



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 173**

51 Int. Cl.:
A61K 31/575 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 39/00 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07731211 .4**
96 Fecha de presentación : **28.03.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2001483**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.12.2008**

54 Título: **Utilización de derivados de colest-4-en 3-ona para obtener un medicamento citoprotector.**

30 Prioridad: **31.03.2006 FR 06 02799**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.05.2011

73 Titular/es: **TROPHOS**
Parc Scientifique Luminy
Luminy Biotech Entreprises Case 931
13288 Marseille Cédex 9, FR

72 Inventor/es: **Pruss, Rebecca;**
Buisson, Bruno y
Bordet, Thierry

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 359 173 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a la utilización de derivados de colest-4-en-3-ona, para la obtención de un medicamento citoprotector, a excepción de un medicamento neuroprotector.

5 Los procesos degenerativos celulares se caracterizan por la disfunción de las células que acarrearán con frecuencia actividades celulares indeseables y la muerte celular.

Las células han desarrollado mecanismos de adaptación, en respuesta al estrés, que alargan la duración de la vida o retardan o impiden la muerte celular (mecanismos citoprotectores).

10 Sin embargo, estos mecanismos citoprotectores, son a veces insuficientes, inadecuados o producidos demasiado tarde para ser eficaces y las células mueren. Puede pues parecer interesante disponer de nuevos medicamentos, citoprotectores, que favorecen la citoprotección. Este es uno de los objetivos de la presente invención.

15 El término "citoprotector" hace referencia a la capacidad de los agentes, naturales o no, para proteger una célula de la muerte celular, particularmente de la muerte celular patológica y/o contra las disfunciones celulares que conducen a la muerte celular. Estas disfunciones celulares pueden ser por ejemplo de origen mitocondrial, como una reducción de la capacidad para generar el ATP, una incapacidad para captar y/o retener el calcio o la generación de radicales libres.

Entre los mecanismos principales de la muerte celular, se distingue esencialmente la necrosis, la apoptosis y la necroptosis.

20 La necrosis es una muerte celular denominada "accidental" que sobreviene en una lesión tisular. La membrana plásmica de la célula que es la más afectada, es la que ocasiona una modificación de la homeostasis de la célula. Las células van a saturarse de agua hasta el punto que esto va a acarrear la lisis de su membrana plásmica. Esta lisis celular conduce al alargamiento en el medio circundante del contenido citoplásmico. La necrosis está en el origen del proceso inflamatorio.

25 La necrosis puede afectar un conjunto de células o un tejido cuando las otras partes vecinas permanecen vivas. La transformación que resulta de ello es una mortandad de células o de tejidos.

30 Dicho de otra manera, la necrosis se define por modificaciones morfológicas que sobrevienen cuando una célula llega al fin de la vida como consecuencia de los episodios tales como un traumatismo importante, como una parada o una disminución de la circulación sanguínea a nivel de un órgano, la hipotermia (elevación importante de la temperatura), una intoxicación por un producto químico, un choque físico, etc.... Una de las necrosis más conocidas es la del miocardio en el momento del infarto (detención del aporte circulatorio a nivel del músculo cardíaco) debido a una obliteración (obstrucción) de una arteria coronaria.

35 La apoptosis forma parte integrante de la fisiología normal de un organismo. Es una forma fisiológica de muerte celular altamente regulada y es necesaria para la supervivencia de los organismos pluricelulares. La apoptosis es un proceso que desempeña una función primordial en el transcurso de la embriogénesis.

40 Las células en apoptosis o apoptóticas van a aislarse de las demás células. La apoptosis implica habitualmente células individuales en un tejido y no provoca inflamación. Uno de los puntos morfológicos característicos de la apoptosis es la importante condensación a la vez del núcleo y del citoplasma lo que conduce a una significativa disminución del volumen celular. El núcleo se fragmenta a continuación, cada fragmento se rodea de una doble envoltura. Los cuerpos apoptóticos (elementos citoplásmicos y nucleares) se liberan a continuación y van a ser absorbidos por fagocitosis por las células próximas.

45 La apoptosis puede ser provocada de diferentes maneras. Por ejemplo, una radiación, la presencia de un compuesto químico o de una hormona son estímulos susceptibles de inducir una cascada de episodios apoptóticos en la célula. Las señales intracelulares, como una mitosis incompleta o un daño al ADN pueden también provocar apoptosis.

50 La apoptosis interviene también después de la acción de un genotóxico o en el transcurso de una enfermedad. Determinadas patologías se caracterizan por una apoptosis anormal, acarreado la pérdida de determinadas poblaciones celulares, como por ejemplo la hepatotoxicidad, las retinopatías o la cardiotoxicidad.

Se distingue pues la apoptosis fisiológica y la apoptosis patológica.

La invención se refiere esencialmente a la apoptosis patológica.

Existen otros mecanismos de muerte celular, como por ejemplo la necroptosis, que presenta características de la necrosis y de la apoptosis. Una célula que muere por necroptosis presenta

características similares a las de una célula que muere por necrosis, pero las etapas bioquímicas de este mecanismo se asimilan más a las de las apoptosis. Este mecanismo de muerte celular interviene por ejemplo en la isquemia.

5 Es también pues uno de los objetivos de la presente invención disponer de nuevos medicamentos que puedan permitir prevenir y/o tratar la necrosis y/o la apoptosis patológica y/o la necroptosis (medicamentos antinecróticos y/o antiapoptóticos y/o antinecroptóticos).

Los procesos degenerativos celulares pueden dar como resultado, entre otras a situaciones patológicas reagrupadas bajo el término de enfermedades o afecciones degenerativas, traumatismos o exposición a diferentes factores.

