(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 392 846**

(51) Int. CI.:

A61K 31/4545 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **05715443 .7**
(96) Fecha de presentación: **22.02.2005**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1727545**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **06.12.2006**

(54) Título: **Uso de derivados de N-piperidina para el tratamiento de patologías neurodegenerativas**

(30) Prioridad:

01.03.2004 IT TO20040124

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:

14.12.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:

14.12.2012

(73) Titular/es:

MEDESTEA RESEARCH & PRODUCTION S.P.A. (100.0%)
Via Ribes, 5
10010 Colleretto Giacosa (TO), IT

(72) Inventor/es:

MERIZZI, GIANFRANCO

(74) Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

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

Uso de derivados de N-piperidina para el tratamiento de patologías neurodegenerativas

Es conocido que los radicales libres centrados en oxígeno (ROS) y los radicales libres centrados en nitrógeno (RNS) son regularmente generados durante la respiración celular y el metabolismo normal, realizando funciones fisiológicas importantes como, por ejemplo, la de los segundos mensajeros en la inducción de procedimientos celulares (Suzuki H. J. Free Rad. Biol. Med. 22, 269-285, 1977; Clement M. V. & Pervaiz S. Free Rad. Res. 30, 247-2525, 1999).

Es conocido también que un número grande y creciente de procedimientos patológicos están asociados con un aumento en la generación de especies de radicales reactivos como el anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$, el radical perhidroxilo ($HO_2^{\bullet}$) el radical hidroxilo ($HO^{\bullet}$), el singletón de oxígeno ($^{1\Delta}O_2$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), dióxido de nitrógeno (NO_2^-), peroxinitrito y otros radicales ($R^{\bullet}$) (alquil-$L^{\bullet}$, alcoxi-$LO^{\bullet}$, peroxi-$LOO^{\bullet}$, etc.).

Los radicales que son producidos en exceso, saturando la maquinaria antioxidante que está constituida por sistemas enzimáticos (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa, glutatión reductasa), y por sistemas no enzimáticos hidrófilos y lipófilos (ubiquinona, ubiquinol, vitamina E, vitamina C, vitamina A, glutatión reducido, ácido úrico, carotenoides, etc.) generan el ampliamente proclamado “estado de tensión oxidativa” (OSS) que es responsable de la muerte celular y el deterioro de tejidos: el ataque de radicales puede dar lugar a un aumento adicional de ROS, RNS y $R^{\bullet}$, es decir, del OSS, con la consecuente exacerbación del deterioro oxidativo inicial (Diaz M. D. et al., New Engl. J. Med. 331, 408-416, 1997; Cerutti P. A., The Lancet 344,-862-863, 1994; Giacosa A. & Filiberti R. Eur. J. Cancer Prev. 5, 307-312, 1996; Bruce N. A. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 90, 1915-1922, 1993; Albens L. et al. J. Neural Transm. (Suppl.) 59, 133-154, 2000; Foley M. et al. J. Neurol. (Suppl. 2) 247, II82-94, 2000; Huang Z. et al. Can J. Neurol. Sci. (Suppl. 1) 30, S10-18, 2003; He Y. et al. J. Neurochem. 86, 1338-1345, 2003; Gao H. M. et al. Trends Pharmacol. Sci. 24, 395-401, 2003; Sekhon B. et al. Brain Res. 971, 1-8, 2003; Nedelykovic Z. S. et al. Postgrad. Med. J. 79, 195-198, 2003; Arbiser J. L. Nat. Med. 9, 1103-1104, 2003; véase también Medline® y Toxline®.

Además, es conocido intentar atenuar la cascada de acontecimientos que conduce al OSS mediante diversas aproximaciones terapéuticas, cada una de ellas con problemas inevitables que impiden o limitan su uso en el hombre o en animales. Los agentes quelantes que pueden catalizar, por ejemplo, reacciones redox no deseadas en las células se disocian fácilmente o pierden actividad como consecuencia de enlaces con múltiples componentes celulares (Ikeda Y et al. Neurosurgery 24, 820-824, 1989; White B. C. & Krause G. S. Ann. Emerg. Med. 22, 970-979, 1993).

Aparte del factor limitante conectado con la saturación de enzimas (≤ número de producción) y con las especies reactivas individuales de dismutasa ($O^{\bullet -}$) en el mundo más complejo y dinámico de OSS, el uso de la enzima superóxido dismutasa plantea problemas de estabilidad (incluso cuando es incluida en liposomas) con una semivida variable entre unos pocos minutos y algunas horas según el tipo; no pasa a través de las membranas celulares e incluso menos a través de la barrera hematoencefálica y es inmunógena (aunque el uso reciente de formas de r-h-MnSOD humano recombinante parece alentador) (Mikawa S. et al. J. Neurosurg. 85, 885-891, 1996; Kontos H. A. & Wei E. P. J. Neurosurg. 64, 803-807, 1986; Chan P. H. et al. Ann. Neur. 21, 540-547, 1987); no es carente de significado que un reciente ensayo al azar y multi-centros que proporcionó el uso de superóxido dismutasa conjugada a glicol (Pegorgotein®) en traumas craneales cerrados inevitablemente no proporcionó los resultados que eran de esperar (Young B. et al. JAMA 276, 538-543, 1996).

Algunas de las limitaciones relacionadas con el uso de la enzima neutra como, por ejemplo, la permeabilidad celular, con referencia particular a la barrera hematoencefálica y la administración, han sido superadas mediante el uso de compuestos orgánicos (por ejemplo, M40401® o M40403®) con un bajo peso molecular y con actividad catalítica de dismutasa, por ejemplo, respecto al superóxido (miméticos de SOD) (véanse las patentes de EE.UU Nº 5.874.421, 5.637.578 y 5.696.109; solicitudes internacionales WO 02/28390 y WO 02/058686, Samilowski W. E. et al. Nat. Med. 9, 750-755, 2003) o incluso con el uso de la parte activa aislada de la enzima (patente de EE.UU. nº 6.117.454).

Sin embargo, incluso estas estrategias pueden tener una eficacia tan solo limitada ya que reproducen la actividad de la enzima natural a nivel molecular; de hecho, actúan también sobre una especie de radical único ($O^{\bullet -}$) y, por lo tanto, son completamente inactivas unas respecto a otras, ROS, RNS y $R^{\bullet}$ que conducen a un OSS en su conjunto. En la actualidad, los fármacos que necesitan pasar a través de la membrana sanguínea del cerebro y que pasan a través de ella con dificultad o son incapaces de pasar a través de ella, han sido administrados mediante infusión directa en el CNS (sistema nervioso central) o mediante implante de polímero de liberación controlada, con problemas que pueden ser fácilmente imaginados (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.883.666).

