo tratado con pilo-DZP.

oo $p < 0.01$, o $p < 0.05$, diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo SL

6/8

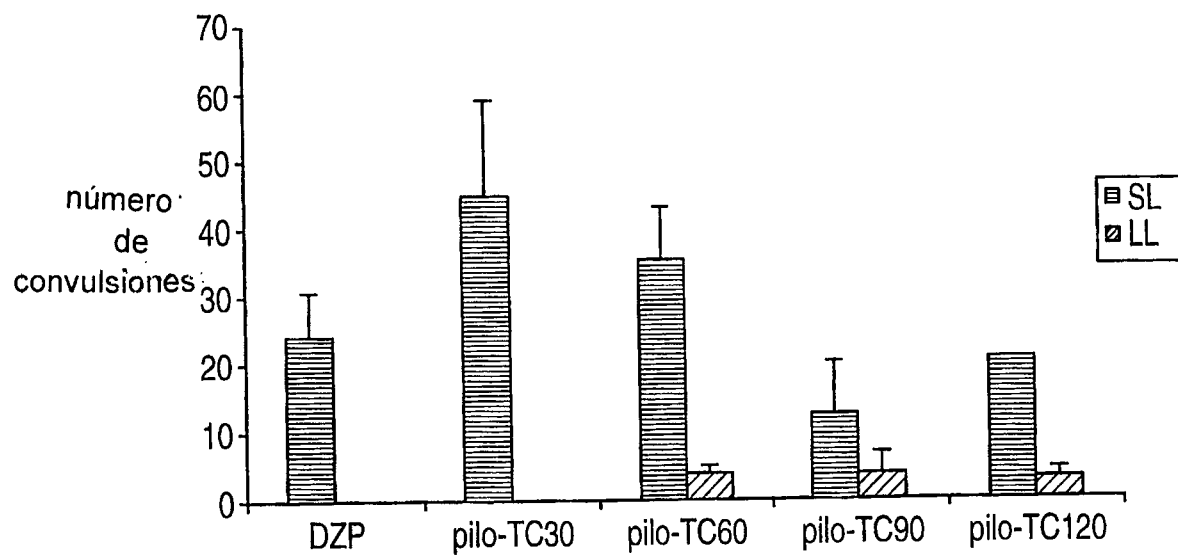
FIG. 6

* $p < 0.05$, diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo tratado con pilo-TC30 (prueba t de Dunnett post-hoc).

7/8

FIG. 7

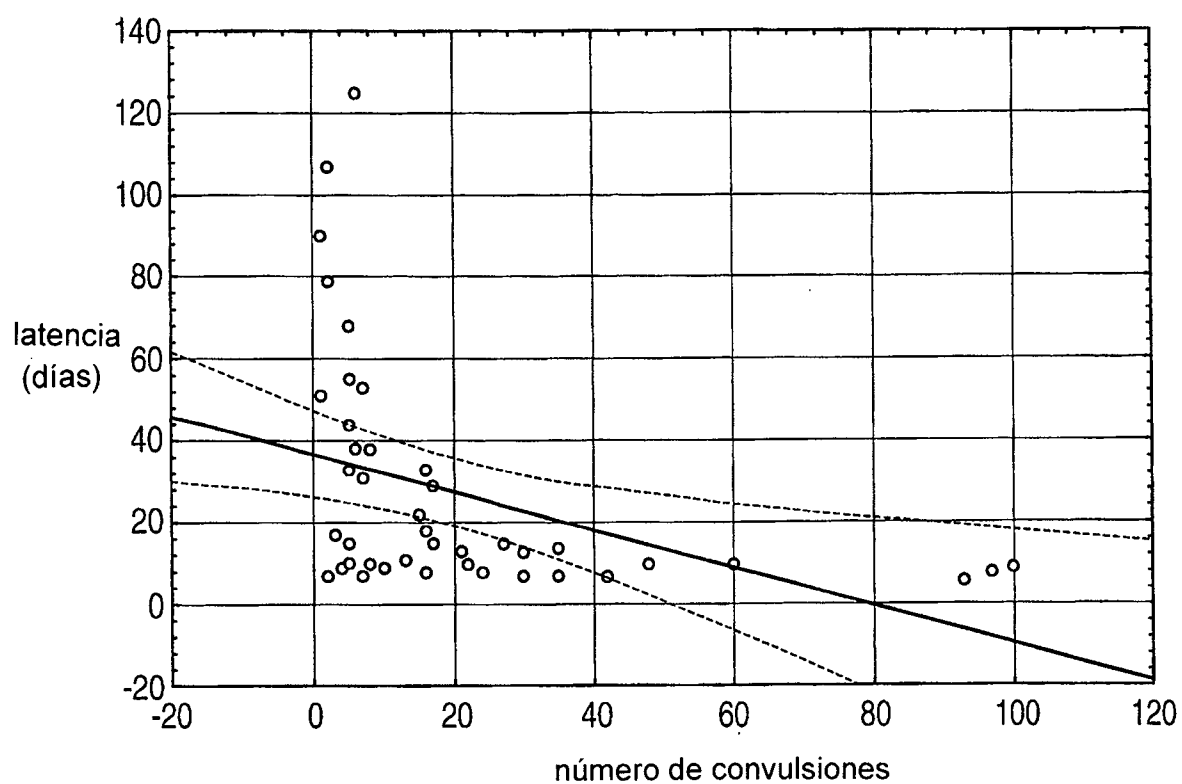
Relación entre latencia y el número de convulsiones.



