

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 503**

21 Número de solicitud: 201330738

51 Int. Cl.:

A61K 31/568 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

22.05.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

23.12.2014

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2014/070421

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)
SERRANO, 117
28006 MADRID ES y
FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO
RAMÓN Y CAJAL (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MARCO CONTELLES, José Luis y
ALCÁZAR GONZÁLEZ, Alberto**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **USO DE ESTERONITRONAS PARA EL TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DEL ICTUS O ACCIDENTE CEREBROVASCULAR, ENFERMEDADES DE ALZHEIMER, PARKINSON Y ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA**

57 Resumen:

Uso de esteronitronas para el tratamiento y prevención del ictus o accidente cerebrovascular, enfermedades de alzheimer, parkinson y esclerosis lateral amiotrófica.

Uso y preparación de esteronitronas con alta permeabilidad a la barrera hematoencefálica, capacidad antioxidante y neuroprotectora, como potenciales fármacos para el tratamiento del ictus o accidente cerebrovascular, enfermedades de Alzheimer, Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica.

ES 2 525 503 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de esteronitronas para el tratamiento y prevención del ictus o accidente cerebrovascular, enfermedades de Alzheimer, Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica

SECTOR Y OBJETO DE LA INVENCION

5 La presente invención se enmarca en el sector de la química farmacéutica. Específicamente constituye el objeto de la presente invención el uso de esteronitronas para el tratamiento y prevención del ictus o accidente cerebrovascular, enfermedades de Alzheimer, Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica.

10 Constituye igualmente un objeto de la presente invención una composición farmacéutica que comprende una o más esteronitronas, así como sus isómeros, hidratos, sales, polimorfos, y pro-fármacos farmacéuticamente aceptables, junto con excipientes farmacéuticamente apropiados.

ESTADO DE LA TECNICA

15 Es bien sabido que la oxidación de las membranas celulares lipídicas es uno de los eventos farmacológicos más importantes que tienen lugar durante el ictus, que conduce y se traduce en la muerte del tejido cerebral, y neuronas. Consecuentemente, una de las áreas de investigación más activas para el tratamiento del ictus, se centra en la búsqueda de nuevos agentes permeables de potente capacidad antioxidante y fuerte acción neuroprotectora, capaces de bloquear el diverso tipo de radicales libres oxigenados (ROS), responsables del estrés oxidativo que produce el ictus, una grave patología en rápido aumento en nuestras sociedades avanzadas, para la que no existe un tratamiento eficiente, y que es la cuarta causa de mortalidad después del cáncer, enfermedades coronarias, y Alzheimer. En efecto, la membrana de las neurona es rica en ácidos grasos, poliinsaturados, que son particularmente sensibles a la acción de los ROS, del tipo hidroxilo, peroxilo, y superóxido, en las posiciones adyacentes a dobles enlaces, generando radicales alílicos, muy reactivos, y capaces de producir nuevas reacciones radicálicas en cadena, es decir nuevos radicales más complejos, o interaccionar con metales, como el hierro, para generar nuevos radicales más tóxicos y nocivos aún.

25 Es por eso que la estrategia contra el ictus basada en el desarrollo de agentes atrapadores y bloqueantes de ROS es un área de permanente interés, y de investigación.

30 Es en este contexto donde los compuestos orgánicos del tipo nitrona, por su estructura y propiedades, han jugado un papel clave en los últimos treinta años, aunque desgraciadamente su presunta actividad beneficiosa en los numerosos ensayos clínicos a los que se han sometido una amplia gama de las mismas, dista mucho de estar contrastada (Floyd, R. A.; Kopke, R. D. Choi, C. H.; Foster, S. B.; Doblaz, S.; Towner, R. A. Nitrones as therapeutics. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *45*, 1361-1374).

35 Así, la (*Z*)- α -fenil-*N-tert*-butilnitrona (PBN) inhibe la oxidación de las lipoproteínas (Kalyanaraman, B.; Joseph, J.; Parthasarathy, S. The spin trap, α -phenyl *N-tert*-butylnitrona, inhibits the oxidative modification of low density lipoprotein *FEBS Lett.* **1991**, *280*, 17-20), reduce el daño oxidativo en eritrocitos, la peroxidación de lípidos debido a fenilhidracina, y protege a ratas de la isquemia, y de la toxicidad del MPTP.

La nitrona NXY-059 (Kuroda, S.; Tsuchidate, R.; Smith, M. L.; Maples, K. R.; Siesjo, B. K. Neuroprotective effects of a novel nitrona, NXY-059, after transient focal cerebral ischemia in

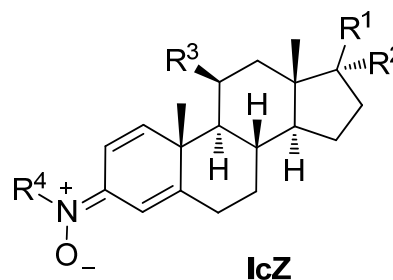
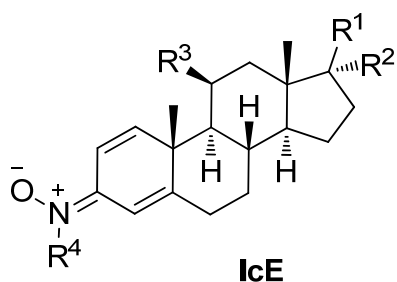
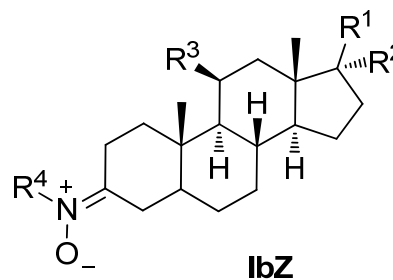
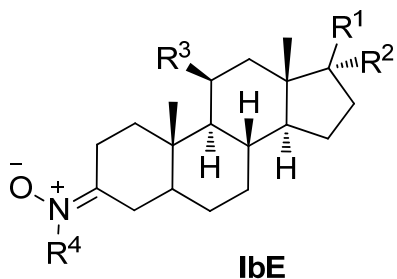
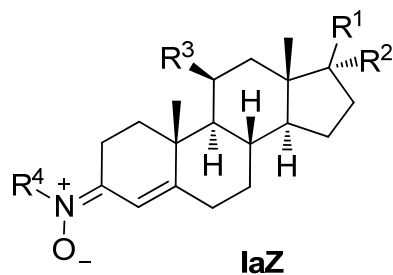
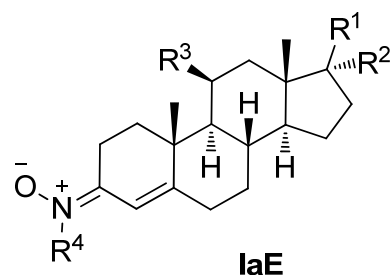
the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1999**, *19*, 778-787), un excelente atrapador de ROS con capacidad neuroprotectora, pero que ha fracasado repetidamente en ensayos clínicos.

