

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 092**

51 Int. Cl.:

C07D 309/30 (2006.01)
A61K 31/366 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 25/08 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2010 E 10720187 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014 EP 2420496**

54 Título: **Compuesto neuroprotector, hipocolesterolémico y antiepiléptico**

30 Prioridad:

16.04.2009 EP 09382051

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

07.04.2015

73 Titular/es:

NEURON BIOPHARMA, S.A. (100.0%)
Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud
Avda. de la Innovación, 1
18100 Armilla - Granada, ES

72 Inventor/es:

BURGOS MUÑOZ, JAVIER SANTOS;
ADRIO FONDEVILA, JOSÉ LUIS;
RAMOS MARTÍN, MARIA DEL CARMEN;
SIERRA ÁVILA, SALETA;
ALFARO SÁNCHEZ, JUAN MARÍA;
RAMÍREZ MORENO, CARLOS;
CAMPOY GARCÍA, SONIA;
VELASCO ÁLVAREZ, JAVIER y
RUMBERO SÁNCHEZ, ÁNGEL

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 533 092 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

Compuesto neuroprotector, hipocolesterolémico y antiepiléptico

Campo de la invención

- 5 La presente invención da a conocer la prevención y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas o de enfermedades asociadas con una oxidación indeseada o de procesos patológicos asociados a la edad, así como con la prevención y/o el tratamiento de la epilepsia, de las crisis epilépticas o de las convulsiones, con la disminución de los niveles de colesterol-LDL y con la inhibición de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa para la prevención de la dislipemia y de las enfermedades cardiovasculares.

Antecedentes de la invención

- 10 La gran incidencia de las enfermedades neurodegenerativas y de las enfermedades asociadas al envejecimiento es un problema de primer orden en todo el mundo. Por ello es necesaria la búsqueda de compuestos neuroprotectores que eviten o palien dichas enfermedades. De todas ellas, la enfermedad de Alzheimer (EA) es la más prevalente, estimándose que en el año 2040, 81 millones de personas sufrirán esa enfermedad (Blennow et al., Lancet 2006; 368: 387-403). Solo en España se estima que más de medio millón de personas sufren
- 15 actualmente EA. Los costes asociados a esta enfermedad son proporcionalmente altos, y se calcula que el coste total derivado del cuidado de los enfermos de Alzheimer es de 81.000 y 22.000 millones de € en Estados Unidos y en el Reino Unido, respectivamente. Actualmente no existen fármacos eficaces que prevengan o impidan esta enfermedad, con lo que la búsqueda y validación de nuevos compuestos neuroprotectores que eviten el daño neuronal es una necesidad.
- 20 En la actualidad, se están siguiendo diferentes estrategias para la obtención de nuevos compuestos, una vez que se ha visto que los actuales fármacos ofrecen pocos beneficios a los pacientes. Estos fármacos retrasan temporalmente (en el mejor de los casos un año), algunos síntomas de la dolencia, pero no evitan su evolución. Las opciones terapéuticas actuales se basan en la inhibición de la acetilcolinesterasa con fármacos como el donepezilo, la galantamina o la rivastigmina, o en la capacidad de la memantina en antagonizar un receptor de
- 25 glutamato, el NMDA (ácido N-metil-D-aspartico).

- Debido al poco éxito de estos fármacos se han abierto nuevas líneas de investigación, y, entre ellas, destaca en los últimos tiempos la investigación de los inhibidores de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMGR) (más conocidos como estatinas) como agentes terapéuticos. La HMGR es la enzima que cataliza el paso limitante en la biosíntesis del colesterol, por lo que su inhibición por las estatinas es una estrategia terapéutica
- 30 habitual para disminuir los altos niveles de colesterol asociados a las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Estos fármacos reducen el riesgo de infarto de miocardio y de muerte coronaria, y son considerados seguros. Además, la hipercolesterolemia (definida como un alto nivel de colesterol en sangre) es el principal factor de riesgo para la enfermedad cardiovascular isquémica, como la aterosclerosis.

- Diversos factores genéticos y ambientales que afectan al metabolismo del colesterol están asociados con la EA. Por ejemplo, la isoforma $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (apoE4) es un factor de riesgo para la EA y está ligado a un incremento de los niveles de colesterol. La aterosclerosis, que tiene a la hipercolesterolemia como principal factor de riesgo, parece estar asociada también a la EA. Además, estudios epidemiológicos indican que altos niveles de
- 35 colesterol en suero incrementan el riesgo de EA, y se ha propuesto que la regulación homeostática del metabolismo del colesterol puede estar alterada en el alzhéimer. Por otra parte, se ha descrito una reducción significativa del riesgo de Alzheimer en pacientes tratados con estatinas. En conjunto, todos estos estudios sugieren que la reducción de los niveles de colesterol puede inhibir la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (Cole & Vassar; Neurobiol Dis 2006; 22[2]:209-22).

- El colesterol es transportado por la sangre mediante diferentes tipos de lipoproteínas, donde los mayores portadores de colesterol son las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de alta densidad (HDL). Las LDL son lipoproteínas especializadas en el transporte del colesterol y de los triglicéridos desde el hígado a tejidos periféricos, donde son captados por las células a través de los receptores LDL (R-LDL) en membrana celular. Las LDL también regulan la síntesis de colesterol, y se han asociado los altos niveles de colesterol-LDL al riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (ECV). Por su parte, las HDL son lipoproteínas que transportan el
- 45 colesterol desde los diferentes tejidos hasta el hígado. Debido a que las HDL pueden retirar el colesterol de las arterias y transportarlo de vuelta al hígado para su excreción, se les otorga un papel protector frente a las enfermedades cardiovasculares. Los inhibidores de la HMGR son los agentes hipolipemiantes de más éxito en la historia, siendo capaces de reducir los niveles de colesterol total a base de disminuir los niveles de colesterol-LDL sin alterar los de colesterol-HDL.

- Recientemente se han descrito nuevas propiedades de las estatinas, especialmente a nivel de daño cerebral causado por trauma o en demencias, proponiéndose nuevas actividades antioxidantes y antiinflamatorias (Pahan, Cell Mol Life Sci. 2006; 63[10]:1165-78), y se ha demostrado que ciertas estatinas (p. ej., simvastatina) intensifican la capacidad de memoria y aprendizaje en ratones (Ling et al., Ann Neurol. 2006; 60[6]:729-39) o protegen de las crisis convulsivas asociadas a fenómenos epilépticos (Lee et al., Neurosci Lett. 2008; 440: 260-4). Además, las

estatinas también han demostrado su eficacia en ensayos clínicos en fase II que sugieren resultados positivos frente al tratamiento del vasoespasmio cerebral (Fandino et al., Neurocirugía. 2007; 18: 16-27), así como frente a la muerte neuronal inducida por daño isquémico en la retina (Honjo et al., Arch. Ophthalmol. 2002; 120: 1707-13). No obstante, actualmente se encuentra en discusión si los efectos neuroprotectores de las diferentes estatinas comerciales (p. ej., atorvastatina, lovastatina, simvastatina, etc.) son debidos a un efecto directo sobre el metabolismo lipídico, o si por el contrario es consecuencia de rutas alternativas.

La solicitud de patente WO 99/11258 describe un compuesto de estructura similar al de la presente invención. No obstante, este documento no especifica la configuración de los distintos centros quirales presentes en el compuesto.

Sumario de la invención

Aunque existe literatura sobre el potencial efecto neuroprotector de las estatinas, los autores de esta invención han encontrado que un derivado de monacolina J no comercial, en concreto el 2-etil-butirato de (1S,3R,7S,8S,8aR)-1,2,3,7,8,8a-hexahidro-3,7-dimetil-8-[2-[(2R,4R)-tetrahydro-4-hidroxi-6-oxo-2H-piran-2-il]etil]-1-naftalenilo (también identificado en ocasiones en esta solicitud de patente como NST0037) es un agente con un potencial neuroprotector sorprendente, además de tener una alta capacidad de disminuir los niveles de lípidos (colesterol y triglicéridos) de la sangre, inhibiendo de forma muy eficaz la HMGR, y protegiendo de la epilepsia, de las crisis epilépticas y de las convulsiones. Además, y de forma sorprendente, este compuesto es más seguro que las estatinas comerciales, mostrando niveles de toxicidad por debajo de la estatina más biosegura, la simvastatina. Adicionalmente, se trata de un compuesto que resulta más barato de sintetizar debido al bajo coste de la cadena lateral a añadir a la molécula de monacolina J.

La actividad neuroprotectora de dicho compuesto se ha puesto de manifiesto frente a diferentes agresiones que causan la muerte neuronal en líneas celulares humanas de origen colinérgico mediante diferentes tipos de agresiones que causan estrés oxidativo, estrés reticular o apoptosis (Ejemplo 2, Figuras 1 a 4). Dicho ejemplo pone de manifiesto el potencial empleo de dicho compuesto en la prevención y/o tratamiento de la muerte neuronal asociada a enfermedades neurodegenerativas (p. ej., Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, *status epilepticus*, Huntington, etc.) o de enfermedades asociadas con una oxidación indeseada o de procesos patológicos asociados a la edad.

La actividad neuroprotectora de dicho compuesto se ha confirmado en un modelo de enfermedad de Alzheimer en ratón, donde este compuesto ejerce un efecto neuroprotector frente a la muerte neuronal en el hipocampo causada por una sustancia excitotóxica (Ejemplo 3, Figura 5). Además, se ha comprobado que dicha sustancia recupera la memoria temporal y espacial de los ratones con neurodegeneración (Ejemplo 3, Figuras 6 y 7), además de evitar la muerte de los animales causada por la administración de una sustancia excitotóxica (Ejemplo 3, Figura 8). Dichos ejemplos ponen de manifiesto el potencial empleo de este compuesto en la prevención y/o tratamiento de la muerte neuronal y del déficit cognitivo asociados a enfermedades neurodegenerativas (p. ej., Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, *status epilepticus*, Huntington, etc.) o de enfermedades asociadas con una oxidación indeseada o de procesos patológicos asociados a la edad.

La actividad antiepiléptica y anticonvulsivante de dicho compuesto se ha puesto de manifiesto mediante la determinación de la protección de las crisis epilépticas y de las convulsiones en un modelo de epilepsia en ratones (Ejemplo 4, Figuras 9 y 10). Dicho ejemplo pone de manifiesto el potencial empleo de este compuesto en la prevención y/o tratamiento de la epilepsia y de las crisis convulsivas o convulsiones.

La actividad hipolipemiente de dicho compuesto se ha puesto de manifiesto mediante la determinación de la inhibición de la HMGR en comparación con dos estatinas comerciales, la simvastatina y la atorvastatina (Ejemplo 5, Figura 11).

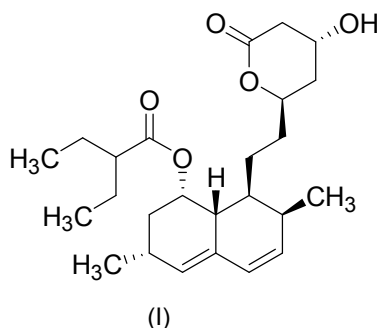
Adicionalmente se ha demostrado la capacidad hipolipemiente de dicho compuesto en un modelo de hiperlipidemia endógena en ratón, observándose un efecto similar a la simvastatina en la disminución de los niveles de colesterol plasmático total, del colesterol asociado a LDL, del colesterol asociado a VLDL y de la fracción de colesterol esterificado. Por el contrario, y al igual que la simvastatina, no altera los niveles de colesterol asociado a HDL ni los de la fracción de colesterol libre, lo que le otorga un papel protector frente a enfermedades cardiovasculares (ECV) (Ejemplo 5, Figuras 12 a 17). Dichos ejemplos ponen de manifiesto el potencial empleo de dicho compuesto en la prevención y/o tratamiento de la hipercolesterolemia asociada a enfermedades cardiovasculares (p. ej., infarto de miocardio, aterosclerosis, cardiopatía congénita, cardiopatía adquirida, cardiopatía isquémica, cardiopatía hipertensiva, valvulopatías, miocardiopatías, trastornos sanguíneos, etc.).

La actividad hipolipemiente de dicho compuesto se ha confirmado en un modelo de hiperlipidemia inducida en ratón (Ejemplo 6, Figuras 18 a 23), observándose un efecto mayor a la simvastatina en la disminución de los niveles de colesterol plasmático total, del colesterol asociado a LDL y de la fracción de colesterol libre y esterificado. Por el contrario, este compuesto no altera los niveles de colesterol asociado a HDL ni los de colesterol asociado a VLDL, lo que le otorga un papel protector frente a enfermedades cardiovasculares (ECV). Dichos ejemplos ponen de manifiesto el potencial empleo de dicho compuesto en la prevención y/o tratamiento de la

hipercolesterolemia asociada a enfermedades cardiovasculares (p. ej., infarto de miocardio, aterosclerosis, cardiopatía congénita, cardiopatía adquirida, cardiopatía isquémica, cardiopatía hipertensiva, valvulopatías, miocardiopatías, trastornos sanguíneos, etc.).

La bioseguridad de dicho compuesto se ha puesto de manifiesto mediante la evaluación de su toxicidad en un modelo de embrión de pez cebra, en comparación con una estatina comercial, la simvastatina, observándose que es menos tóxica que la simvastatina a diferentes concentraciones ya que produce una menor mortalidad (Ejemplo 7, Figuras 24 y 25). Adicionalmente, se ha demostrado que la dosis letal 50 (LD50) es mayor en el caso del compuesto NST0037 que en el de la simvastatina en todos los puntos temporales evaluados, lo que indica una mayor bioseguridad de dicho compuesto (Ejemplo 7, Figuras 26). Adicionalmente, se ha demostrado que este compuesto produce un mayor porcentaje de larvas sanas al final del experimento, así como un menor porcentaje de larvas con deformidades o aspecto anómalo (Ejemplo 7, Figuras 27 y 28). Adicionalmente, este compuesto no produce una variación significativa del porcentaje de latidos cardíacos a altas concentraciones, a diferencia de la simvastatina que produce una disminución significativa del ritmo cardíaco a altas concentraciones (Ejemplo 7, Figuras 29).

Por tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) [también identificado en ocasiones en esta solicitud de patente como NST0037]:



su forma hidroxilácida, las sales farmacéuticamente aceptables de dicho hidroxilácido y solvatos farmacéuticamente aceptables del compuesto y de su forma hidroxilácida.

Otro aspecto de la presente invención, es una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) y/o su forma hidroxilácida y/o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilácido y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilácida, y al menos un adyuvante, portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I), su forma hidroxilácida o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilácido y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilácida para su uso como medicamento.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I), su forma hidroxilácida o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilácido y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilácida para su uso como agente neuroprotector, en particular en la prevención y/o el tratamiento de:

a. enfermedades neurodegenerativas (p. ej., Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, *status epilepticus*, Huntington, etc.), más concretamente, procesos de apoptosis, estrés oxidativo o estrés de retículo endoplásmico asociados a dichas enfermedades neurodegenerativas crónicas,

b. deterioro cognitivo,

c. procesos patológicos asociados a la edad y progeria,

d. epilepsia, crisis epilépticas y convulsiones.

Un aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I), de su forma hidroxilácida, de una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilácido y/o de un solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilácida en la elaboración de un medicamento. Según una realización particular, el medicamento es para su uso como agente neuroprotector, en particular en la prevención y/o el tratamiento de:

a. enfermedades neurodegenerativas (p. ej., Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, *status epilepticus*, Huntington, etc.), más concretamente, procesos de apoptosis, estrés oxidativo o estrés de retículo endoplásmico asociados a dichas enfermedades neurodegenerativas crónicas,

b. deterioro cognitivo,

- c. procesos patológicos asociados a la edad y progeria,
- d. epilepsia, crisis epilépticas y convulsiones.

La presente invención da a conocer un compuesto de fórmula (I), su forma hidroxilada o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilado y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilada para su uso en el aumento de la expresión del gen seladin-1/DHCR24.

La presente invención da a conocer un compuesto de fórmula (I), su forma hidroxilada o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilado y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilada para su uso en la prevención y/o tratamiento de enfermedades relacionadas con el gen seladin-1/DHCR24.

La presente invención da a conocer el uso de un compuesto de fórmula (I), de su forma hidroxilada, de una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilado y/o de un solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilada en la elaboración de un medicamento caracterizado por incrementar la expresión del gen seladin-1/DHCR24.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una gráfica de dispersión XY que representa el efecto protector del compuesto NST0037 frente a la muerte causada por xantina/xantina oxidasa (XXO). La figura muestra el porcentaje de la muerte celular (tomando el 100 % la producida por XXO) de los cultivos tratados con 10 μ M xantina (X) 60 mU/ml xantina oxidasa (XO) y NST0037 a diferentes concentraciones, representando las medias+DE de 3 experimentos independientes por triplicado. * Diferencia significativa respecto a los tratamientos con XXO sola, según el test t de Student ($p < 0,05$).

La Figura 2 es una gráfica de dispersión XY que representa el efecto protector del compuesto NST0037 frente a la muerte causada por tunicamicina (Tm). La figura muestra el porcentaje de la muerte celular (tomando el 100 % la producida por Tm) de los cultivos tratados con 24 μ M Tm y NST0037 a diferentes concentraciones, representando las medias+DE de 3 experimentos independientes por triplicado. * Diferencia significativa respecto a los tratamientos con Tm sola, según el test t de Student ($p < 0,05$).

La Figura 3 es una gráfica de dispersión XY que representa el efecto protector del compuesto NST0037 frente a la muerte causada por camptotecina (CPT). La figura muestra el porcentaje de la muerte celular (tomando el 100 % la producida por CPT) de los cultivos tratados con 20 nM CPT y NST0037 a diferentes concentraciones, representando las medias+DE de 3 experimentos independientes por triplicado. * Diferencia significativa respecto a los tratamientos con CPT sola, según el test t de Student ($p < 0,05$).

La Figura 4 son dos gráficas de barras que representan el efecto protector del compuesto NST0037 frente a la apoptosis producida por camptotecina (CPT) determinada por citometría de flujo. La Figura 4A muestra el porcentaje de inhibición de la apoptosis producida por 50 μ M CPT y NST0037 a 10, 40 y 100 μ M en comparación con el control de inhibición el Z-VAD-fmk a 50 μ M, representando las medias+DE de 3 experimentos independientes. * Diferencia significativa respecto al tratamiento con CPT sola, según el test t de Student ($p < 0,05$).

La Figura 4B muestra que el pretratamiento con NST0037 potencia el efecto antiapoptótico del compuesto (40 μ M NST0037 y tratamiento 24 h con 50 μ M de CPT como inductor de la apoptosis), siendo esta protección inhibida parcialmente por la adición de mevalonato (MEV), precursor de la ruta de biosíntesis del colesterol y producto de la reacción enzimática que cataliza la enzima HMG-CoA reductasa. La Figura 4B muestra el porcentaje de inhibición de la apoptosis producida por 50 μ M CPT con un pretratamiento de 24 h con 40 μ M NST0037 solo o junto con 100 μ M mevalonato (MEV), y el efecto del inhibidor Z-VAD-fmk a 50 μ M como control, representando las medias+DE de 3 experimentos independientes. * Diferencia significativa respecto al tratamiento con CPT sola, # diferencia significativa respecto al tratamiento con CPT y NST0037, según el test t de Student ($p < 0,05$).

La Figura 5 es una composición de micrografías que muestra las regiones CA1 y CA2 del hipocampo de ratones donde las muestras han sido teñidas con hematoxilina y eosina. La figura representa el análisis histopatológico de la estructura celular de estas regiones en función del pretratamiento 24 y 0,5 horas antes de la inoculación de la sustancia excitotóxica [ácido kaínico o kainato o KA]), la inoculación de la sustancia excitotóxica (0 días post-inoculación [d.p.i.]) y el posterior tratamiento (hasta 7 d.p.i.).

La Figura 6 es una gráfica de barras donde se analiza el estado de la memoria temporal según el protocolo de Dere y colaboradores (Dere, E., Huston, J. P. & De Souza Silva, M. A. Neurobiol Learn Mem 2005; 84: 214-21). Las barras representan las medias $\pm$ EEM de la memoria temporal expresada en unidades arbitrarias (eje Y), en función del pretratamiento (24 y 0,5 horas antes de la inoculación de la sustancia excitotóxica [ácido kaínico o kainato o KA]), la inoculación de la sustancia excitotóxica (0 días post-inoculación [d.p.i.]) y el posterior tratamiento (hasta 7 d.p.i.).

La Figura 7 es una gráfica de barras donde se analiza el estado de la memoria espacial según el protocolo de Dere y colaboradores (Dere, E., Huston, J. P. & De Souza Silva, M. A. Neurobiol Learn Mem 2005; 84: 214-21). Las barras representan las medias $\pm$ EEM de la memoria espacial expresada en unidades arbitrarias (eje Y), en función

del pretratamiento (24 y 0,5 horas antes de la inoculación de la sustancia excitotóxica [ácido kaínico o kainato o KA]), la inoculación de la sustancia excitotóxica (0 días post-inoculación [d.p.i.]) y el posterior tratamiento (hasta 7 d.p.i.).

5 La Figura 8 es una gráfica de Kaplan-Meier que representa el índice de supervivencia de los ratones en función del pretratamiento (24 y 0,5 horas antes de la inoculación de la sustancia excitotóxica [ácido kaínico o kainato o KA]), la inoculación de la sustancia excitotóxica (0 días post-inoculación [d.p.i.]) y el posterior tratamiento (hasta 7 d.p.i.).

10 La Figura 9 es una gráfica de barras donde se representa la media $\pm$ EEM del tiempo en minutos tras la inoculación de KA en el que aparece la primera convulsión (eje Y) en función del pretratamiento recibido (eje X). El grupo de pretratamiento con PBS se representa en negro y el grupo de tratamiento con NST0037 a 50 mg/kg de peso se representa en gris.

15 La Figura 10 es una gráfica de dispersión XY que representa el nivel de severidad del *status epilepticus* observado según la escala de Racine (Racine, Electroencephalogr Clin Neurophysiol 1972; 32[3]:281-94), frente al tiempo post-inoculación de la sustancia epileptogénica (ácido kaínico o kainato o KA). La gráfica muestra la evolución del estado epileptogénico de los animales según el tratamiento recibido: PBS se representa con círculos y línea negros y el grupo de tratamiento con NST0037 a 50 mg/kg de peso se representa con cuadrados y línea grises.

20 La Figura 11 es una gráfica de dispersión XY que representa las curvas de dosis-respuesta del compuesto NST0037 en comparación con dos estatinas comerciales (simvastatina y atorvastatina) sobre la actividad enzimática de la HMGR in vitro. La gráfica muestra el porcentaje de actividad enzimática de la HMGR con respecto al control de los compuestos en diferentes dosis, representando la media $\pm$ DE de al menos cuatro ensayos independientes.

La Figura 12 es un diagrama de barras que representa los niveles de colesterol total plasmático de ratones macho ApoB100 tras 12 h de ser tratados con 50 mg/kg de NST0037 o simvastatina, representando la media $\pm$ DE de cada uno de los grupos. * Diferencia significativa respecto al tiempo 0h, según el test t de Student ($p<0,05$).

25 La Figura 13 es un diagrama de barras que representa los niveles de colesterol LDL plasmático (c-LDL) de ratones macho ApoB100 tras 12 h de ser tratados con 50 mg/kg de NST0037 o simvastatina, representando la media $\pm$ DE de cada uno de los grupos. * Diferencia significativa respecto al tiempo 0h, según el test t de Student ($p<0,05$).

30 La Figura 14 es un diagrama de barras que representa los niveles de colesterol HDL plasmático (c-HDL) de ratones macho ApoB100 tras 12 h de ser tratados con 50 mg/kg de NST0037 o simvastatina, representando la media $\pm$ DE de cada uno de los grupos. * Diferencia significativa respecto al tiempo 0h, según el test t de Student ($p<0,05$).

La Figura 15 es un diagrama de barras que representa los niveles de colesterol VLDL plasmático (c-VLDL) de ratones macho ApoB100 tras 12 h de ser tratados con 50 mg/kg de NST0037 o simvastatina, representando la media $\pm$ DE de cada uno de los grupos. * Diferencia significativa respecto al tiempo 0h, según el test t de Student ($p<0,05$).

35 La Figura 16 es un diagrama de barras que representa los niveles de colesterol esterificado (CE) plasmático de ratones macho ApoB100 tras 12 h de ser tratados con 50 mg/kg de NST0037 o simvastatina, representando la media $\pm$ DE de cada uno de los grupos. * Diferencia significativa respecto al tiempo 0h, según el test t de Student ($p<0,05$).

40 La Figura 17 es un diagrama de barras que representa los niveles de colesterol libre (CL) plasmático de ratones macho ApoB100 tras 12 h de ser tratados con 50 mg/kg de NST0037 o simvastatina, representando la media $\pm$ DE de cada uno de los grupos. * Diferencia significativa respecto al tiempo 0 h, según el test t de Student ($p<0,05$).

45 La Figura 18 es un diagrama de barras que representa el número de veces que incrementa el colesterol total (CT) en ratones macho C57BL6 tras 24 h de ser tratados i.p. con 500 mg/kg de Tritón 1339 (Tiloxapol) y 50 mg/kg de NST0037 o simvastatina, representando la media $\pm$ DE de cada uno de los grupos. * Diferencia significativa respecto al grupo control, según el test t de Student ($p<0,05$).

La Figura 19 es un diagrama de barras que representa el número de veces que incrementa el colesterol LDL (c-LDL) en ratones macho C57BL6 tras 24 h de ser tratados i.p. con 500 mg/kg de Tritón 1339 (Tiloxapol) y 50 mg/kg de NST0037 o simvastatina, representando la media $\pm$ DE de cada uno de los grupos. * Diferencia significativa respecto al grupo control, según el test t de Student ($p<0,05$).

50 La Figura 20 es un diagrama de barras que representa el número de veces que incrementa el colesterol HDL (c-HDL) en ratones macho C57BL6 tras 24 h de ser tratados i.p. con 500 mg/kg de Tritón 1339 (Tiloxapol) y 50 mg/kg de NST0037 o simvastatina, representando la media $\pm$ DE de cada uno de los grupos.

La Figura 21 es un diagrama de barras que representa los niveles de colesterol VLDL (c-VLDL) en ratones macho C57BL6 tras 24 h de ser tratados i.p. con 500 mg/kg de Tritón 1339 (Tiloxapol) y 50 mg/kg de NST0037 o

simvastatina, representando la media $\pm$ DE de cada uno de los grupos. * Diferencia significativa respecto al grupo control, según el test t de Student ($p<0,05$).

5 La Figura 22 es un diagrama de barras que representa el número de veces que incrementa el colesterol esterificado (CE) en ratones macho C57BL6 tras 24 h de ser tratados i.p. con 500 mg/kg de Tritón 1339 (Tiloxapol) y 50 mg/kg de NST0037 o simvastatina, representando la media $\pm$ DE de cada uno de los grupos.

La Figura 23 es un diagrama de barras que representa el número de veces que incrementa el colesterol libre (CL) en ratones macho C57BL6 tras 24 h de ser tratados i.p. con 500 mg/kg de Tritón 1339 (Tiloxapol) y 50 mg/kg de NST0037 o simvastatina, representando la media $\pm$ DE de cada uno de los grupos.

10 La Figura 24 es una gráfica de Kaplan-Meier que representa el índice de supervivencia de los embriones-larvas en función del tratamiento recibido: control, NST0037 (a una dosis de 2 mg/l) o simvastatina (a una dosis de 2 mg/l). * Diferencia significativa respecto al control, de acuerdo al test de χ^2 ($p<0,01$).

La Figura 25 es una gráfica de Kaplan-Meier que representa el índice de supervivencia de los embriones-larvas en función del tratamiento recibido: control, NST0037 (a una dosis de 0,2 mg/l) o simvastatina (a una dosis de 2 mg/l). * Diferencia significativa respecto al control, de acuerdo al test de χ^2 ($p<0,01$).

15 La Figura 26 es una gráfica de dispersión XY que representa la dosis letal 50 (LD50) de los dos compuestos (NST0037 o simvastatina) frente al tiempo de tratamiento.

La Figura 27 es una gráfica de barras que representa el porcentaje de larvas sanas que se obtienen al final de experimento en función del tratamiento recibido (NST0037 o simvastatina) y la dosis usada (0,02, 0,06 o 0,2 mg/l), y donde se representa las medias $\pm$ DE.

20 La Figura 28 es una gráfica de dispersión XY que representa el porcentaje de embriones-larvas con deformidades o aspecto anómalo en función del tratamiento recibido (NST0037 o simvastatina). * Diferencia significativa entre los dos tratamientos, según el test t de Student ($p<0,05$).

25 La Figura 29 es una gráfica de barras que representa el porcentaje del ritmo cardiaco de los embriones-larvas tratados con dosis crecientes de los compuestos NST0037 o simvastatina, a las 72 horas post-tratamiento, representando las medias $\pm$ DE. La línea negra punteada horizontal representa el valor medio del ritmo cardiaco correspondiente a los controles. * Diferencia significativa de los tratamientos respecto al control, según el test t de Student ($p<0,05$).

30 La Figura 30 es una gráfica que muestra la actividad antifúngica del compuesto NST0037 y de la simvastatina. En ella se representa el logaritmo de las concentraciones ensayadas (mM) frente al diámetro de los halos de inhibición (cm).

35 La Figura 31 es una gráfica de barras que muestra el aumento de la expresión del gen seladin-1/DHCR24 por el tratamiento con NST0037 en las células SK-N-MC. Se muestra la cuantificación relativa (RQ) de la expresión del gen seladin-1/DHCR24, normalizada por el 18S, y referida al valor de las células sin tratamiento (control), para los tratamientos durante 24 h con NST0037 a 1, 4, 10 y 40 μ M. Se muestran los resultados de dos ensayos independientes por triplicado. * Diferencia significativa respecto al control según el test t de Student ($p<0,05$).

40 La Figura 32 es una gráfica de dispersión XY que representa el efecto protector del compuesto NST0037 frente a la muerte causada por ácido okadaico (OA). La figura muestra el porcentaje de la muerte celular (tomando el 100 % la producida por OA) de los cultivos tratados con 20 nM OA y NST0037 a diferentes concentraciones, representando las medias $\pm$ DE de 3 experimentos independientes por triplicado. * Diferencia significativa respecto a los tratamientos con OA sola, según el test t de Student ($p<0,05$).

45 La Figura 33 es una gráfica de dispersión XY que representa el efecto protector del compuesto NST0037 frente a la muerte causada por ácido 3-nitropropiónico (3-NP). La figura muestra el porcentaje de la muerte celular (tomando el 100 % la producida por 3-NP) de los cultivos tratados con 30 μ M 3-NP y NST0037 a diferentes concentraciones, representando las medias $\pm$ DE de 3 experimentos independientes por triplicado. * Diferencia significativa respecto a los tratamientos con 3-NP sola, según el test t de Student ($p<0,05$).

50 La Figura 34 es una gráfica de barras que representa el efecto inhibidor del pretratamiento del compuesto NST0037 sobre la activación de la caspasa 3/7, inducida por camptotecina (CPT). La figura muestra el porcentaje de la caspasa 3/7 activa referida a las células control, sin tratamiento, producido por 50 μ M CPT y pretratamiento con NST0037 a 10 y 40 μ M, mevalonato a 100 μ M y la combinación de ambos compuestos, además, se utiliza el inhibidor Z-VAD-fmk a 50 μ M como control de inhibición, representando las medias $\pm$ DE de 3 experimentos independientes. * Diferencia significativa respecto al tratamiento con CPT sola, # diferencia significativa respecto al tratamiento con CPT y NST0037, según el test t de Student ($p<0,05$).

La Figura 35 son dos gráficas de barras en las que se muestra el porcentaje de A β (1–40) (A) y A β (1–42) (B) secretado y cuantificado mediante ELISA y referido a las células control a 48 h. Se muestran los resultados de un

ensayo representativo por duplicado (media+DE). * Diferencia significativa respecto al control según el test t de Student ($p < 0,05$).

- 5 La Figura 36 es una gráfica de barras que representa el efecto del mevalonato sobre la protección por NST0037 frente a la muerte celular producida por XXO. La figura muestra el porcentaje de la muerte celular (tomando el 100 % la producida por XXO) de los cultivos tratados con 10 μ M xantina (X) 60 mU/ml xantina oxidasa (XO) y 40 μ M NST0037 y mevalonato a 10, 40 y 100 μ M, representando las medias+DE de 3 experimentos independientes por triplicado. * Diferencia significativa respecto al tratamiento con XXO sola; # diferencia significativa respecto al tratamiento con XXO y NST0037, según el test t de Student ($p < 0,05$).
- 10 La Figura 37 es una composición de micrografías que muestra la inmunohistoquímica de MAP2 en el hipocampo de ratones con una magnificación de 12,5X y en más detalle de las áreas CA1 y CA2-CA3 con una magnificación de 200X. La figura representa el análisis histopatológico de la distrofia neurítica en función del pretratamiento (24 y 0,5 horas antes de la inoculación de la sustancia excitotóxica [ácido kaínico o kainato o KA]), la inoculación de la sustancia excitotóxica (0 días post-inoculación [d.p.i.]) y el posterior tratamiento (hasta 7 d.p.i.).
- 15 La Figura 38 es una composición de micrografías que muestra: (A) la región CA2 y CA3 del hipocampo de ratones donde a las muestras se les ha realizado la inmunohistoquímica de HNE, la técnica de T.U.N.E.L. y la inmunohistoquímica de GFAP, todas las imágenes tienen una magnificación de 100X. La figura representa el análisis histopatológico del daño oxidativo, la apoptosis y astrogliosis en el hipocampo en función del pretratamiento (24 y 0,5 horas antes de la inoculación de la sustancia excitotóxica [ácido kaínico o kainato o KA]), la inoculación de la sustancia excitotóxica (0 días post-inoculación [d.p.i.]) y el posterior tratamiento (hasta 7 d.p.i.).
- 20 La Figura 39 es una gráfica de Kaplan-Meier que representa el índice de supervivencia de los ratones en función del tratamiento (24 y 0,5 horas antes de la inoculación de la sustancia neurotóxica [MPTP]), la inoculación de la sustancia neurotóxica (0 días post-inoculación [d.p.i.]) y el posterior tratamiento (hasta 7 d.p.i.).
- 25 La Figura 40 es una gráfica de barras donde se analiza la resistencia del animal. Las barras representan las medias $\pm$ EEM del ratio entre el tiempo de permanencia en el cilindro de los animales a los 7 d.p.i. respecto del estado basal (eje Y), en función del tratamiento (24 y 0,5 horas antes de la inoculación de la sustancia neurotóxica [MPTP]), la inoculación de la sustancia neurotóxica (0 días post-inoculación [d.p.i.]) y el posterior tratamiento (hasta 7 d.p.i.).
- 30 La Figura 41 es una gráfica de barras donde se analiza la fuerza en las extremidades delanteras del animal. Las barras representan las medias $\pm$ EEM del ratio la fuerza de los animales en gramos por quintuplicado a los 7 d.p.i. respecto del estado basal (eje Y), en función del tratamiento (24 y 0,5 horas antes de la inoculación de la sustancia neurotóxica [MPTP]), la inoculación de la sustancia neurotóxica (0 días post-inoculación [d.p.i.]) y el posterior tratamiento (hasta 7 d.p.i.).
- 35 La Figura 42 es una composición de micrografías que muestra las regiones de la sustancia nigra y del estriado de ratones donde las muestras han sido teñidas con Fluoro Jade B con una magnificación de 100X. La figura representa el análisis histopatológico de la neurodegeneración en función del tratamiento (24 y 0,5 horas antes de la inoculación de la sustancia neurotóxica [MPTP]), la inoculación de la sustancia neurotóxica (0 días post-inoculación [d.p.i.]) y el posterior tratamiento (hasta 7 d.p.i.).
- 40 La Figura 43 es una composición de micrografías que muestra las regiones de la sustancia nigra y el estriado de ratones donde a las muestras se les ha realizado la inmunohistoquímica contra tirosina-hidroxilasa con una magnificación de 100X. La figura representa el análisis histopatológico de la muerte de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra y de la desaparición de la extensiones nerviosas del estriado en función del tratamiento (24 y 0,5 horas antes de la inoculación de la sustancia neurotóxica [MPTP]), la inoculación de la sustancia neurotóxica (0 días post-inoculación [d.p.i.]) y el posterior tratamiento (hasta 7 d.p.i.).
- 45 La Figura 44 es una gráfica de dispersión XY donde se analiza la resistencia del animal. Las barras representan las medias $\pm$ EEM del ratio entre el tiempo de permanencia en el cilindro de los animales a los 7, 14 y 21 d.p.i. respecto del estado basal (eje Y) en función del tratamiento (24 y 0,5 horas antes de la inoculación de la sustancia neurotóxica [MPTP]), la inoculación de la sustancia neurotóxica (0 días post-inoculación [d.p.i.]) y el posterior tratamiento (hasta 21 d.p.i.).
- 50 La Figura 45 es una composición de micrografías que muestra la región de la sustancia nigra de ratones donde a las muestras se les ha realizado la inmunohistoquímica contra tirosina-hidroxilasa y HNE con una magnificación de 100X. La figura representa el análisis histopatológico de la muerte y la peroxidación lipídica en neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra en función del tratamiento (24 y 0,5 horas antes de la inoculación de la sustancia neurotóxica [MPTP]), la inoculación de la sustancia neurotóxica (0 días post-inoculación [d.p.i.]) y el posterior tratamiento (hasta 21 d.p.i.).
- 55 La Figura 46 es una gráfica de dispersión XY que representa la permeabilidad efectiva expresada como P_e (cm/s) frente al paso de BHE (%) de la atorvastatina, la simvastatina y el NST0037 mediante determinación *in vitro* por el método PAMPA. Como controles positivo y negativo se emplearon verapamilo y teofilina respectivamente.

