

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 535**

51 Int. Cl.:
A61K 31/409 (2006.01)
A61K 31/555 (2006.01)
C07D 487/22 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09705986 .9**
96 Fecha de presentación: **01.02.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2244701**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.11.2010**

54 Título: **Corroles para neuroprotección y neurosanación**

30 Prioridad:
31.01.2008 US 25043

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.09.2012

73 Titular/es:
**Technion Research and Development
Foundation, Ltd.
Senate House Technion City
32000 Haifa, IL**

72 Inventor/es:
**GROSS, Zeev;
OKUN, Zoya;
MAHAMMED, Atif;
MANDEL, Silvia;
YUODIM, Moussa B.H.;
AMIT, Tamar;
BAR-AM, Orit;
KUPERSHMIDT, Lana y
SALTSMAN, Irena**

74 Agente/Representante:
de Elizaburu Márquez, Alberto

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).

ES 2 387 535 T3

DESCRIPCIÓN

Corroles para neuroprotección y neurosanación

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la neuroprotección y neurosanación y, particularmente a complejos de metales de transición de corroles para ser usados como agentes neuroprotectores y neurosanadores para ser usados en el tratamiento de la diabetes y enfermedades y trastornos neurodegenerativos y a algunos nuevos complejos metálicos de corroles.

Antecedentes de la invención

10 La investigación sobre las causas de las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (PD), enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Huntington (HD) y esclerosis lateral amiotrófica (ALS, una enfermedad de las neuronas motoras), así como de la diabetes, ha estado alentada en parte por la frustración sobre los inconvenientes de los fármacos disponibles para el tratamiento. El verdadero objetivo de una terapia debe ser finalmente identificar el proceso de la enfermedad antes de que sean reconocidos los síntomas y desarrollar nuevos fármacos para evitar el progreso de la muerte celular. Claramente son necesarias nuevas estrategias terapéuticas para las enfermedades neurodegenerativas que se deben enfocar en la neuroprotección o neuro-restauración, así como a ralentizar el procedimiento de muerte o provocar la neuro-restauración a través de la neurogénesis, respectivamente. Los estudios neuropatológicos convergen en un concepto común, considerando las enfermedades neurodegenerativas como multifactoriales, en las que están implicados diversos mecanismos en una cascada de acontecimientos que incluye muchas trayectorias bioquímicas y señalizadoras.

20 La investigación continuada ha indicado claramente que las terapias dirigidas a bloquear procesos oxidativos que incluyen especies reactivas de oxígeno (ROS), producción de óxido nítrico (NO), polifenoles antioxidantes suministrados en la dieta, agentes antiapoptóticos como inhibidores de canales de calcio y caspasas, inhibidores de fármacos bioenergéticos de transmisión de glutamato y queladores de hierro serían una aproximación considerable en una monoterapia o como parte de una formulación de un conjunto antioxidante para el tratamiento de estas enfermedades (Youdim et al., 2005; Mandel et al., 2007a). Lo razonable es que la manipulación simultánea de múltiples dianas deseadas en el sistema nervioso central (CNS) ejerza una mayor eficacia terapéutica (Mandel et al., 2007b). La acumulación y el depósito de hierro en el cerebro pueden provocar una enorme gama de trastornos del CNS que incluyen PD, AD, enfermedad de estructuras de Lewy, HD, ALS, esclerosis múltiple (MS), aceruloplasminemia, ataxia de Friedreich y neurodegeneración con acumulación de hierro en el cerebro. Además de ello, se conoce que el hierro se acumula en el cerebro como una función de la edad, de una manera específica para las células, particularmente en zonas del cerebro que son susceptibles a un deterioro neuronal. Está bien establecido que el hierro precipita en la química de Fenton, reaccionando con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) para producir las más reactivas de todas las ROS, el radical hidroxilo. La formación de este último, combinada con el agotamiento de antioxidantes endógenos, particularmente glutatión reducido en tejidos (GSH), la trayectoria más común del depósito de hierro en el cerebro conduce a una tensión oxidativa (OS). El hierro facilita también la descomposición de peróxidos de lípidos para producir radicales libres relacionados con oxígeno altamente citotóxicos. La OS relacionada con radicales libres provoca el deterioro de DNA, lípidos, proteínas y finalmente la muerte celular asociada a las enfermedades neurodegenerativas.

40 Está ampliamente aceptado que las ROS participan en el desarrollo y el progreso de la diabetes Mellitus (DM) y sus complicaciones. Las células beta tienen una capacidad reducida de escindir radicales libres y son muy sensible a la acción de las ROS y las especies de nitrógeno reactivas (RNS) debido a su sistema escasamente antioxidante (bajos niveles de GSH y de la enzima catalasa que descompone H₂O₂). Estos hechos se cree que son responsables de la elevada sensibilidad de las células productoras de insulina a diversos ataques que conducen a su destrucción y dan lugar a la diabetes.

45 Misteriosamente, algunas líneas de evidencia indican que las causas del desarrollo de PD, AD y DM comparten etiologías comunes, en lo que respecta particularmente a su origen neuroendocrino común y la función de la tensión oxidativa/nitrosativa en el procedimiento de la muerte celular. Por tanto, se puede especular que las enfermedades neurodegenerativas y la DM pueden ser prevenidas por tanto, se puede especular que las enfermedades

neurodegenerativas y la DM pueden ser prevenidas y/o los efectos dañinos de las ROS reducidos, mediante la administración de depuradores de radicales libres y compuestos antioxidantes, como parte de una aproximación de polifarmacología o en forma de un fármaco citoprotector de actuación multimodal destinado a tratar las diversas etiologías de estas enfermedades.

5 Además de las ROS, está indicada la función destacada de las RNS en las fases tempranas de numerosas enfermedades, incluso aunque el resultado final en términos de mal funcionamiento específico o enfermedad difiera sustancialmente en cada caso (Shah et al., 2007). Consecuentemente, los antioxidantes endógenos y exógenos (derivados de la dieta) se espera que desempeñen una función principal en la prevención del deterioro oxidativo/nitrosativo a biomoléculas vitales, pero muchos compuestos que muestran potentes propiedades
10 antioxidantes *in vitro* no consiguen mostrar efectos beneficiosos *in vivo*. Una clave para una posible resolución de este conflicto aparente surge de la evidencia creciente que indica una función crucial para los residuos de proteínas nitradas (principalmente nitrotirosina) en todas estas enfermedades (Mohiuddin et al., 2006). Esto sugiere que las RNS excesiva no son neutralizadas por los antioxidantes naturales tan eficazmente como las ROS.

Una especie particularmente perjudicial es el peroxinitrito (HOONO) (PN), formada a través de una interacción ultrarápida entre el anión superóxido (O_2^-) y NO, cuya escisión homolítica conduce al radical hidroxilo (OC_3^- en un entorno con elevado contenido de CO_2) y NO_2 , las ROS y RNS más reactivas (Goldstein et al., 2005). Estas especies (y los radicales secundarios derivados de ellas) se considera que están involucradas en el deterioro de una amplia diversidad de moléculas (Szabo et al., 2007). En contraste con otros precursores de ROS y RNS, el peroxinitrito (PN) es particularmente tóxico, ya que no hay un sistema de defensa biológica intrínseco contra el mismo, y todos los antioxidantes catalíticos naturales (incluidos SOD y enzima catalasas) no reaccionan con PN más rápido que las biomoléculas vitales (Szabo et al., 2007). Esto llama al desarrollo de reactivos sintéticos que pudieran actuar sobre el PN y neutralizarlo mediante una o más de las siguientes vías: a) interferir con su formación eliminando sus precursores (O_2^- y NO); b) descomponerlo rápidamente en productos biológicamente benignos; c) reparar el deterioro provocado por el mismo. Los avances principales en este campo están en los catalizadores de descomposición basados en metaloporfirina de peroxinitrito, que parece que son eficaces para tratar ciertas enfermedades que están relacionadas con la tensión oxidativa/nitrosativa (Wu et al., 2003; Liang et al., 2007).
25

Sin embargo, se debe adoptar una nota de precaución cuando se trasladen los descubrimientos *in vitro* a cualquier sistema particular *in vivo* (Schlieve et al., 2006). Por ejemplo, el fármaco anti-cancerígeno destacado cisplatino se hace terapéuticamente inactivo muy rápidamente debido a su fuerte unión a la albumina del suero. Este tipo de limitación es incluso más grave para tratar enfermedades neurodegenerativas porque el fármaco potencial debe ser capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BBB).
30

Los corroles son macrociclos de tetrapirrol estrechamente relacionados con las porfirinas, con un átomo de carbono menos en la periferia externa y un protón de NH más en su núcleo interno. Los corroles son mucho menos conocidos que las porfirinas y su síntesis se consideró que era muy compleja, hasta que ha sido descrito un procedimiento sencillo para la síntesis de corroles en el documento US 6.541.628.
35

El documento 6.730.666 describe porfirinas y corroles útiles para la inhibición de la proliferación celular mediada por la actividad de tirosina quinasa receptora del factor de crecimiento, por ejemplo, para la inhibición de la angiogénesis o la proliferación de células de músculos lisos vasculares en trastornos que incluyen aterosclerosis, fallo cardíaco hipertrófico y restenosis port-quirúrgica y de la proliferación y migración celular en el tratamiento de tumores primarios y metástasis. Los corroles definidos en esta patente están exentos de metales y carga positiva y el único corrol definido en la misma, triyoduro de 5,10,15-tris[2,3,5,6-tetrafluorofenil-4-(N-metil-2-piridilio)]-21H,23H-corrol, se mostró que inhibía la aparición de metástasis pulmonares en un modelo de animal.
40

Los corroles pueden quelar una diversidad de iones metálicos y, una vez unidos, los metacorroles son mucho menos propensos a una disociación de metal potencialmente tóxico que las metaloporfirinas análogas. Los co-inventores en la presente invención han demostrado en dos publicaciones recientes que los complejos de hierro (III) y manganeso (III) de 5,10,15-tris(pentafluorofenil)-2,17-bis(ácido sulfónico)corrol (descritos en el documento US 6.939.963) son excelentes catalizadores para la descomposición de dos importantes moléculas reactivas, peróxido de hidrógeno y peroxinitrito (Mahammed et al., 2005; Mahammed and Gross, 2006, Aviv et al., 2007). Se proporcionó una evidencia firme a favor de un mecanismo de desproporcionación de H_2O_2 y peroxinitrito (HOONO): el primero sirve como oxidantes para transferir el corro de manganeso (III) en forma del complejo de (oxo) manganeso (5), que seguidamente utiliza las mismas moléculas como reductores para retornar a manganeso (III). Se obtuvo una visión
50

5 mecanística menos detallada para el complejo de hierro, pero las velocidades catalíticas se encontró que eran mayores que las del complejo de Mn y aparentemente indujo una isomerización en lugar de una desproporción del peroxinitrito. La acción muy rápida del complejo de hierro y el mecanismo único adoptado por el corrol de manganeso (ninguno otro de los complejos de manganeso es capaz de descomponer ROS y RNS catalíticamente en ausencia de co-reductores, Gershman et al., 2007) sugieren un valor añadido significativo de estos complejos en los esfuerzos continuados dedicados al desarrollo de catalizadores sintéticos que puedan neutralizar o evitar la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

Sumario de la invención

10 En un aspecto, la presente invención se refiere a un complejo de metal de transición de un corrol anfífilo, un isómero óptico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para ser usado en neuroprotección y neurosanación, particularmente para el tratamiento de diabetes o de una enfermedad, trastorno o estado neurodegenerativo.

15 El corrol anfífilo es preferentemente un 5,10,15-tris-aril- o 5,10,15-tris-CF₃-corrol y dicho complejo de metal de transición del corrol anfífilo tiene más preferentemente la fórmula I definida con posterioridad en la memoria descriptiva.

La presente invención proporciona adicionalmente un corrol que contiene propargilo que porta uno o más radicales sustituidos con un grupo propargilamino o uno o más radicales heteroarilos que contienen nitrógeno sustituidos con propargilo en el átomo de N del anillo y composiciones farmacéuticas que los comprende.

20 El corrol que contiene propargilo es preferentemente un complejo de metal de transición de un corrol anfífilo de fórmula I como se define con posterioridad en la memoria descriptiva.

Breve descripción de las Figuras

25 Los complejos metálicos de corroles se presentan en las leyendas de las Figuras posteriores mediante una abreviatura corta en letra negrita, como se usan en la presente memoria descriptiva. Los nombres completos de los compuestos se muestran al comienzo de la sección de ejemplos y sus fórmulas estructurales se exponen en los esquemas 1 y 2 al final de la descripción, justo antes de las referencias.

La Fig. 1 muestra la descomposición de peroxinitrito de 385 μM a pH 7,4 y 25°C, verificada a λ =302 Nm como una función de la concentración de corrol de manganeso (III) **4C-Mn**. Inserción: representación gráfica usada para la determinación de la constante de velocidad catalítica.

30 Las Figs. 2A-2B muestran la formación de imágenes basadas en la fluorescencia *in vivo* de un ratón vivo antes (Fig. 2A) y 30 minutos después (Fig. 2B) de una inyección intraperitoneal de 19 mg/kg del complejo de corrol de galio **1C-Ga**. Los resultados son indicativos del traspaso de la barrera hematoencefálica (BBB) por **1C-Ga**, el análogo fluorescente de **1C-Fe** y **1C-Mn**.

35 Las Figs. 3A-3C muestran el efecto protector del corrol **1C-Fe**, sobre líneas celulares beta clonales frente a la toxicidad de peróxido de hidrógeno. (3A) efecto protector de corrol **1C-Fe** sobre células INS-1E tratadas con concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). (3B) efecto protector dependiente de la dosis de corrol **1C-Fe** sobre células RIN-m tratadas con H₂O₂ (35 μM). (3C) el corrol **1C-Fe** no muestra toxicidad cuando es aplicado solo (sin H₂O₂) a concentraciones hasta 50 μM. Los resultados representan la media ± SEM de tres experimentos independientes realizados bajo las mismas condiciones. *p < 0,05 frente a células tratadas con vehículo.

40 La Fig.4 expone el efecto protector de corroles de hierro (III) **1C-Fe** y **5C-Fe** (en concentraciones de 1 y 20 μM) con relación a su porfirina estructuralmente relacionada 1p-Fe, frente a la toxicidad inducida por A₂O₂ (35 μM) en células RIN-m. La lesión celular fue evaluada mediante el ensayo MTT. Los resultados representan la media ± SEM de un experimento representativo que se repitió dos veces con resultados similares, realizado bajo las mismas condiciones. *p < 0,001 frente a células tratadas con vehículo # p < 0,01 frente a la correspondiente porfirina.

Las Figs. 5A-5B muestran el efecto citoprotector de corroles y porfirinas sobre la línea celular RIN-m expuesta a

H₂O₂. (5A) efecto protector de corrol de hierro (III) **1C-Fe** y la porfirina estructuralmente relacionada 1P-Fe. (5B) insuficiencia de los complejos de manganeso (III) **1C-Mn**, **2C-Mn** y la porfirina estructuralmente relacionada **2P-Mn** para proteger frente al deterioro inducido por H₂O₂. Todas las concentraciones están en µM. *p < 0,004, # p < 0,008.

5 Las Figs. 6A-6B muestran el efecto protector de corroles de hierro (III) **1C-Fe** y **5C-Fe** frente a la toxicidad inducida por linsidomina donante de óxido nítrico (SIN-1), en células INS-1E y células RIN-m, respectivamente. Los resultados representan la media ± SEM de tres experimentos independientes realizados bajo las mismas condiciones. * p < 0,05 frente a células tratadas con vehículo.

10 Las Figs. 7A-7C muestran efectos comparativos entre (7A) en corrol de manganeso (III) con carga positiva **2C-Mn** y su análogo con carga negativa **1C-Mn**; (7B) el corrol con carga positiva de manganeso (III) **2C-Mn** y la porfirina estructuralmente relacionada **2P-Mn**; (7C) el corrol de hierro (III) con carga positiva **1C-Fe** y la porfirina estructuralmente relacionada 1P-Fe en células RIN-m expuestas a SIN-1. Los resultados son la media ± error estándar; los experimentos se realizaron dos veces con resultados similares realizados bajo las mismas condiciones. *p < 0,005, # p < 0,001.

15 Las Figs. 8A-8B muestran efector neuroprotectores y neurosanadores de corroles de hierro (III) **1C-Fe** y **5C-Fe** frente a la muerte celular inducida por peróxido de hidrógeno en la línea de células SH-SY5Y de neuroblastoma humano. (8A) efecto neuroprotector dependiente de la dosis de los corroles **1C-Fe** y **5C-Fe** sobre células CH-CY5Y. (8B) neurosanación de células CH-CY5Y con corroles **1C-Fe** y **5C-Fe** añadidos 0,5, 1,5 y tres horas después del ataque con H₂O₂. * p < 0,01 frente a células sin tratar.

20 Las Figs. 9A-9D muestran efectos comparativos de corrol de hierro **1C-Fe** frente a porfirina estructuralmente relacionada 1P-Fe en células SH-SY5Y expuestas a H₂O₂. Los compuestos **1C-Fe** y 1P-Fe (1-50 µM) fueron añadidos 30 minutos antes del ataque con H₂O₂ (200 µM) durante un período posterior de 24 h. (9A) La viabilidad celular fue evaluada mediante el ensayo MTT, y (9B) la muerte celular fue valorada usando el estuche de ensayo ELISA de detección de la muerte celular apoptótica. (9C) el fármaco (**1C-Fe**) no muestra toxicidad cuando es proporcionado (sin H₂O₂) a concentraciones hasta 50 µM. Los gráficos presentan resultados expresados como porcentaje de testigo sin tratar. Los datos se expresan como media ± SEM (n=6) de un experimento representativo que se repitió dos veces con resultados similares. \$ p < 0,001 frente a testigo; + p < 0,001 frente a células tratadas con vehículo, # p < 0,001 frente a la correspondiente porfirina. (9D) Efectos de la neurosanación del corrol **1C-Fe** frente a la muerte celular inducida por H₂O₂ en línea celular CH-CY5Y de neuroblastoma humano. Las células CH-Cy5Y se dispusieron en placas de microtitulación (96 pocillos) en DMEM-Eagle/F-12(HAM) (1:1), que contenía FCS al 10%. Las células CH-CY5Y fueron expuestas en primer lugar a H₂O₂ 20 mM, seguido de la adición de corrol **1C-Fe** después de 0,5-1,5 h y se incubaron durante 24 h adicionales. * p < 0,005 frente a células sin tratar.

La Fig.10 muestra el efecto comparativo del corrol de hierro (III) **1C-Fe** y complejos 1P-Fe de porfirina en células CH-CY5Y expuestas a diferentes concentraciones de H₂O₂.

35 Las Figs. 11A-11B muestran efectos neuroprotectores y neurosanadores de corroles **1C-Fe** y **5C-Fe** frente a la muerte celular inducida por SIN-1 en la línea de células SH-SY5Y. (11A) un efecto neuroprotector dependiente de la dosis de corroles **1C-Fe** y **5C-Fe** sobre células CH-CY5Y. (11B) neurosanación de células SH-SY5Y con corroles **1C-Fe** y **5C-Fe** añadidos en el tiempo indicado después del ataque con SIN-1. *p < 0,001 frente a células sin tratar.

40 Las Figs. 12A-12C muestran efectos comparativos de corroles **1C-Fe**, **2C-Mn** y **3C-Mn** y porfirinas 1P-Fe y **2P-Mn** frente a toxicidad inducida por SIN-1 en células SH-SY5Y. Las células SH-SY5Y fueron previamente tratadas con o sin uno de los complejos 30 minutos antes de la exposición a SIN-1 y se incubaron durante un período posterior de 24 h. (12A) La viabilidad celular fue evaluado mediante el ensayo MTT y (12B) la muerte celular fue valorada usando el estuche de ensayo ELISA de detección de la muerte celular apoptótica. Los gráficos presentan los resultados expresados como un porcentaje de testigo sin tratar. Los datos se expresan como media ± SEM (n=6) de un experimento representativo que se repitió dos veces con resultados similares. \$ p < 0,001 frente a testigo; * p < 0,001 frente a células tratadas con vehículo # p < 0,001 frente a la correspondiente porfirina. (12C) citoprotección por corrol de hierro (III) **1C-Fe** y corrol de manganeso (III) **3C-Mn** en células SH-SY5Y expuestas a diferentes concentraciones de SIN-1. * p < 0,005, # p < 0,005.

Las Figs. 13A-13B muestran los efectos de los corroles **1C-Fe**, **2C-Mn** y **3C-Mn** sobre el nivel de nitrotirosina en el modelo de neurotoxicidad inducido por SIN-1. Las células SH-SY5Y fueron previamente tratadas con o sin los

corroles (20 μ M) durante 30 minutos antes de la exposición a SIN-1 (700 μ M) y fueron analizadas después de un período posterior de 24 h. La nitrotirosina fue detectada mediante microscopía de fluorescencia usando un anticuerpo primario específico. (13A) las imágenes muestran campos representativos obtenido mediante la combinación de tinción nuclear DAPI (reflejada en color azul) y anticuerpo de nitrotirosina (reflejada en color rojo). (13B) gráfico que representa valores absolutos de seis a ocho campos separados expresados como media \pm SEM. # p < 0,001 frente a testigo. * p < 0,001 frente a células tratadas con vehículo.

Las Figs. 14A-14B muestra efectos neuroprotectores y neurosanadores de corroles de hierro (III) **1C-Fe** y **5C-Fe** frente a muerte celular inducida por 6-hidroxidopamina (OHDA) en la línea de células SH-SY5Y. (14A) efecto neuroprotector dependiente de la dosis de corroles **1C-Fe** y **5C-Fe** sobre células SH-SY5Y. (14B) neurosanación de células SH-SY5Y con corroles **1C-Fe** y **5C-Fe** añadidos 0,5, 1,5, 3 y 6h después del ataque con 6-OHDA. *p < 0,01 frente a células sin tratar.

Las Figs. 15A-15C muestran los efectos comparativos de los corroles **1C-Fe**, **2C-Mn** y **3C-Mn** y las porfirinas 1P-Fe, **2P-Mn** frente a la toxicidad inducida por 6-OHDA. Las células SH-SY5Y fueron previamente tratadas con o sin los complejos (20 μ M) 30 minutos antes de la exposición a 6-OHDA (40 μ M) durante un período posterior de 24 h. (15A) la viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT y (15B) la muerte celular se valoró usando el estuche del ensayo ELISA de detección de la muerte celular apoptótica. (15C) para la neurosanación, las células SH-SY5Y fueron expuestas en primer lugar a 6-OHDA 40 μ M durante 0,5-3 h seguido de la adición de los corroles **1C-Fe**, **2C-Mn** y **3C-Mn** (20 μ M) y se incubaron durante 24 h adicionales. Los gráficos presentan los resultados expresados como porcentaje de testigo sin tratar. Los datos se expresan como media \pm SEM (n=6) de un experimento representativo que se repitió dos veces con resultados similares. \$ p < 0,001 frente testigo; * p < 0,001 frente a células tratadas con vehículo; # p < 0,001 frente a la correspondiente porfirina.

Las figs16A-N muestran los efectos de los corroles **1C-Fe** (E,F), **2C-Mn** (I,J) y **3C-Mn** (K,I) y las porfirinas 1P-Fe (G,H) y **2P-Mn** (M,N), frente a la toxicidad inducida por 6-OHDA. Las células SH-SY5Y fueron previamente tratadas con o sin los corroles (20 μ M) 30 minutos antes de la exposición a 6-OHDA (40 μ M) durante un período posterior de 24 h. La proteína asociada al crecimiento (GAP-43) fue detectada mediante microscopía de fluorescencia usando un anticuerpo primario específico (Fig. 16A, C, E, G, I, K y M para el testigo, 6-OHDA 40 μ M, **1C-Fe**, 1P-Fe, **2C-Mn**, **3C-Mn** y **2P-Mn**, respectivamente). Los núcleos apoptóticos fueron determinados mediante análisis de marcación de extremos mellados de UTP-digoxigenina mediada por desoxinucleotidil-transferasa y se aplicó una tinción DAPI para la marcación nuclear (Fig. 16B, D, F, H, J, L y N para el testigo 6-OHDA 40 μ M, **1C-Fe**, 1P-Fe, **2C-Mn**, **3C-Mn** y **2P-Mn**, respectivamente). Las imágenes son campos representativos de dos experimentos diferentes.

Las Figs. 17A-17F muestran los efectos de los corroles **1C-Fe**, **2C-Mn** y **3C-Mn** sobre el nivel de caspasa-3 escindida en el modelo de neurotoxicidad inducida por 6-OHDA. Las células SH-SY5Y fueron previamente tratadas con o sin los corroles (20 μ M) 30 minutos antes de la exposición 6-OHDA (40 μ M) durante un periodo posterior de 24 h. Se detectó 6-OHDA mediante microscopía de fluorescencia usando un anticuerpo primario específico (17A-E) las imágenes son campos representativos para el testigo, 6-OHDA (40 μ M), **1C-Fe**, **2C-Mn** y **3C-Mn**, respectivamente (17F) el gráfico representa valores absolutos de seis a ocho campos separados expresados como media \pm SEM. # p < 0,001 frente a testigo, * p < 0,005 frente a células tratadas con vehículo.

Las figs18A-18B comparan los efectos protectores del corrol **1C-Fe** y porfirina 1P-Fe frente a la toxicidad inducida por peróxido de hidrógeno en la línea celular NSC-34. Los compuestos **1C-Fe** y 1P-Fe (26 μ M) fueron añadidos 30 minutos antes del ataque con peróxido de hidrógeno (300 μ M) durante un período posterior de 24 h. (18A) La viabilidad celular fue evaluada mediante el ensayo MTT y (18B) la muerte celular fue valorada usando el estuche de ensayo ELISA de detección de la muerte celular apoptótica. Los gráficos representan los resultados expresados como porcentaje de testigo sin tratar. Los datos se expresan como media \pm SEM (n=6) de un experimento representativo que se repitió dos veces con resultados similares. \$ p < 0,001 frente a testigo; * p < 0,001 frente a células tratadas con vehículo; # p < 0,001 frente a la correspondiente porfirina.

Las Figs. 19A-19B muestran efectos comparativos de corroles **1C-Fe** y **2C-Mn** y porfirinas 1P-Fe y 2P-Mn frente a la toxicidad inducida por SIN-1 en células NSC-34. Las células NCS-34 fueron previamente con o sin los corroles **1C-Fe** y **2C-Mn** y las porfirinas 1P-Fe y 2P-Mn, respectivamente, 30 minutos antes de la exposición a SIN-1 durante un período posterior de 24 h. (19A) la viabilidad fue evaluada mediante el ensayo MTT; y (19B) la muerte celular fue valorada usando el estuche de ensayo ELISA de detección de la muerte celular apoptótica. Los gráficos presentan resultados expresados como porcentaje de testigo sin tratar. Los datos están expresados como media \pm SEM (n=6)

de un experimento representativo que se repitió dos veces con resultados similares. \$ p < 0,001 frente a testigo; * p < 0,001 frente a células tratadas con vehículo; # p < 0,001 frente a la correspondiente porfirina.

5 Las Figs. 20A-20B muestran el efecto neuroprotector de los corroles **1C-Fe** y **5C-Fe** en un modelo de cultivo familiar de ALS familiar. (20A) efectos neuroprotectores dependientes de la dosis de los corroles **1C-Fe** y **5C-Fe** sobre células NSC-34 G93A motoneuronales de ratón que expresan G93A-SOD1 mutante (20B) efecto neuroprotector de los corroles **1C-Fe** y **5C-Fe** sobre células SH-SY5Y G93A que expresan G93A-SOD1 mutante. \$ p < 0,001 frente a células que no expresan la mutación (testigos).

10 Las Figs. 21A-D muestran la absorción celular del complejo de corrol aniónico fluorescente **1C-Ga** (20 μM) por la línea celular RIN-m (21A) tinción de núcleos mediante DAPI (21B) detección de corrol por fluorescencia, (21C) imágenes superpuestas de las Figs. 21A y 21B, (21D) igual que 21B, pero en negro y blanco.

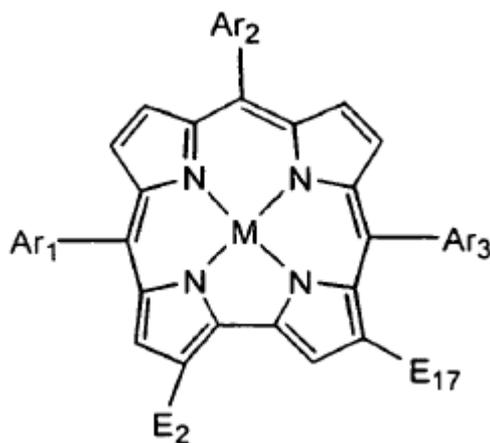
La Fig. 22 muestra la absorción celular del complejo de corrol aniónico fluorescente **1C-Ga** (20 μM) mediante la línea de células SH-SY5Y. (21A) tinción de núcleos mediante DAPI (21B) detección de corrol por fluorescencia, (21C) imágenes superpuestas de las Figs. 21A y 21B, (21D) igual que 21B, pero en negro y blanco.

Descripción detallada de la invención

15 La presente invención se refiere a complejos como se reivindica y composiciones de las mismas para ser usados en neuroprotección y neurosanación.

El corrol metalado para ser usado en la invención es preferentemente un corrol de hierro o manganeso y 5,10,15-tris-arilo o 5,10,15-tris-CF₃.

En una realización preferida, el corrol tiene la fórmula I:



20 en la cual:

Ar₁, Ar₂ y Ar₃, iguales o diferentes, se seleccionan cada uno entre CF₃ o un radical carboarilo, heteroarilo o carboarilo-heteroarilo mixto;

M es un metal seleccionado entre Mn, Fe, Ru, Co, V, Cr o Cu; y

25 E₂ y E₁₇, iguales o diferentes, son cada uno H, SO₃H, SO₂N-R₁R₂, CO₂H, CO₂R o CON-R₁R₂; R es alquilo C₁-C₈ o arilo C₆-C₁₂; y R₁ y R₂, iguales o diferentes son cada uno H, alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido con -COOH, alquilo C₂-C₈, arilo C₆-C₁₂ o junto con el átomo de N al que están unidos forman un anillo de 5-6 miembros saturado que contienen opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado entre O, S y N.

5 Como se define en la presente memoria descriptiva, el término "carboarilo" por sí mismo o como radical del radical mixto carboarilo-heteroarilo se refiere a un radical aromático monocíclico o bicíclico que tiene de 6 a 12 átomos de carbono como fenilo, bifenilo o naftilo opcionalmente mono- o poli-sustituido con uno o más átomos de halógenos o con radicales que incluyen, pero sin limitación, alquilo C₁-C₈, alcoxi C₁-C₈, nitro, hidroxilo, SO₃H, -NR₁R₂, -N⁺R₁R₂R₃, o -N-R₁-NH₂, en que R₁, R₂ y R₃, iguales o diferentes son cada uno H, alquilo C₁-C₈, alquinilo C₂-C₈, arilo, C₆-C₁₂, aril C₆-C₁₂-alquilo C₁-C₈ o R₁ y R₂ junto con el átomo de N al que están unidos forman un anillo de 5-6 miembros saturado que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado entre O, S y N. El término "arilo" en la presente memoria descriptiva se refiere a las mismas definiciones que el carboarilo.