- 5 No obstante, los esfuerzos para encontrar la nitrona óptima no han cesado [(a) Goldstein, S.; P. Lestage, P. Chemical and pharmacological aspects of heteroaryl-nitrones. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 1255-1267; (b) Dias, A. G.; Santos, C. E.; Cyrino, F. Z.; Bouskela, E.; Costa, P. R. *N-tert-Butyl* and *N-methyl* nitrones derived from aromatic aldehydes inhibit macromolecular permeability increase induced by ischemia/reperfusion in hamsters. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3995-3998.
- 10 Por otro lado, los esteroides son compuestos orgánicos de reconocida actividad biológica, entre las que cabe destacar su capacidad para actuar como agentes neuroprotectores en los procesos inflamatorios que afectan al sistema nervioso central y se traducen en enfermedades neurológicas, como la isquemia cerebral, enfermedades de Alzheimer, Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica.
- 15 Recientemente, se ha descrito la síntesis y evaluación biológica de nuevas nitronas para el tratamiento del ictus (Chioua, M.; Sucunza, D.; Soriano, E.; Hadjipavlou-Litina, D.; Alcázar, A.; Ayuso, I.; Oset-Gasque, M. J.; González, M. P.; Monjas, L.; Rodríguez-Franco, M. I.; Marco-Contelles, J.; Samadi, A. α -Aryl-*N*-alkyl Nitrones, as Potential Agents for Stroke Treatment: Synthesis, Theoretical Calculations, Antioxidant, Anti-inflammatory, Neuroprotective and Brain-Blood Barrier Permeability Properties, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 153-168).
- 25 Aunque las nitronas esteroidales son conocidas desde hace años (Barton, D. H. R.; Day, M. J.; Hesse, R. H. A new rearrangement of ketonic nitrones: A convenient alternative to the Beckmann rearrangement. *J. Chem. Soc.; Perkin Trans.* **1975**, 1764-1767) su actividad farmacológica y posible aplicación en terapias definidas contra enfermedades determinadas, sorprendentemente, apenas si se ha explotado e investigado [(a) Blasig, L. E.; Mertsch, K.; Haseloff, R. F. Nitronyl nitroxides, a novel group of protective agents against oxidative stress in endothelial cells forming the blood-brain-barrier, *Neuropharmacology* **2002**, *43*, 1006-1014; (b) Robinson, A. J.; de Lucca, I.; Drummond, S.; Bosewell, G. A. Steroidal nitronone inhibitors of 5 α -reductase, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4801-4804].
- 30

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Tomando como base al actual estado de la técnica antes descrito, se han desarrollado moléculas híbridas que combinan y yuxtaponen un motivo "esteroide" y otro "nitrona", resultando en las nuevas entidades químicas que se han denominado "esteronitronas".

- 35 Es por tanto un objeto de la presente invención el uso de las esteronitronas de fórmula **la-c** y sus isómeros geométricos *E* y *Z*, con alta permeabilidad a la barrera hematoencefálica, capacidad antioxidante, y neuroprotectora, para la preparación de un medicamento o una composición farmacéutica destinada al tratamiento del ictus o accidente cerebrovascular, enfermedades de Alzheimer, Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica:



donde

5 R^1 representa independientemente un radical alquilo C1-C10 sustituido o no, grupos α -hidroxicetona, α -metilcetona, o hidroxilo, halógeno, éter con un radical alquilo C1-C10 sustituido o no, amina primaria, secundaria con un radical alquilo C1-C10 sustituido o no; amina terciaria con dos radicales alquilo C1-C10 sustituido o no;

10 R^2 representa un átomo de hidrógeno, un radical alquilo C1-C10 sustituido o no, hidroxilo, halógeno, éter con un radical alquilo C1-C10 sustituido o no, amina primaria, secundaria con un radical alquilo C1-C10 sustituido o no; amina terciaria con dos radicales alquilo C1-C10 sustituido o no, o grupo aciloxi (OCOX), donde X puede ser radical alquilo C1-C10 sustituido o no, fenilo, o anillo aromático sustituido con grupos halógeno, nitro, ciano, amino o éter con un radical alquilo C1-C10 sustituido o no, anillo heterocíclico de pirrol, piridina, indol, furano, o tiofeno;

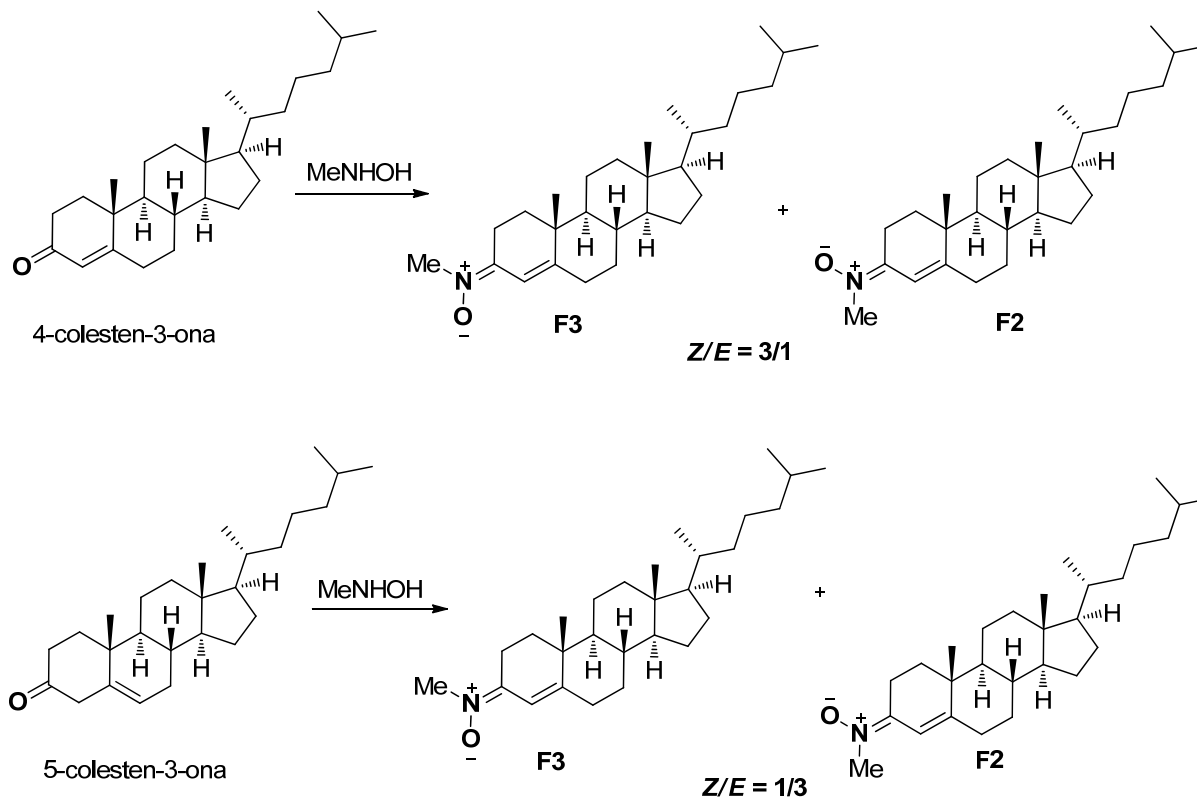
15 R^3 representa un átomo de hidrógeno, o grupo aciloxi (OCOX) donde X puede ser radical alquilo C1-C10 sustituido o no, fenilo, o anillo aromático sustituido con grupos halógeno, nitro, ciano, amino o éter con un radical alquilo C1-C10 sustituido o no, anillo heterocíclico de pirrol, piridina, indol, furano, o tiofeno, y