10 Estos traumatismos y factores pueden incluir, por ejemplo, la exposición a radiaciones (UV, gamma), la hipoxia o la privación de oxígeno, la privación de nutrientes, la privación de factores de crecimiento, de venenos, de toxinas celulares, de residuos, de toxinas medioambientales, de radicales libres, oxígenos reactivos o incluso determinados episodios y/o procedimientos médicos como por ejemplo los traumatismos quirúrgicos incluyendo los trasplantes de células, de tejidos y de órganos. Se
15 pueden citar igualmente agentes químicos o biológicos utilizados como agentes terapéuticos en el contexto de los tratamientos médicos como por ejemplo agentes citostáticos o agentes anti-inflamatorios.

20 La invención no tiene por objeto tratar las causas extracelulares de las patologías o de los procesos degenerativos que pueden conducir a muerte celular, más bien las consecuencias a nivel celular de dichos procesos patológicos o de dichas patologías y particularmente proteger la célula contra dichas consecuencias.

Entre las situaciones patológicas caracterizadas por un proceso degenerativo las más importantes, aparte de las afecciones neurológicas o neurodegenerativas a las que no se refiere la presente invención, se encuentran:

25 las enfermedades óseas, de articulaciones, del tejido conjuntivo o del cartílago, tales como la osteoporosis, la osteomielitis, las artritis unas de ellas por ejemplo la osteoartritis, la artritis reumatoidea y la artritis psoriásica, la necrosis avascular, la fibrodisplasia osificante progresiva, el raquitismo, el síndrome de Cushing;

las enfermedades musculares, tales como la distrofia muscular, como por ejemplo la distrofia muscular de Duchenne, las distrofias miotónicas, las miopatías y las miastenias;

30 las enfermedades de la piel, tales como la dermatitis, el eccema, la psoriasis, el envejecimiento, o incluso las alteraciones de la cicatrización;

35 las enfermedades cardiovasculares tales como la isquemia cardíaca y/o vascular, el infarto de miocardio, la cardiopatía isquémica, la insuficiencia cardíaca crónica o aguda, la arritmia cardíaca, la fibrilación auricular, la fibrilación ventricular, la taquicardia paroxística, la insuficiencia cardíaca, la cardiomiopatía hipertrófica, la anoxia, la hipoxia, los efectos secundarios debidos a terapias con agentes anticancerosos;

las enfermedades circulatorias tales como la aterosclerosis, las esclerosis arteriales y las enfermedades vasculares periféricas, los accidentes vasculares cerebrales, los aneurismas;

40 las enfermedades hematológicas y vasculares tales como: la anemia, la amiloidosis vascular, las hemorragias, la drepanocitosis, el síndrome de fragmentación de los glóbulos rojos, la neutropenia, la leucopenia, la aplasia medular, la pancitopenia, la trombocitopenia, la hemofilia;

las enfermedades pulmonares incluyendo la neumonía, el asma; las enfermedades crónicas obstructivas de los pulmones como por ejemplo las bronquitis crónicas y la enfisemia;

las enfermedades del aparato gastrointestinal, tales como las úlceras;

45 las enfermedades del hígado, como por ejemplo las hepatitis, particularmente las hepatitis de origen vírico o que tienen por agente etiológico otros agentes infecciosos, las hepatitis alcohólicas, las hepatitis autoinmunitarias, las hepatitis fulminantes, determinados trastornos metabólicos hereditarios, la enfermedad de Wilson, las cirrosis, la enfermedad hepatoalcohólica (ALD), las enfermedades del hígado debidas a toxinas o a medicamentos; las esteatosis como por ejemplo:

50 - las esteatosis hepáticas no alcohólicas (NASH) o que acompañan a la intoxicación exógena al alcohol, a medicamentos, las hepatitis víricas o tóxicas, las complicaciones de procedimientos quirúrgicos, las enfermedades metabólicas (tales como la diabetes, síndrome de intolerancia a la glucosa, obesidad, hiperlipidemia, disfunciones del eje hipotálamohipofisiario, abetalipoproteinemia, galactosemias, enfermedades del glucógeno, enfermedad de Wilson, enfermedad de Weber-Christian, el síndrome de Refsum, la insuficiencia en carnitina),
55

- las complicaciones hepáticas de enfermedades inflamatorias del tubo digestivo,
- las hepatitis autoinmunitarias.

5 Por medio de una acción sobre la esteatosis o de una acción sobre la apoptosis hepática, cualquiera que sea la causa, los compuestos podrían presentar una acción preventiva en el desarrollo de la fibrosis hepática y de la prevención de la sobrevenida de la cirrosis, las enfermedades del páncreas, como por ejemplo las pancreatitis agudas o crónicas;

las enfermedades metabólicas, tales como la diabetes mellitus e insípida, las tiroiditis;

las enfermedades renales, tales como por ejemplo los trastornos renales agudos, la toxicidad renal debida a toxinas o a medicamentos, la glomerulonefritis;

10 las intoxicaciones graves por agentes químicos, toxinas o medicamentos;

las afecciones degenerativas asociadas al Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA);

los trastornos asociados al envejecimiento, tal como el síndrome de envejecimiento acelerado;

los trastornos dentales tales como los que conducen a la degradación de tejidos como por ejemplo las periodontitis;

15 las enfermedades o trastornos oftálmicos incluyendo las retinopatías diabéticas, el glaucoma, la ptosis, la atrofia óptica, la oftalmoplejia externa progresiva crónica, las degeneraciones maculares, la degeneración retiniana, la retinitis pigmentaria, los orificios o desgarros retinianos, el desprendimiento de retina, la isquemia retiniana, las retinopatías agudas asociadas a un traumatismo, las degeneraciones inflamatorias, las complicaciones posquirúrgicas, las retinopatías medicamentosas, la catarata;