8/8

FIG. 8

Correlación entre latencia y el número de Convulsiones
Coeficiente de relación de Pearson $R = -0.4$ ($p=0.007$)



PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.175)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	PRD-2350 PCT
I	Title of Invention	METHODS FOR NEUROPROTECTION
II	Applicant	
II-1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States
II-4	Name	JANSSEN PHARMACEUTICA, N.V.
II-5	Address	Turnhoutseweg 30 B-2340 Beerse Belgium
II-6	State of nationality	BE
II-7	State of residence	BE
II-8	Telephone No.	732-524-5352
II-9	Facsimile No.	732-524-2808
II-10	e-mail	pherridg@corus.jnj.com
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	TWYMAN, Roy E.
III-1-5	Address	3355 Byron Drive Doylestown, Pennsylvania 18901 United States of America
III-1-6	State of nationality	US
III-1-7	State of residence	US

PCT REQUEST

2/4

142

Original (for SUBMISSION)

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	ZHAO, Boyu
III-2-5	Address	105 Weymouth Circle Lansdale, Pennsylvania 19446 United States of America
III-2-6	State of nationality	US
III-2-7	State of residence	US
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	JOHNSON, Philip, S.
IV-1-2	Address	JOHNSON & JOHNSON 1 Johnson & Johnson Plaza New Brunswick, New Jersey 08933 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	732-524-5352
IV-1-4	Facsimile No.	732-524-2808
IV-1-5	e-mail	pherridg@corus.jnj.com
IV-1-6	Agent's registration No.	27,200
IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as first named agent
IV-2-1	Name(s)	HERRIDGE, Peter, L. (42,658)
V	DESIGNATIONS	
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.	
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1-1	Filing date	15 October 2004 (15.10.2004)
VI-1-2	Number	60/619,402
VI-1-3	Country	US

PCT REQUEST

3/4

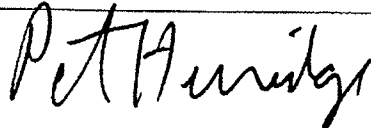
Original (for SUBMISSION)

VI-2	Priority claim of earlier national application		
VI-2-1	Filing date	12 July 2005 (12.07.2005)	
VI-2-2	Number	60/698,403	
VI-2-3	Country	US	
VI-3	Priority document request		
	The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1, VI-2	
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)	
VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	4	✓
IX-2	Description	68	-
IX-3	Claims	9	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	8	-
IX-7	TOTAL	90	
	Accompanying Items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-17	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract	FIG 1	
IX-20	Language of filing of the international application	English	

PCT REQUEST

4/4

Original (for SUBMISSION)