Otras moléculas que han sido propuestas son los denominados “agentes depuradores de captura de espín” como, por ejemplo, azulenil-nitronas, NXY-059 y, en particular, alfa-fenil-terc-butil-nitrona (PBN) que ha dado resultados satisfactorios en diversas patologías (Rachnilewitz D. et al. Gut 35, 1181-1188, 1994; Krishna M. C. et al. J. Biol. Chem. 271, 26018- 26025, 1996; Gilgun-Sherki Y. et al. Pharmacol. Rev. 54, 271- 284, 2002). Sin embargo,

nuevamente la acción está limitada a unas pocas especies de radicales ya que, aunque la acción de los radicales centrados en carbono (C•) conduce a un aducto relativamente estable, el enlace con radicales centrados en oxígeno es completamente insatisfactorio; es suficiente considerar, por ejemplo, que la semivida del aducto entre el radical hidroxilo no deseable (HO•) y PBN es de solo 40 segundos (Jansen F. G. et al. Free Rad. Biol. Med. 12, 169-173, 1992).

Después de la fragmentación, estos nitróxidos no persistentes dan lugar también a especies de radicales adicionales que se pueden propagar o iniciar la reacción de auto-oxidación. Además, la PBN no se une a radicales centrados en nitrógeno (RNS) (Hensley K. et al. Int. Rev. Neurobiol. 40, 299-317, 1997). Las capturas de espín que tienen mayor estabilidad in vitro (Tempo. Tempo), que se pueden unir a radicales superóxido ($O^{\bullet -}$) y radicales hidroxilo (HO•), que se pueden auto-regenerar (es decir que no tienen una acción suicida como antioxidantes normales) y que pueden bloquear simultáneamente la reacción de Fenton, es decir, que pueden terminar reacciones de radicales, han sido producidas (Samuni et al. Biochemistry 30, 555-561, 1991; Samuni et al. J. Clin. Invest. 87, 1562-1530, 1991; Li H. et al. Free Rad. Biol. Med. 32 712-719, 2002; Krishna M. C. et al. J. Biol. Chem. 271, 26026-26031, 1996). Sin embargo, la acción protectora de estas moléculas in vivo está limitada por su toxicidad y por su semivida que es de menos de 3 minutos (Laight D. et al. Br. J. Pharmacol. 124, 238-244, 1988).

Para superar estas dificultades, las capturas de espín, son usadas de hecho in vivo en asociación con una macromolécula polinitroxilada (albúmina de suero humano de polinitroxilo, PNA) que reduce su toxicidad, permite el "reciclado" y, si la dosis usada se mantiene baja, evita efectos vasodilatadores (Kupposomi P. et al. Biochemistry 35 7051-7057, 1996; Kupposomi P. et al., Magn. Res. Med. 40, 806-811, 1998); naturalmente, dadas sus dimensiones considerables, estas macromoléculas funcionan solamente en espacios extracelulares.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden hidroxilaminas cíclicas derivadas de N-piperidina para el tratamiento de enfermedades conectadas con una producción en exceso de radicales libres han sido recientemente descritas en la patente de los Estados Unidos nº 5.981.548.

Un primer aspecto de la presente invención se basa en el reconocimiento del hecho de que las hidroxilaminas cíclicas derivadas de N-piperidona que han sido descritas en la patente de EE.UU. anteriormente mencionada nº 5.981.548 pueden pasar a través de la barrera hematoencefálica y, por lo tanto pueden ser usadas en el tratamiento terapéutico y la profilaxis de enfermedades neurodegenerativas.

Dentro del alcance de la invención, han sido identificados otros compuestos que son derivados de N-piperidina y tienen actividad farmacéutica en el tratamiento de diversas patologías indicadas con posterioridad, y para las cuales no había sido propuesto hasta ahora ningún uso en el campo farmacéutico.

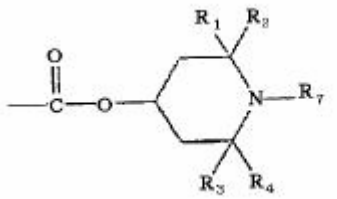
Con referencia a estos compuestos adicionales, la presente invención proporciona nuevos usos en terapia y profilaxis que resultan de la identificación de sus propiedades inesperadas como, en particular, una capacidad elevada de reaccionar con los diversos tipos de radicales libres, terminando las reacciones de los radicales, la capacidad de pasar fácilmente a través de la doble capa de lipoproteínas de las membranas celulares (con particular referencia a la barrera hematoencefálica), una elevada capacidad para la distribución en los tejidos, haciendo posible así que se obtenga una concentración elevada de la sustancia activa en la zona del cuerpo en la que se necesita protección antioxidante y la capacidad de auto-regenerarse (antioxidantes auto-reponedores) y para evitar la reacción de Fenton en la oxidación de iones metálicos.

Un objeto adicional de la presente invención es preferentemente el de proporcionar nuevos usos terapéuticos con respecto a la clase de compuestos que, además de todas las ventajas anteriormente mencionadas, son no tóxicos, no inmunógenos, estables y fáciles de preparar en grandes cantidades a bajo coste.

Los nuevos usos terapéuticos de la invención para preparar medicamentos se definen en las reivindicaciones anejas.

En el compuesto de fórmula (I), alquilo tiene 1 a 6 átomos de carbono y, más preferentemente, 1 a 3 átomos de carbono.

En el grupo de fórmula (II):



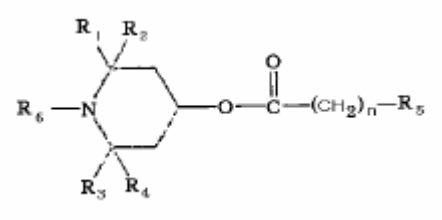
(II)

en la cual:

R_1, R_2, R_3 y R_4 son como se definen en la reivindicación 1, n es un número entero, preferentemente de 6 a 10,

R_7 es oxilo o hidroxilo.