20 los trastornos de las vías auditivas, tales como la otosclerosis y la sordera producida por antibióticos;

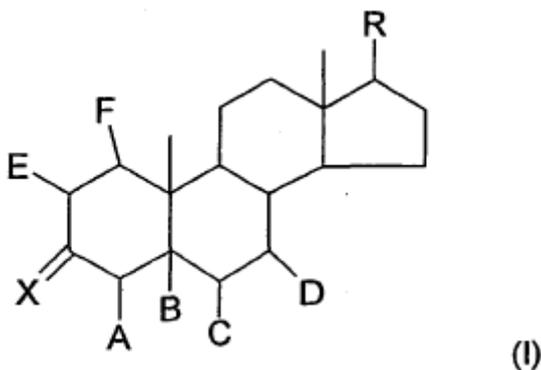
las enfermedades asociadas a mitocondrias (patologías mitocondriales) tales como la ataxia de Friedrich, la distrofia muscular congénita con anomalía mitocondrial estructural, determinadas miopatías (síndrome de MELAS, síndrome de MERFF, síndrome de Pearson, síndrome de Kearns-Sayre, síndrome de MIDD (diabetes mitocondriales y sordera), el síndrome de Wolfram, la distonia.

25 La invención se interesa igualmente en la protección de células, tejidos y/o órganos trasplantados, ya sea antes, durante (principalmente transporte y/o reimplantación) o después del trasplante.

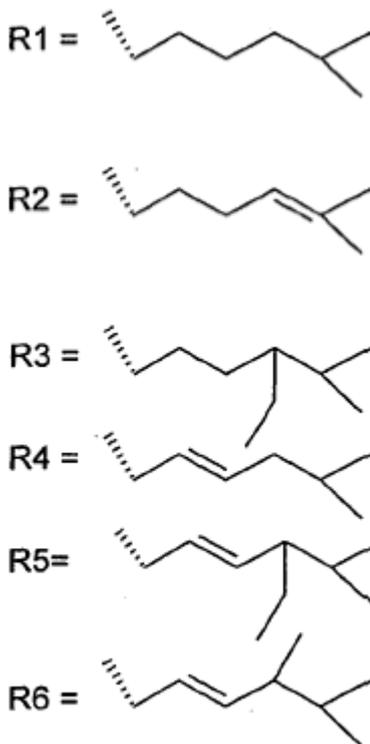
30 Se buscan siempre compuestos farmacológicamente activos para luchar contra los procesos degenerativos mencionados anteriormente.

La presente invención responde a esta petición de compuestos citoprotectores. En efecto, la solicitante ha descubierto que los derivados de colest-4-en-3-ona y principalmente la oxima de colest-4-en-3-ona están dotados de notables propiedades citoprotectoras.

35 Esto es por lo que la presente invención tiene por objeto la utilización de al menos un compuesto que responde a la fórmula I



en la que X representa un grupo =N-OH, y R representa un grupo seleccionado entre



- A representa un átomo de hidrógeno o junto con B un enlace carbono-carbono,
 B representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o junto con A un enlace carbono-carbono,
 C representa un átomo de hidrógeno o junto con D un enlace carbono-carbono,
 5 D representa un átomo de hidrógeno o junto con C un enlace carbono-carbono,
 E representa un átomo de hidrógeno o junto con F un enlace carbono-carbono,
 F representa un átomo de hidrógeno o junto con E un enlace carbono-carbono,

o una de las sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables, o uno de sus ésteres o una de las sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables de dichos ésteres,

- 10 para la preparación de un medicamento citoprotector, a excepción de un medicamento neuroprotector.

Los compuestos de fórmula I tales como los definidos anteriormente son conocidos (documento WO 2004/082581).

- 15 Las sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables pueden ser por ejemplo de sales formadas con los ácidos clorhídrico, bromhídrico, nítrico, sulfúrico, acético fosfórico, fórmico, propiónico, benzoico, maleico, fumárico, succínico, tartárico, cítrico, oxálico, glioxílico, aspártico, alcanosulfónicos tales como los ácidos metano o etano sulfónicos, arilsulfónicos, tales como los ácidos benceno o paratoluen-sulfónicos o carboxílicos.

Según la invención el grupo oxima representa los isómeros syn y anti, puros o mezclados, asociados a la orientación del enlace N-O con relación al doble enlace C=N.

- 20 Entre los compuestos descritos anteriormente, se recuerdan más específicamente los compuestos anteriores para los que:

- A representa junto con B un enlace carbono-carbono, C, D, representan un átomo de hidrógeno, E, F representan un átomo de hidrógeno o juntos un enlace carbono-carbono y R tiene el significado de R1,
 - A representa junto con B un enlace carbono-carbono, C, D, representan un átomo de hidrógeno, E, F representan un átomo de hidrógeno y R tiene el significado de R2, R3 o R4,
 - A representa junto con B un doble enlace, C representa junto con D un enlace carbono-carbono, E, F representan un átomo de hidrógeno y R tiene el significado de R1 o R6,
- 25

- A representa junto con B un doble enlace, C representa junto con D un enlace carbono-carbono, E representa junto con F, un enlace carbono-carbono y R tiene el significado de R1,
- E representa junto con F un doble enlace, C, D, A, B representan un átomo de hidrógeno y R tiene el significado de R1,

5 así como sus sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables.

Ventajosamente, se utiliza según la invención al menos un compuesto de fórmula I seleccionado de entre

la oxima de colestán-3-ona,

la oxima de colest-4-en-3-ona,

10 la oxima de colest-1,4-dien-3-ona

o una de sus sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables, o uno de sus ésteres o una de las sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables de dichos ésteres.