20 R^4 , un grupo metilo, *t*-butilo o bencilo.

En un modo de realización particular de la presente invención, aunque no limitante, el compuesto de la familia es: (*E*)-*N*-((8*S*,9*S*,10*R*,13*R*,14*S*,17*R*)-10,13-dimetil-17-((*R*)-6-metilheptan-2-ilo)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-1*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-3(2*H*,6*H*,10*H*)-ilideno)metanamina óxido (**F2**).

En otro modo de realización particular de la invención el compuesto de la familia es: (*Z*)-*N*-((8*S*,9*S*,10*R*,13*R*,14*S*,17*R*)-10,13-dimetil-17-((*R*)-6-metilheptan-2-ilo)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-1*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-3(2*H*,6*H*,10*H*)-ilideno) metanamina óxido (**F3**).

- 5 Ambos compuestos se preparan a partir de 4-colesten-3-ona o 5-colesten-3-ona por reacción con *N*-metilhidroxilamina, de acuerdo con el esquema:



- 10 Constituye igualmente un objeto de la presente invención una composición farmacéutica que comprende uno o más de los productos de fórmula **la**, **lb** o **lc**, así como sus isómeros, hidratos, sales, polimorfos, y pro-fármacos farmacéuticamente aceptables, junto con excipientes farmacéuticamente apropiados.

- 15 El objeto de la presente invención está igualmente referido a esteronitronas de fórmula general **la**, **lb** o **lc** y sus isómeros geométricos *E* y *Z*, con alta permeabilidad a la barrera hematoencefálica, capacidad antioxidante, y neuroprotectora, para su uso en el tratamiento del ictus o accidente cerebrovascular, enfermedades de Alzheimer, Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica.

- 20 Asimismo constituye otro objeto de la presente invención un método para el tratamiento del ictus o accidente cerebrovascular, enfermedades de Alzheimer, Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende esteronitronas de fórmula general **la**, **lb** o **lc**.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

- 25 **Figura 1:** Viabilidad celular en cultivos neuronales primarios, de 6 a 8 días de cultivo procedentes de corteza cerebral de rata, sometidos a privación de oxígeno y glucosa (DOG) durante 4 h, y posterior reperusión durante 24 h (R24h).

Figura 2: Viabilidad celular en cultivos neuronales expuestos a DOG durante 4 h, y posterior perfusión durante 5 d (R5d).

Figura 3: Reducción del daño isquémico neuronal en la región hipocampal CA1 debido a la colesteronitrona **F2**.

5 **Figura 4:** Reducción de la apoptosis neuronal en la región hipocampal CA1 debido a la colesteronitrona **F2** observado con el método TUNEL.

MODO DE REALIZACION DE LA INVENCION

Se aportan a continuación una serie de ejemplos de productos de uso según la presente invención y que son caracterizados mediante técnicas que se describen a continuación.

10 Los puntos de fusión fueron determinados en un equipo Koffler y no están corregidos.

Los espectros de ^1H NMR y ^{13}C NMR fueron obtenidos a temperatura ambiente, a 300, 400 ó 500 MHz y a 75, 100 o 125 MHz, respectivamente, utilizando CDCl_3 ó DMSO-d_6 como disolventes y los picos de estos disolventes deuterados como referencias internas (CDCl_3 : 7.27 (D), 77.2 (C) ppm; D_2O : 4.60 ppm y DMSO-d_6 : 2.49 (D), 40 (C)). La asignación de los desplazamientos químicos de los compuestos está determinada de acuerdo con los datos obtenidos en experimentos de RMN estándar (^1H , ^{13}C -DEPT, ^1H , ^1H -COSY, gHSQC, gHMBC).

15 Los análisis de espectrometría de masas se llevaron a cabo en un equipo de GC/MS con una fuente de ionización del tipo API-ES.

20 Los microanálisis se realizaron en el CNQO (CSIC, Madrid) en un analizador Heraeus CHN-O Rapid.

La cromatografía de capa fina se llevó a cabo en placas de silicagel F254 y para su visualización se utilizó luz ultravioleta o los reveladores ninhidrina, anisaldehído y ácido fosfomolibdico- H_2SO_4 . Todas las reacciones se realizaron empleando disolventes secos. Las columnas de cromatografía se llevaron a cabo utilizando gel de sílice de 0,06 mm (230 mesh).

Ejemplo 1. Procedimiento general para la síntesis de las nitronas. Una solución de cetona (1 mmol), Na_2SO_4 (3 mmol), y trietilamina (2 mmol) se suspendió en EtOH, y se trató con el clorhidrato de hidroxilamina (1.5 mmol). La mezcla se agitó 30 seg y se puso a irradiar en un horno de microondas (250 W) a 90 °C. Cuando la reacción se dio por concluida (análisis por ccf), el disolvente se eliminó en vacío, se diluyó con agua, se extrajo con AcOEt, se secó con Na_2SO_4 , se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía en columna.

Método A. Siguiendo el método general, la reacción de 4-colesten-3-ona (385 mg, 1 mmol), Na_2SO_4 (426 mg, 3 mmol), Et_3N (0.30 mL, 2 mmol), y clorhidrato de *N*-metilhidroxilamina (126 mg, 1.5 mmol) en etanol (10 mL), en 3 h de reacción, y tras cromatografía en columna ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, desde 1% a 2%), rindió una mezcla separable de ChN **F2** y ChN **F3** (396 mg, 96%, in 1:3 ratio).

