

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 669**

51 Int. Cl.:
A61K 31/575 (2006.01)
C07J 9/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04717660 .7**
96 Fecha de presentación: **05.03.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1601363**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.12.2005**

54 Título: **Aplicación como medicamentos de los derivados de colest-4-en-3-ona, composiciones farmacéuticas que los contienen y nuevos derivados**

30 Prioridad:
11.03.2003 FR 0302992
26.09.2003 FR 0311324

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.10.2012

73 Titular/es:
TROPHOS
PARC SCIENTIFIQUE LUMINY, CASE 931
13288 MARSEILLE CEDEX , FR

72 Inventor/es:
BORDET, Thierry;
DROUOT, Cyrille y
BUISSON, Bruno

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 388 669 T3

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

DESCRIPCIÓN

Aplicación como medicamentos de los derivados de colest-4-en-3-ona, composiciones farmacéuticas que los contienen y nuevos derivados.

5 La presente invención se refiere a la aplicación como medicamentos de los derivados de colest-4-en-3-ona, en particular, como neuroprotectores por ejemplo en las patologías y los traumatismos vinculados a la degeneración o a la muerte de las motoneuronas, a las composiciones farmacéuticas que les contienen, a nuevos derivados y su procedimiento de preparación.

10 Los procesos neurodegenerativos se caracterizan por la disfunción y la muerte de las neuronas que implica la pérdida de las funciones neurológicas mediadas por el cerebro (sistema nervioso central, SNC), la médula espinal y el sistema nervioso periférico (SNP). Pueden resultar, entre otras cosas, de situaciones patológicas agrupadas bajo el término de enfermedades o afecciones neurodegenerativas, de traumatismo, o de exposición a toxinas.

Las patologías más importantes que se caracterizan por un proceso degenerativo son:

- 15 - enfermedades crónicas neurodegenerativas, hereditarias o esporádicas, en particular, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, las amiotrofias espinales, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, la esclerosis múltiple, la adrenoleucodistrofia, la epilepsia, las demencias, la esquizofrenia y los síndromes neurológicos asociados al SIDA;
- las lesiones neuronales vinculadas al envejecimiento;
- 20 - las neuropatías periféricas hereditarias o lesionales, tales como las enfermedades de Fabry, de Charcot-Marie-Tooth, de Krabbe, las leucodistrofias, las neuropatías diabéticas y aquéllas inducidas por los tratamientos anti-cancerígenos;
- los traumatismos del cerebro, de los nervios periféricos o de la médula espinal;
- las isquemias del cerebro o de la médula espinal a raíz de un accidente cerebro-vascular, o inducidas por una falta de riego sanguíneo;
- 25 - las degeneraciones, hereditarias, lesionales o vinculadas al envejecimiento de las neuronas sensoriales de la visión, tal como las degeneraciones maculares, las retinitas pigmentarias, o las degeneraciones del nervio óptico inducidas por los glaucomas;
- las degeneraciones, hereditarias, traumáticas o vinculadas al envejecimiento de las neuronas sensoriales de la audición que implica una disminución o una pérdida de la audición.

30 Una parte de las vías de señalización afectadas en estas patologías son comunes a un gran número de enfermedades neurodegenerativas. La enfermedad de Alzheimer es la demencia más frecuente. Evidencia una atrofia del cerebro, una pérdida neuronal predominante en el asta de Ammon y afecta también a las neuronas colinérgicas. Otras patologías, tal como las atrofas lobares (enfermedad de Pick, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob), la demencia con cuerpo de Lewy, las demencias vasculares, la enfermedad de Parkinson se asocian a una muerte neuronal importante en el origen de los síntomas de estas demencias.

35 No existe actualmente un tratamiento eficaz para frenar las degeneraciones neuronales. Una aproximación terapéutica para proteger las neuronas de la muerte es la aportación de proteínas neurotróficas.

40 Estas proteínas, tales como BDNF (brain-derived neurotrophic factor), CNTF (ciliary neurotrophic factor), NGF (nerve growth factor), GDNF (glia-derived neurotrophic factor) se sintetizan durante el desarrollo embrionario o después de una lesión en el adulto. Estos factores de crecimiento favorecen la supervivencia, la maduración y la diferenciación de las células neuronales. Además, inhiben los mecanismos apoptóticos, activan múltiples vías de supervivencia y protegen un gran número de poblaciones neuronales. Su utilización se propone en la mayoría de las degeneraciones neuronales.

Compuestos que activarían la expresión de factores neurotróficos o que imitaría la acción de estos factores tienen un potencial terapéutico para el tratamiento de los síndromes neurodegenerativos.

45 En particular, la aportación de moléculas neurotróficas para el tratamiento de las degeneraciones neuronales contempla tres objetivos:

- compensar una carencia potencial en factores neurotróficos vinculada a un defecto de aportación por las dianas periféricas o centrales de las neuronas y/o un desorden del transporte retrógrado de estos factores;
- intervenir de manera no específica sobre las vías bioquímicas implicadas en la cascada degenerativa;
- 50 - favorecer los fenómenos compensadores naturales de crecimiento dendrítico y de arborización de las

terminaciones nerviosas.

Estos compuestos presentarían por lo tanto un efecto beneficioso en un gran número de patologías en particular en las patologías que se refieren a los sistemas nerviosos periféricos y centrales.

5 Por otra parte, en el marco indicado más arriba, las motoneuronas son neuronas, en particular, presentes en la médula espinal y en el tronco cerebral. Su degeneración o su muerte puede conducir a una debilidad progresiva de los músculos de los miembros, luego a una atrofia y eventualmente a una espasticidad (es decir, una contracción permanente) del músculo.

10 Las patologías más importantes que resultan de la degeneración y de la muerte de las motoneuronas espinales y/o bulbares son la esclerosis lateral amiotrófica, también conocida bajo el nombre de enfermedad de Charcot o también enfermedad de Lou Gehrig, y las amiotrofias espinales infantiles, también conocidas bajo los nombres de enfermedad de Werdnig-Hoffmann o enfermedad de Kugelberg-Welander.

Además se observa una degeneración de las motoneuronas en los casos de traumatismos con aplastamiento y/o sección de la médula espinal o de los nervios motrices periféricos.

15 Más generalmente, se habla de amiotrofias espinales para las enfermedades donde se implica la degeneración o la muerte de las motoneuronas de la médula espinal.

20 La esclerosis lateral amiotrófica (SLA o ALS para Amyotrophic Lateral Sclerosis) es una enfermedad neurodegenerativa asociada a distintos tipos de inclusiones tales como los cuerpos de Lewy y caracterizada por una degeneración de las motoneuronas espinales y corticales cuyo desenlace fatal a veces se asocia a una demencia frontal. Durante el desarrollo de la ALS, los fenómenos degenerativos se producen no sólo en el cerebro sino también en la médula espinal y en consecuencia en el músculo, por defecto de innervación.

Se buscan siempre compuestos activos para luchar contra las afecciones mencionadas más arriba.

La solicitud de patente europea nº 0442350 describe la utilización de estigmasta-4-en-3-ona o estigmasta-4-22-dien-3-ona para el tratamiento de los tumores.

25 HORITA, KIYOSHI et al ("Anti-arrhythmia constituent in Herba Leonuri" NATURAL MEDICINES, 56(5), 212-214, 2002), describe la actividad antiarrítmica de la estigmasta-4-en-3-ona (beta-sitosterona) y la utilización médica de los extractos de Herba lenuri que lo contiene.

YANG, Y. et al ("Anti-emetic principles of Pogostemon cablin" PHYTOMEDICINE, 6(2), 89-93, 1999) describe el efecto antiemético de la estigmasta-4-en-3-ona y la utilización de hierbas medicas chinas que la contienen.