X-1	Signature of applicant, agent or common representative	
X-1-1	Name	JANSSEN PHARMACEUTICA, N.V.
X-1-2	Name of signatory	Peter L Herridge
X-1-3	Capacity	Proxy Holder

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
27 April 2006 (27.04.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/044472 A1

(51) International Patent Classification:

A61K 31/27 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)

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

(21) International Application Number:

PCT/US2005/036695

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date: 14 October 2005 (14.10.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/619,402 15 October 2004 (15.10.2004) US
60/698,403 12 July 2005 (12.07.2005) US

(71) Applicant: JANSSEN PHARMACEUTICA, N.V.
[BE/BE]; Turnhoutseweg 30, B-2340 Beerse (BE).

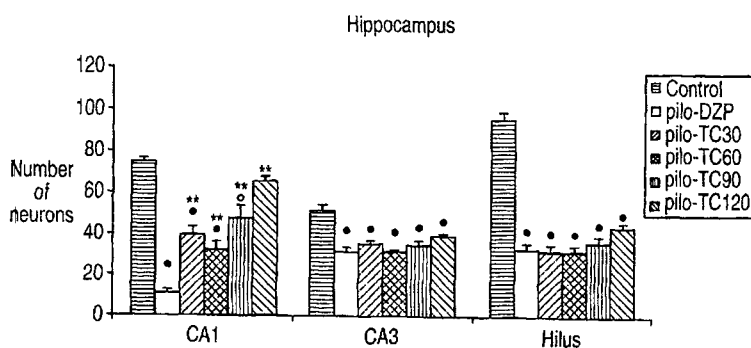
(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): TWYMAN, Roy, E.
[US/US]; 3355 Byron Drive, Doylestown, PA 18901 (US).
ZHAO, Boyu [US/US]; 105 Weymouth Circle, Lansdale,
PA 19446 (US).

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

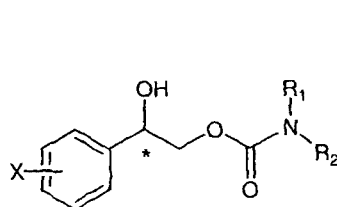
(54) Title: CARBAMATE COMPOUNDS FOR USE IN TREATING NEURODEGENERATIVE DISORDERS



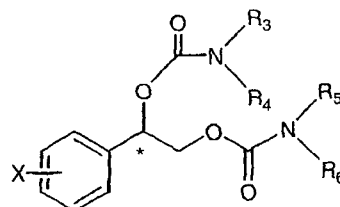
* $p < 0.05$, * $p < 0.01$, statistically significant difference between pilo-TC and control li-saline rats

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, statistically significant differences between pilo-TC and pilo-DZP rats

(57) Abstract: This invention is directed to methods for providing neuroprotection comprising administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a compound selected from the group consisting of Formula (I) and Formula (II), or a pharmaceutically acceptable salt or ester thereof; Formula (I) Formula (II) wherein phenyl is substituted at X with one to five halogen atoms selected from the group consisting of fluorine, chlorine, bromine and iodine; and, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 and R_6 are independently selected from the group consisting of hydrogen and C_1 - C_4 alkyl; wherein C_1 - C_4 alkyl is optionally substituted with phenyl (wherein phenyl is optionally substituted with substituents independently selected from the group consisting of halogen, C_1 - C_4 alkyl, C_1 C_4 alkoxy, amino, nitro and cyano).



Formula (I)



Formula (II)

**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

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.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference PRD-2350 PCT	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2005/036695	International filing date (day/month/year) 14/10/2005	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 15/10/2004
Applicant JANSSEN PHARMACEUTICA, N.V.		