La Figura 47 es un diagrama de barras que representa el efecto de la simvastatina y NST0037 sobre los niveles de colesterol en las líneas celulares humanas HepG2 y SK-N-MC. Los resultados se expresan como el porcentaje de reducción de colesterol respecto al control en cada, línea tras la incubación de los compuestos ácidos durante 20 h en ausencia de FBS. Las determinaciones fueron llevadas a cabo por medios enzimáticos y fluorométricos y los resultados son la media $\pm$ DE. * Diferencia significativa respecto a las células sin tratar, según el test t de Student ($p<0,05$). En el caso de HepG2 se hicieron 2 ensayos independientes por triplicado y en el caso de las SK-N-MC tres ensayos independientes por triplicado.

La Figura 48 es un conjunto de gráficas de dispersión XY que representan la concentración plasmática de colesterol y sus diversas fracciones además de la concentración de apoB en ratones hembra apoB100 de 12 semanas de edad tras 7, 21 y 28 días de tratamiento oral con 50 mg/kg de NST0037 o simvastatina, representando la media $\pm$ EEM de cada uno de los grupos y los tiempos. * Diferencia significativa respecto al control, según el test t de Student ($p<0,05$). + Diferencia significativa respecto tiempo inicial de ese mismo grupo.

La Figura 49 es un diagrama de barras que representa el número de veces que incrementa el colesterol libre y esterificado en ratones hembra apoB100 de 12 semanas de edad tras 7, 21 y 28 días de tratamiento con 50 mg/kg de NST0037 o simvastatina, representando la media $\pm$ EEM de cada uno de los grupos. * Diferencia significativa respecto al grupo control, según el test t de Student ($p<0,05$).

La Figura 50 es un diagrama de barras que representa el número de veces que incrementa el estado de oxidación en el plasma de ratones hembra apoB100 de 12 semanas de edad tras 7, 21 y 28 días de tratamiento con 50 mg/kg de NST0037 o simvastatina, representando la media $\pm$ EEM de cada uno de los grupos. * Diferencia significativa respecto al grupo control, según el test t de Student ($p<0,05$).

La Figura 51 es un conjunto de gráficas de dispersión XY que representan la concentración plasmática de colesterol y sus diversas fracciones en ratones hembra apoB100 de 6 meses de edad tras uno, dos y tres meses de tratamiento oral con 50 mg/kg de NST0037 o simvastatina, representando la media $\pm$ EEM de cada uno de los grupos. * Diferencia significativa respecto al control, según el test t de Student ($p<0,05$). + Diferencia significativa respecto tiempo inicial de ese mismo grupo.

La Figura 52 es un diagrama de barras que representa el número de veces que incrementa el colesterol libre y esterificado en ratones hembra apoB100 de 6 meses de edad tras uno, dos o tres meses de tratamiento oral con 50 mg/kg de NST0037 o simvastatina, representando la media $\pm$ EEM de cada uno de los grupos. * Diferencia significativa respecto al grupo control, según el test t de Student ($p<0,05$).

La Figura 53 es un diagrama de barras que representa el número de veces que incrementa el colesterol y sus diversas fracciones en ratas Zucker macho de 11 semanas de edad tras 7 días de tratamiento oral con 30 mg/kg de NST0037 o simvastatina, representando la media $\pm$ EEM de cada uno de los grupos. * Diferencia significativa respecto al grupo control, según el test t de Student ($p<0,05$).

La Figura 54 es un diagrama de barras que representa el número de veces que incrementan los triglicéridos plasmáticos en ratas Zucker macho de 11 semanas de edad tras 7 días de tratamiento oral con 30 mg/kg de NST0037 o simvastatina, representando la media $\pm$ EEM de cada uno de los grupos. * Diferencia significativa respecto al grupo control, según el test t de Student ($p<0,05$).

La Figura 55 es un diagrama de barras que representa el número de veces que incrementa el estado redox plasmático en ratas Zucker macho de 11 semanas de edad tras 7 días de tratamiento oral con 30 mg/kg de NST0037 o simvastatina, representando la media $\pm$ EEM de cada uno de los grupos. * Diferencia significativa respecto al grupo control, según el test t de Student ($p<0,05$).

La Figura 56 es un diagrama de barras que representa el número de veces que incrementa la expresión del gen seladin-1/DHCR24 en el cerebro de ratones salvajes C57BL6 a las 4 h de la administración oral a 50 mg/kg de NST0037 o simvastatina, representando la media $\pm$ EEM de cada uno de los grupos. * Diferencia significativa respecto al grupo control, según el test t de Student ($p<0,05$).

La Figura 57 es un diagrama de barras que representa el porcentaje de larvas sanas (sin problemas toxicológicos) tras exposición del compuesto NST0037 en comparación con la simvastatina, representando la media del porcentaje $\pm$ EEM de animales sanos después del tratamiento con diferentes dosis de NST0037 o de simvastatina. El eje de las Y determina el porcentaje de larvas sanas y el eje de las X, las concentraciones usadas de ambos compuestos. Las barras en gris representan el grupo de animales tratados con NST0037 y las barras de color negro representan los animales tratados con simvastatina.

La Figura 58 es un diagrama de barras que representa el porcentaje de larvas con aspecto anómalo (sintomatología) tras exposición del compuesto NST0037 en comparación con la simvastatina, representando la media del porcentaje $\pm$ EEM de larvas con deformaciones o aspecto anómalo después del tratamiento con diferentes dosis de NST0037 o de simvastatina. El eje de las Y determina el porcentaje de larvas con aspecto anómalo y el eje de las X las diferentes alteraciones de la sintomatología. Las barras en gris representan el grupo de animales tratados con NST0037 y las barras de color negro representan los animales tratados con simvastatina.

La Figura 59 es un diagrama de barras que representa la variación del peso de peces cebrá adultos en un ensayo de toxicidad de dosis única (24 horas) por exposición en el agua del compuesto NST0037 en comparación con la simvastatina. Los datos se presentan como el peso medio de los animales $\pm$ DE en función del tiempo de estudio y del grupo de tratamiento. Las barras en color blanco indican el peso de los animales en función del tratamiento, refiriéndose al estudio basal (0 dpt). Las gráficas de color gris indican el peso de los animales en función del tratamiento, refiriéndose al estudio a 7 dpt. Las gráficas de color negro indican el peso de los animales en función del tratamiento, refiriéndose al estudio a 14 dpt. * Comparación estadística con el procedimiento t de Student, donde se determinan diferencias significativas en el peso de los animales de un mismo grupo respecto al tiempo basal ($p < 0,05$).

La Figura 60 es una composición de micrografías que muestra el estudio histopatológico en diferentes órganos de peces cebrá adultos tras ensayo de toxicidad de dosis única (24 horas) por exposición en el agua del compuesto NST0037 en comparación con la simvastatina. Los animales fueron tratados con una dosis de 2000 mg/kg, sacrificados a los 14 días post-tratamiento, realizados cortes histológicos representativos de los diferentes grupos de estudio y teñidos con hematoxilina-eosina. Los órganos estudiados que se muestran son: cerebro, riñón, páncreas, intestino, ojo, branquias, ovario, testículo, músculo e hígado.

La Figura 61 es una composición de micrografías que muestra el estudio histopatológico en el ovario de peces cebrá adultos tras ensayo de letalidad por exposición constante en el agua (4 días) del compuesto NST0037 en comparación con la simvastatina. Los animales fueron tratados con dos dosis de 32 y 100 mg/kg, sacrificados a los 4 días post-tratamiento, realizados cortes histológicos representativos de los diferentes grupos de estudio y teñidos con hematoxilina-eosina. El ovario fue el único órgano estudiado que sufrió alteraciones patológicas. Se muestra un corte histológico del ovario de una hembra del grupo control, y ovarios de hembras de los grupos de tratamientos con NST0037 y simvastatina en función de la dosis.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Para facilitar la comprensión de la invención objeto de esta solicitud de patente, a continuación se explica el significado de algunos términos y expresiones utilizados en el contexto de la invención.

El término “neuroprotector”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia capaz de producir la atenuación o desaparición de los efectos de la degeneración o muerte neuronal mediante cualquier mecanismo conocido o por conocer, por ejemplo, necrosis, apoptosis, autofagia, daño oxidativo, excitotoxicidad, daño de retículo endoplásmico, depósito de subproductos, pérdida de la arquitectura celular, etc., o a la disminución o desaparición de sus efectos secundarios.

El término “estatina”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un inhibidor de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMGR), enzima que cataliza el paso limitante de la biosíntesis del colesterol, e incluye cualquier estatina tanto natural como sintética o semisintética. Algunas estatinas pueden presentarse en forma cerrada (lactona) o en forma abierta (hidroxiácido). Los hidroxiácidos (forma abierta) pueden prepararse a partir de las lactonas correspondientes por hidrólisis convencional, por ejemplo, con hidróxido sódico en metanol, hidróxido sódico en tetrahidrofurano-agua y similares. En la forma abierta (hidroxiácido), las estatinas reaccionan para formar sales con cationes de metales y aminas, farmacéuticamente aceptables, formadas a partir de bases orgánicas o inorgánicas. Las sales farmacéuticamente aceptables de las estatinas pueden diferir de los ácidos libres correspondientes en algunas características físicas tales como solubilidad y punto de fusión, pero se consideran equivalentes a la forma de ácido libre para los fines de esta invención. La forma abierta (hidroxiácido) libre de las estatinas puede regenerarse a partir de la forma de sal, si se desea, poniendo en contacto la sal con una solución acuosa diluida de un ácido tal como ácido clorhídrico y similares. La forma cerrada (lactona) de las estatinas puede regenerarse por disolución de la forma abierta (hidroxiácido) en un disolvente inerte tal como, por ejemplo, tolueno, benceno, acetato de etilo y similares, a temperaturas comprendidas entre aproximadamente 0°C y aproximadamente el punto de ebullición del disolvente, típicamente (aunque no necesariamente) con separación simultánea del agua resultante y catálisis con ácidos fuertes, p. ej., ácido clorhídrico y similares. Asimismo, las estatinas pueden existir en forma solvatada o no solvatada y tales formas son equivalentes a la forma no solvatada para los fines de esta invención.

El término “cardioprotector”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia capaz de producir la atenuación o desaparición de los efectos subyacentes a las enfermedades cardiovasculares o cardiopatías o del daño cardíaco mediante cualquier mecanismo conocido o por conocer, por ejemplo, necrosis, apoptosis, isquemia, arritmia, depósito de subproductos, pérdida de la arquitectura celular, etc., o a la disminución o desaparición de sus efectos secundarios.

El término “hipolipemiente”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia farmacológicamente activa que tenga la propiedad de disminuir los niveles de lípidos en sangre o en otros tejidos. La importancia de estas sustancias viene dada porque el exceso de algunos tipos de lípidos (colesterol o

triglicéridos) o de las lipoproteínas, es uno de los principales factores de riesgo para las enfermedades cardiovasculares.

El término “hipocolesterolémico”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia farmacológicamente activa que tenga la propiedad de disminuir los niveles de colesterol en sangre o en otros tejidos.

El término “hipotrigliceridémico”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia farmacológicamente activa que tenga la propiedad de disminuir los niveles de triglicéridos en sangre o en otros tejidos.

El término “antiepiléptico o anticonvulsivante”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la atenuación de las crisis epilépticas o convulsivas, por ejemplo, en la duración y/o en la intensidad, o a la desaparición de las crisis epilépticas o convulsivas, o a la disminución o desaparición de sus efectos secundarios.

El término “bioseguro” tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a ausencia de efectos tóxicos, generación de tumores, alteraciones en el desarrollo embrionario (teratogénesis) u otros efectos adversos.

El término “enfermedad neurodegenerativa”, tal como se utiliza en el presente documento, incluye enfermedades que resultan de la degeneración o deterioro del tejido nervioso, en particular de las neuronas, que conduce, a lo largo del tiempo, a una disfunción o a una incapacidad; el término degeneración incluye pérdida de la viabilidad celular, pérdida de la función celular y/o pérdida del número de células (neuronas u otras). Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de enfermedades neurodegenerativas incluyen enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple, etc. En una realización particular, dicha enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad relacionada con la muerte neuronal causada por una sustancia que, por ejemplo, causa estrés oxidativo o estrés de retículo endoplásmico o apoptosis o excitotoxicidad o muerte neuronal en general.

El término “enfermedad asociada con una oxidación indeseada”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una enfermedad causada por una oxidación indeseada (p. ej., excesiva) o en el que dicha oxidación indeseada es un síntoma. Dicha oxidación indeseada puede ser la consecuencia del daño causado por radicales libres a proteínas, DNA y/o lípidos independientemente del radical libre específico implicado o de la diana. La oxidación indeseada implica una generación excesiva de radicales libres que puede causar una disfunción en células, tejidos u órganos y puede constituir, por tanto, un mecanismo potencial de una enfermedad. En una realización particular, dicha oxidación indeseada puede ser causada por la edad (envejecimiento) o por un proceso neurodegenerativo y puede provocar por sí sola o en combinación con otros factores el comienzo de diversas enfermedades. En una realización concreta, dicha oxidación indeseada se relaciona con el daño oxidativo causado por una sustancia que causa estrés oxidativo.

El término “proceso patológico asociado a la edad”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier evento o combinación de eventos relacionado/s con el envejecimiento que produzca/n pérdida de viabilidad celular del tejido nervioso o sensibilización celular del tejido nervioso, pérdida de la función celular y/o pérdida del número de células (neuronas u otras), incluyendo disfunción metabólica de las células, procesos de estrés, infecciones por patógenos, alteraciones genéticas, susceptibilidad genética, trauma, isquemia, epilepsia, etc.

El término “enfermedad cardiovascular”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier enfermedad o disfunción o alteración del corazón o del resto del sistema cardiovascular o de la sangre.

El término “epilepsia”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un síndrome cerebral crónico de causas diversas, caracterizada por crisis recurrentes debidas a unas descargas excesivas hipersincrónicas de impulsos nerviosos por las neuronas cerebrales, asociadas eventualmente con diversas manifestaciones clínicas y paraclínicas. Las crisis pueden ser convulsivas o no convulsivas. La epilepsia puede tener muchas causas; en unos casos puede ser debida a lesiones cerebrales de distintos tipos (p. ej., traumatismos craneales, secuelas de meningitis, tumores, etc.); en otros casos no hay ninguna lesión sino una predisposición de origen genético a padecer la crisis; en otros casos, la etiología de la epilepsia puede ser ambiental, por tratamientos farmacológicos, por excitotoxicidad, trauma, procesos de estrés, envejecimiento, problemas del desarrollo, enfermedades neurológicas, crisis psicológicas, problemas en la gestación, problemas en el parto, etc.

El término “epiléptico o convulsivante”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier crisis epiléptica o convulsión de cualquier etiología, por ejemplo, genética, ambiental, por tratamientos farmacológicos, por excitotoxicidad, por trauma, por procesos de estrés, por envejecimiento, por problemas del desarrollo, por enfermedades neurológicas, por crisis psicológicas, por problemas en la gestación, por problemas en el parto, etc. Una crisis epiléptica ocurre cuando una actividad anormal eléctrica en el cerebro causa un cambio involuntario de movimiento o función del cuerpo, de sensación, en la capacidad de estar alerta o de comportamiento, y pueden ser parciales o generalizadas (convulsivas o no-convulsivas).

El término “deterioro cognitivo”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la pérdida o alteración de las funciones mentales, tales como memoria, orientación, lenguaje, reconocimiento visual o conducta que interfieren con la actividad e interacción social de la persona afectada de forma persistente en el tiempo

- 5 El término “infecciones fúngicas o víricas”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier colonización de un virus u hongo microscópico que resulta perjudicial para el funcionamiento normal o para la supervivencia del organismo colonizado o huésped.

- 10 El término “sujeto”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un miembro de una especie de mamífero, e incluye, pero no se limita a, animales domésticos, primates y humanos; preferentemente, el sujeto es un ser humano, masculino o femenino, de cualquier edad o raza. En una realización particular, dicho sujeto es un mamífero que padece, o es susceptible de padecer, procesos patológicos asociados a la edad, tal como envejecimiento, o una enfermedad neurodegenerativa, tal como una enfermedad neurodegenerativa crónica.

- 15 El término “farmacéuticamente aceptable”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a que el compuesto es tolerable fisiológicamente y no produce, en general, una reacción alérgica o una reacción desfavorable similar, tal como un trastorno gástrico, mareo o similares, cuando se administra a un sujeto; preferiblemente, dicho término “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora de un gobierno o recogido en la farmacopea estadounidense o en otra farmacopea reconocida generalmente para uso en animales (p. ej., farmacopea europea, etc.).

- 20 El término “sal farmacéuticamente aceptable”, tal como se utiliza en el presente documento, incluye “sales metálicas farmacéuticamente aceptables” así como “sales de amina farmacéuticamente aceptables”. El término “sal metálica farmacéuticamente aceptable” contempla sales formadas con iones de sodio, potasio, calcio, magnesio, aluminio, hierro o zinc. El término “sal de amina farmacéuticamente aceptable” contempla sales con amoníaco y bases nitrogenadas orgánicas suficientemente fuertes para formar sales con ácidos carboxílicos. Dichas sales farmacéuticamente aceptables pueden ser obtenidas por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

- 25 El compuesto 2-etil-butorato de (1S,3R,7S,8S,8aR)-1,2,3,7,8,8a-hexahidro-3,7-dimetil-8-[2-[(2R,4R)-tetrahydro-4-hidroxi-6-oxo-2H-piran-2-il]etil]-1-naftalenilo puede ser obtenido por métodos de semisíntesis, tal como se describe para otros compuestos de la misma familia en la patente de Estados Unidos US 4866090.

- 30 Numerosos ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto el efecto neuroprotector del compuesto NST0037 frente a la acción de una sustancia causante de estrés oxidativo, así como su efecto neuroprotector frente a la acción de una sustancia causante de estrés de retículo endoplásmico, y su efecto neuroprotector frente a la acción de una sustancia causante de apoptosis en neuronas humanas colinérgicas, así como su efecto neuroprotector frente a una sustancia que causa excitotoxicidad, daño oxidativo, apoptosis, atrofia del hipocampo, muerte neuronal, deterioro cognitivo, pérdida de memoria temporal, pérdida de memoria espacial, etc.

- 35 El efecto neuroprotector frente a la acción de una sustancia causante de estrés oxidativo, tal como xantina/xantina oxidasa (XXO) se describe en el Ejemplo 2. En dicho ejemplo se observa que el compuesto NST0037, es capaz de reducir cuantitativamente y de forma significativa la muerte neuronal causada por estrés oxidativo, lo que pone de manifiesto la capacidad neuroprotectora de este compuesto (Figura 1). Con el objetivo de definir mejor el efecto neuroprotector del compuesto, los inventores analizaron con más detalle el proceso neurodegenerativo mediante el análisis de la muerte neuronal causada por la acción de una sustancia causante de estrés de retículo endoplásmico (tunicamicina), determinando que el compuesto NST0037 es capaz de reducir cuantitativamente y de forma significativa la muerte neuronal causada por estrés de retículo endoplásmico, lo que pone de manifiesto la capacidad neuroprotectora de dicho compuesto (Figura 2). Con el objetivo de definir mejor el efecto neuroprotector del compuesto, los inventores analizaron con más detalle el proceso neurodegenerativo mediante el análisis de la muerte neuronal causada por la acción de una sustancia causante de apoptosis (camptotecina), determinando que el compuesto NST0037 es capaz de reducir cuantitativamente y de forma significativa la muerte neuronal causada por apoptosis, lo que pone de manifiesto la capacidad neuroprotectora de dicho compuesto (Figura 3). Asimismo, con el objetivo de definir mejor el efecto neuroprotector de dicho compuesto, los inventores analizaron con más detalle el proceso neurodegenerativo mediante el análisis por citometría de flujo de la muerte neuronal causada por apoptosis y su inhibición por dicho compuesto, en comparación con un inhibidor específico de la muerte neuronal por apoptosis, el Z-VAD-fmk, determinando que el compuesto NST0037 es capaz de inhibir cuantitativamente y de forma significativa la muerte neuronal causada por apoptosis y que este efecto neuroprotector se potencia con el pretratamiento del compuesto NST0037 y que es parcialmente dependiente de la biosíntesis de colesterol (Figura 4).

- 55 Con el objetivo de definir mejor el efecto neuroprotector del compuesto, los inventores analizaron con más detalle el proceso neurodegenerativo mediante el análisis de la muerte neuronal causada por una sustancia excitotóxica (el kainato) en las neuronas del hipocampo de ratones, tal como se describe en el Ejemplo 3. En dicho ejemplo se observa que el compuesto NST0037 es capaz de reducir cuantitativamente y de forma significativa la muerte neuronal causada por una sustancia excitotóxica, lo que pone de manifiesto la capacidad neuroprotectora de dicho

compuesto (Figura 5). En dicha gráfica se demuestra que el tratamiento con NST0037 administrado antes y después, o solamente después, de la administración del kainato produce la protección de las neuronas del hipocampo inhibiendo la muerte neuronal en las zonas CA1 y CA2. Por el contrario, la administración del compuesto NST0037 por sí solo no produce ningún cambio histopatológico destacable, no mostrando diferencias apreciables con el grupo control. Asimismo, como es conocido, la muerte de neuronas del hipocampo induce, en algunos casos, el deterioro cognitivo del animal viéndose afectados los procesos de memoria; por este motivo, los inventores analizaron si el efecto neuroprotector del compuesto se veía acompañado de una reducción de la pérdida de memoria temporal y espacial producida por una sustancia excitotóxica. En los resultados obtenidos sobre la memoria temporal (Figura 6), se demuestra que el tratamiento con NST0037 administrado antes y después, o solamente después, de la administración del kainato produce la protección de la pérdida de este tipo de memoria. En los resultados obtenidos sobre la memoria espacial (Figura 7), se demuestra que el tratamiento con NST0037 administrado antes y después, o solamente después, de la administración del kainato produce la protección de la pérdida de este tipo de memoria. Por el contrario, la administración del compuesto NST0037 por sí solo no produce ningún cambio destacable sobre el estado cognitivo de los animales, no mostrando diferencias apreciables con el grupo control. Asimismo, como es conocido, la administración de una sustancia excitotóxica y la muerte neuronal induce, en algunos casos, la muerte del animal; por este motivo, los inventores analizaron si el efecto neuroprotector del compuesto NST0037 se veía acompañado de una reducción de la mortalidad producida por una sustancia excitotóxica. En los resultados obtenidos (Figura 8), se demuestra que el tratamiento con NST0037 administrado antes y después, o solamente después, de la administración del kainato produce un mayor índice de supervivencia, lo que indica que el tratamiento con dicho compuesto protege a los animales de la muerte y del resto de efectos orgánicos producidos por una sustancia excitotóxica. Por el contrario, la administración del compuesto NST0037 por sí solo no produce ninguna variación destacable sobre el índice de supervivencia de los animales, no mostrando diferencias apreciables con el grupo control.

Asimismo, como es conocido, la administración de una sustancia excitotóxica induce, en algunos casos, crisis convulsivas y epilepsia en el animal; por este motivo, los inventores analizaron si el efecto neuroprotector del compuesto NST0037 se veía acompañado de un efecto antiepiléptico y anticonvulsivante producido por una sustancia excitotóxica (Ejemplo 4), observándose que la administración de NST0037 retrasaba el tiempo de aparición de la primera convulsión (latencia) (Figura 9), produciendo además una disminución en la gravedad y la duración de los síntomas epilépticos (Figura 10), lo que demuestra el efecto antiepiléptico o anticonvulsivante del compuesto NST0037.

Además, y debido a la naturaleza del compuesto NST0037, se estudió la capacidad inhibidora de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGR). Sorprendentemente, y tal como se muestra en el Ejemplo 5 los resultados demuestran que el compuesto NST0037 presenta un efecto hipocolesterolémico evidente. En los resultados obtenidos y tal como muestra la Figura 11, se puede apreciar que la actividad inhibitoria de la enzima HMGR por parte del compuesto NST0037 está dentro del rango de dos de las estatinas comerciales (atorvastatina y simvastatina) usadas habitualmente para disminuir los niveles de colesterol en la población humana. Aquí se demuestra que el compuesto NST0037 ejerce un efecto inhibitorio de dicha enzima muy similar a la estatina con mayor actividad demostrada (la atorvastatina), e inhibe 7,5 veces más la enzima HMGR que la estatina más segura (la simvastatina).

Con el objetivo de definir mejor el efecto hipocolesterolémico del compuesto, los inventores analizaron con más detalle la actividad hipocolesterolémica mediante el análisis de las variaciones de las fracciones de colesterol en el plasma de ratones con hipercolesterolemia endógena, tal como se describe en el Ejemplo 5. Para ello, se comparó el efecto del compuesto NST0037 y de la simvastatina en dos grupos de ratones, determinándose los niveles de colesterol total tras la administración de los compuestos (Figura 12), donde se observó, de forma sorprendente, que ambos compuestos producían un efecto hipocolesterolémico similar. Con el objetivo de definir mejor el efecto hipocolesterolémico del compuesto, se analizaron los niveles de colesterol en las fracciones de LDL, HDL y VLDL, determinándose que ambos compuestos disminuyen de forma similar los niveles de colesterol en las fracciones LDL y VLDL, pero no en las HDL (Figuras 13 a 15), lo que demuestra un efecto hipocolesterolémico y cardioprotector. Con el objetivo de definir mejor el efecto hipocolesterolémico del compuesto, se analizaron los niveles de colesterol libre y esterificado, determinándose que ambos compuestos disminuyen de forma similar los niveles de colesterol esterificado, pero no libre (Figura 16 a 17), lo que demuestra un efecto hipocolesterolémico y cardioprotector.

Con el objetivo de definir mejor el efecto hipocolesterolémico del compuesto, los inventores analizaron con más detalle la actividad hipocolesterolémica mediante el análisis de las variaciones de las fracciones de colesterol en el plasma de ratones con hipercolesterolemia inducida, tal como se describe en el Ejemplo 6. Para ello, se comparó el efecto del compuesto NST0037 y de la simvastatina en dos grupos de ratones, determinándose los niveles de colesterol total tras la administración de los compuestos (Figura 18), donde se observó, de forma sorprendente, que el compuesto NST0037 presentaba un mayor efecto hipocolesterolémico que la simvastatina. Con el objetivo de definir mejor el efecto hipocolesterolémico del compuesto, se analizaron los niveles de colesterol en las fracciones de LDL, HDL y VLDL, determinándose que el compuesto NST0037 disminuye más eficazmente los niveles de colesterol en la fracción LDL que la simvastatina, no alterando los niveles de colesterol ni en las fracciones HDL (al igual que la simvastatina) ni en las VLDL (al contrario que la simvastatina) (Figuras 19 a 21), lo que demuestra un efecto hipocolesterolémico y cardioprotector. Con el objetivo de definir mejor el efecto

hipocolesterolémico del compuesto, se analizaron los niveles de colesterol libre y esterificado, determinándose que en ambos casos el NST0037 disminuye de forma más eficaz que la simvastatina ambas fracciones de colesterol (Figuras 22 y 23), lo que demuestra un efecto hipocolesterolémico y cardioprotector.

Para que un compuesto pueda ser administrado a la población humana, es necesario que se demuestre su inocuidad y seguridad. Con este objetivo, los inventores analizaron la bioseguridad del compuesto NST0037 en un modelo toxicológico ampliamente utilizado, el embrión de pez cebra, siguiendo la metodología descrita en el protocolo C15 de la OECD, tal como se describe en el Ejemplo 7. En este modelo, los inventores compararon el efecto del compuesto en comparación con la simvastatina en concentraciones superiores a las dosis utilizadas en la clínica, con el objetivo de causar daños evidentes en los embriones para poder definir mejor los efectos adversos de dicho compuesto. Así la administración de una alta dosis de NST0037 provocó la mortalidad de todos los embriones del ensayo, al igual que ocurrió con la misma dosis de simvastatina, aunque esta resultó más tóxica, ya que la disminución del índice de supervivencia comenzó antes en el tiempo (Figura 24). Cuando se utilizó una dosis 10 veces menor, la simvastatina produjo una disminución significativa del índice de supervivencia en comparación con los controles, mientras el NST0037 no produjo una disminución estadísticamente significativa de la supervivencia de los embriones, indicando su mayor seguridad (Figura 25). Con el objetivo de definir mejor la bioseguridad del compuesto, se estudiaron las dosis letales 50 (LD₅₀) en diferentes puntos temporales con tratamientos de NST0037 o de simvastatina en método semiestático, observándose que en todos los tiempos las LD₅₀ de la simvastatina eran menores que las de NST0037, lo que indica una mayor bioseguridad de este último compuesto (Figura 26). Con el objetivo de definir mejor la bioseguridad del compuesto, se estudió el porcentaje de larvas sanas al final del experimento en comparación con la simvastatina, observándose un mayor número de larvas sanas en los tratamientos con NST0037 en comparación con la simvastatina (Figura 27). Con el objetivo de definir mejor la bioseguridad del compuesto, se estudió el porcentaje de larvas con deformidades o de aspecto anómalo con el tiempo en comparación con la simvastatina, observándose un menor número de larvas con deformidades o de aspecto anómalo en los tratamientos con NST0037 en comparación con la simvastatina (Figura 28). Con el objetivo de definir mejor la bioseguridad del compuesto, se estudió el porcentaje de latidos cardíacos en función de la dosis utilizada comparando NST0037 con la simvastatina, observándose una mayor disminución del ritmo cardíaco en la mayor dosis evaluada de simvastatina que en la de NST0037, mientras que a dosis menores solamente la simvastatina produjo una disminución estadísticamente significativa del ritmo cardíaco (Figura 29), lo que indica una mayor bioseguridad del compuesto NST0037.

También se estudió la actividad antifúngica del compuesto NST0037 mediante bioensayo frente a estatinas (lovastatina, atorvastatina y simvastatina). Los resultados obtenidos mostraron que el compuesto NST0037 fue el único capaz de producir halos de inhibición en todo el rango de concentraciones ensayadas, incluso a las más bajas (Figura 30), lo que indica una mayor actividad antifúngica.

Por otra parte, se estudió la capacidad del compuesto NST0037 para incrementar la expresión del gen seladin-1/DHCR24, ya que se han demostrado los efectos neuroprotectores del aumento de expresión de este gen frente a la enfermedad de Alzheimer (Cechi et al., J. Cell. Mol. Med. 2008; 12: 1990-2002). Se ha descrito (Greeve et al., J. Neurosci. 2000; 20: 7345-52) que el producto del gen seladin-1/DHCR24 ejerce su poder neuroprotector mediante el efecto antiapoptótico por inhibición de la caspasa-3, y regulando la síntesis de colesterol a partir de desmosterol, lo que determina la generación de una barrera contra las agresiones neurotóxicas y previene la producción de β -amiloide. Estos mecanismos de acción indican que el aumento de la expresión del gen seladin-1/DHCR24 tiene un efecto neuroprotector general, con lo que aquellos fármacos que producen un aumento de la expresión de este gen pueden ser potencialmente utilizados en la prevención y/o tratamiento de la muerte neuronal asociada a enfermedades neurodegenerativas (p. ej., Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, *status epilepticus*, Huntington, etc.) o de enfermedades asociadas con una oxidación indeseada o de procesos patológicos asociados a la edad. La capacidad de aumentar la expresión del gen seladin-1/DHCR24 mediante la administración de NST0037 se describe en el Ejemplo 9, en comparación con la memantina (uno de los fármacos utilizados habitualmente para tratar la EA). En dicho ejemplo se observa que el compuesto NST0037 es capaz de aumentar cuantitativamente, de forma significativa y dosis-dependiente la expresión del gen seladin-1/DHCR24, lo cual se demuestra mediante el análisis de la expresión relativa usando PCR cuantitativa a tiempo real. Dichos resultados ponen de manifiesto la capacidad neuroprotectora del compuesto NST0037 (Figura 31). Adicionalmente, el aumento de la expresión del gen seladin-1/DHCR24 y el incremento en la cantidad de la proteína codificada por este gen han sido corroborados en un estudio paralelo utilizando la simvastatina. Los resultados indican que también esta estatina es capaz de aumentar la expresión de este gen, explicando así su capacidad neuroprotectora, e indicando que se trata de un mecanismo general de la familia de las estatinas que son capaces de aumentar la expresión del gen seladin-1/DHCR24.

Adicionalmente se estudió el efecto neuroprotector en cultivos neuronales humanos del compuesto NST0037 frente a agresiones que mimetizan algunas de las enfermedades neurodegenerativas, como la EA mediante la inhibición de la proteína fosfatasa 1 (Figura 32) o de la enfermedad de Huntington mediante la inhibición de la succinato deshidrogenasa (Figura 33). Además se estudió el efecto sobre la modulación de las caspasas efectoras 3/7, determinándose que el compuesto NST0037 previene la activación de las mismas, y que este efecto está relacionado con la ruta de biosíntesis de colesterol (Figura 34). Además, se determinó que el compuesto NST0037 es capaz de reducir los niveles de A β (1-40) y A β (1-42) en un modelo celular neuronal humano que sobreexpresa la proteína APP (Figura 35). Además se determinó que el efecto neuroprotector del NST0037 frente a la muerte

causada por estrés oxidativo es modulado por el mevalonato, el cual es un precursor de la ruta de biosíntesis del colesterol y el producto de la reacción enzimática que cataliza la enzima HMG-CoA reductasa (Figura 36).

Con el objetivo de definir mejor el efecto neuroprotector del compuesto, los inventores analizaron con más detalle el proceso neurodegenerativo mediante el análisis de las huellas histopatológicas asociadas a la muerte neuronal causada por una sustancia excitotóxica (el kainato) en las neuronas del hipocampo de ratones, tal como se describe en el Ejemplo 15. En dicho ejemplo se observa que el compuesto NST0037 es capaz de prevenir o mejorar la distrofia neurítica (Figura 37), así como del daño oxidativo, de la apoptosis y de la astrogliosis (Figura 38) causada por la administración de una sustancia excitotóxica.

Con el objetivo de definir mejor el efecto neuroprotector del compuesto, los inventores analizaron el potencial efecto terapéutico del tratamiento con NST0037 en un modelo agudo de enfermedad de Parkinson en ratón tal como se describe en el Ejemplo 16. Para ello, y tras la administración aguda de una neurotoxina parkinsoniana específica de las neuronas dopaminérgicas (MPTP), se observó que el NST0037 era capaz de modificar los efectos deletéreos causados por la neurotoxina como la mortalidad (Figura 39), el déficit locomotor en relación a los parámetros de resistencia (Figura 40) y fuerza (Figura 41), la neurodegeneración (Figura 42) además de la pérdida de neuronas dopaminérgicas (Figura 43) en regiones implicadas en la enfermedad de Parkinson como la sustancia negra o el estriado.

Con el objetivo de definir mejor el efecto neuroprotector del compuesto, los inventores analizaron el potencial efecto terapéutico del tratamiento con NST0037 en un modelo subcrónico de enfermedad de Parkinson en ratón tal como se describe en el Ejemplo 17. Para ello, y tras la administración subcrónica de una neurotoxina parkinsoniana específica de las neuronas dopaminérgicas (MPTP), se observó que el NST0037 era capaz de modificar los efectos deletéreos causados por la neurotoxina como el déficit locomotor en relación a la resistencia motora (Figura 44), la muerte neuronal o del daño oxidativo asociado a la peroxidación lipídica (Figura 45) en la sustancia negra.

Con el objetivo de definir mejor el paso de barrera hematoencefálica del compuesto NST0037, los inventores analizaron diferentes parámetros como la lipofiliidad teórica, el porcentaje de paso y la permeabilidad efectiva (Figura 46, Tabla I) tal como se describe en el Ejemplo 18.

Con el objetivo de definir mejor el efecto hipocolesterolémico del compuesto, los inventores analizaron con más detalle la actividad hipocolesterolémica mediante el análisis de las reducciones de colesterol en dos líneas celulares humanas de origen hepático y neuronal (Figura 47), tal como se describe en el Ejemplo 19. Además, el tratamiento durante 28 días del compuesto NST0037 de forma oral en ratones con hiperlipidemia familiar produjo una disminución de los niveles de colesterol total, ApoB, c-LDL, c-VLDL, c-HDL (Figura 48), colesterol libre y esterificado (Figura 49) y del estado de oxidación plasmático (Figura 50), tal como se describe en el Ejemplo 20. Además, el tratamiento durante 3 meses del compuesto NST0037 de forma oral en ratones con hiperlipidemia familiar produjo una disminución de los niveles de colesterol total, c-LDL y de aumento de c-HDL (Figura 51), y una disminución de los niveles de colesterol libre y esterificado (Figura 52), tal como se describe en el Ejemplo 21.

Con el objetivo de definir mejor el efecto hipocolesterolémico del compuesto, los inventores analizaron con más detalle la actividad hipocolesterolémica mediante reducciones de colesterol y de las fracciones asociadas (Figura 53), de triglicéridos (Figura 54), y del estado redox plasmático en ratas Zucker con hiperlipidemia endógena (Figura 55), tal como se describe en el Ejemplo 22.

Con el objetivo de definir mejor la modulación del gen seladin-1/DHCR24 por el compuesto NST0037, los inventores analizaron su regulación en el cerebro de ratones tratados oralmente con NST0037 (Figura 56) tal como se describe en el Ejemplo 18, demostrando que a las 4 h de la administración de NST0037 se produce un aumento de la expresión de este gen neuroprotector.