Método B. Siguiendo el método general, la reacción de 5-coolesten-3-one (385 mg, 1 mmol), Na_2SO_4 (426 mg, 3 mmol), Et_3N (0.30 mL, 2 mmol), y clorhidrato de *N*-metilhidroxilamina (126 mg, 1.5 mmol) en etanol (10 mL), en 2 h, de reacción, y tras cromatografía en columna ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, desde 1% a 2%), rindió una mezcla separable de ChN **F2** y ChN **F3** (407 mg, 98%, relación 3:1).

ChN (**F2**): Sólido blanco; *Rf* (0.21, CH₂Cl₂/MeOH, 5%); pf 139-141 °C; IR (KBr) ν 2939, 2868, 2849, 1466, 1215 cm⁻¹; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5.97 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ⁴CH), 3.72 (s, 3H, NCH₃), 3.23 (d, *J* = 18.4 Hz, 1H, ²CH), 2.34 (m, 2H, ⁶CH₂), 2.21 (m, 1H, ²CH), 1.99 (m, 2H, CH₂), 1.80 (m, 2H, CH₂), 1.60 (s, 3H, CH₃), 1.36 (m, 10H, 5CH₂), 1.12 (m, 6H, 6CH₂), 1.04 (s, 3H, ¹⁹CH₃), 0.99 (m, 2H, CH₂), 0.91 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, ²¹CH₃), 0.88 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H, ²⁶CH₃), 0.86 (m, 3H, ²⁷CH₃), 0.70 (s, 3H, ¹⁸CH₃); RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 156.8 (³C), 146.4 (⁵C), 112.9 (⁴CH), 56.1 (¹⁷CH), 55.9 (¹⁴CH), 53.5 (⁹CH), 46.0 (¹³C), 42.3 (NCH₃), 39.6 (C), 39.4 (C), 37.9 (¹⁰C), 36.1 (C), 35.77 (C), 35.73 (C), 34.4 (C), 33.4 (C), 32.2 (²⁵CH₂), 28.1 (¹⁶CH₂), 27.9 (²CH₂), 24.2 (¹⁵CH₂), 23.8 (²⁴CH₂), 22.7 (²⁶CH₃), 22.5 (²⁷CH₃), 21.4 (CH₂), 21.3 (¹¹CH), 18.6 (¹⁹CH₃), 17.8 (²¹CH₃), 11.9 (¹⁸CH₃). EM (IE) *m/z*: 413 (M, 37%)⁺, 398 (M-CH₃, 27%), 397 (M-O, 70), 137 (C₈H₁₁NO, 100%); MS (ESI) *m/z*: 414.2 (M + H)⁺, 436.2 (M + Na)⁺, 827.8 (2M)⁺, 849.7 (2M + Na)⁺, Anal. Calcd para C₂₈H₄₇NO: C, 81.29; H, 11.45; N, 3.39. Encontrado: C, 80.98; H, 12.19; N, 3.44.

ChN (**F3**): Sólido blanco; *Rf* (0.20, CH₂Cl₂/MeOH, 5%); pf 153-5 °C. IR (KBr) ν 2936, 2868, 1629, 1214 cm⁻¹; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6.78 (s, 1H, ⁴CH), 3.66 (s, 3H, NCH₃), 2.44 (m, 4H, 2CH₂), 1.88 (m, 4H, 2CH₂), 1.37 (m, 14H, 7CH₂), 1.04 (s, 3H, ¹⁹CH₃), 0.98 (m, 2H, CH₂), 0.91 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, ²¹CH₃), 0.88 (d, *J* = 1.4 Hz, 3H, ²⁶CH₃), 0.85 (d, *J* = 1.4 Hz, 3H, ²⁷CH₃), 0.70 (s, 3H, ¹⁸CH₃); RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 123.7 (³C), 120.3 (⁵C), 113.7 (⁴CH), 56.0 (¹⁷CH), 55.9 (¹⁴CH), 53.5 (⁹CH), 46.4 (¹³C), 42.3 (NCH₃), 39.6 (C), 39.4 (C), 37.9 (¹⁰C), 36.0 (C), 35.72 (C), 35.71 (C), 35.4 (C), 32.9 (C), 32.2 (C), 28.1 (C), 27.9 (C), 24.1 (¹⁶CH₂), 23.7 (¹⁵CH₂), 23.6 (²⁴CH₂), 22.7 (²⁶CH₃), 22.5 (²⁷CH₃), 21.3 (¹¹CH₂), 18.6 (¹⁹CH₃), 17.8 (²¹CH₃), 11.9 (¹⁸CH₃). EM (IE) *m/z*: 413 (M, 37%)⁺, 398 (M-CH₃, 27%), 397 (M-O, 70), 137 (C₈H₁₁NO, 100%); EM (ESI) *m/z*: 414.2 (M + H)⁺, 827.8 (2M)⁺, 849.7 (2M + Na)⁺. Anal. Calcd para C₂₈H₄₇NO: C, 81.29; H, 11.45; N, 3.39. Encontrado: C, 81.03; H, 11.33; N, 3.30.

25 Evaluación farmacológica de la neuroprotección frente a isquemia

El poder neuroprotector de las colesteronitronas **F2** y **F3** se ha determinado en cultivos neuronales primarios, de 6 a 8 días de cultivo, procedentes de corteza cerebral de rata sometidos a deprivación de oxígeno y glucosa (DOG) de acuerdo con el siguiente protocolo:

La viabilidad celular se midió utilizando el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difenil tetrazolio (MTT). Así, la exposición de los cultivos neuronales durante 4 h a DOG (DOG 4 h) indujo una significativa disminución de la viabilidad celular del 67,3% (*p* < 0,0001 *versus* 100% control, test de muestra única), que se revirtió parcialmente después de 24 h de reperfusión (R24h, 76,1%; *p* < 0,0022 *versus* DOG 4 h, test de Student), pero sin llegar a alcanzar el valor control a las 24 h (*p* < 0,0001 *versus* 100% control, test de la *t* de muestra única) (Figura 1).

Las colesteronitronas **F2** y **F3**, en un rango de concentraciones desde 0,1 a 100 μ M, y desde 0,5 a 10 μ M, respectivamente, se añadieron al inicio del período de reperfusión a fin de evaluar su poder neuroprotector, usando como compuesto de referencia citicolina, un bien conocido agente neuroprotector. La citicolina se ensayó a concentraciones variables, entre 1 μ M y 1 mM, encontrándose efecto neuroprotector a 10 y 100 μ M (87,4 y 88,1%, respectivamente), siendo el efecto de 100 μ M significativo comparada con el valor obtenido a R24h (análisis de varianza (ANOVA), *p* < 0,0021; y *p* < 0,01, post-test de Dunnett).