10 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "alquilo" solo o como parte de un radical "aralquilo" se refiere a un radical alquilo C₁-C₈ líneas o ramificado, pero sin limitación, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, terc-butilo, n-heptilo, 2,2-dimetilpropilo, pentilo, n-hexilo, n-heptilo y octilo y preferentemente tiene 1-4 átomos de carbono, más preferentemente metilo, etilo y propilo. El término alquinilo" se refiere a un radical alquinilo de C₂-C₈ lineal o ramificado como, pero sin limitación etinilo, propargilo, butinilo y similares, en el que el enlace triple está en la posiciónω y es preferentemente propargilo. El término "halógeno como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo y preferentemente es cloro o flúor, más preferentemente flúor.

20 En una realización, el radical carboarilo es preferentemente un radical fenilo que puede estar monosustituido, por ejemplo con un grupo propargilamino o metoxi, preferentemente en la posición 4 o está polisustituido, en que los sustituyentes son preferentemente átomos de halógenos, más preferentemente cloro o flúor, sulfo, propargilamino, alcoxi, aminoalquilamino y trialquilamino. En una realización, el fenilo está disustituido con cloro o flúor. En más realizaciones, el fenilo está pentasustituido, en que los sustituyentes son preferentemente 5 átomos de flúor o 4 átomos de flúor y un sustituyente seleccionado entre alcoxi, propargilamino, aminoalquilamino y trialquilamino.

25 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "heteroarilo", por sí mismo o como parte del radical mixto carboarilo-heteroarilo, se refiere a un anillo aromático de 5-6 miembros que contiene 1-3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N como, pero sin limitación pirrolilo, flurilo, tienilo, imidazoilo, pirazolilo, oxazolilo, tiazolilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, 1,3,4-triazinilo o 1,2,3-triazinilo, preferentemente piridilo, que puede estar sustituido como se definió anteriormente para el radical carboarilo. Cuando el heteroarilo tiene un átomo de N en el anillo, puede estar sustituido en el átomo de N del anillo, preferentemente con un grupo alquilo o alquinilo como se describió anteriormente. En realizaciones preferidas, el radical heteroarilo es un N-alquilo (C₁-C₈)-piridilio, preferentemente 2-, 3- o 4-(N-metil)piridilio o N-propargil-piridilio.

30 La expresión "carboarilo-heteroarilo ixto" se refiere a un radical derivado de un radical carboarilo y un heteroarilo condensado uno a otro como benzofurilo, isobenzofurilo, indolilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, quinilino, isoquinolino y similares o covalentemente unido uno a otro como piridilio, fenilo. El radical carboarilo-heteroarilo mixto puede estar sustituido como se definió anteriormente. Debe entenderse que los sustituyentes pueden estar en cualquiera de los anillos carbocíclicos y/o heterocíclicos.

35 Ejemplos de un radical mixto carboarilo-heteroarilo que puede ser usado según la invención incluyen N-alquilo (C₁-C₈)-piridilio-tetrafluorofenilo, por ejemplo, 4-(N-metil-2-piridilio)-2,3,5,6-tetrafluoro-fenilo y los correspondientes compuestos de 3- y 4-(N-metil)piridilio.

40 El anillo de 5-6 miembros saturado que contiene un heteroátomo adicional seleccionado entre O, SIN puede ser preferentemente tetrahidropirrolilo, piperidinilo, morfonilo, tiomorfolino y piperazino que puede estar sustituido adicionalmente en el segundo átomo de N con alquilo C₁-C₄, hidroxialquilo o bencilo.

45 En algunas realizaciones preferidas, el carboarilo es 2,6-diclorofenilo, 2,6-difluorofenilo, 4-sulfofenilo, 4-metoxifenilo, pentafluorofenilo, 4-metoxi-2,3,5,6-tetrafluorofenilo, 4-N-propargilamino.2,3,5,6-tetrafluorofenilo o 4-N-propargilamino-fenilo; el heteroarilo es 4-(N-metil)piridilio, 2-(N-metil)piridilio, 4-(N-propargil-piridilio o 2-(N-propargil-piridilio y el carboarilo-heteroarilo es 4-(piridil)-2,3,5,6-tetrafluorofenilo, 4-(N-metil-piridilio)-2,3,5,6-tetrafluorofenilo, 4-(N-propargil-piridilio)-2,3,5,6-tetrafluorofenilo o 2-(N-propargil-piridilio)-2,3,5,6-tetrafluorofenilo.

En algunas realizaciones más preferidas Ar₁, Ar₂ y Ar₃ son iguales y es cada uno CF₃, 4-sulfofenilo, pentafluorofenilo, 4-metoxi-2,3,5,6-tetrafluorofenilo, 4-(N-metil)-piridilio, 2-(N-metil)-piridilio, 4-(N-propargil)-piridilio o 2-(N-propargil)-piridilio.

En algunas otras realizaciones más preferidas Ar_1 y Ar_3 son 4-(N-metil)-piridilio y Ar_2 es pentafluorofenilo; o Ar_1 y Ar_3 son 4-N-propargilamino-2,3,5,6-tetrafluorofenilo y Ar_2 es 4-metoxifenilo; o Ar_1 y Ar_3 son 4-(N-propargil)-piridilio y Ar_2 es pentafluorofenilo; o Ar_1 y Ar_3 son 2-(N-propargil)-piridilio y Ar_2 es pentafluorofenilo; o Ar_1 o Ar_3 son 2-(N-metil)-piridilio y Ar_2 es 4-N-propargilaminofenilo.

- 5 En algunas realizaciones preferidas E_2 y E_{17} son iguales y son H, SO_3H , SO_2NH -propargilo o SO_2NH-CH_2-COOH .

La presente invención proporciona adicionalmente nuevos corroles que portan uno o más radicales sustituidos con un grupo propargilamino o uno o más radicales heteroarilos que contienen nitrógeno sustituidos con propargilo en el átomo de N del anillo.

- 10 En particular, la invención se refiere a corroles quelados con metales de fórmula I anterior que portan un grupo propargilo en los que: (i) al menos uno de Ar_1 , Ar_2 y Ar_3 es un radical carbonilo sustituido con un grupo $-NR_1R_2$, en que R_1 es H y R_2 es propargilo o un radical N-heteroarilo sustituido en el átomo de N del anillo con propargilo; o (ii) al menos de un E_2 y E_{17} es $-CONR_1R_2$ o $-SO_2N-R_1R_2$ en que R_1 es H y R_2 es propargilo.

- 15 En algunas realizaciones preferidas, en los nuevos corroles de fórmula I, E_2 y E_{17} son cada uno $SO_2N-R_1R_2$, en que R_1 es H y R_2 es propargilo, o en la posición 5, 10 y/o 15, Ar_1 , Ar_2 y/o Ar_3 son un radical fenilo, únicamente sustituido con un grupo propargilamino, preferentemente en la posición 4 o con un grupo propargilamino y otros sustituyentes como halógeno, preferentemente flúor o Ar_1 , Ar_2 y/o Ar_3 son un radical piridilo sustituido con propargilo en el átomo de N del anillo.

- 20 Ejemplos de grupos que contienen propargilo según la invención incluyen, pero sin limitación 4-(N-propargil)-piridilio, 2-(N-propargil)-piridilio, 4-N-propargilaminofenilo y 4-N-propargilamino-2,3,5,6-tetrafluorofenilo en las posiciones 5, 10 y/o 15 del corrol o $-SO_2NH$ -propargilo en las posiciones 2 y 17 del corrol.

En las realizaciones preferidas, el corrol que contiene propargilo está metalado y el átomo central es más preferentemente Fe o Mn.

En algunas realizaciones preferidas, el corrol para ser usado en la presente invención se selecciona entre:

- 25 (i) los corroles en los que E_2 y E_{17} son ambos SO_3H , Ar_1 , Ar_2 y Ar_3 son cada uno pentafluorofenilo y M es Fe (denominado en la presente memoria descriptiva corrol **1C-Fe**), Mn (denominado en la presente memoria descriptiva corrol **1C-Mn**) o Cu (denominado en la presente memoria descriptiva corrol **1C-Cu**); o Ar_1 , Ar_2 y Ar_3 son cada uno CF_3 y M es Fe o Mn;

(ii) el corrol en el que E_2 y E_{17} son ambos SO_3H , Ar_1 , Ar_2 y Ar_3 son cada uno 4-metoxi-2,3,5,6-tetrafluorofenilo y M es Fe (denominado en la presente memoria descriptiva corrol **6C-Fe**);

- 30 (iii) el corrol en el que E_2 y E_{17} son ambos SO_2NH-CH_2-COOH , Ar_1 , Ar_2 y Ar_3 son cada uno pentafluorofenilo y M es Fe (denominado en la presente memoria descriptiva corrol **5C-Fe**);

(iv) el corrol en el que E_2 y E_{17} son ambos H, Ar_1 y Ar_3 son cada uno 4-(N-metil)-piridilio, Ar_2 es pentafluorofenilo y M es Mn (denominado en la presente memoria descriptiva corrol **2C-Mn**);

- 35 (v) el corrol en el que E_2 y E_{17} son ambos H, Ar_1 , Ar_2 y Ar_3 son cada uno 2-(N-metil)-piridilio y M es Mn (denominada en la presente memoria descriptiva corrol **3C-Mn**);

(vi) el corrol en el que E_2 y E_{17} son ambos H, Ar_1 y Ar_3 son cada uno 2-(N-metil)-piridilio, Ar_2 es pentafluorofenilo y M es Mn (denominado en la presente memoria descriptiva corrol **4C-Mn**);

(vii) Los corroles en los que E_2 y E_{17} son ambos SO_3H , Ar_1 , Ar_2 y Ar_3 son cada uno CF_3 y M es Mn o Fe (denominado en la presente memoria descriptiva corrol Mn o H-Fe, respectivamente);

- 40 (viii) Los corroles en los que E_2 y E_{17} son ambos H, Ar_1 y Ar_3 son cada uno 4-(N-propargil)-piridilio, Ar_2 es pentafluorofenilo y M es Mn o Fe (denominados en la presente memoria descriptiva corrol **E-pr-Mn** o **E-pr-**

Fe, respectivamente);

(ix) El corrol en el que E₂ y E₁₇ son ambos H, Ar₁ y Ar₃ son cada uno 2-(N-propargil-piridilio, Ar₂ es pentafluorofenilo y M es Mn o Fe (denominado en la presente memoria descriptiva corrol H-Mn o H-Fe, respectivamente);

5 (x) Los corroles en los que E₂ y E₁₇ son ambos SO₃H, Ar₁ y Ar₃ son cada uno 4-N-propargilamino-2,3,5,6-tetrafluorofenilo y Ar₂ es 4-metoxifenilo y M es Mn o Fe (denominados en la presente memoria descriptiva corrol I-Mn o I-Fe, respectivamente);

10 (xi) el corrol en el que E₂ y E₁₇ son ambos H, Ar₁ y Ar₃ son cada uno 2-(N-metil)-piridilio, Ar₂ es 4-propargilamino-fenilo y M es Mn o Fe (denominado en la presente memoria descriptiva corrol J-Mn o J-Fe, respectivamente);

(xii) Los corroles en los que E₂ y E₁₇ son ambos -SO₂-NH-propargilo, Ar₁, Ar₂ y Ar₃ son cada uno pentafluorofenilo y M es Mn o Fe (denominados en la presente memoria descriptiva corrol K-Mn o K-Fe, respectivamente);

15 (xiii) Los corroles en los que E₂ y E₁₇ son ambos -SO₂-NH-propargilo, Ar₁, Ar₂ y Ar₃ son cada CF₃ y M es Mn o Fe (denominados en la presente memoria descriptiva corrol M-Mn o M-Fe, respectivamente).

Las fórmulas estructurales de los corroles anteriormente mencionados (i)-(vii) y los corroles que contienen propargilo (viii)-(xiii) se exponen en los esquemas 1 y 2, respectivamente, en la presente memoria descriptiva y al final de la descripción, justo antes de las referencias.

20 En realizaciones más preferidas, los corroles para ser usados en la presente invención son los corroles **1C-Fe, 1C-Mn, 2C-Mn, 3C-Mn, 4C-Mn, 5C-Fe, 6C-Fe y E-pr-Mn**.

Algunos de los corroles que no contienen un grupo propargilo han sido descritos en las solicitudes WO 03/004021 y PCT/IL2008/001066 del mismo solicitante, que se incorporan como referencia a la presente memoria descriptiva como si estuvieran completamente descritas en la misma.

25 También están contempladas por la presente invención las sales farmacéuticamente aceptables del corrol de fórmula I.

30 Las sales farmacéuticamente aceptables se forman con metales o aminas, como metales alcalinos y alcalinotérreos o aminas orgánicas. Ejemplos de metales usados como cationes son sodio, potasio, magnesio, calcio y similares. Ejemplos de aminas adecuadas son N,N'-dibenciletilenodiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, N-metil-glucamina y procaína (véase, por ejemplo, Berge S. M., et al., "Pharmaceutical Salts," (1977) J. of Pharmaceutical Science, 66: 1-19). Las sales pueden ser también sales cuaternarias farmacéuticamente aceptables como una sal cuaternaria de fórmula -NRR'R"+Z' en la que R, R' y R" son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo o bencilo y Z es un contraión que incluye cloruro, bromuro, yoduro, O-alquilo, toluenosulfonato, metilsulfonato, sulfonato, fosfato o carboxilato.

35 La sales por adición de ácidos farmacéuticamente aceptables de los compuestos incluyen sales derivadas de ácidos inorgánicos como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como sales derivadas de ácidos orgánicos como ácidos alifáticos mono- y di-carboxílicos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidróxi-alcanoicos, ácidos alcanodioicos, ácidos aromáticos, ácidos alifáticos y sulfónicos aromáticos, etc. Por tanto, estas sales incluyen sulfato, piro-sulfato, bisulfato, sulfito, bisulfito, nitrato, fosfato, monohidrofosfato, dihidrogenofosfato, metafosfato, pirofosfato, cloruro, bromuro, yoduro, acetato, propionato, carilato, isobutirato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, mandelato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, ftalato, bencenosulfonato, toluenosulfonato, fenilacetato, citrato, lactato, maleato, tartrato, metanosulfonato, trifluorometil-sulfonato o tosionato y similares. También están contempladas las sales de aminoácidos como arginato y similares y gluconato o galacturonato (véase, por ejemplo, Berge S. M., et al., "Pharmaceutical Salts," (1977) J. of Pharmaceutical Science, 66: 1-19).

La presente invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende un corrol sustituido con propargilamino nuevo, una sal farmacéuticamente aceptable o un isómero óptico del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 La invención se refiere todavía adicionalmente a una composición farmacéutica para neuroprotección y neurosanación, particularmente para el tratamiento de diabetes y enfermedades, trastornos o estados neurodegenerativos, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un complejo metálico de un corrol anfifílico, un isómero óptico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, preferentemente de la fórmula I de la presente memoria descriptiva.

10 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "tratamiento" significa aliviar o mejorar los síntomas o las complicaciones de la diabetes o la enfermedad, trastorno o estado neurodegenerativo, evitando su progreso o curándolo. El corrol según el paciente se administra por tanto al paciente en una cantidad eficaz, tantas veces como sea necesario para conseguir uno o más de estos objetivos.

15 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención que comprenden complejos metálicos de corroles se formulan para una administración para el paciente usando técnicas bien conocidas en el estado de la técnica, por ejemplo, como se resume en la publicación Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Penna., última edición.

20 En una realización preferida, la composición farmacéutica para ser usada en la presente invención es administrada por vía parenteral, por ejemplo, mediante inyección intravenosa o intramuscular o, preferentemente por vía oral. Las dosis dependerán del tipo de enfermedad o trastorno y el estado y edad del paciente y pueden variar entre 0,1 y 10 mg/kg/día.

Los corroles según la invención, incluidos los nuevos corroles que contienen propargilo son útiles como agentes neuroprotectores y neurosanadores para el tratamiento y/o la prevención de la diabetes y enfermedades, trastornos o estados neurodegenerativos y cualquier otra enfermedad trastorno o estado que pueda aprovecharse de la actividad de neuroprotección y neurosanación proporcionada por los corroles.

25 En una realización, la enfermedad, trastorno o estado que puede ser tratado mediante estos corroles es diabetes de tipo II y sus complicaciones.

30 En otra realización, la enfermedad, trastorno o estado es una enfermedad, trastorno o estado neurodegenerativo que incluye la enfermedad de Parkinson (PD), enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Huntington (HD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), esclerosis múltiple, atapsia de Fiedrich, enfermedad de Hallervorden-Spatz, una demencia y enfermedades, trastornos y estados psiquiátricos.

35 La demencia puede ser una demencia de AD o no de AD como demencia de estructuras de Lewy, demencia vascular y demencia provocada por la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, trauma craneal o infección de HIV. La enfermedad, trastorno o estado psiquiátrico puede ser un trastorno afectivo o del ánimo que incluye depresión, un trastorno distímico, un trastorno bipolar, un trastorno psicotímico, esquizofrenia o un trastorno relacionado con la esquizofrenia como trastorno psicótico breve, un trastorno esquizofreniforme, un trastorno esquizoafectivo y trastorno delirante o puede ser el uso y dependencia de drogas como alcoholismo, dependencia de opiáceos, dependencia de la cocaína, dependencia de anfetaminas, dependencia de alucinógenos o el uso fenciclidina y la retirada de los síntomas relacionados con las mismas.

40 En otra realización, la enfermedad, trastorno o estado es un trastorno de pérdida de la memoria como amnesia o pérdida de memoria asociada con demencia de tipo Alzheimer, con una demencia que no es de tipo Alzheimer o con una enfermedad o trastorno seleccionado entre enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, trauma craneal, infección de HIV, hipertiroidismo y deficiencia de vitamina B12.

45 En otras realizaciones, la enfermedad, trastorno o estado es un trastorno traumático neurológico agudo o neurotrauma como lesión de trauma craneal o lesión de trauma de la médula espinal; a) enfermedad desmielinante como esclerosis múltiples; un trastorno de ataques como epilepsia, un trastorno cerebrovascular como isquemia cerebral o apoplejía; un trastorno del comportamiento de origen neurológico que puede ser un síndrome hiperactivo

o trastorno de déficit de atención y una lesión neurotóxica que esté provocada por una neurotoxina como gas nervioso o el sistema de suministro de toxinas de serpientes venenosas, peces o animales.

En algunas realizaciones preferidas, la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer o esclerosis lateral amiotrófica.

5 Como se muestra en los ejemplos de la presente memoria descriptiva, los complejos metálicos de corroles, preferentemente complejos de Fe y Mn con altamente potentes para proteger la actividad de líneas celulares secretoras de insulina frente a los efectos tóxicos de aditivos que emulan la tensión oxidativa/nitrosativa que se produce de forma natural. Una comparación con metaloporfirinas estructuralmente relacionadas pone de manifiesto que los derivados de corroles son significativamente superiores. Incluso más destacable es el efecto de
10 neurosanación/neuro-restauración observado en los modelos de enfermedades neurodegenerativas (AD, PD y ALS) contra la tensión oxidativa, nitrosativa y el agotamiento de soporte de factor neurotrófico.

Se ha mostrado también en la presente memoria descriptiva en los ejemplos que los corroles inhiben la enzimas de monoamina-oxidasa MAO-A y MAO-B.

15 Los corroles usados en la presente invención muestran una superioridad congruente en todos los parámetros verificados de neuroprotección y neurosanación. Se muestra también que los corroles tienen un impacto positivo en el modelo de líneas celulares para diabetes y enfermedades neurodegenerativas para retardar i quizás incluso invertir la velocidad acelerada de citodegeneración. Se muestra también que algunos de los corroles usados en la presente invención pueden atravesar la BB, debido probablemente a la asociación fuerte y espontánea a proteínas que facilitan el procedimiento.

20 Los resultados de la presente invención indican que los corroles son altamente potentes en lo que respecta a la actividad protectora de células secretoras de insulina frente a los efectos tóxicos de aditivos que emulan la tensión oxidativa/nitrosativa que se produce de forma natural (Fig. 3-7). Es incluso más destacable el efecto neuroprotector/neuro-restaurador observado en los modelos de enfermedades neurodegenerativas (AD, PD y AL>S) frente a la tensión oxidativa/nitrosativa y el agotamiento del soporte de factor neurotrófico (Fig. 8-20).
25 Congruentemente, los corroles de hierro **1C-Fe** y **5C-Fe** y los corroles de manganeso **2C-Mn** y **3C-Mn** muestran superioridad sobre otros corroles.

Los presentes descubrimientos sugieren que los corroles **1C-Fe**, **5C-Fe**, **2C-Mn** y **3C-Mn** pueden tener un impacto positivo sobre la diabetes, envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas como retardar o quizás incluso invertir la velocidad acelerada de citodegeneración. Esto puede sugerir una actividad modificadora de la enfermedad
30 potencial. Es adicionalmente importante destacar la observación de que los complejos de corroles se comportan significativamente mejor que las porfirinas estructuralmente análogas (**1C-Fe** frente a 1P-Fe y **2C-Mn** frente a 2P-Mn) en muchos casos (véanse las Figs. 4, 7, 9, 12, 15 y 18). Apreciablemente, el corrol de hierro **1C-Fe** y el corrol de manganeso sustituido con piridinio **2C-Mn** fueron satisfactorios frente a la toxicidad inducida por SIN en células RIN-m, mientras que el corrol de manganeso sustituido con sulfonato **1C-Mn** era ineficaz. Esto se correlaciona muy
35 bien con los resultados de la Tabla 3 que sugiere que la velocidad de destoxificación mediante **1C-Mn** y su actividad DSOD son aparentemente demasiado bajas. Además, la observación de que los corroles **1C-Fe** y **5C-Fe** eran capaces no solo de proteger sino también de sanar neuronas cuando son administrados después de que se indujo un deterioro oxidativo (Fig. 8B, 9D, 11B, 14B y 15B) sugiere: a) que los compuestos tienen la capacidad de entrar en las células y b) que los mecanismos distintos del efecto antioxidante directo contribuyen a su acción neuroprotectora.
40 No se ha realizado un estudio de toxicidad detallado, no obstante los compuestos de corroles ensayados hasta ahora no muestran una citotoxicidad *in vitro* hasta 50 µM (véanse las Figs. 3 y 9C) y los ratones que recibieron cantidades de 10 mg/kg de corroles **1C-Fe** y **1C-Mn** durante 10 semanas no mostraron ningún comportamiento anormal observable ni pérdida de peso.

La invención se ilustrará seguidamente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

45 Ejemplos

En los ejemplos se identificarán los siguientes compuestos mediante los nombres abreviados que se detallan a continuación. La estructura química de estos compuestos se presenta en los esquemas 1 y 2, justo antes de las referencias.

Corrol IC-Fe: 2,17-bis(sulfonato)-5,10,15-tris(pentafluorofenil)-corrolato de hierro(III)

Corrol IC-Mn : 2,17-bis(sulfonato)-5,10,15-tris(pentafluorofenil)-corrolato de manganeso(III)

Corrol IC-Cu: 2,17-bis(sulfonato)-5,10,15-tris(pentafluorofenil)-corrolato de cobre (III)

Corrol IC-Ga: 2,17-bis(sulfonato)-5,10,15-tris(pentafluorofenil)-corrolato de galio (III)

5 Corrol 2C-Mn : sal de diyoduro de 5, 15-bis(4-N-metil-piridilio)-10-pentafluorofenil-corrolato de manganeso(III)

Corrol 3C-Mn: 5,10,15-tris(N-metil-2-piridilio)corrolato de manganeso(III)

Corrol 4C-Mn: 5,15-bis(N-metil-2-piridilio) 10-pentafluorofenil corrolato de manganeso (III)

Corrol 5C-Fe: 2,17-bis(N-sulfonilglycine)-5,10,15-tris(pentafluoro-fenil)-corrolato de hierro(III)

Corrol 6C-Fe: 5,10,15 tris(4-metoxi-tetrafluorofenil)-corrolato de hierro (III).

10 Corrol E-pr-Mn: 5,15-bis(4-N-propargil-piridilio)-10-pentafluorofenil-corrolato de manganeso (III)

Porfirina IP-Fe: 5,10,15,20-tetra(4-sulfonatofenil)-porfirinato de hierro (III)

Porfirina 2P-Mn: sal de diyoduro de 5,15-bis(N-metil-4-piridilio)-10,20-bis-(pentafluoro- fenil)porfirinaato manganeso (III)

15 Los corroles **1C-Fe**, **1C-Mn**, **1C-Cu** y **1C-Ga** se prepararon según procedimientos previamente descritos por los inventores (documentos WO 03/004021, US 6,939,963; Mahammed and Gross, 2006; Saltsman et al., 2002). El corrol **2C-Mn** se preparó como se describió previamente por los inventores (Gershman et al., 2007). Los corroles **3C-Mn**, **4C-Mn**, **5C-Fe** y **6C-Fe**, así como los corroles sustituidos con propargilo son nuevos y sus síntesis se describen con posterioridad en los ejemplo. En las síntesis, los disolventes y productos químicos estándar se adquirieron de fuentes fiables y se usaron como se recibieron.

20 **Ejemplo 1:** Descomposición catalítica de ROS/RNS por los corroles metálicos

La actividad de SOD (descomposición catalítica de tipo enzimática de radical de anión superóxido) de los corroles **1C-Fe**, **6C-Fe**, **6C-Fe**, **1C-Mn**, **1C-Cu**, **2C-Mn** y **3C-Mn** se examinó a través del ensayo de citocromo C. Las constantes de las velocidades catalíticas para la descomposición de peroxinitrito (PN) por el corrol de hierro recientemente preparado **6C-Fe** y el corrol de manganeso **3C-Mn** se determinaron mediante cinéticas de flujo detenido como se describió previamente para los corroles **1C-Fe**, **1C-Mn** y **2C-Mn** (Mahammed and Gross, 2006; Gershman et al., 2007). Estos ensayos se realizaron con el fin de estimar el modo en que las variables electrónicas y estructurales afectan a la reactividad, lo que es un factor crucial para el diseño de nuevos complejos.

Tabla 1. Actividad de SOD y constantes de velocidades catalíticas para la descomposición de PN

Complejo	1C-Fe	6C-Fe	1C-Mn	1C-Cu	2C-Mn	3C-Mn
IC ₅₀ (μM)	1,64	1,18	5,9	12	1,52	3,27
k _{cat} (M ⁻¹ s ⁻¹)	2,0 x 10 ⁶	n.d.	4,0 x 10 ⁴	n.d.	4,0x10 ⁵	2,5 x 10 ⁴

30 n. d. = todavía no determinado. ^a apreciase como IC₅₀ y K_{cat} están afectados por el tipo de ión metálico (**1C-Fe** < **1C-Mn** << **1C-Cu**) y por los sustituyentes de los corroles en los complejos de Mn y de hierro.

Los resultados presentados en la Tabla 1 muestran que los corroles muestran una actividad sustancial de tipo SOD en el ensayo del citocromo C y sugieren también que los valores de IC₅₀ pueden ser opcionalmente reducido aumentando el elevado contenido de electrones de los complejos (compárese **6C-Fe** con **1C-Fe**, por ejemplo). Esto

se puede hacer, por ejemplo, usando corroles con mucho más grupos arilos donantes de electrones y la determinación de su potencial redox electroquímico. Se ha confirmado ya que en una serie de corroles que no son solubles en agua (trabajo realizado en mezclas de agua/DMSO) el desplazamiento de los potenciales redox y las actividades de SOD están de hecho fuertemente correlacionados (no mostrados).

5 La actividad de tipo catalasa (descomposición catalítica de peróxido de hidrógeno en oxígeno molecular y agua) de los corroles metalados fue también determinada mediante un electrodo de medición de oxígeno, poniendo de manifiesto que los corroles de hierro descomponen H₂O₂ mucho más rápidamente que los correspondientes complejos de manganeso.

10 En todas estas investigaciones, incluso para valores muy elevados de producciones catalíticas no hubo ninguna degradación oxidativa de los compuestos de corroles.

Ejemplo 2. Determinación de las velocidades descomposición de peroxinitrito por nuevos corroles de manganeso

15 Las investigaciones se realizaron examinando la disminución de peroxinitrito 385 µM a pH 7,4 y 25°C en presencia y ausencia de diversas cantidades de catalizadores de corroles de Mn **2C-Mn**, **2C¹-Mn**, **2C²-Mn**, **3C-Mn** y **4C-Mn**. Las diferencias entre **2C-Mn**, **2C¹-Mn** y **2C²-Mn** están en la identidad del grupo 10-arilo, que es C₆-F₅ para-anisilo y fenilo, respectivamente. Los resultados (un ejemplo usando **4C-Mn** se muestra en la Fig.1) se obtuvieron verificando los cambios en la absorbancia a 302 nm, la λ_{max} del peroxinitrito. Se ensayaron los rendimientos catalíticos de cinco de los compuestos anteriores; y los valores de K_{cat} así dilucidados se presentan en la Tabla 2. De forma importante, en agudo contraste con los corroles, ninguno de los complejos de porfirina de manganeso (III) estructuralmente similares afectaron a la descomposición del peroxinitrito en modo alguno (no mostrado).

20 Tabla 2. Velocidad de descomposición de peroxinitrito por diversos corroles de manganeso

Complejo	2C-Mn	2C¹-Mn	2C²-Mn	3C-Mn	4C-Mn
Kcat (M-1s-1)	1,5x 10 ⁵	7,7x 10 ⁴	8,1 x10 ⁴	2,5x 10 ⁴	1,6x 10 ⁵

Ejemplo 3. Moléculas sanadoras del deterioro atribuible al radical hidroxilo con corroles de Fey Mn

25 Se examinaron complejos de corroles con respecto a su eficacia para sanar DMSO del deterioro atribuido al radical hidroxilo, formado a través de una reacción de Fenton que incluye también radical de anión superóxido y diferentes ROS y/o RNS de peróxido de hidrógeno. Esto emula también la reacción que se produce en sistemas biológicos que son expuestos a toxicidad de metales, la situación que se produce en enfermedades provocadas por acumulación en hierro en el cerebro. Los resultados resumidos en la tabla 3 demuestran que el corrol de hierro (III) **1C-Fe** es muy potente para prevenir el deterioro oxidativo y que los corroles de manganeso recientemente preparados **2C-Mn** y especialmente **3C-Mn** aparentemente protegen mejor que el corrol **1C-Mn** frente a la oxidación inducida por metales de sustratos.

30 Tabla 3. Efecto inhibitor de corroles de Fe y Mn sobre la oxidación/nitración de moléculas seleccionadas

Especies reactivas de ROS/RNS	Sustrato	Producto	Rendimiento (%) o cantidad de producto ^a				
			Sin aditivo	1C-Fe	1C-Mn	2C-Mn	3C-Mn
CuSO ₄ /ascorbato	DMSO	Formaldehido	44 µM	0	20 µM	7 µM	0
CuSO ₄ /glutación	DMSO	Formaldehido	11 µM	0	7 µM	5 µM	0

Ejemplo 4. Biodistribución de corroles

35 Para obtener información sobre la localización y distribución *in vivo* de los diversos corroles que tienen grupos de cabeza de ácido sulfónico, se realizó la formación de imágenes *in vivo* de corroles en animales completos. Era de particular interés examinar si los compuestos de corroles conductores, al contrario que la mayoría de las porfirinas, eran capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BBB).