15 Preferentemente, se utiliza según la invención la oxima de colest-4-en-3-ona o la oxima de colest-1,4-dien-3-ona o una de sus sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables, o uno de sus ésteres o una de las sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables de dichos ésteres. Las interesantes propiedades citoprotectoras de los compuestos de fórmula I justifican su utilización para la preparación de un medicamento citoprotector, destinado particularmente al tratamiento o a la prevención de la necrosis y/o de la apoptosis patológica y/o de la necroptosis (medicamentos antinecróticos y/o antiapoptóticos y/o antinecroptóticos) o incluso afecciones como

20 las enfermedades óseas, de las articulaciones, del tejido conjuntivo y del cartílago,

las enfermedades musculares,

las enfermedades de la piel,

las enfermedades cardiovasculares,

las enfermedades circulatorias,

25 las enfermedades hematológicas y vasculares,

las enfermedades pulmonares,

las enfermedades del aparato digestivo,

las enfermedades del hígado,

las enfermedades del páncreas,

30 las enfermedades metabólicas,

las enfermedades renales,

las intoxicaciones graves,

las afecciones degenerativas asociadas al Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA),

las trastornos asociados al envejecimiento,

35 los trastornos dentales,

las enfermedades o trastornos oftálmicos,

las enfermedades de las vías auditivas,

las enfermedades asociadas a las mitocondrias (patologías mitocondriales).

40 La invención se interesa igualmente en la protección de células, tejidos u órganos trasplantados, ya sea antes, durante (extracción, transporte y/o reimplantación) o después del trasplante.

Ventajosamente, los compuestos de fórmula I pueden utilizarse en la preparación de un medicamento destinado a la protección de las células cardíacas (medicamento cardioprotector), a la protección de las células hepáticas (medicamento hepatoprotector) o de un medicamento destinado al tratamiento o a la prevención de enfermedades asociadas a las mitocondrias.

Según la invención el compuesto de fórmula I está presente ventajosamente en el medicamento citoprotector a dosis fisiológicamente eficaces; conteniendo dichos medicamentos principalmente una dosis citoprotectora eficaz de al menos uno de los compuestos de fórmula I.

5 A modo de medicamentos, los compuestos que responden a la fórmula I, sus ésteres, sus sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables, así como las sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables de dichos ésteres pueden formularse para la vía digestiva o parenteral.

10 Los medicamentos según la invención pueden comprender además al menos otro ingrediente terapéuticamente activo, ya sea activo en la misma patología o en una patología diferente, para una utilización simultánea, separada o escalonada en el tiempo, principalmente en un tratamiento en un paciente que padece una de las patologías anteriormente citadas.

15 Según la invención, el compuesto de fórmula I puede utilizarse en el medicamento, en mezcla con uno o varios excipientes o vehículos inertes, es decir farmacéuticamente inactivos y no tóxicos. Se puede citar por ejemplo soluciones salinas, fisiológicas, isotónicas, tamponadas, etc., compatibles con una utilización farmacéutica y conocidos por el experto en la materia. Las composiciones pueden contener uno o varios agentes o vehículos seleccionados de entre dispersantes, disolventes, estabilizantes, conservantes, etc. Los agentes o vehículos utilizables en las formulaciones (líquidas o inyectables y/o sólidas) son principalmente la metilcelulosa, la hidroximetilcelulosa, la carboximetilcelulosa, las ciclodextrinas, el polisorbato 80, el manitol, la gelatina, la lactosa, aceites vegetales o animales, la acacia, etc. De manera preferente, se utilizan aceites vegetales. Las composiciones pueden formularse en forma de suspensión inyectable, de geles, aceites, comprimidos, supositorios, polvos, píldoras, cápsulas, etc., eventualmente por medio de formas galénicas o dispositivos que aseguran una liberación prolongada y/o retardada. Para este tipo de formulación, se utiliza con ventaja un agente tal como la celulosa, carbonatos o almidones.

25 La administración puede realizarse por cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia, con preferencia por vía oral o por inyección, por lo general por vía intraperitoneal, intracerebral, intratecal, intravenosa, intra-arterial o intramuscular. Se prefiere la administración por vía oral. Tratándose de un tratamiento de larga duración, la vía de administración preferida será lingual, sublingual, bucal o transcutánea.

30 Para las infecciones, los compuestos están generalmente acondicionados en forma de suspensiones líquidas, que pueden inyectarse por medio de jeringuillas o de perfusiones, por ejemplo, se entiende que el caudal y/o la dosis inyectada, o de manera general la dosis a administrar, pueden ser adaptadas por el especialista en función del paciente, de la patología, del modo de administración, etc. Se entiende que las administraciones repetidas pueden realizarse, eventualmente en combinación con otros principios activos y/o cualquier otro vehículo aceptable en el campo farmacéutico (tampones, soluciones salinas, isotónicas, en presencia de agentes estabilizantes, etc.).

35 La invención es utilizable en los mamíferos, principalmente en el ser humano.

En general la dosis diaria del compuesto será la dosis mínima para obtener el efecto terapéutico deseado. Las dosis de los compuestos descritos anteriormente y por ejemplo de la oxima de colest-4-en-3-ona estarán comprendidas en general entre 0,001 y 100 mg por kilo al día para el hombre.

40 Si es necesario, la dosis diaria puede administrarse en dos, tres, cuatro, cinco, seis o más, tomas al día o en subdosis múltiples administradas a intervalos apropiados durante el día.