30 KOLAK, UFUK et al ("Cardioactive diterpenoids from the roots of Salvia amplexicaulis" PLANTA MEDICA, 67(8), 761-763, 2001) describe el efecto vasodepresivo de la estigmasta-4-en-3-ona y la utilización médica de las raíces de Salvia amplexicaulis que la contiene.

35 SUZUKI K et al ("The cholesterol metabolite cholest-4-en-3-one and its 3-oxo derivates suppress body weight gain, body fat accumulation and suerum lipid concentration en mice" BIOORGANIC y MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, 8 (16), 2133-2138,1998) describe el efecto anti-obesidad de los derivados del colest-3-ona que responden a la fórmula I).

KANEKO, EMI et al ("Induction of Intestinal ATP-binding Cassette Transporters by a Phytosterol-derived Liver X Receptor Agonist" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 278(38), 36091-36098, 2003) describe el efecto agonista de los receptores LXRs de ergosta-1,4,6,22-tetra-en-3-ona y su posible utilización terapéutica para la modulación del metabolismo del colesterol.

40 LIN, WEI-YU et al ("Anti-platelet aggregation and chemical constituents from the rhizome of Gynura japonica" PLANTA MEDICA, 69(8), 757-764, 2003) describe la actividad anti-agregación de las placas de estigmasta-1,2,22-trien-3-ona y estigmasta-1,4-dien-3-ona, y la utilización médica del rizoma de Gynura Japonica que le contiene.

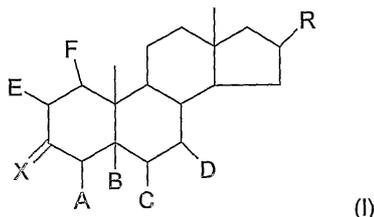
45 La solicitud de patente Japonesa nº 2.002.030.096 la estigmasta-22-en-3-ona y su oxima se revelan como compuestos intermediarios de síntesis en la preparación de ergostenoles, estando estos últimos descritos como regeneradores de las proyecciones neuronales con aplicación en la terapia de las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson.

UENSEREN E ("Gamma irradiation of cholestenone oximes" INIS ATOMINDEX, INTERNACIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, vol. 8, nº 6, 1977, páginas 1-21) revela el compuesto colest-4-en-3-ona y su oxima como compuestos intermediarios en la síntesis de los azasteroides.

50 Estos documentos del estado de la técnica anterior no describen una utilización de compuestos de la invención como medicamentos neuroprotectores.

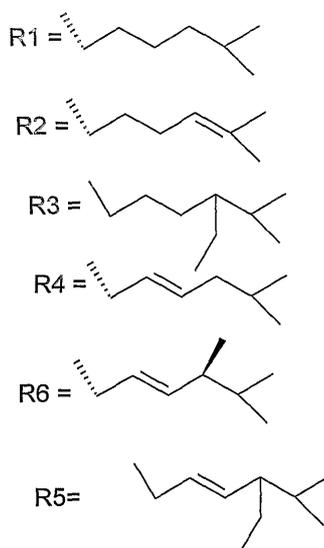
5 Ahora bien, la firma solicitante descubrió que derivados del 4-colesten-3-ona y, en particular, la oxima de colest-4-en-3-ona se dotaban de notables propiedades neuroprotectoras, especialmente frente a las motoneuronas, neuronas del sistema nervioso central, de los nervios motrices y periféricos, y en consecuencia eran útiles como medicamentos y que algunos de ellos se dotaban, por otro lado, de notables propiedades inhibitoras del efecto de moduladores alostéricos positivos de los receptores GABA_A (gamma amino butírico ácido de tipo A).

Esta es la razón por la que la presente invención tiene por objeto los compuestos que responden a la fórmula I:



en la cual X representa un grupo = N-OH,

R representa un grupo elegido entre:



10

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

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

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

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

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

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

así como sus sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables, para su utilización en un método de tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal, es decir, como medicamentos.

20 Las sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables pueden ser, por ejemplo, las sales formadas con los ácidos clorhídrico, bromhídrico, nítrico, sulfúrico, fosfórico, acético, fórmico, propiónico, benzoico, maleico, fumárico, succínico, tartárico, cítrico, oxálico, glicólico, aspártico, alcano sulfónico tales como los ácidos metano- o etano-sulfónicos, aril-sulfónicos, tales como los ácidos benceno- o paratolueno-sulfónicos, o carboxílicos.

Se retienen más concretamente los compuestos citados más arriba para los cuales,

25 - X representa un grupo = N-OH, A representa junto con B un enlace carbono-carbono, C, D, representan un átomo de hidrógeno, E, F representan un átomo de hidrógeno o juntos un enlace carbono-carbono y R tiene el mismo significado que R1,

- X representa un grupo = N-OH, A representa junto con B un enlace carbono-carbono, C, D representan un átomo de hidrógeno, E, F representan un átomo de hidrógeno y R tiene el mismo significado que R2 o R3 o R4,
- 5 - X representa un grupo = N-OH, A representa junto con B un doble enlace, C representa junto con D un enlace carbono-carbono, E, F representan un átomo de hidrógeno y R tiene el mismo significado que R1 o R6,
- X representa un grupo = N-OH, A representa junto con B un enlace doble, C representa junto con D un enlace carbono-carbono, E representa junto con F un enlace carbono-carbono y R tiene el mismo significado que R1,
- 10 - X representa un grupo = N-OH, E representa junto con F un enlace doble, C, D, A, B representan un átomo de hidrógeno y R tiene el mismo significado que R1,

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

Entre los compuestos de la invención se puede citar además:

- la 5 beta hidroxí colestán 3 ona
- 15 - la oxima de colestán-3-ona

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

Se retiene muy particularmente:

- la oxima de colest-4-en-3-ona,
- la oxima de 1,4-colestadien-3-ona

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

Los compuestos objeto de la presente invención poseen muy interesantes propiedades farmacológicas. Están dotados, en particular, de notables propiedades neuroprotectoras, especialmente frente a las motoneuronas.

25 Estas propiedades se ilustran a continuación en la parte experimental. Justifican la utilización de los compuestos citados más arriba descritos así como de sus sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables como medicamento.

30 Los medicamentos según la presente invención encuentran su empleo debido a sus propiedades neuroprotectoras por ejemplo en el tratamiento o en la prevención de las afecciones neurodegenerativas, como, por ejemplo, la enfermedad de Huntington, las enfermedades crónicas neurodegenerativas, hereditarias o esporádicas, las lesiones neuronales vinculadas al envejecimiento, las neuropatías periféricas hereditarias o lesionales, la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, las neuropatías diabéticas o inducidas por los tratamientos anticancerígenos, los traumatismos del cerebro, los nervios periféricos o de la médula espinal, las isquemias del cerebro o de la médula espinal, las degeneraciones hereditarias, lesionales o vinculadas al envejecimiento de las neuronas sensoriales de la visión o las degeneraciones del nervio óptico, las degeneraciones hereditarias, traumáticas o vinculadas al envejecimiento de las neuronas sensoriales de la audición, las atrofas lobares y las demencias vasculares, y, en particular, las amiotrofias espinales, la esclerosis lateral amiotrófica y las patologías debidas a los traumatismos de la médula espinal o de los nervios motrices periféricos.

40 En el contexto de la invención, el término "tratamiento" designa el tratamiento preventivo, curativo, paliativo, así como asumir el tratamiento a pacientes (reducción del sufrimiento, mejora de la duración de vida, disminución de la progresión de la enfermedad), etc. El tratamiento se puede, por otro lado, realizar en combinación con otros ingredientes o tratamientos, tales como, en particular, otros compuestos activos para tratar las patologías o traumatismos especificados en la presente solicitud.