Con el objetivo de definir mejor la inocuidad y seguridad del compuesto NST0037 y para corroborar los estudios realizados en el Ejemplo 7 con embriones de pez cebra, los inventores decidieron analizar la bioseguridad del compuesto NST0037 en larvas tal como se describe en el Ejemplo 24. En este modelo, los inventores compararon el efecto del compuesto en comparación con la simvastatina realizando curvas crecientes de concentraciones, que revelaron una alta seguridad del compuesto ya que no se produjo mortalidad alguna con ninguno de los dos tratamientos (Tabla II), y donde la simvastatina produjo un menor porcentaje de larvas sanas que el NST0037 (Figura 57) y un mayor porcentaje de larvas con aspecto anómalo (Figura 58).

Con el objetivo de definir mejor la inocuidad y seguridad del compuesto NST0037 y para corroborar los estudios realizados en ejemplos previos, los inventores decidieron analizar la bioseguridad del NST0037 tras tratamiento en peces adultos en comparación con la simvastatina, tal como se describe en el Ejemplo 25. Los resultados indicaron que mientras la simvastatina produce una pérdida significativa de peso en los animales, el NST0037 no varía significativamente dicho parámetro (Figura 59). Además, mientras la simvastatina produjo variaciones histopatológicas en los animales tratados, el NST0037 produjo menos efectos deletéreos (Figura 60).

Con el objetivo de definir mejor la inocuidad y seguridad del compuesto NST0037 y para corroborar los estudios realizados en ejemplos previos, los inventores decidieron analizar la bioseguridad del NST0037 tras tratamiento en

peces adultos en comparación con la simvastatina, tal como se describe en el Ejemplo 26. Los resultados indicaron que mientras la simvastatina produce una mortalidad significativa a los 4 días de tratamiento, la mortalidad asociada al NST0037 fue residual (Tabla III). Además, mientras la simvastatina produjo variaciones histopatológicas claras en el ovario de los animales tratados con 100 mg/kg, el NST0037 no produjo ningún efecto deletéreo a esta dosis (Figura 63).

La composición farmacéutica proporcionada por esta invención puede contener el compuesto NST0037, y/o su forma hidroxilada y/o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilado y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilada junto con uno o más adyuvantes, vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

El término "sal o solvato" farmacéuticamente aceptable se refiere a cualquier sal, solvato o cualquier otro compuesto farmacéuticamente aceptable que, en su administración al receptor, es capaz de proporcionar (de forma directa o indirecta) un compuesto tal y como se ha descrito en la presente invención. No obstante, las sales farmacéuticamente inaceptables también caen dentro del alcance de la invención, ya que estas pueden ser útiles para la preparación de sales farmacéuticamente aceptables. La preparación de sales puede ser llevada a cabo mediante procedimientos conocidos en el estado de la técnica.

Los compuestos según la invención pueden estar en forma cristalina o como compuestos libres o como solvatos (por ejemplo, hidratos) y se pretende que ambas formas estén dentro del alcance de la presente invención. Los métodos de solvatación en general son conocidos en el estado de la técnica. En una realización particular el solvato es un hidrato.

Las composiciones farmacéuticas que contienen el compuesto NST0037, o una forma hidroxilada del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilado, pueden formularse en cualquier forma farmacéutica de administración adecuada para su administración por la vía de administración elegida, p. ej., oral, parenteral (subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, etc.), tópica, rectal, etc. A modo ilustrativo, no limitativo, las composiciones farmacéuticas proporcionadas por esta invención pueden formularse en una forma farmacéutica sólida de administración por vía oral (p. ej., gránulos, comprimidos, cápsulas, etc.), en una forma farmacéutica líquida de administración por vía oral (p. ej., soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.), en una forma farmacéutica de administración por vía parenteral (p. ej., soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.). Para ello, en cada caso, se elegirán los vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados para la forma farmacéutica de administración y vía de administración elegida, por ejemplo, aglutinantes, diluyentes, desintegrantes, lubricantes, humectantes, para la formulación de formas farmacéuticas de administración sólidas, y tampones, tensioactivos, para la formulación de formas farmacéuticas de administración líquidas. Dichos vehículos y excipientes deben ser farmacéuticamente aceptables y farmacológicamente tolerables y han de poder ser combinados con otros componentes de la formulación sin ejercer ningún efecto adverso sobre el sujeto tratado. Información sobre dichos vehículos y excipientes, así como sobre dichas formas farmacéuticas de administración de dicho principio activo puede encontrarse en tratados de farmacia galénica. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos, en general, y de sus procedimientos de preparación puede encontrarse en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 1ª Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

La composición farmacéutica proporcionada por esta invención comprende, el compuesto NST0037, o una forma hidroxilada del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilado, en una cantidad terapéuticamente eficaz. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de compuesto calculada para producir el efecto deseado. La dosis del compuesto NST0037, o una forma hidroxilada del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilado, a administrar a un sujeto puede variar dentro de un amplio intervalo dependiendo de numerosos factores, entre los que se incluyen las características del compuesto utilizado, p. ej., su actividad y vida media biológica, la concentración del compuesto en la composición farmacéutica, la situación clínica del sujeto, la severidad de la patología, la forma farmacéutica de administración elegida, etc. La composición farmacéutica proporcionada por esta invención se puede administrar una o más veces al día con fines preventivos o terapéuticos o, alternativamente, se pueden seguir otras pautas de administración, no necesariamente diaria sino también de forma puntual, semanal, etc.

La composición farmacéutica proporcionada por esta invención, si se desea, puede usarse junto con otros fármacos, por ejemplo, fármacos útiles en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, deterioro cognitivo, enfermedades asociadas con una oxidación indeseada, procesos patológicos asociados a la edad y progeria, epilepsia, crisis epilépticas, convulsiones, enfermedades cardiovasculares, o infecciones fúngicas o víricas con el fin de aumentar la eficiencia de la composición farmacéutica proporcionada por esta invención, generándose de este modo una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden facilitarse como una composición farmacéutica separada para su administración al mismo tiempo (administración simultánea) que la composición farmacéutica proporcionada por esta invención o en momentos diferentes (administración secuencial) respecto a la administración de la composición farmacéutica proporcionada por esta invención.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención.

Ejemplo 1

Síntesis de 2-etil-butirato de (1S,3R,7S,8S,8aR)-1,2,3,7,8,8a-hexahidro-3,7-dimetil-8-[2-[(2R,4R)-tetrahydro-4-hidroxi-6-oxo-2H-piran-2-il]etil]-1-naftalenilo

- 5 El compuesto identificado como NST0037 se preparó siguiendo la metodología descrita en Hoffman, et al. (*J. Med. Chem.*, 1986, 29, 849-852) para compuestos similares.

1.1. Purificación de lovastatina

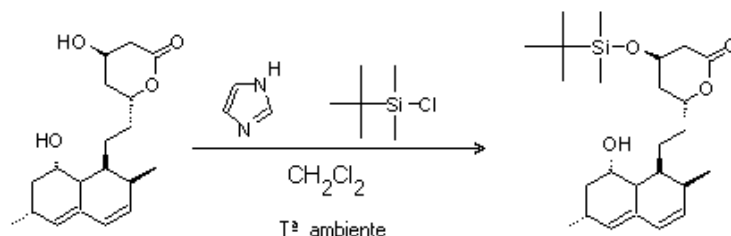
Partiendo de un extracto de procedencia natural, la lovastatina se purificó por cromatografía en columna utilizando como eluyente un gradiente de hexano y acetato de etilo.

- 10 1.2. Obtención de monacolina J



Se prepara una disolución de 0,7 g de hidróxido potásico en 0,5 ml de agua y se añade poco a poco 3 ml de metanol. Posteriormente, se añaden 0,5 g de Lovastatina y se pone la disolución a reflujo durante 21 horas. Después del tratamiento de la reacción se obtiene una mezcla al 50 % de monacolina J y producto de apertura.

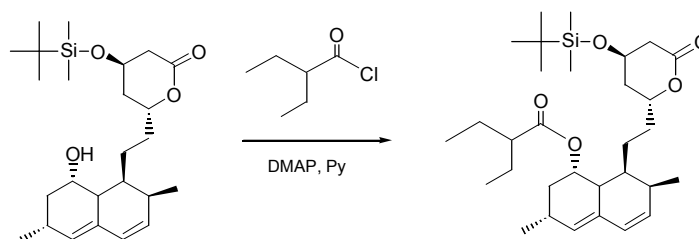
- 15 1.3. Preparación del derivado protegido



Se prepara una disolución de 0,5 g de Monacolina J en 10 ml de diclorometano. Se añaden 0,4345 g de imidazol y se agita hasta disolución. A continuación se añade 0,4835 g de cloruro de terc-butil-dimetilsilano disueltos en 5 ml de diclorometano, y se continúa la agitación durante 24 horas. Se sigue la reacción por TLC utilizando como eluyente diclorometano-metanol (10:1). Rendimiento: 96 %.

- 20

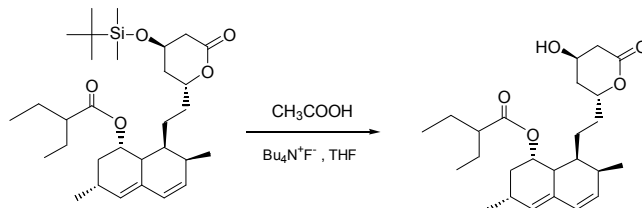
1.4. Preparación del derivado acilado



En un matraz con atmósfera inerte, se disuelven 0,3 g del derivado protegido obtenido previamente en 2 ml de piridina. Posteriormente, se añade 0,06 g de DMAP disuelta en 2 ml de piridina. Se coloca el matraz de reacción en baño de hielo y se añaden 0,378 ml del cloruro de 2-etilbutirilo. A continuación se agita durante una hora a 0° C y a temperatura ambiente durante 18 horas. Se sigue la reacción por TLC utilizando como eluyente hexano-acetato de etilo (2:1). Rendimiento 95 %.

- 25

1.5. Síntesis del compuesto final



Se disuelven 0,368 g del derivado obtenido previamente se disuelven en 2 ml de THF. A continuación, se añade sobre el medio de reacción una disolución de 0,16 ml de ácido acético y 2,16 ml de fluoruro de tetrabutilamonio 1M. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 16 horas. Se sigue la reacción por TLC utilizando como eluyente diclorometano-acetona (6:1). Rendimiento 75 %.

Ejemplo 2

Protección por NST0037 frente a la muerte neuronal inducida por diferentes agresiones: estrés oxidativo, estrés de retículo endoplásmico y apoptosis

2.1. Protección por NST0037 frente a la muerte neuronal inducida por estrés oxidativo

El ensayo fue realizado sobre células en cultivo de neuroblastoma humano SK-N-MC procedentes de "American Type Culture Collection (ATCC)", en todos los casos se siguieron estrictas normas de esterilidad y la manipulación se llevó a cabo en cabinas de seguridad biológica clase II que siguen la norma europea EN 12469. Las células fueron mantenidas en el siguiente medio de cultivo: "Minimun Essential Médium Eagle" (MEM) suplementado con piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, gentamicina 0,05 mg/ml y suero fetal bovino al 10 %.

Se analizó la inhibición producida por el compuesto NST0037 de la muerte celular causada por el tratamiento con xantina/xantina oxidasa que origina daño oxidativo (produce radicales libres como peróxido de hidrógeno, anión superóxido, radical hidroxilo) lo que desencadena muerte celular. Estas células, en pase no superior a 15, fueron sembradas sobre placas de 96 pocillos tratadas para células adherentes con una concentración celular de 5×10^4 células/pocillo; para cada condición del ensayo se sembraron 3 pocillos de la placa.

Tras 24 h de incubación de las células a 37 °C y CO₂ al 5 % se procedió a los tratamientos celulares con 100 µl de volumen total para las condiciones siguientes:

- Control: medio de cultivo (medio)
- Xantina/xantina oxidasa (XXO): medio más xantina 10 µM/ xantina oxidasa 60 mU/ml, que produce la muerte del 50 % de las células.
- XXO más NST0037: medio más XXO (10 µM / 60 mU/ml) más NST0037 a 1, 4, 10, 20, 40 o 100 µM.

Las células fueron incubadas (a 37 °C y CO₂ al 5 %) con estos tratamientos durante 22 h, pasadas las cuales se añadió el reactivo WST-1 (Roche). El test WST-1 se basa en la medida de la actividad metabólica. El daño celular produce la pérdida de la habilidad de las células de obtener la energía necesaria para mantener sus funciones metabólicas y el crecimiento celular, por lo que las células que metabólicamente activas (vivas) reducen la sal de tetrazolium a formazán mediante el sistema succinato-tetrazolium reductasa (de la cadena respiratoria mitocondrial). El formazán formado puede ser detectado colorimétricamente, ya que tiene una absorbancia de 440 nm. A las 2 horas de añadido el reactivo se realizó la lectura en un lector de placas a 440 nm.

Los resultados obtenidos se muestran, como aparece en la Figura 1, como el porcentaje de muerte celular para cada tratamiento referido a la muerte producida por la XXO. Se observó protección de la muerte desde 1 a 100 µM de NST0037, siendo las diferencias respecto a la XXO estadísticamente significativas, según el test t de Student, para todas las concentraciones evaluadas, alcanzando una máxima protección del 78 % a 20 µM. Estos resultados indican que el compuesto NST0037 muestra un efecto protector de la muerte de células humanas de origen neuronal causada por estrés oxidativo.

2.2. Protección por NST0037 frente a la muerte neuronal inducida por estrés de retículo endoplásmico

El ensayo fue realizado sobre células en cultivo de neuroblastoma humano SK-N-MC procedentes de "American Type Culture Collection (ATCC)", en todos los casos se siguieron estrictas normas de esterilidad y la manipulación se llevó a cabo en cabinas de seguridad biológica clase II que siguen la norma europea EN 12469. Las células fueron mantenidas en el siguiente medio de cultivo: "Minimun Essential Médium Eagle" (MEM) suplementado con piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, gentamicina 0,05 mg/ml y suero fetal bovino al 10 %.

Se analizó la inhibición producida por el compuesto NST0037 de la muerte celular causada por el tratamiento con tunicamicina que origina estrés reticular. La tunicamicina es un inhibidor de la N-glicosilación de proteínas, lo que produce el plegamiento anormal de las proteínas en el retículo endoplásmico, con lo que dichas proteínas se acumulan y producen estrés que desemboca en la muerte celular. Estas células, en pase no superior a 15, fueron sembradas sobre placas de 96 pocillos tratadas para células adherentes con una concentración celular de 5×10^4 células/pocillo; para cada condición del ensayo se sembraron 3 pocillos de la placa.

Tras 24 h de incubación de las células a 37 °C y CO₂ al 5 % se procedió a los tratamientos celulares con 100 µl de volumen total para las condiciones siguientes:

- Control: medio de cultivo (medio)
- Tunicamicina (Tm): medio más tunicamicina 24 µM, que produce la muerte del 50 % de las células.
- Tm más NST0037: medio más Tm (24 µM) más NST0037 a 1, 4, 10, 40 o 100 µM.

Las células fueron incubadas (a 37 °C y CO₂ al 5 %) con estos tratamientos durante 22 h, pasadas las cuales se añadió el reactivo WST-1 (Roche). El test WST-1 se basa en la medida de la actividad metabólica. El daño celular produce la pérdida de la habilidad de las células de obtener la energía necesaria para mantener sus funciones metabólicas y el crecimiento celular, por lo que las células metabólicamente activas (vivas) reducen la sal de tetrazolium a formazán mediante el sistema succinato-tetrazolium reductasa (de la cadena respiratoria mitocondrial). El formazán formado puede ser detectado colorimétricamente, ya que tiene una absorbancia de 440 nm. A las 2 horas de añadido el reactivo se realizó la lectura en un lector de placas a 440 nm.

Los resultados obtenidos se muestran, como aparece en la Figura 2, como el porcentaje de muerte celular para cada tratamiento referido a la muerte producida por la Tm. Se observó protección de la muerte desde 1 a 100 µM de NST0037, alcanzando un 55 % a 40 µM. Estos resultados indican que el compuesto NST0037 muestra un efecto protector de la muerte de células humanas de origen neuronal causada por estrés de retículo endoplásmico.

2.3. Protección por NST0037 frente a la muerte neuronal inducida por apoptosis

El ensayo fue realizado sobre células en cultivo de neuroblastoma humano SK-N-MC procedentes de "American Type Culture Collection (ATCC)", en todos los casos se siguieron estrictas normas de esterilidad y la manipulación se llevó a cabo en cabinas de seguridad biológica clase II que siguen la norma europea EN 12469. Las células fueron mantenidas en el siguiente medio de cultivo: "Minimun Essential Médium Eagle" (MEM) suplementado con piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, gentamicina 0,05 mg/ml y suero fetal bovino al 10 %.

Se analizó la inhibición producida por el compuesto NST0037 de la muerte celular causada por el tratamiento con camptotecina que origina parada del ciclo celular. La camptotecina que es un inhibidor de la Topoisomerasa I, por lo que impide la duplicación del DNA y desencadena la parada del ciclo celular y la muerte por apoptosis. Estas células, en pase no superior a 15, fueron sembradas sobre placas de 96 pocillos tratadas para células adherentes con una concentración celular de 5×10^4 células/pocillo; para cada condición del ensayo se sembraron 3 pocillos de la placa.

Tras 24 h de incubación de las células a 37 °C y CO₂ al 5 % se procedió a los tratamientos celulares con 100 µl de volumen total para las condiciones siguientes:

- Control: medio de cultivo (medio)
- Camptotecina (CPT): medio más camptotecina 20 nM, que produce la muerte del 50 % de las células.
- Camptotecina más NST0037: medio más camptotecina (20 nM) más NST0037 a 1, 4, 10, 20, 40 o 100 µM.

Las células fueron incubadas (a 37 °C y CO₂ al 5 %) con estos tratamientos durante 22 h, pasadas las cuales se añadió el reactivo WST-1 (Roche). El test WST-1 se basa en la medida de la actividad metabólica. El daño celular produce la pérdida de la habilidad de las células de obtener la energía necesaria para mantener sus funciones metabólicas y el crecimiento celular, por lo que las células metabólicamente activas (vivas) reducen la sal de tetrazolium a formazán mediante el sistema succinato-tetrazolium reductasa (de la cadena respiratoria mitocondrial). El formazán formado puede ser detectado colorimétricamente, ya que tiene una absorbancia de 440 nm. A las 2 horas de añadido el reactivo se realizó la lectura en un lector de placas a 440 nm.

Los resultados obtenidos se muestran, como aparece en la Figura 3, como el porcentaje de muerte celular para cada tratamiento referido a la muerte producida por la camptotecina. Se observó protección de la muerte desde 4 a 100 µM de NST0037, alcanzando un 18 %, 28 %, 27 % y 27 % a 4, 10, 40 y 100 µM, respectivamente. Estos resultados indican que el compuesto NST0037 muestra un efecto protector de la muerte de células humanas de origen neuronal causada por parada del ciclo celular.

2.4. Determinación de la inhibición de la apoptosis mediante citometría de flujo

El ensayo fue realizado sobre células en cultivo de neuroblastoma humano SK-N-MC procedentes de "American Type Culture Collection (ATCC)", en todos los casos se siguieron estrictas normas de esterilidad y la manipulación se llevó a cabo en cabinas de seguridad biológica clase II que siguen la norma europea EN 12469. Las células fueron mantenidas en el siguiente medio de cultivo: "Minimun Essential Médium Eagle" (MEM) suplementado con

5 piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, gentamicina 0,05 mg/ml y suero fetal bovino al 10 %.

Se analizó la inhibición producida por el compuesto NST0037 frente a la apoptosis (muerte celular programada) causada por el tratamiento con camptotecina que inhibe la enzima topoisomerasa I, lo que impide la duplicación del DNA y desencadena muerte celular apoptótica. Estas células, en pase no superior a 15, fueron sembradas

10 sobre placas de 6 pocillos tratadas para células adherentes con una concentración celular de 8×10^5 células/pocillo y 7×10^5 células/pocillo para el ensayo con pretratamiento; para cada condición del ensayo se sembraron 2 pocillos de la placa.

Tras 24 h de incubación de las células a 37 °C y CO₂ al 5 % se procedió a los tratamientos celulares con 2 ml de volumen total para las condiciones siguientes:

- 15 - Control: medio de cultivo (medio)
- Camptotecina: medio más camptotecina 50 µM.
- Camptotecina más Z-VAD-fmk: medio más camptotecina 50 µM más Z-VAD-fmk 50 µM, como control positivo de inhibición.
- Camptotecina más NST0037: medio más camptotecina 50 µM más NST0037 a 10, 40 o 100 µM.

20 En el ensayo con pretratamiento las células se trataron previamente con 40 µM de NST0037, 100 µM de mevalonato o ambos juntos durante 24 h y después se trataron con 50 µM camptotecina, el resto del procedimiento fue similar al ensayo sin pretratamiento.

Las células fueron incubadas (a 37 °C y CO₂ al 5 %) con estos tratamientos durante 6 h, pasadas las cuales se recogieron junto con su medio de cultivo y se centrifugaron a 300xg durante 5 min. Se eliminó el medio, se realizó

25 un lavado con PBS y se fijaron durante 2 minutos con 500 µl de etanol al 70 % a -20 °C. Una vez fijadas se centrifugaron a 400xg durante 5 min, se lavaron con PBS y se les añadió yoduro de propidio a 0,05 mg/ml, diluido en buffer de ciclo (Citrato sódico al 0,1 %, Nonidet P-40 al 0,3 % y RNasa 0,02 mg/ml) y se incubaron 1 hora a 37 °C. Pasado este tiempo se analizaron por citometría de flujo, comparando la fluorescencia del yoduro de propidio frente a la cantidad de DNA. El porcentaje de apoptosis se midió sobre la región sub-G1 de cada una de

30 las condiciones.

Los resultados obtenidos se muestran, como aparece en la Figura 4A y B, como el porcentaje de la inhibición de la apoptosis de cada tratamiento referido a la apoptosis producida por la camptotecina. Se observó una protección máxima del 18 % a 40 y 100 µM de NST0037 (Figura 4A), por lo que este compuesto muestra un efecto protector de la apoptosis en células humanas de origen neuronal. El Z-VAD-fmk, inhibidor específico de caspasas, inhibió

35 específicamente la apoptosis producida por la camptotecina. Estos resultados fueron corroborados mediante experimentos de pretratamiento del NST0037 a 40 µM (Figura 4B), lo que produjo un aumento del porcentaje de protección (llegando hasta el 45 %). Adicionalmente se determinó que la protección ejercida por NST0037 es inhibida parcialmente por la adición de mevalonato al medio, lo que indica que el efecto neuroprotector del NST0037 está relacionado con la biosíntesis del colesterol o con alguno de los precursores de la ruta.

40 Ejemplo 3

Protección por NST0037 frente a la muerte neuronal en el hipocampo, del déficit cognitivo y de la muerte causada por una sustancia excitotóxica

3.1. Efecto protector de NST0037 frente a la muerte neuronal en el hipocampo de ratones causada por una sustancia excitotóxica

45 En base a los resultados del Ejemplo 2, los inventores decidieron averiguar si el efecto neuroprotector de NST0037 demostrado en neuronas colinérgicas humanas se corroboraba en un modelo de enfermedad de Alzheimer esporádica en ratón mediante administración de kainato (KA).

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron machos de 12 semanas de edad y de la cepa FVB/NHan. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the*

50 *Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

Veintiocho animales fueron utilizados en este ensayo y los tratamientos llevados a cabo, todos por vía intraperitoneal (i.p.) con un volumen de 100 µl, según las siguientes pautas:

i) Pauta PBS+PBS+PBS: 4 animales se trataron inicialmente con PBS con una dosis diaria durante 2 días, en el segundo día los animales fueron inoculados con una nueva dosis de PBS y durante los siguientes 7 días con una dosis diaria de PBS.

5 ii) Pauta PBS+KA+PBS: 6 animales se trataron inicialmente con PBS con una dosis diaria durante 2 días, en el segundo día los animales fueron inoculados con una dosis de kainato a 25 mg/kg y durante los siguientes 7 días con una dosis diaria de PBS.

iii) Pauta PBS+KA+NST0037: 7 animales se trataron inicialmente con PBS con una dosis diaria durante 2 días, en el segundo día los animales fueron inoculados con una dosis de kainato a 25 mg/kg y durante los siguientes 7 días con una dosis diaria de NST0037 a 50 mg/kg.

10 iv) Pauta NST0037+KA+NST0037: 6 animales se trataron inicialmente con una dosis diaria durante 2 días con NST0037 a 50 mg/kg, en el segundo día los animales fueron inoculados con una dosis de kainato a 25 mg/kg y durante los siguientes 7 días con una dosis diaria de NST0037 a 50 mg/kg.

15 v) Pauta NST0037+PBS+NST0037: 5 animales se trataron inicialmente con una dosis diaria durante 2 días con NST0037 a 50 mg/kg, en el segundo día los animales fueron inoculados con una dosis de PBS y durante los siguientes 7 días con una dosis diaria de NST0037 a 50 mg/kg.

Una vez concluido el tiempo de 7 días de tratamiento los animales fueron sacrificados y los encéfalos fueron diseccionados. Las muestras de encéfalo fueron procesadas e incluidas en parafina. Para el análisis de la arquitectura celular del hipocampo se utilizó la tinción con hematoxilina y eosina en cortes de 5 µm de grosor.

20 Como muestra la Figura 5, la pauta de administración PBS+KA+PBS produjo un severo daño neuronal en la región CA1 y CA2 del hipocampo de los ratones. En las muestras de dicho grupo observamos ausencia de neuronas, evidencias de necrosis y numerosos núcleos picnóticos, lo que demuestra muerte neuronal. Sin embargo, las muestras del grupo NST0037+KA+NST0037 presentaban una estructura celular igual a los controles (grupo PBS+PBS+PBS) sin evidencias de daño celular en las regiones CA1 y CA2. Además y de manera sorprendente, las muestras del grupo PBS+KA+NST0037, mostraron diversas señales de daño y muerte neuronal en el
25 hipocampo. Sin embargo, comparando *de visu* las muestras de los grupos PBS+KA+PBS frente a las del grupo PBS+KA+NST0037 observamos un mayor número de neuronas del hipocampo sin daño en el grupo con el tratamiento de NST0037, lo que indica su efecto neuroprotector. Por último las muestras del grupo NST0037+PBS+NST0037 presentaban un patrón igual al observado en los animales del grupo PBS+PBS+PBS.

30 En resumen, el pretratamiento con NST0037 (grupo NST0037+KA+NST0037) protegió completamente de la muerte neuronal producida por el KA en las regiones CA1 y CA2 del hipocampo. Además el comienzo del tratamiento con NST0037 después de la inoculación de KA redujo cualitativamente el daño y la muerte neuronal en esta región. También se demostró que la administración diaria de NST0037 durante 8 días no fue neurotóxica para los ratones.

35 3.2. Efecto protector de NST0037 frente al deterioro de la memoria de tipo episódica en ratones causado por una sustancia excitotóxica

La excitotoxicidad que produce el KA induce, a los pocos días tras su inoculación en ratones, el deterioro de la memoria de tipo episódico, afectando a la memoria temporal y produciendo un grave déficit en la memoria espacial. Debido a esto los inventores decidieron averiguar si el efecto neuroprotector de NST0037 se veía acompañado de una protección de la memoria que se deteriora por efecto de una sustancia excitotóxica.

40 Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron machos de 12 semanas de edad y de la cepa FVB/NHan. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

45 Veintiocho animales fueron utilizados en este ensayo y los tratamientos llevados a cabo, todos por vía intraperitoneal (i.p.) con un volumen de 100 µl, según las siguientes pautas:

i) Pauta PBS+PBS+PBS: 4 animales se trataron inicialmente con PBS con una dosis diaria durante 2 días, en el segundo día los animales fueron inoculados con una nueva dosis de PBS y durante los siguientes 3 días con una dosis diaria de PBS.

50 ii) Pauta PBS+KA+PBS: 6 animales se trataron inicialmente con PBS con una dosis diaria durante 2 días, en el segundo día los animales fueron inoculados con una dosis de kainato a 25 mg/kg y durante los siguientes 3 días con una dosis diaria de PBS.

iii) Pauta PBS+KA+NST0037: 7 animales se trataron inicialmente con PBS con una dosis diaria durante 2 días, en el segundo día los animales fueron inoculados con una dosis de kainato a 25 mg/kg y durante los siguientes 3 días con una dosis diaria de NST0037 a 50 mg/kg.

5 iv) Pauta NST0037+KA+NST0037: 6 animales se trataron inicialmente con una dosis diaria durante 2 días con NST0037 a 50 mg/kg, en el segundo día los animales fueron inoculados con una dosis de kainato a 25 mg/kg y durante los siguientes 3 días con una dosis diaria de NST0037 a 50 mg/kg.

v) Pauta NST0037+PBS+NST0037: 5 animales se trataron inicialmente con una dosis diaria durante 2 días con NST0037 a 50 mg/kg, en el segundo día los animales fueron inoculados con una dosis de PBS y durante los siguientes 3 días con una dosis diaria de NST0037 a 50 mg/kg.

10 A los 3 días post-inoculación de KA les fue realizado a los animales un test de reconocimiento de objetos denominado test de memoria integral. En la Figura 6 se muestran los resultados de la relación en el tiempo de exploración de los objetos antiguos frente a los objetos recientes (memoria temporal). Se observó que el grupo con la pauta de tratamiento NST0037+KA+NST0037 evitó la disminución en la capacidad de memoria temporal en comparación con los ratones del grupo PBS+KA+PBS. Además los animales del grupo PBS+KA+NST0037
15 también presentaron una mejora del estado de la memoria temporal respecto a los tratados del grupo PBS+KA+PBS. Los datos también mostraron que el grupo de los ratones con la pauta NST0037+PBS+NST0037 también presentaron una mejora de la memoria temporal respecto al grupo PBS+PBS+PBS.

En la Figura 7 se muestran los resultados de la relación en el tiempo de exploración del objeto antiguo desplazado frente al objeto antiguo sin desplazar (memoria espacial). El grupo de ratones con las pautas de tratamiento
20 NST0037+KA+NST0037 o NST0037+PBS+NST0037 mostraron una ratio de exploración de objetos que demuestra que la memoria espacial se encuentra intacta ya que no se observan diferencias respecto al grupo PBS+PBS+PBS. Sin embargo los ratones del grupo PBS+KA+PBS presentaron un deterioro grave de la memoria espacial. El grupo del tratamiento PBS+KA+NST0037 mostró una mejora de este tipo de memoria respecto a los que fueron tratados del grupo PBS+KA+PBS.

25 Estos estudios indican que el tratamiento antes y después (o solo después) del daño con una sustancia excitotóxica con el compuesto NST0037, tiene un efecto de protección de la memoria episódica (temporal y espacial) que degenera tras la administración de una sustancia excitotóxica.

3.3. Efecto protector de NST0037 frente a la muerte causada por una sustancia excitotóxica

30 Es conocido que la administración de una sustancia excitotóxica a animales induce, en algunos casos, la muerte del animal. Debido a esto los inventores decidieron averiguar si el efecto neuroprotector de NST0037 se veía acompañado de una reducción de la mortalidad producida por una sustancia excitotóxica.

35 Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron machos de 12 semanas de edad y de la cepa FVB/NHan. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

Veintiocho animales fueron utilizados en este ensayo y los tratamientos llevados a cabo, todos por vía intraperitoneal (i.p.) con un volumen de 100 µl, siguieron la siguiente pauta:

40 vi) Pauta PBS+PBS+PBS: 4 animales se trataron inicialmente con PBS con una dosis diaria durante 2 días, en el segundo día los animales fueron inoculados con una nueva dosis de PBS y durante los siguientes 3 días con una dosis diaria de PBS.

vii) Pauta PBS+KA+PBS: 6 animales se trataron inicialmente con PBS con una dosis diaria durante 2 días, en el segundo día los animales fueron inoculados con una dosis de kainato a 25 mg/kg y durante los siguientes 3 días con una dosis diaria de PBS.

45 viii) Pauta PBS+KA+NST0037: 7 animales se trataron inicialmente con PBS con una dosis diaria durante 2 días, en el segundo día los animales fueron inoculados con una dosis de kainato a 25 mg/kg y durante los siguientes 3 días con una dosis diaria de NST0037 a 50 mg/kg.

50 ix) Pauta NST0037+KA+NST0037: 6 animales se trataron inicialmente con una dosis diaria durante 2 días con NST0037 a 50 mg/kg, en el segundo día los animales fueron inoculados con una dosis de kainato a 25 mg/kg y durante los siguientes 3 días con una dosis diaria de NST0037 a 50 mg/kg.

x) Pauta NST0037+PBS+NST0037: 5 animales se trataron inicialmente con una dosis diaria durante 2 días con NST0037 a 50 mg/kg, en el segundo día los animales fueron inoculados con una dosis de PBS y durante los siguientes 3 días con una dosis diaria de NST0037 a 50 mg/kg.

Durante todo el tiempo del ensayo se registraron las muertes, los resultados se muestran en la Figura 8 mediante curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. Los resultados del estudio de la mortalidad producida por el KA mostraron que el grupo con la pauta de tratamiento NST0037+KA+NST0037 protegió de la muerte asociada al daño producido por una sustancia excitotóxica. Además, y lo que es más importante, el grupo con la pauta de tratamiento PBS+KA+NST0037 aumenta la supervivencia de los animales frente a los del grupo con la pauta PBS+KA+PBS.

Estos estudios indican que el tratamiento antes y después (o solo después) del daño con una sustancia excitotóxica con el compuesto NST0037, tiene un efecto de protección de mortalidad causada por la administración de una sustancia excitotóxica.

Ejemplo 4

Efecto antiepiléptico de NST0037 frente a la acción de una sustancia excitotóxica

Es conocido que la administración de una sustancia excitotóxica a animales induce, en algunos casos, crisis epilépticas y convulsiones en los animales. Debido a esto los inventores decidieron averiguar si el efecto neuroprotector de NST0037 se veía acompañado de un efecto antiepiléptico producido por una sustancia excitotóxica.

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron machos de 12 semanas de edad y de la cepa FVB/NHan. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

Los animales fueron inoculados intraperitonealmente con 25 mg/kg de kainato (KA) disuelto en PBS. Trece animales fueron pretratados a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA mediante inyección intraperitoneal con PBS (pauta de administración PBS+KA) y 6 fueron pretratados a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA mediante inyección intraperitoneal con NST0037 a una dosis de 50 mg/kg (pauta de administración NST0037+KA). Tras la inoculación los animales fueron alojados en cubetas de manera individual para su seguimiento. Durante la observación se registró el nivel máximo de epilepsia de los animales según la escala Racine cada diez minutos y durante al menos 120 minutos post-inoculación (m.p.i.).

Posteriormente se realizaron estudios comparativos de los fenómenos epileptogénicos entre el tratamiento con PBS (PBS+KA) y con NST0037 (NST0037+KA). Se observaron diferencias en el porcentaje de animales que entraron en *status epilepticus*, es decir que presentaron convulsiones clónico-tónicas, entre el grupo de NST0037+KA y que fue de un 33,3 % (2 de 6) frente al grupo de pauta de tratamiento con PBS+KA y que fue de un 76,9 % (10 de 13), lo que demuestra que el compuesto NST0037 es antiepiléptico y anticonvulsivante. También se observaron diferencias en el tiempo en el que aparecían las primeras convulsiones (*periodo de latencia*), donde la latencia del grupo NST0037+KA (103,3±13,1 min.) fue mayor que con la pauta de tratamiento PBS+KA (74,6±8,6 min.) como se muestra la Figura 9, lo que demuestra un efecto antiepiléptico y anticonvulsivante del compuesto NST0037. En base a estos resultados los inventores decidieron averiguar si el efecto antiepiléptico y anticonvulsivante se confirmaba con los niveles de epilepsia y por la gravedad de los síntomas, observando que los animales del grupo con la pauta PBS+KA alcanzaban un nivel de epilepsia 4 en la escala Racine, mientras la pauta NST0037+KA no produjo en ningún momento un nivel de epilepsia 3 en dicha escala, indicando que el compuesto NST0037 es antiepiléptico y anticonvulsivante. Además, a partir de los 100 m.p.i. la pauta NST0037+KA produjo la desaparición de los síntomas epileptogénicos, mientras la pauta de PBS+KA presentaba crisis y espasmos graves.

Estos estudios indican que el tratamiento con el compuesto NST0037, tiene un efecto antiepiléptico y anticonvulsivante debido a la administración de una sustancia excitotóxica.

Ejemplo 5

Actividad inhibitoria de la HMGR y efecto hipocolesterolémico de NST0037 en un modelo de hiperlipidemia endógena en ratón

5.1. Efecto inhibitorio de NST0037 sobre la actividad enzimática de la HMGR

Debido a la naturaleza del compuesto, se determinó el grado de inhibición de la enzima HMGR por el compuesto NST0037, ya que este enzima es clave en la síntesis de colesterol celular y en la regulación fisiológica de dicha síntesis. El efecto de este compuesto se comparó con el de dos estatinas conocidas, la atorvastatina y la simvastatina, compuestos para los que ya está descrito un potente efecto inhibitorio sobre HMGR. Durante la reacción, la HMGR utiliza NADPH como agente reductor y como sustrato 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMGCoA), produciendo ácido mevalónico, CoASH y NADP⁺. La disminución de la absorbancia a la que absorbe el NADPH (340 nm) es una medida directa de la actividad catalítica de la HMGR y sirve para calcular los porcentajes de inhibición de diferentes compuestos. Para llevar a cabo las medidas de inhibición de HMGR, el

ensayo se llevó a cabo en placa de 96 pocillos, con un volumen de reacción total de 200 µl. El buffer de reacción (KH_2PO_4 50 mM, KCl 1 M, Bovine Serum Albumin [BSA] 2 mg/ml y DTT 5 mM, a pH=7,3) se preparó en el momento de llevar a cabo la reacción y se mantuvo a 37 °C. En los ensayos se incluyeron:

- Un blanco: Carente de HMGR que informa de la estabilidad de NADPH durante la reacción.
- 5 - Un control: Contiene todos los componentes de la reacción pero carece de compuesto problema.
- Compuestos problema: NST0037, Atorvastatina y Simvastatina a diversas concentraciones. En todos los casos se empleó la forma ácida de los compuestos.