El corrol **1C-Fe** se muestra en la presente memoria descriptiva que es un compuesto neurosanador y neuroprotector. El corrol **1C-Ga** (esquema 1) es un análogo fluorescente de **1C-Fe** que no exhibe las capacidades de **1C-Fe**, oero que puede ser usado como un material que puede ser fácilmente detectado en células y tejidos debido a su fluorescencia. Como el **1C-Fe** y **1C-Ga** difieren solamente en el centro de metal, se supone que su biodistribución es la misma.

En los experimentos de formación de imágenes *in vivo* se realizaron como sigue. Ratones desprovistos de sistema inmunológico recibieron inyecciones i.p. del corrol de galio (III) fluorescente **1C-Ga** y fueron examinados mediante el sistema de formación de imágenes IVIS 200 [Xenogen]. Los resultados mostrados en la Fig. 2B (30 minutos después de la inyección de 19 mg/kg de **1C-Ga**) demuestran la posible penetración de la BBB y la acumulación del complejo de corrol en la zona cerebral.

Ejemplo 5. Efecto protector del corrol de hierro **1C-Fe** sobre líneas de células beta clonales expuestas a peróxido de hidrógeno (H_2O_2)- efectos neurosanadores/neuro-restauradores

Islotes y especialmente células β que contienen niveles entre los más bajos de actividades enzimáticas antioxidantes se compararon con otros tejidos. Estos hechos se cree que son responsables de la elevada sensibilidad de las células productoras de insulina a diversos ataques, que conducen a la destrucción de células beta y, consecuentemente, dan lugar a diabetes. Esto estimuló los estudios sobre el examen de las propiedades protectoras de los corroles frente a la tensión oxidativa en células beta productoras de insulina.

Se usaron dos líneas celulares beta secretora de insulina, insulinoma de rata (INS-1E) y células RIN-m para examinar el efecto protector del corrol **1C-Fe**. Las células se cultivaron a 37°C en un entorno de aire húmedo con 5% de CO_2 y 95% de aire en un medio regular RPMI-1640 (Invitrogen) complementado con 5% de suero de ternera fetal (FCS).

Después de 2 días de cultivo, las células INS-1E (5×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos) se trataron con corrol **1C-Fe** (20 y 50 μM) añadidos 30 minutos antes del tratamiento con concentraciones crecientes de H_2O_2 y seguidamente se incubaron adicionalmente durante 24 h. Los resultados se muestran en la Fig. 3A.

Después de 2 días de cultivo, se trataron células RIN-m (5×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos) con corrol **1C-Fe** (1-50 μM) antes de la adición de 35 μM de H_2O_2 . La viabilidad celular se evaluó mediante un ensayo colorimétrico para la estimación de la función mitocondrial usando el ensayo MTT como se describió previamente (Gassen et al., 1998) y se expresó como porcentaje de testigo. Los resultados se muestran en la Fig. 3B.

Los datos presentados en las Figs. 3A y 3B muestran un efecto protector significativo del corrol **1C-Fe** sobre células beta frente a una amplia gama de concentraciones de peróxido de hidrógeno. El corrol **1C-Fe** no muestra toxicidad cuando es proporcionado solo (sin H_2O_2) a concentraciones hasta 50 μM (Fig. 3C).

Ejemplo 6: efectos comparativos de corroles **1C-Fe**, **1C-Mn**, **5C-Fe** y **2C-Mn** y porfirinas 1P-Fe y 1P-Mn frente a la toxicidad inducida por H_2O_2 en células RIN-m

Se hicieron crecer células RIN-m como se describe en el Ejemplo 5. Después de 3 días de cultivo, las células RIN-m ($2,5 \times 10^4$ células/pocillo en placas de 96 pocillos) se trataron con corroles **1C-Fe** o **5C-Fe** o porfirina 1P-Fe (1 y 20 μM), añadidos 30 minutos antes del tratamiento con H_2O_2 35 μM y se incubaron adicionalmente durante 24 h. La lesión celular se evaluó mediante un ensayo MTT. Los resultados de la Fig. 4 representan la media SEM de un experimento representativo repetido dos veces con resultados similares realizados bajo las mismas condiciones. Los corroles **1C-Fe** y **5C-Fe** (a una concentración de 20 μM) exhibían un efecto protector mayor frente a la toxicidad inducida por H_2O_2 en células RIN-m, con relación a su porfirina 1P-Fe estructuralmente análoga.

El efecto protector de los complejos de corroles de hierro (III) frente a la toxicidad inducida por H_2O_2 (150 μM) se comparó con la de los corroles de manganeso (III) y se relacionó con la porfirina. Aunque los complejos de hierro (III) de corrol **1C-Fe** y la porfirina 1P-Fe estructuralmente relacionada mostraron efectos citoprotectores frente a H_2O_2 , pusieron de manifiesto algunas desventajas del primero (Fig. 5A). Los complejos de Mn (III) **1C-Mn** y **2C-Mn** y la porfirina 2P-Mn estructuralmente análoga eran totalmente insuficientes (Fig. 5A-5B).

Ejemplo 7: Efecto protector de corroles de hierro **1C-Fe** y **5C-Fe** frente a la toxicidad inducida por el donante de óxido nítrico, ICIN-1 (un precursor de peroxinitrito) en células INS-1E y RIN-m

Se cultivaron células INS-1E o células RIN-m en RPMI con bajo contenido de suero (2% de FCS), se colocaron en placas de microtitulación (96 pocillo) a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/pocillo y se dejó que se unieran durante 24 h antes del tratamiento. Se añadieron los corroles **1C-Fe** y **5C-Fe** (10 μM) 30 minutos antes del ataque con el donante de óxido nítrico SIN-1 (500 o 600 μM) durante un período posterior de 24 h. La viabilidad celular se evaluó mediante un ensayo colorimétrico para la función mitocondrial usando bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (ensayo MTT) y se expresó como porcentaje de testigo sin tratar. Los valores mayor que 100% reflejan una actividad mitocondrial aumentada inducida por el fármaco. Los resultados representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes realizados bajo las mismas condiciones.

Los resultados expuestos en las Figs. 6^a-6B demuestran un efecto protector destacado del corrol **1C-Fe** y **5C-Fe** frente a la toxicidad inducida por SIN-1 en células INS-1E y células beta RIN-m, respectivamente. El deterioro es más pronunciado en las células INS-1E, mientras que la protección es extremadamente eficaz en ambos casos.

Ejemplo 8: efectos comparativos de corroles de hierro **1C-Fe** y corroles de manganeso **1C-Mn** y **2C-Mn** con relación a sus respectivas porfirinas 1P-Fe y **2C-Mn** en células beta RIN-m expuestas a SIN-1

Se incubaron células RIN-m secretoras de insulina en RPMI con bajo contenido de suero (2% de FCS) y se colocaron en placas de microtitulación (96 pocillos) a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/pocillo y se dejaron unir durante 24 h antes del tratamiento. Las células se trataron con corroles **1C-Fe**, **1C-Mn** o **2C-Mn** o porfirinas 1P-Fe o 2P-Mn en diversas concentraciones (0,1-20 μM), durante 30 minutos antes del ataque con SIN-1 (800 μM) durante un período posterior de 24 h. La viabilidad celular se evaluó mediante un ensayo MTTT y se expresó como porcentaje de testigo sin tratar.

La primera comparación se refirió a las propiedades citoprotectoras de corrol de manganeso **2C-Mn** con carga positiva frente a su análogo **1C-Mn** con carga negativa (Fig. 7A). Los resultados fueron inequívocamente favorables al primero y se escogió **2C-Mn** como compuesto principal para complejos de manganeso. Para poner de manifiesto las posibles ventajas de los corroles se sintetizó también una porfirina 2P-Mn estructuralmente análoga y se investigó en los mismos experimentos (Fig. 7C). El corrol de hierro **1C-Fe** y la porfirina relacionada 1P-Fe se ensayaron también bajo las mismas condiciones poniendo de manifiesto las ventajas del primero (Fig. 7B).

A cada concentración de fármaco, el corrol de hierro **1C-Fe** exhibe un efecto protector mayor sobre células beta RIN-m frente a la toxicidad inducida por SIN-1 con relación a su respectiva porfirina 1P-Fe (Fig. 7B). El corrol de Mn **2C-Mn** muestra también un efecto protector mejorado sobre células RIN-m frente a la toxicidad inducida por SIN-1 con relación a su correspondiente porfirina 2P-Mn (Fig. 7C).

Ejemplo 9. Efectos neuroprotector y neurosanador de corroles de hierro (III) **1C-Fe** y **5C-Fe** sobre la muerte celular en la línea celular de SH-SY5Y de neuroblastoma humano.

La línea celular de neuroblastoma humano se examinó también bajo condiciones similares a las células RIN-m para poner de manifiesto la capacidad del corrol para prevenir la muerte neuronal provocada por la tensión oxidativa. Se dispusieron en placas células SH-SY5Y en placas de microtitulación (96 pocillos) en DMEM-Eagle/F-12(HAM) (1: 1), que contenía 10% de FCS. Para examinar el efecto neuroprotector, las células SH-SY5Y fueron tratadas durante 30 minutos con corroles **1C-Fe** y **5C-Fe** (20 y 50 μM) antes de la adición de H_2O_2 20 μM durante 24 h. Para examinar la neurosanación, las células SH-SY5Y fueron expuestas en primer lugar a H_2O_2 20 μM durante 0,5 h, 1,5 h o 3 h, seguido de la adición de corroles **1C-Fe** y **5C-Fe** (20 μM) y de incubación durante 24 h.

Los resultados se muestran en las Figs. 8A-8B. Ambos corroles **1C-Fe** y **5C-Fe** muestran un efecto neuroprotector dependiente de la dosis frente a la toxicidad inducida por H_2O_2 en células SH-SY5Y (Fig. 8A). Además de ello, los corroles **1C-Fe** y **5C-Fe** provocaron neurosanación de células SH-SY5Y a continuación de un ataque con H_2O_2 durante diversos períodos de tiempos (Fig. 8B).

Ejemplo 10: efectos comparativos de corrol **1C-Fe** y porfirina 1P-Fe frente a la toxicidad inducida por H_2O_2 en células SH-SY5Y.

Se añadieron los compuestos **1C-Fe** y **1P-Fe** (1-50 μM) 30 minutos antes de un ataque con H_2O_2 (200 μM) seguido de un período posterior de 24 h. Los efectos neuroprotectores del corrol de hierro **1C-Fe** y su porfirina de hierro **1P-Fe** estructuralmente análoga frente a la neurotoxicidad inducida por H_2O_2 se investigaron usando un ensayo de reducción MTT y ELISA de muerte celular, basado en el uso de anticuerpos monoclonales de ratón para detectar histonas libres y DNA fragmentado (F. Hollrieder et al, Biochemica 2002, 1, 25). Los resultados muestran (Fig. 9A-9C) que el H_2O_2 a μM durante 24 h disminuyó considerablemente la viabilidad de células SH-SY5Y de neuroblastoma humano cultivadas en comparación con células testigos sin tratar. El pretratamiento de las células con corrol **1C-Fe** (1-20 μM) durante 30 minutos antes de la incubación con H_2O_2 200 μM durante 24 h, viabilidad celular aumentada de forma dependiente de la dosis, según se determinó mediante reducción MTTT en comparación con células tratadas con H_2O_2 (Fig. 9A). El corrol **1C-Fe** añadido en ausencia de H_2O_2 (hasta 50 μM) no tuvo ningún efecto significativo sobre la viabilidad de SH-SY5Y (Fig. 9C). Se obtuvieron resultados similares cuando la neuroprotección se evaluó mediante un ensayo de detección ELISA, demostrando que el corrol **1C-Fe** protegió significativamente y de forma dependiente de la dosis las células SH-SY5Y frente a la neurotoxicidad de H_2O_2 (Fig. 9B). Congruentemente, a todas las concentraciones estudiadas, el corrol **1C-Fe** mostró superioridad sobre la porfirina **1P-Fe** en la protección de células SH-SY5Y respecto a la neurotoxicidad inducida por H_2O_2 . Considerando el efecto neuroprotector observado del corrol **1C-Fe**, se intentó determinar la duración del retraso entre la exposición a H_2O_2 y el tratamiento del corrol **1C-Fe** que todavía proporcionaría una neuroprotección. Se administró H_2O_2 a células SH-SY5Y y seguidamente se añadió corrol **1C-Fe** durante 0,5-1,5 h durante 0,5-1,5 h posteriores. El efecto neuroprotector del corrol **1C-Fe** permaneció inalterado a las 0,5 h posteriores al ataque de H_2O_2 (Fig.9A y 9D). A las 1 y 1,5 h posteriores al ataque de H_2O_2 , el corrol **1C-Fe** protegió significativamente las células SH-SY5Y, pero el alcance de la protección disminuyó gradualmente (Fig. 9D). De forma apreciable, los dos corroles de manganeso sustituidos **2C-Mn** y **3C-Mn** (hasta 50 Mn) no fueron eficaces para prevenir la citotoxicidad mediada por H_2O_2 (datos no mostrados).

La citoprotección por complejos de hierro frente a diferentes concentraciones de H_2O_2 se muestra en la Fig. 10. Como en los casos previos, el corrol mostró una superioridad sobre la porfirina análoga en lo que respecta a la supervivencia celular en condiciones de deterioro oxidativo inducido por diferentes concentraciones de H_2O_2 .

Ejemplo 11. Efectos neuroprotector y neurosanador de corroles de hierro **1C-Fe** y **5C-Fe** frente a muerte celular inducida por SIN-1 en la línea de células SH-SY5Y de neuroblastoma humano

Se cultivaron células SH-SY5Y en DMEM-Eagle/F-12(HAM) (1:1) que contenía 10% de FCS. Las células se volvieron a poner en suspensión en medio que contenía 2% de FCS, se sembraron en placas de microtitulación (96 pocillos) y se dejaron unir durante 24 h antes del inicio del tratamiento. Para examinar los efectos neuroprotectores, se trataron células SH-SY5Y durante 30 minutos con corroles **1C-Fe** y **5C-Fe** (10 y 20 μM) antes de la adición de H_2O_2 μM durante 24 h. Para examinar la neurosanación, las células SH-SY5Y se expusieron en primer lugar a H_2O_2 20 μM durante 0,5 h, 1,5 h o 3 h seguido de la adición de corroles de **1C-Fe** y **5C-Fe** (20 μM) y de una incubación durante 24 h.

Los resultados se muestran en las Figs. 11A-11B. Ambos corroles **1C-Fe** y **5C-Fe** mostraron un efecto neuroprotector dependiente de la dosis frente a la toxicidad inducida por SIN-1 en células SH-SY5Y (Fig. 11A). Además de ello, los corroles **1C-Fe** y **5C-Fe** provocaron la neurosanación de células SH-SY5Y a continuación de un ataque con SIN-1 durante diversos períodos de tiempo (Fig. 11B).

Ejemplo 12. Efectos comparativos de los corroles **1C-Fe**, **2C-Mn** y **3C-Mn** y porfirinas **1P-Fe** y **2P-Mn** frente a la toxicidad inducida por SIN-1 en células SH-SY5Y

Se trataron previamente células SH-SY5Y con o sin corroles **1C-Fe**, **2C-Mn** y **3C-Mn** y las porfirinas estructuralmente relacionadas **1P-Fe** y **2P-Mn**, respectivamente, 30 minutos antes de la exposición a SIN-1 durante un período posterior de 24 h. Las Figs. 12A-12B demuestran la capacidad del corrol de hierro **1C-Fe** y los corroles de manganeso **2C-Mn** y **3C-Mn** para proteger, de una manera dependiente de la dosis, células SH-SY5Y frente a SIN-1, según se determina mediante el análisis de reducción MTT y el ensayo ELISA. El corrol de hierro **1C-Fe** a concentraciones de 10 y 20 μM fue capaz de inhibir la muerte neuronal, pero fue menos potente que los corroles de manganeso **2C-Mn** y **3C-Mn**. Además, los dos corroles de hierro y manganeso mostraron una superioridad significativa sobre sus respectivas porfirinas análogas.

Además de **2C-Mn** con sus restos de para-piridinio con carga positiva, se examinó también **3C-Mn** con restos de

orto-piridinio. El corrol de manganeso (III) **3C-Mn** parece que es más eficaz no solamente que el **2C-Mn**, sino que muestra también mejores propiedades citoprotectoras que el complejo de corrol de hierro (III) **1C-Fe**. La Fig. 12C pone de manifiesto la capacidad de ambos corroles de hierro (III) y manganeso (III) **1C-Fe** y **3C-Mn** (25 µM) para proteger células frente a diferentes concentraciones de SIN-1, siendo aparentemente mejores las propiedades citoprotectoras de **3C-Mn** que la de **1C-Fe** a todas las concentraciones de toxinas.

Para determinar el efecto de los corroles sobre la nitración de proteínas celulares inducida por SIN-1, se trataron células de neuroblastoma SH-SY5Y con SIN-1 (700 µM) en ausencia o presencia de 20 µM de los corroles **1C-Fe**, **2C-Mn** y **3C-Mn**. La nitración de proteínas se detectó mediante análisis de inmunofluorescencia usando un anticuerpo monoclonal frente a nitrotirosina (Ntyr), un marcador biológico de peroxinitrito. Las Figs. 13A-13B ilustran que la inmuno-reactividad respecto a Ntyr se indujo considerablemente mediante exposición a SIN-1 en comparación con células testigos. La administración de corrol de hierro dio lugar a una reducción parcial (aunque bastante considerable) en la tinción de Ntyr, aunque los dos corroles de manganeso **2C-Mn** y **3C-Mn** impidieron totalmente la formación inducida por SIN-1 de nitrotirosina.

Ejemplo 13: Efectos neuroprotectores y neurosanadores de corroles de hierro **1C-Fe** y **5C-Fe** frente a la muerte celular inducida por 6-hidróxido pamina (OHDA) en la línea de células SH-SY5Y de neuroblastoma humano

En esta serie de experimentos, se indujo el deterioro celular por 6-OHDA como un modelo para la enfermedad de Parkinson. La 6-hidróxidopamina (6-OHDA) es una neurotoxina dopaminérgica putativamente implicada en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson (PD). Su neurotoxicidad ha estado relacionado con la producción de especies de oxígeno reactivo. Bajo condiciones fisiológicas, la 6-OHDA es oxidada de forma rápida y no enzimática por oxígeno molecular para formar peróxido de hidrógeno y la correspondiente p-quinona. Esta última experimenta seguidamente una ciclación intramolecular seguida de una cascada de reacciones oxidativas que dan lugar a la formación de un pigmento polímero insoluble relacionado con neuromelanina. Aunque el mecanismo molecular preciso de la citotoxicidad para 6-OHDA sigue siendo incierto, a menudo ha sido asociado a la producción de ROS. El H₂O₂ resultante de la auto-oxidación de 6-OHDA puede ser fácilmente reducido en presencia de Fe²⁺ mediante la reacción de Fenton para proporcionar el radical hidroxilo que, como se mencionó anteriormente, es considerado el radical libre más dañino para las células vivas.

Se cultivaron células SH-SY5Y en DMEM-Eagle/F-12 (HAM) (1:1) que contiene 10% de FCS. Las células se volvieron a poner en suspensión en medio que contiene 2% de FCS, se sembraron en placas de microtitulación (96 pocillos) y se dejaron unir durante 24 h. Para examinar el efecto neuroprotector, se pretataron células durante 30 minutos con corroles **1C-Fe** y **5C-Fe** (1-20 µM) y seguidamente se expusieron a 6-OHDA (60 µM) durante 24 h adicionales. Para la medición de la neurosanación, se trataron en primer lugar células SH-SY5Y con 6-OHDA (60 µM) durante 0,5 h, 1,5 h, 3 h y 6 h seguido de la adición de compuestos **1C-Fe** y **5C-Fe** (10 µM) durante 24 h adicionales.

Los resultados se exponen en las Figs. 14A-14B. Ambos corroles **1C-Fe** y **5C-Fe** muestran un efecto neuroprotector dependiente de la dosis frente a la toxicidad inducida por 6-OHDA en células SH-SY5Y con corrol **1C-Fe** que muestra un efecto mayor (Fig. 14A). Además de ello, los corroles **1C-Fe** y **5C-Fe** provocaron una neurosanación de células SH-SY5Y a continuación de un ataque con 6-OHDA durante diversos períodos de tiempo (Fig. 14B).

Ejemplo 14. Efectos comparativos de corroles **1C-Fe**, **2C-Mn** y **3C-Mn** y porfirinas 1P-Fe y 2P-Mn frente a neurotoxicidad inducida por 6-OHDA en células SH-SY5Y

Se pretataron células SH-SY5Y con o sin corroles **1C-Fe**, **2C-Mn** y **3C-Mn** y porfirinas 1P-Fe y 2P-Mn (20 µM), 30 minutos antes de una exposición a 6-OHDA (40 µM) durante un período posterior de 24 h. La viabilidad celular se evaluó mediante un ensayo MTT y la muerte celular se valoró usando el estuche de ensayo ELISA de detección de la muerte celular apoptótica. Para la neurosanación, las células SH-SY5Y se expusieron en primer lugar a 6-OHDA 40 µM durante 0,5, 1, 1,5 y 3 h seguido de la adición de los compuestos **1C-Fe**, **2C-Mn** y **3C-Mn** (20 µM) y se incubaron 24 h adicionales. La proteína asociada al crecimiento (GAP-43) se detectó mediante microscopía de fluorescencia usando un anticuerpo primario específico. Los núcleos apoptóticos se determinaron mediante análisis de marcación de extremos mellados de UTP-digoxigenina mediado por desoxinucleotidil-transferasa terminal. Se aplicó una tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para la marcación nuclear. Se detectó 6-OHDA mediante microscopía de fluorescencia usando un anticuerpo primario específico.

- 5 Como se puede observar en las Figs. 15A-15B, el corrol de hierro **1C-Fe**, así como los corroles de manganeso **2C-Mn** y **3C-Mn** atenuaron significativamente la citotoxicidad inducida por 6-OHDA en cultivos de células SH-SY5Y. La magnitud del efecto neuroprotector fue más pronunciada para los corroles de manganeso. Unos experimentos de neurosanación adicionales (Fig. 15C) pusieron de manifiesto que los corroles de hierro y manganeso confieren un efecto neuroprotector pronunciado a las 0,5 h posteriores a la administración de 6-OHDA, que resulta gradualmente reducido hasta 3 h después de la exposición al ataque. Para confirmar adicionalmente el efecto neuroprotector de los corroles en células SH-SY5Y expuestas a 6-OHDA, se empleó un análisis de inmunofluorescencia, usando un anticuerpo primario específico frente al marcador axonal, proteína asociada al crecimiento (GAP-43) y tinción de DAPI para la marcación nuclear.
- 10 Las Figs. 16A-N muestran que el tratamiento con los corroles **1C-Fe**, **2C-Mn** y **3C-Mn** (26 μM) atenuaron significativamente la mortalidad celular inducida por 6-OHDA, mejoraron la morfología celular y redujeron el número de núcleos apoptóticos, en comparación con las células tratadas con vehículo (16A-D). Además de ello, la totalidad de los tres corroles (**1C-Fe**, **2C-Mn** y **3C-Mn**) exhibieron una superioridad considerable sobre las porfirinas 1P-Fe y 2P-Mn, en concordancia con los resultados obtenidos mediante el ensayo MTT y el análisis ELISA de muerte celular.
- 15 Como la 6-OHDA se conoce también que induce apoptosis en diversos tipos de células, incluida la SH-SY5Y (von Coelln et al. 2001; Nie et al. 2002; Shimizu et al. 2002; Jordan et al. 2004), se ensayó adicionalmente el efecto de los corroles sobre los niveles del marcador apoptótico, caspasa-3 escindida, un ejecutor principal de la trayectoria intrínseca mitocondrial de la apoptosis. Las Figs. 17A-E muestran que las células SH-SY5Y incubadas con vehículo y expuestas a 6-OHDA (40 μM) exhibieron un aumento significativo en los niveles de caspasa-3 escindida frente a las células testigos. Este efecto sobre la caspasa-3 escindida fue parcialmente impedida por la administración de corrol de hierro **1C-Fe** o totalmente mediante la administración de corroles de manganeso **2C-Mn** o **3C-Mn**, como se indicó mediante un análisis de inmunofluorescencia (Fig. 17F).

Ejemplo 15: Efectos comparativos de corroles **1C-Fe**, **2C-Mn** y porfirinas 1P-Fe, 2P-Mn frente a la toxicidad inducida por SIN-1 o por H_2O_2 en células NSC-34

- 25 Los efectos neuroprotectores del corrol de hierro **1C-Fe** y porfirina análoga 1P-Fe frente a un ataque de H_2O_2 fueron adicionalmente examinados en la línea celular de neuronas motoras, NSC-34. La células NSC-34 es una línea celular híbrida de neuroblastoma x médula espinal (NSC) que se parece a la neuronas motoras, que muestra un fenotipo de tipo neurona multipolar. Se pretrataron células NSC-34 motoneuronales de ratón con o sin los corroles **1C-Fe** o **2C-Mn** o las porfirinas estructuralmente relacionada 1P-Fe, 2P-Mn, respectivamente, 30 minutos antes de la exposición a H_2O_2 (200 μM) o SIN-1 (700 μM) durante un período posterior de 24 h. La viabilidad celular (Fig. 18A, 19A) se evaluó mediante el ensayo MTT y la muerte celular (Fig. 18B, 19B) se valoró usando el estuche de ensayo ELISA de detección de la muerte celular apoptótica. Los gráficos en la Fig. 18A-18B y 19A-19B presentan resultados expresados como porcentaje de testigo sin tratar. Los datos se expresan como media \pm SEM (n = 6) de un experimento representativo que se repitió dos veces con resultados similares.
- 30
- 35 Como se muestra en las Figs. 18A-18B para el corrol **1C-Fe** (20 μM) y la porfirina 1P-Fe, el corrol **1C-Fe** se encontró que confería una protección significativa frente a la citotoxicidad mediada por H_2O_2 en células NSC 34, en los ensayos tanto MTT (Fig. 18A) como ELISA (Fig. 18B). DE forma congruente con los resultados en las células SH-SY5Y, se encontró que la porfirina 1P-Fe no era apreciablemente activa para evitar la citotoxicidad mediada por H_2O_2 en células NSC-34. Como se muestra en las Figs. 19A-19B para los corroles **1C-Fe** y **2C-Mn** (20 μM) y las porfirinas 1P-Fe y 2P-Mn, tanto el corrol de hierro **1C-Fe** (20 μM) como el corrol de manganeso **2C-Mn** (20 μM) atenuaron significativamente la citotoxicidad inducida por SIN-1 (700 μM) en células de neuronas motoras NSC-34, poniendo de manifiesto una actividad mayor de citoprotección que las respectivas porfirinas análogas 1P-Fe y 2P-Mn.

45 **Ejemplo 16:** efecto neuroprotector de corroles de hierro **1C-Fe** y **5C-Fe** en un modelo de cultivo celular de ALS familiar

- La superóxido dismutasa mutante (G93A-SOD1) está asociada con la esclerosis lateral amiotrófica familiar (FALS). Se realizó un modelo de cultivo familiar de FALS transfectando con establemente células NSC-34 motoneuronales o células ECH-SH-SY5Y, para expresar G93A-SOD1 a niveles que se aproximan a los observados en la enfermedad humana. Las células NSC-34 o las células SH-SY5Y se incubaron en medio Eagle modificado de Dulbecco/medio F-12 complementado con 10% de FCS exento de tetraciclina (FCS exento de Tet, Clontech), a 37°C en una atmósfera
- 50

de 5% de CO₂ en aire. Estas líneas celulares son establemente transfectadas con el plásmido pTet-ON (Clontech, Palo Alto, CA) que codifica el transactivador controlado de tetraciclina inversa (rtTA). La inducción de la expresión de SOD1 mutante se obtuvo desplazando cultivos no confluentes en medio de cultivo que contenía complemento de 1% de N₂ (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 1 mg/ml de doxociclina durante 48 h en presencia o ausencia de corrol **1C-Fe** y **5C-Fe**.

Los resultados se muestran en las Figs. 20A-20B. En las células mutantes inducidas, la supervivencia se disminuyó en más de 40%, mientras que el tratamiento con el corrol **1C-Fe** o **5C-Fe** mejoró significativamente la viabilidad celular de células NSC-34 G93A incluso a una concentración tan baja como 0,5 μM (Fig. 20A). Se obtuvieron resultados similares cuando la mutación de G93A se expresó en células SH-SY5Y (Fig. 20B).

10 **Ejemplo 17:** Absorción celular de los corroles.

Para ensayar la penetración de la membrana celular, así como la absorción y acumulación de corroles en las células, se aprovechó la propiedad de fluorescencia de un corrol apropiado. Para esta finalidad se usó un complejo de corrol fluorescente (**1C-Ga**) que es estructuralmente igual a los compuestos catalíticos usados en los experimentos de citoprotección/citosanación, excepto en que el metal quelado es galio (III) en lugar de hierro (III) en **1C-Fe** o manganeso (III) en **1C-Mn**. Los resultados se muestran en las Figs. 21A-D para la línea celular RIN-m (insulinoma) y las Figs. 22A-D para la línea de células SH-SY5Y (neuroblastoma). Ambas figuras demuestran la acumulación de corroles en el interior de células originadas a partir de diferentes líneas celulares.

Para visualizar el corrol intracelular se usó microscopía de fluorescencia. Se dispusieron en placas células SH-SY5Y de neuroblastoma y células RIN-m de insulinoma sobre cubreobjetos. A las 24 h después de la disposición en las placas, se añadió corrol **1C-Ga** directamente a los medios celulares y se incubó durante media hora a 37°C. Seguidamente las células se aspiraron de los medios y se lavaron con tampón de fosfato para eliminar la señal de fondo debida al corrol celular extra. Se realizó una fijación con formaldehído. Los cubreobjetos con el medio de soporte (con DAPI) se colocaron directamente en los portaobjetos y se observaron mediante microscopía de fluorescencia; los resultados se muestran en las Figs. 21 y 22.

A partir de estos resultados se observa que el corrol probablemente se acumula en el citoplasma de células de neuroblastoma y de insulinoma, pero permanece excluido del núcleo. Para un análisis más exacto y específico de la distribución de corroles entre orgánulos celulares se utilizará una tinción específica y microscopía confocal en el futuro.