La adición de la colesteronitrona **F2** a 1 o 5 μ M, pero no la colesteronitrona **F3**, aumentó significativamente la viabilidad neuronal durante la reperfusión, y a la concentración de 5 μ M se alcanzó casi el valor control (89,1 y 95,5%, para colesteronitrona **F2** a 1 ó 5 μ M, respectivamente; ANOVA, *p* < 0,0001; y *p* < 0,01, post-test de Dunnett comparado con R24h) (Figura 1).

La neuroprotección inducida por la colesteronitrona **F2** se comparó con la de citicolina a 5 μM , lo que resultó en una neuroprotección significativamente más alta que la observada para citicolina (Tabla 1).

5 **Tabla 1.** Efecto neuroprotector de las colesteronitronas **F2** y **F3** en cultivos neuronales en condiciones de DOG.

	Colesteronitrona	Concentración (μM)	Neuroprotección (%)
10	F2	0,1	9,6 \pm 0,5
		0,5	49,3 \pm 3,6
		1,0	54,3 \pm 1,3 *
		5,0	80,7 \pm 2,7 ***
		10	47,2 \pm 1,4
15		50	< 0
		100	< 0
	F3	0,5	< 0
		1,0	18,8 \pm 1,1
		5,0	21,7 \pm 1,2
20		10	0,8 \pm 0,07
	citicolina	100	50,2 \pm 1,26

Por el contrario, la colesteronitrona **F3** no mostró una significativa capacidad neuroprotectora.

25 Para evaluar el poder neuroprotector de las colesteronitronas **F2** y **F3** frente a un daño isquémico en neuronas cultivadas y simular unas condiciones de reperfusión a largo plazo, los cultivos se expusieron a DOG durante 4 h, y entonces, las células se sometieron a reperfusión durante 5 d (R5d).

30 Las colesteronitronas **F2** y **F3** (a concentraciones de 1,0 y 5,0 μM) se añadieron al principio del período de reperfusión y después de 48 h de reperfusión, para así evaluar su poder neuroprotector a largo plazo, utilizando de nuevo la molécula de referencia citicolina, de acuerdo con el protocolo del MTT (ver más arriba).

35 El experimento R5d indujo una más que notable disminución de la viabilidad celular (77,7%; $p < 0,0001$ versus 100% del control, test de la t de muestra única) (Figura 2). Citicolina, ensayada a una concentración de 100 μM , no produjo neuroprotección alguna en el experimento R5d tanto cuando se añadió al inicio de la reperfusión (barra sólida) o después de 48 h de reperfusión (barra rallada) (76,0 y 74,6%, respectivamente; ANOVA, $p = 0,786$).

5 Por el contrario, la adición de la colestonitrona **F2** (o **F3**) a 1 y 5 μM , sí produjo un considerable aumento en la viabilidad neuronal, superando el valor control observado a 5 d (110,6 y 118,2%, a 1 y 5 μM para la colestonitrona **F2**, respectivamente; 105,6 y 118,6%, a 1 and 5 μM para la colestonitrona **F3**, respectivamente; ANOVA, $p < 0,0001$; and $p < 0,01$, test de Dunnett) (Figura 2, barras sólidas).

10 Más aún, la colestonitrona **F2** (1 μM), o colestonitrona **F3** (5 μM), añadida después de 48 h de reperfusión (barras ralladas), aumentó significativamente la viabilidad neuronal en el experimento R5d (95,7 y 97,8%, a 1 and 5 μM para las colestonitronas **F2** y **F3**, respectivamente; ANOVA, $p < 0,0001$; and $p < 0,05$, según el test de Dunnett comparado con R5d) (Figura 2, barras ralladas).

En suma, la neuroprotección por las colestonitronas después de isquemia sigue siendo efectiva a largo plazo, y se mantuvo aún a las 48 h de tratamiento, cuando ya citicolina no mostró ningún efecto.

15 Se evaluó el poder neuroprotector de la colestonitrona más efectiva, **F2**, en un modelo animal de isquemia global cerebral.

20 La isquemia global se ha inducido en ratas adultas de acuerdo con el método usual de la obstrucción de los cuatro vasos [Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* **1982**, *11*, 491–498] evaluando la muerte neuronal mediante las técnicas de Fluoro-Jade B [Burda J, Matiasov M, Gottlieb M, Danielisov V, Nemethov M, García L et al. Evidence for a role of second pathophysiological stress in prevention of delayed neuronal death in the hippocampal CA1 region. *Neurochem Res* 2005, *30*, 1397–1405] y TUNEL [Ayuso MI, Martínez-Alonso E, Cid C, de Leciñana MA, Alcázar A. The translational repressor eIF4E-binding protein 2 (4E-BP2) correlates with selective delayed neuronal death after ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* En prensa doi: 10.1038/jcbfm.2013.60].

30 Así, las dos arterias vertebrales se cauterizaron completamente, y después de 24 h se indujo la isquemia por la oclusión de la carótida mediante pequeñas pinzas durante 15 min; a continuación, se quitaron las pinzas y se procedió a la reperfusión. Después de 5 d (R5d), los animales se sacrificaron. Los animales se trataron con colestonitrona **F2**, diluida en etanol al 10% en solución salina como vehículo, por vía intraperitoneal en el momento del inicio del período de reperfusión. Se han ensayado diez animales; uno de los cinco animales tratados con vehículo murió a los 2 d de reperfusión. Todos los protocolos utilizados en los experimentos con animales han sido realizados de acuerdo con las pautas aprobados por el

35 Comité de Ética del Hospital Ramón y Cajal (Madrid). En el modelo de isquemia cerebral de rata de la oclusión de los cuatro vasos, tras un breve período de isquemia se produce un neurodegeneración retardada en la región CA1 del hipocampo. En este modelo experimental, la reperfusión de 3 a 7 d después de isquemia induce una muerte neuronal significativa en CA1. La neurodegeneración selectiva de las neuronas en la zona CA1 fue evidente en comparación con lo observado en corteza cerebral.