Se llevaron a cabo cinco ensayos independientes con NST0037, cuatro ensayos independientes con atorvastatina y seis ensayos independientes con simvastatina, determinándose la potencia de la inhibición en un rango de concentraciones que permitían definir las constantes de inhibición al 50 % (IC_{50}), mediante determinación espectrofotométrica de la caída de NADPH a 37 °C, y tal y como se muestra en la Figura 11. El descenso de absorbancia a 340 nm permite calcular el porcentaje de actividad enzimática HMGR respecto al control. Las IC_{50} fueron determinadas mediante el método Trimmed Spearman-Kärber (Versión 1.5). Los resultados indican que la potencia de inhibición de NST0037 está sorprendentemente próxima a la de la estatina más potente, la atorvastatina, y es 7,5 veces más potente que la simvastatina, lo que demuestra un efecto inhibitor de la HMGR claro.

5.2. Efecto hipocolesterolémico de NST0037 en un modelo de hiperlipidemia endógena (familiar)

En base a los resultados del punto anterior, los inventores decidieron averiguar si la actividad inhibidora de la enzima HMGR por el compuesto NST0037 se correspondía con una variación de colesterol total y de sus fracciones en un modelo de hiperlipidemia endógena en ratón.

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron machos de 46 semanas de edad y de la cepa ApoB100, la cual presenta una deficiencia en la retirada de colesterol de la sangre que produce un aumento anormalmente elevado de colesterol en plasma. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

Para llevar a cabo el experimento a los animales en condición de ayuno se les extrajo sangre por punción ocular. De dicha sangre se obtuvo el plasma en el que se determinaron los niveles de colesterol total y de sus fracciones previo a la administración de las sustancias a estudio. Inmediatamente después, los animales fueron inoculados intraperitonealmente con 50 mg/kg de cada uno de los compuestos problema. Cuatro animales fueron tratados únicamente con el vehículo y fueron considerados el grupo control. Un segundo grupo de cinco ratones recibió 50 mg/kg de simvastatina. Por último, un tercer grupo de cinco ratones recibió 50 mg/kg de NST0037. Transcurridas doce horas de los tratamientos, se extrajo sangre de nuevo a los animales en condición de ayuno y se obtuvo el plasma de dicha sangre. La Figura 12 muestra los niveles plasmáticos de colesterol a tiempo inicial (t_0) y doce horas tras la administración de vehículo, simvastatina o NST0037 en los diferentes grupos de ratones (t_{12}), demostrando que ambos compuestos presentan un efecto hipocolesterolémico significativo. En relación a las diferentes fracciones de colesterol, ambos compuestos disminuyeron apreciablemente los niveles de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (c-LDL) y de muy baja densidad (c-VLDL), sin alterar los niveles de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (c-HDL), tal y como se muestra en las Figuras 13 a 15. En relación a los niveles de colesterol libre (CL) y colesterol esterificado (CE), ambos compuestos disminuyeron de forma similar los niveles de CE sin alterar los de CL, tal y como se muestra en las Figuras 16 y 17.

Los resultados mostrados en este apartado demuestran que el compuesto NST0037 muestra un efecto sorprendentemente similar a la simvastatina, reduciendo los niveles de CT, c-LDL, c-VLDL y CE de manera significativa sin alterar los de c-HDL ni de CL.

45 Ejemplo 6

Efecto hipocolesterolémico de NST0037 en un modelo de hiperlipidemia inducida en ratón

En base a los resultados obtenidos en la experimentación con animales ApoB100, los inventores decidieron averiguar si el compuesto NST0037 mostraba también un efecto hipocolesterolémico en un modelo de hiperlipidemia inducida aguda.

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron ratones salvajes machos de 6 semanas de edad y de la cepa C57BL6. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

Para llevar a cabo el experimento a los animales en condición de ayuno se les extrajo sangre por punción ocular. De dicha sangre se obtuvo el plasma en el que se determinaron los niveles de colesterol total y de sus fracciones, previamente a la administración de las sustancias a estudio. Inmediatamente después, los animales fueron inoculados intraperitonealmente con 500 mg/kg de Tritón 1339 también conocido como tiloxapol. A los treinta minutos, los animales fueron inoculados intraperitonealmente con 50 mg/kg de cada uno de los compuestos problema. Siete animales fueron tratados únicamente con el vehículo y fueron considerados el grupo control. Un segundo grupo de seis ratones recibió 50 mg/kg de simvastatina. Por último, un tercer grupo de siete ratones recibió 50 mg/kg de NST0037. Transcurridas veinticuatro horas de los tratamientos, se extrajo sangre de nuevo a los animales en condición de ayuno y se obtuvo el plasma de dicha sangre. La Figura 18 muestra el número de veces que incrementa el colesterol total tras veinticuatro horas de la administración del Tritón 1339 seguida de la administración de vehículo, simvastatina o NST0037 en los diferentes grupos de ratones, demostrando que ambos compuestos problema presentan un efecto hipocolesterolémico, siendo estadísticamente significativo únicamente en el caso del tratamiento con NST0037. En relación a las diferentes fracciones de colesterol, ambos compuestos disminuyeron los niveles de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (c-LDL), siendo estadísticamente significativa dicha reducción solo en el caso de NST0037. Solo la simvastatina disminuyó los niveles de colesterol unido a lipoproteínas de muy baja densidad (c-VLDL), no siendo alterados con ninguno de los dos compuestos los niveles de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) tal y como se muestra en las Figuras 19 a 21. A diferencia de la simvastatina, NST0037 disminuyó los niveles de colesterol esterificado (CE), tal y como se muestra en la Figura 22. En relación a los niveles de colesterol libre (CL), ambos compuestos disminuyeron de forma similar los niveles de esta fracción, tal y como se muestra en la Figura 23.

Los resultados mostrados en este apartado demuestran sorprendentemente que el compuesto NST0037 presenta un efecto hipocolesterolémico igual o mayor a la simvastatina, reduciendo los niveles de CT y c-LDL de manera estadísticamente significativa. Estos resultados confirman el efecto hipocolesterolémico de NST0037 observado en el modelo de ratones apoB100.

Ejemplo 7

Bioseguridad de NST0037 en embrión de pez cebra

7.1. Análisis del índice de supervivencia del compuesto NST0037 en comparación con la simvastatina

Para evaluar la bioseguridad del compuesto NST0037 se analizaron sus efectos toxicológicos en el modelo de embrión de pez cebra mediante la determinación de los parámetros de seguridad del protocolo C15 de la OECD.

Los huevos fertilizados fueron obtenidos por apareamiento natural del pez cebra (*Danio rerio*, cepa AB). Un total de 8-10 parejas fueron utilizadas para cada cruce y se generaron un total de 200-250 huevos de media por pareja. Los huevos se recogieron inmediatamente después del desove y fueron lavados con agua de dilución ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,29 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,12 g/l, NaHCO_3 0,065 g/l, KCl 0,006 g/l) ajustándose a pH $7,8 \pm 0,2$, acorde con el Reglamento CE n.º 440/2008 método C.1 y depositados en una placa petri.

Para asegurar la exposición en los estadios más tempranos del desarrollo, los huevos fueron rápidamente transferidos (un mínimo de 50 por condición) a otra placa petri con las soluciones a ensayar de los compuestos. Posteriormente, solo los huevos fertilizados (10 por condición experimental) fueron transferidos de las placas petri a las cámaras de exposición (placas microtiter M24) por medio de pipetas y expuestos a las sustancias a testar (NST0037 o simvastatina), con agua de dilución (controles) o con diferentes concentraciones de los tratamientos.

Los embriones fueron incubados sin aireación adicional, a la temperatura apropiada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) y bajo un régimen de 12 h luz/12 h oscuridad. Cada experimento fue realizado en triplicado.

Los estudios fueron llevados a cabo en un total de 9 días post-fertilización, donde la frecuencia de renovación del tratamiento se realizó todos los días, realizando así un ensayo semi-estático. Los tratamientos llevados a cabo siguieron la siguiente pauta:

➤ 10 animales control, tratados con agua de dilución y con recambio diario durante los 9 días que duró el ensayo.

➤ 30 animales tratados con el compuesto NST0037 (10 embriones por triplicado) diluido en agua de dilución y con recambio diario durante los 9 días que duró el ensayo.

➤ 30 animales tratados con el compuesto simvastatina (10 embriones por triplicado) diluido en agua de dilución y con recambio diario durante los 9 días que duró el ensayo.

Durante todo el tiempo que dura el ensayo se registró la mortalidad de los embriones-larvas, mostrándose los resultados en las Figuras 24 y 25 mediante la realización de curvas de Kaplan-Meier. Los resultados del estudio de la mortalidad inducida por las dos sustancias a estudio mostraron que el compuesto NST0037 es sorprendentemente más seguro que la simvastatina a las dosis evaluadas, siendo las curvas de supervivencia estadísticamente diferentes comparando ambos tratamientos.

7.2. Análisis de las dosis letales 50 del compuesto NST0037 en comparación con la simvastatina en función del tiempo

En base a los resultados del apartado anterior, los inventores decidieron averiguar si la mayor bioseguridad del compuesto NST0037 en comparación con la simvastatina se corroboraba mediante el análisis de las dosis letales 50 (LD₅₀) a lo largo del tiempo.

Los huevos fertilizados fueron obtenidos por apareamiento natural del pez cebra (*Danio rerio*, cepa AB). Un total de 8-10 parejas fueron utilizadas para cada cruce y se generaron un total de 200-250 huevos de media por pareja. Los huevos se recogieron inmediatamente después del desove y fueron lavados con agua de dilución (CaCl₂·2H₂O 0,29 g/l, MgSO₄·7H₂O 0,12 g/l, NaHCO₃ 0,065 g/l, KCl 0,006 g/l) ajustándose a pH 7,8 ± 0,2, acorde con el Reglamento CE n.º 440/2008 método C.1 y depositados en una placa petri.

Para asegurar la exposición en los estadios más tempranos del desarrollo, los huevos fueron rápidamente transferidos (un mínimo de 50 por condición) a otra placa petri con las soluciones a ensayar de los compuestos. Posteriormente, solo los huevos fertilizados (10 por condición experimental) fueron transferidos de las placas petri a las cámaras de exposición (placas microtiter M24) por medio de pipetas y expuestos a las sustancias a testar (NST0037 o simvastatina), con agua de dilución (controles) o con diferentes concentraciones de los tratamientos. Los embriones fueron incubados sin aireación adicional, a la temperatura apropiada (25±1 °C) y bajo un régimen de 12 h luz/12 h oscuridad. Cada experimento fue realizado en triplicado.

Los estudios fueron llevados a cabo en un total de 9 días post-fertilización, donde la frecuencia de renovación del tratamiento se realizó todos los días, realizando así un ensayo semi-estático. Los tratamientos llevados a cabo siguieron la siguiente pauta:

- 10 animales control, tratados con agua de dilución y con recambio diario durante los 9 días que duró el ensayo.
- 30 animales tratados con el compuesto NST0037 (10 embriones por triplicado) diluido en agua de dilución y con recambio diario durante los 9 días que duró el ensayo.
- 30 animales tratados con el compuesto simvastatina (10 embriones por triplicado) diluido en agua de dilución y con recambio diario durante los 9 días que duró el ensayo.

Durante el tiempo que duró el estudio, se registró el número de embriones/larvas muertas a intervalos de 24 horas y se calculó la LD₅₀ en cada punto temporal del experimento, tal y como se muestra en la Figura 26. Los resultados muestran que en los primeros días post-tratamiento (hasta día 2) la LD₅₀ de ambos compuestos se encuentra por encima de la máxima dosis evaluada. No obstante, a partir del tercer día y hasta la finalización del experimento la simvastatina presentó una LD₅₀ menor que la del compuesto NST0037, lo que indica su mayor toxicidad. A partir del día 2 de tratamiento las LD₅₀ de ambos compuestos fue disminuyendo progresivamente a lo largo de todo el experimento, aunque la simvastatina siempre presentó una LD₅₀ por debajo del compuesto NST0037, indicando que NST0037 es más bioseguro que la simvastatina.

7.3. Análisis del porcentaje de larvas sanas al final del experimento del compuesto NST0037 en comparación con la simvastatina en función del tiempo

En base a los resultados de los apartados anteriores, los inventores decidieron averiguar si la mayor bioseguridad del compuesto NST0037 en comparación con la simvastatina se corroboraba mediante el análisis del porcentaje de larvas sanas al final del experimento.

Los huevos fertilizados fueron obtenidos por apareamiento natural del pez cebra (*Danio rerio*, cepa AB). Un total de 8-10 parejas fueron utilizadas para cada cruce y se generaron un total de 200-250 huevos de media por pareja. Los huevos se recogieron inmediatamente después del desove y fueron lavados con agua de dilución (CaCl₂·2H₂O 0,29 g/l, MgSO₄·7H₂O 0,12 g/l, NaHCO₃ 0,065 g/l, KCl 0,006 g/l) ajustándose a pH 7,8 ± 0,2, acorde con el Reglamento CE n.º 440/2008 método C.1 y depositados en una placa petri.

Para asegurar la exposición en los estadios más tempranos del desarrollo, los huevos fueron rápidamente transferidos (un mínimo de 50 por condición) a otra placa petri con las soluciones a ensayar de los compuestos. Posteriormente, solo los huevos fertilizados (10 por condición experimental) fueron transferidos de las placas petri a las cámaras de exposición (placas microtiter M24) por medio de pipetas y expuestos a las sustancias a testar (NST0037 o simvastatina), con agua de dilución (controles) o con diferentes concentraciones de los tratamientos. Los embriones fueron incubados sin aireación adicional, a la temperatura apropiada (25±1 °C) y bajo un régimen de 12 h luz/12 h oscuridad. Cada experimento fue realizado en triplicado.

Los estudios fueron llevados a cabo en un total de 9 días post-fertilización, donde la frecuencia de renovación del tratamiento se realizó todos los días, realizando así un ensayo semi-estático. Los tratamientos llevados a cabo siguieron la siguiente pauta:

➤ 10 animales control, tratados con agua de dilución y con recambio diario durante los 9 días que duró el ensayo.

➤ 30 animales tratados con el compuesto NST0037 (10 embriones por triplicado) diluido en agua de dilución y con recambio diario durante los 9 días que duró el ensayo.

5 ➤ 30 animales tratados con el compuesto simvastatina (10 embriones por triplicado) diluido en agua de dilución y con recambio diario durante los 9 días que duró el ensayo.

Los resultados al final del experimento permitieron recoger el porcentaje de larvas que llegan sanas al final del experimento, definido como el número de larvas vivas y sin síntomas de anomalías fisiopatológicas externas (morfológica y/o en comportamiento), siendo este un parámetro que determina la bioseguridad de una sustancia a estudio y es complementaria a los índices de supervivencia y a las LD₅₀. Tal y como se muestra en la Figura 27, se observaron diferencias evidentes entre los porcentajes de larvas sanas entre los dos tratamientos evaluados en las dosis más altas a estudio (0,06 y 0,2 mg/l), llegando más larvas sanas al final del experimento con el tratamiento con NST0037, lo que indica su mayor bioseguridad.

10

7.4. Análisis del porcentaje de larvas con deformidades o aspecto anómalo al final del experimento del compuesto NST0037 en comparación con la simvastatina en función del tiempo

15

En base a los resultados de los apartados anteriores, los inventores decidieron averiguar si la mayor bioseguridad del compuesto NST0037 en comparación con la simvastatina se corroboraba mediante el análisis del porcentaje de larvas con deformidades o aspecto anómalo, recogiendo el número de larvas que presenten anomalías corporales y/o pigmentarias, así como la fase de reabsorción de la vesícula vitelina a intervalos adecuados (cada 24 horas). Las anomalías registradas en el estudio se describen a continuación:

20

- Trombosis intracraneal: es un coágulo en el interior de un vaso sanguíneo, en este caso de cualquier vaso cerebral.

- Trombosis cardíaca: ocurre en un vaso cardíaco.

25

- Edema (o hidropesía) cardíaco: es la acumulación de líquido en el espacio tisular intercelular o intersticial y también en las cavidades del organismo. En el caso del corazón, se produce acumulación de líquido en la bolsa pericárdica.

- Malformación: es una diferencia notable en la forma del cuerpo o parte del cuerpo, u órgano del cuerpo (interno o externo) comparada con la forma promedio de la parte en cuestión. Normalmente las malformaciones observadas en nuestro estudio son del saco vitelino.

30

Los huevos fertilizados fueron obtenidos por apareamiento natural del pez cebra (*Danio rerio*, cepa AB). Un total de 8-10 parejas fueron utilizadas para cada cruce y se generaron un total de 200-250 huevos de media por pareja. Los huevos se recogieron inmediatamente después del desove y fueron lavados con agua de dilución (CaCl₂•2H₂O 0,29 g/l, MgSO₄•7H₂O 0,12 g/l, NaHCO₃ 0,065 g/l, KCl 0,006 g/l) ajustándose a pH 7,8 ± 0,2, acorde con el Reglamento CE n.º 440/2008 método C.1 y depositados en una placa petri.

35

Para asegurar la exposición en los estadios más tempranos del desarrollo, los huevos fueron rápidamente transferidos (un mínimo de 50 por condición) a otra placa petri con las soluciones a ensayar de los compuestos. Posteriormente, solo los huevos fertilizados (10 por condición experimental) fueron transferidos de las placas petri a las cámaras de exposición (placas microtiter M24) por medio de pipetas y expuestos a las sustancias a testar (NST0037 o simvastatina), con agua de dilución (controles) o con diferentes concentraciones de los tratamientos.

40

Los embriones fueron incubados sin aireación adicional, a la temperatura apropiada (25±1 °C) y bajo un régimen de 12 h luz/12 h oscuridad. Cada experimento fue realizado en triplicado.

Los estudios fueron llevados a cabo en un total de 9 días post-fertilización, donde la frecuencia de renovación del tratamiento se realizó todos los días, realizando así un ensayo semi-estático. Los tratamientos llevados a cabo siguieron la siguiente pauta:

45

➤ 10 animales control, tratados con agua de dilución y con recambio diario durante los 9 días que duró el ensayo.

➤ 30 animales tratados con el compuesto NST0037 (10 embriones por triplicado) diluido en agua de dilución y con recambio diario durante los 9 días que duró el ensayo.

50

➤ 30 animales tratados con el compuesto simvastatina (10 embriones por triplicado) diluido en agua de dilución y con recambio diario durante los 9 días que duró el ensayo.

Los resultados indican que el porcentaje de larvas con deformidades o aspecto anómalo es dependiente del tiempo y del tratamiento, tal y como se muestra en la Figura 28, observándose que a la dosis evaluada (0,2 mg/l) la simvastatina indujo en los embriones-larvas un porcentaje significativo de anomalías o problemas toxicológicos,

mientras el compuesto NST0037 no mostró efectos toxicológicos significativos, lo que indica su mayor bioseguridad. El tratamiento con simvastatina produjo trombosis intracraneales y cardíacas y edemas pericárdicos. También los datos de la gráfica muestran que los animales se fueron recuperando a lo largo del tiempo de los problemas inducidos por la simvastatina, indicando que el tratamiento con 0,2 mg/l de esta sustancia no fue

5

suficientemente tóxico para inducir la muerte del animal, con la consiguiente mejora de los mismos.

Estos resultados indican que el compuesto NST0037 es más seguro que la simvastatina, ya que esta induce un mayor porcentaje de problemas toxicológicos de manera significativa con mayor gravedad.

7.5. Análisis de la variación de la cardiotoxicidad del compuesto NST0037 en comparación con la simvastatina en función de la dosis

- 10 En base a los resultados de los apartados anteriores, los inventores decidieron averiguar si la mayor bioseguridad del compuesto NST0037 en comparación con la simvastatina se corroboraba mediante el análisis de la cardiotoxicidad tras el tratamiento con los diferentes compuestos y a varias dosis. El estudio de este parámetro (cardiotoxicidad), no solo determina el ritmo cardíaco de los animales sino que además, nos permite observar alteraciones en el latido cardíaco (taquicardia, bradicardia, etc.) o anomalías en el desarrollo del corazón
- 15 (pericarditis, atrofia, hipertrofia, etc.).

Los huevos fertilizados fueron obtenidos por apareamiento natural del pez cebra (*Danio rerio*, cepa AB). Un total de 8-10 parejas fueron utilizadas para cada cruce y se generaron un total de 200-250 huevos de media por pareja. Los huevos se recogieron inmediatamente después del desove y fueron lavados con agua de dilución ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,29 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,12 g/l, NaHCO_3 0,065 g/l, KCl 0,006 g/l) ajustándose a pH 7,8 $\pm$ 0,2, acorde con el Reglamento CE n.º 440/2008 método C.1 y depositados en una placa petri.

20

Para asegurar la exposición en los estadios más tempranos del desarrollo, los huevos fueron rápidamente transferidos (un mínimo de 50 por condición) a otra placa petri con las soluciones a ensayar de los compuestos. Posteriormente, solo los huevos fertilizados (10 por condición experimental) fueron transferidos de las placas petri a las cámaras de exposición (placas microtiter M24) por medio de pipetas y expuestos a las sustancias a testar (NST0037 o simvastatina), con agua de dilución (controles) o con diferentes concentraciones de los tratamientos. Los embriones fueron incubados sin aireación adicional, a la temperatura apropiada (25 $\pm$ 1 °C) y bajo un régimen de 12 h luz/12 h oscuridad. Cada experimento fue realizado en triplicado.

25

Los estudios fueron llevados a cabo en un total de 9 días post-fertilización, donde la frecuencia de renovación del tratamiento se realizó todos los días, realizando así un ensayo semi-estático. Los tratamientos llevados a cabo siguieron la siguiente pauta:

30

- 10 animales control, tratados con agua de dilución y con recambio diario durante los 9 días que duró el ensayo.
- 30 animales tratados con el compuesto NST0037 (10 embriones por triplicado) diluido en agua de dilución y con recambio diario durante los 9 días que duró el ensayo.
- 35 ➤ 30 animales tratados con el compuesto simvastatina (10 embriones por triplicado) diluido en agua de dilución y con recambio diario durante los 9 días que duró el ensayo.

Se determinó el ritmo cardíaco de los embriones-larva de pez cebra mediante análisis visual en estereomicroscopio, con determinación del latido cardíaco con la ayuda de un contador manual durante un periodo de un minuto. Los diferentes tratamientos variaron el ritmo cardíaco de los animales, tal y como se muestra en la

40 Figura 29, observándose que las larvas tratadas con simvastatina presentaron una disminución estadísticamente significativa respecto los controles a partir de la dosis de 0,06, y que llegó a ser muy evidente a la dosis de 2 mg/l. Por el contrario, la disminución del ritmo cardíaco con el compuesto NST0037 solo fue estadísticamente significativo a la dosis 2 mg/l en comparación con los controles, mientras a concentraciones menores no presentó diferencias con los controles. Además, a la máxima dosis utilizada de ambos compuestos (2 mg/l), el ritmo

45 cardíaco de los animales tratados con simvastatina fue estadísticamente menor que a los tratados con NST0037, demostrando de nuevo que el compuesto NST0037 es más bioseguro que la simvastatina. Por lo tanto, NST0037 es un compuesto más cardioso que la simvastatina.

Ejemplo 8

Actividad fungicida de NST0037

- 50 La actividad fungicida de NST0037 se analizó mediante bioensayo frente a *Candida albicans*. Para ello se prepararon disoluciones de la forma β -hidroxiácida de NST0037, lovastatina, atorvastatina y simvastatina. Las concentraciones ensayadas fueron las siguientes: 2, 1,5, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,06, 0,025 y 0,01 mM. Se prepararon placas de medio MA (conteniendo por litro: 20 g de extracto de malta, 20 g de glucosa, 1 g de micopeptona y 10 g de agar) previamente inoculadas con un cultivo de *Candida albicans* CECT 1002. Con ayuda de un sacabocados
- 55 (6 mm diámetro) se prepararon varios pocillos en los que se depositaron 40 μ l de las soluciones anteriores. El

estudio se realizó por triplicado y en cada placa se incluyeron triplicados para cada compuesto y concentración. Las placas se mantuvieron a 4 °C durante 1 hora y posteriormente se incubaron a 28 °C durante toda la noche. La presencia de actividad antifúngica se determinó mediante la formación de halos de inhibición del crecimiento de *C. albicans*.

- 5 Los resultados obtenidos mostraron que el compuesto NST0037 tiene una mayor actividad antifúngica que las estatinas incluidas en el ensayo. Como se muestra en la Figura 30 este comportamiento se observó durante todo el rango de concentraciones. En el caso de las concentraciones más elevadas (2–0,25 mM) el compuesto NST0037 mostró valores ligeramente superiores a la simvastatina, la estatina que mostró la mayor actividad fungicida. Sin embargo, al utilizar las concentraciones más bajas (0,06 y 0,025 mM), el compuesto NST0037 fue el
10 único capaz de producir halos de inhibición.

Ejemplo 9

Inducción de la expresión celular del gen 24- dehidrocolesterol reductasa (Seladin-1/DHCR24) por el tratamiento con NST0037

- 15 El ensayo fue realizado sobre células en cultivo de neuroblastoma humano SK-N-MC procedentes de “American Type Culture Collection (ATCC)”, en todos los casos se siguieron estrictas normas de esterilidad y la manipulación se llevó a cabo en cabinas de seguridad biológica clase II que siguen la norma europea EN 12469. Las células fueron mantenidas en el siguiente medio de cultivo: “Minimun Essential Médium Eagle” (MEM) suplementado con piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, gentamicina 0,05 mg/ml y suero fetal bovino al 10 %.

- 20 Se analizó la expresión del gen seladin-1/DHCR24 (NCBI Reference Sequence: NM_014762.3) mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real en comparación con la memantina (fármaco habitualmente utilizado para tratar la enfermedad de Alzheimer). Las células SK-N-MC fueron tratadas durante 24 h en ausencia (control) o presencia de NST0037 o de memantina a 1, 4, 10 o 40 µM. El RNA total se extrajo mediante el kit *High Pure RNA Isolation* (Roche) y la cantidad y calidad del RNA se analizaron mediante espectrofotometría (Infinite 200 con NanoQuant, Tecan) y visualización de las bandas 18S y 28S mediante electroforesis. La RT-PCR se realizó mediante dos
25 pasos, en primer lugar se pasó el mRNA a cDNA usando el *RNA to cDNA kit* (Applied Biosystem) y posteriormente se analizó la expresión génica mediante sondas TaqMan utilizando las sondas validadas Hs00207388_m1 para seladin-1/DHCR24 y Hs99999901_s1 para 18S (utilizado para normalizar los resultados) en el equipo 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem). Se realizaron dos ensayos independientes por triplicado. La cantidad
30 relativa de la expresión del gen se determinó utilizando el método $\Delta\Delta C_t$ con el software SDS v2.1.1 (Applied Biosystem); la expresión de 18S fue usada para normalizar la medida.

- Los resultados obtenidos, como aparece en la Figura 31, muestran el aumento de la expresión del gen seladin-1/DHCR24 con el tratamiento con NST0037 a las concentraciones ensayadas, pero no con el tratamiento con memantina, lo que indica que el tratamiento con NST0037 produce el aumento específico de la expresión del gen seladin-1/DHCR24, que está relacionado con la biosíntesis de colesterol y con capacidad anti-apoptótica mediante
35 la inhibición de la caspasa 3.

Ejemplo 10

Protección por NST0037 frente a la muerte neuronal inducida por la inhibición de la proteína fosfatasa 1 (PP1)

- 40 El ensayo fue realizado sobre células en cultivo de neuroblastoma humano SK-N-MC procedentes de “American Type Culture Collection (ATCC)”, en todos los casos se siguieron estrictas normas de esterilidad y la manipulación se llevó a cabo en cabinas de seguridad biológica clase II que siguen la norma europea EN 12469. Las células fueron mantenidas en el siguiente medio de cultivo: “Minimun Essential Médium Eagle” (MEM) suplementado con piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, gentamicina 0,05 mg/ml y suero fetal bovino al 10 %.

- Se analizó la inhibición producida por el compuesto NST0037 de la muerte celular causada por el tratamiento con ácido okadaico (OA) que inhibe la actividad de la proteína fosfatasa 1 (PP1). El OA es una de las drogas más utilizadas para el estudio del mecanismo de fosforilación de la proteína tau, involucrada en la patogénesis y la progresión de la EA. La inhibición de la PP1 produce alteraciones del citoesqueleto y daño mitocondrial. Estas
50 células, en pase no superior a 15, fueron sembradas sobre placas de 96 pocillos tratadas para células adherentes con una concentración celular de 5×10^4 células/pocillo; para cada condición del ensayo se sembraron 3 pocillos de la placa.

Tras 24 h de incubación de las células a 37 °C y CO₂ al 5 % se procedió a los tratamientos celulares con 100 µl de volumen total para las condiciones siguientes:

- 55 - Control: medio de cultivo (medio)

- Ácido okadaico (OA): medio más OA 20 nM, que produce la muerte del 50 % de las células.
- OA más NST0037: medio más OA (20 nM) más NST0037 a 1, 4, 10, 40 o 100 μ M.

Las células fueron incubadas (a 37 °C y CO₂ al 5 %) con estos tratamientos durante 22 h, pasadas las cuales se añadió el reactivo WST-1 (Roche). El test WST-1 se basa en la medida de la actividad metabólica. El daño celular produce la pérdida de la habilidad de las células de obtener la energía necesaria para mantener sus funciones metabólicas y el crecimiento celular, por lo que las células metabólicamente activas (vivas) reducen la sal de tetrazolium a formazán mediante el sistema succinato-tetrazolium reductasa (de la cadena respiratoria mitocondrial). El formazán formado puede ser detectado colorimétricamente, ya que tiene una absorbancia de 440 nm. A las 2 horas de añadido el reactivo se realizó la lectura en un lector de placas a 440 nm.

Los resultados obtenidos se muestran, como aparece en la Figura 32, como el porcentaje de muerte celular para cada tratamiento referido a la muerte producida por OA. Se observó protección de la muerte desde 4 a 40 μ M de NST0037, alcanzando un 57 % a 40 μ M. Estos resultados indican que el compuesto NST0037 muestra un efecto protector de la muerte de células humanas de origen neuronal causada por inhibición de la PP1.

Ejemplo 11

Protección por NST0037 frente a la muerte neuronal inducida por la inhibición de la succinato deshidrogenasa

El ensayo fue realizado sobre células en cultivo de neuroblastoma humano SK-N-MC procedentes de "American Type Culture Collection (ATCC)", en todos los casos se siguieron estrictas normas de esterilidad y la manipulación se llevó a cabo en cabinas de seguridad biológica clase II que siguen la norma europea EN 12469. Las células fueron mantenidas en el siguiente medio de cultivo: "Minimun Essential Médium Eagle" (MEM) suplementado con piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, gentamicina 0,05 mg/ml y suero fetal bovino al 10 %.

Se analizó la inhibición producida por el compuesto NST0037 de la muerte celular causada por el tratamiento con ácido 3-Nitropropiónico (3-NP). El 3-NP es un inhibidor irreversible de la enzima succinato deshidrogenasa que en modelos animales produce estrés oxidativo y muerte celular apoptótica en el estriado, que mimetiza cambios neuroquímicos y anatómicos asociados a la enfermedad de Huntington (HD). Estas células, en pase no superior a 15, fueron sembradas sobre placas de 96 pocillos tratadas para células adherentes con una concentración celular de 5×10^4 células/pocillo; para cada condición del ensayo se sembraron 3 pocillos de la placa.

Tras 24 h de incubación de las células a 37 °C y CO₂ al 5 % se procedió a los tratamientos celulares con 100 μ l de volumen total para las condiciones siguientes:

- Control: medio de cultivo (medio)
- 3-Nitropropiónico (3-NP): medio más 3-NP 30 μ M, que produce la muerte del 50 % de las células.
- 3-NP más NST0037: medio más 3-NP (30 μ M) más NST0037 a 0,1, 1, 4, 10, 40, 100 o 200 μ M.

Las células fueron incubadas (a 37 °C y CO₂ al 5 %) con estos tratamientos durante 22 h, pasadas las cuales se añadió el reactivo WST-1 (Roche). El test WST-1 se basa en la medida de la actividad metabólica. El daño celular produce la pérdida de la habilidad de las células de obtener la energía necesaria para mantener sus funciones metabólicas y el crecimiento celular, por lo que las células metabólicamente activas (vivas) reducen la sal de tetrazolium a formazán mediante el sistema succinato-tetrazolium reductasa (de la cadena respiratoria mitocondrial). El formazán formado puede ser detectado colorimétricamente, ya que tiene una absorbancia de 440 nm. A las 2 horas de añadido el reactivo se realizó la lectura en un lector de placas a 440 nm.

Los resultados obtenidos se muestran, como aparece en la Figura 33, como el porcentaje de muerte celular para cada tratamiento referido a la muerte producida por 3-NP. Se observó protección de la muerte desde 1 a 100 μ M de NST0037, alcanzando un 41 % a 40 μ M. Estos resultados indican que el compuesto NST0037 muestra un efecto protector de la muerte de células humanas de origen neuronal causada por inhibición de enzima succinato deshidrogenasa.

Ejemplo 12

Inhibición del NST0037 de la activación de caspasa 3/7 en un modelo celular de apoptosis

El ensayo fue realizado sobre células en cultivo de neuroblastoma humano SK-N-MC procedentes de "American Type Culture Collection (ATCC)", en todos los casos se siguieron estrictas normas de esterilidad y la manipulación se llevó a cabo en cabinas de seguridad biológica clase II que siguen la norma europea EN 12469. Las células fueron mantenidas en el siguiente medio de cultivo: "Minimun Essential Médium Eagle" (MEM) suplementado con piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM, aminoácido no esenciales 0,1 mM, gentamicina 0,05 mg/ml y suero fetal bovino al 10 %.

La inducción de apoptosis sobre las células en cultivo se realizó mediante incubación con camptotecina (CPT), que desencadena la activación la apoptosis celular. La apoptosis fue determinada mediante la medida de la activación de las caspasas efectoras, caspasa 3 o caspasa 7, para lo que se utilizó un kit de detección fluorimétrica de caspasa 3/7 activa (Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7, Promega). La caspasa 3 o 7 activa de las células, producen la ruptura de un sustrato, lo que lleva a la emisión de fluorescencia, que es leída mediante un fluorímetro. De esta manera, se analizó el efecto del pretratamiento del compuesto NST0037 a 10 y 40 μM sobre la activación de la caspasa 3/7 producida por 50 μM de camptotecina (CPT) en las células SK-N-MC. Estas células, en pase no superior a 15, fueron sembradas sobre placas de 96 pocillos tratadas para células adherentes con una concentración celular de 5×10^4 células/pocillo, para cada condición del ensayo se sembraron 3 pocillos de la placa. Tras 24 h de incubación de las células a 37 °C y CO₂ al 5 % se procedió al pretratamiento con NST0037 a 10 y 40 μM .

Tras 24 h, se realizaron los tratamientos celulares con 100 μl de volumen total para las condiciones siguientes:

- Control: medio de cultivo (medio)
- Camptotecina (CPT): medio con CPT a 50 μM
- Camptotecina (CPT): medio con CPT a 50 μM , con diferentes pretratamientos con NST0037 (10 o 40 μM) y/o mevalonato (MEV; a 100 μM) o Z-VAD-fmk (50 μM).

Las células fueron incubadas (a 37 °C y CO₂ al 5 %) con estos tratamientos durante 6 h, tras lo que se añadió el tampón de lisis celular y el sustrato de las caspasas a las concentraciones especificadas por el fabricante; se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se congeló a -20 °C durante una noche. Al día siguiente se midió la fluorescencia (499/521 nm, Exci/Emi).

En la Figura 34 se muestra el porcentaje de activación de la caspasa 3/7 respecto a las células control de los diferentes tratamientos. Se observó una inhibición de la caspasa 3/7 respecto a la camptotecina del 26 y 33 % a 10 y 40 μM de NST0037, respectivamente, lo que demuestra un efecto anti-apoptótico funcional de este compuesto. Por otro lado, el mevalonato revirtió esta inhibición, por lo que se demuestra que el efecto del NST0037 sobre la caspasa 3/7 está relacionado con la biosíntesis del colesterol o de alguno de los precursores de la ruta de biosíntesis de este. El Z-VAD-fmk, como inhibidor de caspasas, inhibió totalmente la activación de la caspasa 3/7.

Ejemplo 13

El compuesto NST0037 reduce la producción del péptido β -amiloide en un modelo celular

El ensayo fue realizado sobre células en cultivo de neuroblastoma humano SK-N-MC procedentes de "American Type Culture Collection (ATCC)" transfectadas establemente con una construcción que lleva el gen APP (proteína precursora del beta amiloide, Gen ID: 351) en la isoforma 695, que es la variante más frecuente expresada en neuronas, con lo que se consigue sobreexpresión de la proteína APP. En todos los casos se siguieron estrictas normas de esterilidad y la manipulación se llevó a cabo en cabinas de seguridad biológica clase II que siguen la norma europea EN 12469. Las células fueron mantenidas en el siguiente medio de cultivo: "Minimun Essential Médium Eagle" (MEM) suplementado con piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, gentamicina 0,05 mg/ml y suero fetal bovino al 10 %, la expresión de APP se selecciona mediante la adición del antibiótico higromicina B a 0,16 mg/ml.