30 **Ejemplo 18.** Preparación de corrol de 2,17-bis-sulfonato-5,10,15-tris(p-metoxi-tetrafluorofenil)hierro (III) (corrol **6C-Fe**, esquema 1)

18.1 Preparación de corrol de 5,10,15-tris(p-metoxi-tetrafluorofenil)

Se disolvieron 200 mg de corrol de 5,10,15-tris(pentafluorofenil) en 100 ml de solución de metóxido de sodio (0,5 M en metanol). La solución se calentó a reflujo durante 6 h bajo argón y seguidamente se evaporó el disolvente. El producto se purificó mediante dos columnas de gel de sílice posteriores (el eluyente era de etanol para la primera columna y CH₂Cl₂/n-hexano 2:1 para la segunda columna), proporcionando 160 mg (rendimiento de 77%) de corrol de 5,10,15-tris(p-metoxitetrafluorofenil). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ = 9,02 (d, J = 4,0 Hz, 2H), 8,73 (d, J = 4,8 Hz, 2H), 8,54 (d, J = 4,8 Hz, 2H), 8,51 (d, J = 4,0 Hz, 2H), 4,31 (s, 9H). ¹⁹F RMN (282,4 MHz, CDCl₃) δ = -139,6 (dd, J¹ = 22 Hz, J² = 7,0 Hz, 2F), -140,1 (dd, J¹ = 22 Hz, J² = 7,0 Hz, 4F), -158,2 (dd, J¹ = 22 Hz, J² = 7,0 Hz, 4F), -158,6 (dd, J¹ = 22 Hz, J² = 7,0 Hz, 2F).

40 18.2 Preparación de corrol de 2,17-bis-sulfonato-5,10,15-tris(p-metoxi-tetrafluorofenil) (corrol 6C, esquema 1)

Se agitaron 100 mg de corrol de 5,10,15-tris(p-metoxi-tetrafluorofenil) y 10 ml de ácido sulfúrico a 25°C durante 4 h, después de lo cual la mezcla de reacción se enfrió mediante un baño con hielo y se trató con trozos pequeños de hielo (5-10 g). El ácido se neutralizó mediante carbonato de sodio y el producto se separó del sulfato a través de la adición de etanol, filtración y evaporación. El producto se purificó mediante columna de gel de sílice (el eluyente era CH₂Cl₂/etanol 2:1), proporcionando 80 mg (rendimiento de 67%) de corrol de 2,17-bis-sulfonato-5,10,15-tris(p-metoxitetrafluorofenil). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ = 9,67 (s, 1H), 8,57 (s, 1H), 8,38 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 8,22 (d, J =

4,5 Hz, 1H), 8,15 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 8,14 (d, J = 4,5 Hz, 2H), 4,24 (s, 3H), 4,23 (s, 3H), 4,21 (s, 3H). ^{19}F RMN (282,4 MHz, CD_3OD) δ = -140,9 (dd, J^1 = 24 Hz, J^2 = 8,0 Hz, 2F), -141,9 (dd, J^1 = 24 Hz, J^2 = 8,0 Hz, 2F), -142,1 (dd, J^1 = 24 Hz, J^2 = 8,0 Hz, 2F), -161,6 (dd, J^1 = 24 Hz, J^2 = 8,0 Hz, 2F), -162,1 (dd, J^1 = 24 Hz, J^2 = 8,0 Hz, 2F), -164,3 (dd, J^1 = 24 Hz, J^2 = 8,0 Hz, 2F). MS (TOF LD-) m/z (%) 101 1,9 (100%) [$\text{M}^{2+} + \text{Na}^+$].

5 18.3 Preparación de corrol 2,17-bis-sulfonato-5,10,15-tris(p-metoxitetrafluorofenilo)hierro (III) (**6C-Fe**)

Una parte de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (100 mg) se añadió de una vez a una solución en piridina (10 ml) de corrol de 2,17-bis-sulfonato-5,10,15-tris(parametoxitetrafluorofenil) (100 mg) y la mezcla se calentó inmediatamente a reflujo durante 10 minutos. El producto se purificó mediante una columna de gel de sílice (el eluyente era éter/etanol 3:1 al comienzo y seguidamente éter/etanol 1:2), proporcionando 75 mg (rendimiento de 71%) del producto del título. ^{19}F RMN (282,4 MHz, CD_3OD) δ = -109,2 (1F), -119,3 (2F), -153,4 (1F), -154,8 (1F), -157,4 (1F). MS (TOF LD-) m/z (%) 1065,9 (100%) [$\text{M}^{2+} + \text{Na}^+$].

Ejemplo 19. Preparación de corrol de 2,17-bis-sulfonato-glicina-5,10,15-tris(pentafluorofenilo) hierro (III) (corrol **5C-Fe**, esquema 1).

19.1 Preparación de éster etílico de corrol de 2,17-bis-sulfonato-glicina-5,10,15-tris(pentafluorofenilo)

15 Una solución de corrol de 2,17-bis-sulfonilcloruro-5,10,15-tris(pentafluoro-fenil) (70 mg) y 200 μl de éster etílico de glicina en CH_2Cl_2 (20 ml) se agitó durante 1 h. La solución se lavó dos veces con una solución de HCl (2 M) y seguidamente con agua destilada. El disolvente se evaporó y se obtuvo éster etílico de corrol de 2,17-bis-sulfonato-glicina-5,10,15-tris(pentafluorofenilo) con un rendimiento cuantitativo. ^{19}F RMN (188 MHz, CDCl_3) δ = -136,8 (pico ancho, 4F), -139,0 (pico ancho, 2F), -150,7 (pico ancho, 1F), -151,1 (pico ancho, 2F), -160,7 (pico ancho, 4F), -162,5 (pico ancho, 2F). MS (TOF LD+) m/z (%) 1149,2 (100%) [$\text{M} + \text{Na}^+$].

19.2 Preparación de éster etílico de 2,17-bis-sulfonato-glicina-corrol de tris(pentafluorofenilo)hierro (III)

25 Una parte de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (70 mg) se añadió de una vez a una solución en piridina (10 ml) de éster etílico de corrol de 2,17-bis-sulfonato-glicina-5,10,15-tris(pentafluorofenilo) (70 mg) y la mezcla se calentó inmediatamente hasta reflujo durante 10 minutos. El producto se purificó mediante una columna de gel de sílice (el eluyente era $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{n}$ -hexano 1:1 al comienzo y seguidamente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{THF}$ 100:1), proporcionando 60 mg (rendimiento de 82%) de éster etílico de 2,17-bis-sulfonatoglicina-5,10,15-tris(pentafluorofenil) hierro (III). ^{19}F RMN (282,4 MHz, CDCl_3) δ = -118,1 (2F), -123,0 (2F), -124,9 (2F), -153,7 (2F), -156,1 (1F), -160,9 (2F), -161,2 (2F), -163,2 (2F). MS (TOF LD-) m/z (%) 1179,242 (80%) [M], 1202,244 (100%) [$\text{M} + \text{Na}$].

19.3 Preparación de 2,17-bis-sulfonato-glicina-5,10,15-tris(pentafluorofenilo)hierro (III)

30 Se llevaron a reflujo durante 1 h 60 mg de éster etílico de 2,17-bis-sulfonatoglicina-corrol de 5,10,15-tris(pentafluorofenilo)hierro (III) y 100 ml de agua que contenían 500 mg de carbonato de sodio, después de lo cual la solución básica se neutralizó mediante HCl y se lavó con CH_2Cl_2 . El producto se transfirió a la fase orgánica. El CH_2Cl_2 se lavó dos veces con agua y se secó por medio de sulfato de sodio. Se obtuvieron 45 mg del producto final 2,17-bis-sulfonato-glicina-corrol de 5,10,15-tris(pentafluorofenilo)hierro (III) después de una filtración y evaporación de la solución en CH_2Cl_2 . ^{19}F RMN (282,4 MHz, CDCl_3) δ = -118,2 (2F), -123,1 (2F), -125,0 (2F), -153,8 (2F), -156,1 (1F), -161,1 (4F), -163,3 (2F). MS (TOF LD-) m/z (%) 1122,468 (100%) [M].

Ejemplo 20. Preparación de corroles **3C-Mn** y **4C-Mn** (esquema 1)

La preparación de los corroles exentos de metales y no alquilados **3C** y **4C**, a partir de los cuales se prepararon los complejos metálicos **3C-Mn** y **4C-Mn**, respectivamente, se describe por Saltsman et al., 2008.

40 20.1 Preparación de corrol de 5,10,15-tris(o-piridilo) (**3C**, el precursor de **3C-M**, esquema 1)

Para la preparación del compuesto del título en el Ejemplo 20.1, se hicieron reaccionar 2-piridinio-dipirrometano y un aldehído apropiado (2-piridino-carboxaldehído/pentafluorobenzaldehído) como se describe por Gryko and Piechota, 2002. Brevemente, las muestras de dipirrometano (0,4 mmol) y el aldehído apropiado (0,2 mmol) se disolvieron en

5 CH_2Cl_2 (12 ml) y se añadió ácido trifluoroacético (62 μl , 0,8 mmol) a esta mezcla en agitación a temperatura ambiente. Después de 1 h se añadió trietilamina (112 μM , 0,8 mmol) y la mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (308 ml). Se añadió DDQ (90 mg, 0,4 mmol) y se continuó la agitación durante 10 minutos adicionales. La mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad y se purificó mediante cromatografía de columna sobre sílice con los detalles de purificación que se describen para cada caso.

10 La mezcla de reacción se purificó a través de cromatografía de columna sobre sílice. La segunda banda azul-verde se eluyó con acetato de etilo: n-hexano (al comienzo 3:1 y a continuación gradualmente hasta acetato de etilo al 100%, seguidamente metanol al 10% en acetato de etilo). Un segundo tratamiento cromatográfico (acetato de etilo: n-hexano 3:1, seguidamente n-hexano al 3% en acetato de etilo y seguidamente metanol al 5% en acetato de etilo) proporcionó corrol puro (25 mg, 24% de rendimiento), R_f (sílice, acetato de etilo) = 0,24. ^1H 500 MHz RMN (C_6D_6) δ = 8,81 (s ancho, 2H), 8,79 (d, ^3J (H,H) = 4,12 Hz, 2H), 8,67 (s ancho, 1H), 8,65 (d, ^3J (H,H) = 4,35 Hz, 2H), 8,44 (d, ^3J (H,H) = 4,12 Hz, 2H), 8,23 (d, ^3J (4,58 Hz, 2H), 8,04 (d, ^3J (H,H) = 7,56 Hz, 2H), 7,91 (d, ^3J (H,H) = 7,33 Hz, 1H), 7,34 (m, 3H), 6,92 (m, 3H). UV-vis (acetato de etilo): λ_{max} , nm ($\epsilon \times 10^{-3}$) 418 (36,3), 582 (6,7), 614 (4,4).

MS (MALDI-TOF): m/z (%): 528,3 [M^+ , 100%]; 530,5 [M^+ , 100%].

15 20.2 Preparación de corrol de 10-(pentafluorofenil)-5,15-bis(o-piridilo) (4C)

20 La mezcla de reacción de la reacción con pentafluorobenzaldehído se purificó a través de cromatografía de columna sobre sílice. La segunda banda azul-verde que se eluyó con acetato de etilo: n-hexano (1:4 y seguidamente 1:2) proporcionó una fracción que contenía corrol 4C. La purificación final de 4C se consiguió mediante cromatografía de capa fina (placa de sílice/acetato de etilo: n-hexano, 3:4) para proporcionar 4C puro (27 mg, 22% de rendimiento), R_f (sílice, acetato de etilo: n-hexano 2:3) = 0,81. ^1H 300 MHz RMN (C_6D_6): δ = 8,74 (s ancho, 2H), 8,61 (d, ^3J (H,H) = 4,12 Hz, 2H), 8,22 (d, ^3J (H,H) = 4,67 Hz, 2H), 8,09 (d, ^3J (H,H) = 7,96 Hz, 2H), 7,71 (d, ^3J (H,H) = 4,94 Hz, 2H), 7,06 (m, 4H), 6,42 (m, 2H), -1,47 (s ancho, 3H). ^{19}F 282 MHz (C_6D_6): δ = 138,36 (dd, ^3J (F,F) = 25,3 Hz, ^4J (F,F) = 5,6 Hz, 2F), -154,16 (t, ^3J (F,F) = 22,6 Hz, 1F), -162,96 (td, ^3J (F,F) = 25,4 Hz, ^4J (F,F) = 8,5 Hz, 2F). UV-vis (EtOAc): λ_{max} , nm ($\epsilon \times 10^{-3}$) 416 (48,5), 578 (10,3).

25 MS (MALDI-TOF): m/z (%): 617,0 [M^+ , 100%]; 619,2 [M^+ , 100%].

MS (MALDI-TOF): m/z (%): 619,2 [M^+ , 100%].

20.3 Preparación de 3C y 4C N-metilados

30 Se disolvieron 3C y 4C en el volumen mínimo de DMF y se añadió yoduro de metilo en exceso (100 eq) a las soluciones. Las mezclas de reacción se agitaron a temperatura ambiente durante una noche. Se añadió una pequeña cantidad de metanol y un exceso de tres veces de dietil-éter a las mezclas de reacción. Los productos precipitados se recogieron y se lavaron con parte de adición dietil-éter.

Corrol de 5,10,15-tris(N-metil-o-piridinilo) (3C^{3+}): se obtuvo en forma de una mezcla de tres estructuras atropoisómeras, que se separaron mediante HPLC de fase inversa. R_f (sílice, KNO_3 sat : H_2O : acetonitrilo, 1:1:8) = 0,46, UV-vis (acetonitrilo): λ_{max} , nm ($\epsilon \times 10^{-3}$) 408 (8,0), 436 (8,2), 626 (3,3).

35 MS (MALDI-TOF) ES^+ (CH_3CN): m/z (%): 575 (10) [M^+], 560 (40) [$\text{M}-15(\text{CH}_3)$], 545 (100) [$\text{M}-30(2\times\text{CH}_3)$], 287 (100) [M^+]/2, 196 (25) [$\text{M}+16(\text{O})$]/3.

40 Corrol de 10-(pentafluorofenil)5,15-bis(N-metil-o-piridinilo) (4C^{2+}): se obtuvo en forma de una mezcla de dos atropoisómeros, que se separaron mediante HPLC de fase inversa. R_f (sílice, KNO_3 sat : H_2O : acetonitrilo 1:1:8) = 0,55. ^1H 300 MHz RMN CD_3CN : δ = 9,15 (d, ^3J (H,H) = 4,16 Hz, 2H), 9,12 (d, ^3J (H,H) = 6,46 Hz, 2H), 8,69 (m, 4H), 8,56 (d, ^3J (H,H) = 4,74 Hz, 2H), 8,52 (d, ^3J (H,H) = 4,22 Hz, 2H), 8,49 (d, ^3J (H,H) = 4,67 Hz, 2H), 8,31 (t, ^3J (H,H) = 6,59 Hz, 2H), 4,15 (s, 3H), 4,13 (s, 3H). ^{19}F 282 MHz (CD_3CN): δ = -141,01 (m, 2F), -158,21 (t, ^3J (F,F) = 19,4 Hz, 1F), -165,01 (m, 2F). UV-vis (acetonitrilo): λ_{max} , nm ($\epsilon \times 10^{-3}$)

MS (MALDI-TOF) ES^+ (CH_3CN): m/z (%): 648,2 (100) [M^+], 633,2 (85)

20.4 Preparación de complejo de Mn (III) de corrol de 5,10,15-tris(N-metil-o-piridinio) (**3C-Mn**); complejo de Mn (III) de corrol de 10-pentafluorofenil 5,15-bis(N-metil-o-piridinio) (**4C-Mn**)

Los compuestos del título se prepararon calentando una solución en DMF del $3C^{3+}$ o $4C^{2+}$ metilados a reflujo con 15 eq de Mn (OAc)₂·4H₂O. Unos exámenes de UV-vis y TLC pusieron de manifiesto que no había ningún material de partida. La evaporación del disolvente y la separación cuidadosa mediante una columna cromatográfica del residuo (gel de sílice, KNO₃ sat: H₂O: acetonitrilo, 1:1:8 para **3C-Mn** y KCl sat: H₂O:acetonitrilo, 1:1:8) para **4C-Mn**) proporcionó 73% y 85% de rendimiento, respectivamente, en forma de sólidos verdes oscuros.

3C-Mn: R_f (sílice, KNO₃ sat: H₂O:acetonitrilo, 1:1:8) = 0,24, MS (MALDI- TOF) LD⁺ (CH₃CN): *m/z* (%): 626,1 (10) [M⁺], 611,1 (30) [M⁺-CH₃], 596,1 (100) [M⁺- (2xCH₃)], 581,1 (95) [M⁺-(3xCH₃)]; ES⁺: 279,0 (100)[M⁺/3 + (2xCl⁻)].

4C-Mn: R_f (sílice, KNO₃ sat: H₂O:acetonitrilo, 1:1:8) = 0,78, ¹⁹F 282 MHz (CD₃CN): δ = -119,29 (s ancho, 2F), -154,06 (m, 1F), -157,51 (m, 2F). MS (MALDI- TOF) ES⁺ (CH₃CN): *m/z* (%): 350,1 (100) [M⁺]/2.

Ejemplo 21: síntesis de 5,15-bis(4-N-propargil-piridilio)-10-pentafluorofenil-corrolato de manganeso (III) (**E-pr-Mn**, esquema 2)

Se sintetizó corrol que porta sustituyentes de piridina como sigue: Se añadió pentafluorobenzaldehído (50 µl, 0,4 mmol) a 10 ml de una solución de piridil-dipirrometano (178 mg, 0,8 mmol) en ácido propiónico y la mezcla se calentó a reflujo durante 50 minutos. El residuo obtenido después de la evaporación del disolvente se lavó con agua caliente, se neutralizó con hidróxido de amonio (25%) y se lavó nuevamente con agua caliente. El material sólido se disolvió en metanol, se añadió alúmina básica y el disolvente se evaporó. La separación entre corrol y la porfirina análoga se consiguió mediante cromatografía de columna (sílice CH₂Cl₂ seguido de metanol al 0,5%) seguido de separación mediante cromatografía preparativa de capa fina (placa de sílice, CHCl₃/MeOH 50:1) proporcionando corrol puro (18 mg, 8%).

R_f = 0,15 CH₂Cl₂/ acetato de etilo 1:1). UV/Vis (CH₂Cl₂/MeOH (2:1)): λ_{max} (ε10⁻³) = 416 (104,99), 576 (16,14), 610 (9,40), 640 (5,34). MS (MALDI-TOF): *m/z* (%): 619 (100) [M⁺]. ¹H RMN (200 MHz, C₆D₆): δ = 8,93 (s ancho, 4 H), 8,67 (d, J = 4 Hz, 4 H), 8,26 (m, 4 H), 7,90 ppm (br. s, 4 H). ¹⁹F (188 MHz): δ = -138,79 (d, J = 23,5 Hz, 2F), -153,22 (t, J = 21,9 Hz, 1 F), -162,37 ppm (t, J = 22,5 Hz, 1 F).

El correspondiente complejo de manganeso se preparó calentando la solución de corrol en piridina a reflujo con 15 equivalentes de Mn (OAc)₂·4H₂O seguido de separación cromatográfica (sílice partiendo de CH₂Cl₂ y añadiendo gradualmente metanol), proporcionando un rendimiento de 81%. UV/Vis (MeOH): λ_{max} (ε10⁻³) = 368 (16,7). 402 (26,7), 420 (4,8), 458 (18,4), 484 (16,2), 634 (9,4). MS (MALDI-TOF LD⁺): *m/z* (%): 670 (100) [M⁺]. ¹⁹F (C₅D₄N) (188 MHz): δ = -136,58 (s ancho, 2 F), -155,16 (s, 1 F), -161,23 ppm (s, 2 F).

N-alkilación: el complejo de manganeso se disolvió en THF caliente y se añadió bromuro de propargilo en exceso a la solución, que seguidamente se dejó a 50°C hasta una precipitación completa. El material sólido se recogió por centrifugación y se lavó con THF y dietil-éter hasta que el disolvente era incoloro. UV/Vis (methanol): λ_{max} 462, 600, 638; MS (MALDI-TOF LD⁺): *m/z* (%): 711 (10) [M⁺], 671 (80) [M-80]. ¹⁹F (MeOD) (188 MHz): δ = -132,1 (s ancho, 2 F), -144,71 (s, 1 F), -161,70 ppm (s, 2 F). El producto del título se cristalizó mediante difusión de dietil-éter en solución concentrada en metanol, proporcionando un rendimiento de 58%.

Ejemplo 22. Neuroprotección mediante corroles *in vivo* en el modelo MPTT de PD

El modelo de ratón de la enfermedad de Parkinson (PD) usando la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (NPTP) recapitula muchas de las manifestaciones patológicas que se encuentran en la PD humana, que incluyen una generación aumentada de ROS y nitración de residuos de tirosina en proteínas en la sustancia negra (SN) del cerebro medio ventral, una zona que contiene las neuronas DA vulnerables. Empleando este modelo se mostró recientemente que la rasagilina y M-30 (un quelador de hierro que contiene propargilo descrito en el documento WO 2004/041151) son neuroprotectores y tienen también la capacidad de restablecer neuronas dopaminérgicas negras cuando se proporcionan con posterioridad a MPTT (Gal et al., 2005). Basándose en resultados preliminares (véase lo que antecede, Fig. 3-20) y en la lipicidad algo mayor del corrol **5C-Fe** (mayor probabilidad de penetrar la BBB), este fue el primer corrol ensayado. Los ratones son tratados con corrol **5C-Fe** (1,

2, 10 y 20 mg/kg, una vez al día mediante administración oral o intraperitoneal (i.p.) durante 5 días consecutivos y seguido de la combinación con MPTP (24 mg/kg, i.p.) durante 4 días adicionales. La actividad A/B de monoamina-oxidasa (MAO) es valorada en el estriato y el hipocampo, así como la actividad de tirosina hidroxilasa (TH) y los niveles de catecolamina en el estriato, hipotálamo y rafe dorsal. Además, las proteínas asociadas al Parkinsonismo como α -sinucleína y sinfirina-1, y las proteínas reguladoras del hierro, como ferritina, receptor de transferrina y factor indusible de hipoxia (HIF)-1 son verificados para los cambios en la expresión estriatal. Para asociar los posibles efectos neuroprotectores del corrol con acciones antioxidantes, se ensayan parámetros de ROS y RNS que incluyen glutatión reducido (GCH), peroxidación de lípidos y proteína 3-nitrociladas en la zona del cerebro medio ventral del ratón, como se describe (Liang et al., 2007).

10 **Ejemplo 23.** Neurosanación mediante corroles en el modelo de MPTP

Los resultados preliminares han mostrado que los corroles **5C-Fe** y **1C-Fe** poseen una actividad no solamente preventiva sino también neurosanadora potente (indicada por su administración posterior al deterioro) en cultivos celulares (véanse las Figs. 8, 11, 14 y 15). Por lo tanto, el corrol **5C-Fe** es el inicialmente investigado por su efecto potencial neurosanador/neuro-restaurador en el modelo de neurodegeneración de dopamina miroestriatal inducida post-MPTP de PD en ratones. La administración de MPTP (20 mg/kg, i.p.), por día, durante 4 días está seguida de un período de descanso adicional de 4 días (día 8) para permitir la conversión completa de MPTP en su metabolito activo, MPP⁺ (Sagi et al., 2007). En el día 8, el corrol **5C-Fe** (las dosis son según los resultados del paradigma neuroprotector) es administrado (i.p. o por vía oral) durante 14 días. Se determinan los mismos parámetros descritos para los estudios neuroprotectores en el ejemplo 22 también en este caso.

20 **Ejemplo 24.** Efectos moleculares de corroles *in vitro* sobre la apoptosis, señalización celular y procedimientos relacionados de OS

El mecanismo molecular de la acción citoprotectora/citosanadora de los diversos corroles es valorado en las siguientes líneas celulares: Línea celular neuronal dopaminérgica SN derivada de ratón clonal, SN 4741 (modelo de PD), línea celular neuronal motora de ratón, NSC-34 (modelo ALS) y en líneas celulares ISN-1E y RIN-m de insulinooma de rata (modelo de DM). Los marcadores de proteínas asociados a la apoptosis (por ejemplo, las proteínas de la familia Bcl-2, Bax, Bad, Bcl-2; citocromo c; fosfo-H2AX, caspasa-3 y -8 escindida; poli-ADP-ribosa escindida (PARP)), cascadas señalizadoras (por ejemplo, MAPK, PKC, PI3K/AKT) y parámetros de OS (catalasa, GSH, glutatión peroxidasa, niveles de ROS endógenos), se determinan como se describe en las publicaciones anteriores del grupo de M. Youdim (Weinreb et al., 2004; Bar-Am et al., 2005). Específicamente, para las líneas celulares de insulinooma, el efecto de los corroles frente al aloxano, una toxina diabetogénica que destruye selectivamente las células beta que producen insulina en el páncreas, se investiga y se determinan los niveles de insulina celular y secretados. También, se miden los niveles de proteína de interacción con tioredoxina, un factor pro-apoptótico que se han encontrado recientemente que aumenta en células beta sometidas a toxicidad de glucosa (Chen et al., 2006).

35 **Ejemplo 25.** Efecto de corroles sobre la función mitocondrial

Se examinan diversos corroles con respecto a su capacidad para prevenir el colapso de mitocondrias y la consecuente disminución de la actividad proteasomal (debido a un impedimento en el suministro de ATP) a continuación de una exposición a 6-OHDA, una neurotoxina que se conoce que inhibe los complejos mitocondriales I y IV. El potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) Se determina mediante el ensayo JC-1. Brevemente, los corroles son añadidos 30 minutos antes de la exposición a 6-OHDA (35 μ M), durante un período de 4 h. Los cambios en $\Delta\Psi_m$ se determinan por medio del estuche de ensayo de detección del potencial de membrana mitocondrial JC-1 (Biotium, Inc) durante 20 minutos a 37°C. Las imágenes de emisión dual (530 y 590 nm) representan la señal a partir de la fluorescencia de JC-1 monómera (verde) y J-agregada (roja) mediante microscopía confocal. A los elevados potenciales de membrana característicos de mitocondrias activada, se acumula JC-1 suficientemente para agregarse, dando lugar a desplazamientos amplios color naranja (590 nm) en el máximo de emisión. A potenciales inferiores, el colorante existe en forma de un monómero fluorescente verde (530 nm).

Ejemplo 26. Biodistribución y biodisponibilidad de corroles

Los asuntos relativos a la biodistribución, mecanismo de transporte, acumulación en órganos específicos y la

eventual eliminación de los compuestos administrados, están entre las principales preocupaciones en lo que se refiere a la utilización en la vida real de los fármacos potenciales. Esto puede ser abordado por medios diversos y bastante diferentes que incluyen exámenes *in vitro*, *in vivo* y *ex-vivo*. Una forma de predecir la distribución es a través de examen de la unión de los corroles a las proteínas en circulación que pueden actuar como transportadores, de forma análoga al experimento realizado previamente por los inventores con complejos metálicos de corrol 1C (esquema 1), que forma espontáneamente bioconjugados no covalentes estrechamente unidos con HDL (Haber et al., 2007), albumina (Mahammed et al., 2004) y transferrina (Haber and Gross. 2007) (citados en orden creciente de afinidad) así como con proteínas semi-sintéticas (Agadjanian et al., 2006). Los experimentos preliminares pusieron de manifiesto que los complejos metálicos de corrol 2C (como **2C-Mn**) no se unen a albumina, pero todavía lo hacen para transferrina, una de las muy pocas proteínas que puede portar fármacos al cerebro. Una aproximación más directa consiste en la fuerte fluorescencia de los corroles que no son quelados por metales de transición (sin metal como en los corroles 1C y 2C o usando complejos de corrol de Ga/Al como **1C-Ga**). Esta característica se usa para ensayar la entrada de células a través de microscopía confocal (Agadjanian et al., 2006), sin necesidad de unir una etiqueta fluorescente. Además, puede ser usada incluso para fines de formación de imágenes de animales completos, como se muestra en el ejemplo 4 con anterioridad. Puede ser usada también tomografía de emisión de positrones (PET) basada en corroles de cobre como el corrol **1C-Cu**. La semi-vida de ^{64}Cu es 12,7 horas, el cobre puede ser insertado en corroles en minutos a temperatura ambiente y el metal no se desprende del corrol una vez insertado.

La distribución en tejidos de los corroles se determina en diversas zonas del cerebro que incluyen la corteza, hipocampo y tronco encefálico, así como sus niveles en la periferia y plasma a diferentes intervalos de tiempo (1-96 h) por medio de HPLC y quimioluminiscencia. De forma importante, se ha confirmado ya que concentraciones nanomolares de complejo **1C-Fe** pueden ser determinadas en muestras de plasma a través del método de luminol/ H_2O_2 (Motsenbocker et al., 1999).

Ejemplo 27. La capacidad de los corroles para prevenir el desarrollo de diabetes inducida por estreptozotocina (STZ)

Siguiendo los estudios iniciales usando los compuestos para la protección *in vitro* de células productoras de insulina expuestas a peróxido de hidrógeno o SIN-1 (se convierte en PNA a pH fisiológico), los corroles seleccionados son administrados i.p. a ratones (la dosis se determina a partir de los resultados del modelo de mPTP) durante periodos de tiempo diferentes (1, 3 y 6 semanas) antes, durante y una semana después de la administración de la toxina inductora diabetogénica, STZ, que destruye selectivamente las células beta productora de insulina en el páncreas. Se estudiaron los siguientes grupos experimentales.

Inducción de diabetes y verificación de efectos secundarios

Se induce diabetes en ratones Balb/c (Harlan Laboratories, Jerusalem) mediante una única inyección de solución de STC (Sigma, St.Louis, MO) a una dosis de 200 mg/kg de masa corporal o mediante inyecciones de dosis múltiples bajas (40 mg/kg x 5 días). La STZ es inyectada por vía i.p. después de disolverla en tampón cítrico (pH 4,5). La gravedad de la diabetes es estimada mediante verificación de la glucosa en sangre y orina, peso corporal así como mediante el ensayo de tolerancia a la glucosa. Todos los animales tratados con los corroles son ocasionalmente verificados en cuanto a posibles efectos secundarios mediante toma de muestra de sangre para los perfiles bioquímicos y hematológicos. Estos estudios incluyen dos grupos diferentes: ratones con diabetes de STZ de dosis elevado y ratones con diabetes de STZ de múltiples dosis bajas, para examinar los efectos de los corroles en la destrucción directa de células beta tóxicas y sobre la destrucción de células beta de tipo autoinmune, respectivamente.

Ejemplo 28. Utilidad terapéutica potencial de corroles en el modelo de ratones transgénicos dobles ATP/presenilina-1(PS1) de la enfermedad de Alzheimer (AD)

Para abordar la posible función neuroprotectora de los corroles en la patogénesis de la AD, sus efectos se examinan en los mecanismos de regulación/tratamiento de la proteína precursora amiloide (APP) (por ejemplo, APP mRNA/proteína, α/β APP soluble, péptidos A β fibrilares/depósitos de placa) en la corteza cerebral y el hipocampo de ratones doblemente transgénicos AD, APP/PS1. La dosis forzada diaria se proporciona durante cuatro semanas consecutivas antes de la aparición de los síntomas (~ 6 meses de edad). Después de que se completa la administración de los fármacos, se sacrifican 5-6 animales de cada grupo, sus cerebros se extirpan y se almacenan -

60°C para un análisis adicional.