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 04 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
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III)

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:

CARBAMATE COMPOUNDS FOR USE IN TREATING NEURODEGENERATIVE DISORDERS

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 No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 1

- ☒ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

148

International application No

US2005/036695

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K31/27 A61P25/28

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

B. FIELDS SEARCHED

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

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/067925 A (ORTHO-MCNEIL PHARMACEUTICAL, INC) 6 September 2002 (2002-09-06) page 14, line 32 - page 15, line 3; claims page 12, line 18 - page 14, line 20 -----	1-44
X	WO 01/13904 A (ORTHO-MCNEIL PHARMACEUTICAL, INC) 1 March 2001 (2001-03-01) page 10, lines 7-12 page 13, line 25 - page 14, line 13; claims; example A4 -----	1-44

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier 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 (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

Date of the actual completion of the international search

28 February 2006

Date of mailing of the international search report

08/03/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 spo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Friederich, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/036695

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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 1-28 and 31-44 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:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2005/036695

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02067925	A	06-09-2002	BR 0207645 A	28-12-2004
			CA 2439295 A1	06-09-2002
			CN 1503667 A	09-06-2004
			CZ 20032313 A3	18-08-2004
			EP 1383489 A1	28-01-2004
			HU 0303264 A2	28-01-2004
			JP 2004523555 T	05-08-2004
			NO 20033798 A	26-09-2003
			PL 364680 A1	13-12-2004
			US 2002165273 A1	07-11-2002
			US 2004171679 A1	02-09-2004
WO 0113904	A	01-03-2001	AT 284223 T	15-12-2004
			AU 782759 B2	25-08-2005
			AU 6895800 A	19-03-2001
			BG 106420 A	30-09-2002
			BR 0013439 A	30-04-2002
			CA 2381797 A1	01-03-2001
			CN 1379686 A	13-11-2002
			CZ 20020524 A3	13-11-2002
			DE 60016602 D1	13-01-2005
			DE 60016602 T2	03-11-2005
			EP 1210118 A2	05-06-2002
			ES 2234651 T3	01-07-2005
			HU 0203198 A2	28-02-2003
			JP 2003507421 T	25-02-2003
			MX PA02001820 A	14-07-2003
			NO 20020728 A	05-04-2002
			NZ 517106 A	29-04-2005
			PL 353266 A1	03-11-2003
			PT 1210118 T	28-02-2005
			SK 2262002 A3	04-02-2003
			TR 200201067 T2	23-09-2002
			ZA 200201403 A	19-05-2003

DOCKET NO. PRD2350USPSP
Joint Inventors

A S S I G N M E N T

Serial No. 60/619,402
Filed 10/15/2004

WHEREAS, Roy E. Twyman and Boyu Zhao, citizens of the United States of America, residing at 3355 Byron Drive, Doylestown, PA 18901 and 105 Weymouth Circle, Lansdale, PA 19446 respectively (hereinafter called "Assignors"), have made certain new and useful inventions or discoveries relating to

METHODS FOR NEUROPROTECTION

for which they have filed a provisional application for Letters Patent of the United States; and

WHEREAS, Janssen Pharmaceutica N.V., in the country of Belgium, (hereinafter called "Assignee"), is desirous of acquiring Assignors' entire right, title, and interest therein:

NOW, THEREFORE, BE IT KNOWN that for and in consideration of the sum of One Dollar and other valuable considerations, the receipt of which is hereby acknowledged, Assignors have sold, assigned, and transferred, and do hereby sell, assign and transfer unto said Assignee their entire right, title and interest in and to all said inventions and discoveries disclosed in said application whose identification above by serial number and filing date, when available is hereby authorized, and in and to said application, all substitutions, divisions, and continuations thereof, and in and to all Letters Patent, United States and foreign, that may be granted for said inventions and discoveries, and in and to all extensions, renewals, and reissues thereof, the same to be held and enjoyed by said Assignee, its successors and assigns, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by Assignors if this Assignment and sale had not been made;

And Assignors hereby authorize and request the Commissioner of Patents of the United States to issue said Letters Patent in accordance with this Assignment;

And for the consideration aforesaid, Assignors covenant and agree with said Assignee that he has a full and unencumbered title to the inventions and discoveries above described and hereby assigned, which title they warrant unto said Assignee, its successors and assigns;

And for the consideration aforesaid, Assignors further covenant and agree that they will, whenever requested, but without cost to them promptly communicate to said Assignee or its representatives any facts known to them relating to said inventions and discoveries, testify in any interference or legal proceedings involving said inventions and discoveries, and execute any additional papers that may be necessary to enable said Assignee or its representatives, successors, nominees, or assigns to secure full and complete protection for the said inventions and discoveries or that may be necessary to vest in said Assignee the complete title to the said inventions and discoveries and patents hereby conveyed and to enable it to record said title.