Estas células, en pase no superior a 15, fueron sembradas sobre placas de 6 pocillos tratadas para células adherentes con una concentración celular de 8×10^5 células/pocillo, para cada condición del ensayo se sembraron 2 pocillos de la placa. Tras 24 h de incubación de las células a 37 °C y CO₂ al 5 % se procedió a los tratamientos celulares con 2 ml de volumen total para las condiciones siguientes:

- Control: medio de cultivo (medio)
- NST0037: medio más NST0037 a 1, 4, 10 o 40 μM .

Las células fueron incubadas (a 37 °C y CO₂ al 5 %) con estos tratamientos durante 48 h, recogándose entonces 500 μl de medio condicionado para realizar las medidas. Del medio condicionado fueron eliminados los restos celulares mediante centrifugación a 300xg y después se añadió inhibidores de proteasas (Mini EDTA-free, Roche). Se midieron las dos especies más frecuentes de A β : 1-40 y 1-42. Para A β (1-42) fue necesario concentrar el medio 5 veces para realizar las medidas, utilizando el sistema de filtración Amicon Ultra (Millipore). Se analizó la cantidad de A β (1-40) y A β (1-42) del medio condicionado para cada tratamiento mediante ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), utilizando el kit "beta amyloid 40 ELISA" y "beta amyloid 42 ELISA" (Biosource), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los resultados se cuantificaron utilizando una curva de concentraciones crecientes con péptidos sintéticos. Los valores basales de A β secretado en estas células son de 1340 ± 141 pg/ml para A β (1-40) y de 20 ± 3 pg/ml para A β (1-42).

Los resultados obtenidos para los tratamientos se muestran en la Figura 35, en la que se muestra el porcentaje de A β (1–40) (A) y A β (1–42) (B) respecto a las células control a 48 h. Para A β (1–40) se obtiene una reducción tras el tratamiento con 10, 40 y 100 μ M de NST0037. Para A β (1–42) se obtuvo una reducción tanto a 10 como a 40 μ M de NST0037.

- 5 De estos resultados se concluye que NST0037 reduce la secreción de A β en células de neuroblastoma humano que sobreexpresan APP. La producción de A β se ha relacionado con muerte celular tanto in vitro como in vivo y, además, está asociado con las placas seniles que se encuentran en los enfermos de alzhéimer.

Ejemplo 14

Efecto del mevalonato sobre la protección por NST0037 frente a la muerte neuronal inducida por estrés oxidativo.

El ensayo fue realizado sobre células en cultivo de neuroblastoma humano SK-N-MC procedentes de “American Type Culture Collection (ATCC)”, en todos los casos se siguieron estrictas normas de esterilidad y la manipulación se llevó a cabo en cabinas de seguridad biológica clase II que siguen la norma europea EN 12469. Las células fueron mantenidas en el siguiente medio de cultivo: “Minimum Essential Medium Eagle” (MEM) suplementado con piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, gentamicina 0,05 mg/ml y suero fetal bovino al 10 %.

Se analizó el efecto del mevalonato sobre la protección producida por el compuesto NST0037 de la muerte celular causada por el tratamiento con xantina/xantina oxidasa que origina daño oxidativo y muerte celular. Estas células, en pase no superior a 15, fueron sembradas sobre placas de 96 pocillos tratadas para células adherentes con una concentración celular de 5×10^4 células/pocillo; para cada condición del ensayo se sembraron 3 pocillos de la placa.

Tras 24 h de incubación de las células a 37 °C y CO₂ al 5 % se procedió a los tratamientos celulares con 100 μ l de volumen total para las condiciones siguientes:

- Control: medio de cultivo
- Xantina/xantina oxidasa (XXO): medio más xantina 10 μ M/ xantina oxidasa 60 mU/ml, que produce la muerte del 50 % de las células.
- XXO más NST0037: medio más XXO (10 μ M / 60 mU/ml) más NST0037 a 40 μ M.
- XXO más mevalonato: medio más XXO (10 μ M / 60 mU/ml) más mevalonato a 10, 40 o 100 μ M.
- XXO más NST0037 más mevalonato: medio más XXO (10 μ M / 60 mU/ml) más NST0037 a 40 μ M más mevalonato a 10, 40 o 100 μ M.

Las células fueron incubadas (a 37 °C y CO₂ al 5 %) con los tratamientos durante 22 h, pasadas las cuales se añadió el reactivo WST-1 (Roche). El test WST-1 se basa en la medida de la actividad metabólica. El daño celular produce la pérdida de la habilidad de las células de obtener la energía necesaria para mantener sus funciones metabólicas y el crecimiento celular, por lo que las células que metabólicamente activas (vivas) reducen la sal de tetrazolium a formazán mediante el sistema succinato-tetrazolium reductasa (de la cadena respiratoria mitocondrial). El formazán formado puede ser detectado colorimétricamente, ya que tiene una absorbancia de 440 nm. A las 2 horas de añadido el reactivo se realizó la lectura en un lector de placas a 440 nm.

Los resultados obtenidos se muestran, como aparece en la Figura 36, como el porcentaje de muerte celular para cada tratamiento referido a la muerte producida por la XXO. Se observó que el mevalonato por sí solo no protege de la muerte por XXO, ni produce aumento de toxicidad, mientras que el NST0037 a 40 μ M protegió un 57 % de la muerte y este efecto fue inhibido por la adición de mevalonato a 10, 40 y 100 μ M, siendo las diferencias estadísticamente significativas, según el test t de Student, para 10 y 100 μ M. Estos resultados indican que la protección observada del compuesto NST0037 está relacionada con la biosíntesis del colesterol o de alguno de los precursores de la ruta.

Ejemplo 15

Protección por NST0037 de las huellas neuropatológicas asociadas a la muerte neuronal en el hipocampo

15.1. Efecto protector de NST0037 frente a la distrofia neurítica producida por una sustancia excitotóxica en el hipocampo

En base a los resultados de neuroprotección, los inventores decidieron averiguar si el efecto neuroprotector de NST0037 en el hipocampo demostrado en un modelo de enfermedad de Alzheimer esporádica en ratón mediante administración de kainato (KA) estaba acompañado de la protección de otro signo de daño neuronal como es la distrofia neurítica.

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron machos de 12 semanas de edad y de la cepa FVB/NHan. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986). Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

Veinticinco animales fueron utilizados en este ensayo y los tratamientos llevados a cabo, todos por vía intraperitoneal (i.p.) con un volumen de 100 µl, según las siguientes pautas:

i) Pauta PBS+PBS+PBS: 4 animales se trataron inicialmente con PBS con una dosis diaria durante 2 días, en el segundo día los animales fueron inoculados con una nueva dosis de PBS y durante los siguientes 7 días con una dosis diaria de PBS.

ii) Pauta NST0037+KA+NST0037: 7 animales se trataron inicialmente con una dosis diaria durante 2 días con NST0037 a 50 mg/kg, en el segundo día los animales fueron inoculados con una dosis de kainato a 25 mg/kg y durante los siguientes 7 días con una dosis diaria de NST0037 a 50 mg/kg.

iii) Pauta PBS+KA+PBS: 7 animales se trataron inicialmente con PBS con una dosis diaria durante 2 días, en el segundo día los animales fueron inoculados con una dosis de kainato a 25 mg/kg y durante los siguientes 7 días con una dosis diaria de PBS.

iv) Pauta PBS+KA+NST0037: 7 animales se trataron inicialmente con PBS con una dosis diaria durante 2 días, en el segundo día los animales fueron inoculados con una dosis de kainato a 25 mg/kg y durante los siguientes 7 días con una dosis diaria de NST0037 a 50 mg/kg.

Una vez concluido el tiempo de 7 días de tratamiento los animales fueron sacrificados y los encéfalos fueron diseccionados. Las muestras de encéfalo fueron procesadas e incluidas en parafina. Para el análisis de la distrofia neurítica en el hipocampo se realizó la inmunohistoquímica de campo claro contra la proteína asociada a microtúbulos tipo 2 (MAP2) en cortes coronales de 5 µm de grosor.

Como muestra la Figura 37, la pauta de administración PBS+KA+PBS produce una disminución del marcaje de MAP2 en especial en zonas de CA1, CA3 y giro dentado del hipocampo, respecto a la pauta de administración PBS+PBS+PBS que muestra un marcaje uniforme. Sin embargo, las muestras del grupo NST0037+KA+NST0037 presentaron un patrón de tinción igual a los controles (grupo PBS+PBS+PBS) sin evidencias de distrofia neurítica en estas regiones del hipocampo. Además, y de manera sorprendente, observamos que el tratamiento con NST0037 tras el pretratamiento con PBS y la inoculación de KA disminuye claramente la pérdida de marcaje de MAP2 en el hipocampo.

En resumen, el tratamiento con NST0037, tanto anterior como posterior a la inoculación de KA, protege de la distrofia neurítica producida por este en el hipocampo.

15.2. Efecto protector de NST0037 frente al daño oxidativo producido por una sustancia excitotóxica en el hipocampo

En base a los resultados de protección de la neurodegeneración y la distrofia neurítica, los inventores decidieron averiguar si el efecto neuroprotector de NST0037 en el hipocampo demostrado en un modelo de enfermedad de Alzheimer esporádica en ratón mediante administración de kainato (KA) estaba acompañado de la protección de otro signo de neurodegeneración asociado a la enfermedad como es el daño oxidativo.

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron machos de 12 semanas de edad y de la cepa FVB/NHan. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986). Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

Veinticinco animales fueron utilizados en este ensayo y los tratamientos llevados a cabo, todos por vía intraperitoneal (i.p.) con un volumen de 100 µl, según las siguientes pautas:

i) Pauta PBS+PBS+PBS: 4 animales se trataron inicialmente con PBS con una dosis diaria durante 2 días, en el segundo día los animales fueron inoculados con una nueva dosis de PBS y durante los siguientes 7 días con una dosis diaria de PBS.

ii) Pauta NST0037+KA+NST0037: 7 animales se trataron inicialmente con una dosis diaria durante 2 días con NST0037 a 50 mg/kg, en el segundo día los animales fueron inoculados con una dosis de kainato a 25 mg/kg y durante los siguientes 7 días con una dosis diaria de NST0037 a 50 mg/kg.

iii) Pauta PBS+KA+PBS: 7 animales se trataron inicialmente con PBS con una dosis diaria durante 2 días, en el segundo día los animales fueron inoculados con una dosis de kainato a 25 mg/kg y durante los siguientes 7 días con una dosis diaria de PBS.

iv) Pauta PBS+KA+NST0037: 7 animales se trataron inicialmente con PBS con una dosis diaria durante 2 días, en el segundo día los animales fueron inoculados con una dosis de kainato a 25 mg/kg y durante los siguientes 7 días con una dosis diaria de NST0037 a 50 mg/kg.

5 Una vez concluido el tiempo de 7 días de tratamiento los animales fueron sacrificados y los encéfalos fueron diseccionados. Las muestras de encéfalo fueron procesadas e incluidas en parafina. Para el análisis del daño oxidativo por peroxidación lipídica en el hipocampo se realizó la inmunohistoquímica de campo claro contra el 4-hidroxinonenal (HNE) en cortes coronales de 5 µm de grosor.

10 Como muestra la Figura 38, la pauta de administración PBS+KA+PBS produce un aumento de la señal de HNE en la región CA3 del hipocampo respecto a la pauta de administración PBS+PBS+PBS que no muestra este marcaje de peroxidación lipídica. Sin embargo, las muestras del grupo NST0037+KA+NST0037 presentaron un patrón de tinción igual a los controles (grupo PBS+PBS+PBS) sin neuronas marcadas con HNE en estas regiones del hipocampo. Además, y de manera sorprendente, observamos que el tratamiento con NST0037 tras el pretratamiento con PBS y la inoculación de KA reduce el número de neuronas con marcaje de HNE en el hipocampo.

15 En resumen, el tratamiento con NST0037, tanto anterior como posterior a la inoculación de KA, protege del daño oxidativo inducido por este en el hipocampo.

15.3. Efecto protector de NST0037 frente a la apoptosis producida por una sustancia excitotóxica en el hipocampo

20 En base a los anteriores resultados, los inventores decidieron averiguar si el efecto antioxidante de NST0037 en el hipocampo demostrado en un modelo de enfermedad de Alzheimer esporádica en ratón mediante administración de kainato (KA) estaba acompañado de la protección frente a la muerte por apoptosis, mecanismo que está asociado a la enfermedad.

25 Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron machos de 12 semanas de edad y de la cepa FVB/NHan. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986). Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

Veinticinco animales fueron utilizados en este ensayo y los tratamientos llevados a cabo, todos por vía intraperitoneal (i.p.) con un volumen de 100 µl, según las siguientes pautas:

30 i) Pauta PBS+PBS+PBS: 4 animales se trataron inicialmente con PBS con una dosis diaria durante 2 días, en el segundo día los animales fueron inoculados con una nueva dosis de PBS y durante los siguientes 7 días con una dosis diaria de PBS.

ii) Pauta NST0037+KA+NST0037: 7 animales se trataron inicialmente con una dosis diaria durante 2 días con NST0037 a 50 mg/kg, en el segundo día los animales fueron inoculados con una dosis de kainato a 25 mg/kg y durante los siguientes 7 días con una dosis diaria de NST0037 a 50 mg/kg.

35 iii) Pauta PBS+KA+PBS: 7 animales se trataron inicialmente con PBS con una dosis diaria durante 2 días, en el segundo día los animales fueron inoculados con una dosis de kainato a 25 mg/kg y durante los siguientes 7 días con una dosis diaria de PBS.

40 iv) Pauta PBS+KA+NST0037: 7 animales se trataron inicialmente con PBS con una dosis diaria durante 2 días, en el segundo día los animales fueron inoculados con una dosis de kainato a 25 mg/kg y durante los siguientes 7 días con una dosis diaria de NST0037 a 50 mg/kg.

45 Una vez concluido el tiempo de 7 días de tratamiento los animales fueron sacrificados y los encéfalos fueron diseccionados. Las muestras de encéfalo fueron procesadas e incluidas en parafina. Para el análisis de la presencia de neuronas en apoptosis en el hipocampo se realizó la técnica de T.U.N.E.L. (Marcación de la UTP final mediada por la transferasa desoxinucleotidil terminal del inglés *TdT-mediated dUTP nick end labelling*) de fluorescencia en cortes coronales de 5 µm de grosor.

50 La pauta de administración PBS+KA+PBS produce muerte neuronal por apoptosis en el hipocampo y en especial en las regiones CA1, CA3 (Figura 38) y giro dentado. Sin embargo, las muestras del grupo NST0037+KA+NST0037 no presentaron neuronas positivas para T.U.N.E.L. mostrando un patrón igual a los controles (grupo PBS+PBS+PBS). Adicionalmente, observamos que el tratamiento con NST0037 tras el pretratamiento con PBS y la inoculación de KA reduce el número de neuronas en apoptosis a unas pocas células aisladas en la región CA3 del hipocampo.

En resumen, el tratamiento con NST0037, tanto anterior como posterior a la inoculación de KA, protege del daño oxidativo y de la apoptosis inducida por este en las neuronas del hipocampo.

15.4. Efecto protector de NST0037 frente a la astrogliosis producida por una sustancia excitotóxica en el hipocampo

En base a los anteriores resultados, los inventores decidieron averiguar si el efecto antioxidante y antiapoptótico mostrado por el NST0037 en el hipocampo demostrado en un modelo de enfermedad de Alzheimer esporádica en ratón mediante administración de kainato (KA) estaba acompañado de la reducción de la astrogliosis reactiva, que es otra huella histopatológica que se detecta en el cerebro de pacientes de la enfermedad de Alzheimer.

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron machos de 12 semanas de edad y de la cepa FVB/NHan. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986). Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

Veinticinco animales fueron utilizados en este ensayo y los tratamientos llevados a cabo, todos por vía intraperitoneal (i.p.) con un volumen de 100 µl, según las siguientes pautas:

i) Pauta PBS+PBS+PBS: 4 animales se trataron inicialmente con PBS con una dosis diaria durante 2 días, en el segundo día los animales fueron inoculados con una nueva dosis de PBS y durante los siguientes 7 días con una dosis diaria de PBS.

ii) Pauta NST0037+KA+NST0037: 7 animales se trataron inicialmente con una dosis diaria durante 2 días con NST0037 a 50 mg/kg, en el segundo día los animales fueron inoculados con una dosis de kainato a 25 mg/kg y durante los siguientes 7 días con una dosis diaria de NST0037 a 50 mg/kg.

iii) Pauta PBS+KA+PBS: 7 animales se trataron inicialmente con PBS con una dosis diaria durante 2 días, en el segundo día los animales fueron inoculados con una dosis de kainato a 25 mg/kg y durante los siguientes 7 días con una dosis diaria de PBS.

iv) Pauta PBS+KA+NST0037: 7 animales se trataron inicialmente con PBS con una dosis diaria durante 2 días, en el segundo día los animales fueron inoculados con una dosis de kainato a 25 mg/kg y durante los siguientes 7 días con una dosis diaria de NST0037 a 50 mg/kg.

Una vez concluido el tiempo de 7 días de tratamiento los animales fueron sacrificados y los encéfalos fueron diseccionados. Las muestras de encéfalo fueron procesadas e incluidas en parafina. El análisis de la astrogliosis reactiva se realizó mediante la inmunohistoquímica de campo claro contra la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) en cortes coronales de 5 µm de grosor, la cual está presente en los astrocitos.

La pauta de administración PBS+KA+PBS produce un aumento significativo de la activación y propagación de astrocitos en el neuropilo del hipocampo (Figura 38). Por el contrario, las muestras del grupo NST0037+KA+NST0037 presentaron un patrón astrocítico muy similar al de los controles (grupo PBS+PBS+PBS). Sorprendentemente, también observamos que el tratamiento con NST0037 tras el pretratamiento con PBS y la inoculación de KA reduce el número de astrocitos y la intensidad del marcaje con GFAP en el hipocampo.

En resumen, el tratamiento con NST0037, tanto anterior como posterior a la inoculación de KA, protege del daño oxidativo, de la apoptosis y evita la astrogliosis reactiva inducida por este en la región del hipocampo.

Ejemplo 16

Protección por NST0037 frente a los síntomas clínicos, déficits locomotores, neurodegeneración y muerte neuronal causada por una neurotoxina parkinsoniana administrada de forma aguda

En base a los resultados de neuroprotección demostrada por el compuesto NST0037 en un modelo de enfermedad de Alzheimer esporádica en ratón, los investigadores decidieron evaluar la capacidad neuroprotectora del compuesto en un modelo de la enfermedad de Parkinson basado en la muerte de neuronas dopaminérgicas inducida por una sustancia neurotóxica como es el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). La inyección sistémica de MPTP en ratón induce una muerte masiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra, lo cual reduce la concentración de dopamina en esta región y en otras como el estriado que están muy vinculadas a la actividad locomotora en humanos. Debido a estos fenómenos este modelo ha sido ampliamente utilizado para el estudio de la enfermedad de Parkinson ya que reproduce uno de los eventos centrales en dicha enfermedad como es el deterioro motor. En este ejemplo se presentan los resultados del análisis del efecto de NST0037 frente a la neurodegeneración y los síntomas que induce el MPTP en una administración aguda.

16.1. Efecto protector de NST0037 frente a la muerte causada por la administración aguda de una sustancia neurotóxica que induce la muerte de las neuronas dopaminérgicas

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron machos de 12 semanas de edad y de la cepa CD1. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986). Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron

tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

Cuarenta animales fueron utilizados en este ensayo y los tratamientos llevados a cabo con un volumen de 100 µl, según las siguientes pautas:

- 5 i) Pauta PBS+PBS+PBS: 10 animales se trataron inicialmente con PBS con una dosis diaria durante 2 días por vía subcutánea (s.c.), en el segundo día los animales fueron inoculados con 4 dosis de PBS, a intervalos de 2 horas por vía intraperitoneal (i.p.). Durante los siguientes 7 días se les administró una dosis diaria de PBS por vía s.c.
- 10 ii) Pauta PBS+MPTP+PBS: 10 animales se trataron inicialmente con una dosis diaria durante 2 días de PBS por vía s.c., en el segundo día los animales fueron inoculados con 4 dosis de MPTP a 20 mg/kg, a intervalos de 2 horas por vía i.p. Durante los siguientes 7 días se les administró una dosis diaria de PBS por vía s.c.
- 15 iii) Pauta NST0037+MPTP+NST0037: 10 animales se trataron inicialmente con una dosis diaria durante 2 días de NST0037 a 50 mg/kg por vía s.c., en el segundo día los animales fueron inoculados con 4 dosis de MPTP a 20 mg/kg, a intervalos de 2 horas por vía i.p. Durante los siguientes 7 días se les administró una dosis diaria de NST0037 a 50 mg/kg por vía s.c.

Durante todo el procedimiento experimental fueron registradas las muertes en los distintos grupos de tratamiento, con estos datos se realizaron las correspondientes curvas de supervivencia que se presentan en la Figura 39.

- 20 La pauta de administración PBS+MPTP+PBS produce un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) de la mortalidad en los ratones. Sin embargo, y de forma sorprendente, el tratamiento con NST0037 promueve la supervivencia de los animales tras la administración aguda de MPTP ya que no se observaron diferencias significativas entre el grupo NST0037+MPTP+NST0037 y el grupo PBS+PBS+PBS ($p > 0,05$).

16.2. Efecto protector de NST0037 frente al declive en la resistencia motora causado por la administración aguda de una sustancia neurotóxica que induce la muerte de las neuronas dopaminérgicas

- 25 Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron machos de 12 semanas de edad y de la cepa CD1. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986). Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

- 30 Cuarenta animales fueron utilizados en este ensayo y los tratamientos llevados a cabo con un volumen de 100 µl, según las siguientes pautas:

- i) Pauta PBS+PBS+PBS: 10 animales se trataron inicialmente con PBS con una dosis diaria durante 2 días por vía subcutánea (s.c.), en el segundo día los animales fueron inoculados con 4 dosis de PBS, a intervalos de 2 horas por vía intraperitoneal (i.p.). Durante los siguientes 7 días se les administró una dosis diaria de PBS por vía s.c.
- 35 ii) Pauta PBS+MPTP+PBS: 10 animales se trataron inicialmente con una dosis diaria durante 2 días de PBS por vía s.c., en el segundo día los animales fueron inoculados con 4 dosis de MPTP a 20 mg/kg, a intervalos de 2 horas por vía i.p. Durante los siguientes 7 días se les administró una dosis diaria de PBS por vía s.c.
- 40 iii) Pauta NST0037+MPTP+NST0037: 10 animales se trataron inicialmente con una dosis diaria durante 2 días de NST0037 a 50 mg/kg por vía s.c., en el segundo día los animales fueron inoculados con 4 dosis de MPTP a 20 mg/kg, a intervalos de 2 horas por vía i.p. Durante los siguientes 7 días se les administró una dosis diaria de NST0037 a 50 mg/kg por vía s.c.

- 45 Antes del inicio de los tratamientos y una vez concluido el tiempo de 7 días de tratamiento les fue realizado a los animales un test de resistencia locomotora denominado test de Rotarod durante 2 minutos, registrando el tiempo que resistían los animales caminando por un cilindro que aumentaba su velocidad desde los 4 a los 40 r.p.m. En la figura 40 se muestra la ratio, entre el final del ensayo y el estado basal, del tiempo que los animales de los diferentes grupos se mantienen caminando sobre el cilindro.

- 50 La pauta de administración PBS+MPTP+PBS produce una disminución estadísticamente significativa de la resistencia motora en los ratones desde su estado basal hasta 7 días después de la administración aguda del MPTP ($p < 0,05$). Sin embargo, sorprendentemente, el tratamiento con NST0037 evita el deterioro motor de los animales manteniendo la resistencia de los ratones en el nivel que mostraban antes de la administración del MPTP ($p > 0,05$), patrón que es igual al de los ratones no inyectados con MPTP y tratados con PBS ($p > 0,05$).

En resumen, el tratamiento con NST0037 protege de la pérdida de resistencia inducida por la administración aguda de MPTP.

16.2. Efecto protector de NST0037 frente a la disminución de la fuerza causada por la administración aguda de una sustancia neurotóxica que induce la muerte de las neuronas dopaminérgicas

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron machos de 12 semanas de edad y de la cepa CD1. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986). Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

Cuarenta animales fueron utilizados en este ensayo y los tratamientos llevados a cabo con un volumen de 100 µl, según las siguientes pautas:

i) Pauta PBS+PBS+PBS: 10 animales se trataron inicialmente con PBS con una dosis diaria durante 2 días por vía subcutánea (s.c.), en el segundo día los animales fueron inoculados con 4 dosis de PBS, a intervalos de 2 horas por vía intraperitoneal (i.p.). Durante los siguientes 7 días se les administró una dosis diaria de PBS por vía s.c.

ii) Pauta PBS+MPTP+PBS: 10 animales se trataron inicialmente con una dosis diaria durante 2 días de PBS por vía s.c., en el segundo día los animales fueron inoculados con 4 dosis de MPTP a 20 mg/kg, a intervalos de 2 horas por vía i.p. Durante los siguientes 7 días se les administró una dosis diaria de PBS por vía s.c.

iii) Pauta NST0037+MPTP+NST0037: 10 animales se trataron inicialmente con una dosis diaria durante 2 días de NST0037 a 50 mg/kg por vía s.c., en el segundo día los animales fueron inoculados con 4 dosis de MPTP a 20 mg/kg, a intervalos de 2 horas por vía i.p. Durante los siguientes 7 días se les administró una dosis diaria de NST0037 a 50 mg/kg por vía s.c.

Antes del inicio de los tratamientos y una vez concluido el tiempo de 7 días de tratamiento les fue realizado a los animales un test de fuerza en las denominado test de fuerza de agarre, registrando la fuerza de agarre a una barra en gramos que realizaban los animales con las patas delanteras por quintuplicado. En la figura 41 se muestra la ratio, entre la fuerza mostrada por los animales al final del ensayo respecto la del estado basal.

La pauta de administración PBS+MPTP+PBS produce una disminución estadísticamente significativa de la fuerza que los ratones ejercen al agarrarse con las patas delanteras desde su estado basal hasta 7 días después de la administración aguda del MPTP ($p < 0,05$). Además, el tratamiento con NST0037 evita la pérdida de fuerza que induce el MPTP y tras 7 días de tratamiento los ratones del grupo NST0037+MPTP+NST0037 muestran unos niveles de fuerza iguales a los de antes de la administración del MPTP ($p > 0,05$), patrón que es muy similar al de los ratones no inyectados con MPTP y tratados con PBS ($p > 0,05$).

En resumen, el tratamiento con NST0037 protege de la pérdida de resistencia y de fuerza inducida por la administración aguda de MPTP.

16.3. Efecto protector de NST0037 frente a la neurodegeneración causada por la administración aguda de una sustancia neurotóxica que induce la muerte de las neuronas dopaminérgicas

Basándose en los resultados anteriores, los inventores quisieron determinar si la protección que mostraba el compuesto NST0037 frente al deterioro del estado psicomotor producido por el MPTP, se veía acompañado de la neurodegeneración en regiones del cerebro implicadas en la actividad locomotora, y relacionadas con la enfermedad de Parkinson como son la sustancia nigra y el estriado.

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron machos de 12 semanas de edad y de la cepa CD1. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986). Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

Cuarenta animales fueron utilizados en este ensayo y los tratamientos llevados a cabo con un volumen de 100 µl, según las siguientes pautas:

i) Pauta PBS+PBS+PBS: 10 animales se trataron inicialmente con PBS con una dosis diaria durante 2 días por vía subcutánea (s.c.), en el segundo día los animales fueron inoculados con 4 dosis de PBS, a intervalos de 2 horas por vía intraperitoneal (i.p.). Durante los siguientes 7 días se les administró una dosis diaria de PBS por vía s.c.

ii) Pauta PBS+MPTP+PBS: 10 animales se trataron inicialmente con una dosis diaria durante 2 días de PBS por vía s.c., en el segundo día los animales fueron inoculados con 4 dosis de MPTP a 20 mg/kg, a intervalos de 2 horas por vía i.p. Durante los siguientes 7 días se les administró una dosis diaria de PBS por vía s.c.

iii) Pauta NST0037+MPTP+NST0037: 10 animales se trataron inicialmente con una dosis diaria durante 2 días de NST0037 a 50 mg/kg por vía s.c., en el segundo día los animales fueron inoculados con 4 dosis de MPTP a

20 mg/kg, a intervalos de 2 horas por vía i.p. Durante los siguientes 7 días se les administró una dosis diaria de NST0037 a 50 mg/kg por vía s.c.

Una vez concluido el tiempo de 7 días de tratamiento los animales fueron sacrificados y los encéfalos fueron diseccionados. Las muestras de encéfalo fueron procesadas e incluidas en parafina. Para el análisis de la neurodegeneración en la sustancia nigra y del estriado se realizó la tinción fluorescente de Fluoro Jade B (FJB) en cortes sagitales de 5 µm de grosor. En la figura 42 se muestra una fotografía representativa de cada grupo y en ambas zonas bajo estudio.

La pauta de administración PBS+MPTP+PBS produce un claro aumento de las células positivas para FJB tanto en la sustancia nigra como en el estriado respecto a las muestras del grupo PBS+PBS+PBS. En contraste, las muestras del grupo NST0037+MPTP+NST0037 presentaron un número de células en degeneración y positivas para FJB significativamente menor a las del grupo PBS+MPTP+PBS.

En resumen, el tratamiento con NST0037 protege frente al deterioro psicomotor y de la neurodegeneración, inducida por la administración aguda de MPTP, en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra, así como de las terminaciones nerviosas que inervan el estriado.

16.4. Efecto protector de NST0037 frente a la pérdida de neuronas dopaminérgicas por la administración aguda de una sustancia neurotóxica

Basándose en los resultados anteriores, los inventores quisieron determinar si la protección que mostraba el compuesto NST0037 frente a la neurodegeneración producida por el MPTP, se veía acompañada de la protección de neuronas dopaminérgicas en regiones del cerebro deterioradas en la enfermedad de Parkinson como son la sustancia nigra y el estriado.

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron machos de 12 semanas de edad y de la cepa CD1. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986). Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

Cuarenta animales fueron utilizados en este ensayo y los tratamientos llevados a cabo con un volumen de 100 µl, según las siguientes pautas:

i) Pauta PBS+PBS+PBS: 10 animales se trataron inicialmente con PBS con una dosis diaria durante 2 días por vía subcutánea (s.c.), en el segundo día los animales fueron inoculados con 4 dosis de PBS, a intervalos de 2 horas por vía intraperitoneal (i.p.). Durante los siguientes 7 días se les administró una dosis diaria de PBS por vía s.c.

ii) Pauta PBS+MPTP+PBS: 10 animales se trataron inicialmente con una dosis diaria durante 2 días de PBS por vía s.c., en el segundo día los animales fueron inoculados con 4 dosis de MPTP a 20 mg/kg, a intervalos de 2 horas por vía i.p. Durante los siguientes 7 días se les administró una dosis diaria de PBS por vía s.c.

iii) Pauta NST0037+MPTP+NST0037: 10 animales se trataron inicialmente con una dosis diaria durante 2 días de NST0037 a 50 mg/kg por vía s.c., en el segundo día los animales fueron inoculados con 4 dosis de MPTP a 20 mg/kg, a intervalos de 2 horas por vía i.p. Durante los siguientes 7 días se les administró una dosis diaria de NST0037 a 50 mg/kg por vía s.c.

Una vez concluido el tiempo de 7 días de tratamiento los animales fueron sacrificados y los encéfalos fueron diseccionados. Las muestras de encéfalo fueron procesadas e incluidas en parafina. Para el análisis de la presencia de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra y del estriado se realizó la inmunohistoquímica contra la proteína tirosina-hidroxilasa (TH) en cortes sagitales de 5 µm de grosor. En la figura 43 se muestra una fotografía representativa de cada grupo y en ambas zonas bajo estudio.

La pauta de administración PBS+MPTP+PBS produce una evidente disminución de la cantidad de neuronas dopaminérgicas ya que se detecta una ausencia clara de marcaje con TH en comparación con el grupo PBS+PBS+PBS, tanto en los cuerpos neuronales de la sustancia nigra como en las extensiones nerviosas en el estriado. En cambio, las muestras del grupo NST0037+MPTP+NST0037 presentaron un mayor número de células TH-positivas en la sustancia nigra así como una mayor intensidad de marcaje en el estriado que las del grupo PBS+MPTP+PBS.

En resumen, el tratamiento con NST0037 protege frente al deterioro psicomotor de los ratones, además de la neurodegeneración y de la muerte neuronal inducida por la administración aguda de MPTP, en la sustancia nigra y el estriado.

Ejemplo 17

Protección por NST0037 frente a los déficits locomotores, muerte neuronal y daño oxidativo causado por una neurotoxina parkinsoniana administrada de forma subcrónica

Debido a los resultados obtenidos y presentados en el Ejemplo 16 los inventores decidieron analizar el efecto del NST0037 en los síntomas clínicos y en la neuropatología inducida en la sustancia nigra por la administración subcrónica del MPTP en ratón.

17.1. Efecto protector de NST0037 frente al declive en la resistencia motora causado por la administración subcrónica de una sustancia neurotóxica que induce la muerte de las neuronas dopaminérgicas

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron machos de 12 semanas de edad y de la cepa CD1. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986). Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

Veinte animales fueron utilizados en este ensayo y los tratamientos, todos por vía intraperitoneal, fueron llevados a cabo con un volumen de 100 µl, según las siguientes pautas:

i) Pauta PBS+MPTP+PBS: 10 animales se trataron inicialmente con una dosis diaria durante 2 días de PBS, a partir del segundo día los animales fueron inoculados con 1 dosis diaria de MPTP a 30 mg/kg durante 5 días, a intervalos de 2 horas por vía i.p. Durante los siguientes 21 días se les administró 3 dosis semanales de PBS.

ii) Pauta NST0037+MPTP+NST0037: 10 animales se trataron inicialmente con una dosis diaria durante 2 días de NST0037 a 50 mg/kg, a partir del segundo día los animales fueron inoculados con 1 dosis diaria de MPTP a 30 mg/kg durante 5 días, a intervalos de 2 horas por vía i.p. Durante los siguientes 21 días se les administró 3 dosis semanales de NST0037 a 50 mg/kg.

Siete días antes del inicio de los tratamientos y a los 7, 14 y 21 días post-inoculación del MPTP les fue realizado a los animales un test de resistencia locomotora denominado test de Rotarod durante 2 minutos, registrando el tiempo que resistían los animales caminando por un cilindro que aumentaba su velocidad desde los 4 a los 40 r.p.m. En la figura 44 se muestra la ratio, entre los diferentes puntos temporales del ensayo y el estado basal, del tiempo que los animales de los diferentes grupos se mantienen caminando sobre el cilindro.

La pauta de administración PBS+MPTP+PBS produce una disminución estadísticamente significativa de la resistencia motora en los ratones desde su estado basal a partir de los 14 días después de la administración subcrónica del MPTP ($p < 0,05$). Sin embargo, sorprendentemente, el tratamiento con NST0037 evita el deterioro motor de los animales manteniendo la resistencia de los ratones en el nivel que mostraban antes de la administración del MPTP ($p > 0,05$).

En resumen, el tratamiento con NST0037 protege de la pérdida de resistencia inducida por la administración subcrónica de MPTP.

17.2. Efecto protector de NST0037 frente a la pérdida de neuronas dopaminérgicas por la administración subcrónica de una sustancia neurotóxica

Basándose en los resultados anteriores, los inventores quisieron determinar si la protección que mostraba el compuesto NST0037 frente al deterioro del estado psicomotor producido por el MPTP, se veía acompañada de neurodegeneración en una de las regiones más importantes del cerebro que está implicada en la enfermedad de Parkinson como es la sustancia nigra.

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron machos de 12 semanas de edad y de la cepa CD1. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986). Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

Veinte animales fueron utilizados en este ensayo y los tratamientos, todos por vía intraperitoneal, fueron llevados a cabo con un volumen de 100 µl, según las siguientes pautas:

i) Pauta PBS+MPTP+PBS: 10 animales se trataron inicialmente con una dosis diaria durante 2 días de PBS, a partir del segundo día los animales fueron inoculados con 1 dosis diaria de MPTP a 30 mg/kg durante 5 días, a intervalos de 2 horas por vía i.p. Durante los siguientes 21 días se les administró 3 dosis semanales de PBS.

ii) Pauta NST0037+MPTP+NST0037: 10 animales se trataron inicialmente con una dosis diaria durante 2 días de NST0037 a 50 mg/kg, a partir del segundo día los animales fueron inoculados con 1 dosis diaria de MPTP a 30 mg/kg durante 5 días, a intervalos de 2 horas por vía i.p. Durante los siguientes 21 días se les administró 3 dosis semanales de NST0037 a 50 mg/kg.

Una vez concluido el tiempo de 21 días de tratamiento los animales fueron sacrificados y los encéfalos fueron diseccionados. Las muestras de encéfalo fueron procesadas e incluidas en parafina. Para el análisis de la presencia de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra se realizó la inmunohistoquímica contra la proteína tirosina-hidroxilasa (TH) en cortes sagitales de 5 µm de grosor. En la Figura 45 se muestra una fotografía representativa de cada grupo.

La pauta de administración PBS+MPTP+PBS produce una evidente pérdida de neuronas dopaminérgicas ya que observamos una ausencia clara de marcaje con TH en algunas regiones de la sustancia nigra. En cambio, las muestras del grupo NST0037+MPTP+NST0037 presentaron un mayor número de células TH-positivas en la misma región de la sustancia nigra.

En resumen, el tratamiento con NST0037 protege frente al deterioro psicomotor de los ratones, además de la muerte neuronal inducida en la sustancia nigra por la administración subcrónica de MPTP.