Ejemplo 29. Utilidad terapéutica potencial de corroles en ratones transgénicos ALS

5 Ratones transgénicos SOD hemizigóticos (que portan un número elevado de copias de un SOD-1 de alelo mutante que contiene la sustitución Gly93 → Ala (G93A)) resultan polarizados en una o más de sus extremidades en la fase tardía de la enfermedad, con un intervalo de vida de ~ 130 días. Los corroles seleccionados son administrados mediante alimentación forzosa diaria comenzando en un estado asintomático (día 70) hasta la muerte. Se valoran la función motora, intervalo de vida y análisis histopatológico post-mortem.

Ejemplo 30. Propargil-corroles bifuncionales: inhibición de MAO-A/B y potencial anti-depresivo

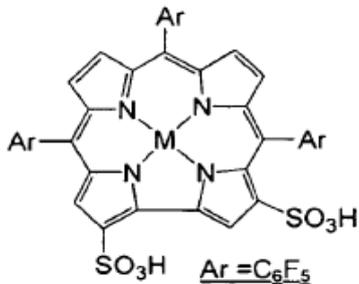
10 Se examinan inicialmente diversos N-propargil-corroles híbridos (esquema 2) *in vitro* en cuanto a sus propiedades como inhibidores de MAO. Los compuestos que exhiben las potencias más elevadas se seleccionan para una investigación adicional. A los ratones se les administran los propargil-corroles (1/10 mg/kg i.p.) y se sacrifican 1 h después para valorar la inhibición *ex-vivo* de la actividad de MAO A/B en diversas zonas del cerebro y órganos sistémicos. Además de la evaluación de la potencia inhibidora de MAO, estos descubrimientos proporcionan una indicación respecto a la permeabilidad en el cerebro de los fármacos examinados. La valoración de los niveles de aminas estriatales (DA, DOPAC, HVA, ME, 5-HT y 5-HIAA) se realiza también para confirmar los descubrimientos del ensayo de inhibición de MAO (Gal et al., 2005). Los propargil-corroles que exhiben la capacidad de inhibir MAO-A en el cerebro son examinados en cuanto a su potencia para mejorar la depresión. Esto se realiza usando el modelo de ensayo de modo forzado, un modelo específico de modo de comportamiento, desesperación y depresión, como se describió previamente (Weinstock et al., 2002). A las ratas se les administra propargil/corroles (5 o 10 mg/kg) y se valoran las características de comportamiento típicas de la depresión.

25 Los inhibidores de MAO no selectivos combinados con la ingestión de tiramina derivada de la dieta pueden conducir a lo que se denomina comúnmente “la reacción del queso” caracterizada por hipertensión con riesgo para la vida, resultante de los niveles de sinapsa-norepinefrina elevados (Youdim and Weinstock, 2004). Debido a este efecto secundario, ha sido limitado el uso de inhibidores de MAO. Como la isoenzima de MAO predominante en el intestino delgado es MAO-A, el desarrollo de nuevos inhibidores de MAO se ha dirigido en consecuencia a la inhibición selectiva de MAO-B. Los propargil-corroles son examinados en cuanto a si producen o no este efecto hipertensor. Esta suposición está basada en los descubrimientos que muestran que el quelador de hierro neuroprotector que contiene propargilo, M-30, inhibe de forma potente MAO-A y -B en el cerebro, pero escasamente en órganos periféricos (Gal et al., 2005). Con esta finalidad, a las ratas se les administran propargil-corroles (5 y 10 mg/kg i.p.) antes de la administración oral de tiramina (Weinstock et al., 2002) y seguidamente se determina la presión sanguínea y el ritmo cardíaco. Se determina también la inhibición de MAO-A y MAO-B en el cerebro, hígado e intestino.

30 Finalmente, basándose en el resultado positivo de los estudios anteriores, los corroles bifuncionales seleccionados son ensayados en cuanto a sus propiedades cito/neuroprotectoras en los diversos modelos de animales.

35

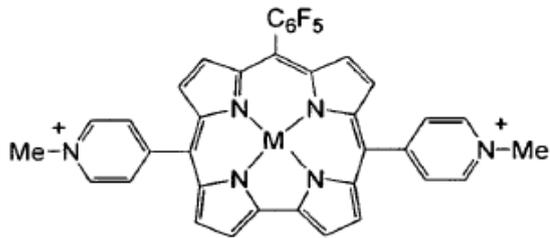
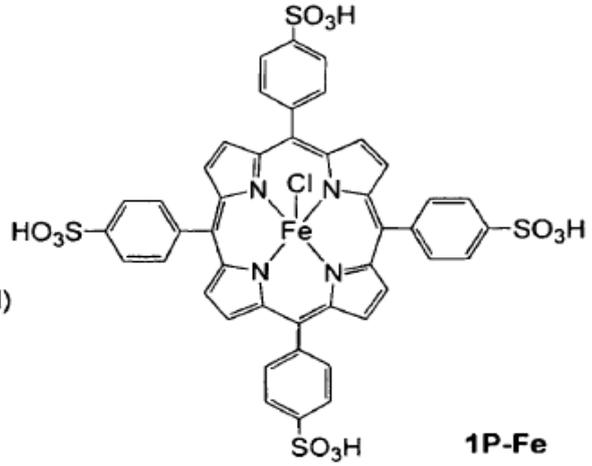
Esquema 1



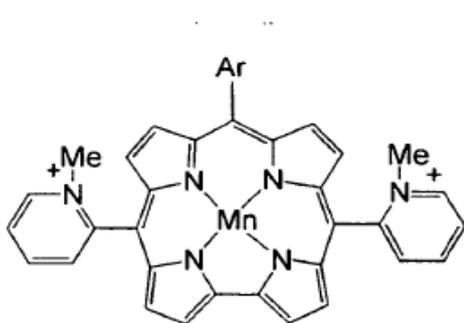
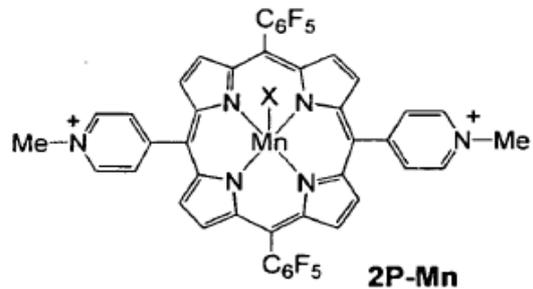
Ar = C₆F₅
 1: M = H₃ (no metal)
1C-Fe: M = Fe
1C-Mn: M = Mn
1C-Cu: M = Cu
1C-Ga: M = Ga

Ar = 4-OCH₃-C₆F₄
 6: M = H₃ (no metal)
6C-Fe: M = Fe

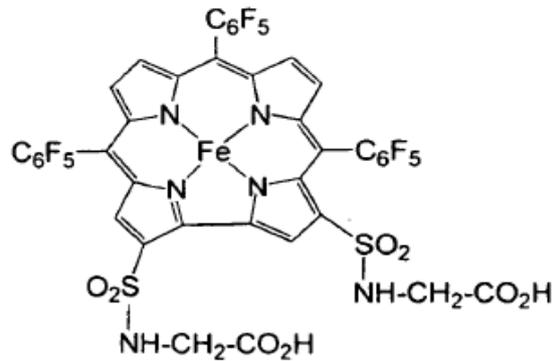
Ar = CF₃
 L: M = metal



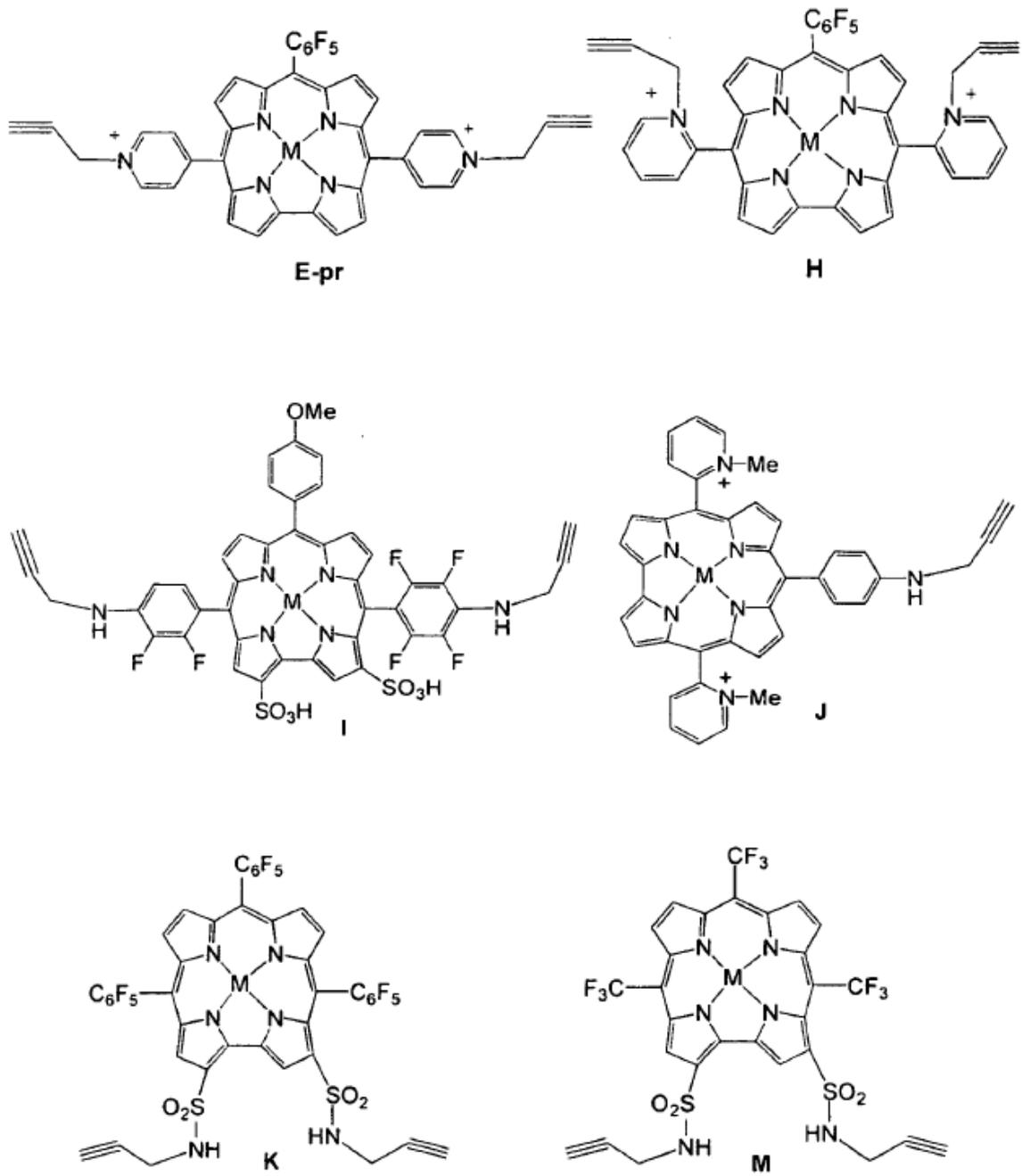
2: M = H₃ (no metal)
2C-Mn: M = Mn



3C-Mn: Ar = o-C₅H₄N⁺-CH₃
4C-Mn: Ar = C₆F₅



Esquema 2



REFERENCIAS

- Agadjanian H, Weaver J J, Mahammed A, Rentsendorj A, Bass S, Kim J, Dmochowski I J, Margalit R, Gray H B, Gross Z and L. K. Medina-Kauwe. (2006). Specific Delivery of Corroles to Cells via Noncovalent Conjugates with Viral Proteins. *Pharmaceutical Res.* 23: 367-377.
- 5 Aviv I, Gross Z. (2007). Corrole-based applications. *Chem Commun (Camb)* (20): 1987-99.
- Avramovich-Tirosh Y, Amit T, Bar-Am O, Zheng H, Fridkin M, Youdim MB (2007). Therapeutic targets and potential of the novel brain-permeable multifunctional iron chelator monoamine oxidase inhibitor drug, M-30, for the treatment of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 100: 490-502.
- 10 Bar-Am O, Weinreb O, Amit T and Youdim M B (2005). Regulation of Bcl-2 family proteins, neurotrophic factors, and APP processing in the neurorescue activity of propargylamine. *FASEB J.* 19: 1899-901.
- Barbe, J.M., Canard, G., Brandes, S. & Guilrad, R (2005). Synthesis and physicochemical characterization of meso-functionalized corroles: Precursors of organic-inorganic hybrid materials. *Eur J Org Chem.* 21: 4601 -4611.
- Barnham KJ, Masters CL & Bush AI (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov.* 3: 205-214
- 15 Batinić-Haberle I, Spasojević I, Stevens RD, Bondurant B, Okado-Matsumoto A, Fridovich I, Vujaskovic Z. and Dewhirst MW (2006). New PEG-ylated Mn(III) porphyrins approaching catalytic activity of SOD enzyme. *Dalton Trans.* 617-624. Chen J, Couto FM, Minn AH, Shalev A (2006). Exenatide inhibits beta-cell apoptosis by decreasing thioredoxin-interacting protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 346: 1067-74.
- 20 Fisher AEO, Hague TA, Clarke CL and Naughton DP. (2004). Catalytic superoxide scavenging by metal complexes of the calcium chelator EGTA and contrast agent EHPG. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323: 163-167. Gal S, Zheng H, Fridkin M, Youdim MB (2005). Novel multifunctional neuroprotective iron chelator-monoamine oxidase inhibitor drugs for neurodegenerative diseases. In vivo selective brain monoamine oxidase inhibition and prevention of MPTP-induced striatal dopamine depletion. *J. Neurochem.* 95: 79-88.
- 25 Gershman, Z., Goldberg, I. & Gross, Z (2007). DNA binding and catalytic properties of positively-charged corroles. *Angew. Chem Int Ed Engl* 46: 4320-4324.
- Goldschmidt R, Goldberg I, Balazs Y and Gross Z (2006). Synthesis of a Corrole with Small and Electron-withdrawing Substituents, 5,15-bis(trifluoromethyl)-10-pentafluorophenylcorrole. *J Porphyrins Phthalocyanines* 10: 76-86.
- 30 Goldstein S., Lind J. & Merenyi G (2005). Chemistry of Peroxynitrites as Compared to Peroxynitrates. *Chem Rev* 105: 2457-2470. the mouse, *Biochem J.* 199: 393-398.
- Gross Z, GaMi N, and Salzman I (1999). The First Direct Synthesis of Corroles from Pyrrole, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 38: 1427-9.
- Gryko DT. (2002) Recent advances in the synthesis of corroles and core-modified corroles *Eur J Org Chem* 11, 1735-1743.
- 35 GrykoD.T. and Piechota K.E.(2002) Straightforward route to trans-A2B-corroles bearing substituents with basic nitrogen atoms. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 6: 81.
- Gryko DT, Fox JP & Goldberg DP (2004). Recent advances in the chemistry of corroles and core-modified corroles. *J. Porph. Phthal.* 8: 1091-1 105.

- Haber A., Agadjanian h, Medina-Kauwe LK, and Zeev Gross (2007). Corroles Bind with High Affinity to both Apo and Holo Transferrin. *J Inorg Biochem*, 102: 446.
- 5 Haber A, Mahammed A, Fuhrman B, Volkova N, Coleman R, Hayek T, Aviram M and Zeev Gross (2007). Amphiphilic corrole metal complexes as multifunctional agents for attenuation of atherosclerosis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47: 7896.
- Han J, Cheng F C, Yang Z, Dryhurst G (1999). Inhibitors of mitochondrial respiration, iron (II), and hydroxyl radical evoke release and extracellular hydrolysis of glutathione in rat striatum and substantia nigra: potential implications to Parkinson's disease. *J Neurochem.* 73(4): 1683-95. Liang, L.P., Huang, J., Fulton, R., Day, B.J. & Patel, M (2007). An orally active catalytic metalloporphyrin protects against l-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity in vivo. *J. Neurosci.* 27, 4326-4333.
- 10 Mahammed A, Goldberg I & Gross, Z (2001). Highly selective chloro-sulfonation of tris(pentafluorophenyl)corrole as a synthetic tool for the preparation of amphiphilic corroles and metal complexes of chiral planarity, *Org. Lett.* 3: 3443-3446.
- Mahammed A, Gray H B, Weaver J J, Sorasaene K, and Gross Z. (2004). Amphiphilic Corroles Bind Tightly to Human Serum Albumin" *Bioconj Chem.* 15: 738-746. Mahammed, A. and Gross, Z. (2005) Albumin-conjugated corrole metal complexes: extremely simple yet very efficient biomimetic oxidation systems. *J Am Chem Soc* 127, 2883-7.
- 15 Mahammed, A. & Gross, Z (2006). Iron and manganese corroles are potent catalysts for the decomposition of peroxyxynitrite. *Angew. Chem In. Ed Engl* 45: 6544-6547.
- Mandel S, Weinreb O, Youdim M B H (2003). Using cDNA microarray to assess Parkinson's disease models and the effects of neuroprotective drugs. *Trends Pharmacol Sci.*; 24(4): 184-91.
- 20 Mandel S, Amit T, Kalfon L, Youdim MB (2007a). Applying transcriptomic and proteomic knowledge to Parkinson's disease drug discovery. *Expert opinion drug discov.* 2: 1225-40.
- Mandel S, Amit T, Bar-Am O, Youdim MB (2007b). Iron dysregulation in Alzheimer's disease: multimodal brain permeable iron chelating drugs, possessing neuroprotective-neurorescue and amyloid precursor protein-processing regulatory activities as therapeutic agents. *Prog Neurobiol.* 82: 348-60. Mohiuddin I, Chai H, Lin PH, Lumsden AB, Yao QZ, Chen CY (2006). Nitrotyrosine and chlorotyrosine: Clinical significance and biological functions in the vascular system *J Surg Res.* 133: 143-149.
- 25 Molsenbocker M, Ichimori Y and Kondo K (1999). Metal Porphyrin Chemiluminescence Reaction and Application to Immunoassay. *Anal. Chem.* 65: 397-402.
- 30 Olmos A, Giner RM, Manez S (2007). Drugs modulating the biological effects of peroxyxynitrite and related nitrogen species. *Med. Res. Rev.* 27: 1-64.
- Peng J., Peng L., Stevenson F. F., Doctrow S. R., and Andersen J. K (2007). Iron and Paraquat as Synergistic Environmental Risk Factors in Sporadic Parkinson's Disease Accelerate Age-Related Neurodegeneration. *J. Neurosc.* 27: 6914-6922.
- 35 Rha SY, Izbicka E, Lawrence R, Davidson K, Sun D, Moyer MP, Roodman GD, Hurley L, Von Hoff D. (2000). Effect of telomere and telomerase interactive agents on human tumor and normal cell lines. *Clin. Cancer. Res.* 6: 987-993.
- Rohrer L, Hersberger M, von Eckardstein A (2004). High density lipoproteins in the intersection of diabetes mellitus, inflammation and cardiovascular disease. *Curr. Opin Lipidology* 15 (3): 269-278.
- 40 Sagi, Y. Mandel, S. Amit, T. and Youdim (2007). Activation of tyrosine kinase receptor signaling pathway by rasagiline facilitates neurorescue and restoration of nigrostriatal dopamine neurons in post-MPTP-induced parkinsonism. *Neurobiol Dis.* 25: 35-44.

- Saltsman I, Goldberg I & Gross Z (2002) One-step conversions of a simple corrole into chiral and amphiphilic derivatives", *Tetrahedron Lett.* 44, 5669-5673. Saltsman I, Mahammed A, Goldberg I, Tkachenko E, Botoshansky M, Gross
- 5 Z (2003). Selective substitution of corroles: Nitration, hydroformylation, and chlorosulfonation. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 7411-7420.
- Saltsman I, Botoshansky M. and Gross Z. (2008) Facile synthesis of ortho-pyridyl-substituted corroles and molecular structures of analogous porphyrins. *Tet. Lett.* 49: 4163 Schlieve, C.R., Lieven, C.J. & Levin, L.A (2006). Biochemical activity of reactive oxygen species scavengers do not predict retinal ganglion cell survival. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47: 3878-3886.
- 10 Shah S. Iqbal M, Karam J, Salifu M, McFarlane SI (2007). Oxidative stress, glucose metabolism, and prevention of type 2 diabetes: pathophysiological insights. *Antioxid. Redox Signal.* 9: 91 1-929 and references therein.
- Szabo C, Ischiropoulos H & Radi R (2007). Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6: 662-680. Van der Schyf, C. J., Geldenhuys, W. J. and Youdim, M. B. (2006) Multifunctional drugs with different CNS targets for neuropsychiatric disorders. *J. Neurochem.* 99, 1033-48.
- 15 Weinreb O, Bar-Am O, Amit T, Chillag-Talmor O and Youdim MBH. (2004) Neuroprotection via pro-survival protein kinase C isoforms associated with Bcl-2 family members. *FASEB J.* 18: 1471-3.
- Weinstock M, Gorodetsky E, Wang RH, Gross A, Weinreb O, Youdim MB (2002) Limited potentiation of blood pressure response to oral tyramine by brain-selective monoamine oxidase A-B inhibitor, TV-3326 in conscious rabbits. *Neuropharmacology* 43(6): 999-1005. Wu AS, Kiaei M, Aguirre N, Crow JP, Calingasan NY, Browne SE, Beal MF
- 20 (2003). Iron porphyrin treatment extends survival in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 85 : 142-150.
- Yogev-Falach M, Amit T, Bar-AM O, Youdim M B H (2003). The importance of propargylamine moiety in the anti-Parkinson drug rasagiline and its derivatives for MAPK-dependent amyloid precursor protein processing. *FASEB J.* 17: (15): 2325-7.
- 25 Youdim M B H, Grunblatt E, Mandel S (1999). The pivotal role of iron in NF-kappa B activation and nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration. Prospects for neuroprotection in Parkinson's disease with iron chelators. *Ann N Y Acad Sci.*; 890: 7-25. Youdim M B (2003). Rasagiline: an anti-Parkinson drug with neuroprotective activity. *Expert Rev Neurotherapeutics.*; 3: (6): 737-749.
- 30 Youdim MB, Weinstock M (2004). Therapeutic applications of selective and non-selective inhibitors of monoamine oxidase A and B that do not cause significant tyramine potentiation. *Neurotoxicology* 25, 243-50.
- Youdim MB, Buccafusco JJ (2005). Multi-functional drugs for various CNS targets in the treatment of neurodegenerative disorders. *Trends Pharmacol. Sci.*; 26: 27-35.

REIVINDICACIONES

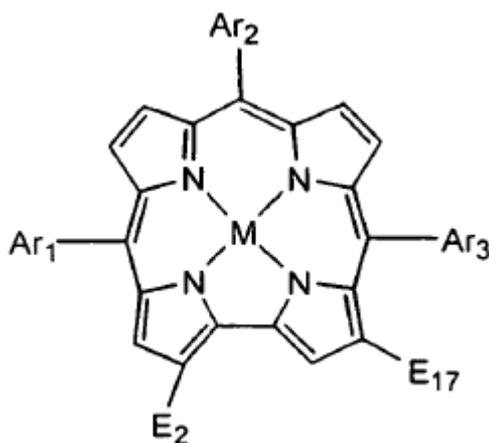
1. Un complejo de metal de transición de un corrol anfifílico, un isómero óptico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para ser usado en neuroprotección y neurosanación.

5 2. El complejo según la reivindicación 1, para el tratamiento de diabetes o una enfermedad, trastorno o estado neurodegenerativo.

3. El complejo según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho corrol anfifílico es un 5,10,15-tris-aril- o 5,10,15-tris-CF₃-corrol.

4. El complejo según la reivindicación 3, en que dicho complejo de metal de transición del corrol anfifílico tiene la fórmula I:

10



en la cual:

Ar₁, Ar₂ y Ar₃, iguales o diferentes, se seleccionan cada uno entre CF₃, carboarilo, heteroarilo o carboarilo-heteroarilo mixto;

15 M es un metal de transición seleccionado entre Mn, Fe, Ru, Co, V, Cr o Cu; y

E₂ y E₁₇, iguales o diferentes, son cada uno H, SO₃H, SO₂N-R₁R₂, CO₂H, CO₂R o CON-R₁R₂; R es alquilo C₁-C₈ o arilo; y R₁ y R₂, iguales o diferentes son cada uno H, alquilo C₁-C₈ opcionalmente sustituido con -COOH, alquinilo C₂-C₈, arilo C₆-C₁₂ o junto con el átomo de N al que están unidos forman un anillo de 5-6 miembros saturado que contienen opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado entre O, S y N.

20 5. El complejo según la reivindicación 4, en el que el carboarilo por sí mismo o como parte del radical mixto carboarilo-heteroarilo, es un radical aromático C₆-C₁₂ monocíclico o bicíclico como fenilo, bifenilo o naftilo opcionalmente mono- o poli-sustituido con uno o más átomos de halógenos o con alquilo C₁-C₈, preferentemente C₁-C₄, o alcoxi, nitro, hidroxilo, SO₃H, -NR₁R₂, -N⁺R₁R₂R₃, o -N-R₁-NH₂, en que R₁, R₂ y R₃, iguales o diferentes son cada uno H, alquilo C₁-C₈, alquinilo C₂-C₈, preferentemente C₃, arilo C₆-C₁₂, aril C₆-C₁₂-alquilo C₁-C₈ o R₁ y R₂ junto con el átomo de N al que están unidos forman un anillo de 5-6 miembros saturado que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado entre O, S y N; dicho heteroarilo por sí mismo o como parte del radical mixto carboarilo-heteroarilo, es un anillo aromático de 5-6 miembros que contiene 1-3 heteroátomos seleccionados entre O, S y N como pirrolilo, flurilo, tienilo, imidazoilo, pirazolilo, oxazolilo, tiazolilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, 1,3,4-triazinilo o 1,2,3-triazinilo, opcionalmente sustituido como se definió anteriormente para el carboarilo, y cuando el

25

- heteroarilo tiene un átomo de N en el anillo, puede estar sustituido en el átomo de N, preferentemente con un grupo alquilo o alquinilo, preferentemente propargilo, y dicho carboarilo-heteroarilo mixto es un radical derivado de un radical carboarilo y un heteroarilo condensado uno a otro como benzofurilo, isobenzofurilo, indolilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, quinolino o isoquinolino, o están covalentemente unidos uno a otro como piridilio-fenilo, opcionalmente sustituido como se definió anteriormente en los anillos carbocíclico, heterocíclico o en ambos.
6. El complejo según la reivindicación 5, en el carboarilo es un radical fenilo monosustituido con propargilamino o metoxi, preferentemente en la posición 4, o está polisustituido con átomos de halógenos, más preferentemente átomos de cloro o flúor, sulfuro, propargilamino, alcoxi, preferentemente metoxi, aminoalquilamino y trialkilamonio y el heteroarilo es piridino sustituido en el átomo de N con alquilo C₁-C₄, preferentemente metilo o propargilo.
7. El complejo según la reivindicación 6, en el que el carboarilo es 2,6-diclorofenilo, 2,6-difluorofenilo, pentafluorofenilo, 4-metoxi-2,3,5,6-tetrafluorofenilo, 4-sulfofenilo, 4-metoxifenilo, 4-N-propargilamino-2,3,5,6-tetrafluorofenilo o 4-N-propargilamino-fenilo; el heteroarilo es 4-(N-metil)piridilio, 2-(N-metil)piridilio, 4-(N-propargil)piridilio o 2-(N-propargil)-piridilio y el carboarilo-heteroarilo es 4-(piridil)-2,3,5,6-tetrafluorofenilo, 4-(N-metil-piridilio)-2,3,5,6-tetrafluorofenilo, 4-(N-propargil-piridilio)-2,3,5,6-tetrafluorofenilo o 2-(N-propargil-piridilio)-2,3,5,6-tetrafluorofenilo.
8. El complejo según la reivindicación 7, en el cual:
- (i) Ar₁, Ar₂ y Ar₃ son iguales y son CF₃, pentafluorofenilo, 4-metoxi-2,3,5,6-tetrafluorofenilo, 4-sulfo-fenilo, 4-(N-metil)-piridilio, 2-(N-metil)-piridilio, 4-(N-propargil)-piridilio o 2-(N-propargil)-piridilio;
 - (ii) Ar₁ y Ar₃ son cada uno 4-(N-metil)-piridilio y Ar₂ es pentafluorofenilo; o Ar₁ y Ar₃ son cada uno 4-N-propargilamino-2,3,5,6-tetrafluorofenilo y Ar₂ es 4-metoxifenilo; o Ar₁ y Ar₃ son cada uno 4-(N-propargil)-piridilio y Ar₂ es pentafluorofenilo; o Ar₁ y Ar₃ son cada uno 2-(N-propargil)-piridilio y Ar₂ es pentafluorofenilo; o Ar₁ y Ar₃ son cada uno 2-(N-metil)-piridilio y Ar₂ es 4-N-propargilaminofenilo; o
 - (iii) E₂ y E₁₇ son iguales y son cada uno H, SO₃H, SO₂NH-propargilo o SO₂NH-CH₂-COOH.
9. El complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en que el metal M es Fe o Mn.
10. El complejo según la reivindicación 9, en el que dicho complejo de metal de corrol se selecciona entre:
- (i) los corroles en los que E₂ y E₁₇ son ambos SO₃H, Ar₁, Ar₂ y Ar₃ son cada uno pentafluorofenilo y M es Fe, denominado en la presente memoria descriptiva corrol **1C-Fe**, Mn, denominado en la presente memoria descriptiva corrol **1C-Mn** o Cu, denominado en la presente memoria descriptiva corrol **1C-Cu**; o Ar₁, Ar₂ y Ar₃ son cada uno CF₃ y M es Fe o Mn;
 - (ii) el corrol en el que E₂ y E₁₇ son ambos SO₃H, Ar₁, Ar₂ y Ar₃ son cada uno 4-metoxi-2,3,5,6-tetrafluorofenilo y M es Fe, denominado en la presente memoria descriptiva corrol **6C-Fe**;
 - (iii) el corrol en el que E₂ y E₁₇ son ambos SO₂NH-CH₂-COOH, Ar₁, Ar₂ y Ar₃ son cada uno pentafluorofenilo y M es Fe, denominado en la presente memoria descriptiva corrol **5C-Fe**;
 - (iv) el corrol en el que E₂ y E₁₇ son ambos H, Ar₁ y Ar₃ son cada uno 4-(N-metil)-piridilio, Ar₂ es pentafluorofenilo y M es Mn, denominado en la presente memoria descriptiva corrol **2C-Mn**;
 - (v) el corrol en el que E₂ y E₁₇ son ambos H, Ar₁, Ar₂ y Ar₃ son cada uno 2-(N-metil)-piridilio y M es Mn, denominado en la presente memoria descriptiva corrol **3C-Mn**;
 - (vi) el corrol en el que E₂ y E₁₇ son ambos H, Ar₁ y Ar₃ son cada uno 2-(N-metil)-piridilio, Ar₂ es pentafluorofenilo y M es Mn, denominado en la presente memoria descriptiva corrol **4C-Mn**;
 - (vii) los corroles en los que E₂ y E₁₇ son ambos SO₃H, Ar₁, Ar₂ y Ar₃ son cada uno CF₃ y M es Mn o Fe, denominado en la presente memoria descriptiva corrol M-Mn o H-Fe, respectivamente;