45 Presentan también propiedades inhibitoras del efecto de moduladores alostéricos positivos de los receptores GABA_A (gamma amino butírico ácido de tipo A). Ejemplos de moduladores alostéricos positivos son: la alopregnanolona o 3 α -hidroxí-5 α -pregnan-20-ona o 3 α , 5 α -TH-PROG o la tetrahidroxí corticosterona = 3 α , 20-dihidroxí-5 α -pregnan-20-ona = 3 α , 5 α -TH-DOC, que son neuroesteroides endógenos del sistema nervioso central. Estas propiedades particulares justifican que los compuestos de la invención encuentran también su empleo en el tratamiento de distintas situaciones fisiopatológicas donde estos neuroesteroides se describieron para desempeñar un papel importante, tal como, por ejemplo,

- el comportamiento sexual
- 50 - la muerte súbita del recién nacido, y, en particular,

- la sensibilidad dolorosa o los dolores neuropáticos crónicos
 - la ansiedad o la depresión
 - las lesiones traumáticas del sistema nervioso
 - las epilepsias sensibles a los esteroides, los desordenes del sueño o la intoxicación
- 5 - el aprendizaje cognoscitivo o los desordenes de la memoria.

Encuentran, en particular, debido a sus propiedades neuroprotectoras frente a las motoneuronas, su empleo especialmente en el tratamiento de las amiotrofias espinales, en particular, de la esclerosis lateral amiotrófica o de las amiotrofias espinales infantiles, y en el tratamiento de los traumatismos de la médula espinal o de los nervios motrices periféricos tal como se menciona más arriba.

10 En general la dosis diaria del compuesto será la dosis mínima para obtener el efecto terapéutico. Esta dosis dependerá de los distintos factores citados antes. Las dosis de los compuestos citados más arriba descritos y por ejemplo de la oxima de colest-4-en-3-ona se incluirán en general entre 0,001 a 100 mg por kilo al día por hombre.

En caso necesario, la dosis diaria se puede administrar en dos, tres, cuatro, cinco, seis o más, tomas al día o por subdosis múltiples administradas por intervalos apropiados durante el día.

15 La cantidad elegida dependerá de múltiples factores, en particular de la vía de administración, de la duración de administración, del momento de la administración, de la velocidad de eliminación del compuesto, del o de los distintos productos utilizados en combinación con el compuesto, de la edad, del peso y de la condición física del paciente, así como de su historia médica, y de todas las informaciones conocidas en medicina.

20 La prescripción del médico que trata podrá comenzar en dosis inferiores a las generalmente utilizadas, luego estas dosis se aumentarán progresivamente con el fin de controlar mejor la aparición de posibles efectos secundarios.

La invención tiene también por objeto las composiciones farmacéuticas que contienen al menos un compuesto antes citado o una de sus sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables, como principio activo.

25 En estas composiciones, el principio activo está presente ventajosamente en dosis fisiológicamente eficaces; las composiciones antes citadas contienen, en particular, una dosis neuroprotectora eficaz de al menos un principio activo citado más arriba.

Como medicamentos, los compuestos que responden a la fórmula I así como sus sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas destinadas a la vía digestiva o parenteral.

30 Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden incluir por otro lado al menos otro ingrediente terapéuticamente activo, para una utilización simultánea, separada o extendida en el tiempo, en particular, durante un tratamiento en un sujeto alcanzado de una patología o de un traumatismo vinculado a la degeneración o a la muerte de las motoneuronas tal como se definen más arriba.

35 Las composiciones farmacéuticas o medicamentos según la invención incluyen ventajosamente uno o varios excipientes o vehículos inertes, es decir, farmacéuticamente inactivos y no tóxicos. Se pueden citar por ejemplo soluciones salinas, fisiológicas, isotónicas, tamponadas, etc, compatibles con un uso farmacéutico y conocidas por el experto en la técnica. Las composiciones pueden contener uno o varios agentes o vehículos elegidos entre los dispersantes, solubilizantes, estabilizantes, conservantes, etc. Agentes o vehículos utilizables en formulaciones (líquidos y/o inyectables y/o sólidos) son, en particular, la metilcelulosa, el hidroximetilcelulosa, la carboximetilcelulosa, las ciclodextrinas, el polisorbato 80, el manitol, la gelatina, la lactosa, los aceites vegetales o animales, la acacia, etc. Las composiciones se pueden formular en forma de suspensión inyectable, de geles, aceites, comprimidos, supositorios, polvos, cápsulas de gelatina, cápsulas, etc, eventualmente por medio de forma galénica o de dispositivos que aseguran una liberación prolongada y/o retardada. Para este tipo de formulación, se utilizan ventajosamente un agente tal como la celulosa, carbonatos o almidones.

45 La administración se puede realizar por cualquier método conocido por el experto en la técnica, preferentemente por vía oral o por inyección, típicamente por vía intraperitoneal, intracerebral, intratecal, intravenosa, intra-arterial o intramuscular. Se prefiere la administración por vía oral. Se trata de un tratamiento a largo plazo, la vía de administración preferida será sublingual, oral o transcutánea.

50 Para las inyecciones, los compuestos se condicionan generalmente en forma de suspensiones líquidas, que se pueden inyectar por medio de jeringuillas o de perfusiones, por ejemplo. Se entiende que el caudal y/o la dosis inyectada, o de manera general la dosis que se debe administrar, se pueden adaptar por el experto en la técnica en función del paciente, de la patología, del modo de administración, etc. Se entiende que se pueden realizar administraciones repetidas, eventualmente en combinación con otros ingredientes activos o cualquier vehículo aceptable a nivel farmacéutico (tampones, soluciones salinas, isotónicas, en presencia de agentes estabilizantes,

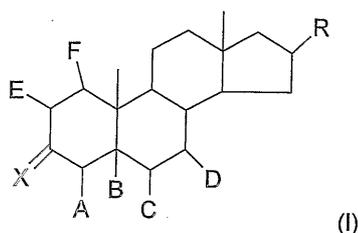
etc).

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

5 La presente invención describe también un procedimiento de preparación de una composición descrita más arriba, caracterizado porque se mezcla, según métodos conocidos de por sí, el o los principios activos con excipientes aceptables, en particular, farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos de fórmula I tales como se define más arriba son conocidos o se pueden preparar según los procedimientos descritos en la literatura. Algunos derivados de fórmula I son productos nuevos.

Esta es la razón por la que la presente solicitud tiene también por objeto los nuevos compuestos que responden a la fórmula I:

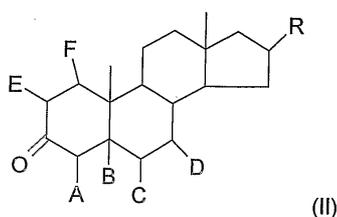


10 en la cual X representa un radical =N-OH y

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

20 así como sus sales de adición con los ácidos minerales u orgánicos.

La presente invención describe también un procedimiento de preparación de los nuevos compuestos de fórmula I tales como se define más arriba así como sus sales, caracterizado porque hace reaccionar un compuesto de fórmula II



25 en la cuál

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

- A representa junto con B un enlace carbono-carbono, C, D representan un átomo de hidrógeno, E, F representan un átomo de hidrógeno y R tiene el mismo significado que R2 o R4, o

30 - A representa junto con B un enlace carbono-carbono, C representa junto con D un enlace carbono-carbono, E, F representan un átomo de hidrógeno y R tiene el mismo significado que R6, o

- A representa junto con B un enlace carbono-carbono, C representa junto con D un enlace carbono-carbono, E representa junto con F un enlace carbono-carbono y R tiene el mismo significado que R1,

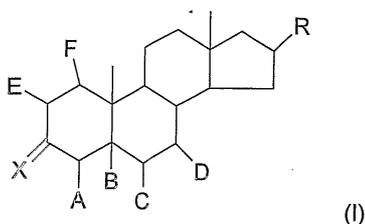
35 con un halogenuro de hidroxilamina como el hidrocloreuro de hidroxilamina, para obtener el compuesto de fórmula I esperada que se aísla y sí se desea salifica.