17.3. Efecto protector de NST0037 frente al daño oxidativo inducido por la administración subcrónica de una sustancia neurotóxica para las neuronas dopaminérgicas

Basándose en los resultados anteriores, los inventores quisieron determinar si la neuroprotección mostrada por el compuesto NST0037 frente a la neurodegeneración producida por el MPTP en la sustancia nigra se veía acompañada de la reducción de otra huella histopatológica del daño neuronal como es el daño oxidativo.

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron machos de 12 semanas de edad y de la cepa CD1. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986). Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

Veinte animales fueron utilizados en este ensayo y los tratamientos, todos por vía intraperitoneal, fueron llevados a cabo con un volumen de 100 µl, según las siguientes pautas:

i) Pauta PBS+MPTP+PBS: 10 animales se trataron inicialmente con una dosis diaria durante 2 días de PBS, a partir del segundo día los animales fueron inoculados con 1 dosis diaria de MPTP a 30 mg/kg durante 5 días, a intervalos de 2 horas por vía i.p. Durante los siguientes 21 días se les administró 3 dosis semanales de PBS.

ii) Pauta NST0037+MPTP+NST0037: 10 animales se trataron inicialmente con una dosis diaria durante 2 días de NST0037 a 50 mg/kg, a partir del segundo día los animales fueron inoculados con 1 dosis diaria de MPTP a 30 mg/kg durante 5 días, a intervalos de 2 horas por vía i.p. Durante los siguientes 21 días se les administró 3 dosis semanales de NST0037 a 50 mg/kg.

Una vez concluido el tiempo de 21 días de tratamiento los animales fueron sacrificados y los encéfalos fueron diseccionados. Las muestras de encéfalo fueron procesadas e incluidas en parafina. Para el análisis de la peroxidación lipídica en las neuronas de la sustancia nigra se realizó la inmunohistoquímica de campo claro contra el 4-hidroxinonenal (HNE) en cortes sagitales de 5 µm de grosor. En la Figura 45 se muestra una fotografía representativa de cada grupo.

La pauta de administración PBS+MPTP+PBS induce la presencia de marcaje contra HNE en numerosas neuronas de la sustancia nigra. En contraste, las muestras del grupo NST0037+MPTP+NST0037 presentan un número discreto de neuronas aisladas con marcaje HNE-positivo en la sustancia nigra.

En resumen, el tratamiento con NST0037 protege frente al deterioro psicomotor de los ratones, además de la muerte neuronal y del daño oxidativo por peroxidación lipídica inducido en la sustancia nigra por la administración sub-crónica de MPTP.

Ejemplo 18

Estudio del paso de barrera hematoencefálica de la forma ácida de NST0037 en un ensayo in vitro (PAMPA)

El ensayo tuvo por objeto predecir si el compuesto NST0037, en comparación con la simvastatina y la atorvastatina, en sus formas activas, eran capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) para lo cual, dicha barrera se mimetizó en un sistema *in vitro* que permitió la evaluación del compuesto sin empleo de células. Para ello, se llevó a cabo el denominado ensayo PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeation Assay*), que emplea un sistema sándwich que contempla el paso de compuestos por medio de difusión pasiva. Como control positivo se empleó verapamilo, un compuesto de elevada permeabilidad, mientras que como control negativo se empleó teofilina, un compuesto que no atraviesa BHE.

Para mimetizar la BHE se hizo uso de una mezcla de lípidos comercial derivada de cerebro de cerdo con una composición de fosfolípidos muy semejante a la que constituye la barrera, y que se denomina PBL (*Porcine Polar Brain Lipid*). El verapamilo, la teofilina y la atorvastatina se prepararon a 10 mM en DMSO, mientras que el NST0037 y la simvastatina se prepararon en agua y se activaron con NaOH 0,1 N a 4 °C durante 12h.

En el momento del ensayo, se preparó 1,5 ml de los compuestos a evaluar y de los controles, en todos los casos a 100 µM a partir de los *stocks* en un tampón fosfato a pH 7,4 que contenía fosfato sódico monobásico (0,41 M) y fosfato potásico dibásico (0,287 M). Para ello se llevó a cabo una dilución 1/100 de los compuestos, igualando el contenido de DMSO al 1 % en todos los casos.

- 5 En una placa con filtro de 96 pocillos, con una membrana de PVDF, con un tamaño de poro de 45 µm (MAIPN4550, Millipore) se añadieron 5 µl de PBL a 20 µg/ml. Transcurridos dos minutos, se añadieron 300 µl del tampón fosfato empleado para diluir los compuestos. Esta placa se consideró la placa aceptora y se situó en la parte superior del sándwich. Sobre otra placa de 96 pocillos que ensamblaba perfectamente con la anterior (MATRNP550 de Millipore) se añadieron 300 µl de los compuestos a 100 µM y por triplicado. Además, se incluyó un blanco que incluía únicamente el DMSO al 1 % en el tampón fosfato empleado. Esta placa se denominó placa donadora. La placa aceptora fue situada cuidadosamente sobre la placa donadora formando el sistema sándwich. Los compuestos objeto de estudio difundieron desde los pocillos de la placa donadora a los pocillos correspondientes de la placa aceptora durante las 18 h en las que el sistema se mantuvo intacto. El compuesto restante preparado se conservó en las mismas condiciones de humedad, temperatura y oscuridad que el sistema sándwich constituido por las placas. Transcurrido este tiempo, 100 µl de los pocillos de las placas donadoras y de las aceptoras se transvasaron a una placa de 96 pocillos especial para lectura al UV. Además, se transvasaron 100 µl, por triplicado, de los compuestos preparados para la realización del ensayo y conservados de modo igual a las placas (pocillos basales). La placa UV se introdujo en un espectrofotómetro en el cual se llevó a cabo un *scan* en el UV desde 230 a 498 nm, con lecturas cada 4 nm. A partir de los datos del espectrofotómetro se calculó el porcentaje de paso de barrera así como la permeabilidad efectiva (P_e). Para calcular la P_e , se aplicó la siguiente fórmula:

$$P_e = C \times -\ln \left(1 - \frac{[\text{Fármaco}]_{\text{aceptor}}}{[\text{Fármaco}]_{\text{equilibrio}}} \right)$$

Donde:

$$C = \frac{V_D \times V_A}{(V_D \times V_A) \times \text{Área} \times \text{Tiempo}}$$

- 25 $[\text{Fármaco}]_{\text{aceptor}}$ = Absorbancia del pocillo aceptor

$[\text{Fármaco}]_{\text{equilibrio}}$ = Absorbancia de la media de los pocillos basales / 2

V_A = Volumen del pocillo aceptor = 0,3 cm³

V_D = Volumen del pocillo donador = 0,3 cm³

Área = 0,24 cm²

- 30 Tiempo = 64.000 s

El cálculo teórico de la lipofilicidad de un compuesto se puede obtener calculando el logaritmo del coeficiente de partición octanol/agua, que viene dado por cLogP. cLogP se calculó teóricamente mediante el programa CLOGP (OSIRIS Property Explorer) introduciendo las estructuras químicas en el software. La n para cada compuesto viene indicada en la tabla junto con los resultados numéricos de la media±DE de los valores obtenidos en el ensayo.

- 35 Tabla I

	% Paso BHE	P_e (cm/s)	n	cLogP
Simvastatina	25,6±9,0	4,0±1,7 x 10 ⁻⁶	21	4,61
Atorvastatina	4,9±2,0	0,5±0,2 x 10 ⁻⁶	9	5,55
NST0037	22,5±5,5	3,1±1,2 x 10 ⁻⁶	33	4,55

- 40 Como se puede observar en la Tabla I y en la Figura 46, tanto la simvastatina como el NST0037 presentaron un índice de paso de BHE muy similar. En ambos casos, se prevee para estos compuestos un paso de BHE intermedio entre el verapamilo ($P_e=10\pm2 \times 10^{-6}$ cm/s) y la teofilina ($P_e=0,2\pm0,1 \times 10^{-6}$ cm/s). Estos datos de paso de BHE vienen confirmados por el rango de lipofilicidad, mostrando por ambos compuestos, y que presentan una cLogP muy parecida. Sin embargo, la atorvastatina, a pesar de presentar una elevada cLogP, apenas atraviesa BHE, haciéndolo en el mismo rango que lo hace el control negativo, la teofilina.

Ejemplo 19**Efecto de NST0037 sobre los niveles intracelulares de colesterol total en líneas celulares humanas hepáticas y neuronales**

5 El ensayo tuvo por objeto determinar en qué grado el compuesto NST0037 en comparación con la simvastatina, era capaz de modificar los niveles de colesterol total en líneas celulares de origen neuronal y hepático. Para llevar a cabo este ensayo, los compuestos se activaron con NaOH hasta la apertura completa de la forma lactona.

10 Tanto la línea Hep G2 (hepatocarcinoma humano) como la línea SK-N-MC (neuroblastoma humano) se obtuvieron de Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC n.º HB-8065 y HTB-10 respectivamente). En todos los casos se siguieron estrictas normas de esterilidad y la manipulación se llevó a cabo en cabinas de seguridad biológica clase II que siguen la norma europea EN 12469. Las células mantenidas en pase se sembraron en placas de 96 pocillos en MEM suplementado con FBS al 10 %, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato sódico, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales y 0,05 mg/ml de gentamicina. En el caso de las HepG2 se sembraron 4×10^4 células/pocillo y en el caso de las SK-N-MC 5×10^4 células/pocillo. Transcurridas 24 h de la siembra, las células fueron desprovistas de FBS durante 8h. Seguidamente, las células fueron incubadas con los tratamientos a diversas concentraciones durante 20h. Tras el periodo de incubación, las células se lavaron con PBS y se lisaron con un tampón fosfato con tritón X-100 al 0,5 %. La lisis se completó mediante una doble congelación-descongelación.

20 La cuantificación de colesterol total se llevó a cabo mediante técnicas enzimáticas y fluorométricas. 25 µl de cada lisado se transvasaron a una placa de 96 pocillos junto con una curva patrón de colesterol que partía de 10 µg/ml hasta 0,08 µg/ml. Sobre las muestras se añadieron 75 µl de la mezcla reactiva preparada a base de MES 0,05 M (pH 6,5) conteniendo colesterol oxidasa (0,5 U/ml), colesterol esterasa (0,8 U/ml), peroxidasa de rábano (4 U/ml) y ampliflu red (20 µg/ml) y se incubó 15 minutos a 37 °C. La intensidad de fluorescencia se determinó a 530 nm de excitación y 580 nm de emisión mediante un fluorímetro. Los resultados fueron normalizados por proteína la cual se determinó mediante la técnica del BCA.

25 En la Figura 47 se puede apreciar como el NST0037 presentó un efecto hipocolesterolémico en ambos tipos celulares, si bien fue en las células neuronales donde las reducciones de colesterol fueron más drásticas. En el caso de HepG2, NST0037 resultó ser más potente que la simvastatina, mientras que en SK-N-MC, las reducciones de colesterol con ambos compuestos fueron semejantes.

Ejemplo 20**Efecto hipocolesterolémico de NST0037 administrado oralmente durante 28 días en un modelo de hiperlipidemia endógena (familiar)**

30 En base a los resultados presentados previamente sobre el carácter hipocolesterolémico del compuesto NST0037, los investigadores decidieron evaluar el efecto de la administración oral y en el tiempo de NST0037 en el mismo modelo de hiperlipidemia endógena familiar (ratones apoB100) que se había empleado en el Ejemplo 5.2. El objetivo de este nuevo estudio fue analizar si la administración oral prolongada es eficaz para disminuir los niveles de colesterol en el tiempo.

35 Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron ratones hembra de 12 semanas de edad. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante los tratamientos y manipulaciones.

40 Los ratones fueron divididos en tres grupos: grupo control (n=8); grupo simvastatina (n=8); grupo NST0037 (n=8). Tras un acondicionamiento a la dieta, a los ratones se les administró oralmente y a la misma hora (15.00 a 18.00 h) durante 28 días consecutivos 50 mg/kg de simvastatina o NST0037 (en sus formas lactonas), empleando un vehículo. Antes de iniciar los tratamientos y a los 7, 21 y 28 días de iniciar los mismos, se llevaron a cabo extracciones de sangre retro-orbital previo ayuno de 16h. De dicha sangre se obtuvo el plasma donde se evaluaron los niveles de colesterol total (CT), colesterol libre (CL), colesterol (CE), c-HDL, c-LDL, c-VLDL y apoB100 por técnicas enzimáticas y espectrofotométricas. Para comprobar si el efecto a nivel de lípidos implicaba una alteración del estrés oxidativo, se evaluó además el estado redox en los plasmas obtenidos mediante la técnica del TEAC ("Trolox Antioxidant Capacity Assay"). Esta técnica, determina la capacidad antioxidante in vitro dando una idea del estado redox de la muestra analizada mediante la capacidad de absorbancia por transferencia de electrones. A los plasmas diluidos 1/10 en PBS (10 µl), se les añadió en una placa de 96 pocillos los diferentes componentes de la reacción, mioglobina, ABTS (ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-sulfónico), peróxido de hidrógeno y H₂O₂. Tras 3 minutos de incubación, la absorbancia se midió a 405 nm (con una referencia de 600 nm).

55 En la Figura 48 se puede observar que ambos tratamientos son capaces de disminuir de manera significativa los niveles plasmáticos de colesterol total. Este hecho se manifiesta principalmente en una disminución de VLDL y HDL además de en un menor incremento de LDL. Además, los niveles de la apolipoproteína B (apoB) fueron visiblemente disminuidos por los tratamientos. En la Figura 49 se muestran además la disminución de los niveles

de CL y CE tras los tratamientos con el compuesto NST0037 en comparación con la simvastatina, siendo esta reducción más acusada a partir de los 21 días de tratamiento. Adicionalmente se demostró, como se presenta en la Figura 50, que los tratamientos con NST0037 y con simvastatina disminuyen el estado redox de los plasmas de los animales.

- 5 En resumen, el tratamiento con NST0037 durante 28 días mediante administración oral a ratones con hiperlipidemia congénita produce una disminución de los niveles de colesterol total, esterificado, libre, de todas las fracciones lipoprotéicas asociadas al colesterol, de los niveles de ApoB y del estado redox de los animales.

Ejemplo 21

10 **Efecto hipocolesterolémico de NST0037 administrado oralmente durante tres meses en un modelo de hiperlipidemia endógena (familiar)**

En base a los resultados presentados previamente sobre el carácter hipocolesterolémico del compuesto NST0037, los investigadores decidieron evaluar el efecto de la administración oral durante 3 meses de NST0037 en el mismo modelo de hiperlipidemia endógena familiar (ratones apoB100).

- 15 Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron ratones hembra de 6 meses de edad. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante los tratamientos y manipulaciones.

- 20 Los animales fueron divididos en tres grupos: grupo control (n = 8); grupo simvastatina (n = 6); grupo NST0037 (n = 8). Tras un acondicionamiento a la dieta, a los ratones se les administró oralmente durante 3 meses 50 mg/kg de NST0021 o NST0037, tres veces semanales, empleando en ambos casos como vehículo carboximetilcelulosa al 0,25 % en suero salino fisiológico. El grupo control recibió este mismo vehículo. Antes de iniciar los tratamientos y a los uno, dos y tres meses de iniciar el mismo, se llevó a cabo una extracción de sangre retro-orbital previo ayuno de 16h. De dicha sangre se obtuvo el plasma donde se evaluaron los niveles de colesterol total, colesterol libre (CL), colesterol (CE), c-HDL, c-LDL y c-VLDL por técnicas enzimáticas y espectrofotométricas.

- 25 En la Figura 51 se puede observar como ambos tratamientos disminuyeron las diferentes fracciones de colesterol. No obstante, y de forma sorprendente, NST0037 disminuyó en mayor medida los niveles de c-LDL y aumentó los de c-HDL, mostrando así un mejor perfil cardioprotector que la simvastatina. Estos resultados se correlacionaron con los efectos de los tratamientos sobre los niveles de CL y CE (Figura 52), y donde se apreció que el NST0037 produce una disminución significativa tanto de CL como de CE.

- 30 En resumen, el tratamiento con NST0037 durante 3 meses mediante administración oral a ratones con hiperlipidemia congénita produce una disminución de los niveles de colesterol total, esterificado, libre, así como una disminución de los niveles de c-LDL y un aumento del c-HDL, lo que demuestra su poder cardioprotector.

Ejemplo 22

Efecto hipolipemiante de NST0037 en ratas Zucker genéticamente obesas

- 35 En base a los resultados presentados previamente sobre el carácter hipocolesterolémico del compuesto NST0037 en ratones, los investigadores decidieron evaluar el efecto de la administración oral durante 7 días de NST0037 en un modelo de hiperlipidemia endógena en ratas Zucker genéticamente obesas, con niveles de lípidos anormalmente elevados.

- 40 Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron ratas Zucker macho de 11 semanas de edad. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante los tratamientos y manipulaciones.

- 45 Los animales fueron divididos en tres grupos: grupo control (n = 7); grupo simvastatina (n = 7); grupo NST0037 (n = 7). Tras un acondicionamiento a la dieta, a las ratas se les administró oralmente y a la misma hora (15.00 a 18.00h) durante 7 días consecutivos 30 mg/kg de NST0021 o NST0037, empleando en ambos casos como vehículo carboximetilcelulosa al 0,5 % en agua. El grupo control recibió este mismo vehículo. Antes de iniciar los tratamientos y a los 7 días del mismo se extrajo sangre por punción lingual bajo anestesia previo ayuno de 16h. De dicha sangre se obtuvo el plasma donde se evaluaron los niveles de colesterol total, c-HDL, c-LDL, c-VLDL, y triglicéridos (TG) por técnicas enzimáticas y espectrofotométricas. Para comprobar si el efecto a nivel de lípidos implicaba una alteración del estrés oxidativo, se evaluó además el estado redox en los plasmas obtenidos mediante la técnica del TEAC (*Trolox Antioxidant Capacity Assay*). Esta técnica, determina la capacidad antioxidante in vitro dando una idea del estado redox de la muestra analizada mediante la capacidad de absorbancia por transferencia de electrones. A los plasmas diluidos 1/10 en PBS (10 µl), se les añadió en una
- 55 placa de 96 pocillos los diferentes componentes de la reacción, mioglobina, ABTS [ácido 2,2-azino-bis-(3-

etilbenztiazolin-sulfónico)] y peróxido de hidrógeno. Tras 3 minutos de incubación, la absorbancia se midió a 405 nm (con una referencia de 600 nm).

En la Figura 53 se puede apreciar que tanto la simvastatina como el NST0037 fueron capaces de disminuir igualmente los niveles plasmáticos de LDL, hecho directamente relacionado con la inhibición de la actividad HMGR, que lleva a un aumento de expresión de receptores LDL. En este caso, el efecto de NST0037 alcanzó significación estadística. Además, ambos compuestos produjeron un aumento de HDL, lo que implica un efecto cardioprotector. En la Figura 54 se observa como los compuestos disminuyeron los niveles de triglicéridos plasmáticos, lo que indica un efecto hipotrigliceridémico. Además, mientras que en las ratas control se produjo un incremento del estrés oxidativo (Figura 55), determinado por medio del estado redox en plasma mediante TEAC, en las ratas tratadas con simvastatina y NST0037 se produjo una drástica disminución, lo que indica un efecto antioxidante. En este caso, los resultados fueron estadísticamente significativos solo en el caso de NST0037.

En resumen, el tratamiento con NST0037 durante 7 días mediante administración oral a ratas Zucker genéticamente obesas con hiperlipidemia endógena produjo una disminución de los niveles de c-LDL, de triglicéridos, y del estado redox, lo que demuestra su poder cardioprotector.

Ejemplo 23

Efecto de NST0037 sobre la expresión del gen 24- dehidrocolesterol reductasa (Seladin-1/DHCR24) en ratones salvajes

En base a los resultados presentados en el Ejemplo 9 sobre la inducción del gen seladin-1/DHCR24 en líneas neuronales humanas, los investigadores decidieron analizar si el NST0037 modulaba dicho gen en cerebros de ratones tratados con este compuesto.

Para llevar a cabo este estudio, ratones macho C57BL6 de 3 meses de edad (n=3/grupo) fueron tratados oralmente con 50 mg/kg de simvastatina o NST0037. Un grupo control recibió únicamente el vehículo, y que consistió en carboximetilcelulosa al 0,25 % en suero salino fisiológico. 4 h después de las administraciones orales, los animales fueron sacrificados bajo anestesia gaseosa con isoflurano y los cerebros, previamente perfundidos con PBS, fueron extraídos e inmediatamente después congelados en nitrógeno líquido. Posteriormente, el RNA total del cerebro se extrajo mediante el kit *High Pure RNA Isolation* (Roche) y la cantidad y calidad del RNA se analizaron mediante espectrofotometría (Infinite 200 con NanoQuant, Tecan) y visualización de las bandas 18S y 28S mediante electroforesis. La RT-PCR se realizó mediante dos pasos, en primer lugar se pasó el mRNA a cDNA usando el *RNA to cDNA kit* (Applied Biosystem) y posteriormente se analizó la expresión génica mediante sondas TaqMan utilizando las sondas validadas Mn00519071_m1 para seladin-1/DHCR24 y Hs99999901_s1 para 18S (utilizado para normalizar los resultados) en el equipo 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem). La cantidad relativa de la expresión del gen se determinó utilizando el método $\Delta\Delta C_t$ con el software SDS v2.1.1 (Applied Biosystem); la expresión de 18S fue usada para normalizar la medida.

En la Figura 56 se puede observar como tanto la simvastatina como el NST0037 aumentaron la expresión del gen a las 4 h de su administración en igual medida. Estos resultados confirman los datos previos en neuronas humanas donde se observaba un aumento de la expresión de seladin-1 como mecanismo neuroprotector del NST0037. Además, estos resultados confirman el paso de barrera hematoencefálica presentado en ejemplos previos.

En resumen, el tratamiento oral con NST0037 a ratones salvajes produce un aumento del gen neuroprotector seladin-1/DHCR24, lo que confirma además que el compuesto atraviesa la barrera hematoencefálica.

Ejemplo 24

Análisis comparativo en índice de supervivencia de dos compuestos en larvas de pez cebra

24.1. Análisis del índice de supervivencia del compuesto NST0037 en comparación con la simvastatina en larvas de pez cebra. Ensayo de toxicidad aguda.

Para evaluar la bioseguridad del compuesto NST0037 se analizaron sus efectos toxicológicos en el modelo de larva de pez cebra mediante la determinación de los parámetros de seguridad del protocolo C15 de la OECD.

Los huevos fertilizados fueron obtenidos por apareamiento natural del pez cebra (*Danio rerio*, cepa AB). Un total de 8-10 parejas fueron utilizadas para cada cruce y se generaron un total de 200-250 huevos de media por pareja. Los huevos se recogieron inmediatamente después del desove y fueron lavados con agua de dilución ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,29 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,12 g/l, NaHCO_3 0,065 g/l, KCl 0,006 g/l) ajustándose a pH 7,8 $\pm$ 0,2, acorde con el Reglamento CE n.º 440/2008 procedimiento C.1 y depositados en una placa petri.

Los embriones se desarrollaron con normalidad hasta 96 horas post-fertilización en su medio de crecimiento. En dicho momento, las larvas fueron transferidas de las placas petri de crecimiento a las cámaras de exposición (placas microtiter M24) por medio de pipetas y expuestos a las sustancias a testar (NST0037 o simvastatina), con

agua de dilución (controles) o con diferentes concentraciones de los tratamientos. Las larvas fueron incubadas sin aireación adicional, a la temperatura apropiada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) y bajo un régimen de 12 h luz/12 h oscuridad. Cada experimento fue realizado en triplicado.

Los estudios fueron llevados a cabo durante 24 horas de tratamiento, realizando así un ensayo de toxicidad aguda. Los tratamientos llevados a cabo siguieron la siguiente pauta:

- 10 animales control, tratados con agua de dilución durante un periodo de 24 horas.
- 30 animales tratados con el compuesto NST0037 (10 larvas por triplicado) diluido en agua de dilución durante un periodo de 24 horas.
- 30 animales tratados con el compuesto simvastatina (10 embriones por triplicado) diluido en agua de dilución durante un periodo de 24 horas.

Después del tiempo de exposición de las sustancias a estudio, se determinó el registro de la mortalidad de las larvas. La Tabla II muestra el análisis del índice de supervivencia del compuesto NST0037 en comparación con la simvastatina en larvas de pez cebra. En la tabla se muestra el número de larvas utilizadas para la experimentación, la dosis en mg/kg (de peso del animal), el tiempo de tratamiento y el número de larvas muertas respecto al total.

Tabla II

Grupo (NST0037)	Larvas	Dosis (mg/Kg)	Tiempo (Días)	Mortalidad
1	10	Vehículo ^a	1	0/10
2	30	10	1	0/30
3	30	30	1	0/30
4	30	100	1	0/30
5	30	300	1	0/30
6	30	1000	1	0/30
Grupo (simvastatina)	Larvas	Dosis (mg/Kg)	Tiempo (Días)	Mortalidad
1	10	Vehículo ^a	1	0/10
2	30	10	1	0/30
3	30	30	1	0/30
4	30	100	1	0/30
5	30	300	1	0/30
6	30	1000	1	0/30

^a Agua de embriones

Los resultados del estudio mostraron que ambos compuestos presentan un perfil toxicológico similar en cuanto al parámetro de inducción de mortalidad de larvas de pez cebra, no observándose la presencia de ninguna muerte a ninguna de las dosis usadas.

24.2. Análisis del porcentaje de larvas sanas tras exposición del compuesto NST0037 en comparación con la simvastatina en larvas. Ensayo de toxicidad aguda.

Basándose en los resultados anteriores, los inventores quisieron determinar si la ausencia de mortalidad registrada por el compuesto NST0037 estaba asociada a un porcentaje de larvas sanas igual o menor al del tratamiento con simvastatina. El porcentaje de larvas sanas fue definido como el número de larvas vivas y sin síntomas de anomalías fisiopatológicas externas (morfológica y/o en comportamiento), siendo este un parámetro que determina la bioseguridad de una sustancia a estudio y es complementaria a los índices de supervivencia y a las LD_{50} . Tal y como se muestra en la Figura 58, se observaron diferencias en los porcentajes de larvas sanas entre los dos tratamientos evaluados a la dosis más alta de estudio (1000 mg/kg), llegando al $67,9 \pm 3,3$ para el compuesto NST0037, siendo del $53,3 \pm 8,8$ para la simvastatina, lo que indica sorprendentemente una mayor bioseguridad del compuesto NST0037 en el modelo de larva de pez cebra.

24.3. Análisis del porcentaje de larvas con aspecto anómalo (síntomatología) tras exposición del compuesto NST0037 en comparación con la simvastatina en larvas. Ensayo de toxicidad aguda.

En base a los resultados de los apartados anteriores, los inventores decidieron averiguar si la mayor bioseguridad del compuesto NST0037 en comparación con la simvastatina se corroboraba mediante el análisis del porcentaje de larvas con deformidades o aspecto anómalo, recogiendo el porcentaje de larvas que presenten anomalías corporales y/o pigmentarias. Las anomalías registradas en el estudio se describen a continuación:

- Trombosis en el saco vitelino: es un coágulo en el interior de un vaso sanguíneo, en este caso de cualquier vaso que riega el saco vitelino.

- Trombosis cardíaca: ocurre en un vaso cardíaco.

- Edema (o hidropesía) cardíaco: es la acumulación de líquido en el espacio tisular intercelular o intersticial y también en las cavidades del organismo. En el caso del corazón, se produce acumulación de líquido en la bolsa pericárdica.

Los resultados indican que el porcentaje de larvas con deformidades o aspecto anómalo es muy similar entre ambos compuestos, no obstante, y tal y como muestra la Figura 58, se observa sorprendentemente que la simvastatina indujo un mayor porcentaje de larvas con sintomatología toxicológica que el compuesto NST0037, lo que indica una mayor bioseguridad de este último.

En resumen, el tratamiento con NST0037 a larvas de pez cebra en un amplio rango de concentraciones no produce mortalidad alguna, además de presentar un mayor porcentaje de larvas sanas y un menor número de larvas con deformidades o aspecto anómalo que la simvastatina.

Ejemplo 25

25.1. Estudio de la variación del peso de peces cebra adultos en un ensayo de toxicidad de dosis única (24 horas) por exposición en el agua del compuesto NST0037 en comparación con la simvastatina

En base a los resultados de ejemplos anteriores, los inventores decidieron averiguar si la mayor bioseguridad del compuesto NST0037 en comparación con la simvastatina se corroboraba mediante el análisis de la variación del peso de peces cebra adultos, mediante un ensayo de dosis simple recogido por la Agencia Europea del Medicamento (EMA). Este estudio del EMA trata sobre la calidad y la cantidad del fenómeno tóxico producido por la administración única de una sustancia o combinación de sustancias, relacionado con el tiempo. Estos estudios dan parte de información de los posibles efectos de sobredosis producidos en humanos y pueden ser útiles para el diseño de estudios de toxicidad donde se requiere dosis repetidas de administración del tratamiento.

Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. El ensayo desarrollado presentó los siguientes parámetros de estudio:

- ✓ Duración del tratamiento: 24 horas por exposición en el agua.
- ✓ Tiempo post-tratamiento: 14 días.
- ✓ Número de animales: 7 por concentración.
- ✓ Recipientes de ensayo: peceras de 9 litros de capacidad, llenándolas con un volumen de 5 litros con agua de recirculación de los racks filtrado.
- ✓ Carga de animal: peso medio de los peces, entre 0,54-0,60 g.
- ✓ Concentración de ensayo: 2000 mg/kg.
- ✓ Luz: fotoperiodos de 12/12 horas de luz/oscuridad.
- ✓ Temperatura: 25 ± 1 °C.
- ✓ Alimento: no se alimenta a los animales 24 horas antes del tratamiento y tampoco durante las 24 horas que dura el ensayo. Posteriormente, se alimentaron como al resto de los animales.
- ✓ Peso de los animales: se pesaron a tiempo 0 (antes del tratamiento), a 7 y a 14 días post-tratamiento.

En este caso se utilizó como parámetro de toxicidad el peso de los animales de los diferentes grupos de estudio a tres tiempos establecidos: antes del comienzo de los tratamientos (0 dpt), a día 7 post-tratamiento y a día 14 post-tratamiento. En la Figura 59 se muestra el promedio de los pesos de los animales en función del tratamiento y del tiempo post-exposición de las sustancias. Los resultados indicaron que mientras que los peces sin tratamiento aumentaron de peso a lo largo del estudio, mientras que los tratados con simvastatina redujeron significativamente el peso. Por su parte el tratamiento con NST0037, de manera sorprendente, no modificó el peso durante la duración del ensayo, lo que indica que presenta un mejor perfil de seguridad de la simvastatina.

25.2. Estudio histopatológico en peces cebra adultos tras ensayo de toxicidad de dosis única (24 horas) por exposición en el agua del compuesto NST0037 en comparación con la simvastatina

En base a los resultados de los estudios anteriores, los inventores decidieron averiguar si existían diferencias en el estudio histopatológico de los diferentes grupos de tratamiento mediante la tinción de las muestras con hematoxilina-eosina, la cual permite discernir marcas patológicas en los órganos o tejidos de los animales a estudio. Para ello, los peces se sacrificaron a 14 días post-tratamiento (previamente anestesiados) y las muestras (pez entero) fueron incluidas en parafina. Posteriormente se realizó la tinción de hematoxilina-eosina para la realización de los estudios histopatológicos, obteniéndose un mínimo de 6 cortes longitudinales por animal, con el objetivo de recoger diferentes zonas de estudio del mismo órgano. Los órganos estudiados fueron los siguientes:

cerebro, riñón, páncreas, intestino, ojo, branquias, ovario, testículo, musculo e hígado. En la figura 60, se muestran imágenes representativas del estudio histopatológico realizado en los animales tratados con la dosis de 2000 mg/kg. De todos los órganos estudiados, los únicos que presentaron rasgos patológicos discernibles fueron el intestino y el ovario. En el intestino se detectó huellas de atrofia en las vellosidades intestinales, siendo más acusada en los animales tratados con simvastatina que en los tratados con NST0037. En el ovario de las hembras tratadas con simvastatina se detectó atrofia en ovocitos terciarios. Además, el hígado de los animales tratados con ambos compuestos presentó zonas discretas de inflamación.

En resumen, el tratamiento con NST0037 a peces cebrá adultos no modificó el peso de los mismos durante un experimento de 14 días, mientras con simvastatina se detectó una disminución significativa del peso de los animales. Además, la simvastatina produjo mayores efectos histopatológicos que el NST0037, demostrándose que este último compuesto es más seguro.

Ejemplo 26

26. 1. Estudio de letalidad por exposición constante en el agua (4 días) de NST0037 en comparación con la simvastatina en pez cebrá adulto.

En base a los resultados de ejemplos anteriores, los inventores decidieron averiguar si la mayor bioseguridad del compuesto NST0037 en comparación con la simvastatina se corroboraba mediante el análisis de la letalidad por exposición constante en el agua durante 4 días según el test de toxicidad aguda para peces de la OECD (*Draft Revised Guideline* 203). El objeto de este ensayo es determinar la toxicidad letal aguda de una sustancia en peces de agua dulce. La toxicidad aguda es el efecto adverso, discernible, inducido en un organismo como consecuencia de la exposición a una sustancia dada durante un corto período de tiempo (días). En el presente ensayo, la toxicidad aguda viene expresada como la dosis letal media (LD_{50}), es decir, la dosis que en el agua causa la muerte del 50 % de los peces de un lote sometido a ensayo durante un período de exposición continuo.

Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. El ensayo desarrollado presentó los siguientes parámetros de estudio:

✓ Método estático: se realizó un ensayo de toxicidad durante el cual no hubo renovación de la solución de ensayo.

✓ Se efectúa un control (o testigo), sin sustancia de ensayo además de las concentraciones de ensayo propiamente dichas.

✓ Duración: 4 días.

✓ Número de animales: 7 por concentración.

✓ Recipientes: cubetas de 9 litros, llenándolas con un volumen de 5 litros, con agua de recirculación de los racks filtrado.

✓ Carga: peso medio de los peces: $0,46 \text{ g} \pm 0,03$, quedando la carga en 0,49 g/litro.

✓ Concentraciones de ensayo: 5 concentraciones (1, 3,2, 10, 32 y 100 mg/kg).

✓ Luz: fotoperiodos de 12/12 horas de luz/oscuridad.

✓ Temperatura: 25 ± 1 °C.

✓ Alimento: ninguno.

Como parámetro de toxicidad se registraron las muertes de los animales a estudio durante todo el tiempo del ensayo.

La Tabla III muestra el análisis del índice de supervivencia del compuesto NST0037 en comparación con la simvastatina en peces cebrá adultos tratados durante 4 días con los compuestos en el agua. En la tabla se muestra el número de animales utilizados para la experimentación, la dosis en mg/kg (de peso del animal), el tiempo de tratamiento y el número de animales muertos respecto al total.

Tabla III

Grupo (NST0037)	Animales	Dosis (mg/kg)	Tiempo (Días)	Mortalidad
1	7	Vehículo ^a	4	0/7
2	7	1	4	0/7
3	7	3,2	4	0/7
4	7	10	4	0/7
5	7	32	4	0/7
6	7	100	4	1/7
Grupo (simvastatina)	Animales	Dosis (mg/kg)	Tiempo (Días)	Mortalidad
-	-	-	-	-
1	7	1	4	0/7
2	7	3,2	4	0/7
3	7	10	4	0/7
4	7	32	4	0/7
5	7	100	4	6/7

^a Agua del sistema

Tal y como se muestra en la Tabla III, la mortalidad producida por ambos compuestos en este ensayo de toxicidad aguda demuestran sorprendentemente que la simvastatina fue significativamente más tóxica que el compuesto NST0037 (χ^2 , p-valor < 0,001), ya que a día 4 post-tratamiento, el 14 % (1/7) de los animales tratados con NST0037 murieron, siendo del 86 % (6/7) el porcentaje de mortalidad observado para el grupo de tratamiento con simvastatina. Según lo observado en este estudio, la LD₅₀ del compuesto NST0037 fue superior a 100 mg/kg después de 4 días de tratamiento continuo con el compuesto. La simvastatina presentó una LD₅₀ de 60,55 mg/kg después de 4 dpt; de nuevo y de manera sorprendente fue más tóxica que el compuesto NST0037, ya que la simvastatina alcanzó la LD₅₀ con menos dosis que NST0037 y en el mismo tiempo.

26. 2. Estudio histopatológico en peces cebras adultos tras ensayo de letalidad por exposición constante en el agua (4 días) de NST0037 en comparación con la simvastatina en pez cebra adulto

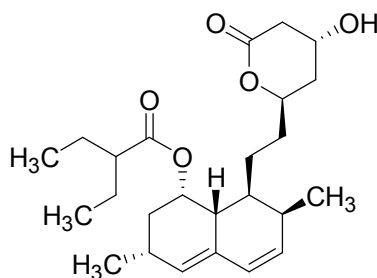
En base a los resultados de los estudios anteriores, los inventores decidieron averiguar si existían diferencias en el estudio histopatológico de los diferentes grupos de tratamiento mediante la tinción de las muestras con hematoxilina-eosina, la cual permite discernir marcas patológicas en los órganos o tejidos de los animales a estudio. Para ello, los peces que sobrevivieron al tratamiento se sacrificaron a 4 días post-tratamiento (previamente anestesiados) y las muestras (pez entero) fueron incluidas en parafina. Posteriormente se realizó la tinción de hematoxilina-eosina para la realización de los estudios histopatológicos, obteniéndose un mínimo de 6 cortes longitudinales por animal, con el objetivo de recoger diferentes zonas de estudio del mismo órgano. Los órganos estudiados fueron los siguientes: cerebro, riñón, páncreas, intestino, ojo, branquias, ovario, testículo, músculo e hígado.