- (viii) los corroles en los que E_2 y E_{17} son ambos H, Ar_1 y Ar_3 son cada uno 4-(N-propargil)-piridilio, Ar_2 es pentafluorofenilo y M es Mn o Fe, denominados en la presente memoria descriptiva corrol **E-pr-Mn** o **E-pr-Fe**, respectivamente;
- 5 (ix) el corrol en el que E_2 y E_{17} son ambos H, Ar_1 y Ar_3 son cada uno 2-(N-propargil)-piridilio, Ar_2 es pentafluorofenilo y M es Mn o Fe, denominado en la presente memoria descriptiva corrol H-Mn o H-Fe, respectivamente;
- (x) los corroles en los que E_2 y E_{17} son ambos SO_3H , Ar_1 y Ar_3 son cada uno 4-N-propargilamino-2,3,5,6-tetrafluorofenilo y Ar_2 es 4-metoxifenilo y M es Mn o Fe, denominados en la presente memoria descriptiva corrol I-Mn o I-Fe, respectivamente;
- 10 (xi) el corrol en el que E_2 y E_{17} son ambos H, Ar_1 y Ar_3 son cada uno 2-(N-metil)-piridilio, Ar_2 es 4-propargilamino-fenilo y M es Mn o Fe, denominado en la presente memoria descriptiva corrol J-Mn o J-Fe, respectivamente;
- 15 (xii) los corroles en los que E_2 y E_{17} son ambos $-SO_2-NH$ -propargilo, Ar_1 , Ar_2 y Ar_3 son cada uno pentafluorofenilo y M es Mn o Fe, denominados en la presente memoria descriptiva corrol K-Mn o K-Fe, respectivamente; y
- (xiii) los corroles en los que E_2 y E_{17} son ambos $-SO_2-NH$ -propargilo, Ar_1 , Ar_2 y Ar_3 son cada uno CF_3 y M es Mn o Fe, denominados en la presente memoria descriptiva corrol M-Mn o M-Fe, respectivamente.
11. Una composición farmacéutica para ser usada en neuroprotección y neurosanación, particularmente para el tratamiento de diabetes y enfermedades, trastornos o estados neurodegenerativos, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un complejo metálico de un corrol anfifílico, un isómero óptico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, preferentemente de fórmula I mostrada en la reivindicación 4.
- 20 12. Un corrol que contiene propargilo, que porta uno o más radicales sustituidos con un grupo propargilamino o uno o más radicales heteroarilos que contienen nitrógenos sustituidos con propargilo en el átomo de N del anillo.
- 25 13. El corrol que contiene propargilo según la reivindicación 12, que es un complejo de metal de transición de un corrol anfifílico de fórmula I como se define en la reivindicación 4, en el que (i) al menos uno de Ar_1 , Ar_2 y Ar_3 es un radical carboarilo sustituido con un grupo $-NR_1R_2$, en el que R_1 es H y R_2 es propargilo, o un radical N-heteroarilo sustituido en el átomo de N del anillo con propargilo; o (ii) al menos uno de E_2 y E_{17} es $-CONR_1R_2$ o $-SO_2N-R_1R_2$, en que R_1 es H y R_2 es propargilo.
- 30 14. El corrol que contiene propargilo según la reivindicación 13, en el que E_2 y E_{17} son cada uno $SO_2N-R_1R_2$, en que R_1 es H y R_2 es propargilo, o en la posición 5, 10 y/o 15, Ar_1 , Ar_2 y/o Ar_3 son un radical fenilo sustituido únicamente con un grupo propargilamino, preferentemente en la posición 4, o con un grupo propargilamino y otros sustituyentes como halógeno, preferentemente flúor o Ar_1 , Ar_2 y/o Ar_3 son un radical piridilio sustituido con propargilo en el átomo de N del anillo.
- 35 15. El corrol que contiene propargilo según la reivindicación 14, en que los grupos que contienen propargilo se seleccionan entre 4-(N-propargil)-piridilio, 2-(N-propargil)-piridilio, 4-N-propargilaminofenilo y 4-N-propargilamino-2,3,5,6-tetrafluorofenilo en las posiciones 5,10 y/o 15 del corrol o $-SO_2-NH$ -propargilo en las posiciones 2 y 17 del corrol y el metal M es Fe o Mn.
16. El corrol que contiene propargilo según la reivindicación 15, seleccionado entre:
- 40 (a) los corroles en los que E_2 y E_{17} son ambos H, Ar_1 y Ar_3 son cada uno 4-(N-propargil)-piridilio, Ar_2 es pentafluorofenilo y M es Mn o Fe, corrol denominado en la presente memoria descriptiva **E-pr-Mn** o **E-pr-Fe**, respectivamente;
- (b) el corrol en el que E_2 y E_{17} son ambos H, Ar_1 y Ar_3 son cada uno 2-(N-propargil)piridilio, Ar_2 es pentafluorofenilo y M es Mn o Fe, indicado en la presente memoria descriptiva corrol H-Mn o H-Fe,

respectivamente;

(c) los corroles en los que E_2 y E_{17} son ambos SO_3H , Ar_1 y Ar_3 son cada uno 4-N-propargilamino-2,3,5,6-tetrafluorofenilo y Ar_2 es 4-metoxifenilo y M es Mn o Fe, denominados en la presente memoria descriptiva corrol I-Mn o I-Fe, respectivamente.

5 (d) el corrol en el que E_2 y E_{17} son ambos H, Ar_1 y Ar_3 son cada uno 2-(N-metil)piridilio, Ar_2 es 4-propargilamino-fenilo y M es Mn o Fe, indicados en la presente memoria descriptiva corrol J-Mn o J-Fe, respectivamente;

10 (e) los corroles en los que E_2 y E_{17} son ambos $-\text{SO}_2\text{-NH-propargilo}$, Ar_1 , Ar_2 y Ar_3 son cada uno pentafluorofenilo y M es Mn o Fe, indicados en la presente memoria descriptiva corrol K-Mn o K-Fe, respectivamente; y

(f) los corroles en los que E_2 y E_{17} son ambos $-\text{SO}_2\text{-NH-propargilo}$, Ar_1 , Ar_2 y Ar_3 son cada uno CF_3 y M es Mn o Fe, indicados en la presente memoria descriptiva corrol M-Mn o M-Fe, respectivamente.

15 17. Una composición farmacéutica, que comprende un corrol que contiene propargilo según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, una sal farmacéuticamente aceptable o un isómero óptico del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

18. Los complejos metálicos de corroles anfífilos de la fórmula I como se definió en la reivindicación 4, en los cuales:

(i) E_2 y E_{17} son ambos H, Ar_1 , Ar_2 y Ar_3 son cada uno 2-(N-metil)piridilio y M es Mn, indicados en la presente memoria descriptiva corrol **3C-Mn**;

20 (ii) E_2 y E_{17} son ambos H, Ar_1 y Ar_3 son cada uno 2-(N-metil)piridilio, Ar_2 es pentafluorofenilo y M es Mn, denominado en la presente memoria descriptiva corrol **4C-Mn**;

(iii) E_2 y E_{17} son ambos $\text{SO}_2\text{NH-CH}_2\text{-COOH}$, Ar_1 , Ar_2 y Ar_3 son cada uno pentafluorofenilo y M es Fe, indicado en la presente memoria descriptiva corrol 5C-Fe; o

25 (iv) E_2 y E_{17} son ambos SO_3H , Ar_1 , Ar_2 y Ar_3 son cada uno 4-metoxi-2,3,5,6-tetrafluorofenilo y M es Fe indicado en la presente memoria descriptiva corrol **6C-Fe**.

Fig. 1

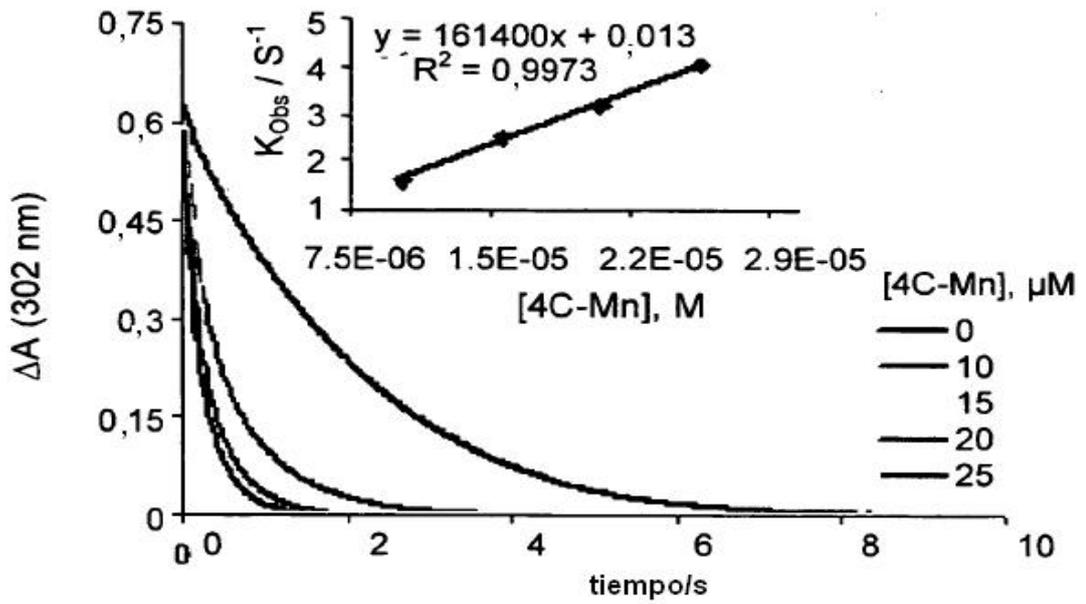


Fig. 2A



Fig. 2B



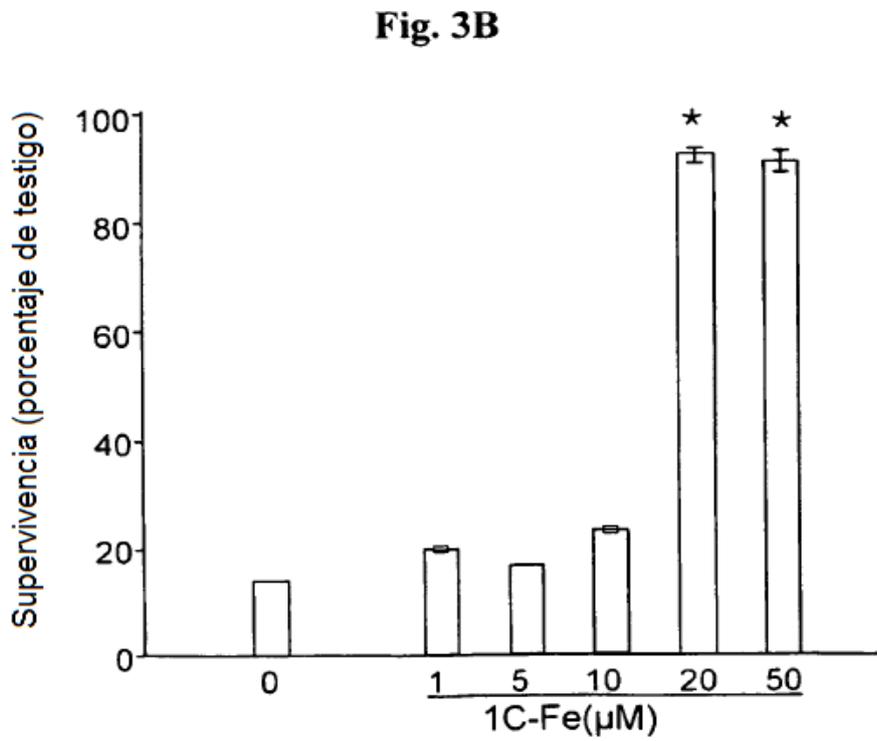
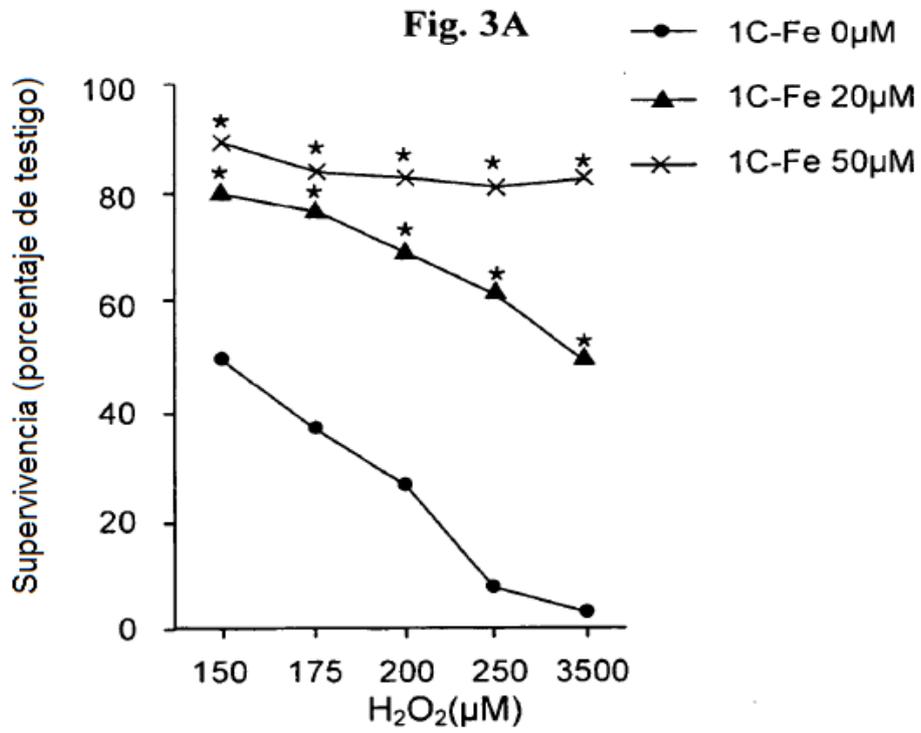


Fig. 3C

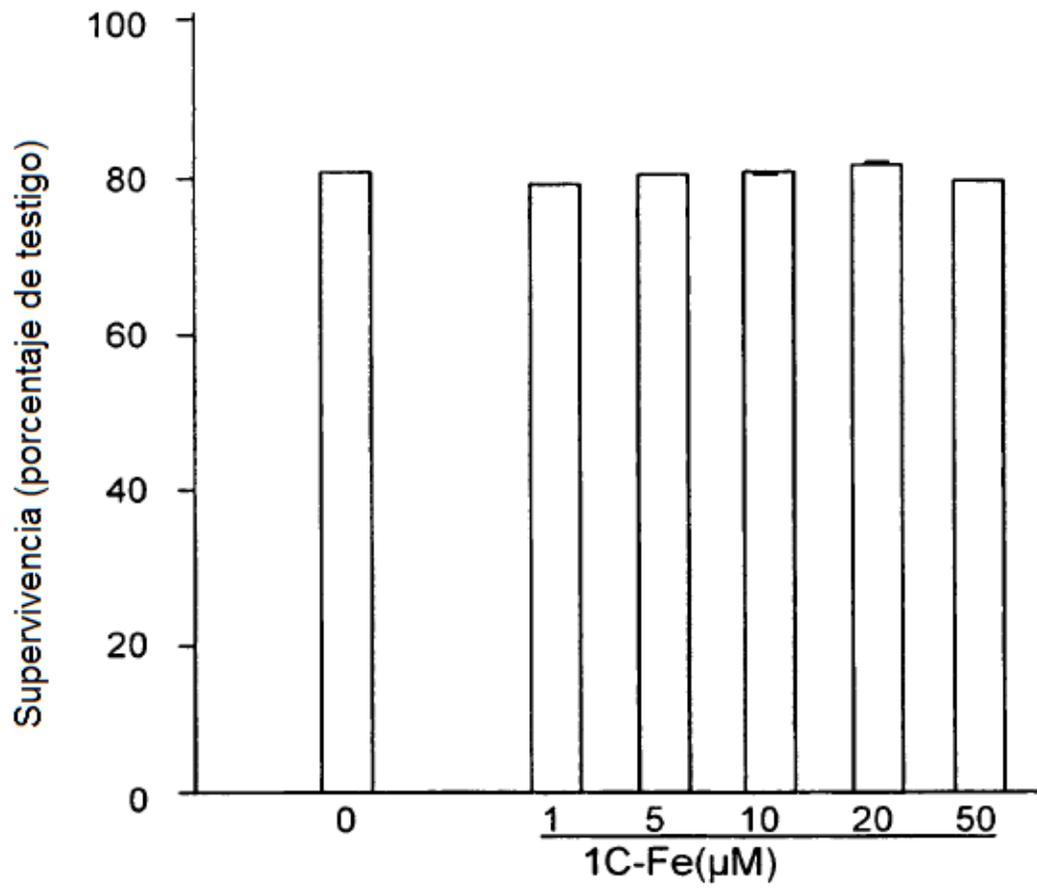


Fig. 4

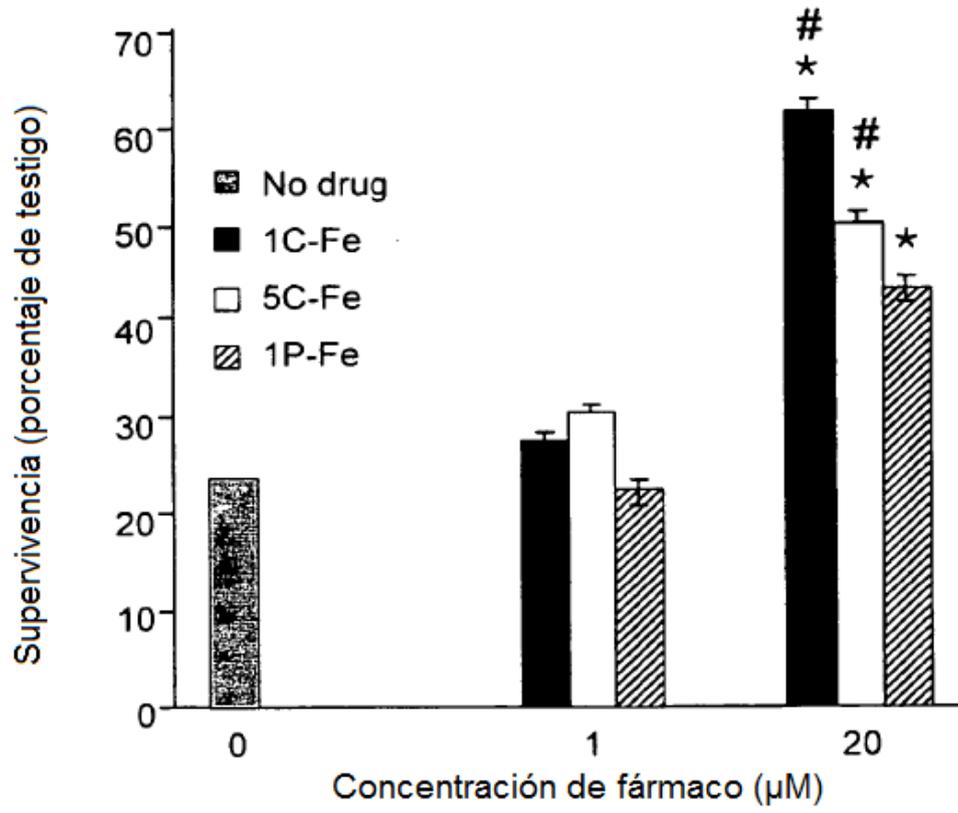


Fig. 5A

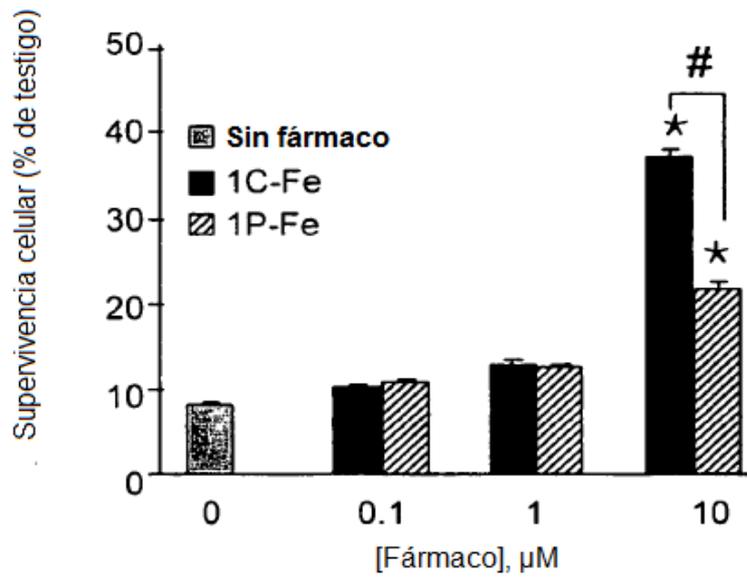


Fig. 5B

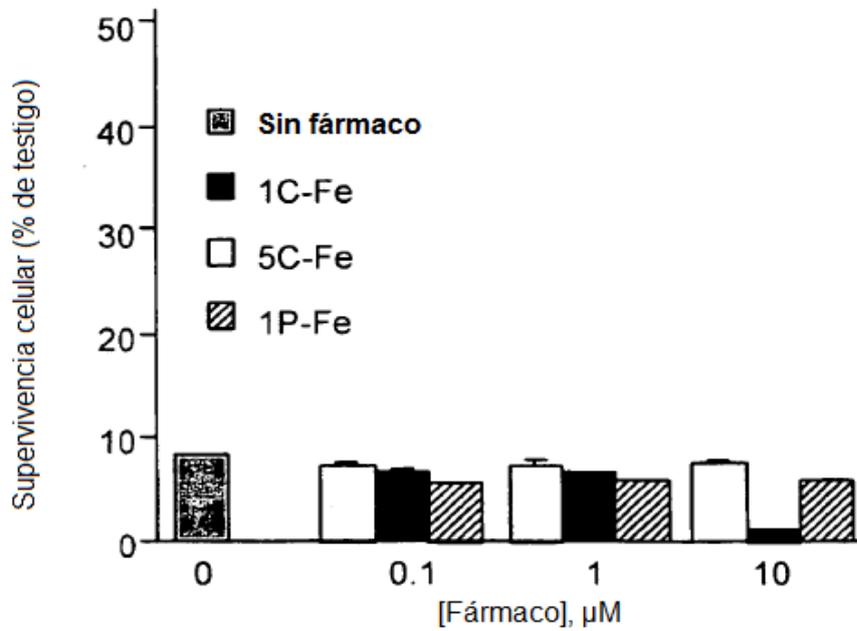


Fig. 6A

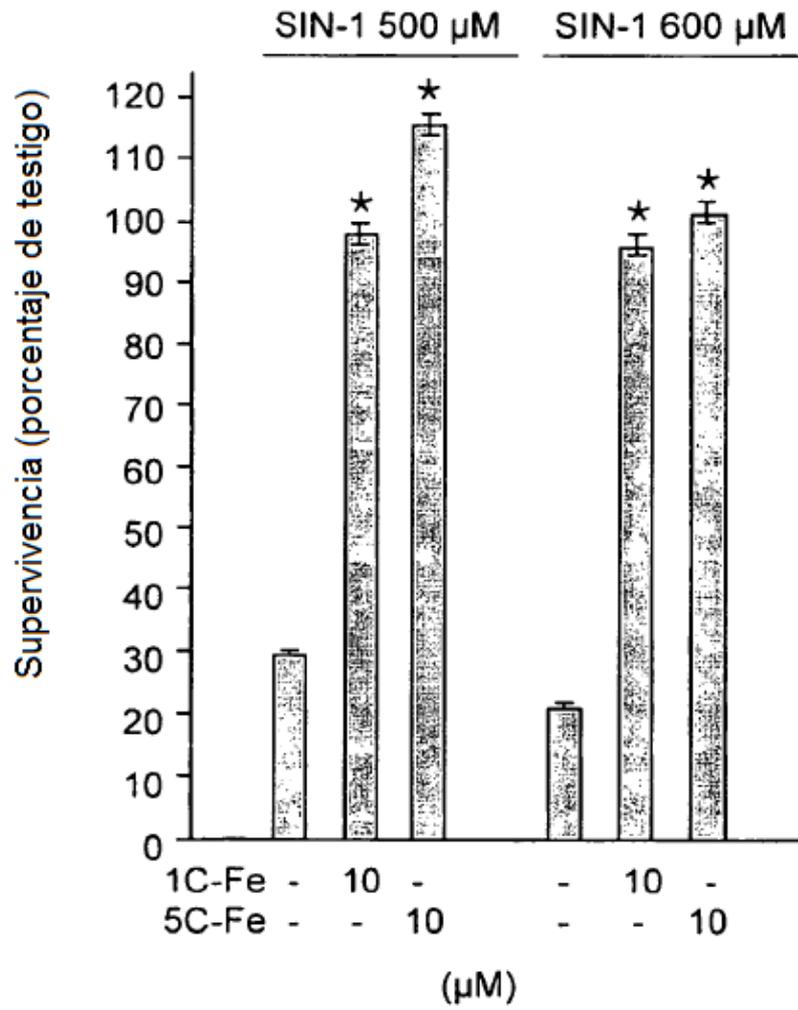


Fig. 6B

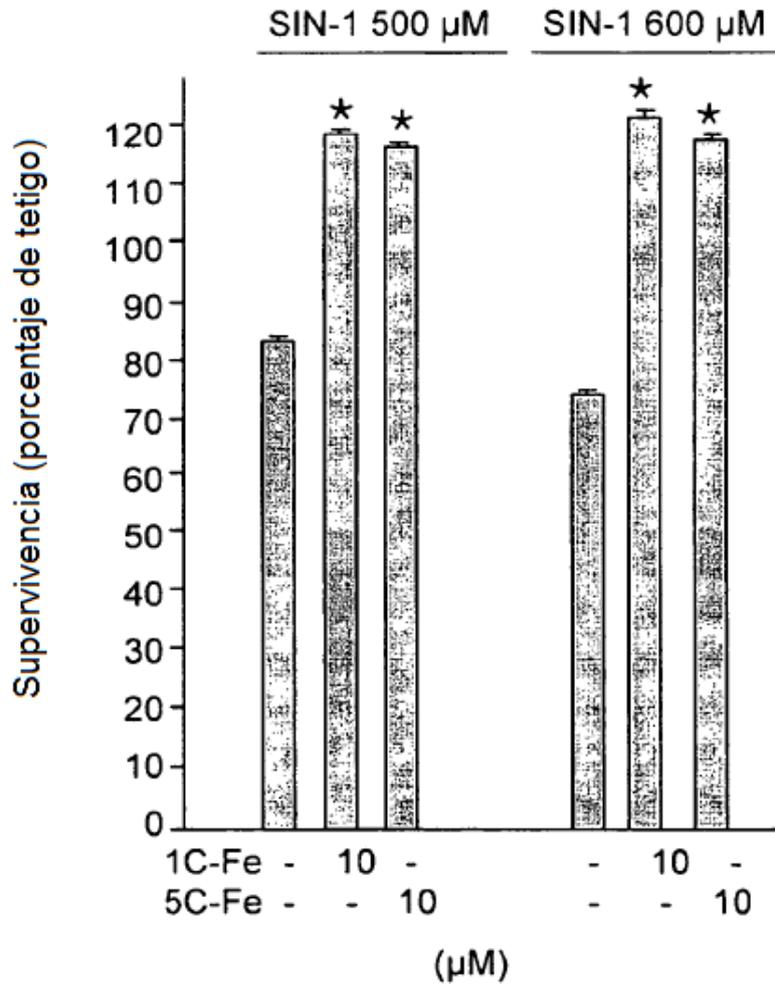


Fig. 7A

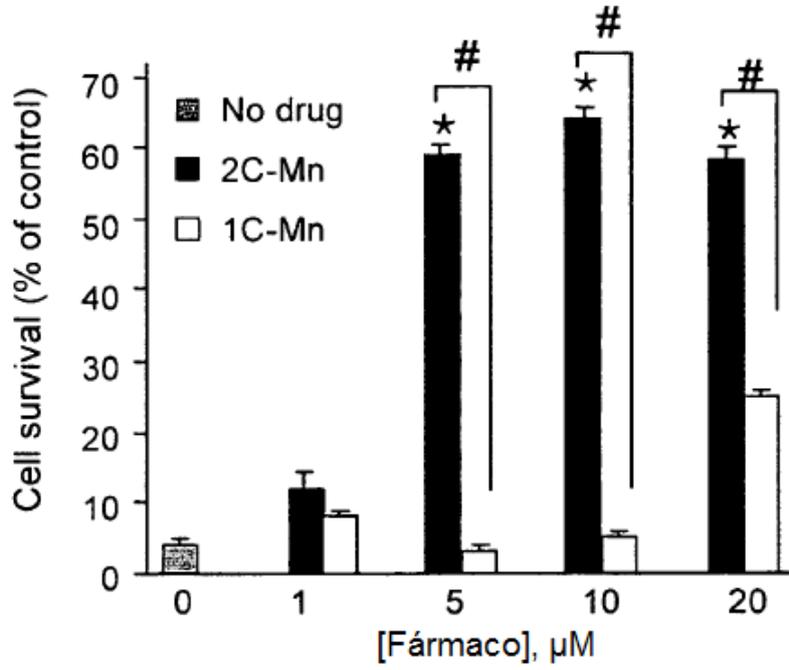


Fig. 7B

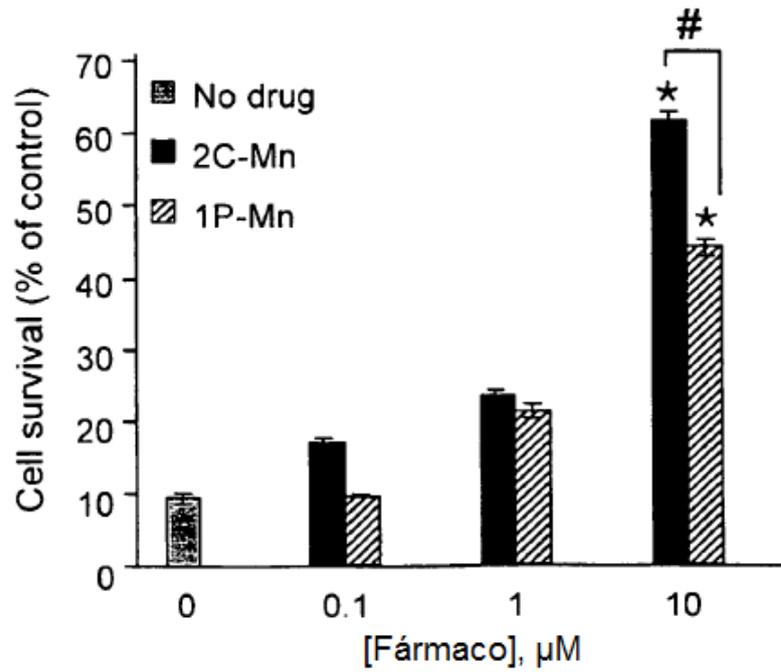


Fig. 7C

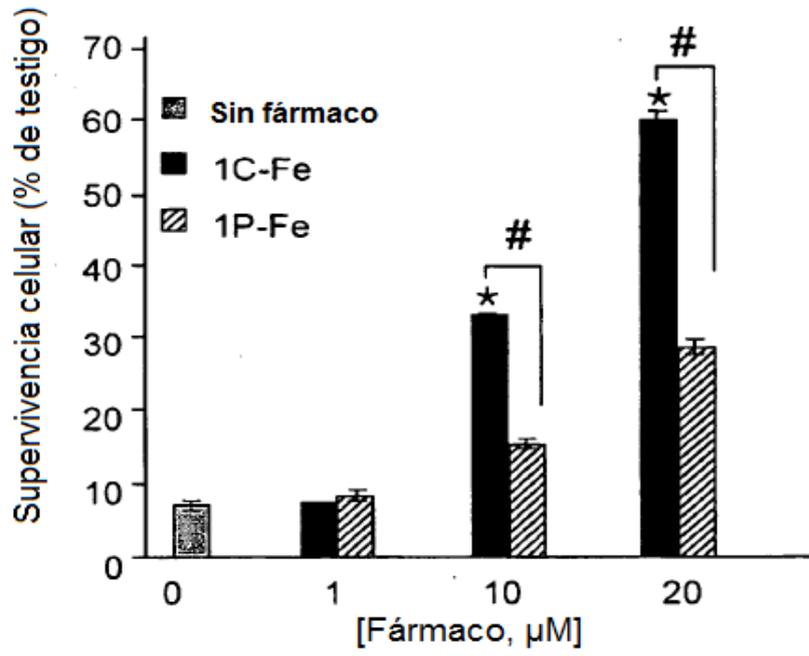


Fig. 8A

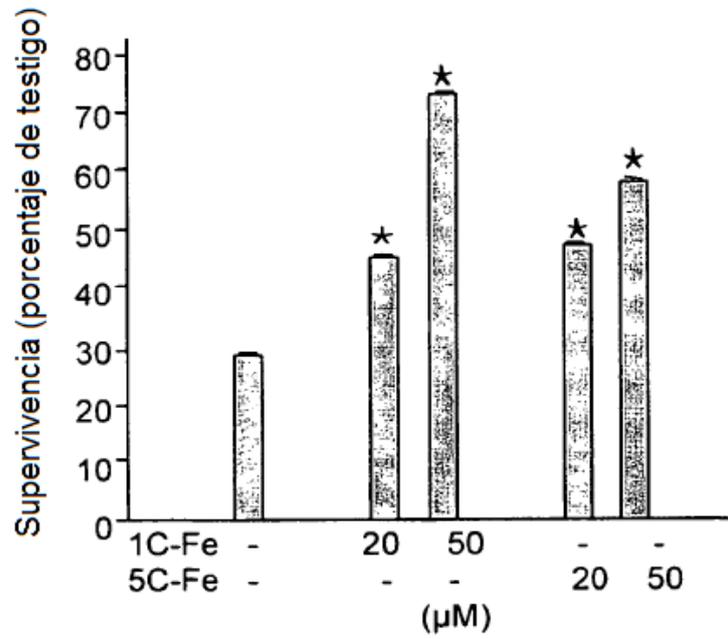
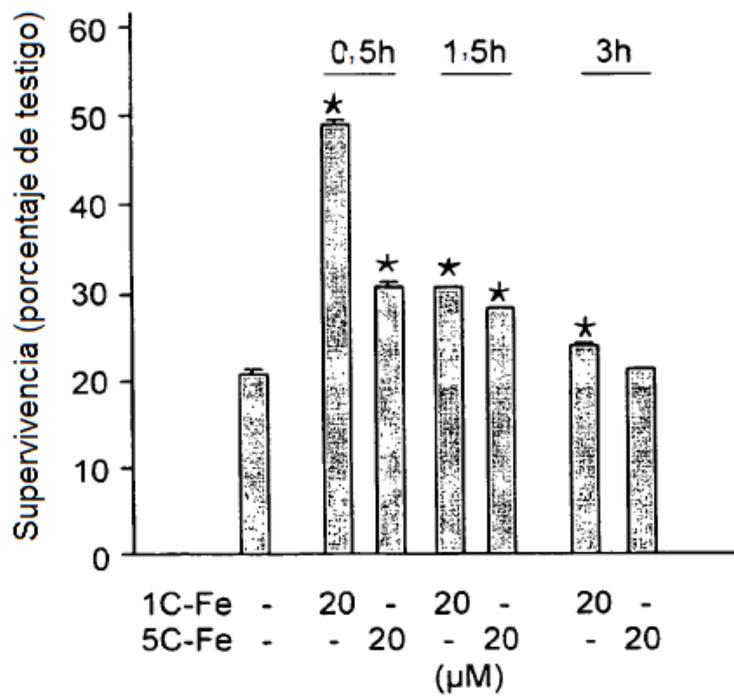