40 Los animales se han tratado con colestonitrona **F2** a una dosis de 0,1 mg/kg, justo en el momento del inicio del período de reperfusión, analizándose la muerte neuronal inducida en 5 d (R5d). El efecto protector de la colestonitrona **F2** frente al IR stress-inducido por la muerte neuronal se observó con Fluoro-Jade B y se visualizó por microscopía de fluorescencia. Estos experimentos mostraron que el tratamiento con la colestonitrona

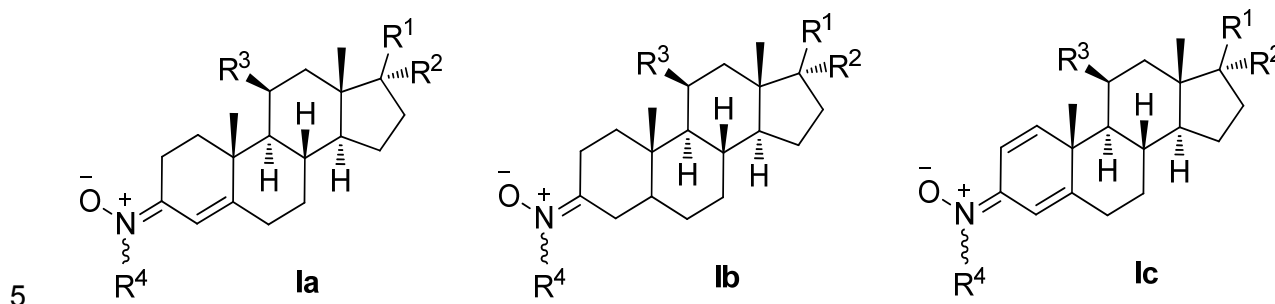
45 disminuyó significativamente la muerte neuronal en la región CA1 del hipocampo.

Los resultados mostraron que los animales tratados con la colesteronitrona presentaban una significativa disminución de la muerte por apoptosis en la región CA1 (CA1) en el experimento a 5 d (R5d) ($70,4 \pm 2,4$ comparado con $55,1 \pm 3,4$ de células por campo, para animales tratados con solución salina y colesteronitrona **F2**, respectivamente; ANOVA, $p < 0,0001$; and $p < 0,01$, post-test de Newman-Keuls) (Figura 3, CA1). La muerte neuronal inducida por isquemia también se observó en la corteza cerebral (C) y lateral (CL), aunque el efecto fue mucho más limitado que en la región CA1. Es más, la reducción del daño isquémico neuronal debido a la colesteronitrona **F2** se pudo observar en corteza cerebral ($6,7 \pm 3,5$ comparado con $0 \pm 0,1$ células por campo, para animales tratados con vehículo y colesteronitrona, respectivamente; $p < 0,05$, test de Student) y corteza lateral ($13,4 \pm 3,6$ comparado con $6,3 \pm 2,2$, para animales tratados con vehículo y colesteronitrona, respectivamente) (Figura 3).

La inducción de apoptosis se demostró específicamente en la región CA1 en el experimento R5d con el método TUNEL. Secciones de cerebro de animales tratados con vehículo (R5d) mostraron un nivel de células TUNEL-positivas más elevado que las de los animales tratados con colesteronitrona en la región CA1, corteza cerebral y corteza lateral (Figura 4). Los resultados mostraron que en los animales tratados con colesteronitrona **F2** la muerte neuronal por apoptosis había disminuido significativamente en la zona CA1 a los 5 d de reperusión (R5d) ($64,1 \pm 7,1$ comparado con $48,5 \pm 0,4$ de núcleos por campo, para animales tratados con vehículo y colesteronitrona, respectivamente; ANOVA, $p < 0,0001$; and $p < 0,01$, de acuerdo con el post-test de Newman-Keuls) (Figura 4, CA1). Al mismo tiempo, la disminución de muerte celular por apoptosis provocada por la colesteronitrona también se observó en corteza cerebral y lateral, en consonancia con los resultados descritos más arriba ($7,2 \pm 3,8$ y $1 \pm 0,5$ de núcleos por campo, para animales tratados con vehículo y colesteronitrona, respectivamente, en corteza cerebral; $13,3 \pm 6,2$ y $4,3 \pm 1,4$, para animales tratados con vehículo y colesteronitrona, respectivamente, en corteza lateral (Figura 4).

REIVINDICACIONES

1. Uso de derivados de esteronitronas de fórmula **la-c**, y sus isómeros geométricos *E* y *Z* en el doble enlace $R^4N(O)=C(3)$,



donde

10 R^1 representa independientemente un radical alquilo C1-C10 sustituido o no, grupos α -hidroxicetona, α -metilcetona, o hidroxilo, halógeno, éter con un radical alquilo C1-C10 sustituido o no, amina primaria, secundaria con un radical alquilo C1-C10 sustituido o no; amina terciaria con dos radicales alquilo C1-C10 sustituido o no;

15 R^2 representa un átomo de hidrógeno, un radical alquilo C1-C10 sustituido o no, hidroxilo, halógeno, éter con un radical alquilo C1-C10 sustituido o no, amina primaria, secundaria con un radical alquilo C1-C10 sustituido o no; amina terciaria con dos radicales alquilo C1-C10 sustituido o no, o grupo aciloxi (OCOX), donde X puede ser radical alquilo C1-C10 sustituido o no, fenilo, o anillo aromático sustituido con grupos halógeno, nitro, ciano, amino o éter con un radical alquilo C1-C10 sustituido o no, anillo heterocíclico de pirrol, piridina, indol, furano, o tiofeno;

20 R^3 representa un átomo de hidrógeno, o grupo aciloxi (OCOX) donde X puede ser radical alquilo C1-C10 sustituido o no, fenilo, o anillo aromático sustituido con grupos halógeno, nitro, ciano, amino o éter con un radical alquilo C1-C10 sustituido o no, anillo heterocíclico de pirrol, piridina, indol, furano, o tiofeno, y

R^4 , un grupo metilo, *t*-butilo o bencilo,

25 para la preparación de un medicamento o composición farmacéutica destinada al tratamiento del ictus o accidente cerebrovascular, enfermedades de Alzheimer, Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica.

30 **2.-** Uso según la reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto utilizado es (*E*)-*N*-((8*S*,9*S*,10*R*,13*R*,14*S*,17*R*)-10,13-dimetil-17-((*R*)-6-metilheptan-2-ilo)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-1*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-3(2*H*,6*H*,10*H*)-ilideno)metanamina óxido.

3.- Uso según la reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto es

(*Z*)-*N*-((8*S*,9*S*,10*R*,13*R*,14*S*,17*R*)-10,13-dimetil-17-((*R*)-6-metilheptan-2-ilo)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-1*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-3(2*H*,6*H*,10*H*)-ilideno)metanamina óxido.

4.- Composición farmacéutica que comprenden uno o más de los productos de formula **la-c**, así como sus isómeros, hidratos, sales, polimorfos, y pro-fármacos farmacéuticamente aceptables, junto con excipientes farmacéuticamente apropiados.