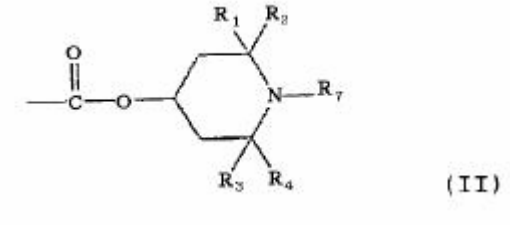
Un grupo de compuestos que son preferidos y son ilustrativos de la presente invención son los compuestos de fórmula:



en la cual:

R_1, R_2, R_3 y R_4 son alquilo que tiene de 1 a 3 átomos de carbono,

R^5 es:

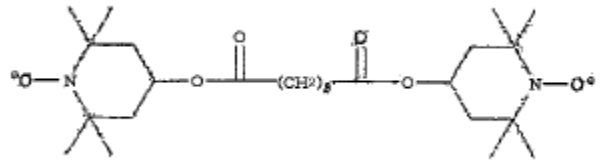


(II)

en la cual:

R_1, R_2, R_3 y R_4 son alquilo que tiene de 1 a 3 átomos de carbono,

n es un número entero de 2 a 10 y al menos uno de R_6 y R_7 es oxilo y el otro de R_6 y R_7 es oxilo o hidroxilo; en particular, el uso de un compuesto de fórmula:



conocido como bis(1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil)decanodioato es particularmente preferido.

La expresión “alquilo de 1 a 6 átomos de carbono” indica un grupo sustituyente derivado de un hidrocarburo saturado mediante la separación de un único átomo de hidrógeno. La expresión incluye metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, sec-butilo, iso-butilo, terc-butilo y las diversas formas isómeras de pentilo y hexilo.

Los compuestos derivados de N-oxilo y N-hidroxilo se pueden preparar mediante procedimientos descritos en las patentes de EE.UU. nº 4.691.105 y 5.981.548, partiendo de derivados de N-H.

En particular, los derivados de n-oxilo son obtenidos a partir del correspondiente derivado de N-H mediante reacción con ácido m-cloroperbenzoico. El derivado de N-oxilo puede ser convertido en el correspondiente derivado de N-hidroxi mediante hidrogenación catalítica, por ejemplo, con el uso de PtO_2 como catalizador.

Como se indicó anteriormente, un objeto de la invención es el uso de los compuestos anteriormente mencionados para la preparación de medicamentos, composiciones farmacéuticas o veterinarias para el tratamiento (inhibición, prevención, profilaxis y terapia) de síndromes y patologías neurodegenerativos como enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, lesiones encefálicas debido a ictus, lesiones cerebrales traumáticas, neuropatía debida a HIV, síndrome de Down, polineuropatía diabética, distrofia muscular, esclerosis múltiple, enfermedad de Huntington,

enfermedad priónica, disquinesia tardía, tautopatía, patologías desmielinantes y síndrome de Lou Gherig.

La invención se refiere también al uso de los compuestos mencionados para la preparación de composiciones farmacéuticas o veterinarias y medicamentos para el tratamiento terapéutico, prevención y/o profilaxis de estados mortales como isquemia-reperfusión cardíaca/renal/pulmonar/hepática/intestinal, hipertensión, diabetes, cáncer y también de apoplejía, fibrosis quística, infecciones virales, toxicidad debida a fármacos y radiación (por ejemplo, radioterapia o protección de la radiación más generalmente), envejecimiento, artritis reumatoide, así como en el tratamiento de sepsis.

Para un uso en le campo farmacéutico o veterinario, los compuestos según la presente invención son administrados al paciente a niveles de dosis en el intervalo de 0,01 a 1 g/kg de peso corporal, preferentemente de 0,1 a 200 mg/kg y, más preferentemente, en un intervalo entre 0,5 y 20 mg/kg de peso corporal, en una o más administraciones diarias.

Sin embargo, las dosificaciones específicas usadas pueden variar dependiendo de las necesidades del paciente o el animal, de la gravedad de las patologías que van a ser tratadas (de la edad, sexo, dieta, método de administración y consideraciones farmacológicas como la actividad del compuesto que va a ser usado, la eficacia y el perfil farmacocinético y toxicológico del compuesto preseleccionado y cualquier combinación con otros fármacos, etc.). la determinación de la dosis óptima está entre las posibles selecciones que están abiertas para un experto en la técnica.

Pueden ser usados vehículos farmacéuticamente aceptables en forma sólida o líquida para la preparación de composiciones farmacéuticas o veterinarias que comprenden al menos uno de los compuestos según la presente invención.

Los métodos de administración comprenden, además de la administración oral y parenteral, una administración por vías inhaladoras y dermatológicas (tópicas).

Las preparaciones sólidas incluirán, por ejemplo, polvos, comprimidos, gránulos, cápsulas, sellos y supositorios.

Un vehículo sólido puede estar constituido por una o más sustancias que pueden actuar también como diluyentes, aromas, solubilizantes, lubricantes, agentes de suspensión, aglutinantes o disgregantes para comprimidos; puede ser usado también un material encapsulado.

En los polvos, el vehículo está constituido por un sólido finamente dividido que es mezclado con al menos un compuesto activo. En los comprimidos, el ingrediente activo es mezclado con el vehículo que tiene las propiedades aglutinantes necesarias en proporciones adecuadas y es compactado en la forma y tamaño deseados. Los polvos y comprimidos contienen preferentemente entre 7 y 70% en peso del ingrediente activo.

Los vehículos adecuados están representados principalmente por carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, lactosa, azúcar, pectina, dextrina, almidón de maíz, metil-celulosa, carboximetil-celulosa de sodio, ceras con bajos puntos de fusión, manteca de coco y similares.

Pueden usados comprimidos, polvos, sellos y cápsulas como formas adecuadas de dosificación para una administración oral.

Las preparaciones en forma líquida incluyen soluciones adecuadas para una administración subcutánea, intravenosa, intramuscular, de inyecciones intraesternales o para una administración oral, es decir, suspensiones o emulsiones adecuadas para una administración oral. Las soluciones acuosas esterilizadas del ingrediente activo y las soluciones esterilizadas del ingrediente activo en disolventes que comprenden agua, etanol o propilenglicol pueden ser mencionados como ejemplos de preparaciones líquidas adecuadas para las vías de administración anteriormente mencionadas.

Las soluciones esterilizadas pueden ser preparadas disolviendo el ingrediente activo en el sistema disolvente deseado y haciendo pasar seguidamente la solución a través de un filtro de membrana con el fin de esterilizarla o, alternativamente, disolviendo el compuesto esterilizado en un disolvente previamente esterilizado, en condiciones estériles.

Las soluciones acuosas para una administración oral pueden ser preparadas disolviendo el ingrediente activo en agua y añadiendo agentes colorantes, aromáticos, estabilizantes y aglomerantes adecuados en la cantidad deseada.