Fig. 8B



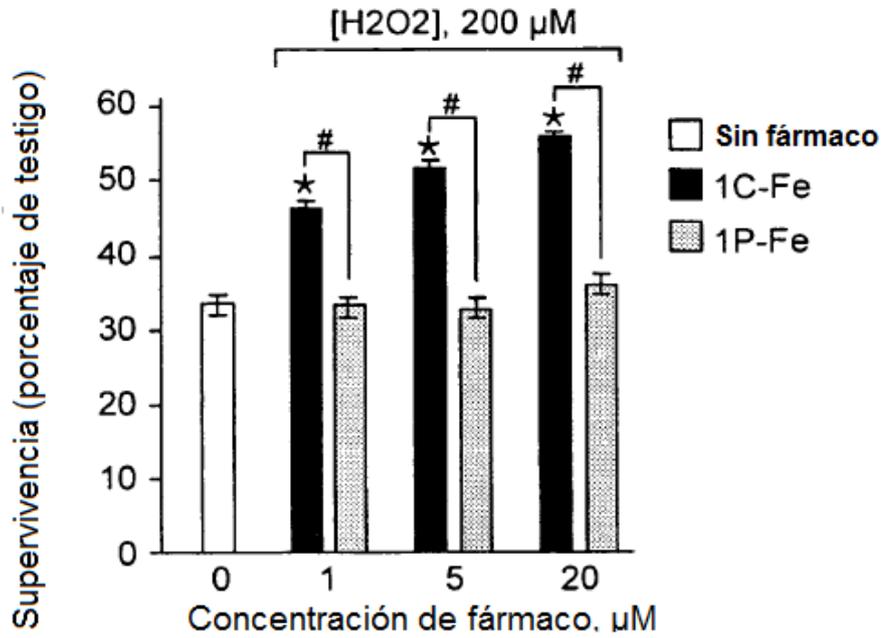


Fig. 9B

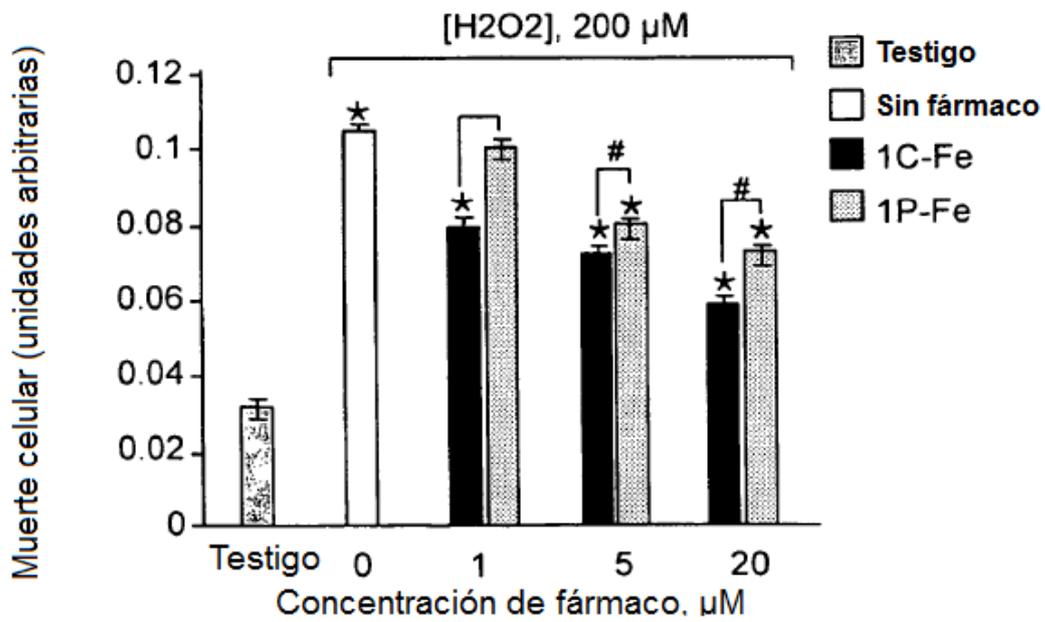


Fig. 9C

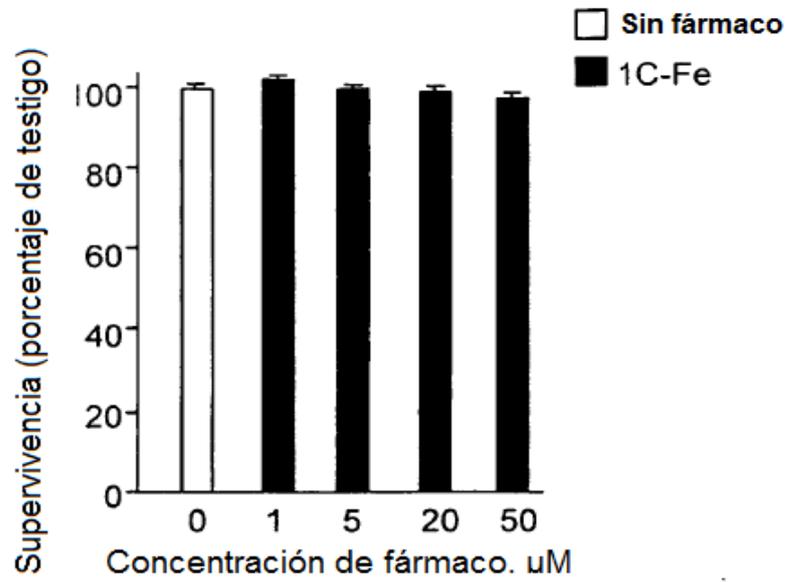


Fig. 9D

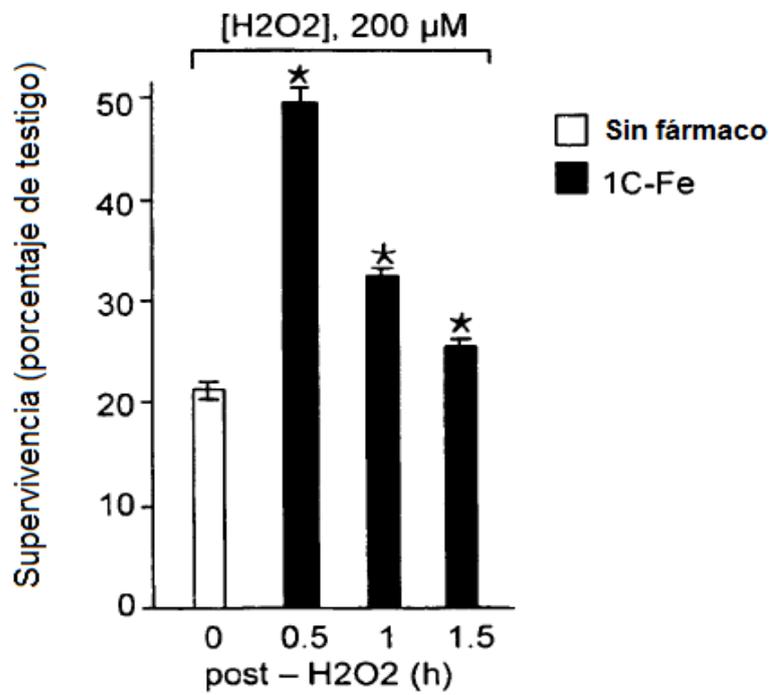


Fig. 10

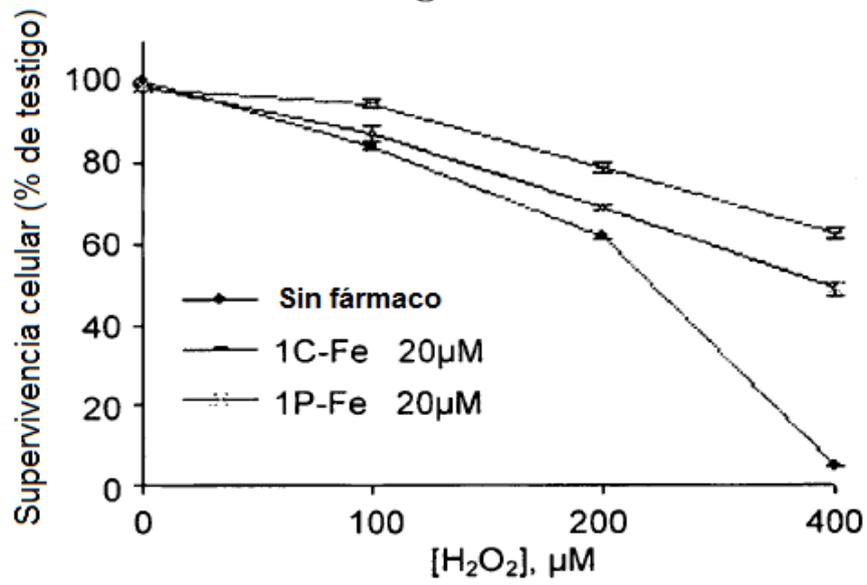


Fig. 11A

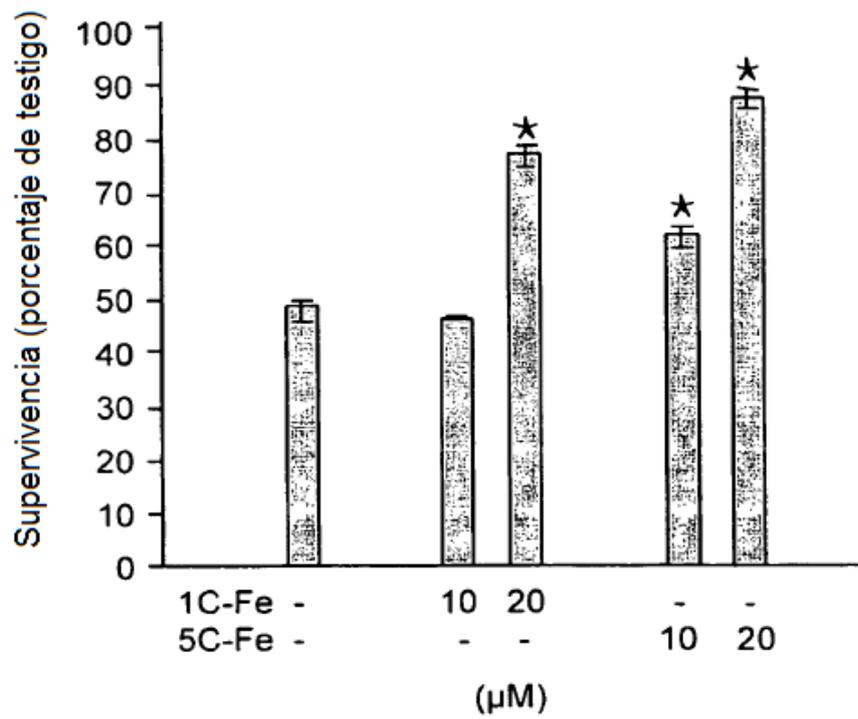


Fig. 11B

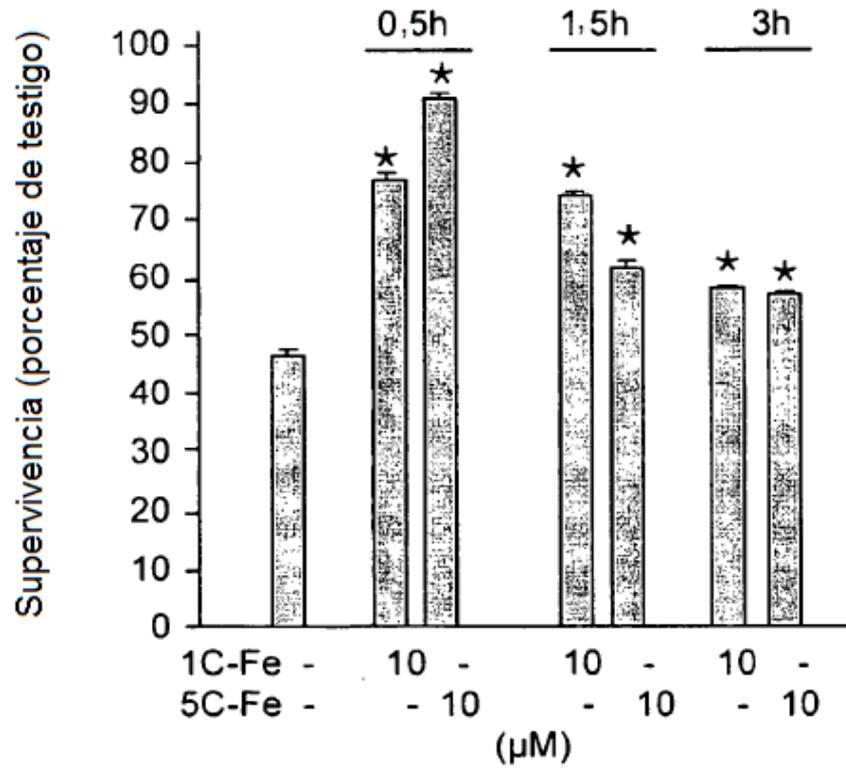


Fig. 12A

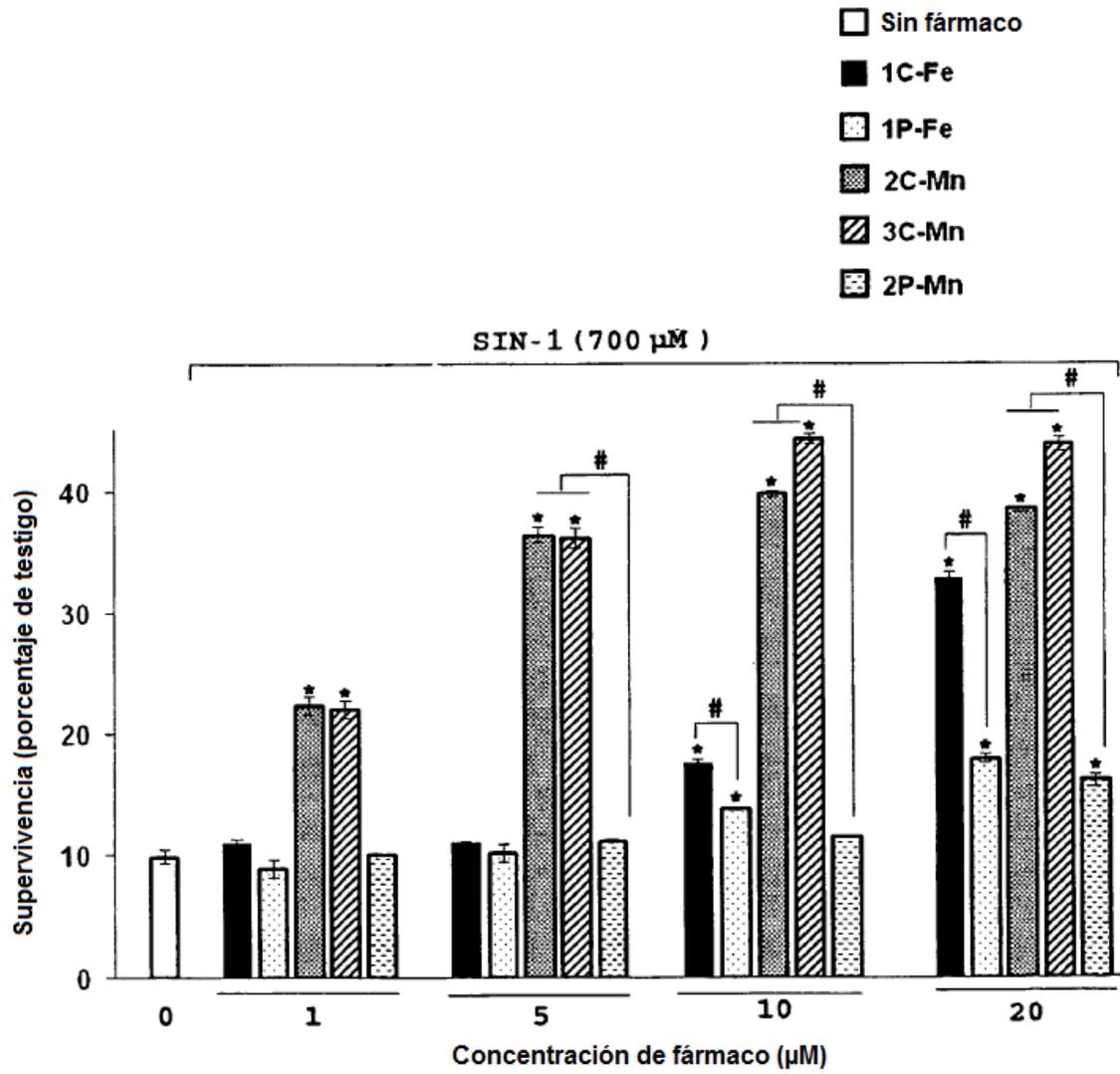


Fig. 12B

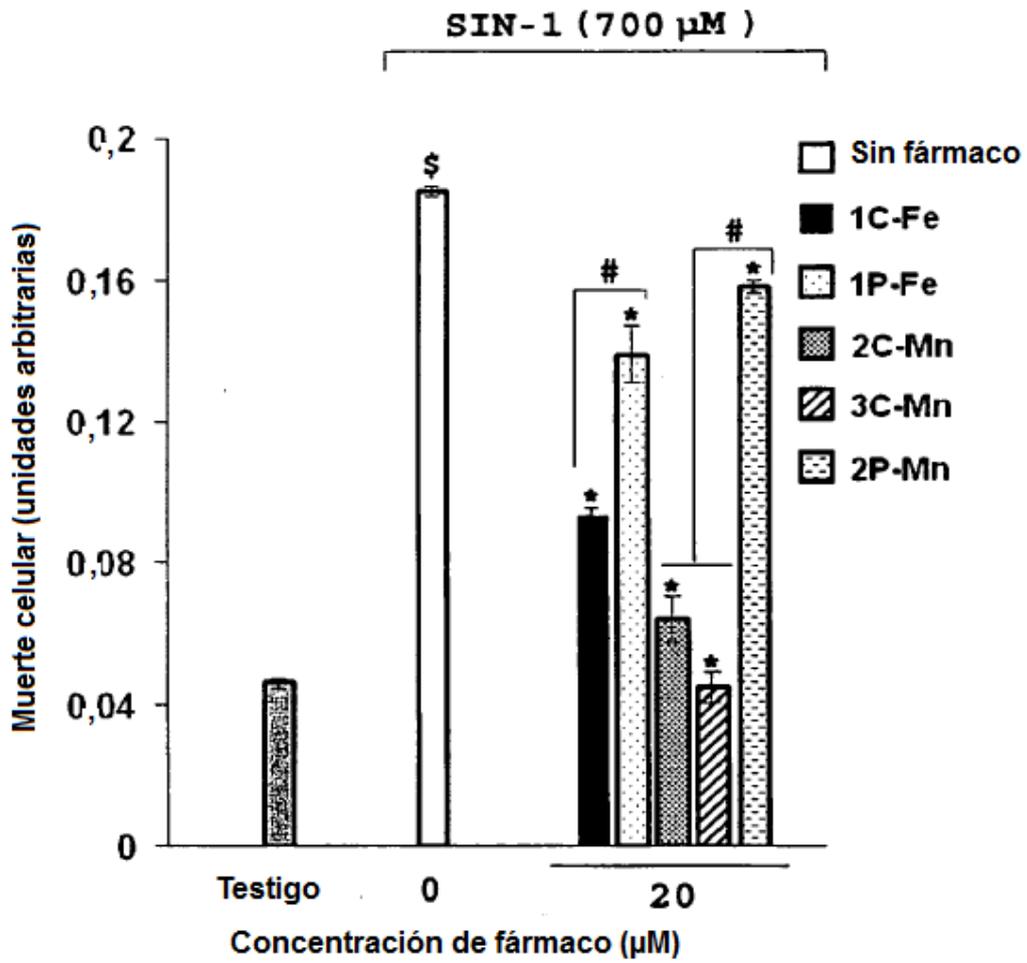


Fig. 12C

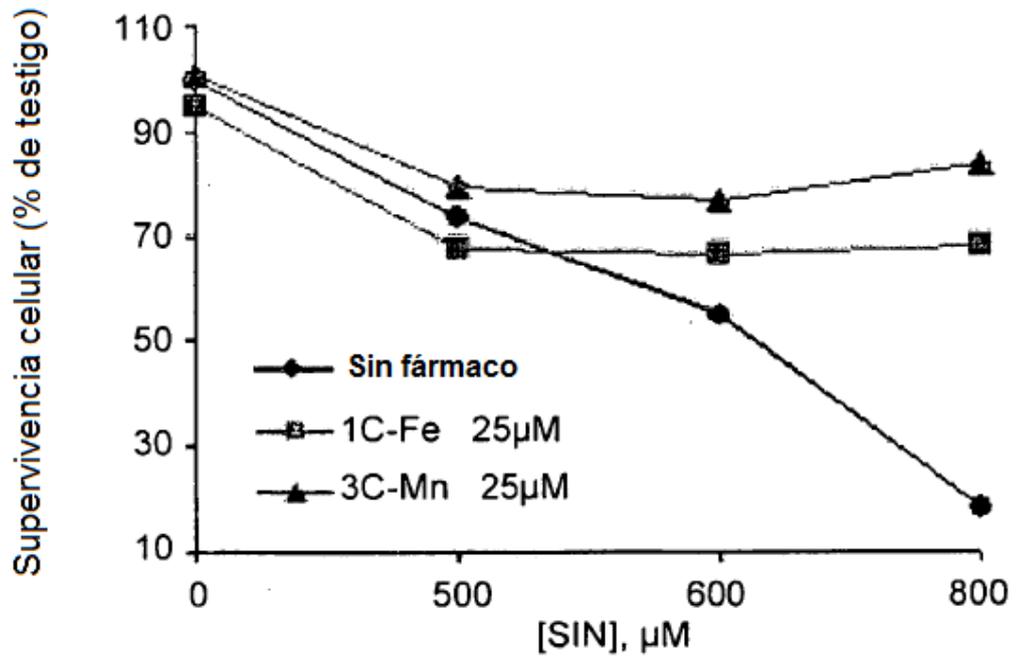


Fig. 13A

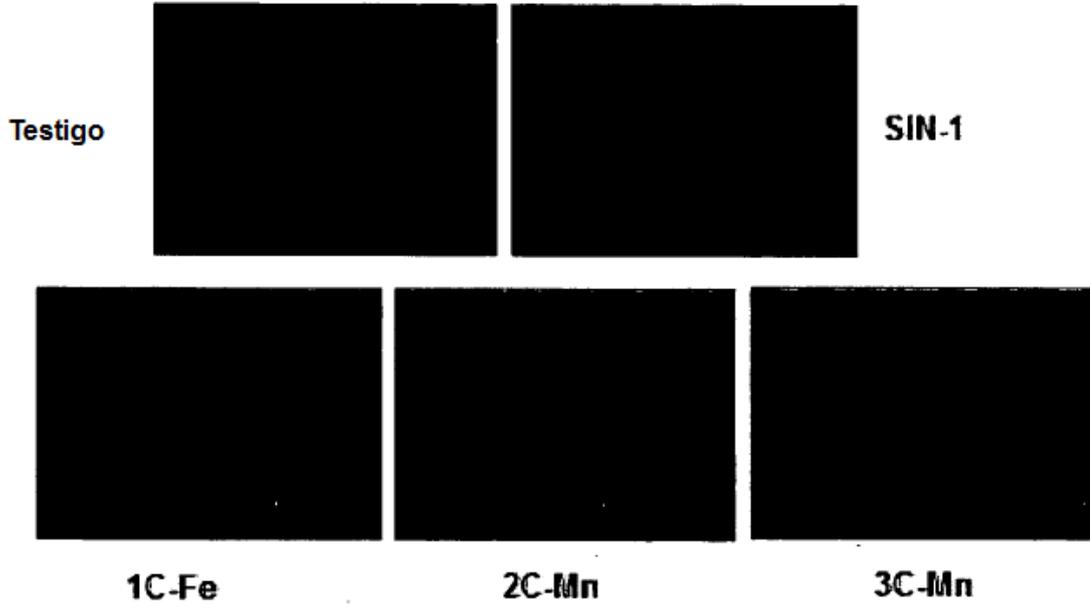


Fig. 13B

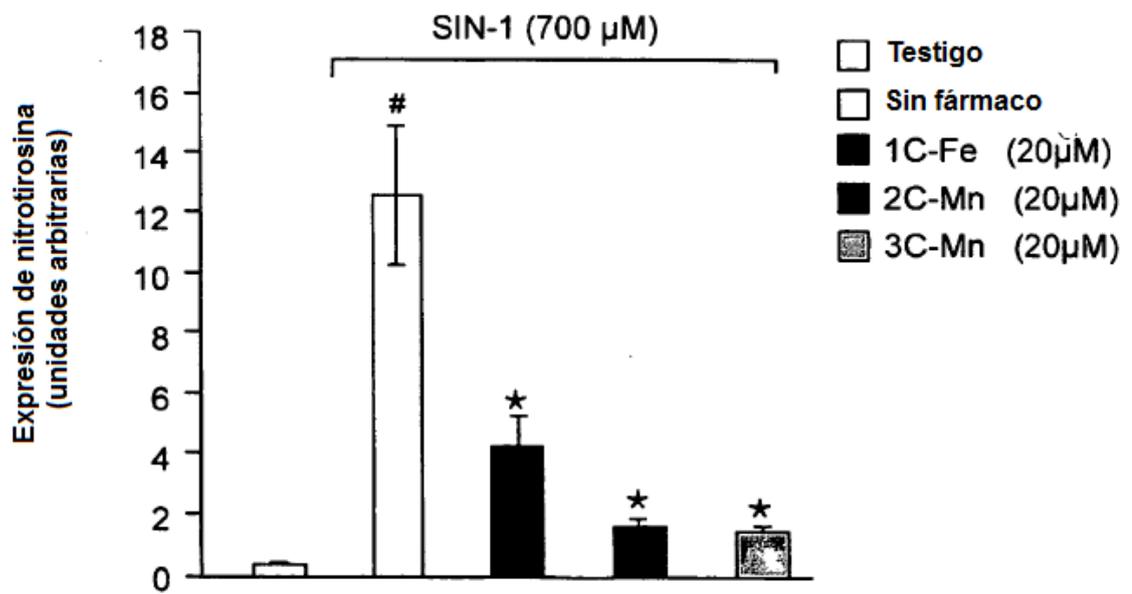


Fig. 14A

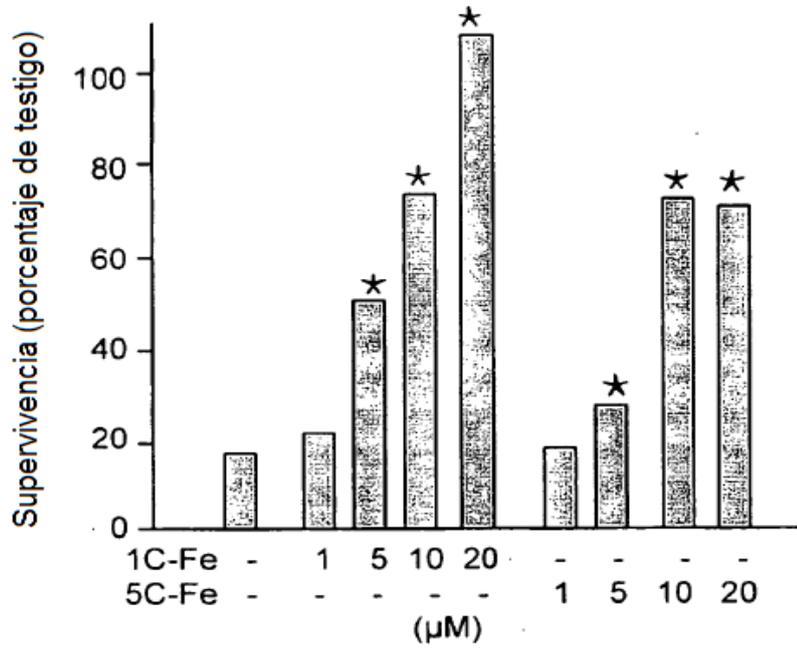


Fig. 14B

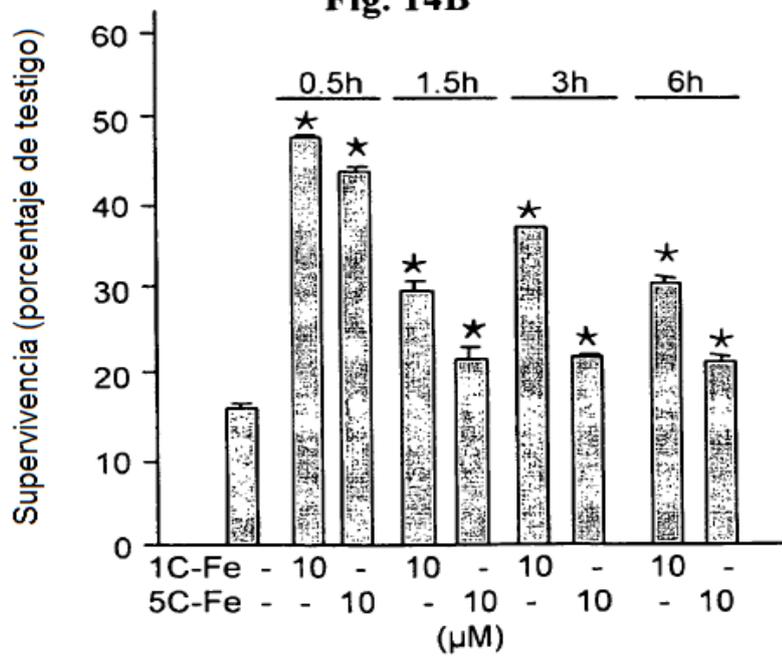


Fig. 15A

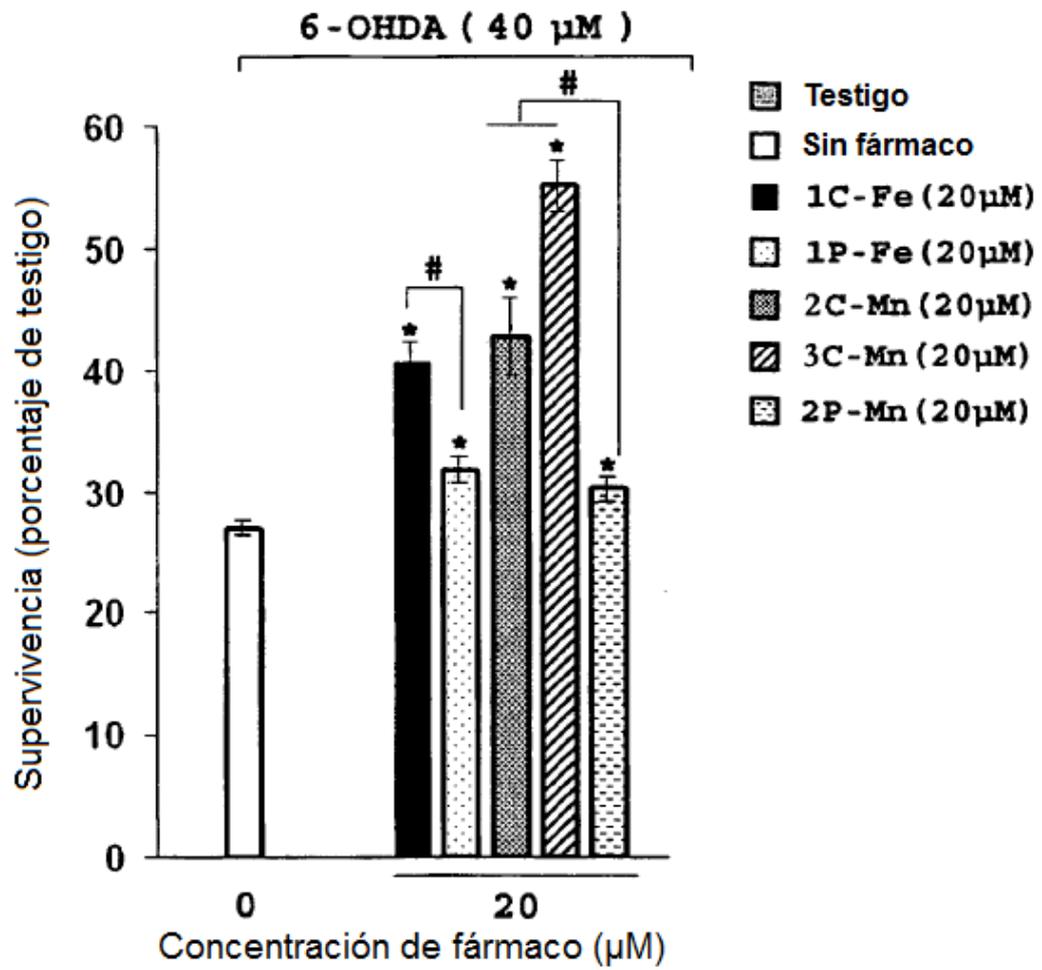


Fig. 15B