En condiciones preferenciales de empleo del procedimiento descrito más arriba,

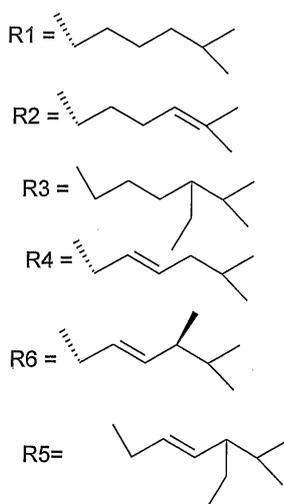
- Se solubiliza el producto de partida en un mínimo de un disolvente adaptado como la piridina
- si otra función cetona está presente, es bloqueada específicamente por un grupo protector adaptado como acetales cíclicos,
- 5 - se utiliza un exceso, por ejemplo 2 equivalentes, de halogenuro de hidroxilamina.
- Se opera bajo agitación durante aproximadamente 24 h a temperatura ambiente.

Los compuestos de fórmula II son derivados conocidos, descritos en la literatura, y son accesibles comercialmente.

La invención tiene también por objeto la utilización de un compuesto de fórmula I



- 10 en la cual X representa un átomo de oxígeno o un grupo = N-OH,
R representa un grupo elegido entre



- A representa un átomo de hidrógeno o junto con B un enlace carbono-carbono
- B representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o junto con A un enlace carbono-carbono,
- 15 C representa un átomo de hidrógeno o junto con D un enlace carbono-carbono,
- D representa un átomo de hidrógeno o junto con C un enlace carbono-carbono,
- E representa un átomo de hidrógeno o junto con F un enlace carbono-carbono,
- F representa un átomo de hidrógeno o junto con E un enlace carbono-carbono,
- 20 o de una de sus sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables, para la obtención de un medicamento neuroprotector, en particular, destinado al tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas tales como, por ejemplo, la enfermedad de Huntington, las enfermedades crónicas neurodegenerativas, hereditarias o esporádicas, las lesiones neuronales vinculadas al envejecimiento, las neuropatías periféricas hereditarias o lesionales, la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, las neuropatías diabéticas o inducidas por el tratamiento anticancerígeno, los traumatismos del cerebro, los nervios periféricos o de la médula espinal, las isquemias del
- 25 cerebro o de la médula espinal, las degeneraciones hereditarias, lesionales o vinculadas al envejecimiento de las neuronas sensoriales de la visión o las degeneraciones del nervio óptico, las degeneraciones hereditarias,

traumáticas o vinculadas al envejecimiento de las neuronas sensoriales de la audición, las atrofas lobares y las demencias vasculares, las enfermedades y traumatismos vinculados a la degeneración de las motoneuronas y más concretamente a las amiotrofias espinales especialmente infantiles, la esclerosis lateral amiotrófica, la esclerosis en placas y los traumatismos de la médula espinal o los nervios motrices periféricos.

5 La invención tiene especialmente por objeto la utilización de un compuesto de fórmula I descrita más arriba para la obtención de un medicamento neuroprotector, en particular, destinado al tratamiento de patologías o traumatismos vinculados a la degeneración o a la muerte de las neuronas, en mamíferos (en general de los pacientes) alcanzados de tales patologías o traumatismos.

10 La invención tiene más concretamente por objeto la utilización de un compuesto de fórmula I para la obtención de un medicamento destinado al tratamiento de las amiotrofias espinales infantiles y las esclerosis laterales amiotróficas.

15 La invención describe también la utilización de un compuesto de fórmula I descrita más arriba para la obtención de un medicamento destinado al tratamiento de las patologías donde la sobreactivación de los receptores GABA_A, (por ejemplo a causa de la presencia de neuroesteroides tal como la alopregnanolona y/o la tetrahidroxicorticosterona), puede tener un efecto dañino tal como las epilepsias sensibles a los esteroides, la intoxicación alcohólica, el aprendizaje cognitivo, la sensibilidad dolorosa o los desordenes del sueño. Este sobreactivación de los receptores GABA_A, se puede caracterizar por efectos inhibidores o efectos excitadores.

El empleo de estos medicamentos comprende habitualmente la administración a estos mamíferos una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I y, en particular, de oxima de colest-4-en-3-ona, en particular para aumentar la supervivencia de las neuronas o favorecer el crecimiento axonal.

20 La invención tiene por objeto, igualmente, la disponibilidad de nuevos derivados del 4-colesten-3-ona como otros derivados del 4-colesten-3-ona que las que pueden haber sido descrito en el estado de la técnica. Por lo tanto, se excluyen los descritos en la literatura.

25 Las condiciones preferenciales más arriba descritas de empleo de los medicamentos de fórmula I se aplican también a los otros objetos de la invención contemplados más arriba, en particular, a las composiciones, nuevos derivados, utilizations e inversamente.

Los ejemplos que siguen ilustran la presente solicitud.

Ejemplo 1

Se preparó una suspensión que respondía a la fórmula

Oxima de colest-4-en-3-ona	20 mg por ml
30 Excipiente:	Emulsión aceitosa

Ejemplo 2

Se prepararon cápsulas de gelatina que respondían a la fórmula

Oxima de colest-4-en-3-ona	250 mg
----------------------------	--------

Excipiente: cantidad suficiente para una cápsula de gelatina terminada a 750 mg

35 **Ejemplo 3:** Oxima de 1,4-colestadien-3-ona (R = R1)

40 En un matraz de fondo redondo de 100 ml, se solubilizan 5 g de 1,4-colestadien-3-ona (13 mmoles) en 50 ml de piridina, luego se añaden 5 g de hidrocloreuro de hidroxilamina. La agitación se mantiene durante 24 h a temperatura ambiente, y se evapora el disolvente bajo presión reducida. Se añade agua, luego el acetato de etilo con el fin de efectuar una extracción. La fase orgánica se lava con una solución acuosa acidificada (HCl a 1%). El acetato de etilo se evapora bajo presión reducida. Se obtiene un polvo blanco con un rendimiento superior al 50%.

Análisis:

- Cromatografía Líquida/Espectrometría de Masa (Electrospray®)
- Condiciones de la cromatografía líquida de alto rendimiento:

Columna: Macherey-Nagel - Nucleosil® 300-6 C4 – 150 x 4,6 mm

45 Gradiente: agua (+ 0,05% TFA)/acetonitrilo (+ 0,05% ácido trifluoroacético)

t = 0 min: 60% acetonitrilo, 40% H₂O

t = 6 min: 100% acetonitrilo, 0% H₂O

luego se permanece 5 min a 100% de acetonitrilo

Tiempo de retención: 5 min 60 segundos

Pico detectado en espectrometría de masa: {M + H}⁺ = 398

5 **Ejemplo 4:** Oxima de 4,24-colestadien-3-ona (R = R2)

10 En un matraz de fondo redondo de 10 ml, se solubilizan 100 mg de 4,24-colestadien-3-ona (0,26 mmoles) en 5 ml de piridina, luego se añaden 100 mg de hidrocloreuro de hidroxilamina. La agitación se mantiene durante 24 h a temperatura ambiente, y se evapora el disolvente bajo presión reducida. Se añade agua, luego acetato de etilo con el fin de efectuar una extracción. Luego se lava la fase orgánica con una solución acuosa acidificada (HCl a 1%). El acetato de etilo se evapora bajo presión reducida. Se obtiene un polvo blanco con un rendimiento superior al 50%.