Las suspensiones acuosas para un uso oral pueden ser preparadas dispersando el ingrediente activo finamente dividido en agua junto con un material viscoso como gomas naturales o sintéticas, resinas, metil-celulosa, carboximetil-celulosa de sodio y otros agentes de suspensión conocidos en la técnica para formulaciones farmacéuticas o veterinarias.

Preferentemente, la preparación farmacéutica o veterinaria está en la forma de unidades de dosis única que contienen preferentemente de 1 a 300 mg. En esta forma, la preparación se divide en dosis unitarias que contienen cantidades adecuadas del ingrediente activo. La unidad de dosis única puede estar constituida por una preparación envasada que contenga comprimidos, cápsulas o polvos en viales o ampollas.

Las composiciones farmacéuticas de la invención son preferentemente para un uso en seres humanos. Sin embargo, como son utilizables para seres humanos, pueden ser utilizables también en el campo veterinario, para animales domésticos, animales exóticos y animales de granja, incluidos mamíferos, aves, roedores, etc., más preferentemente animales como perros y gatos, así como ganado, ovejas y cerdos.

Los siguientes ejemplos pueden hacer posible que un experto en la técnica ponga en práctica la invención. Por lo tanto, serán ilustrativos de la invención y se incluyen como ejemplos. Por lo tanto, se describe el uso de la invención en un modelo de enfermedad de Parkinson, como un ejemplo de trastorno neurodegenerativo, y en un modelo de isquemia-reperfusión de miocardio, como un ejemplo de enfermedad con riesgo para la vida.

Ejemplo 1

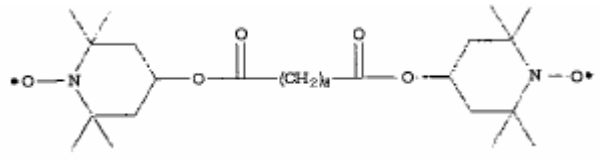
Aunque el síndrome de Parkinson (PS) se describió por primera vez en 1817 por James Parkinson como una “parálisis agitadora” de origen desconocido (sin embargo, hay una evidencia de síndromes parkinsonianos que datan incluso de hace miles de años), su etiología es todavía bastante incierta.

Además de la edad, hay un vivo debate científico a nivel internacional sobre la función de factores genéticos y medioambientales en el origen del PS (Huang Z et al. Can. J. Neur. Sci. 30 Suppl. 1, 510-518, 2003i Daner W. et al. Proc. Natl. Acad. Scie. (USA) 99, 14524-14529, 2002; Vaughan J. R. et al. Am. Hum. Gen. 65, 111-126, 2001; Thiruchelvam M. et al. Neurotoxicology 23, 621-633, 2002; Scott W. K. et al. JAMA 286, 2239-2244, 2001; Warner T. T. & Schapira A. H. Am. Neurol. 53 Suppl. 3, 516-523, 2003). Se proporcionó un impulso considerable a la investigación en el campo medioambiental en la mitad de los años ochenta, mediante el descubrimiento de que neurotoxinas específicas como N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MTPT) pueden provocar parkinsonismo en el hombre y animales, desde entonces se ha encontrado que muchos plaguicidas reproducen el PS en modelos de animales (Betarbert R. et al. Nat. Neurosci. 3, 1301-1306, 2000; Kirbi M. L. et al, Toxicol. Sci. 61, 100-106, 2001; Yumino K. et al. J. Biochem. (Tokyo) 131, 565-570, 2002; Gao et al. J. Neurosci. 23, 6181-6187, 2003). No está carente de significado que un meta-análisis de control de los casos de los estudios disponibles sugiere la existencia de una asociación entre la exposición a plaguicidas y el PS (Priyadarshi A. et al. Neurotoxicology 21, 435-440, 2000; Priyadarshi A. et al. Environ. Res. 86, 123-127, 2001).

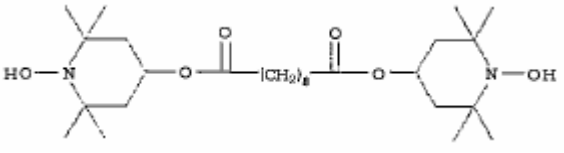
Una gran evidencia experimental demuestra que el herbicida Paraquat (que tiene una estructura química similar a la MPTP) está implicado en la patogénesis del PS; tanto la microinfusión de Paraquat en la sustancia negra del animal y el tratamiento sistémico o intraperitoneal conducen a una degeneración selectiva de neuronas dopaminérgicas acompañada de indicios de comportamiento y neuropatológicos de una neurotoxicidad grave no selectiva (Brooks A. I. et al. Brain Res. 823, 1-10, 1999; Thiruchelvam M. et al. Neurotoxicology 23, 621-633, 2002; McCornack A. L. et al. Neurobiol Dis. 10, 119-127, 2002) atribuida a un exceso de radicales libres reactivos con OSS (Jannone N. et al. Neuropharmacology 30, 893-898, 1991; Klivenyi G. et al Neurobiol. Dis. 5, 253-258, 1998; Foley M. et al. J. Neurol. 247 Suppl. 2, 1182-94, 2000).

Por lo tanto, se seleccionó el modelo experimental de Paraquat/rata/PS como el más indicativo para comprobar la eficacia de compuestos químicos según la presente invención; de estos, se usaron dos antioxidantes denominados MP1002 y MP1001 en los ensayos:

MP1002



MP1001



Se mantuvieron ratas Sprague Dawley machos (210-220 g de peso) en una dieta de laboratorio estándar complementada con "Nossan Pellets" (tanto los animales como los gránulos están disponibles en la entidad Nossan

Company, Milan, Italia) y fueron albergadas durante tres semanas (humedad relativa 50% ± 10%, temperatura 22ºC ± 1 y en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas/12 horas, con la primera luz a las 7.30 a.m.) antes de los ensayos; los alimentos y el agua estuvieron disponibles *ad libitum.*

Antes del tratamiento, las ratas fueron anestesiadas mediante inyección intraperitoneal de 380 mg/kg de peso de hidrato de cloral; se implantó una cánula de guía de acero inoxidable (tamaño 25) unilateralmente en la sustancia negra con guiado estereotáxico y se afianzó al cráneo con material acrílico dental.