45 La cantidad seleccionada dependerá de muchos factores, en particular de la vía de administración, de la duración de la administración, del momento de la administración, de la velocidad de eliminación del compuesto, del o de los diferentes productos utilizados en combinación con el compuesto, de la edad, del peso y del estado físico del paciente, así como de sus antecedentes médicos, y de cualesquiera otras informaciones conocidas en medicina.

La prescripción del médico de cabecera podrá comenzar con dosis inferiores a las generalmente utilizadas, después estas dosis se aumentarán progresivamente a fin de controlar mejor la aparición de eventuales efectos secundarios.

50 Ejemplo 1: Efecto antiapoptótico de la oxima de colest-4-en-3-ona

Las propiedades antiapoptóticas de la oxima de colest-4-en-3-ona han sido analizadas en cardiomiocitos, mediante una prueba de disfunción contráctil provocada por la doxorubicina.

55 Se ha utilizado una solución madre de la oxima de colest-4-en-3-ona con una concentración de 10 mM en 100% de DMSO. La concentración final en DMSO ha sido la misma para todos los puntos experimentales, independientemente de las concentraciones en las moléculas utilizadas. La oxima de colest-4-en-3-ona ha sido probada a las concentraciones de 0,3, 1 y 3 μ M, diluidas en una solución de

Tyrode (composición en mmoles/l: NaCl 135, KCl 5,4, NaH₂PO₄ 0,33, CaCl₂ 1,2, MgCl₂ 1,0, Hepes 10; pH ajustado a 7,4 con NaOH).

Métodos

Contractilidad y apoptosis de cardiomiocitos ventriculares del conejo

5 A.1 Obtención de células aisladas de cardiomiocitos ventriculares de conejo

Se obtienen células ventriculares aisladas a partir de corazones de conejos macho de Nueva Zelanda como se describe en A. d'Anglemont de Tassigny *et al.*, *Fund. Clin. Pharmacol.*, 18:531-38, 2004. En resumen, los conejos (2,0-2,5 kg) se anestesian con una solución de pentobarbital (50 mg/kg) después reciben heparina (200 UI/kg). Se extirpan los corazones e inmediatamente se perfunden, durante 10 a 15 minutos gracias a un aparato de Langendorff sin recirculación con una solución isotónica de Tyrode (sin calcio) oxigenada (95%, 2,5% CO₂ (en mM (NaCl 135, KCl 5,4, Na₂PO₄ 0,33, MgCl₂ 1,0, HEPES 10, pH ajustado a 7,4 con NaOH 1 M a 37°C, 280-300 mOsmol/kg H₂O). A continuación, todos los corazones se perfunden en 3 minutos en modos "recirculación", con la misma solución de Tyrode sin calcio (caudal coronario, 10 a 15 ml/min) añadido de 1 mg/ml de colagenasa Tipo II y 0,28 mg/ml de proteasa Tipo XIV. Por último todos los corazones se perfunden en modo sin recirculación con la misma solución de Tyrode enriquecida con CaCl₂ 0,3 mM durante 10 min. El ventrículo izquierdo se extrae y se corta en pequeños trozos, se realiza la disociación celular por agitación mecánica suave. Se añade calcio extracelular por incremento cada 15 minutos, para llegar a una concentración fisiológica de 1,0 mM. Los miocitos aislados se mantienen en un medio sin suero que contiene (en mM) NaCl 110, KCl 5,4, Na₂PO₄ 0,33, NaHCO₃ 25, Glucosa 5, MgCl₂ 0,8, CaCl₂ 1, pH ajustado a 7,4 hasta 1 h 30 antes de la experimentación. Todas las células están en forma de varilla, tienen una estriación cruzada clara y no presentan vesículas en su superficie al microscopio óptico.

A.2 Marcaje con anexina V

El marcaje con anexina V de la fosfatidilserina se ha utilizado como método cuantitativo de medición de la apoptosis utilizando el kit MiniMacs cell isolation (Miltenyi Biotec, Bergisch, Gladbach, Alemania). En resumen, las células que se exponen a la fosfatidilserina se marcan magnéticamente con las microbolas de anexina V, después se pasan en una columna colocada en un campo magnético. Las células marcadas (que presentan fosfatidilserina marcada magnéticamente) se retienen en la columna mientras que las no marcadas (células necróticas y no apoptóticas) no se retienen. La columna se retira del campo magnético, las células que se exponen a la fosfatidilserina retenidas magnéticamente se eluyen como fracción positiva y se cuentan con una célula de Mallassez. El porcentaje de células apoptóticas se relaciona entonces con el número inicial de células.

A.3 Medición de la actividad de caspasa-3

La actividad de caspasa-3 se utiliza como método cuantitativo de medición de la apoptosis. En resumen, se lisan las células y el sobrenadante se utiliza para la medición de la actividad de caspasa-3 utilizando el kit AK-005 (Biomol Research Laboratories, Plymouth Meeting, PA, EE.UU.). El sustrato fluorógeno para medir la actividad de caspasa-3 (DEVD) se marca con el fluorocromo 7-amimo-4-metilcumarina (AMC) que produce una fluorescencia amarilla-verdosa detectable a la luz UV a 360/460 nm durante 210 min. La AMC es liberada del sustrato por escisión por la caspasa-3, la expresión de la enzima se expresa en fmol/min.

A.4 Medición de la contractilidad

Los miocitos se transfieren a una cámara a 37°C perfundida de manera continua y colocada sobre la platina de un microscopio invertido. La cámara se perfunde con tampón fisiológico que contiene (en mM): NaCl 140, KCl 5,4, ClCa₂ 1, MgCl₂ 0,8, HEPES 10 y glucosa 5,6 (pH = 7,4; 290 mOs mol/kg H₂O).