Análisis:

- Cromatografía Líquida/Espectrometría de Masa (Electrospray®)

Pico detectado en espectrometría de masa: {M+H}⁺ = 398

Ejemplo 5: Oxima de 4,22-cholesiadien-3-ona (R = R4)

15 En un matraz de fondo redondo de 10 ml, se solubilizan 10 mg de 4,22-colestadien-3-ona (0,026 mmoles) en 5 ml de piridina, luego se añaden 100 mg de hidrocloreuro de hidroxilamina. La agitación se mantiene durante 24 h a temperatura ambiente, y se evapora el disolvente bajo presión reducida. Ser añade agua, luego acetato de etilo con el fin de efectuar una extracción. Luego se lava la fase orgánica con una solución acuosa acidificada (HCl a 1%). El acetato de etilo se evapora bajo presión reducida. Se obtiene un polvo blanco con un rendimiento superior al 50%.

20 Análisis:

- Cromatografía Líquida/Espectrometría de Masa (Electrospray®)

Pico detectado en espectrometría de masa: {M+H}⁺ = 398

Ejemplo 6: Oxima de 4-estigmasta-en-3-ona (R = R3)

25 En un matraz de fondo redondo de 50 ml, se solubilizan 100 mg de 4-estigmasta-en-3-ona (0,24 mmoles) en 10 ml de piridina, luego se añaden 100 mg de hidrocloreuro de hidroxilamina. La agitación se mantiene durante 24 h a temperatura ambiente, y se evapora el disolvente bajo presión reducida. Se añade agua, luego acetato de etilo con el fin de efectuar una extracción. Luego se lava la fase orgánica con una solución acuosa acidificada (HCl a 1%). El acetato de etilo se evapora bajo presión reducida. Se obtiene un polvo blanco con un rendimiento superior al 50%.

Análisis:

- 30 - Cromatografía Liquidado/Espectrometría de Masa (Electrospray®)

Pico detectado en espectrometría de masa: {M+H}⁺ = 428

Ejemplo 7: Oxima de 4,6,22-Ergosta-trien-3-ona (R = R6)

35 En un matraz de fondo redondo de 50 ml, se solubilizan 100 mg de 4,6,22-Ergosta-trien-3-ona (0,25 mmoles) en 10 ml de piridina, luego se añaden 100 mg de hidrocloreuro de hidroxilamina. La agitación se mantiene durante 24 h a temperatura ambiente, y se evapora el disolvente bajo presión reducida. Se añade agua, luego acetato de etilo con el fin de efectuar una extracción. Luego se lava la fase orgánica con una solución acuosa acidificada (HCl a 1%). El acetato de etilo se evapora bajo presión reducida. Se obtiene un polvo blanco con un rendimiento superior al 50%.

Análisis:

- Cromatografía Líquida/Espectrometría de Masa (Electrospray®)

40 Pico detectado en espectrometría de masa: {M+H}⁺ = 410

Ejemplo 8: Oxima de 1,4,6-Colesta-trien-3-ona (R = R1)

45 En un matraz de fondo redondo de 50 ml, se solubilizan 100 mg de 1,4,6-Colesta-trien-3-ona (0,26 mmoles) en 10 ml de piridina, luego se añaden 100 mg de hidrocloreuro de hidroxilamina. La agitación se mantiene durante 24 h a temperatura ambiente, y se evapora el disolvente bajo presión reducida. Se añade agua, luego acetato de etilo con el fin de efectuar una extracción, luego se lava la fase orgánica con una solución acuosa acidificada (HCl a 1%). El

acetato de etilo se evapora bajo presión reducida. Se obtiene un polvo blanco con un rendimiento superior al 50%.

Análisis:

- Cromatografía Líquida/Espectrometría de Masa (Electrospray®)

Pico detectado en espectrometría de masa: $\{M+H\}^+ = 396$

5 ESTUDIO FARMACOLÓGICO

Se ensayaron los siguientes compuestos de fórmula 1:

Compuesto N°	
1	Oxima de colest-4-en-3-ona descrita en Gamma irradiation of colestenone oximes. Uenseren, Envare. Cekmece Nucl. Res. Train. Cent., Estambul, Turk. Avail. INIS. Report (1976), (CNAEM-R-157), 21 pp. From: INIS Atomindex 1977, 8(6), Abstr. No. 295540.
2	Compuesto del ejemplo 3
3	Oxima de colest-3-ona disponible comercialmente en Sigma-Aldrich
4	Colest-4,24-dien-3-ona descrita en Chemical synthesis of colest-5,7,24-trieno-3beta-ol and demonstration of its conversion to cholesterol in the rat. Scallen, Terence J. Univ. of Minnesota, Minneapolis, Biochemical and Biophysical Research Communications (1965), 21(2), 149-55.
5	4,22-colest-dien-3-ona. Descrita en 3-Keto- Δ^4 -steroids from 3-hydroxy-ene-4 (or ène-5)-steroids. Yamanaka, Toru; Imai, Takashi. (Takasago Perfumery Co., Ltd., Japan). JP 52116456 19770929 Showa. Application: JP 76-32979 19760325. CAN 88:136852 AN 1978:136852
6	Compuesto del ejemplo 4
7	Compuesto del ejemplo 5
8	Compuesto del ejemplo 6
9	5-beta-hidroxi-colest-3-ona disponible comercialmente en Sigma-Aldrich
10	5-alfa-hidroxi-colest-3-ona disponible comercialmente en Sigma-Aldrich
11	5-alfa-colest-6-en-3-ona disponible comercialmente en Sigma-Aldrich
12	24-metilcolest-4,6,22-trien-3-ona descrita en Preparation of 3-beta-hydroxy-(24R) - methylcholest-5-ene. Khripach, V. A.; Zhabinskii, V. N.; Zhemosek, E. V.; Lakhvich, F. A. (Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences, Belorussian S.S.R., USSR). U.S.S.R. (1990), y SU 1594181 19900923: SU 88-4612746 19881201. CAN 114:102558 AN 1991:102558
13	Oxima de colest-5-en-3-ona descrita en Gamma irradiation of colest-5-en-3-one oximes. Uenseren, Envare. Cekmece Nucl. Res. Train. Cent. Estambul, Turck. Avail. INIS. Report (1976), (CNAEM-R-157), 21 pp.
14	Oxima de colest-4,6-dien-3-ona descrita en Azasteroid from cholesta-4,6-dien-3-one. Ahmad, Mohammed S.; Siddiqui, A. H.; Shafiullah; Logani, S. C. Aligarh Muslim Univ., Aligarh, India. Australian Journal of Chemistry (1969), 22 (1), 271-4.
15	Compuesto del ejemplo 7
16	Oxima de 5- alfa-colest-1-en-3-ona descrita en Poliphosphoric acid-catalyzed Beckmann rearrangement of 3-keto-steroid oximas. Kobayashi, Masaru; Shimizu, Yuzuru; Mitsunashi, Hiroshi. Fac. Pharm. Sci., Hokkaido Univ., Sapporo, Japan. Chemical & Pharmaceutical Bulletin (1969), 17 (6), 1255-60.
17	Compuesto del ejemplo 8

1. Efectos de los compuestos de fórmula I sobre la supervivencia de las motoneuronas

Para poner en evidencia la acción neuroprotectora de los compuestos de fórmula I, la firma solicitante estudió su actividad sobre un modelo *in vitro* de privación trófica de motoneuronas de ratas. Se podrá referir útilmente a la solicitud de patente internacional n° 0142784 de la firma solicitante sobre el cultivo de las motoneuronas de médula espinal.

5 Se diseña la médula espinal de embriones E14 de rata y la parte ventral se disocia por trituración después de la tripsinización. Las motoneuronas son separadas de las otras células espinales por un método conocido (Camu et al, 1993, Purification of spinal motoneurons from chicken and rat embryos by immunopanning. En "Immunoselection Strategies for Neural cell culture", Neuroprotocols: A companion to Methods in Neurosciences 2, 191-199; Henderson et al, 1993, Neutrophins promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bud. Nature 363 (6426): 266-70). Las células se centrifugan sobre un gradiente de densidad. Las motoneuronas se enriquecen en la fracción de las grandes células (los menos densos). Las células de esta fracción se incuban con un anticuerpo anti-p75, un antígeno de superficie presente sobre las motoneuronas. Se añaden algunos anticuerpos secundarios acoplados a bolas magnéticas y la mezcla de células se pasa a través de una columna en un imán (Arce et al, 1999). Sólo las motoneuronas se retienen: su pureza es del orden de 90%.

