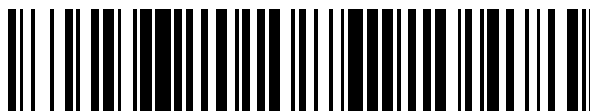


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 108**

51 Int. Cl.:

**C07D 311/30** (2006.01)

**A61K 31/665** (2006.01)

**C07F 9/12** (2006.01)

**A61K 31/352** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2006 E 06704987 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 1856085**

54 Título: **Compuestos flavonoides y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**11.03.2005 AU 2005901214**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.11.2015**

73 Titular/es:

**HOWARD FLOREY INSTITUTE PTY LTD (50.0%)**  
**2/161 Barry St.**  
**Carlton South, VIC 3053, AU y**  
**ARMARON BIO PTY LTD (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DUSTING, GREGORY JAMES;**  
**WOODMAN, OWEN LLEWELLYN;**  
**JARROTT, BEVYN y**  
**MAY, CLIVE NEWTON**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 552 108 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

Compuestos flavonoides y usos de los mismos

## CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se refiere a compuestos novedosos, a composiciones que contienen los mismos, a procedimientos para su síntesis y a usos de estos compuestos. En particular, la presente invención se refiere a compuestos flavonoides, a procedimientos de síntesis de compuestos flavonoides, a composiciones que contienen los compuestos flavonoides y a procedimientos de uso de los mismos.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 La rápida reperfusión del tejido isquémico es crítica para restaurar la función normal. Sin embargo, este retorno de flujo sanguíneo puede producir paradójicamente una destrucción progresiva de células dañadas irreversiblemente, conduciendo de este modo a una disfunción del tejido y a infarto. Esta "lesión por reperfusión" tiene causas multifactoriales de enfermedad pero parece estar fuertemente asociada con una respuesta inflamatoria; con el retorno de flujo sanguíneo, pueden producirse varios procesos inflamatorios para potenciar la lesión isquémica, incluyendo la adhesión de leucocitos y la infiltración y la liberación de especies reactivas de oxígeno (ERO) tales como especies de radicales libres derivados de oxígeno, por ejemplo  $H_2O_2$ .

- 15 Muchas de estas respuestas inflamatorias parecen estar mediadas por interleucinas (ILs), una subclase multifuncional de citocinas. Los leucocitos (glóbulos blancos) también parecen desempeñar una función crítica en la lesión por reperfusión. Además de dañar el endotelio y las neuronas, los leucocitos pueden obstruir directamente la microcirculación. Esta obstrucción capilar por leucocitos también puede ser el mecanismo principal del "fenómeno de no reflujo." Así, áreas del parénquima que todavía son viables cuando retorne el flujo sanguíneo no son reperfundidas de forma adecuada y finalmente mueren. En particular, la isquemia de miocardio causa obstrucción capilar extensiva.

- 20 La isquemia y, en particular, la reperfusión, tienden a promover una mayor liberación de ERO de los leucocitos lo que conduce a una posterior lesión tisular. Uno de los tipos de radicales libres más dañinos es el de los aniones superóxido que actúan afectando la función endotelial y la actividad de óxido nítrico (NO). Esto empeora aún más el proceso de obstrucción capilar puesto que el NO ha mostrado que inhibe la agregación plaquetaria y previene la adherencia de leucocitos al endotelio.

- 25 El grado de recuperación de tejido conseguido después de la isquemia y reperfusión depende de la naturaleza del tejido y de la intensidad de la lesión.

- 30 La isquemia puede ser causada por una diversidad de patologías. Por ejemplo, incidentes agudos tales como accidente cerebrovascular, infarto de miocardio o traumatismo mecánico, y patologías crónicas tales como aterosclerosis, enfermedad vascular periférica y diabetes pueden causar isquemia. La hipertensión es otro tipo de trastorno que puede conducir a isquemia.

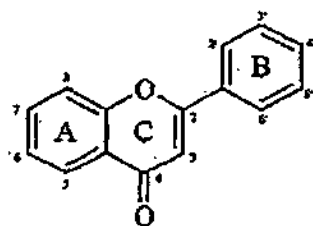
- 35 Después de un incidente agudo tal como ataque al corazón provocado por una arteria coronaria bloqueada, se liberan diversos fármacos por vía intravenosa a la víctima del ataque al corazón en la eliminación de cualquier obstrucción de un vaso sanguíneo, restableciendo de este modo el flujo sanguíneo que conduce a la reperfusión de los tejidos. Sin embargo, este tipo de tratamiento no está dirigido a prevenir o mejorar la lesión al tejido asociado con la reperfusión. Crear un ambiente para que se produzca reperfusión y restablecer el aporte de oxígeno al tejido puede conducir a una mayor lesión tisular al aumentar la producción de radicales libres.