La contracción de los miocitos es provocada una vez por segundo (1 Hz) con electrodos de campo en platino colocados en la cámara y unidos a un estimulador. Las imágenes se toman de manera continua con un objetivo x 20 y se transmiten a una cámara CCD a razón de 240 muestras/s. Las imágenes de la cámara CCD se proyectan sobre una pantalla de video.

Se han seleccionado miocitos para el estudio según el criterio siguiente: un aspecto en forma de varilla con estriaciones muy aparentes y no de vacuola intracelular, sin contracción espontánea cuando se les estimula con Ca²⁺ 1 mM, y con la longitud de reposo y una amplitud de contracción constantes. La longitud de los sarcómeros se ha medido gracias a un programa de análisis de la imagen por video y los datos se han tomado a un ritmo de 240 muestras/s. Las imágenes de la cámara se han convertido en mediciones de longitud de sarcómero. El porcentaje de contracción se calcula a partir de estos datos sobre la longitud del sarcómero.

A.5 Análisis de los datos

Todos los datos se han expresado en media \pm desviación estándar. Las comparaciones de los datos entre los diferentes grupos han sido realizadas por ANOVA seguido de una prueba de Student con una diferencia significativa en $p < 0,05$.

5 ■ Protocolo experimental

10 La apoptosis se produce en los cardiomiocitos aislados por exposición durante 3 a 8 h a $1 \mu\text{M}$ de doxorubicina añadida en una solución isotónica que contiene (en mM) NaCl 110, KCl 5,4, Na_2PO_4 0,33, NaHCO_3 25, Glucosa 5, MgCl_2 0,8, CaCl_2 1, pH ajustado a 7,4. El marcaje con anexina V se ha realizado 3 h después del principio de la exposición a la doxorubicina puesto que este fenómeno aparecía muy pronto en la cascada apoptótica. Las medidas de la actividad de caspasa-3 se realizan 8 h después de la exposición a la doxorubicina puesto que este fenómeno tiene lugar más tarde en el fenómeno de apoptosis. La contractilidad de los cardiomiocitos se ha medido a cualquier hora durante las 8 h de la exposición a la doxorubicina. Después de todos los tratamientos, las células se han comparado a los cardiomiocitos referencias no expuestas a la doxorubicina.

15 Los cardiomiocitos se han pretratado con el compuesto oxima de colest-4-en-3-ona durante 15 min antes de la exposición a la doxorubicina. Tres concentraciones de este compuesto han sido probadas durante este estudio: $0,3 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$ y $3 \mu\text{M}$.

■ Resultados

20 La longitud media de los sarcómeros de las células utilizadas en este estudio no era significativamente diferente entre los grupos.

Efecto de la doxorubicina sobre la contractilidad de los miocitos y sobre la apoptosis.

25 La exposición a la doxorubicina ha dado como resultado una disminución a lo largo del tiempo del acortamiento del sarcómero. El acortamiento del pico bajo doxorubicina era similar al control durante las tres primeras horas después disminuyó de manera significativa después de 4 h de exposición ($-53,20 \pm 7,70\%$ frente a $-19,49 \pm 2,06\%$ con relación a la línea de referencia de la doxorubicina y de la referencia respectivamente, $p < 0,05$, $n = 5$).

El tratamiento con $1 \mu\text{M}$ de doxorubicina ha producido apoptosis con un aumento significativo en el marcaje con la anexina V y en actividad de caspasa-3.

30 Efecto de la oxima de colest-4-en-3-ona en la disfunción a nivel de la contractilidad inducida por la doxorubicina y la apoptosis

35 El tratamiento con $1 \mu\text{M}$ de doxorubicina ha dado como resultado una reducción significativa del acortamiento del pico de los cardiomiocitos ventriculares que se suprime en presencia de la oxima de colest-4-en-3-ona ($0,3$, 1 y $3 \mu\text{M}$). En efecto, después de 4 h de exposición, el acortamiento del pico bajo doxorubicina ($-53,20 \pm 7,70\%$) llega a disminuir de manera significativa con el compuesto hasta $0,3 \mu\text{M}$ ($-25,35 \pm 0,18\%$), hasta $1 \mu\text{M}$ ($-15,66 \pm 5,72\%$), y hasta $3 \mu\text{M}$ ($-13,95 \pm 3,17\%$) con relación a la línea de referencia.

Además, los aumentos de marcaje en anexina V y actividad de caspase-3, debidos a la doxorubicina, han sido bloqueados por la oxima de colest-4-en-3-ona a $0,3$, 1 y $3 \mu\text{M}$.

40 La apoptosis evaluada en % de cambio del marcaje con anexina V 3 h después de la doxorubicina da los resultados siguientes: referencia: 100% ; doxorubicina: $291\% \pm 32$; doxorubicina + oxima de colest-4-en-3-ona $0,3 \mu\text{M}$: $130\% \pm 12,43$; doxorubicina + oxima de colest-4-en-3-ona $1 \mu\text{M}$: $121\% \pm 4,74$; doxorubicina + oxima de colest-4-en-3-ona $3 \mu\text{M}$: $115,5\% \pm 16,35$. Los resultados en relación con las medidas de actividad de caspasa-3 son los siguientes: referencia: $18 \pm 9 \text{ fmol/min}$; doxorubicina: $120 \pm 15 \text{ fmol/min}$; doxorubicina + oxima de colest-4-en-3-ona $0,3 \mu\text{M}$: $33 \pm 9 \text{ fmol/min}$; doxorubicina + oxima de colest-4-en-3-ona $1 \mu\text{M}$: $18 \pm 8 \text{ fmol/min}$; doxorubicina + oxima de colest-4-en-3-ona $3 \mu\text{M}$: $11 \pm 4 \text{ fmol/min}$.

■ Comentarios y conclusiones

50 El compuesto oxima de colest-4-en-3-ona muestra un efecto cardioprotector en la disfunción de la contractilidad producida por la doxorubicina y sobre la apoptosis en cardiomiocitos aislados de conejo. La molécula, cuando se utiliza a dosis apropiadas puede proteger efectivamente contra la cardiotoxicidad producida por la doxorubicina que es conocida como factor limitativo en el tratamiento de pacientes cancerosos con esta antraciclina. Así, el compuesto oxima de colest-4-en-3-ona podría utilizarse para limitar la cardiotoxicidad de la doxorubicina en estos pacientes.

Ejemplo 2: Efecto de la oxima de colest-4-en-3-ona en un modelo *in vivo* de hepatotoxicidad aguda

Los hepatocitos como numerosas otras células llevan el receptor Fas/CD95 en su membrana citoplasmática. La estimulación de esta vía Fas produce la muerte celular activando la cascada de las caspasas.

5 Un modelo agudo de daño hepático podría ser producido por una única inyección de anticuerpos anti-Fas Jo2 (Ogasawara *et al.*, *Nature*, 1993) que produce daños hepáticos graves y que se asemeja a la hepatitis vírica, autoinmunitaria o inducida por fármacos.

10 La alanina aminotransferasa (ALAT) denominada también la suero glutámico pirúvico transaminasa sérica (SGPT) es una enzima presente en los hepatocitos. Su actividad aumenta de manera importante en el plasma después de la lisis hepática y es por consiguiente un buen marcador para evaluar la lesión hepática.

La experiencia realizada ha consistido en la intoxicación por Jo2 de animales seguida de una dosis de ALAT y en demostrar la capacidad de oxima de colest-4-en-3-ona para proteger los hepatocitos.

Materiales y métodos**15 Animales**

Se han utilizado ratones adultos CD1 macho provenientes de "Elevage Janvier", (Le Genest-Saint-Isle, Francia). Se han identificado los animales individualmente y tenían acceso libre al agua y a los alimentos.

20 Las instalaciones se han mantenido en un ciclo controlado de luz (7:00-19:00) y a temperaturas de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad de $50 \pm 20\%$.

Preparación del anticuerpo Jo2

La solución madre del anticuerpo monoclonal de hámster anti-ratón CD95 (Fas) denominada Jo2, proveniente de Pharmingen (BD Biosciences, ref. 554254, lote 66081) está a la concentración de 1 mg/ml en agua. Las diluciones se realizan en cloruro de sodio al 0,9% en agua.

25 Preparación del compuesto a determinar

La cantidad deseada de oxima de colest-4-en-3-ona se pesa y se muele en un polvo fino, después se pone en suspensión a 60 mg/ml en aceite de maíz. El compuesto se administra por vía oral (por alimentación con sonda) a una concentración de 5 ml/kg.

Protocolo

30 Un pretratamiento mediante la oxima de colest-4-en-3-ona se realiza a la dosis de 300 mg/kg por administración oral 4 h antes de la administración del anticuerpo Jo2. El anticuerpo Jo2 se administra por inyección intraperitoneal a la dosis de 125 µg/kg en un volumen de 5 ml/kg de peso corporal.

35 Se realiza un control en los animales que reciben un pretratamiento por administración oral 4 h antes de la administración del anticuerpo de un volumen idéntico de aceite de maíz que ha sido utilizado para la preparación del compuesto a analizar, sin compuesto.

Dosificación de ALAT

Se toman muestras de sangre de los ratones anestesiados 24 h después de la administración de Jo2. La dosificación de ALAT se realiza utilizando un Kit (Roche Diagnostics) con un espectrofotómetro (Hitachi Modular), según el método estándar por la IFCC (Federación Internacional de Química Clínica).

40 Resultados y conclusiones

La administración intraperitoneal de Jo2 a 125 µg/kg ha provocado la muerte de 3 de los 19 ratones en el grupo controlado 24 horas después de la inyección.

La actividad ALAT se reduce de manera significativa por el compuesto analizado a 300 mg/kg.

Tabla 1: Actividad ALAT medida 24 h después de la administración de Jo2

Tratamiento	Actividad ALAT (U/l) media \pm Sem (n)
Referencia	2586 \pm 474 (16)
oxima de colest-4-en-3-ona (300 mg/kg)	1136 \pm 175 (20)**
**: p = 0,0037, prueba de la t efectuada con relación al grupo de referencia	

La oxima de colest-4-en-3-ona administrada a 300 mg/kg, 4 h antes del anticuerpo Jo2 ha permitido:

- 5 - impedir la muerte de los ratones que reciben el anticuerpo Jo2 24 h después de la inyección;
- limitar la muerte celular provocada por una dosis subletal de anticuerpo; la actividad ALAT, biomarcador de la citólisis hepática en el plasma, es significativamente más baja en los ratones tratados con la oxima de colest-4-en-3-ona que en los ratones de referencia sin tratar.

Conclusiones

- 10 El modelo de hepatotoxicidad aguda provocada en los ratones por un anticuerpo anti Fas (Jo2) ha permitido poner de manifiesto las propiedades hepatoprotectoras de la oxima de colest-4-en-3-ona.

Estos efectos notables permiten contemplar para los compuestos de fórmula I una utilización en la preparación de un medicamento citoprotector en general.