15 Las motoneuronas se siembran a baja densidad en pocillos de cultivo sobre un sustrato de poliornitinalaminina en un medio neurobasal suplementario según Raoul et al, 1999, Programmed cell death of embryonic motoneurons triggered through the Fas death receptor. J Cell Biol 147 (5): 1049-62. Controles negativos (ausencia de factores tróficos) y positivos (en presencia de BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) a 1 ng/ml, GDNF (Glial-Derived Neurotrophic Factor) a 1 ng/ml y CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor) a 10 ng/ml, comercializados por la sociedad americana PEPROTECH, Inc. y la sociedad Sigma-Aldrich, se incluye en cada serie.

Los compuestos que se deben ensayar se añaden 60 minutos después de la siembra y se mantienen los cultivos a 37°C bajo un 5% de CO2 durante 3 días.

20 Las motoneuronas tienden espontánea a morir en ausencia de factores neurotróficas (Pettmann y Henderson, 1998, Neuronal cell death. Neuron 20 (4): 633-47). Después de 3 días, la supervivencia es evaluada por una medida de fluorescencia después de la incubación de las células en presencia de calceína que se vuelve fluorescente en las células vivas.

25 Después de 3 días en cultivo a 37°C, bajo 5% de CO2 y de humedad saturante, hasta 50% de las motoneuronas sembradas inicialmente sobreviven en el medio suplementario en factores neurotróficas, mientras que menos del 15% de las motoneuronas sobreviven en medio básico solo.

La actividad de los compuestos que se deben ensayar fue evaluada por su capacidad para impedir la muerte de las motoneuronas cuando se añaden al medio neurobasal en comparación con la supervivencia de las motoneuronas en medio suplementario con factores neurotróficos.

30 Los compuestos de fórmula I según la invención mostraron una actividad a una concentración capaz de permitir una mejor tasa de supervivencia de las motoneuronas en el medio basal. Esta tasa de supervivencia se expresa por una cifra, el ratio. Si el ratio es superior a 0, el efecto de los compuestos es positivo sobre la supervivencia de las motoneuronas.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

Compuesto nº	Concentración en µM	Ratio
1	5	1
2	5	0,6
6	5	0,5
7	6	0,25
8	10	0,3
15	5	0,2
17	5	0,3
9	1	0,5

35 Debido a su efecto trófico sobre las motoneuronas espinales, los compuestos de fórmula I según la invención se muestran, por lo tanto, útiles como medicamento, en particular, en el tratamiento de las amiotrofias, en particular en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica o de las amiotrofias espinales infantiles, y en el tratamiento de los traumatismos de la médula espinal.

2. Efectos de los compuestos de fórmula I sobre la neuroprotección

40 Se practica un axotomía del nervio facial sobre ratones recién nacidos con edad de 2-3 días. Los animales reciben la oxima de colest-4-en-3-ona 4 horas antes de la sección unilateral del nervio luego diariamente durante 5 días por vía subcutánea. Siete días después de la sección del nervio, se anestesia a los animales, luego se fijan por perfusión

intracardiaca de paraformaldehído. El cerebro se extrae entonces, se incluye en parafina. El análisis histológico de cortes seriados de 7 μm del núcleo facial, coloreados al cresilo violeta, permite contar el número de motoneuronas del lado intacto así como del lado del nervio seccionado (Casanovas et al., Prevention by lamotrigine, MK-801 and N omega-nitro-L-arginine methyl ester of motoneuron cell death after neonatal axotomy, Neuroscience, 1996, 71, 313-325).

Los resultados obtenidos son los siguientes:

La supervivencia de las motoneuronas del núcleo facial en ratas recién nacidas axotomizadas y tratada por la oxima de colest-4-en-3-ona se aumenta hasta 40% a una dosis comprendida entre 3 y 100 mg/kg, según la vía de administración, en comparación con el nervio no seccionado.

3. Efectos de los compuestos de fórmula I sobre la neuroprotección

Se practica un aplastamiento del nervio ciático sobre ratones adultos según el método descrito por Azzouz et al, Enhancement of mousse sciatic nerve regeneration by the largo chain fatty alcohol,N-hexacosanol, Exp. Neurol., 1996, 138: 189-97). Los animales reciben los compuestos que se deben ensayar el día del aplastamiento luego cada día durante 4 semanas y por vía subcutánea. Cada semana se anestesia a los animales para realizar un registro electromiográfico en el músculo de la pantorrilla después de estímulo supramaximal del nervio ciático. Se miden así la amplitud, la duración y la latencia de los potenciales de acción mencionados (CMAP). Cuatro semanas después del aplastamiento del nervio, los animales se sacrifican por inyección de una dosis mortal de anestésico y se extrae un segmento de nervio lesionado, fijado en glutaraldehído a 4% y se incluye en resina. El análisis histológico de cortes seriados, coloreados al azul de toluidina, permite un recuento semiautomatizado de las fibras degeneradas y no degeneradas, así como una medida del tamaño de los axones y del espesor de la envoltura de mielina de las fibras no degeneradas.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

La administración de la oxima de colest-4-en-3-ona reduce de 20 a 40% el número de fibras degeneradas por comparación con los animales no tratados. De manera aún más espectacular, la regeneración de las fibras nerviosas se estimula mucho por los compuestos que se deben ensayar a partir de la segunda semana después del aplastamiento, con un efecto máximo observado cuatro semanas después del aplastamiento. Así cuatro semanas después del aplastamiento, la amplitud de los CMAP en los ratones tratados por los compuestos que se deben ensayar a una dosis entre 0,3 y 30 mg/kg/día, según la vía de administración, se aumentan en 40 a 70% y la velocidad de conducción nerviosa mejorada de 30 a 50% por comparación con los ratones no tratados.

4. Efectos de los compuestos de fórmula I sobre la protección de las neuronas estriatales de la muerte inducida por la sobreexpresión de una forma mutada de la huntingtina

Se preparan cultivos primarios de neuronas estriatales tal como se describe en la literatura (Primary striatal neuronal culture, Mao L. et al, Methods mol Med., 2003, 79: 379-86). Las células se electroporan según el procedimiento descrito por Raoul et al, (Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. potentiation by ALS-linked SOD1 mutations Neuron, 2002, 35: 1067-83) antes de la siembra con un vector o plásmido de expresión que contiene un elemento promotor seguido del ADN codificador para una forma truncada del huntingtina que comprende los 480 primeros aminoácidos y 68 CAG (Saudou et al., Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions, Cell, 1998, 95: 55-66). Un segundo vector de expresión que contiene el ADN codificador la *green fluorescent protein* (GFP) se electropora también y sirve de gen reportero. El ADN del plásmido codificador la huntingtina fue preparado por purificación con el cloruro de cesio. El plásmido que contenía la secuencia GFP se preparó sobre columnas Qiagen. La integridad de las secuencias de ADN se verifica por secuenciado, transfección y western blotting. Las células que sobreviven a la electroporación se siembran a una densidad de 4000 células por pocillo de placas de 96 pocillos. El cultivo se hace en el medio Neurobasal (GIBCO) complementado con el piruvato y B-27 (Beckton Dickinson). Las células se mantienen en cultivo durante 7 días sin cambiar el medio.

Los tratamientos con los compuestos que se deben ensayar se hacen justo después de la siembra a una concentración final de 1 μm en 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO). Los controles positivos se hacen por adición de BDNF a 5 ng/ml final. Los controles negativos sólo reciben 0,5% de DMSO.

La muerte celular es evaluada después de 7 días por recuento del número de células vivas que expresan la GFP.

La actividad de los compuestos que se deben ensayar fue evaluada por su capacidad para impedir la muerte de las neuronas estriatales cultivadas en el medio neurobasal en comparación con la supervivencia de las neuronas estriatales en medio suplementario con el BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor).

Los resultados obtenidos son los siguientes:

Compuesto n°	Concentraciones en μM	Ratio
1	1	0,3
4	1	0,2
9	1	0,5
11	1	0,3
12	1	0,3

A la concentración de 10^{-6}M , los compuestos que se deben ensayar muestran un efecto protector de la muerte celular inducida por la huntingtina mutada hasta 60% en comparación con las células tratadas por el BDNF.

Debido a su efecto neuroprotector, los compuestos de fórmula I según la invención se muestran, por lo tanto, útiles como medicamentos destinado al tratamiento o a la prevención de las afecciones neurodegenerativas, en particular, en el tratamiento de las amiotrofias espinales, de la esclerosis lateral amiotrófica, en el tratamiento de los traumatismos de la médula espinal y de los nervios periféricos y en el tratamiento de la enfermedad de Huntington.

5. Efectos de los compuestos de fórmula I sobre la potencialización de los receptores GABA_A por los esteroides

Experiencias electrofisiológicas se realizaron *in vitro* con neuronas de rata (tramos de hipocampo, neuronas sensibles en cultivo), del siguiente modo:

- 10 Las experiencias se realizan con hipocampos extraídos sobre ratas de cepas Sprague Dawley de 10 a 21 días de edad. Los animales se sacrifican por decapitación, y se transfiere rápidamente su cerebro en el ACSF (Artificial Cerebro-Spinal Fluid) sin sodio (composición: KCl 2 mM, NaH₂PO₄ 1,2 mM, mgCl₂ 2 mM., CaCl₂ 0,5 mM, NaHCO₃ 26 mM, glucosa 11 mM, sacarosa 250 mM), mantenida a una temperatura de 4°C y gasificado con carbógeno (mezcla 95% de O₂, 5% CO₂). Se extrae los hipocampos de cada hemisferio cerebral luego se recortan en rodajas de 300 μM de espesor por un "tejido chopper". Las rodajas se ponen a reposar en el medio ACSF (composición: NaCl 126 mM, KCl 2 mM, NaH₂PO₄ 1,2 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 0,5 mM, NaHCO₃ 26 mM, glucosa 11mM) a temperatura ambiente, al menos una hora antes del registro. Una rodaja se deposita a continuación con la ayuda de una pipeta sobre un sistema de registro multielectrodo (MEA, MultiChannel Systems™, Germany) y posicionado de tal modo que cubra los 64 electrodos. Para evitar toda modificación de posicionamiento por el flujo de perfusión, se posiciona una rejilla lastrada por una "U" en platino sobre la rodaja. Rápidamente el MEA se inserta entonces en el sistema de registro y la cámara profundida con el ACSF gasificada al carbógeno; el medio de la cámara se conecta a la tierra. El ACSF profundido así como el MEA se mantienen a una temperatura de 37°C. Uno de los 60 electrodos se selecciona como electrodo de estimulación. Se genera una corriente de estimulación bifásica y de una intensidad de 300 μA durante 0,1 ms a partir de este electrodo a razón de una estimulación cada 30 segundos. Las respuestas mencionadas se visualizan simultáneamente a nivel de otros 59 electrodos del MEA. Los axones de los colaterales de Schaeffer se estimulan en CA3. En la región CA1, se seleccionan 6 a 12 electrodos para registrar los potenciales de campo que corresponden a la suma de las variaciones de los potenciales postsinápticos de las neuronas situadas en proximidad de cada electrodo. Las moléculas ensayadas se disuelven en el medio ACSF (la concentración final en DMSO es $\leq 0,1\%$) y se proporcionan sobre la rodaja gracias al sistema de perfusión.
- 20
- 25
- 30 Las neuronas sensibles de rata se cultivan 1 a 2 días y se registran a continuación con la técnica de patch-clamp tal como se describe en De Roo M. et al (Dehydroepiandrosterone potentiates native ionotropic ATP receptors containing the P2X2 subunit in rat sensory neurones, J Physiol, 2003, 552: 59-71).

Los resultados obtenidos son los siguientes:

- 35 Sobre las rodajas de hipocampo, una pequeña fracción de los potenciales post sinápticos de campo registrados en la región CA1 corresponde a una transmisión GABA_A excitante: se bloquea por antagonistas clásicos de los receptores GABA_A (20 μM bicuculina o 50 μM picrotoxina) y potencializada por moduladores alostéricos positivos de los receptores GABA_A: benzodiazepina (1-10 μM de Diazepam) y esteroides (10-1000 nM alopregnanolona o tetrahydrocorticosterona). El efecto potenciador de los esteroides desaparece cuando los receptores GABA_A se desensibilizan por la adición de una concentración saturante de GABA (10 mM). El efecto excitador del GABA está vinculado al paso de los iones hidrogenocarbonatos (HCO₃) a través de los receptores GABA_A.
- 40

En las neuronas sensibles registradas en patch-clamp, se mencionan algunas corrientes abriendo selectivamente a los receptores GABA_A de estas neuronas por aplicación rápida de un agonista GABA_A-selectiva, la isoguvacina. Las corrientes de cloro así mencionados se bloquean por la bicuculina y potencializadas por la alopregnanolona.

- 45 Los resultados ponen de manifiesto que la oxima de colest-4-en-3-ona (ensayado solo hasta 10 μM) no tiene efecto sobre los receptores GABA_A (rodaja de hipocampo o neuronas sensibles). Por el contrario, la oxima de colest-4-en-3-ona es capaz de bloquear el efecto de moduladores alostéricos positivos (alopregnanolona o tetrahydrocorticosterona) de los receptores GABA_A y esto de manera dosis-dependiente y para concentraciones

equivalentes a la de aquellas en que se observan los efectos neurotróficas *in vitro*.

- 5 Los compuestos de fórmula I tienen, por lo tanto, un efecto “protector” en todas las patologías en que la sobreactivación de los receptores GABA_A, a causa de la presencia de alopregnanolona y/o de tetrahidroxicorticosterona, puede tener un efecto dañino, tanto para efectos inhibidores como sobre efectos excitadores mediados por los receptores GABA_A.

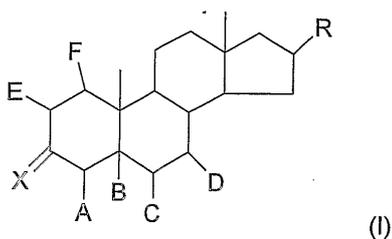
Estudio toxicológico

La administración en el ratón, en particular de la oxima de la colest-4-en-3-ona, por las vías orales, subcutáneas, intraperitoneal e intravenosa, a una dosis que llega hasta 300 mg/kg/día, por tratamiento con administración diaria que puede llegar hasta 28 días, no mostró toxicidad significativa.

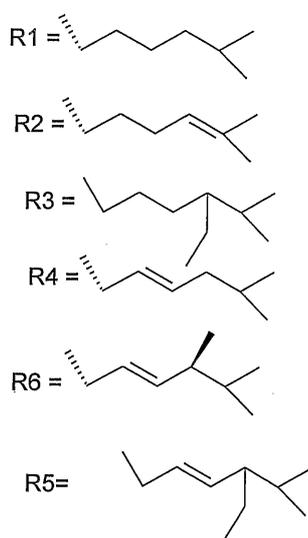
- 10 En el mono, la administración por vía oral de dosis crecientes diarias hasta 1500 mg/kg sobre un período de 10 días no reveló ninguna toxicidad.

REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto que responde a la fórmula I



5 en la cual X representa un grupo = N-OH,
R representa un grupo elegido entre



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

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

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

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

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

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

o una de sus sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables,

15 para su utilización en un método de tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal, es decir, como medicamento.

2.- Un compuesto según la reivindicación 1 para su utilización según la reivindicación 1, caracterizado porque en la fórmula I, A representa junto con B un enlace carbono-carbono, C, D, representan un átomo de hidrógeno, E, F representan un átomo de hidrógeno o juntos un enlace carbono-carbono y R tiene el mismo significado que R1, es decir, la oxima de colest-4-en-3-ona o la oxima de 1,4-colestadien-3-ona, o una de sus sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables, para su utilización como medicamento.

20

3.- Un compuesto según la reivindicación 1, para su utilización según la reivindicación 1, caracterizado porque en la fórmula I, A representa junto con B un enlace carbono-carbono, C, D representan un átomo de hidrógeno, E, F representan un átomo de hidrógeno y R tiene el mismo significado que R2 o R3 o R4, o una de sus sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables, para su utilización como medicamento.

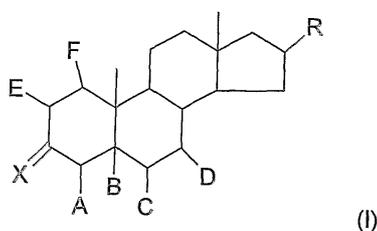
25

4.- Un compuesto según la reivindicación 1, para su utilización según la reivindicación 1, caracterizado porque en la fórmula I, A representa junto con B un enlace doble, C representa junto con D un enlace carbono-carbono, E, F representan un átomo de hidrógeno y R tiene el mismo significado que R1 o R6, o una de sus sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables, para su utilización como medicamento.

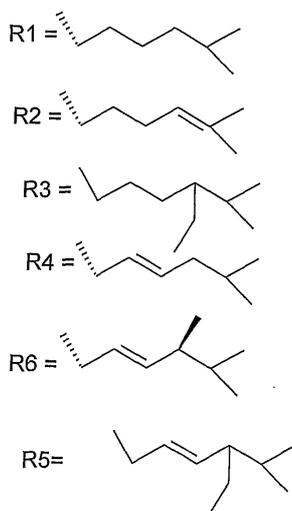
5 5.- Un compuesto según la reivindicación 1, para su utilización según la reivindicación 1, caracterizado porque en la fórmula I A representa junto con B un enlace carbono-carbono, C representa junto con D un enlace carbono-carbono, E representa junto con F un enlace carbono-carbono y R tiene el mismo significado que R1, o una de sus sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables, para su utilización como medicamento.

10 6.- Un compuesto según la reivindicación 1, para su utilización según la reivindicación 1, caracterizado porque en la fórmula I E representa junto con F un enlace carbono-carbono, C, D, A, B, representan un átomo de hidrógeno y R tiene el mismo significado que R1, o una de sus sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables, para su utilización como medicamento.

7.- Utilización de un compuesto de fórmula I



15 en que X representa un grupo = N-OH o un átomo de oxígeno, y R representa un grupo elegido entre



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

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

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

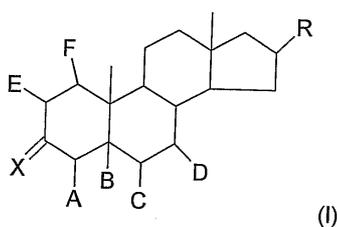
20 D representa un átomo de hidrógeno o junto con C un enlace carbono-carbono,

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

F representa un átomo de hidrógeno o junto con E un enlace carbono-carbono, o una de sus sales de adición con los ácidos farmacéuticamente aceptables, para la obtención de un medicamento destinado a ser utilizado como neuroprotector.

25 8.- Utilización, según la reivindicación 7 caracterizada porque el medicamento neuroprotector está destinado al tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.

- 5 9.- Utilización, según la reivindicación 7 u 8 caracterizada porque el medicamento neuroprotector está destinado al tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa elegida entre la enfermedad de Huntington, enfermedades crónicas neurodegenerativas, hereditarias o esporádicas, las lesiones neuronales vinculadas al envejecimiento, las neuropatías periféricas hereditarias o lesionales, la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, las neuropatías diabéticas o inducidas por los tratamientos anticancerígenos, los traumatismos del cerebro, de los nervios periféricos o de la médula espinal, las isquemias del cerebro o de la médula espinal, las degeneraciones hereditarias, lesionales o vinculadas al envejecimiento de las neuronas sensoriales de la visión o las degeneraciones del nervio óptico, las degeneraciones hereditarias, traumáticas o vinculadas al envejecimiento de las neuronas sensoriales de la audición, las atrofas lobares y las demencias vasculares, las enfermedades y traumatismos vinculados a la degeneración de las motoneuronas, las amiotrofias espinales, la esclerosis en placas y los traumatismos de la médula espinal o de los nervios motrices periféricos.
- 10 10.- Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 caracterizada porque el medicamento neuroprotector está destinado al tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa elegida entre las patologías o traumatismos vinculados a la degeneración o a la muerte de las neuronas, en mamíferos alcanzados de tales patologías o traumatismos.
- 15 11.- Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 caracterizada porque el medicamento neuroprotector está destinado al tratamiento de las amiotrofias espinales infantiles.
- 12.- Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 caracterizada porque el medicamento neuroprotector está destinado al tratamiento de las esclerosis laterales amiotróficas.
- 20 13.- Utilización, según la reivindicación 7 caracterizada porque el medicamento neuroprotector está destinado al tratamiento de la sensibilidad dolorosa o de los dolores neuropáticos crónicos.
- 14.- Utilización, según la reivindicación 7 caracterizada porque el medicamento neuroprotector está destinado al tratamiento de las lesiones traumáticas del sistema nervioso.
- 25 15.- Utilización, según la reivindicación 7 caracterizada porque el medicamento neuroprotector está destinado al tratamiento de las epilepsias sensibles a los esteroides, los desordenes del sueño o la intoxicación alcohólica.
- 16.- Utilización, según la reivindicación 7 caracterizada porque el medicamento neuroprotector está destinado al tratamiento del aprendizaje cognoscitivo o los desordenes de la memoria.
- 17.- Utilización, según la reivindicación 7 caracterizada porque el medicamento neuroprotector está destinado al tratamiento del ansiedad o de la depresión.
- 30 18.- Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 17 caracterizada porque el compuesto de fórmula I según la reivindicación 1 es la oxima de colest-4-en-3-ona.
- 19.- Un compuesto que responde a la fórmula I



- en la cual X representa un radical =N-OH y
- 35 - A representa junto con B un enlace carbono-carbono, C, D representan un átomo de hidrógeno, E representa junto con F un enlace carbono-carbono y R tiene el mismo significado que R1, o
- A representa junto con B un enlace carbono-carbono, C, D representan un átomo de hidrógeno, E, F representan un átomo de hidrógeno y R tiene el mismo significado que R2 o R4, o
- 40 - A representa junto con B un enlace carbono-carbono, C representa junto con D un enlace carbono-carbono, E, F representan un átomo de hidrógeno y R tiene el mismo significado que R6, o
- A representa junto con B un enlace carbono-carbono, C representa junto con D un enlace carbono-carbono, E representa junto con F un enlace carbono-carbono y R tiene el mismo significado que R1, así como sus sales de adición con los ácidos minerales u orgánicos.

20.- Una composición farmacéutica caracterizada porque contiene como principio activo uno al menos de los medicamentos tales como se definen en la reivindicación 1, así como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

21.- Una composición farmacéutica caracterizada porque contiene como principio activo uno al menos de los medicamentos tales como se definen en la reivindicación 2 así como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 22.- Una composición farmacéutica caracterizada porque contiene como principio activo uno al menos de los medicamentos tales como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, así como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

23.- Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 22, caracterizada porque el excipiente farmacéuticamente aceptable es al menos un aceite vegetal o animal.