En la Figura 61, se muestran imágenes representativas del estudio histopatológico realizado en los animales tratados. En ella se muestran imágenes representativas del estudio histopatológico realizado. Las únicas dosis que indujeron problemas toxicológicos fueron las de 32 y 100 mg/kg, restringiéndose las alteraciones patológicas a los ovarios. Mientras las hembras control mostraron folículos ováricos normales en diferentes estadios de maduración, las hembras tratadas con 100 mg/kg de ambos compuestos presentaron daño ovárico, observándose una degeneración masiva de los ovocitos secundarios y terciarios, además de alteración estromal. Por otro lado, el grupo de hembras tratadas con 30 mg/kg de simvastatina también presentó daño histopatológico en el ovario, no siendo observado sorprendentemente en el grupo de hembras tratadas con la misma dosis del compuesto NST0037, lo que indica que el compuesto NST0037 es más seguro que la simvastatina en este modelo experimental.

En resumen, el tratamiento con NST0037 a peces cebras adultos durante 4 días a 100 mg/kg presentó una mortalidad residual, la cual fue ampliada en las mismas condiciones con simvastatina. Además, los daños histopatológicos encontrados se restringieron a los ovarios de los animales y se detectaron a las dosis de 32 y 100 mg/kg para la simvastatina, mientras que con NST0037 el daño ovárico solo se detectó a la dosis más alta, lo que demuestra que este último compuesto es más seguro.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I)



(I)

- 5 su forma hidroxilada, las sales farmacéuticamente aceptables de dicho hidroxilado y solvatos farmacéuticamente aceptables del compuesto y de su forma hidroxilada.
2. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1 y/o su forma hidroxilada y/o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilado y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilada, y al menos un adyuvante, portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 3. Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, su forma hidroxilada o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilado y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilada para su uso como medicamento.
- 15 4. Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, su forma hidroxilada o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilado y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilada para su uso en la prevención y/o el tratamiento de:
- enfermedades neurodegenerativas,
 - deterioro cognitivo,
 - procesos patológicos asociados a la edad que se refieren a cualquier evento o combinación de eventos relacionado/s con el envejecimiento que producen pérdida de viabilidad celular del tejido nervioso o sensibilización celular del tejido nervioso, pérdida de la función celular y/o pérdida del número de células; y progeria, o
 - epilepsia, crisis epilépticas y convulsiones.
- 20 5. Un compuesto de fórmula (I), su forma hidroxilada o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilado y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilada según la reivindicación 4, en el que las enfermedades neurodegenerativas son: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) o esclerosis múltiple.
- 25 6. Uso de un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, de su forma hidroxilada, de una sal farmacéuticamente aceptable de dicho hidroxilado y/o de un solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto o de su forma hidroxilada en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de:
- 30 -enfermedades neurodegenerativas,
- deterioro cognitivo,
 - procesos patológicos asociados a la edad que se refieren a cualquier evento o combinación de eventos relacionado/s con el envejecimiento que producen pérdida de viabilidad celular del tejido nervioso o sensibilización celular del tejido nervioso, pérdida de la función celular y/o pérdida del número de células; y progeria, o
 - epilepsia, crisis epilépticas y convulsiones.
- 35