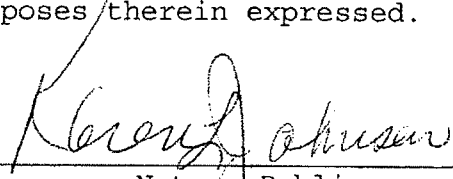
IN TESTIMONY WHEREOF, Assignor has hereunto set his hand and seal this 16th day of December, 2004


 _____ (L.S.)
 Roy E. Twyman

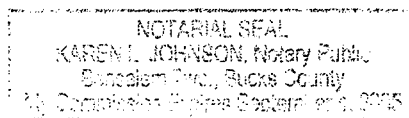
STATE OF PENNA.)
) ss.
 COUNTY OF BUCKS)

BE IT REMEMBERED, That on this _____ day of _____, 2004, before me, a Notary Public, personally appeared Roy E. Twyman who I am satisfied is the person named in and who executed the foregoing instrument in my presence, and I having first made known to him the contents thereof, he did acknowledge that he signed, sealed, and delivered the same as his voluntary act and deed for the uses and purposes therein expressed.

Sworn to and subscribed before me
 this 16th day of DEC 2004.



 Notary Public



DOCKET NO. PRD2350USPSP
Joint Inventors

A S S I G N M E N T

Serial No. 60/619,402
Filed 10/15/2004

WHEREAS, Roy E. Twyman and Boyu Zhao, citizens of the United States of America, residing at 3355 Byron Drive, Doylestown, PA 18901 and 105 Weymouth Circle, Lansdale, PA 19446 respectively (hereinafter called "Assignors"), have made certain new and useful inventions or discoveries relating to

METHODS FOR NEUROPROTECTION

for which they have filed a provisional application for Letters Patent of the United States; and

WHEREAS, Janssen Pharmaceutica N.V., in the country of Belgium, (hereinafter called "Assignee"), is desirous of acquiring Assignors' entire right, title, and interest therein:

NOW, THEREFORE, BE IT KNOWN that for and in consideration of the sum of One Dollar and other valuable considerations, the receipt of which is hereby acknowledged, Assignors have sold, assigned, and transferred, and do hereby sell, assign and transfer unto said Assignee their entire right, title and interest in and to all said inventions and discoveries disclosed in said application whose identification above by serial number and filing date, when available is hereby authorized, and in and to said application, all substitutions, divisions, and continuations thereof, and in and to all Letters Patent, United States and foreign, that may be granted for said inventions and discoveries, and in and to all extensions, renewals, and reissues thereof, the same to be held and enjoyed by said Assignee, its successors and assigns, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by Assignors if this Assignment and sale had not been made;

And Assignors hereby authorize and request the Commissioner of Patents of the United States to issue said Letters Patent in accordance with this Assignment;

And for the consideration aforesaid, Assignors covenant and agree with said Assignee that he has a full and unencumbered title to the inventions and discoveries above described and hereby assigned, which title they warrant unto said Assignee, its successors and assigns;

IN TESTIMONY WHEREOF, Assignor has hereunto set his hand and seal this 13 day of Dec, 2004

Boyu Zhao (L.S.)

STATE OF *Pennsylvania*) ss.
COUNTY OF *Montgomery*

BE IT REMEMBERED, That on this 13TH day of DEC, 2004, before me, a Notary Public, personally appeared Boyu Zhao who I am satisfied is the person named in and who executed the foregoing instrument in my presence, and I having first made known to him the contents thereof, he did acknowledge that he signed, sealed, and delivered the same as his voluntary act and deed for the uses and purposes therein expressed.