- 40 En este sentido, los tratamientos convencionales para sujetos que presentan isquemia o tienen riesgo de isquemia son inadecuados.

- Se ha sugerido que diversas sustancias mejoran la salud y la función vascular, y que en poblaciones con una dieta rica en frutas y hortalizas existe una menor incidencia de arteriopatía coronaria. Este efecto se ha relacionado con los efectos beneficiosos de los flavonoides, que son compuestos polifenólicos que se encuentran tanto en frutas como en hortalizas.

- 45 Los flavonoides son un grupo muy grande y ampliamente extendido de compuestos derivados de plantas que se cree que presentan una serie de efectos biológicos que incluyen reducir los niveles plasmáticos de lipoproteínas de baja densidad, inhibir la agregación plaquetaria, eliminar los radicales libres y reducir la proliferación celular, así como modular el tono vascular.

- 50 Se han identificado un gran número de flavonoides y se diferencian entre sí en la orientación de la hidroxilación o metilación, en la posición del sustituyente bencenoide, en el grado de insaturación y en los tipos de sustituyentes unidos. La estructura general de tres anillos (anillos A, B y C) de muchos flavonoides está basada en la estructura de 2-fenil-4H-1-benzopiran-4-ona.



Estructura básica flavonoide

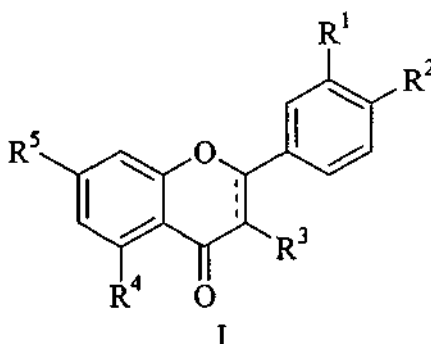
Por ejemplo, el flavonoide sintético 3',4'-dihidroxi flavonol (DiOHF) tiene un grupo hidroxilo en las posiciones 3,3'- y 4' y se ha demostrado que reduce el infarto y las lesiones asociados con isquemia miocárdica y reperfusión durante estudios *in vitro* (Shen Wang, Gregory Dusting, Clive May and Owen Woodman, British Journal of Pharmacology (2004) 142, 443-452).

Sin embargo, la farmacocinética de muchos flavonoides ha limitado gravemente su utilidad terapéutica. Los flavonoides sintéticos tienden a ser moléculas muy solubles en lípidos y, por tanto, tienden a tener baja solubilidad en agua conduciendo a una dificultad en la administración como agente terapéutico. Estas características limitan su aplicabilidad a terapias en las que es deseable una administración parenteral aguda, por ejemplo en terapias de vasodilatación.

Dados los problemas antes identificados, existe una necesidad de desarrollar derivados de flavonoides sintéticos con solubilidad acuosa y farmacocinética mejoradas al compararlos con flavonoides conocidos.

#### SUMARIO DE LA INVENCIÓN

De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica y/o veterinaria que comprende un vehículo o diluyente farmacéuticamente y /o veterinariamente aceptable junto con al menos un compuesto de Fórmula general I:



en la que:

---- denota un enlace sencillo o doble; y

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  están seleccionados independientemente de H, OH o un grupo de acuerdo con la Fórmula (Ia):

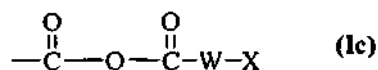


en la que

O es oxígeno;

L y D no están presentes; y

E es un éster de acuerdo con la Fórmula (Ic):



en la que

Q es un alquileo de cadena lineal o ramificada no sustituido, de 1 a 6 átomos de carbono;

W es O; y

X es H, alquilo sustituido o no sustituido, una sal mono-catiónica, o una sal de amonio catiónica; y

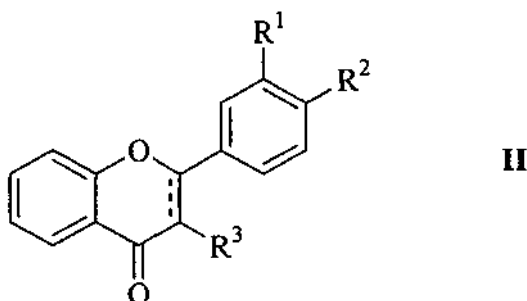
5 con la condición de que al menos uno de  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  o  $R^5$  sea distinto de H u OH;

o su sal farmacéuticamente aceptable.