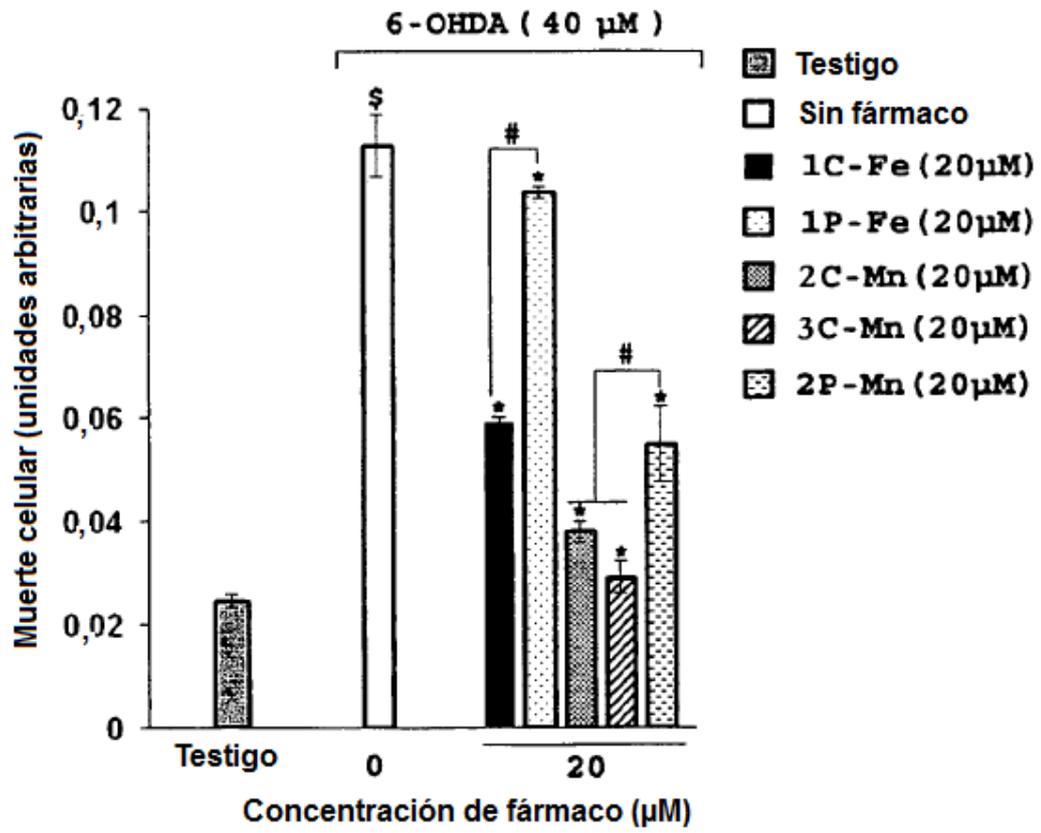


Fig. 15C

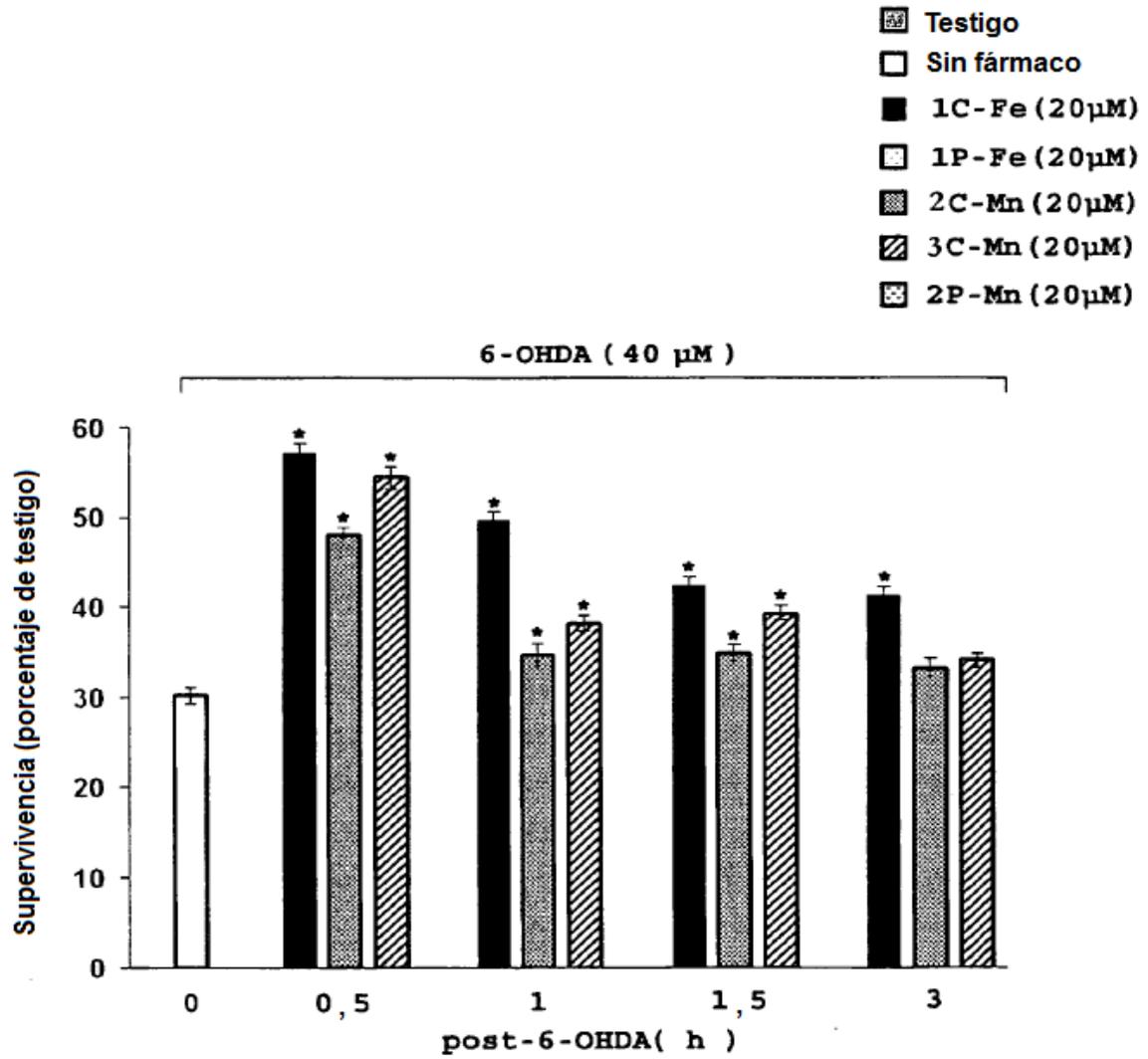


Fig. 16A



Fig. 16B



Fig. 16C



Fig. 16D



Fig. 16E



Fig. 16F



Fig. 16G



Fig. 16H



Fig. 16I



Fig. 16J



Fig. 16K



Fig. 16L



Fig. 16M



Fig. 16N



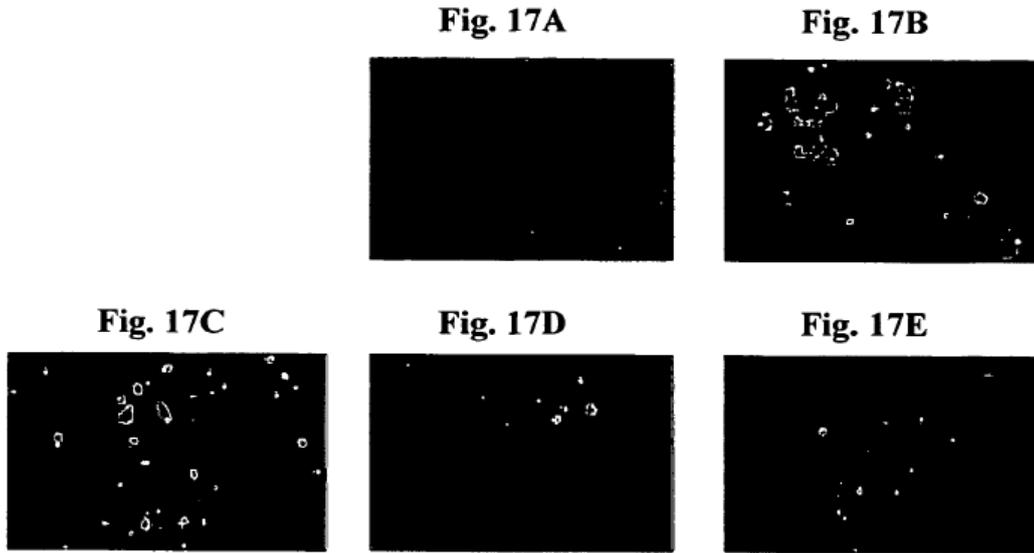


Fig. 17F

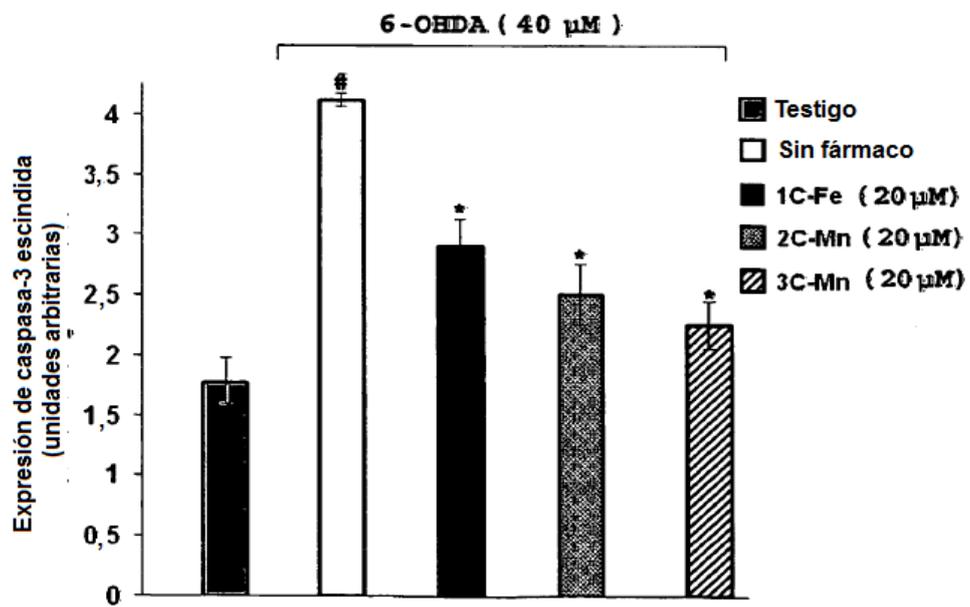


Fig. 18A

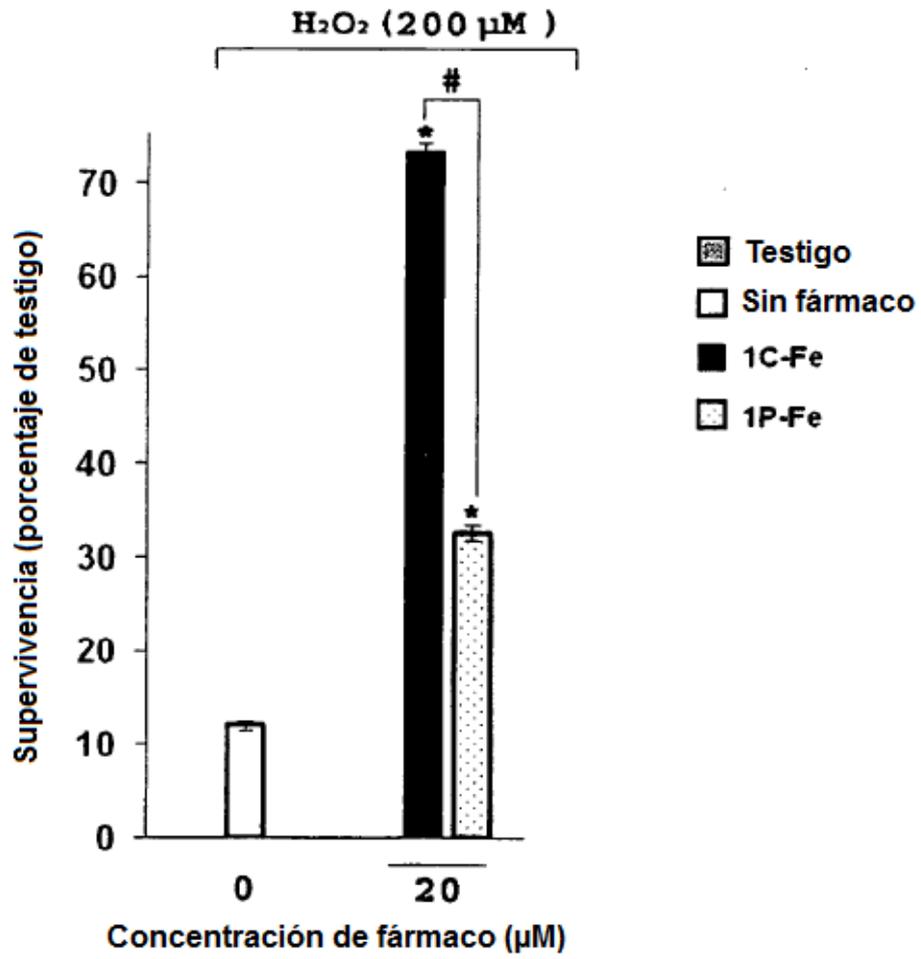


Fig. 18B

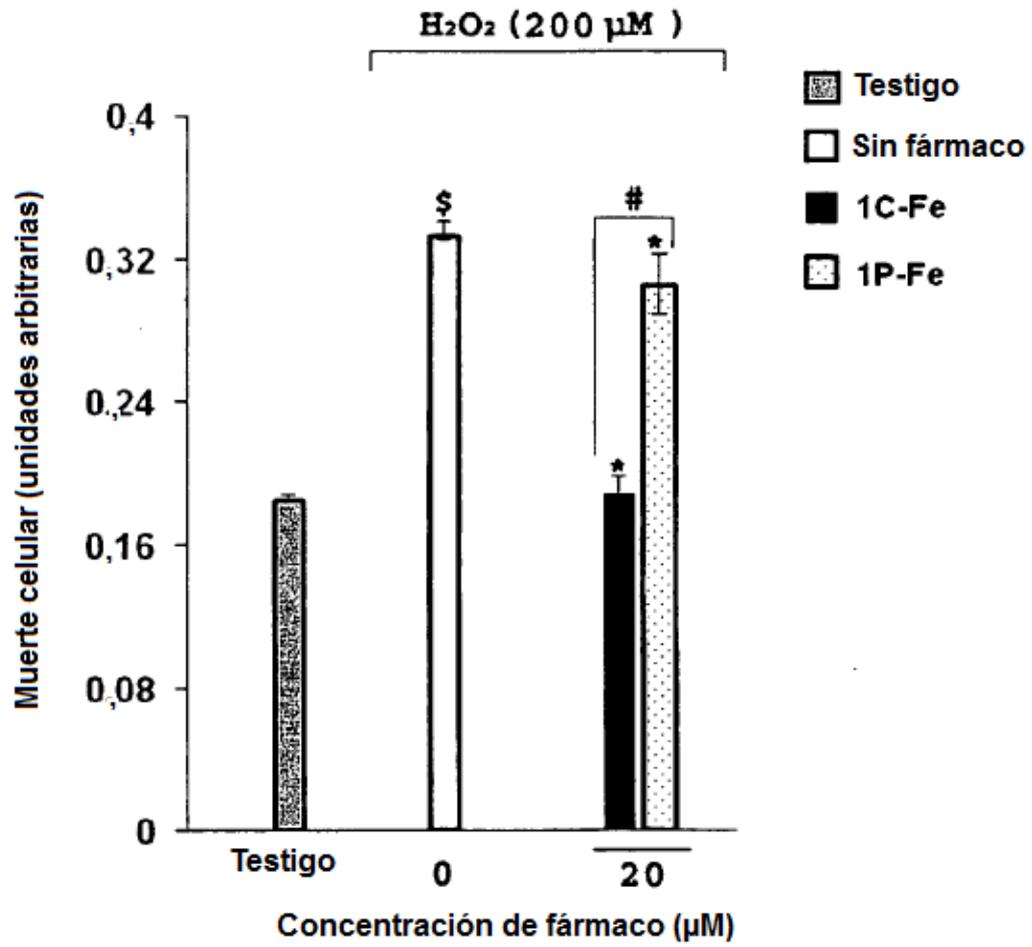


Fig. 19A

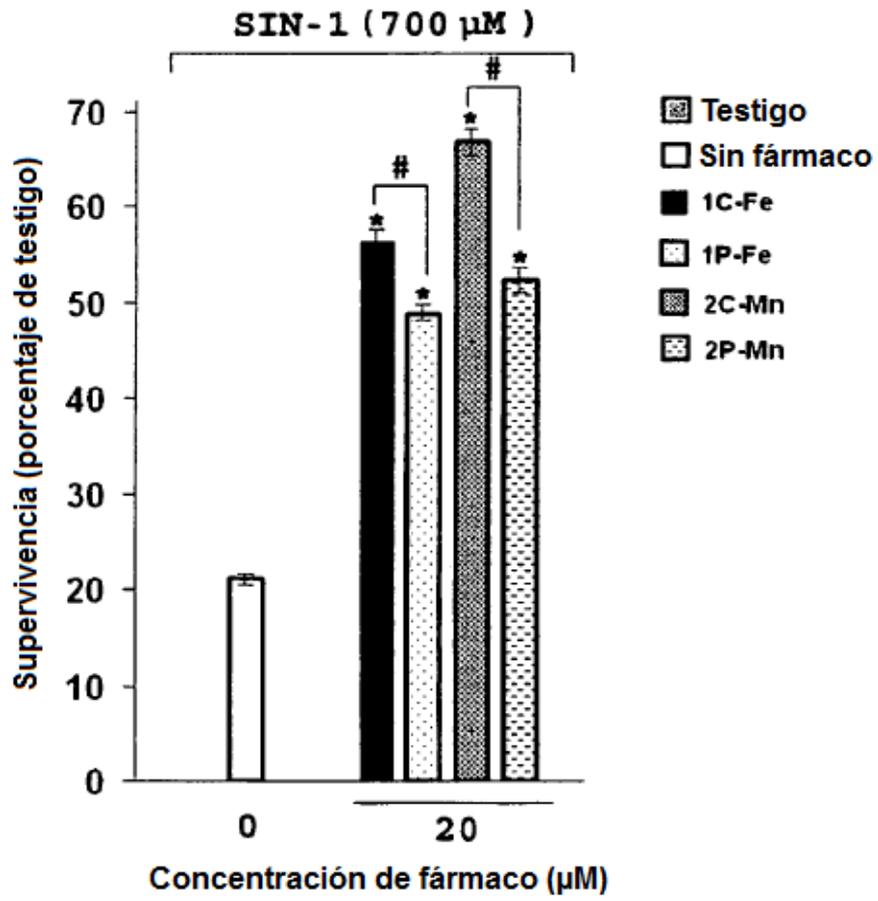


Fig. 19B

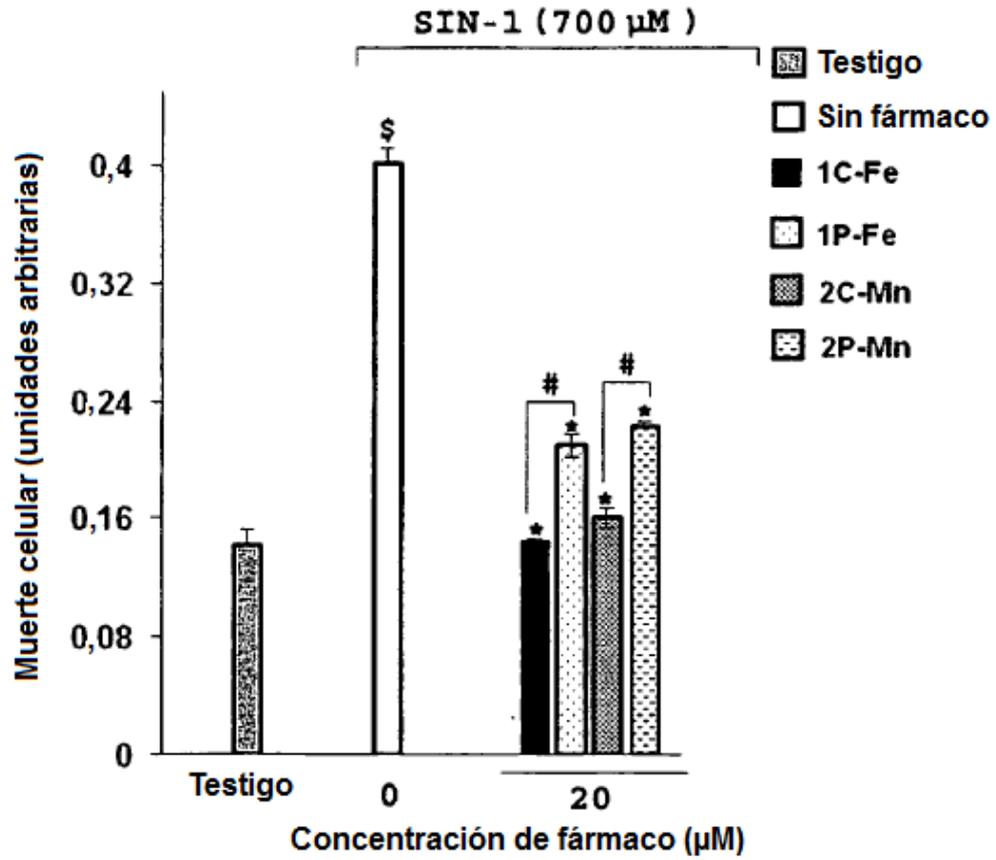


Fig. 20A

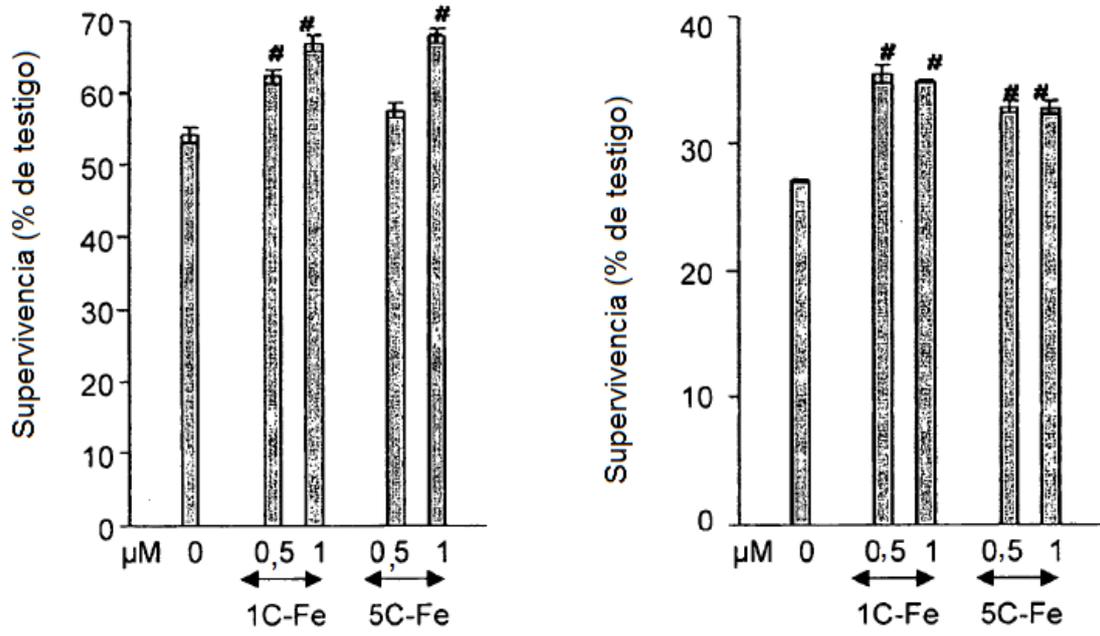


Fig. 21A

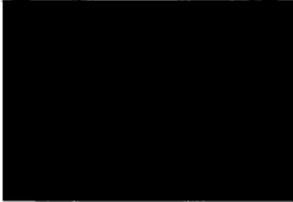


Fig. 21B



Fig. 21C



Fig. 21D



Fig. 22A



Fig. 22B

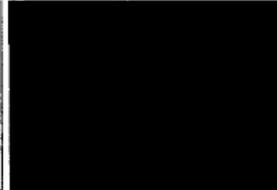


Fig. 22C

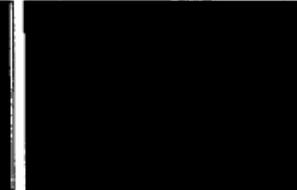


Fig. 22D