Se permitió que los animales (20 por grupo de ensayo) se recuperaran durante un período de siete días antes del tratamiento; durante este período no se observó ningún cambio en la actividad motora o las posturas. Se realizaron microinfusiones por medio de una jeringuilla Hamilton de 10 µl conectada a una cánula de inyección por medio de un tubo de Teflon. Los compuestos o el vehículo (NaCl al 0,8%) fueron inyectados a un volumen total de 1 µl/minuto.

Una microinfusión de 50 µg de Paraquat en la sustancia negra (n-20 ratas) condujo a un aumento de la actividad motora realizando los animales altos y desplazándose en círculos en una dirección contralateral con relación a la inyección, aproximadamente 24 minutos más tarde; todos los animales estaban muertos 24 ± 2,5 horas después de la infusión. Unos 20 animales adicionales fueron sometidos a infusión con Paraquat y veinte con Paraquat más vehículo; aproximadamente diez de los animales para cada grupo sobrevivieron 20 horas después del tratamiento y fueron usados para determinar el desarrollo de la peroxidación de lípidos en la sustancia negra.

Cuando el Paraquat (50 µg) fue sometido a microinfusión en la sustancia negra simultáneamente con uno µg de MP1002 o MP1001, la totalidad de los animales sobrevivió durante 24 horas adicionales y no se observaron indicios de alteraciones durante la verificación continua (véase la tabla 1). Se obtuvieron resultados similares después de una administración intraperitoneal de los antioxidantes, demostrando así la extraordinaria capacidad de MP1002 o MP1001 para atravesar la barrera hematoencefálica (BBB), que es uno de los factores más limitantes de los antioxidantes convencionales (junto con su selectividad en relación con un tipo específico de radical) para fines terapéuticos en patologías neurodegenerativas.

En particular, ninguna de las ratas murió cundo: (1) fueron previamente tratadas por vía intraperitoneal con 120 mg/kg en peso de MP1002 o MP1001 5 minutos antes de la microinfusión de 50 µg de Paraquat (2) fueron simultáneamente tratadas mediante inyección intraperitoneal de 120 mg/kg en peso de MP1002 o MP1001 e infusionadas con 50 µg de Paraquat; y (3) fueron microinfusionadas con 50 µg de Paraquat seguido de inyección intraperitoneal de 120 mg/kg en peso de MP1002 y MP1001 5 minutos después (véase la tabla 1).

La peroxidación de lípidos en la sustancia negra se determino mediante la cualificación de la liberación de malonodialdehído (MDA) que fue usado como un biomarcador, por medio del reactivo ácido tiobarbitúrico-TCA-HCl, como se describe por Buege J. A. & Aust S. D. Meth. Enzymol. 52, 302-310, 1978. La tabla 1 muestra claramente el aumento de la peroxidación de lípidos en la sustancia negra en un grupo adicional de animales (aproximadamente 10) que sobrevivieron 20 horas después de la infusión con 50 µg de Paraquat o Paraquat y solución salina. El tratamiento con MP1002 o MP1001 en diversas situaciones (antes, con o después de la infusión con Paraquat) redujo de forma considerable y significativa ($p<0,01$) la peroxidación de lípidos en la sustancia negra, indicando claramente la elevada potencia antioxidante de esos compuestos.

En estos ensayos, la administración intracerebral y la administración periférica de MP1002 o MP1001, dos tipos de antioxidantes descritos en la siguiente memoria descriptiva, protegió completamente contra los efectos de comportamiento y neuropatológicos inducidos por Paraquat en ratas. Estos resultados muestran la capacidad de los compuestos según la invención para atravesar la barrera hematoencefálica fácilmente, protegiendo así las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra contra el deterioro degenerativo (por ejemplo, OSS) producido por herbicidas como Paraquat. Esto representa una aproximación útil para el tratamiento de diversas patologías neurodegenerativas, que incluyen la enfermedad de Parkinson.

Ejemplo 2

El modelo in vivo de lesión de miocardio debida a isquemia y reperfusión se seleccionó como el más adecuado para comprobar la eficacia de los compuestos MP1002 y MP1001 según la invención.

Se mantuvieron ratas Sprague Dawley machos (220-230 g) en una dieta de laboratorio estándar complementada con “Nossan Pellets” (Nossan Company, Milan, Italia) y fueron albergadas durante tres semanas antes de los ensayos (humedad relativa 50% ± 10, temperatura 21º C ± 1 y ciclo de luz/oscuridad de 12/11 horas con la primera luz a las 7.30 a.m.); los alimentos y el agua estuvieron disponibles *ad libitum.*

Las ratas (20 por grupo) fueron anestesiadas mediante inyección intraperitoneal de hidrato de cloral (380 mg/kg) y seguidamente fueron traqueotomizadas, entubadas y ventiladas con aire del ambiente mediante un ventilador adecuado; la temperatura corporal se mantuvo a 38ºC ± 1 y la arteria carótida derecha fue canulada y conectada a un transductor de presión para verificar la presión sanguínea arterial media (MA).

La vena yugular derecha fue canulada para la administración de los compuestos, se realizó una toracotomía lateral, el corazón se puso en suspensión en un lecho pericardial temporal y se dispuso un oclusor de bucle alrededor de la arteria coronaria descendente izquierda (LAD); se permitió que los animales se estabilizaran durante 40 minutos antes de la ligadura de la LAD.

La arteria coronaria fue ocluida apretando el oclusor, un procedimiento que está correlacionado con cambios electrocardiográficos y hemodinámicos (caída de la MAP) que son típicos de la isquemia de miocardio. Después de 25 minutos de isquemia de miocardio, se volvió a abrir el oclusor, permitiendo la reperfusión durante 2 horas. Se comprobaron continuamente el ritmo cardíaco (HR) y la MAP.

Después de una reperfusión durante dos horas, la arteria coronaria fue nuevamente ocluida y se inyectó el colorante azul de Evans (4,5 ml a 2% p/v) en el ventrículo izquierdo por medio de la cánula en la arteria carótida derecha con el fin de discriminar entre secciones perfusionadas y no perfusionadas (AAR) en el corazón; la solución de zul de Evans tiñó el micocardio pefusionado, mientras que el lecho vascular ocluido permaneció sin teñir.

Las ratas fueron seguidamente sacrificadas mediante una sobredosis de anestésico, los corazones fueron extirpados y fueron cortados en láminas (3-4 mm), la pared ventricular derecha y el área en riesgo (rosa) se extirparon y se separaron del área no isquémica (azul). El área en riesgo se cortó en pequeños trozos y se incubaron con azul de p-nitro-tetrazolio (NBT) 0,48 mg/ml) durante 20 minutos a 37ºC, en presencia de enzimas deshidrogenasas intactas (miocardio vivo), el MBT formó un formazano azul oscuro mientras que el área de necrosis sin actividad de deshidrogenasa no se coloreó. Los trozos se separaron según su coloración y se pesaron para determinar el tamaño del infarto como un porcentaje del peso de AAR.