Preferiblemente, Q es un alquileo inferior sustituido o no sustituido.

En otra realización, E es un éster fosfato de acuerdo con la Fórmula (Id):

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica y/o veterinaria que comprende un  
10 vehículo o diluyente farmacéuticamente y /o veterinariamente aceptable junto con al menos un compuesto de Fórmula  
general II:

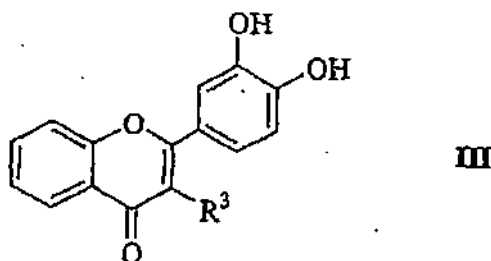


en la que

---- denota un enlace sencillo o doble; y

15  $R^1, R^2$  y  $R^3$  son como se ha especificado antes.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona una composición farmacéutica y/o veterinaria que comprende un vehículo o diluyente farmacéuticamente y /o veterinariamente aceptable junto con al menos un compuesto de Fórmula general III:



20 en la que  $R^3$  es como se ha especificado antes.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto seleccionado del grupo 3-(benciloxicarbonilbutilcarbonilo)flavona; 3-hemidiadipato de 3-hidroxi-4'-hidroxi-3-(benciloxicarbonilbutilcarbonilo)flavona; 3-hemidiadipato de 4'-hidroxi-3',4'-dibenciloxi-3-(benciloxicarbonilbutilcarbonilo)flavona; 3-hemidiadipato de 3',4'-dihidroxi-3,4'-di(benciloxicarbonilbutilcarbonilo)flavona; 3,4'-bis(hemidiadipato) de flavona; 3,7-di(benciloxicarbonilbutilcarbonilo)flavona; 3,7-bis(hemidiadipato) de 3,7-dihidroxi-4'-hidroxi-3-hidroxi-3-amonio cuaternario.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica y/o veterinaria que comprende un vehículo o diluyente farmacéuticamente y/o veterinariamente aceptable junto con al menos un compuesto seleccionado del grupo que comprende 3-(benciloxycarbonilbutilcarbonilo)flavona; 3-hemidipato de 3-hidroxiflavona; 4'-(benciloxi)-3-(benciloxycarbonilbutilcarbonilo)flavona; 3-hemidipato de 4'-hidroxiflavona;

3',4'-dibenciloxi-3-(benciloxicarbonilbutilcarboniloxi)flavona; 3-hemiadipato de 3',4'-dihidroxi-3-(benciloxicarbonilbutilcarboniloxi)flavona; 3,4'-bis(hemiadipato) de 3',4'-dihidroxi-3-(benciloxicarbonilbutilcarboniloxi)flavona; 3,7-di-(benciloxicarbonilbutilcarboniloxi)flavona; 3-(dibenciloxifosforiloxi)flavona; 3,7-bis(hemiadipato) de 3,7-dihidroxi-3-(benciloxicarbonilbutilcarboniloxi)flavona; éster de 4'-hidroxi-3-hidroxi-3-(benciloxicarbonilbutilcarboniloxi)flavona-3-amonio cuaternario; o sal disódica de 3-fosfato de 3,7-dihidroxi-3-(benciloxicarbonilbutilcarboniloxi)flavona.

5 En otro aspecto más, la presente invención proporciona un compuesto como se ha especificado antes para su uso en la prevención y/o tratamiento de enfermedades en un sujeto asociado con la presencia de especies reactivas de oxígeno (ERO).

Preferiblemente, el sujeto que necesita dicho tratamiento está en riesgo de desarrollar isquemia. Más preferiblemente, el sujeto padece isquemia y/o lesión por reperusión como resultado de una patología aguda o crónica.

10 En una realización particular, la patología crónica está seleccionada de cáncer, enfermedad cerebrovascular, enfermedad vascular pulmonar, aterosclerosis, enfermedad arterial, cardiopatía congestiva, enfermedad coronaria, enfermedad vascular periférica, diabetes, hipertensión, migraña, quemaduras, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfermedad vascular retiniana.