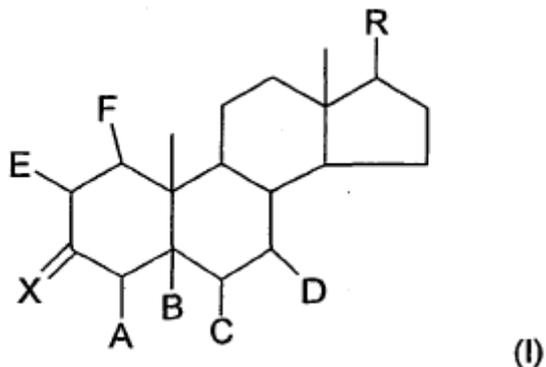
Estudio toxicológico

- 15 La administración en el ratón, en particular de la oxima de colest-4-en-3-ona, por las vías oral, subcutánea, intraperitoneal e intravenosa, a las dosis que van hasta 300 mg/kg/día por tratamiento con administración diaria que puede ir hasta 24 días, no ha mostrado toxicidad significativa.

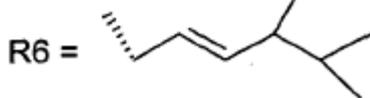
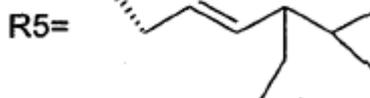
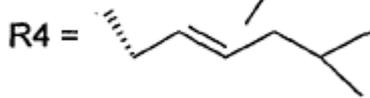
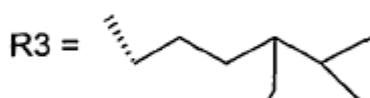
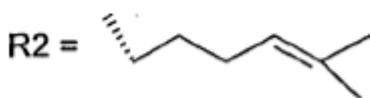
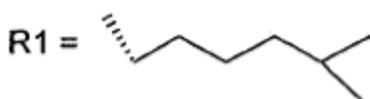
En el mono, la administración por vía oral de dosis crecientes diarias hasta 1500 mg/kg en un periodo de 10 días no ha puesto de manifiesto ninguna toxicidad.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de al menos un compuesto que responde a la fórmula I



en la que X representa un grupo =N-OH, y R representa un grupo seleccionado entre



5

A representa un átomo de hidrógeno o junto con B un enlace carbono-carbono,

B representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o junto con A un enlace carbono-carbono,

C representa un átomo de hidrógeno o junto con D un enlace carbono-carbono,

D representa un átomo de hidrógeno o junto con C un enlace carbono-carbono,

10

E representa un átomo de hidrógeno o junto con F un enlace carbono-carbono,

F representa un átomo de hidrógeno o junto con E un enlace carbono-carbono,

o una de las sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables, o uno de sus ésteres o una de las sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables de dichos ésteres,

para la obtención de un medicamento citoprotector, a excepción de un medicamento neuroprotector.

2. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque en la fórmula I, A representa junto con B un enlace carbono-carbono, C, D, representan un átomo de hidrógeno, E, F representan un átomo de hidrógeno o juntos un enlace carbono-carbono y R tiene el significado de R1.
- 5 3. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque en la fórmula I, A representa junto con B un enlace carbono-carbono, C, D, representan un átomo de hidrógeno, E, F representan un átomo de hidrógeno y R tiene el significado de R2, R3 o R4.
4. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque en la fórmula I, A representa junto con B un doble enlace, C representa junto con D un enlace carbono-carbono, E, F representan un átomo de hidrógeno y R tiene el significado de R1 o R6.
- 10 5. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque en la fórmula I, A representa junto con B un doble enlace, C representa junto con D un enlace carbono-carbono, E representa junto con F, un enlace carbono-carbono y R tiene el significado de R1.
6. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque en la fórmula I, E representa junto con F un doble enlace, C, D, A, B representan un átomo de hidrógeno y R tiene el significado de R1.
- 15 7. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque el compuesto de fórmula I se elige entre
- la oxima de colestan-3-ona,
 - la oxima de colest-4-en-3-ona,
 - la oxima de colest-1,4-dien-3-ona
- 20 o una de sus sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables, o uno de sus ésteres o una de las sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables de dichos ésteres.
8. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque el compuesto de fórmula I se elige entre la oxima de colest-4-en-3-ona o la oxima de colest-1,4-dien-3-ona o una de sus sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables, o uno de sus ésteres o una de las sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables de dichos ésteres.
- 25 9. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el medicamento se destina al tratamiento o a la prevención de la necrosis y/o de la apoptosis patológica y/o de la necroptosis (medicamentos antinecróticos y/o antiapoptóticos y/o antinecroptóticos) o incluso afecciones como
- 30 las enfermedades óseas, de las articulaciones, del tejido conjuntivo y del cartílago;
- las enfermedades musculares;
- las enfermedades de la piel;
- las enfermedades cardiovasculares;
- las enfermedades circulatorias;
- 35 las enfermedades hematológicas y vasculares;
- las enfermedades pulmonares;
- las enfermedades del aparato digestivo;
- las enfermedades del hígado;
- las enfermedades del páncreas;
- 40 las enfermedades metabólicas;
- las enfermedades renales;
- las intoxicaciones graves;
- las afecciones degenerativas asociadas al Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA);
- las trastornos asociados al envejecimiento;
- 45 los trastornos dentales;

las enfermedades o trastornos oftálmicos;

las enfermedades de las vías auditivas;

las enfermedades asociadas a las mitocondrias (patologías mitocondriales).

5 10. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el medicamento se destina a la protección de las células cardíacas (medicamento cardioprotector).

 11. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada porque el medicamento se destina a la protección de las células hepáticas (medicamento hepatoprotector).

 12. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada porque el medicamento se destina al tratamiento o a la prevención de enfermedades asociadas a las mitocondrias.

10 13. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada porque el medicamento se destina a la protección de células, de un tejido o d un órgano, antes, durante o después de un trasplante.