Maria T. Shclunke
Notary Public

Notarial Seal
Maria I. Shchuka, Notary Public
Lower Gwynedd Twp., Montgomery County
My Commission Expires April 14, 2007
Member, Pennsylvania Association Of Notaries

TO:

see form PCT/ISA/220

155
RECEIVED
MAR 12 2006
PCT
INTERNATIONAL PATENT SECTION

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

PRD 2350 PCT
Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2005/036695

International filing date (day/month/year)
14.10.2005

Priority date (day/month/year)
15.10.2004

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K31/27 A61P25/28

Applicant
JANSSEN PHARMACEUTICA, N.V.

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

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Friederich, M

Telephone No. +49 89 2399-7860



Box No. 1 Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
☐ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
☐ in written format
☐ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
☐ contained in the international application as filed.
☐ filed together with the international application in computer readable form.
☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application,
☒ claims Nos. 1-28 and 31-44 with respect to industrial applicability

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 1-28,31-44 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.
- ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:
- | | |
|----------------------------|--|
| the written form | ☐ has not been furnished |
| | ☐ does not comply with the standard |
| the computer readable form | ☐ has not been furnished |
| | ☐ does not comply with the standard |
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions.
- ☐ See separate sheet for further details

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	26-28
	No: Claims	1-25,29-44
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	26-28
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	29,30
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Re Item III

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

Claims 1-28 and 31-44 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT).

Re Item V

Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Reference is made to the following documents:

- D1: WO 02/067925 A (ORTHO-MCNEIL PHARMACEUTICAL, INC) 6 September 2002 (2002-09-06)
D2: WO 01/13904 A (ORTHO-MCNEIL PHARMACEUTICAL, INC) 1 March 2001 (2001-03-01)

If not indicated otherwise, the relevant passages are those mentioned in the International search report.

Art. 33(2) The present application does not meet the requirements of Article 33(2) PCT, because the subject-matter of **claims 1-25 and 29-44** does not appear to be new in the sense of Article 33(2) PCT.

D1 discloses the use of the same carbamates for the treatment and prevention of neurodegenerative disorders. The use of selected enantiomers or the combination with other drugs is also mentioned.

The subject-matter of **claims 1-25 and 29-44** is therefore not considered to be new (Article 33(2) PCT).

D2 discloses the use of the synergistic combination of RWJ-333369 and tramadol for the treatment of pain and neurologic or psychiatric disorders.

The subject-matter of **claims 1-8, 11-14, 20, 25 and 29-44** is therefore not considered to be new (Article 33(2) PCT).

The subject-matter of **claims 26-28** is considered to be new in the sense of Article 33(2) PCT since the combination of the carbamates with selected compounds delimits these claims from the prior art at hand.

Art. 33(3) The subject-matter of **claims 26-28** is not considered to involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.

D1 discloses the use of the carbamates for the treatment and prevention of neurodegenerative disorders, from which the subject-matter of **claims 26-28** differs in that the carbamates are combined with selected neuroprotective drugs.

The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as how to provide a medicament for the treatment of neurodegenerative diseases.

Taking into account the teaching of the cited prior art the following reasoning applies:

With respect to the subject-matter of the remaining **claims 26-28** the applicant's attention is drawn to the fact that there seems to be no basis for inventive step within the present application as filed since no evidence can be found that the features which are novel result in a solution of the posed problem which could

not have been foreseen by the skilled person.
Being aware of the teaching of D1 the skilled person performed an arbitrary choice out of one list containing all neuroprotective drugs to select.

Since there is no surprising effect resulting from that choice, the solution proposed in **claims 26-28** of the present application is not considered to be inventive in the sense of Article 33(3) PCT.

Nothing has been shown in the present application with respect to the combination of carbamates with other drugs. It is therefore not clear wherein the contribution to the prior art may reside.

Art. 33(4) The subject-matter of **claims 29 and 30** is considered to be industrially applicable in the sense of Art. 33(4) PCT.

For the assessment of the present **claims 1-28 and 31-44** on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

164
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No 07-038444- -00000-0000
Fecha: 2007-04-18 16:33:03 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 163



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

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 se 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 trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Olivia M. N. Cortes
Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia