

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 216**

51 Int. Cl.:
A61K 31/444 (2006.01)
A61P 25/14 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/18 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01)
A61P 9/04 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06762898 .2**
96 Fecha de presentación: **28.07.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1909912**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2008**

54 Título: **Uso de colismicina A como inhibidor del estrés oxidativo**

30 Prioridad:
29.07.2005 EP 05380175

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.10.2012

73 Titular/es:
NOSCIRA, S.A. (50.0%)
Avenida de la Industria, 52
28760 Tres Cantos, Madrid , ES y
INSTITUTO BIOMAR S.A. (50.0%)

72 Inventor/es:
MARTÍNEZ GIL, ANA;
USÁN EGEA, PAOLA;
MEDINA PADILLA, MIGUEL;
GARCÍA PALOMERO, ESTHER;
PÉREZ BAZ, JULIA;
FERNÁNDEZ CHIMENO, ROSA ISABEL;
FERNÁNDEZ MEDARDE, ANTONIO;
CAÑEDO HERNÁNDEZ, LIBRADA MARÍA;
ROMERO MILLÁN, FRANCISCO;
CASTRO MORERA, ANA;
ALONSO CASCÓN, MERCEDES y
SÁNCHEZ QUESADA, JORGE

74 Agente/Representante:
ARIAS SANZ, Juan

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 2 389 216 T3

DESCRIPCIÓN

Uso de colismicina A como inhibidor del estrés oxidativo

Campo de la invención

La presente invención está relacionada con el uso de Colismicina A como inhibidor del estrés oxidativo en células y su uso para la preparación de medicamentos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades o condiciones inducidas por estrés oxidativo, especialmente enfermedades neurodegenerativas, tales como Enfermedad de Alzheimer y Enfermedad de Parkinson.

Antecedentes de la invención

La Enfermedad de Alzheimer (EA) y la Enfermedad de Parkinson (EP) son las enfermedades neurodegenerativas más frecuentes, y afectan a millones de personas en el mundo. Debido a que un importante porcentaje de los pacientes comparten características clínicas y patológicas comunes de ambas enfermedades, esto parece indicar la existencia de un mecanismo patológico común. Basado en datos *in vivo* e *in situ*, un modelo molecular unificado de estrés oxidativo inducido por dopamina (DA), 6-hidroxidopamina (6-OHDA); 5,6 y 5,7-dihidrotriptamina (5,6 y 5,7-DHT); beta amiloide 25-35 (A β 25-35) y metales como por ejemplo hierro (Fe²⁺), cobre (Cu²⁺), zinc (Zn²⁺), manganeso (Mn²⁺), ha sido ampliamente propuesto como una posible explicación de la pérdida neuronal en casos en los que coinciden EA y EP. Esta hipótesis podría contribuir a un mejor entendimiento de las cascadas patofisiológicas de ambos trastornos, y además apoyar la idea de que el estrés oxidativo generado por H₂O₂ representa una molécula esencial en la señalización intracelular que conduce a la muerte celular.

Por lo tanto, una aproximación interesante para desarrollar nuevos compuestos farmacéuticos para tratar enfermedades neurodegenerativas puede ser el diseño de compuestos los cuales inhiben el estrés oxidativo celular. Las especies oxigenadas reactivas (ROS), tales como el radical superóxido (O₂⁻) o el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), se producen durante los procesos metabólicos normales y desempeñan diversas funciones útiles (*Reactive oxygen species and the central nervous system*, Halliwell B., *J. Neurochem.*; 1992, 59 859: 1609-1623). Las células están provistas con varios mecanismos para controlar los niveles de estos agentes oxidativos, por ejemplo, la superóxido dismutasa (SOD), el glutatión o la vitamina E. En condiciones fisiológicas normales, existe un equilibrio entre las ROS y estos mecanismos antioxidativos. Una producción excesiva de ROS y una pérdida de eficiencia de las defensas antioxidativas pueden conducir a afecciones patológicas en las células y a provocar daño en los tejidos. Este hecho parece ocurrir más drásticamente en neuronas, debido a su gran actividad metabólica, y por eso parece estar relacionado con una serie de procesos degenerativos, enfermedades y síndromes, como por ejemplo, Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y esquizofrenia (*Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration*, Schulz et al., *Eur. J. Biochem.*; 2000, 267, 4904-4911). También otras enfermedades o condiciones patológicas se han relacionado con el estrés oxidativo, tales como la Enfermedad de Huntington (*Oxidative damage in Huntington's disease*, Segovia J. and Pérez-Severiano F, *Methods Mol. Biol.*; 2004; 207: 321-334), daños cerebrales, tales como apoplejía e isquemia, (*Oxidative Stress in the Context of Acute Cerebrovascular Stroke*, El Kossi et al., *Stroke*; 2000; 31: 1889-1892), diabetes (*Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy*, Wiernsperger NF, *Diabetes Metab.*; 2003; 29, 579-85), esclerosis múltiple (*The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy*, Gilgun-Sherki Y. et al., *J. Neurol.*; 2004; 251 (3): 261-8), epilepsia (*Oxidative injury in epilepsy: potential for antioxidant therapy?*, Costello D.J. and Delanty N., *Expert. Rev. Neurother.*; 2004; 4(3):541-553), aterosclerosis (*The oxidative stress hypothesis of atherogenesis*, Iuliano L., *Lipids*; 2001; 36 suppl: S41-44), Ataxia de Friedreich (*Oxidative stress mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia*, Calabrese et al., *J. Neurol. Sci.*; 2005) e insuficiencia cardíaca (*Oxygen, oxidative stress, hypoxia and heart failure*, Giordano F.J., *J. Clin. Invest.*; 2005; 115 (3): 500-508). Los tratamientos que condujeran a un potenciamiento de los mecanismos antioxidativos podrían aminorar la progresión de algunas de las enfermedades mencionadas.

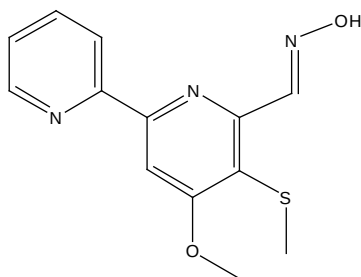
Las Colismicinas son 2-2'-bipiridinas las cuales han sido aisladas de especies de *Streptomyces*. Varios tipos de estas moléculas fueron aislados por primera vez por Gomi et al. (*Novel Antibiotics SF2738A, B and C and their analogues produced by Streptomyces sp.*, Gomi et al., *J. Antibiot.*, 1994, 47:1385-1394) de un cultivo de *Streptomyces* sp. SF2738, y su estructura fue descrita mediante análisis de espectros y conversión química. Las actividades biológicas de distintos tipos de Colismicinas también fueron estudiadas, y entre ellas, especialmente la Colismicina A, para la cual se describió que posee actividad antibiótica contra alguna bacterias y un amplio rango de hongos. Esta actividad antifúngica contra algunas especies, tales como *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*, ha sido demostrada por Stadler et al. (*Antifungal Actinomycete Metabolites Discovered in a Differential Cell-Based Screening Using a Recombinant TOPO1 Deletion Mutant Strain*, Stadler et al., *Arch. Pharm. Med. Chem.*, 2001, 334:143-147). Dos cepas de levaduras, una salvaje (ScAL 141 y una mutante (ScAL 143) con una delección en topoisomerasa I (TOPO1), se utilizaron para seleccionar compuestos producidos por las cepas de actinomicetos WS1410 y BS1465. Estas cepas de levaduras se usaron también para probar las actividades biológicas de Colismicinas, entre otros compuestos, con la actividad de la camptotecina como referencia. Los resultados muestran que el mecanismo de acción de las Colismicinas no se basa en la inhibición de topoisomerasa I, ya que las Colismicinas son activas tanto contra la cepa salvaje como para la mutante.

La citotoxicidad es otra actividad biológica de algunas Colismicinas que ha sido descrita. Esta propiedad fue demostrada también por Gomi et al. (ver arriba) en un estudio de la capacidad citotóxica de estas moléculas sobre células leucémicas murinas P388. El documento JP5078322 está relacionada con el uso de Colismicinas A y B como sustancias antitumorales, útiles como agentes carcinostáticos, para administración parenteral u oral. Numerosas publicaciones de patente se refieren al uso de Colismicina A y B en combinación con otros agentes antitumorales. Este es el caso, por ejemplo, del documento WO02/053138, en el cual se desvela el uso de incensol y/o furanogermacrenos, sus derivados, metabolitos y precursores, en el tratamiento de neoplasias, particularmente neoplasias resistentes y trastornos del tipo desregulación inmunológica. Estos compuestos pueden ser administrados solos o en combinación con quimioterápicos convencionales, antivirales, agentes antiparasitarios, radiación y/o cirugía. Los agentes quimioterápicos listados incluyen Colismicinas A y B.

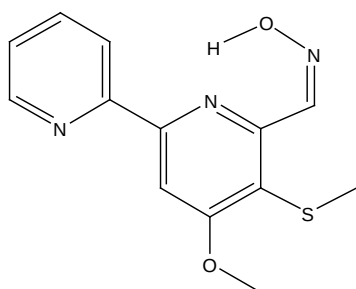
Otra actividad biológica de las Colismicinas fue descrita por Shindo et al. en 1994 (*Collismycins A and B, novel non-steroidal inhibitors of dexamethasone-glucocorticoid receptor binding*, Shindo et al., *J. Antibiot.*, 1994, 47:1072-1074). Se sugirió que la Colismicina A y su isómero B podrían tener actividad antiinflamatoria inhibiendo la unión al receptor de dexametasona-glucocorticoide, aunque no parece que se hayan publicado resultados complementarios a este estudio.

Una síntesis de Colismicina A ha sido descrita por Trécourt et al. En 1998 (*First Synthesis of Caerulomycin E and Collismycins A and C. A New Synthesis of Caerulomycin A*, Trécourt et al. *J. Org. Chem.*, 1998, 63:2892-2897) partiendo de N-óxido de 2,2'-bipiridina. La funcionalización en el C-4 y el C-6 a través de diferentes rutas conduce a 6-bromo-4-metoxi-2,2'-bipiridinas; una posterior reacción de metalación introduce un resto metiltio en el C-5. En un último paso de la ruta de síntesis, el Br en el C-6 se sustituye por un grupo formilo el cual reacciona con hidroxilamina para proporcionar Colismicina A.

En particular, Colismicina A presenta la siguiente estructura:



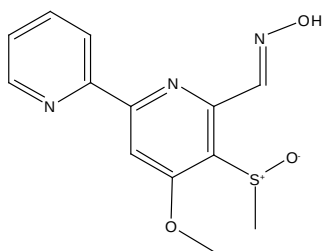
y Colismicina B:



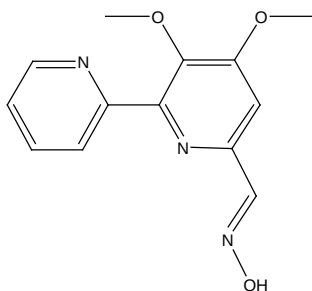
Algunos otros compuestos derivados de 2,2'-bipiridina con estructuras similares a la de Colismicina han sido descritos en la bibliografía.

Algunos ejemplos son:

Pirisulfoxin-A (N.Tsuge et al., J. Antibiot. 52 (1999) 505-7)

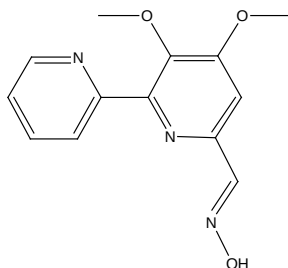


Caerulomicina-B; Cerulomicina-B

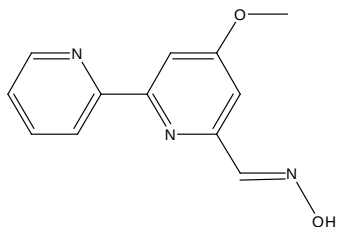


5

Caerulomicina-C; Cerulomicina-C



Caerulomicina; Caerulomicina-A; Cerulomicina



Sumario de la invención

10 Se ha encontrado ahora que la Colismicina A muestra una fuerte inhibición del estrés oxidativo en células.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención se refiere al uso de Colismicina A en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad o condición inducida por el estrés oxidativo seleccionado del grupo formado por Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Huntington, Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS), Esclerosis Múltiple (ML), ataxia de Friedreich, disquinesia tardía, lesiones cerebrales, tales como isquemia, daño por reperusión o apoplejía, infarto de miocardio, esquizofrenia, aterosclerosis, insuficiencia cardíaca, diabetes, especialmente diabetes tipo II, epilepsia y demencia por SIDA.

15

El compuesto a usar de acuerdo con la invención es

o sus sales y solvatos farmacéuticamente aceptables.

El término "enfermedad o condición inducida por el estrés oxidativo", como se usa en el presente documento, significa cualquier enfermedad u otra condición perjudicial inducida o co-inducida por estrés oxidativo.

5 Preferiblemente, la enfermedad o condición inducida por estrés oxidativo es una enfermedad o condición neurodegenerativa.

Según una realización preferida de la presente invención, la enfermedad neurodegenerativa es la Enfermedad de Alzheimer.

Según otra realización preferida, la enfermedad o condición neurodegenerativa es la Enfermedad de Parkinson.

Según una realización adicional, la enfermedad o condición neurodegenerativa es apoplejía o isquemia.

10 Breve descripción de las figuras

Figura 1.- Resultados de ensayo de toxicidad en células SHSY5Y de neuroblastoma humano, la actividad de la Lactato deshidrogenasa se mide después de incubación a diferentes concentraciones de Colismicina A.

Figura 2.- Resultados de ensayo de neuroprotección sobre células de neuroblastoma humano expuestas a estrés oxidativo inducido por H_2O_2 , incubación previa con Colismicina A.

15 Figura 3.- Resultados de ensayo de supervivencia celular sobre células de neuroblastoma humano expuestas a estrés oxidativo inducido por H_2O_2 , incubación previa con Colismicina A.

Figura 4.- Efecto protector de preincubación de 2 horas a diferentes concentraciones de Colismicina A contra la toxicidad causada por 6-hidroxidopamina.

20 Figura 5.- Diagrama que muestra la supervivencia celular previa preincubación de 2 horas a diferentes concentraciones de Colismicina A, comparada con 6OHDA y NAC.

Figura 6.- Neuroprotección contra la muerte celular inducida por 6OHDA, previa preincubación de 1 hora con Colismicina A.

Figura 7.- Diagrama que muestra la supervivencia de células previa preincubación de 1 hora a diferentes concentraciones de Colismicina A, comparada con 6OHDA y NAC.

25 Descripción detallada de la invención

El compuesto de esta invención muestra buenas propiedades respecto a la inhibición del estrés oxidativo causado por H_2O_2 y la protección celular contra los efectos perjudiciales de la toxina 6-hidroxidopamina, las cuales son similares o incluso mejores que las propiedades del control ampliamente usado NAC (N-acetilcisteína); simultáneamente, el compuesto muestra muy altos niveles de supervivencia celular.

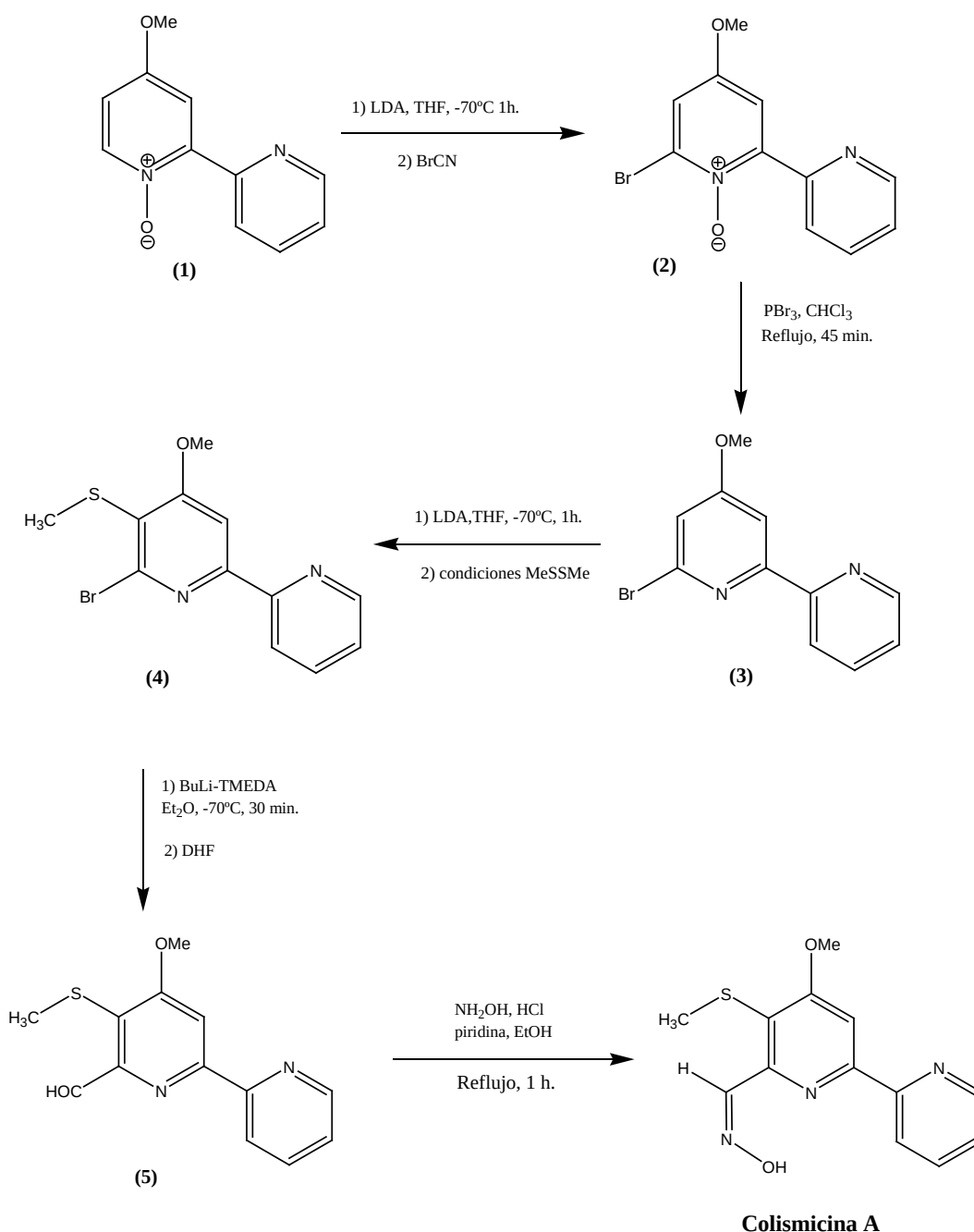
30 El término "sales, solvatos, profármacos farmacéuticamente aceptables" se refiere a cualquier sal, solvato farmacéuticamente aceptable, que, tras su administración al receptor, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto tal y como se describe en el presente documento. No obstante, se observará que las sales farmacéuticamente inaceptables también caen dentro del alcance de la invención, ya que éstas pueden ser
35 útiles para la preparación de sales farmacéuticamente aceptables. La preparación de sales, se puede llevar a cabo mediante procedimientos conocidos en la técnica.

Por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables son sintetizadas a partir del compuesto descrito anteriormente que contiene un resto básico o ácido mediante procedimientos químicos convencionales. En general, tales sales son preparadas, por ejemplo, reaccionando las formas ácidas o básicas libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o el ácido apropiados en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de ambos.

40 En general, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Ejemplos de las sales de adición de ácido incluyen sales de adición de ácidos minerales tales como, por ejemplo, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, nitrato, fosfato, y sales de adición de ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, acetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metanosulfonato y p-toluensulfonato. Ejemplos de sales de adición alcalinas incluyen sales inorgánicas tales como, por ejemplo, sales de
45 sodio, potasio, calcio, amonio, magnesio, aluminio y litio, y sales alcalinas orgánicas tales como, por ejemplo, etilendiamina, etanolamina, N,N-dialquilenetanolamina, trietanolamina y glucamina y sales de aminoácidos básicos.

El compuesto arriba definido se puede obtener a partir de fuentes naturales, mediante modificaciones sintéticas del compuesto natural o mediante síntesis total usando procedimientos de síntesis disponibles. Tal y como se menciona arriba, según Trécourt et al. (*First Synthesis of Caerulomycin E and Collismycins A and C. A New Synthesis of Caerulomycin A*, Trécourt et al. *J. Org. Chem.*, 1998, 63:2892-2897), se puede llevar a cabo una síntesis de
50 Colismicina A partiendo de N-óxido de 2,2'-bipiridinas.

Esta ruta implica principalmente reacciones eficientemente controladas, tales como metalación y acoplamiento cruzado:



- 5 La ruta de síntesis parte del N-óxido de 4-metoxi-2,2'-bipiridina (**1**), el cual puede ser fácilmente preparado a partir de la 2,2'-bipiridina mediante una secuencia de tres etapas ya conocida (Wenkert, D., Woodward, R.B., *J. Org. Chem.* 1983, 48, 283). La primera parte del proceso de síntesis implica una funcionalización en el carbono en posición seis (C-6) del compuesto (**1**). Una metalación del N-óxido de 4-metoxi-2,2'-bipiridina usando LDA a -70°C y BrCN como electrófilo se lleva a cabo para obtener un N-óxido de bromo (**2**). Esta molécula se reduce posteriormente con PBr₃, dando lugar a la 6-bromo-4-metoxi-2,2'-bipiridina (**3**) con un buen rendimiento.

En una segunda secuencia de reacciones, la bromo-bipiridina obtenida se somete a otra metalación en las mismas condiciones de LDA a -70°C pero usando metil disulfuro como electrófilo (Turner J.A., *J. Org. Chem* 1983, 48, 3401) para introducir un grupo metiltio en el C-5, obteniendo el compuesto (**4**). Las condiciones tienen que ser cuidadosamente optimizadas para evitar sustituciones secundarias del bromo en C-6 por un grupo metiltio antes de la hidrólisis (*First Synthesis of Caerulomycin E and Collismycins A and C. A New Synthesis of Caerulomycin A*,

Trécourt et al. *J. Org. Chem.*, 1998, 63:2892-2897). Para llegar hasta la molécula objetivo, Colismicina A, la funcionalización del C-6 se lleva a cabo a través de una estrategia de intercambio de bromo-litio. El quelato BuLi-TMEDA realiza este intercambio, y el derivado de litio obtenido se somete a una reacción de "quenching" en presencia de DMF para dar un aldehído (5). La reacción de este aldehído con hidroxilamina conduce a Colismicina A (6).

Otros procedimientos alternativos se pueden encontrar en Org. Lett. 2002, 4(14) 2385 - 2388; J. Org. Chem. 2002, 67(10), 3272 - 3276; J. Org. Chem. 1996, 61(5), 1673 - 1676.

Procedimientos adicionales alternativos serán evidentes para los expertos en la técnica, usando reacciones convencionales en química orgánica tales como las descritas en "March's Advanced Organic Chemistry" 5ª Edición, 2001 Wiley-Interscience.

El compuesto de la invención puede estar en forma cristalina, bien como compuesto libre o como solvato (por ejemplo hidrato) y se pretende que ambas formas estén dentro del ámbito de la presente invención. Los procedimientos de solvatación son generalmente conocidos en la técnica. Los solvatos adecuados son los solvatos farmacéuticamente aceptables. En una realización particular el solvato es un hidrato.

El compuesto o sus sales o solvatos están preferiblemente en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura. Se entiende como forma farmacéuticamente aceptable, entre otros, la que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable, excluyendo aditivos farmacéuticos normales, tales como diluyentes y vehículos, y no incluyendo cualquier material considerado tóxico a niveles normales de dosis. Los niveles de pureza para las sustancias de medicamentos están preferiblemente por encima de 50%, más preferiblemente por encima de 70%, y los más preferidos por encima de 90%. En una realización preferida está por encima de 95% del compuesto, o sus sales o solvatos.

El compuesto de la presente invención representado por la fórmula descrita arriba puede incluir enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales, o isómeros dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo Z, E). Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y sus mezclas caen dentro del ámbito de la presente invención.

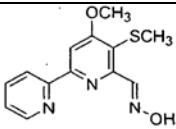
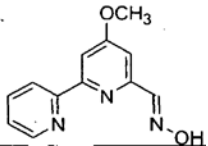
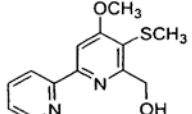
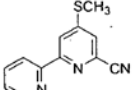
El compuesto y composiciones de esta invención pueden ser usados junto a otros fármacos para proporcionar una terapia combinada. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición, o proporcionarse como una composición separada para su administración en el mismo momento o en diferente momento.

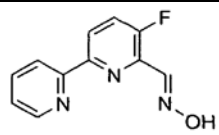
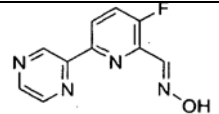
Con los siguientes ejemplos se pretende describir adicionalmente la invención.

Ejemplos

Biología

Los siguientes compuestos se ensayaron para determinar su toxicidad, su capacidad de protección contra la muerte celular inducida por peróxido de hidrógeno y su capacidad de protección contra la muerte celular inducida por 6-OHDA.

Colismicina A	
Colismicina A	
Colismicina C	
Compuesto 1	

Compuesto 2	
Compuesto 2	

Toxicidad

Los efectos potenciales de Colismicina A sobre la viabilidad celular de los compuestos ensayados se ensayan en células SH-SY5Y de neuroblastoma humano, mediante la cuantificación de la liberación de actividad de lactato deshidrogenasa (LDH). Las células SH-SY5Y de neuroblastoma humano se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos con 10^4 células por pocillo. Posteriormente el medio se elimina y las células se incuban con diferentes concentraciones de los compuestos durante 24 horas. Los compuestos se ensayan a concentraciones finales de 1, 10, 100 y 1000 μM , en medio de cultivo reciente. Pasadas 24 horas, el medio se elimina y las células adheridas al fondo del pocillo son lisadas añadiendo 50 μl de Krebs-Hepes; Triton X-100 al 1% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para la cuantificación de la liberación de LDH, los inventores usan el kit de detección de citotoxicidad de Roche (Cat. No. 11644 793 001). La actividad de LDH se mide mediante su absorbancia a 492 nm respecto a una longitud de onda de 620 nm.