15 En otra realización, la patología aguda está seleccionada de accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, traumatismo mecánico originado por lesión por aplastamiento o cirugía. Preferiblemente, la cirugía es cirugía vascular. Más preferiblemente, la cirugía vascular es una cirugía de derivación cardíaca y/o trasplante.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto como se ha especificado antes para su uso en la prevención, retraso del inicio y/o ralentización de la progresión de aterosclerosis y/o cardiopatía coronaria en un sujeto.

20 Aun en otro aspecto más, la presente invención proporciona un compuesto como se ha especificado antes para su uso en la prevención y/o al menos mejoría de la lesión a un sujeto causada por isquemia y/o lesión por reperfundición.

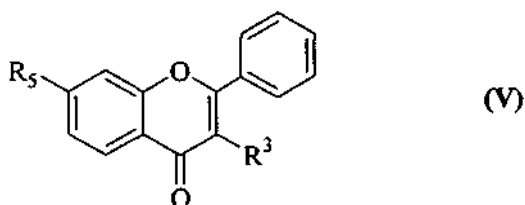
Aun en otro aspecto más, la presente invención proporciona un compuesto como se ha especificado antes para su uso en la prevención y/o al menos mejoría de la lesión a un sujeto causada por la administración de un agente terapéutico.

Preferiblemente, el agente terapéutico es un agente terapéutico oxidante.

25 En una realización particular, el agente terapéutico es un agente antineoplásico. Preferiblemente, el agente antineoplásico es antraciclina y sus derivados.

En realizaciones particulares, el compuesto se administra por vía oral.

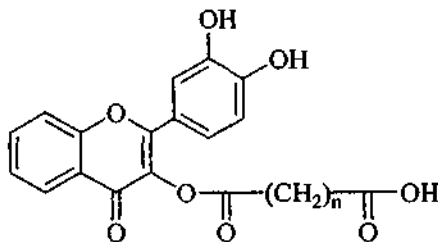
En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula general V:



en la que  $R^3$  y  $R^5$  se han especificado antes.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de síntesis de compuestos como se ha especificado antes.

En otra realización, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula general:



$n$  es un número entero de 2 a 6; preferiblemente  $n$  es 4;

Las fórmulas dadas en la presente memoria pretenden abarcar todos los posibles isómeros geométricos y ópticos, así como las mezclas racémicas de los mismos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos de síntesis de compuestos de acuerdo con la Fórmula I, Fórmula II o Fórmula III, en las que  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ , Q, W, X, n tienen los mismos significados que antes, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvatos de los mismos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica y/o veterinaria que comprende un vehículo o diluyente farmacéutica y/o veterinariamente aceptable junto con al menos un compuesto de acuerdo con la Fórmula I, Fórmula II o Fórmula III, en las que  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ , Q, W, X, n tienen el mismo significado que antes, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvatos de los mismos.

Se describe un procedimiento de prevención y/o al menos mejoría de la lesión a un sujeto causada por la administración de un agente terapéutico, comprendiendo el procedimiento coadministrar a un sujeto:

ii) un agente terapéutico; y

ii) una cantidad eficaz de al menos un compuesto de acuerdo con la Fórmula I, Fórmula II, Fórmula III o Fórmula V, en las que  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ , Q, W, X, n tienen los mismos significados que antes, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvatos de los mismos.

Se describe un procedimiento de prevención y/o tratamiento de enfermedades asociadas con la presencia de especies reactivas de oxígeno (ERO), comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad eficaz de al menos un compuesto de acuerdo con la Fórmula I, Fórmula II, Fórmula III o Fórmula V, en las que  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ , Q, W, X, n tienen los mismos significados que antes, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvatos de los mismos.

Se describe un procedimiento de prevención y/o tratamiento de enfermedades asociadas con la presencia de especies reactivas de oxígeno (ERO), comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad eficaz de al menos un compuesto de acuerdo con la Fórmula I, Fórmula II o Fórmula III, en las que  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ , Q, W, X, n tienen los mismos significados que antes, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvatos de los mismos.

De forma típica, el sujeto que necesita tratamiento será una persona en riesgo de desarrollar isquemia. De forma alternativa, el sujeto puede ser una persona que padezca actualmente isquemia y/o reperusión como resultado de una patología aguda o crónica.

Se describe un procedimiento de prevención y/o al menos mejoría de lesiones causadas por isquemia y/o reperusión, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad eficaz de al menos un compuesto de acuerdo con la Fórmula I, Fórmula II o Fórmula III, en las que  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ , Q, W, X, n tienen los mismos significados que antes, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvatos de los mismos.