Se consideraron los siguientes grupos de ensayo: a) oclusión de LAD (25 minutos) y reperfusión (2 horas) más administración del vehículo (solución salina, 3 mg/kg - v - bolo más 1,8 ml/kg/h) comenzando 5 minutos después de la reperfusión y mantenida durante el período de reperfusión; b) oclusión de LAD y reperfusión más administración de MB 1002 o MP1001 (10 mg/kg de inyección en bolo) 5 minutos antes de la reperfusión, seguido de infusión de 2 mg/kg/h durante el período de reperfusión; c) operación simulada (sin oclusión de LAD) e infusión del vehículo; d) operación simulada e infusión de MP1002 o MP1001 como se describió anteriormente.

El malono-dialdehído (MDA) en el tejido cardíaco como producto de peroxidación final de los lípidos de las membranas celulares se determinó también como se describió anteriormente.

La tabla 2 proporciona los diversos valores de MPA y HR medidos durante el transcurso de los ensayos. Los resultados hemodinámicos de base fueron similares en los diversos grupos considerados.

En los animales que recibieron operaciones simuladas (sin oclusión de LAD) la infusión del vehículo o vehículo MP1002 o MP1001 no tuvo efectos hemodinámicos sustanciales.

En los animales que fueron sometidos a oclusión coronaria y reperfusión, los valores medios de MAP se redujeron ligeramente durante el período de ensayo pero no hubo cambios en HR. Además, los valores medios de MAP y HR de las ratas que fueron sometidas a tratamiento de I/R (isquemia/reperfusión) y fueron tratadas con MP1002 o MP1001 no fueron significativamente diferentes del grupo de I/R tratado con el vehículo solo.

La infusión de MP1002 o MP1001 llevó a cabo una reducción significativa ($p < 0,01$) del tamaño del infarto (80% y 78%, respectivamente), en comparación con el testigo (figura 1). La operación simulada no dio lugar a ningún grado significativo de infarto. Aunque el tratamiento de I/R condujo a un aumento considerable y significativo ($p < 0,01$) en la peroxidación de lípidos en comparación con las ratas que fueron sometidas a operaciones simuladas (más vehículo o antioxidante), el tratamiento con MP1002 o MP1001 redujo significativamente ($p < 0,01$) el desarrollo de peroxidación a niveles similares a los de los animales que fueron sometidos a operaciones simuladas (figura 2), proporcionando así una evidencia de la elevada potencia antioxidante de estos compuestos.

Estos ensayos muestran que el MP1002 y el MP1001 pueden reducir drásticamente el tamaño de infartos de miocardio después de la oclusión y reperfusión del miocardio. Estos resultados demuestran la capacidad de los compuestos de la invención para ejercer un buen efecto protector contra las lesiones de miocardio inducidas por isquemia-reperfusión.

Esto sugiere que los compuestos de la invención ofrecen una nueva aproximación terapéutica para el tratamiento de enfermedades con riesgo para la vida que incluyen enfermedades cardíacas isquémicas.

TABLA 1. Efectos de bis(1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil)decanoato (MP1002) o bis(1-hidroxil-2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil)decanoato (MP1001) sobre la latencia, duración de ataques, mortalidad y desarrollo de peroxidación de lípidos en ratas que reciben paraquat en sustancia negra

Tratamiento	Latencia (min)	Duración (min)	Mortalidad (%)	Peroxidación de lípidos (mmol MDA x h^{-1} x mg $prot^{-1}$)
Testigo	0	0	0	3,8±0,76
Paraquat*	25±4	270±15	100 (20/20)	14,6±1,34**
Paraquat + vehículo*	25±6	266±17	100 (20/20)	13,5±1,10**
Paraquat + MP1002[a]	Sin ataques ni descargas epilépticas	Sin ataques ni descargas epilépticas	0	4,3±0,63**
Paraquat + MP1001[a]	Sin ataques ni descargas epilépticas	Sin ataques ni descargas epilépticas	0	5,4±0,84**
Paraquat + MP1002[b]	Sin ataques ni descargas epilépticas	Sin ataques ni descargas epilépticas	0	5,2±0,75**
Paraquat + MP1001[b]	Sin ataques ni descargas epilépticas	Sin ataques ni descargas epilépticas	0	4,7±0,49**
Paraquat + MP1002[c]	Sin ataques ni descargas epilépticas	Sin ataques ni descargas epilépticas	0	4,9±0,86**
Paraquat + MP1001[c]	Sin ataques ni descargas epilépticas	Sin ataques ni descargas epilépticas	0	5,1±0,94**
Paraquat + MP1002[d]	Sin ataques ni descargas epilépticas	Sin ataques ni descargas epilépticas	0	4,1±0,39**
Paraquat + MP1001[d]	Sin ataques ni descargas epilépticas	Sin ataques ni descargas epilépticas	0	4,8±0,57**

En la tabla 1 cada valor representa la media ±SD (desviación típica) de veinte ensayos diferentes realizados sobre veinte ratas diferentes; a) animales que recibieron, con microinfusión simultánea en la sustancia negra, Paraquat (50 μg) y 1 μg de MP1002 o MP1001; b) animales que fueron previamente tratados por vía intraperitoneal con 120 mg/kg en peso de MP1002 o MP1001 y que, después de 5 minutos, recibieron Paraquat (50 μg) mediante microinfusión; c) animales que recibieron simultáneamente 50 μg de Paraquat mediante microinfusión y 120 mg/kg en peso de MP1002 o de MP1001 mediante inyección intraperitoneal; d) animales que recibieron 50 μg de Paraquat mediante microinfusion y, 5 minutos después, 100 mg/kg en peso de MP1002 o MP1001 mediante inyección intraperitoneal. La infusión del vehículo en el mismo sitio no produjo ningún efecto en los cambios de comportamiento o en la mortalidad correlacionados con el Paraquat.
La tabla proporciona también las variaciones de la peroxidación de lípidos en la sustancia negra a niveles de malonodialdehído (MDA) 24 o 20 (*) horas después del tratamiento.
Véase el texto siguiente para detalles y procedimientos del ensayo.
** p< 0,01 de Paraquat o Paraquat + vehículo contratestigo y Paraquat vehículo contra MP1002 o MP1001- grupos tratados (método Wilcoxon de clasificación).