Los resultados de la Colismicina A se muestran en la Figura 1. Solamente se observó un efecto sobre la viabilidad celular a 1000 μM , la mayor concentración ensayada

La Caerulomicina A, la Colismicina A y el Compuesto 2 se ensayaron a una concentración máxima de 1000 μM , y resultaron no tóxicas. El compuesto 1 y el Compuesto 3 se ensayaron a una concentración máxima de 5 y 10 μM respectivamente y resultaron no tóxicos

Protección frente a la muerte celular inducida por peróxido

El objetivo de este ensayo es determinar el efecto neuroprotector cuando células de neuroblastoma humano son expuestas a estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno, el cual es altamente perjudicial para la célula y su acumulación causa oxidación en dianas celulares tales como ADN, proteínas y lípidos, provocando mutagénesis y muerte celular.

Células SH-SY5Y de neuroblastoma humano se siembran en placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de 10^4 células por pocillo. Las células se exponen a diferentes concentraciones del compuesto una hora antes de su tratamiento con H_2O_2 100 μM durante 24 horas. NAC a 5 mM, un conocido agente antioxidante, fue utilizado como control positivo y se preincubó 1 hora antes del tratamiento con H_2O_2 . Pasadas 24 horas, se eliminó el medio y las células adheridas al fondo del pocillo se lisan añadiendo 50 μl de Triton X-100 al 1% en Krebs-Hepes durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para la cuantificación de la liberación de LDH, se usa el kit de detección de citotoxicidad de Roche (Cat. No. 11644 793 001).

Los resultados para la neuroprotección de Colismicina A a diferentes concentraciones, comparados con la neuroprotección de NAC a 5 mM, se muestran en la Figura 2.

La supervivencia celular fue determinada en paralelo en el mismo ensayo. La Figura 3 muestra los resultados obtenidos para diferentes concentraciones de Colismicina A, conjuntamente con la comparativa de resultados para el control NAC a 5 mM y H_2O_2 solos. Como se puede observar a partir de los resultados, la Colismicina A muestra una actividad neuroprotectora significativa a 0,05 μM .

Para la Caerulomicina A, la concentración más baja a la que se detectaron efectos neuroprotectores era 0,05 μM .

Para la Colismicina C y el Compuesto 3, la concentración más baja a la que se detectaron efectos neuroprotectores era 10 μM

Para el Compuesto 1 y el Compuesto 2, las concentraciones más bajas a las que se detectaron efectos neuroprotectores eran 5 μM y 0,05 μM respectivamente

Protección frente a la muerte celular inducida por 6-OHDA

El objetivo de este experimento es determinar el efecto protector frente a la toxicidad causada por 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Esta toxina induce a una muerte celular de manera similar a cómo ocurre en la Enfermedad de Parkinson, destruyendo las neuronas dopaminérgicas (*"MPTP and 6-hydroxydopamine-induced neurodegeneration"*

as models for Parkinson's disease: neuroprotective strategies"; Grunblatt E, et al.; J Neurol. 2000 Apr; 247 Suppl 2:II95-102).

5 Dos o tres días antes del experimento, las células SH-SY5Y de neuroblastoma humano son sembradas en placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de 10^4 células por pocillo. Las células se exponen al tratamiento con 6-OHDA y, finalmente, la muerte celular se mide por cuantificación de LDH. Los inventores usan NAC como control positivo.

El ensayo se realizó en dos condiciones experimentales:

A) NAC y el compuesto de fórmula (I) se preincubaban durante 2 horas antes del tratamiento con 6-OHDA $75 \mu\text{M}$ durante 16 horas. El ensayo se realiza en un medio que contenía un 10% de suero bovino fetal.

Los resultados de la neuroprotección frente a la muerte celular inducida por 6-OHDA se muestran en la Figura 4

10 Los resultados relacionados con la supervivencia celular en este ensayo, a diferentes concentraciones de Colismicina A, conjuntamente con los resultados comparativos para el control NAC a 5 mM y 6-OHDA solos, se muestran en la Figura 5.

La Caerulomicina A resultó neuroprotectora a una concentración mínima de $1 \mu\text{M}$.

15 La Colismicina C, el Compuesto 2 y el Compuesto 3 mostraron una actividad neuroprotectora a una concentración mínima de μM

B) NAC y el compuesto de fórmula (I) se preincubaban durante 1 hora antes del tratamiento con 6-OHDA $50 \mu\text{M}$ durante 24 horas. El ensayo se realiza en un medio sin suero bovino fetal.

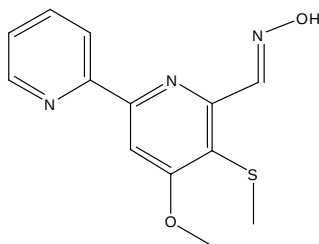
Los resultados de neuroprotección para la Colismicina C frente a muerte celular inducida por 6-OHDA se muestran en la Figura 6.

20 Los resultados relacionados con la supervivencia celular en este ensayo, a diferentes concentraciones de Colismicina A, conjuntamente con los resultados comparativos para el control NAC a 5 mM y 6-OHDA solo, se muestran en la Figura 7.

La Caerulomicina A mostró un efecto neuroprotector a una concentración mínima de $1 \mu\text{M}$, La Colismicina C a $10 \mu\text{M}$, y el Compuesto 2 a $0,5 \mu\text{M}$.

REIVINDICACIONES

1.- Uso de un compuesto de fórmula



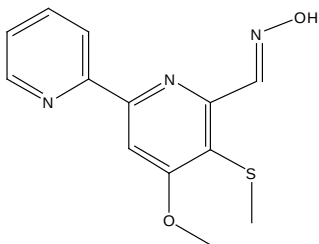
5 o una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato del mismo en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad o condición inducida por el estrés oxidativo seleccionada del grupo formado por Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Huntington, Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS), Esclerosis Múltiple (ML), ataxia de Friedreich, disquinesia tardía, lesiones cerebrales, tales como isquemia, daño por reperfusión o apoplejía, infarto de miocardio, esquizofrenia, aterosclerosis, insuficiencia cardíaca, diabetes, especialmente diabetes tipo II, epilepsia y demencia por SIDA.