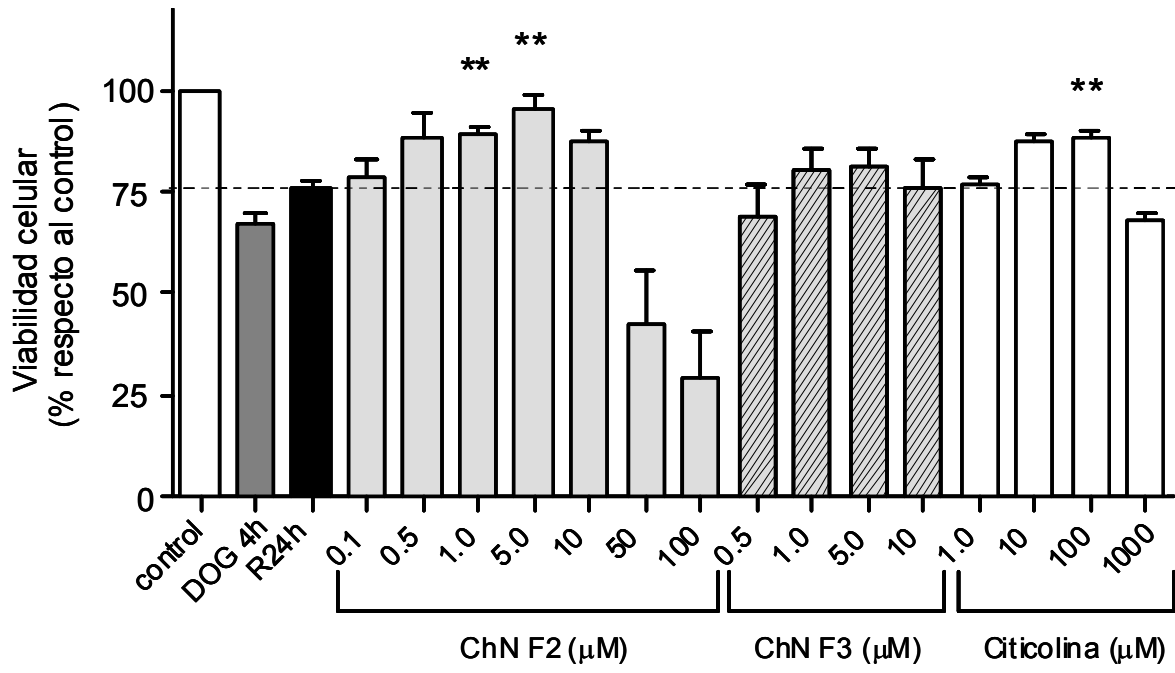


Figura 1

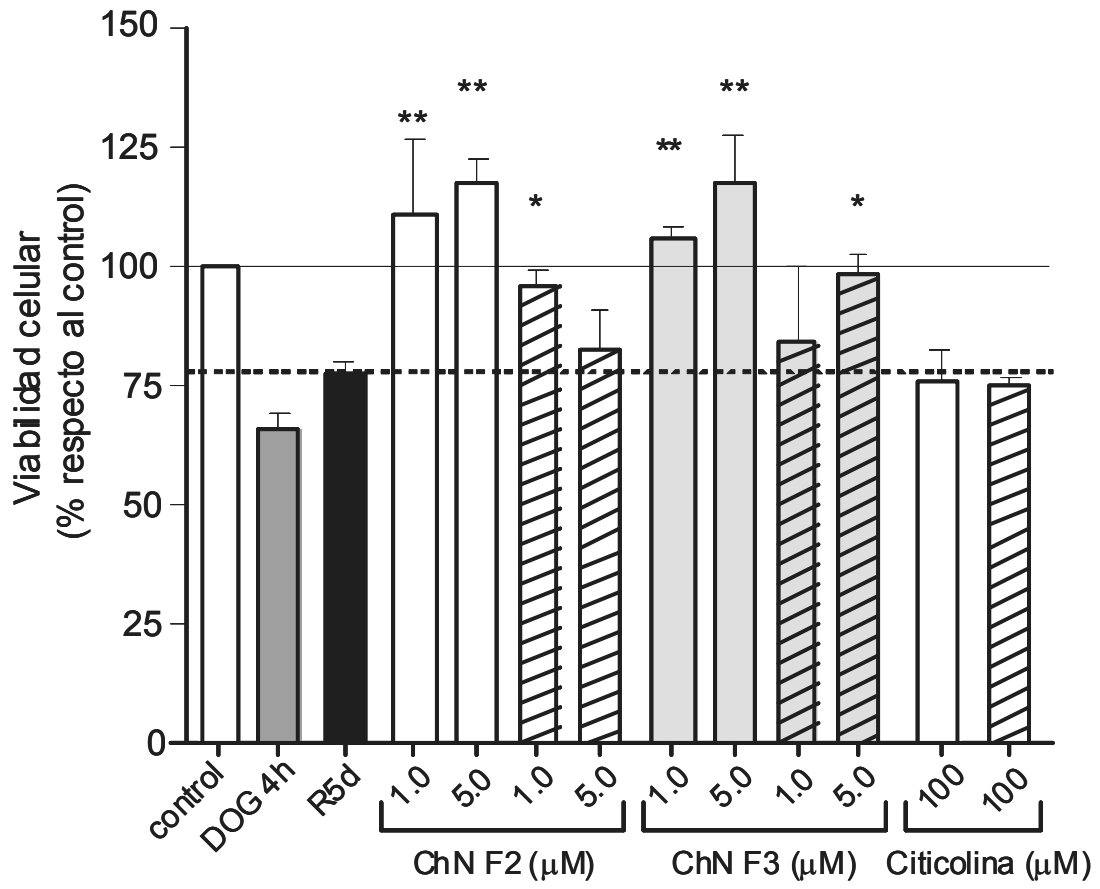


Figura 2

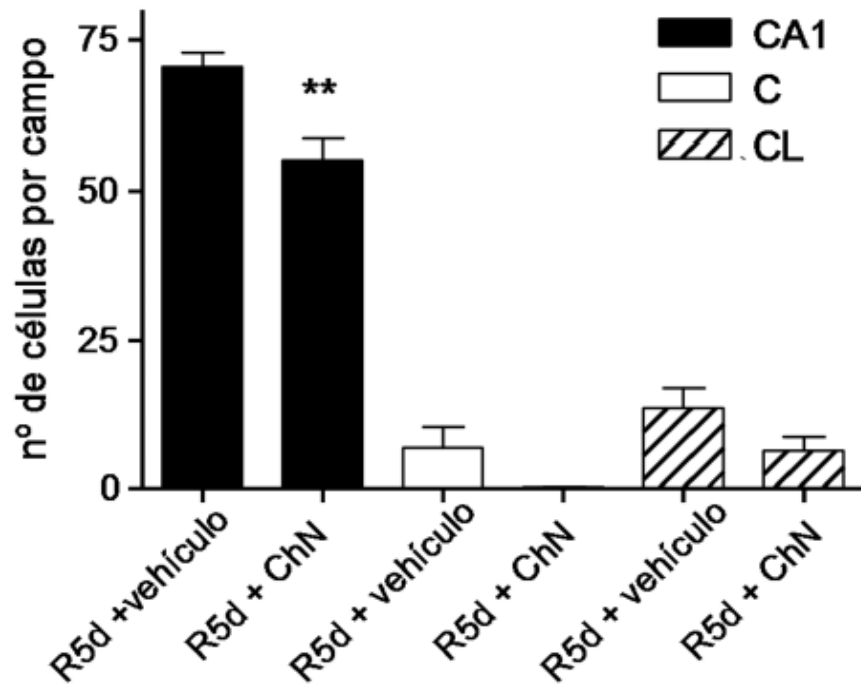