TABLA 2. Efectos de los antioxidantes mp1002 y mp1001 sobre cambios de presión sanguínea arterial media (map) y ritmo cardíaco (hr) en isquemia de miocardio y reperfusión (i/r) en la rata

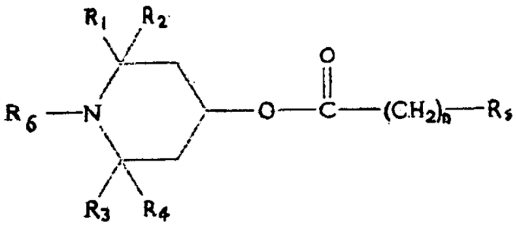
Grupo		Línea de base	Oclusión (min)		Reperfusión (min)	
			15	25	15	25
Simulado + vehículo	MAP	128±12	126±14	118±10	112±9	105±12
	HR	425±25	429±26	426±21	431±23	429±22
Simulado + MP1002	MAP	125±15	123±16	120±11	110±12	105±9
	HR	421±26	420±33	422±25	428±26	426±32
Simulado + MP1001	MAP	172±16	125±13	121±11	112±8	107±16
	HR	422±33	422±26	424±48	427±27	427±23
I/R + vehículo	MAP	128±10	121±12	113±10	101±12	96±9
	HR	445±34	40±31	436±27	434±28	436±26
I/R + MP1002	MAP	127±14	121±14	114±10	102±11	97±9
	HR	438±30	437±32	431±24	427±29	429±25
I/R + MP1001	MAP	125±9	118±12	111±13	100±10	95±8
	HR	435±25	438±31	430±28	425±28	427±26

Cada valor representa la media ± SD de al menos quince experimentos diferentes.
Los animales recibieron MP1002, MP1001 o un volumen igual de vehículo.
Véase el texto para detalles y procedimientos experimentales.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula:

(I)

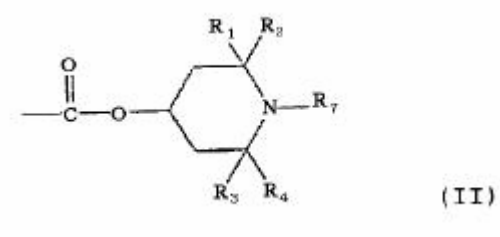


en la cual:

- R_6 es oxilo o hidroxilo,

- R_1, R_2, R_3 y R_4 son independientemente uno de otro alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, y

- R_5 es:



(II)

en la cual:

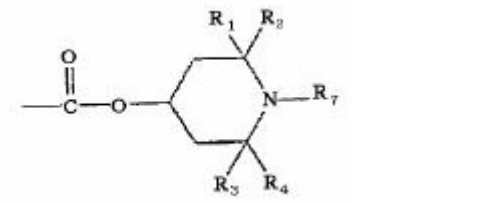
- R_1, R_2, R_3 y R_4 son como se definieron anteriormente,

- R_7 es igual o diferente a R_6 y se selecciona entre oxilo o hidroxilo, y

- n es un número entero de 2 a 14;

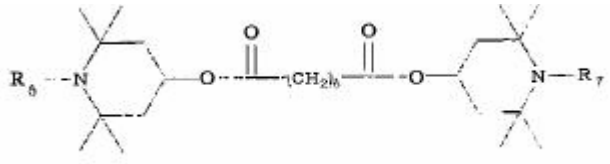
para la preparación de una composición farmacéutica para uso veterinario o humano o de un medicamento para el tratamiento terapéutico o profiláctico de enfermedades neurodegenerativas mediante una vía de administración seleccionada entre oral, intramuscular, subcutánea, intravenosa, dermatológica o inhaladora.

2. Uso según la reivindicación 1, en el que R_1, R_2 R_3 y R_4 son, independientemente uno de otro, un alquilo que tiene de 1 a 3 átomos de carbono y R_5 es:



en la que R_1, R_2, R_3 y R_4 son, independientemente uno de otro, un alquilo que tiene de 1 a 3 átomos de carbono, R_7 es oxilo o hidroxilo y n es un número entero de 6 a 10.

3. Uso según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el compuesto es de fórmula:



(III)

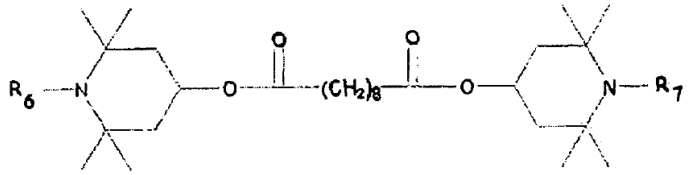
en la que R_6 y R_7 son iguales o diferentes y se seleccionan entre oxilo e hidroxilo.

4. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la enfermedad neurodegenerativa se selecciona entre enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, lesión cerebral debida a isquemia-reperfusión, lesión cerebral traumática, neuropatía debida a HIV, síndrome de Down, polineuropatía diabética, enfermedad de Huntington y tautopatía.

5. Uso de un compuesto como se identifica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para preparar un medicamento para el tratamiento de patologías seleccionadas entre lesiones debidas a isquemia-reperfusión en el corazón, riñones, pulmones, hígado e intestino, hipertensión, diabetes, toxicidad debida a fármacos o radiación en radioterapia o protección de la radiación, envejecimiento, artritis reumatoide y para el tratamiento de sepsis, mediante una vía de administración seleccionada entre oral, intramuscular, subcutánea, intravenosa, dermatológica o inhaladora.

6. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición farmacéutica o veterinaria o medicamento está en una forma de dosificación adecuada para la administración del compuesto en cantidades de 0,01 a 200 mg/kg de peso corporal, preferentemente de 0,5 a 20 mg/kg de peso corporal.