2.- Uso según la reivindicación 1, en el que la enfermedad o condición es Enfermedad de Alzheimer.

3.- Uso según la reivindicación 1, en el que la enfermedad o condición es Enfermedad de Parkinson.

10 4.- Uso de un compuesto como se define en la reivindicación 1, en la fabricación de un reactivo para ensayos biológicos de estrés oxidativo en células.

5.- Un compuesto de fórmula



15 para uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad o condición inducida por el estrés oxidativo seleccionada entre el grupo formado por Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Huntington, Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS), Esclerosis Múltiple (ML), ataxia de Friedreich, disquinesia tardía, lesiones cerebrales, tales como isquemia, daño por reperfusión o apoplejía, infarto de miocardio, esquizofrenia, aterosclerosis, insuficiencia cardíaca, diabetes, especialmente diabetes tipo II, epilepsia y demencia por SIDA.

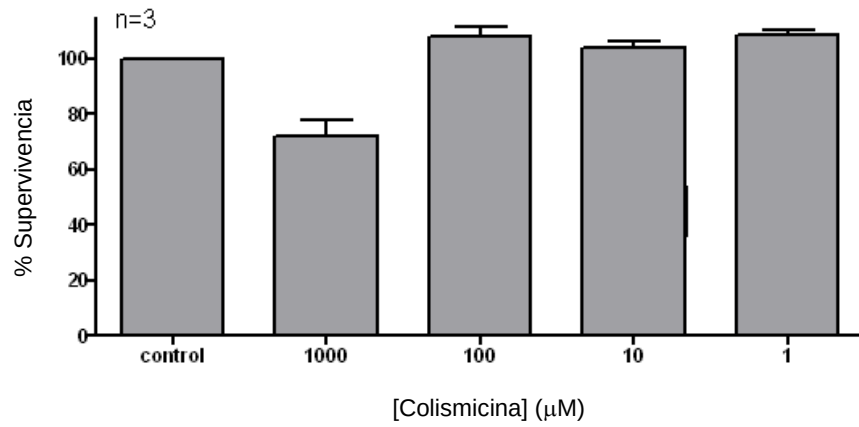


Figura 1

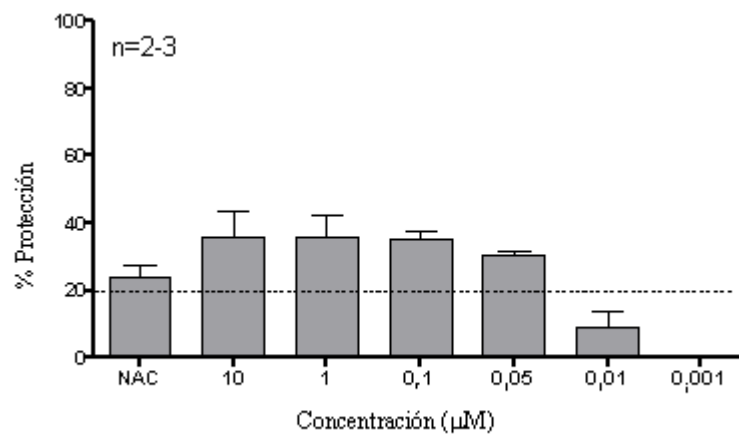


Figura 2

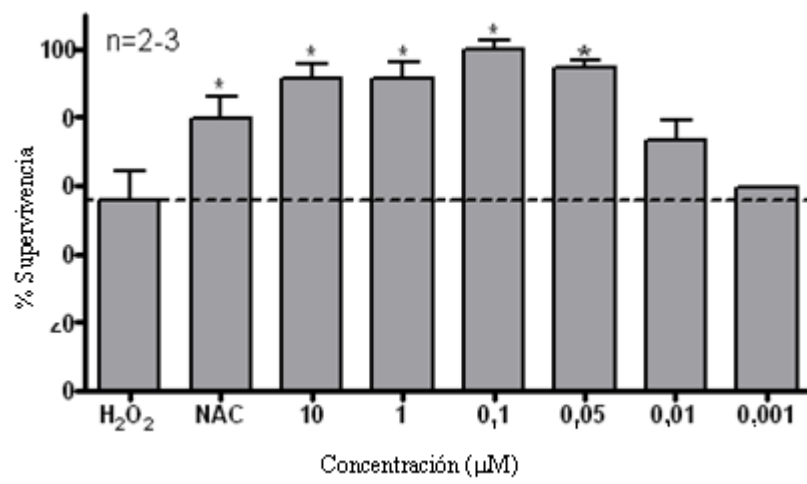


Figura 3

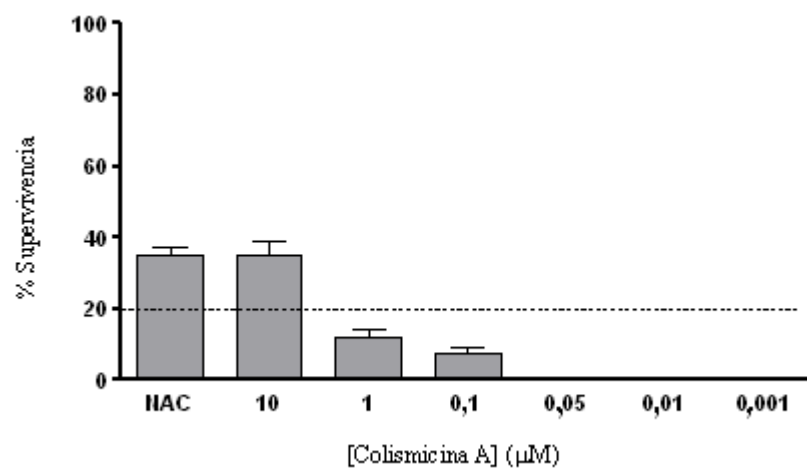


Figura 4

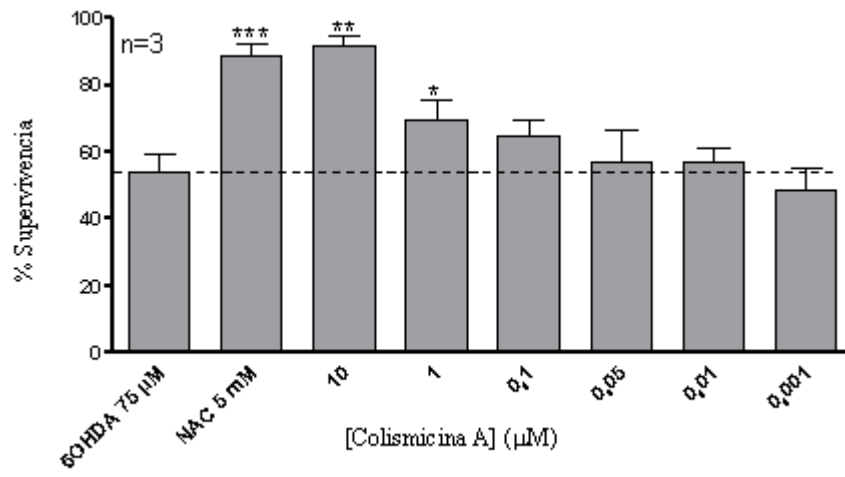


Figura 5

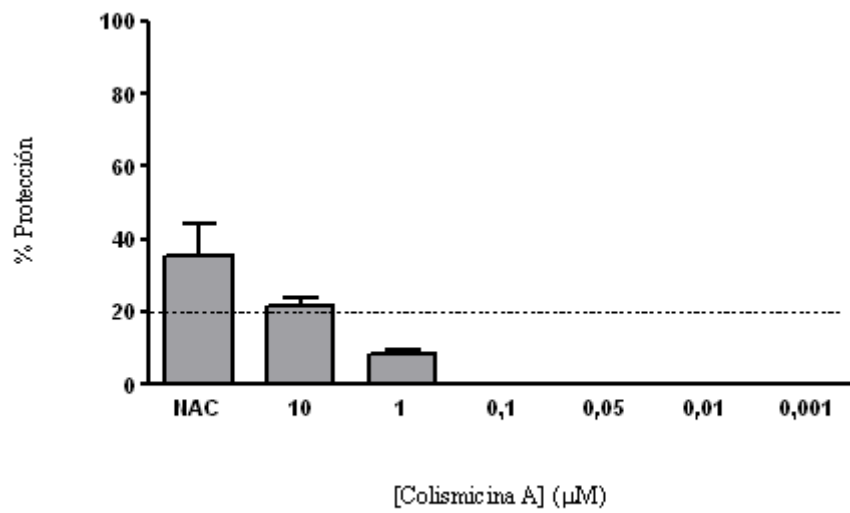


Figura 6

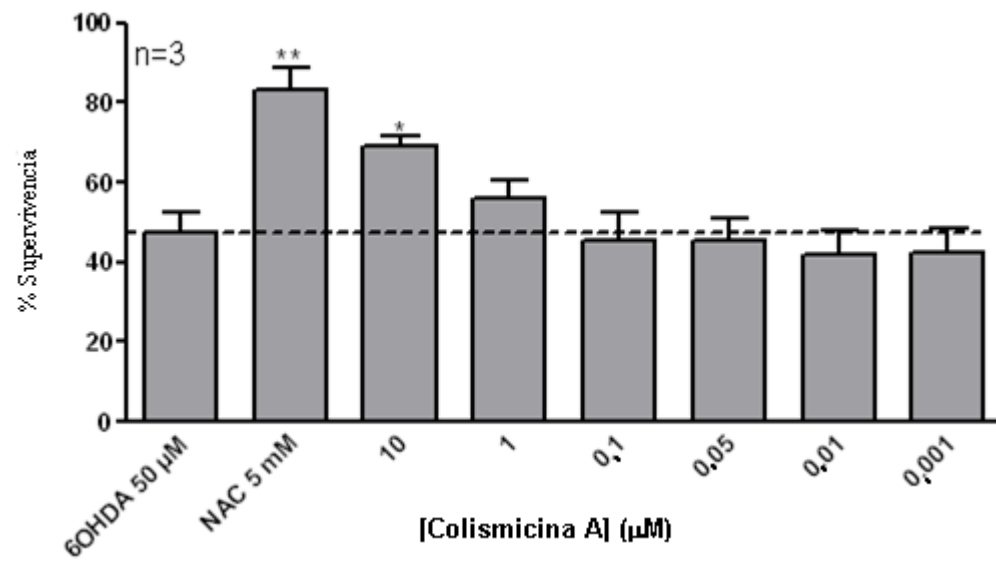


Figura 7