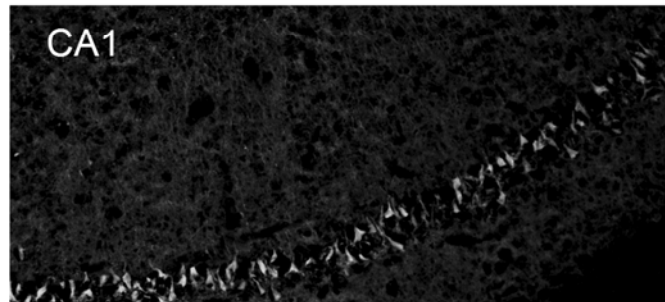
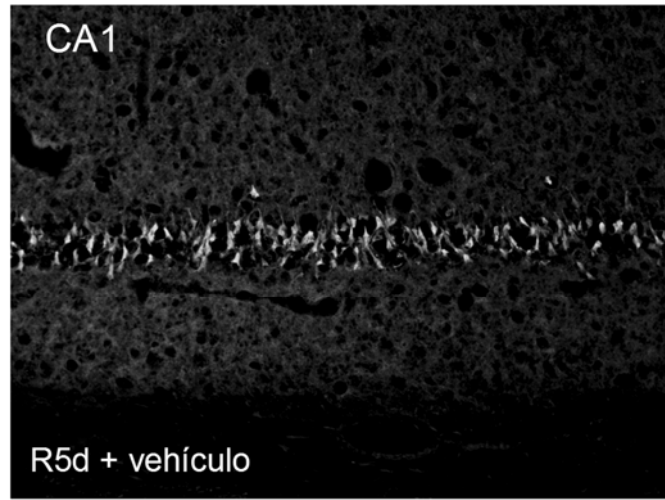


Figura 3

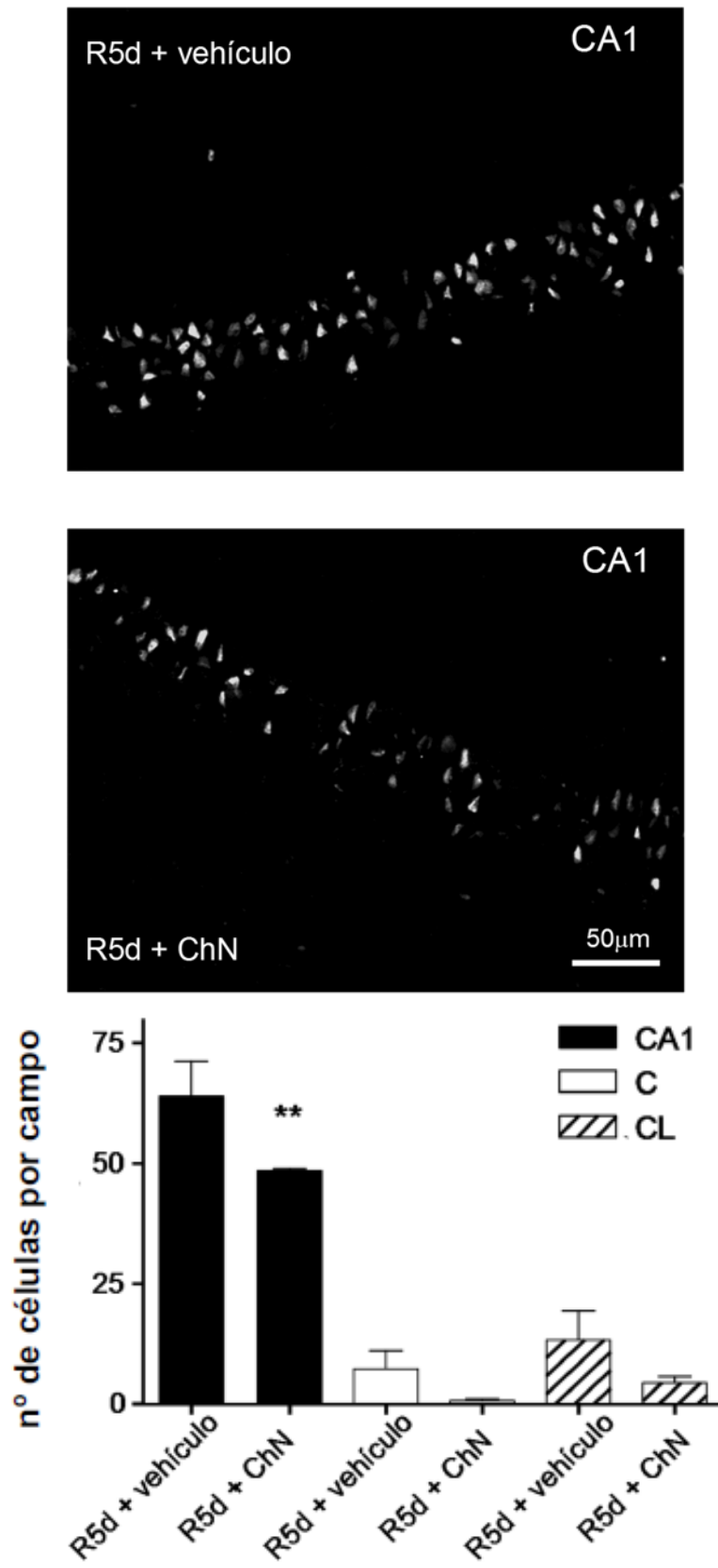


Figura 4