Figura 1

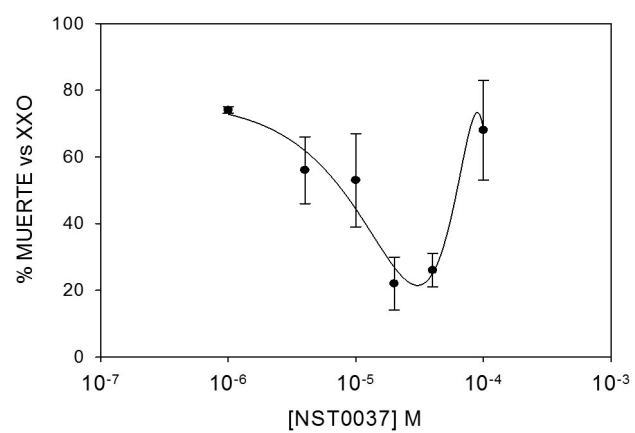


Figura 2

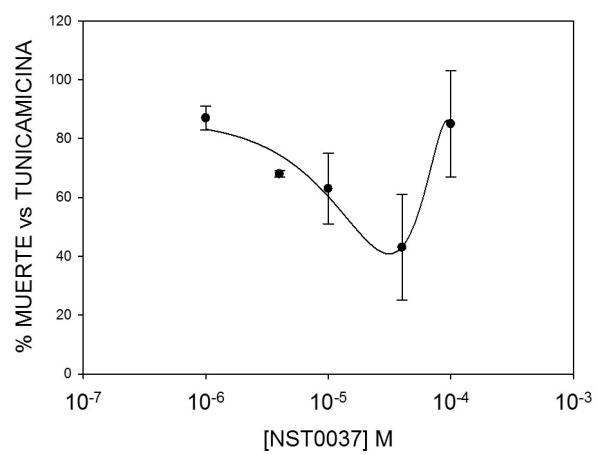


Figura 3

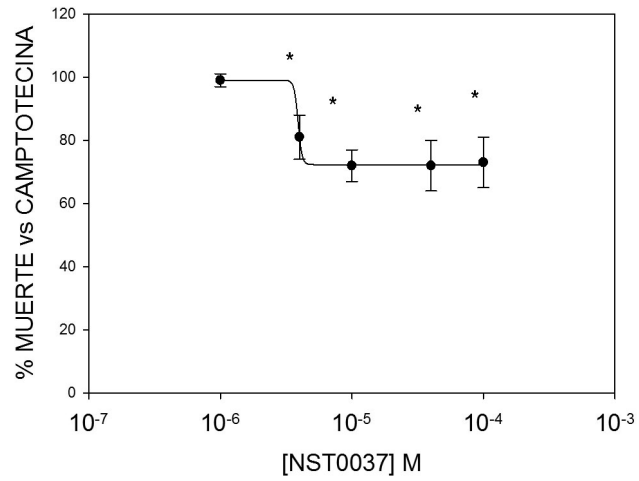


Figura 4

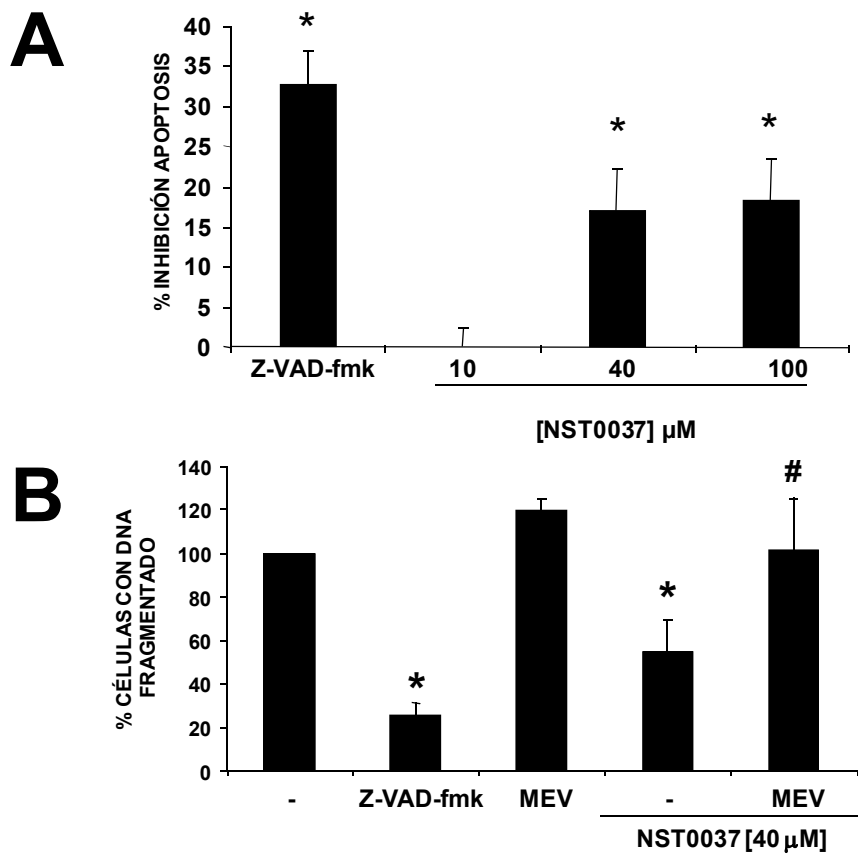


Figura 5

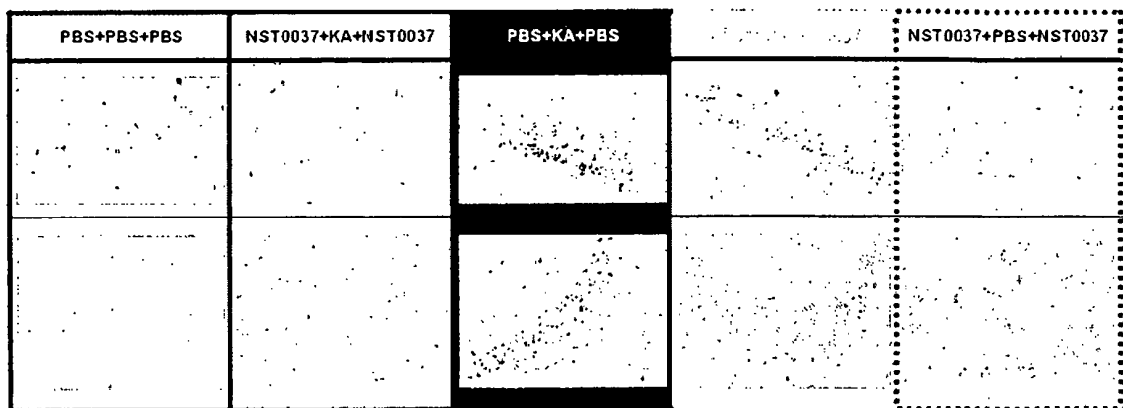


Figura 6

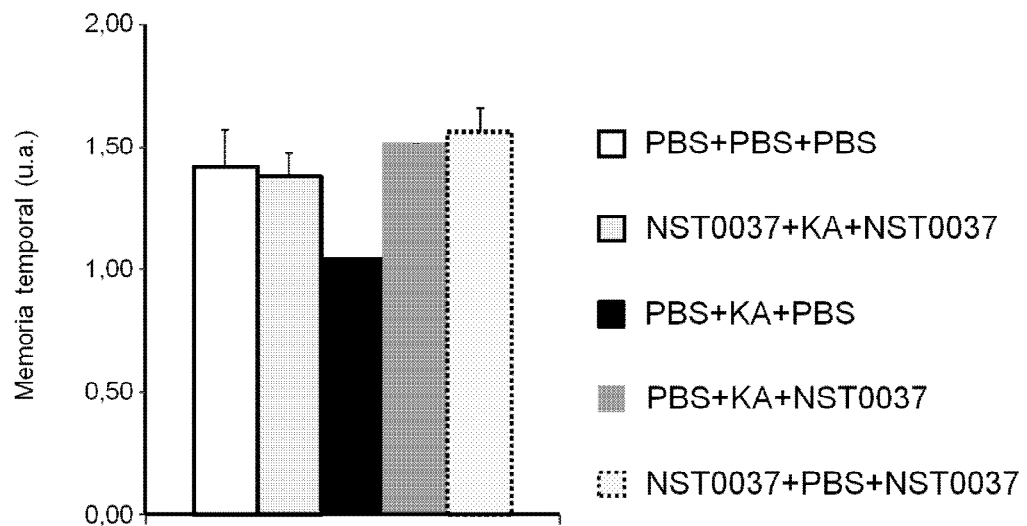


Figura 7

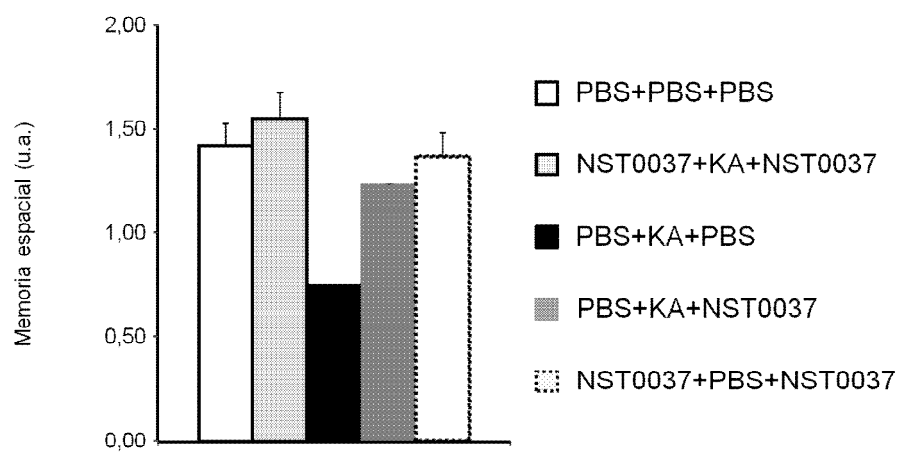


Figura 8

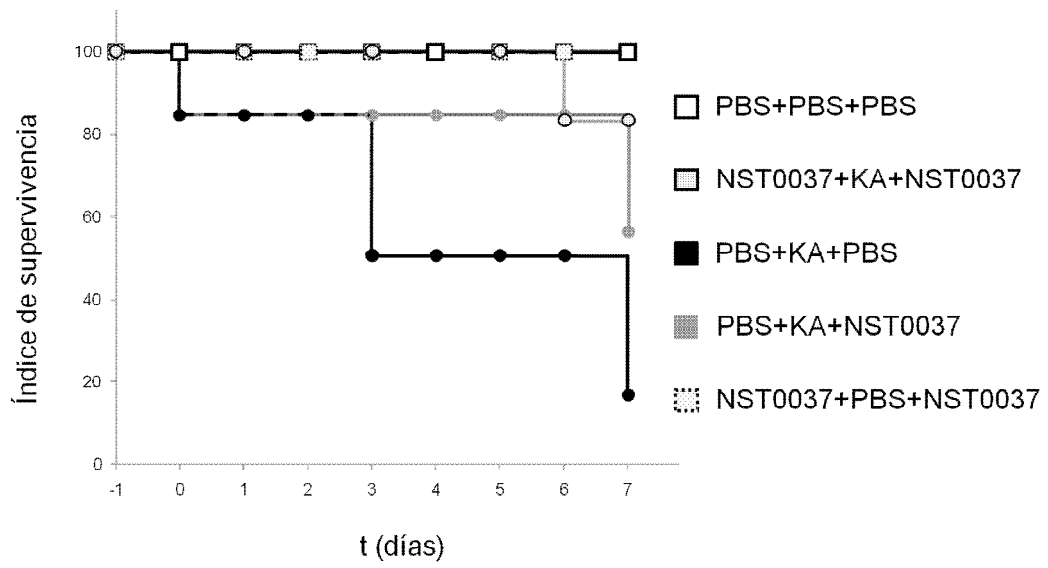


Figura 9

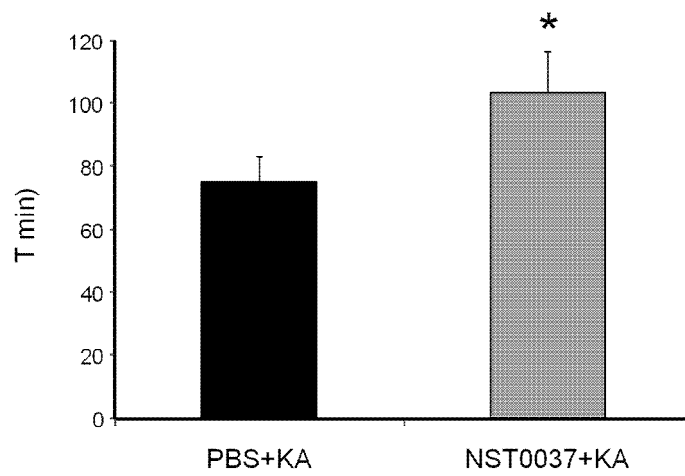


Figura 10

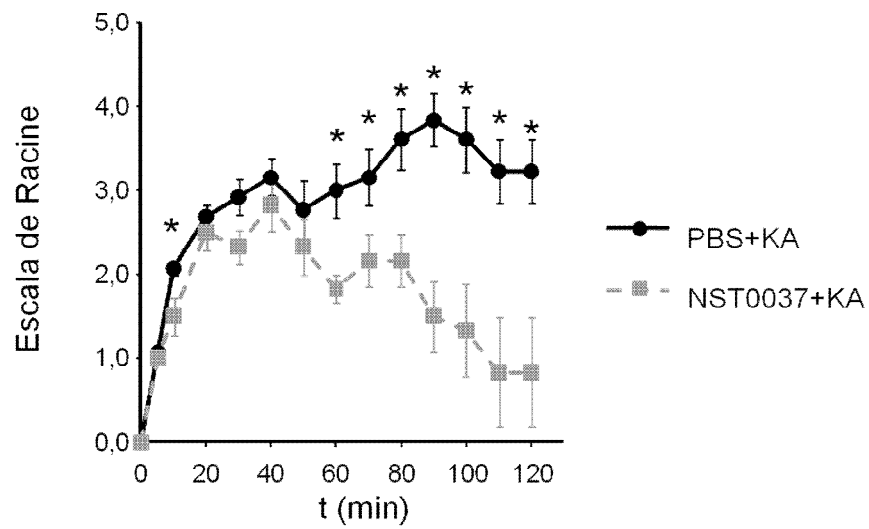


Figura 11

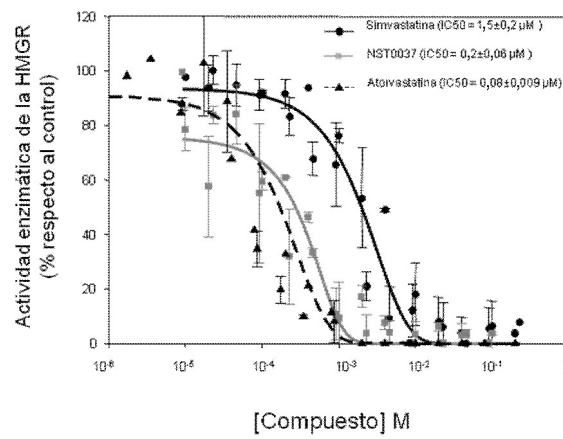


Figura 12

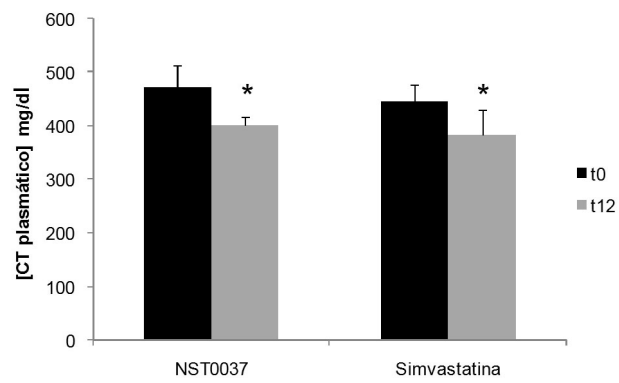


Figura 13

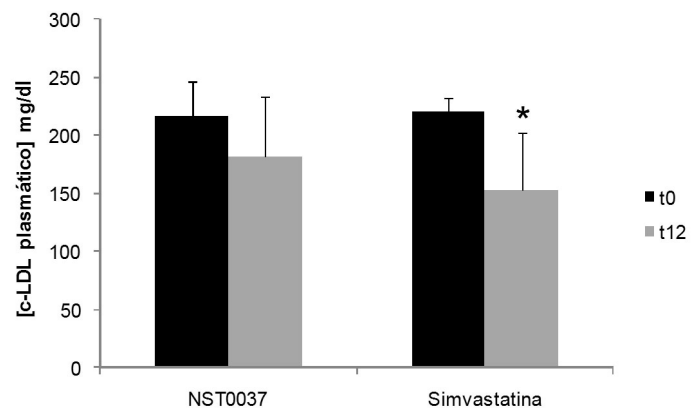


Figura 14

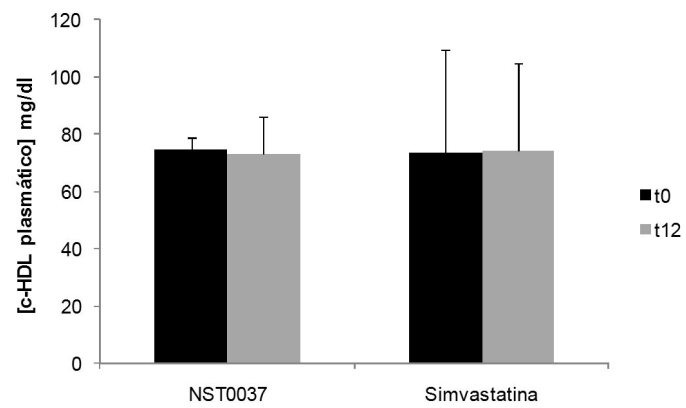


Figura 15

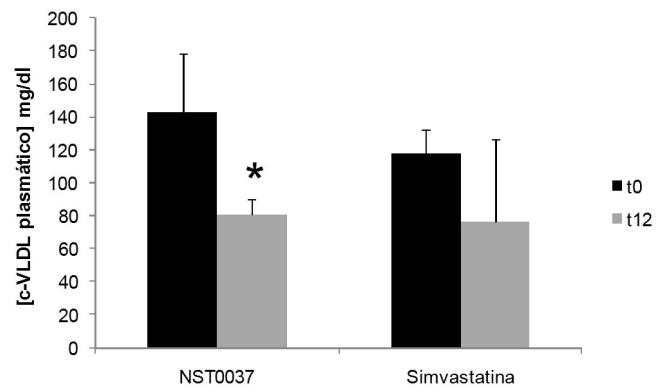


Figura 16

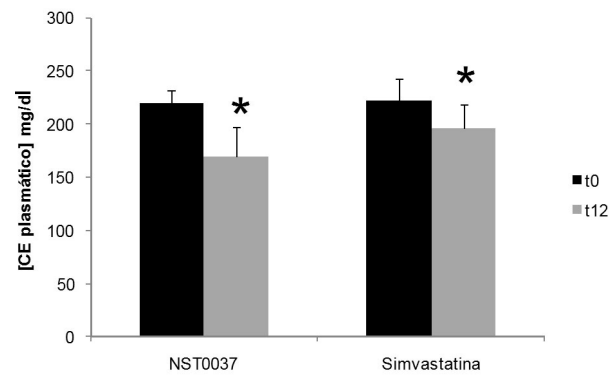


Figura 17

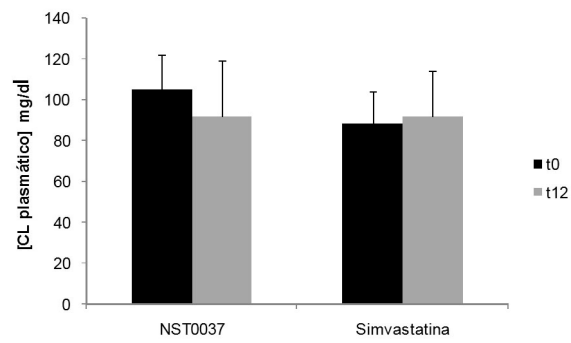


Figura 18

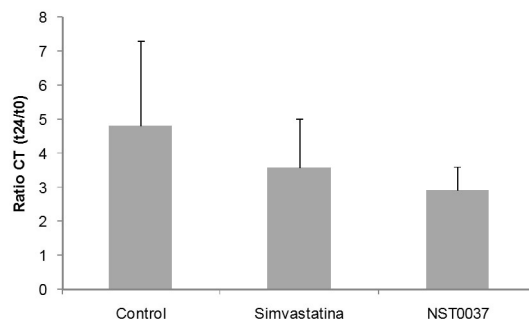


Figura 19

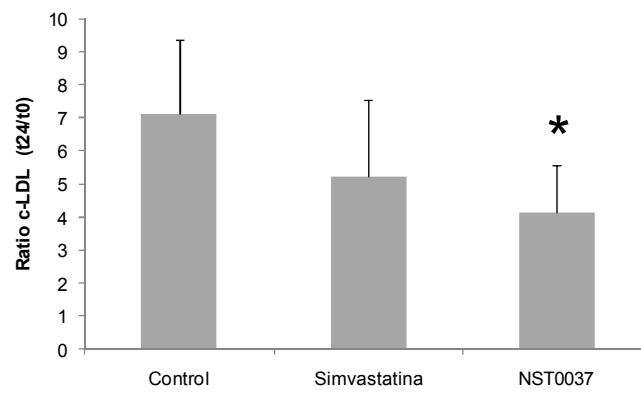


Figura 20

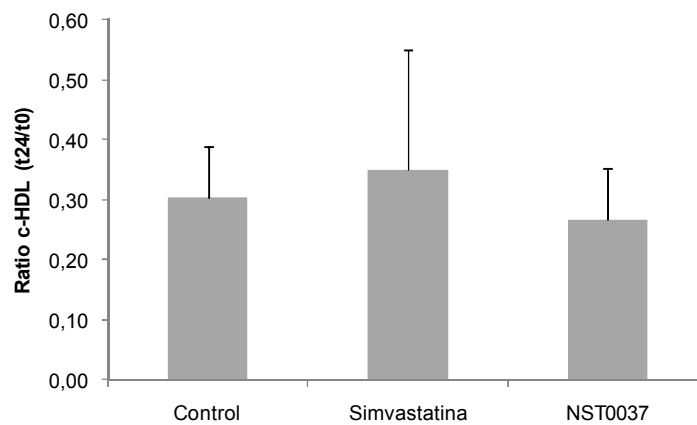


Figura 21

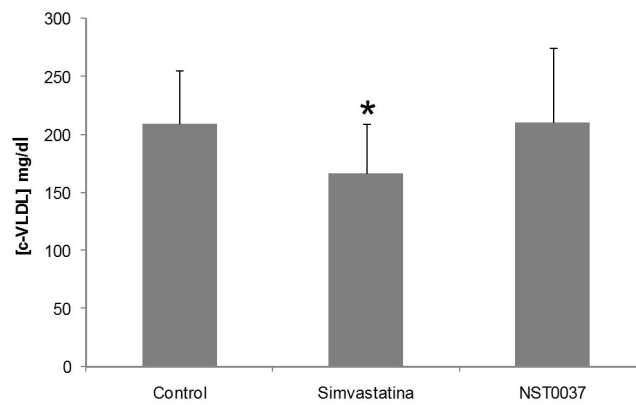


Figura 22

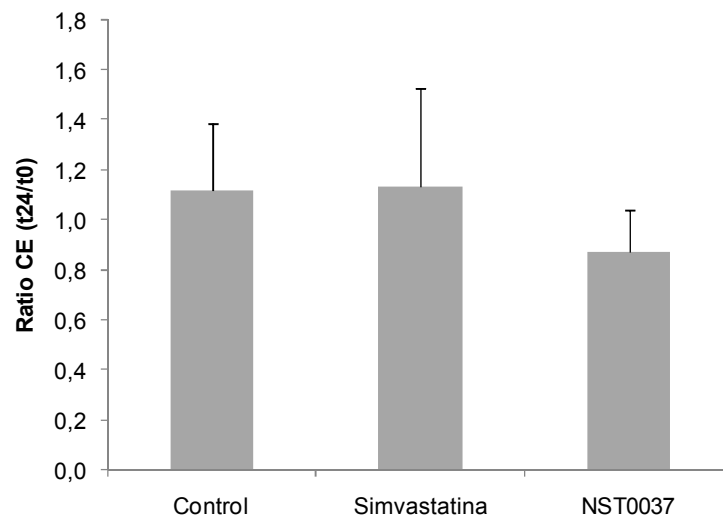


Figura 23

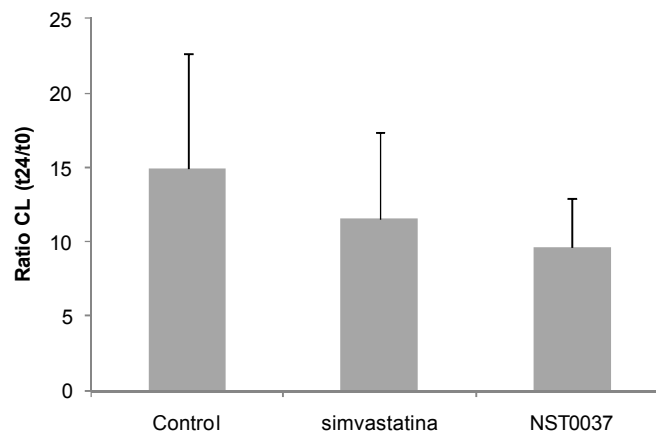


Figura 24

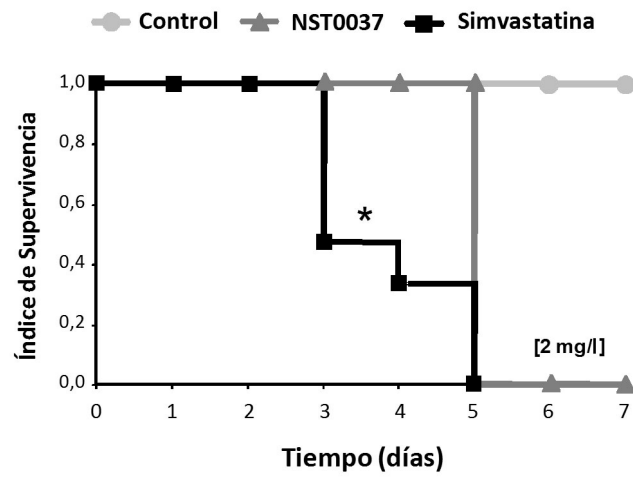


Figura 25

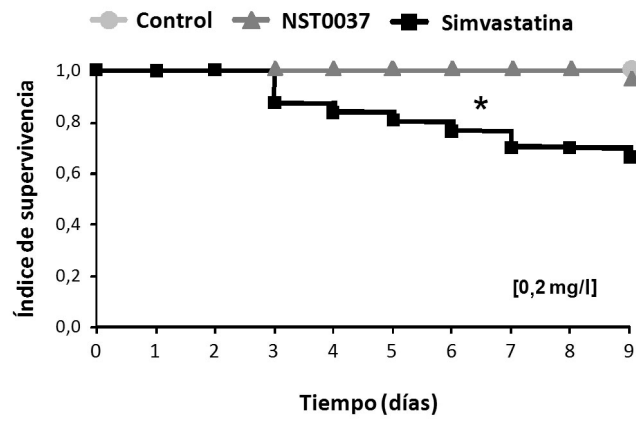


Figura 26

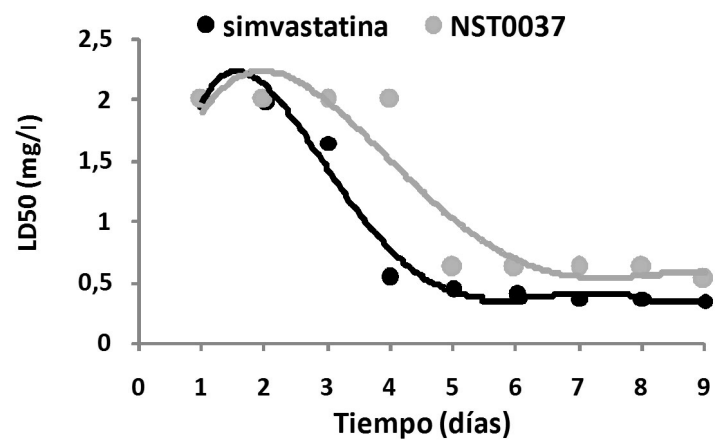


Figura 27

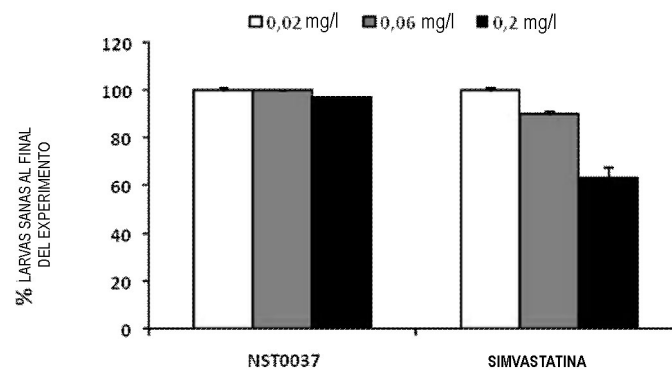


Figura 28

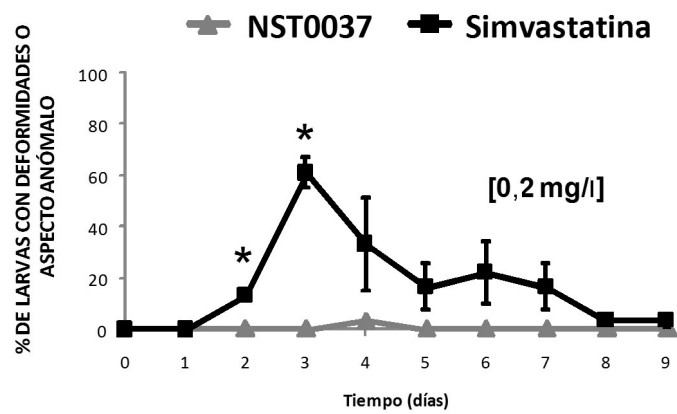


Figura 29

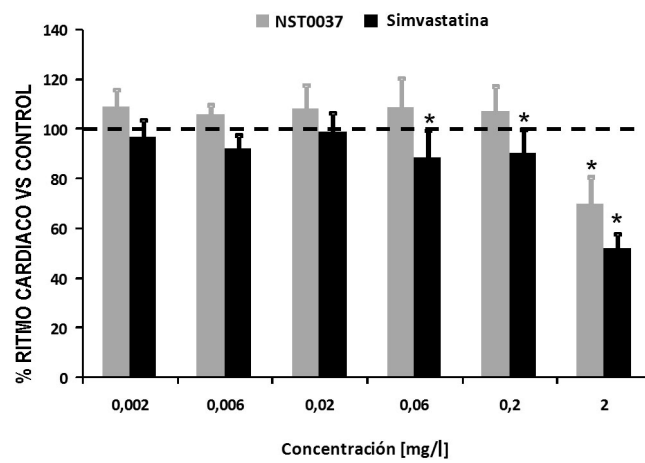


Figura 30

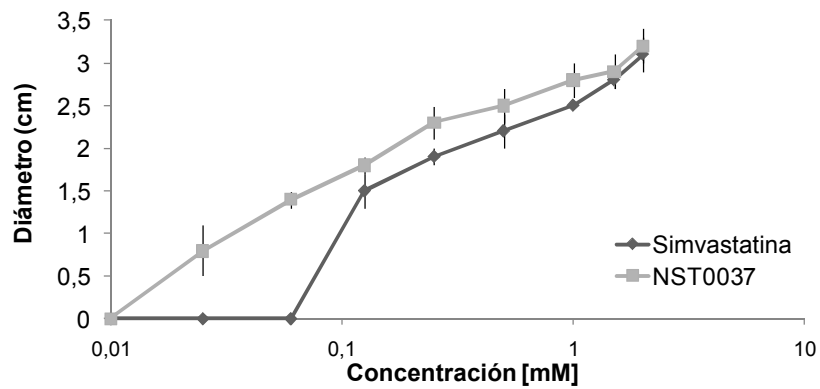


Figura 31

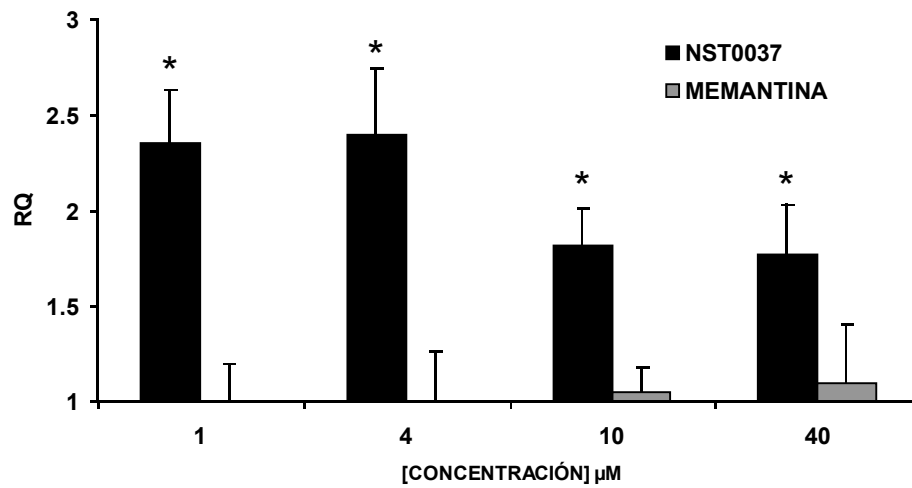


Figura 32

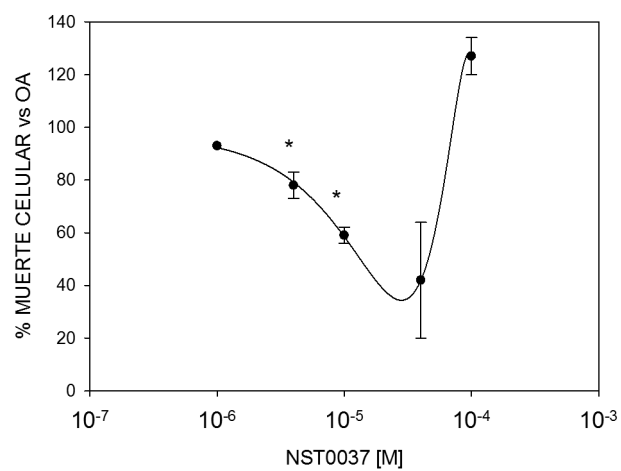


Figura 33

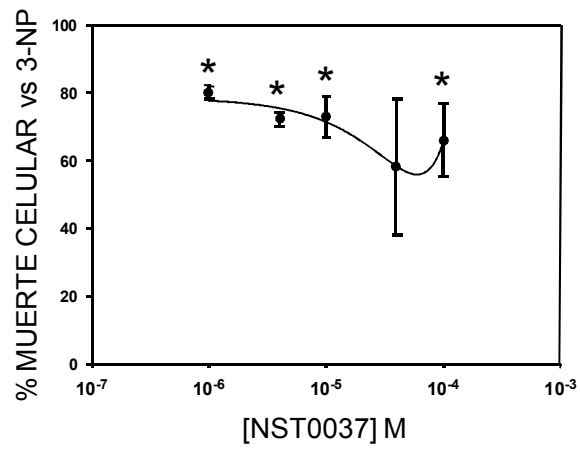


Figura 34

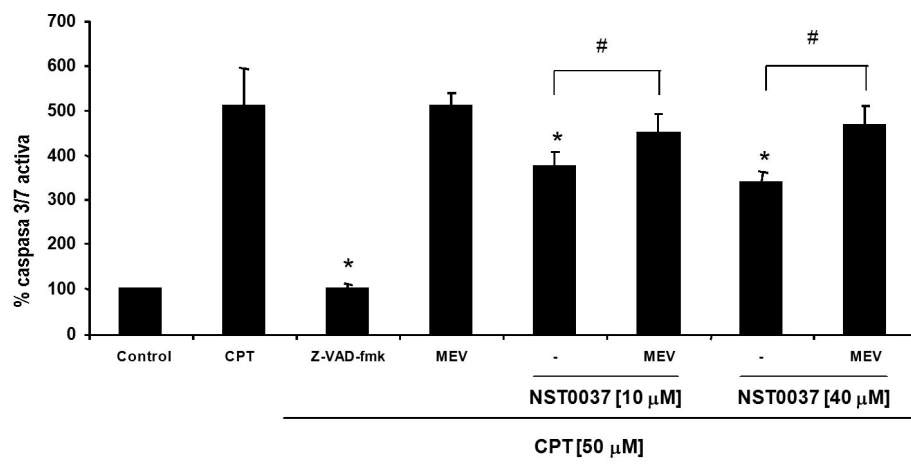


Figura 35

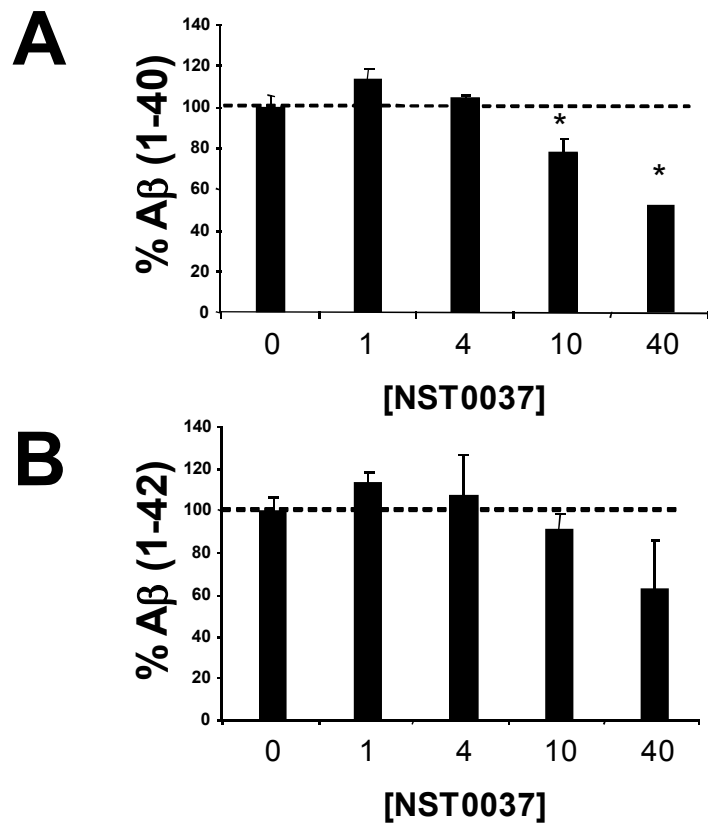


Figura 36

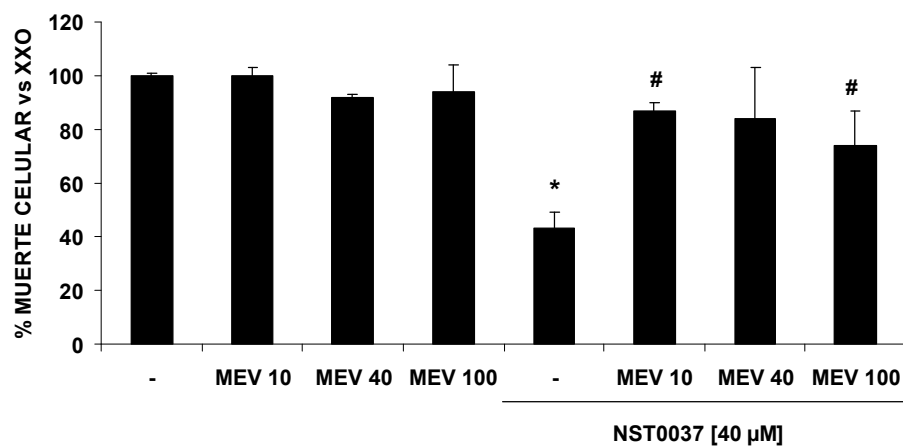


Figura 37

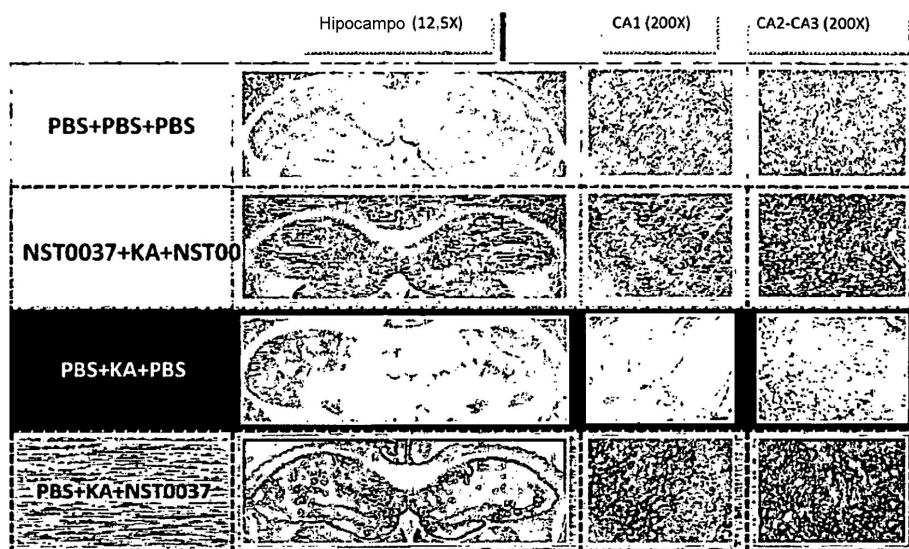


Figura 38

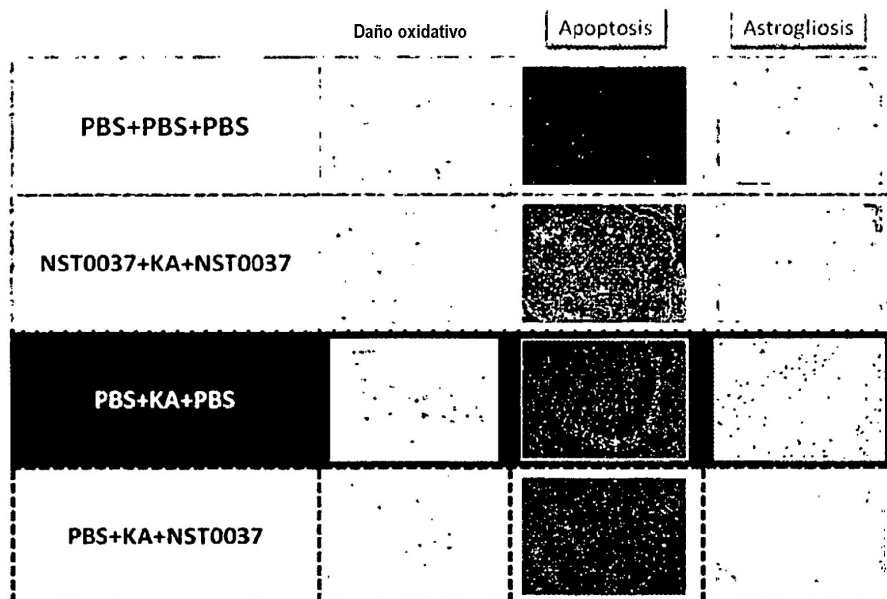


Figura 39

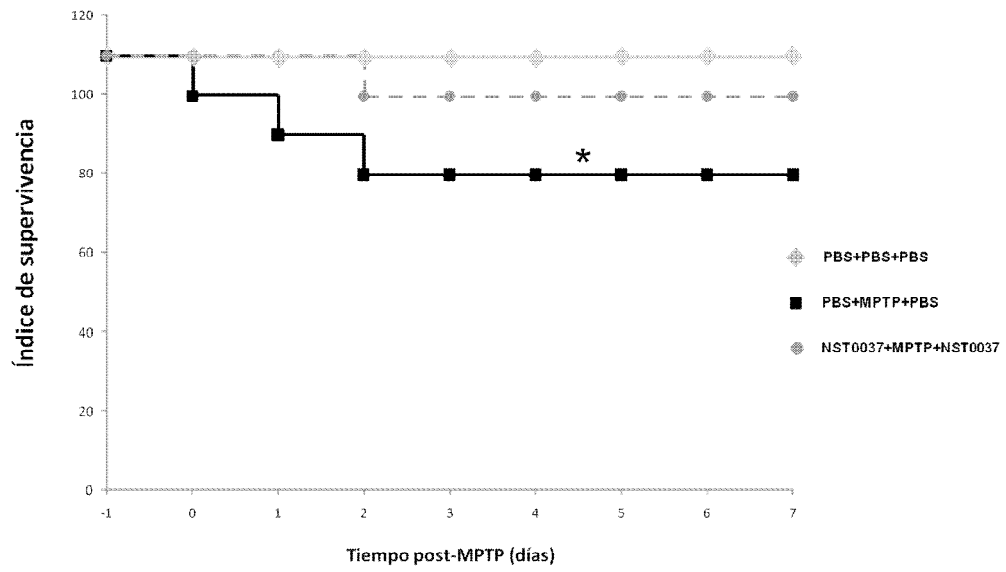


Figura 40

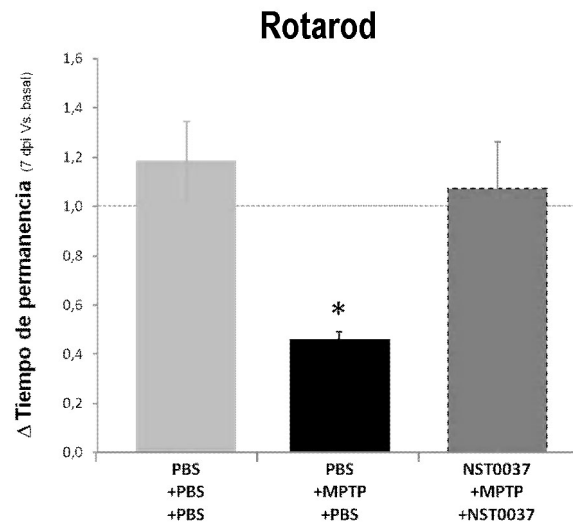


Figura 41

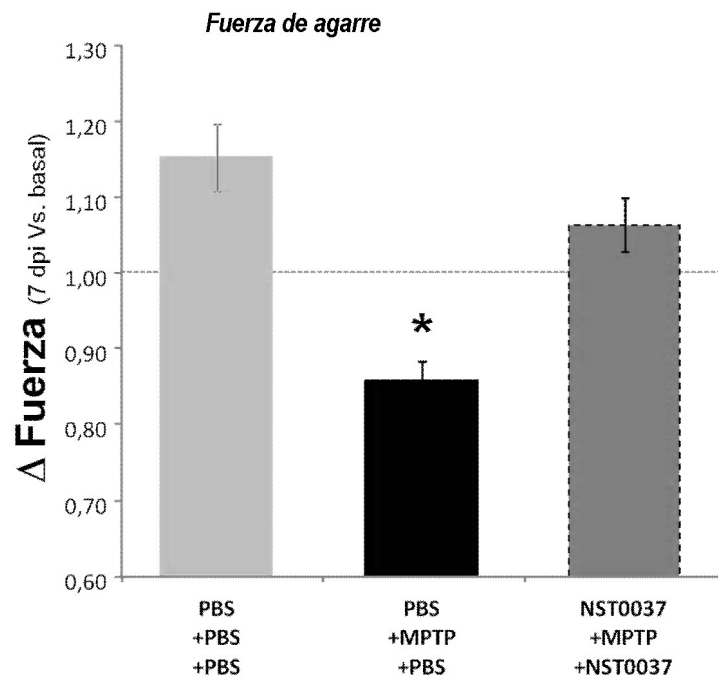


Figura 42

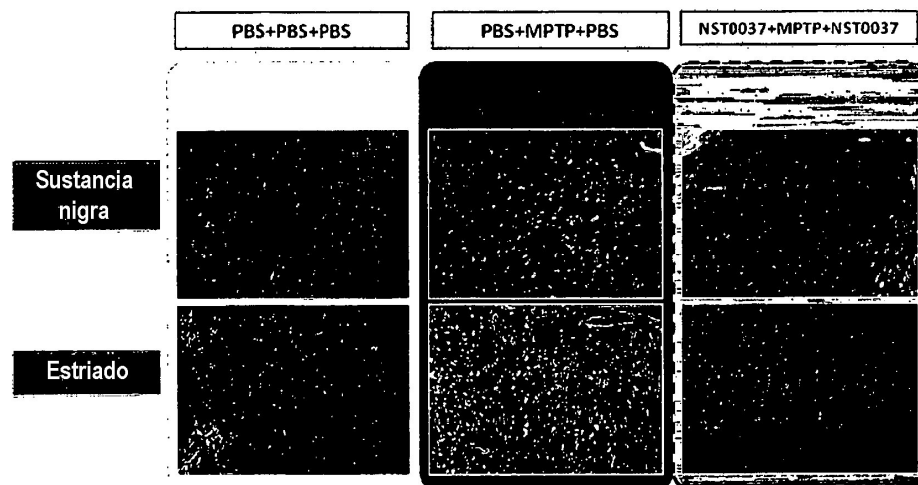


Figura 43

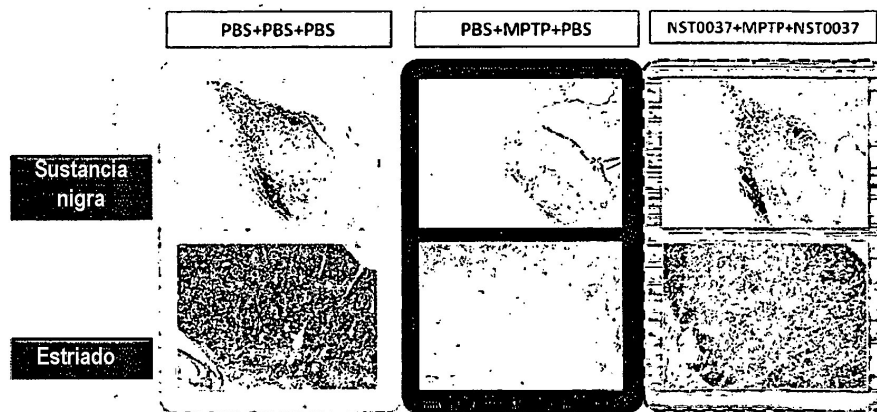


Figura 44

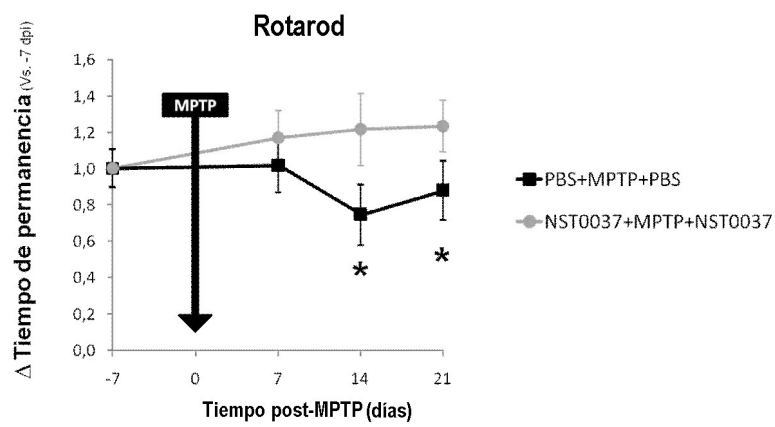


Figura 45

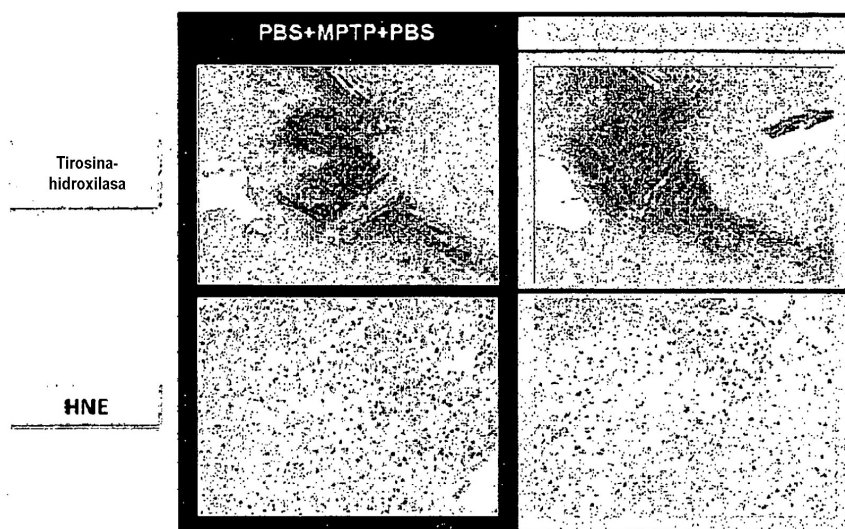


Figura 46

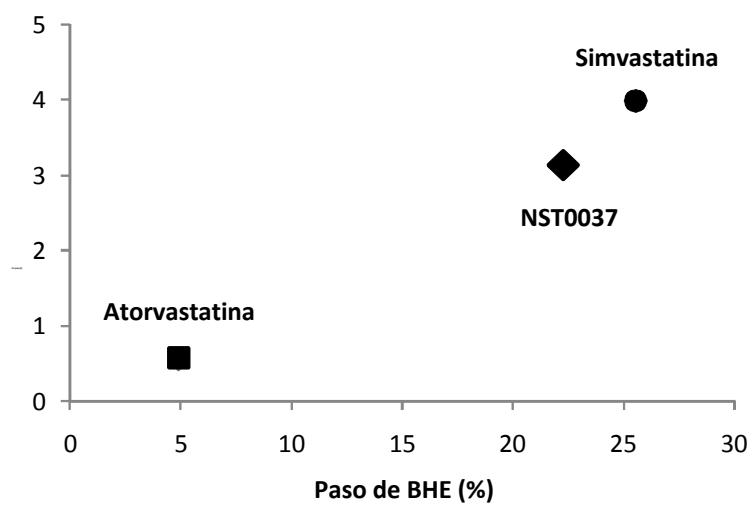


Figura 47

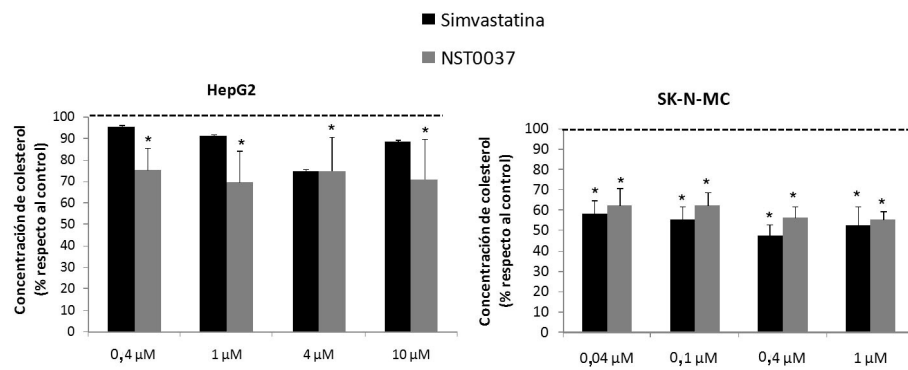


Figura 48

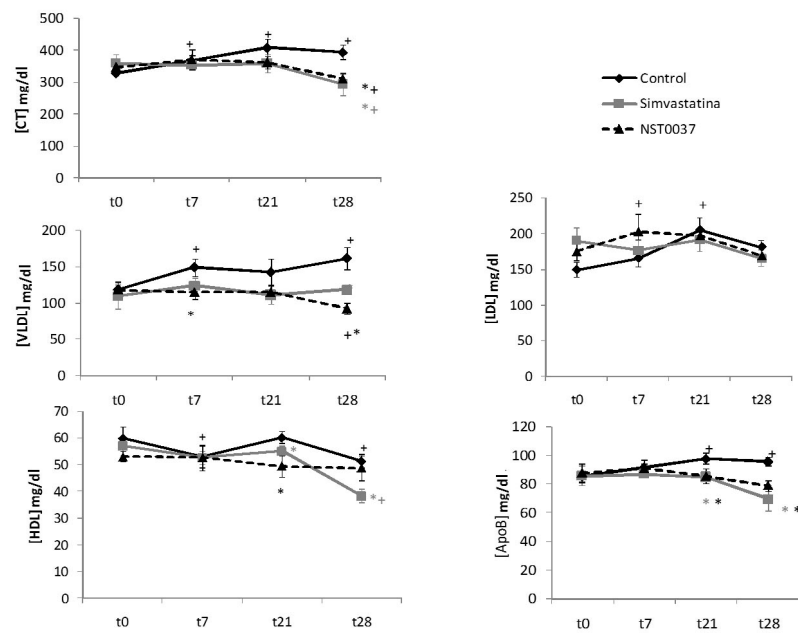


Figura 49

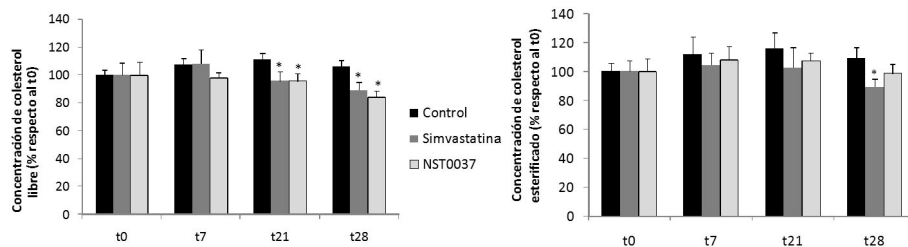


Figura 50

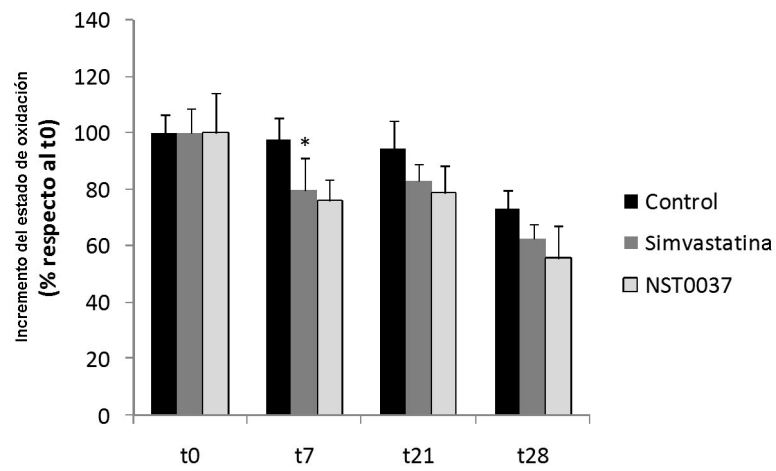


Figura 51

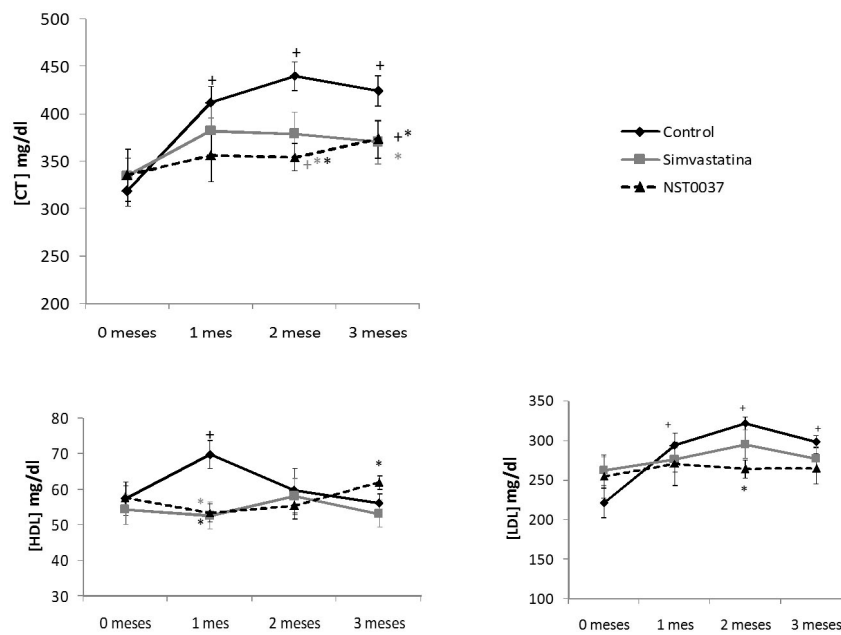


Figura 52

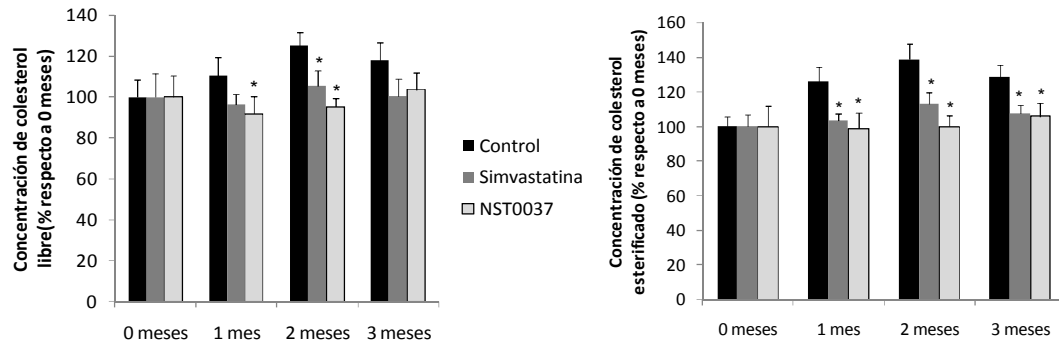


Figura 53

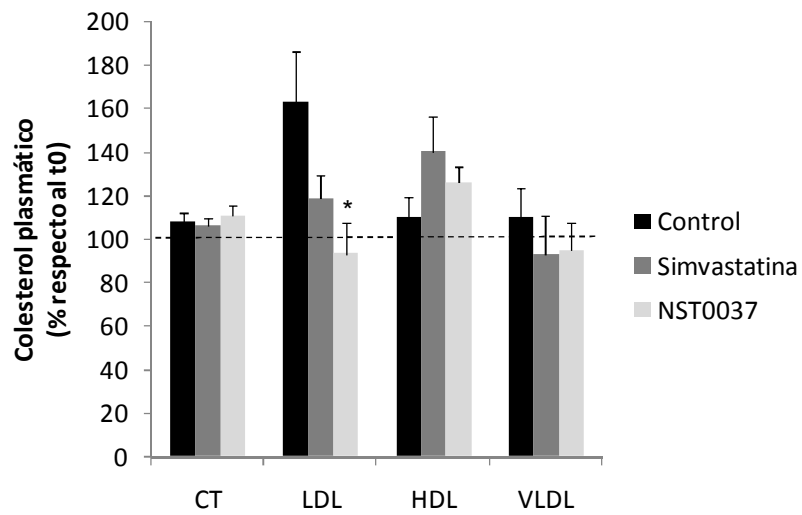


Figura 54

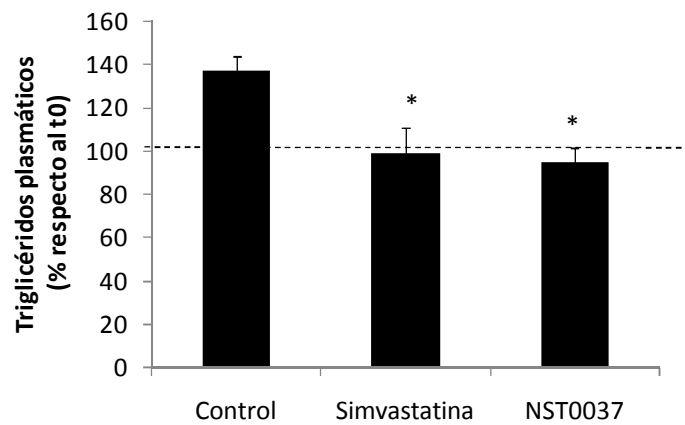


Figura 55

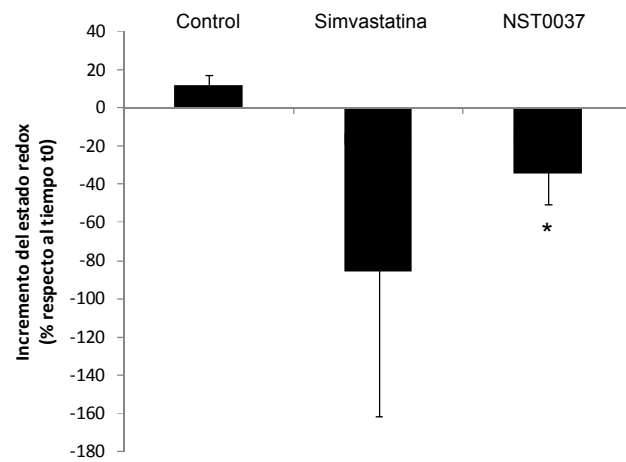


Figura 56

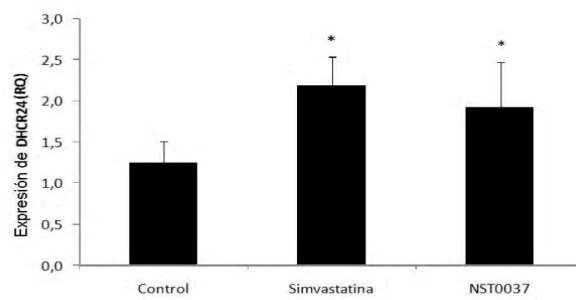


Figura 57

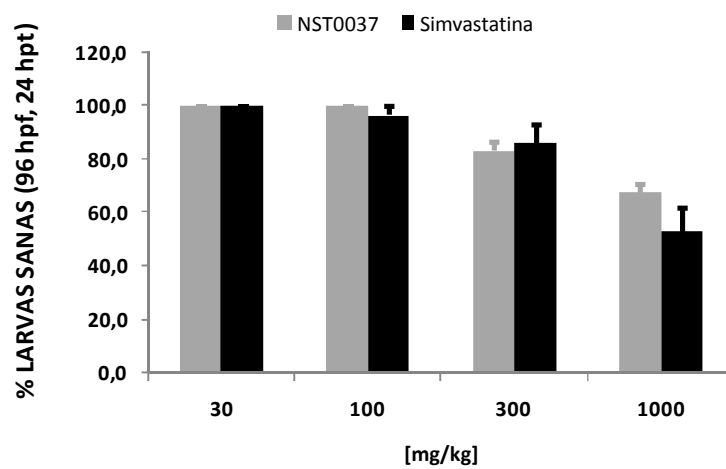


Figura 58

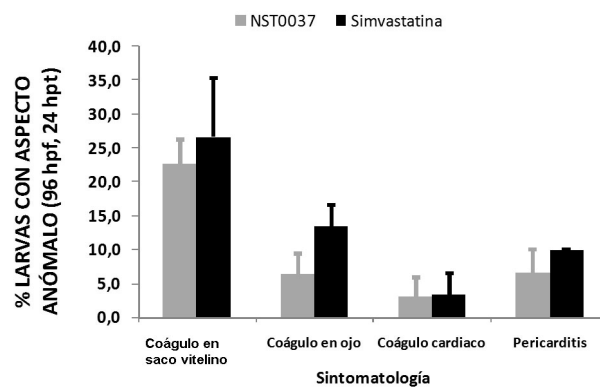


Figura 59

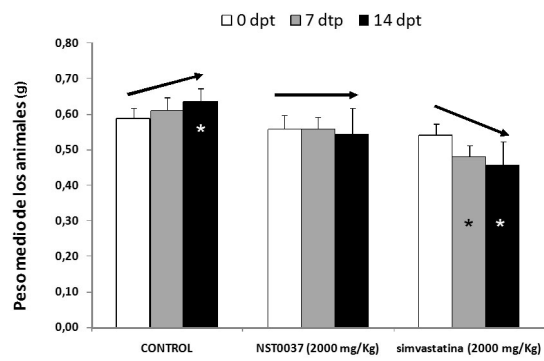


Figura 60

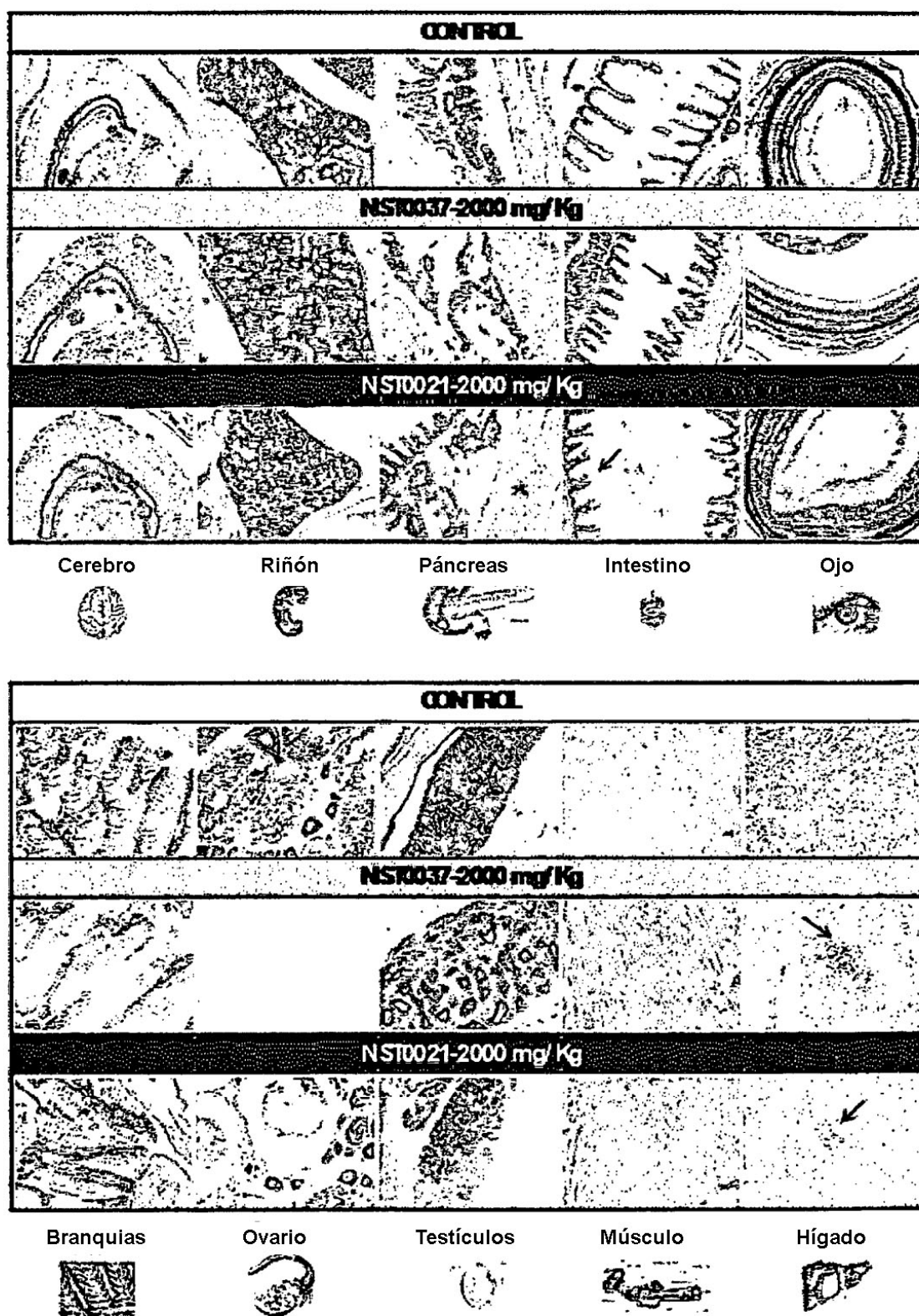


Figura 61