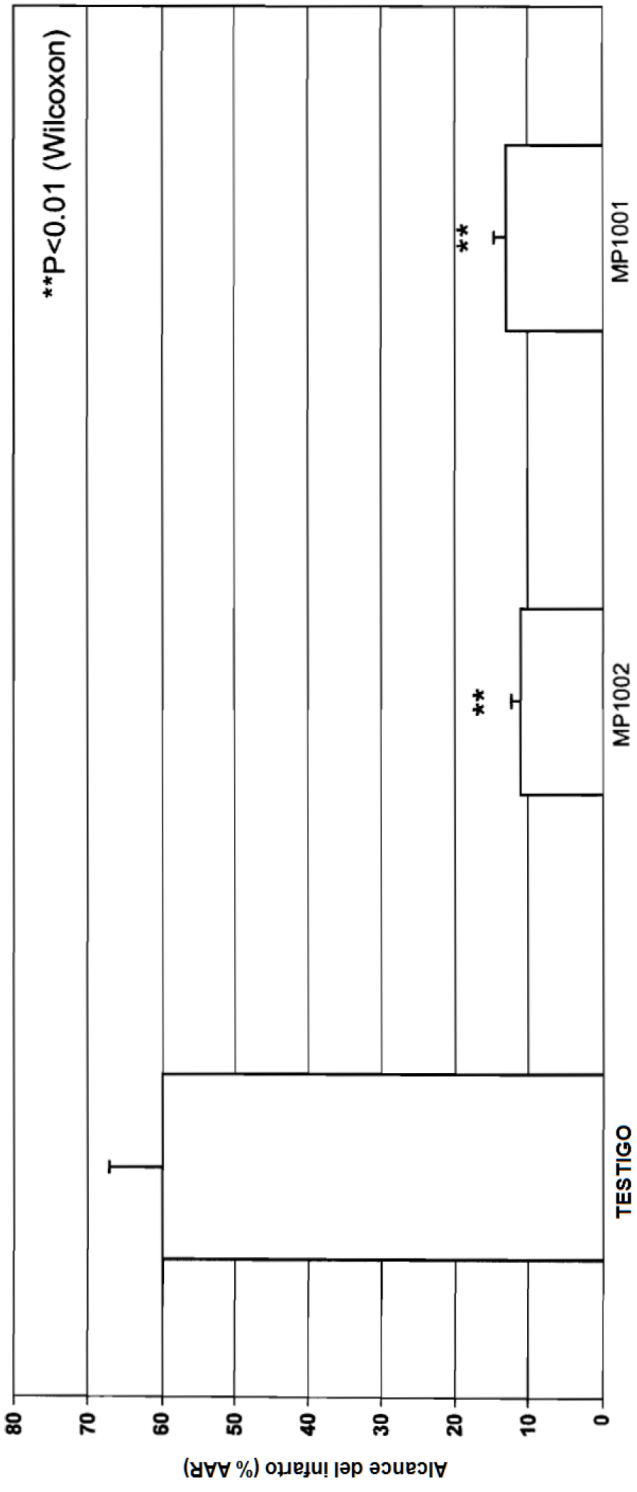
7. Un compuesto de fórmula:



(III)

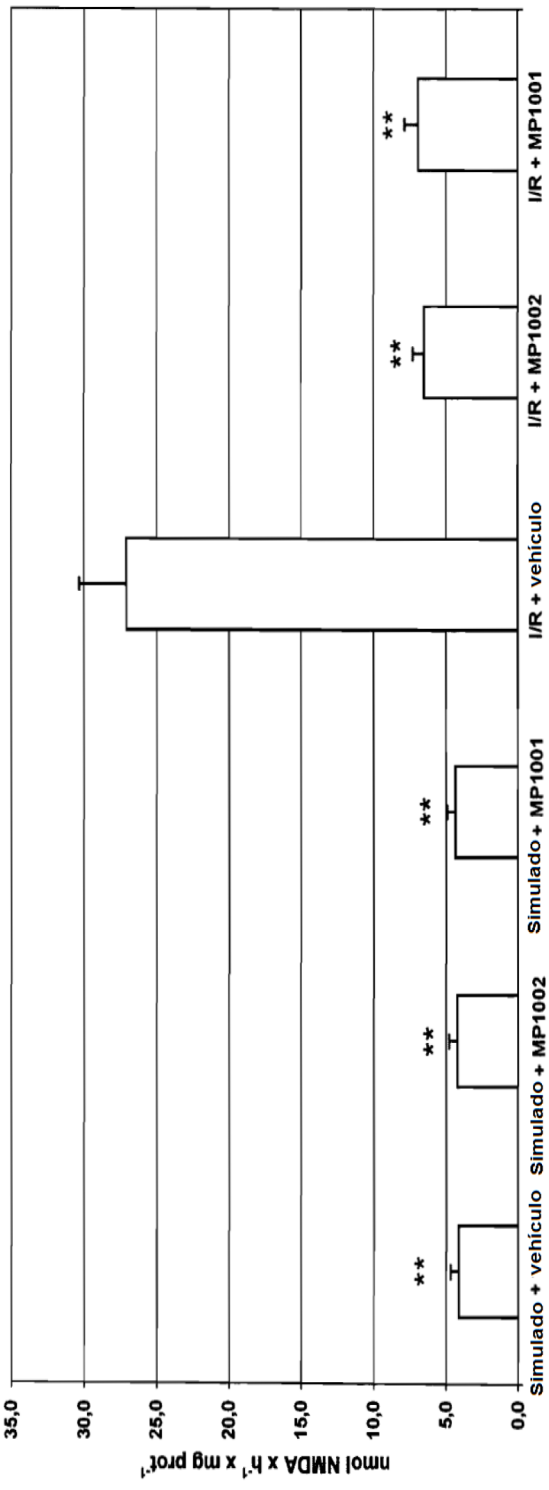
en la que R_6 y R_7 son iguales o diferentes y se seleccionan entre oxilo e hidroxilo, para ser usado en el tratamiento terapéutico de enfermedades neurodegenerativas, mediante una vía de administración seleccionada entre oral, intramuscular, subcutánea, intravenosa, dermatológica o inhaladora.

Fig. 1 - EFECTOS DE ANTIOXIDANTES MP1002 Y MP1001 SOBRE EL ALCANCE DEL INFARTO DE MIOCARDIO DESPUÉS DE OCLUSIÓN Y REPERFUSIÓN DE LA ARTERIA CORONARIA DESCENDENTE ANTERIOR IZQUIERDA (LAD) EN RATA



El valor de las tandas representa la media ± SD (desviación típica) de al menos quince ensayos diferentes. Los diversos grupos de animales fueron sometidos a una oclusión de LAD y recibieron, 5 minutos después del comienzo de la reperfusión, el vehículo (solución salina - testigo), MP1002 o MP1001.

Fig. 2 - EFECTOS DE ANTIOXIDANTES MP1002 Y MP1001 SOBRE EL DESARROLLO DE LA PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS EN ISQUEMIA DE MIOCARDIO Y REPERFUSIÓN (I/R) EN RATA



Cada valor representa la media + SD de al menos quince ensayos. ++P < 0,01 en comparación con UI/R + vehículo (método Wilcoxon)