Preferiblemente, el grupo solubilizante hace al compuesto al menos parcialmente soluble, y más preferiblemente, totalmente soluble en solución acuosa, preferiblemente agua.

Preferiblemente, los compuestos de la invención tienen al menos un sustituyente escindible por enzimas *in vivo*.

Preferiblemente, el sustituyente escindible por enzimas *in vivo* es un grupo ionizable a pH fisiológico.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**Figura 1** ilustra el esquema de síntesis para la síntesis de sal disódica de 3-fosfato de 3-hidroxiflavona (5).

**Figura 2** ilustra el esquema de síntesis para la síntesis de 3-fosfato de 3',4'-dihidroxiflavona (10).

**Figura 3** ilustra el esquema de síntesis para la síntesis de 3-hemisuccinato de 3-hidroxiflavona (15) a través de éster monobencílico del ácido succínico.

**Figura 4** ilustra el esquema de síntesis para la síntesis de 3-hemiadipato de 3-hidroxiflavona (19) a través de éster monobencílico de ácido adípico.

**Figura 5** ilustra el esquema de síntesis para la síntesis de 3-hemiadipato de 3',4'-dihidroxiflavona (21).

**Figura 6** ilustra los efectos del vehículo (dH<sub>2</sub>O), 3-hemiadipato de flavona (19) (F3HA), en presencia y ausencia de butiril colinesterasa (BuCHE, 1000 U/l) y DiOHF (10<sup>-4</sup> M) en el nivel de aniones superóxido generados en la aorta de la rata en presencia de NADPH expresado como porcentaje del control.

**Figura 7** ilustra los efectos del vehículo (dH<sub>2</sub>O), 3-hemiadipato de 3',4'-dihidroxiflavona (21) (DiOHF3HA, 10<sup>-6</sup> M - 10<sup>-4</sup> M) en presencia y ausencia de butiril colinesterasa (BuCHE, 1000 U/l) y DiOHF (10<sup>-4</sup> M) en el nivel de aniones superóxido generados en la aorta de la rata en presencia de NADPH expresado como porcentaje del control.

**Figura 8** ilustra curvas de concentración respuesta a Ca<sup>2+</sup> en presencia de vehículo o 3-hemiadipato de

3',4'-dihydroxiflavona (21) (DiOHF3HA,  $10^{-4}$  M), en presencia y ausencia de BuCHE, comparado con DiOHF en anillos aórticos con el endotelio intacto aislados de ratas. Las concentraciones se expresan como porcentaje de la respuesta inicial a  $\text{Ca}^{2+}$  ( $3 \times 10^{-3}$  M) observada antes del tratamiento con DiOHF3HA.

**Figura 9** ilustra los efectos del vehículo ( $\text{dH}_2\text{O}$ ), 3-fosfato de flavona (F3P,  $10^{-8}$  M a  $10^{-4}$  M) en presencia de fosfatasa (1000 U/l) y DiOHF ( $10^{-4}$  M) en el nivel de aniones superóxido generados en la aorta de la rata en presencia de NADPH expresado como porcentaje del control.

**Figura 10** ilustra curvas de concentración respuesta a  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de vehículo o 3-fosfato de flavona (F3P,  $10^{-8}$  M a  $10^{-4}$  M) en presencia y ausencia de fosfatasa (P, 1000 U/l) en anillos aórticos con el endotelio intacto aislados de ratas. Las contracciones se expresan como porcentaje de la respuesta inicial a  $\text{Ca}^{2+}$  ( $3 \times 10^{-3}$  M) observada antes del tratamiento con 3-fosfato de flavona.

**Figura 11** ilustra el efecto relajador directo del vehículo, 1000U/l de BuCHE, DiOHF3HA ( $10^{-4}$  M), DiOHF3HA ( $10^{-4}$  M) más 1000U/l de BuCHE. Vehículo, 1000U/l de BuCHE y DiOHF3HA ( $10^{-4}$  M) no tienen efecto sobre vasos precontraídos con PE. DiOHF3HA ( $10^{-4}$  M) más 1000U/l de BuCHE tienen un notable efecto sobre el tono vascular en la aorta de la rata precontraída con PE.

**Figura 12(a)** ilustra la disminución dependiente de la dosis en la MAP (mm Hg) indicando vasodilatación como respuesta a DiOHF3HA en ratas anestesiadas.

**Figura 12(b)** ilustra la disminución dependiente de la dosis en la frecuencia cardíaca (latidos/min) como respuesta a DiOHF3HA.

**Figura 13** ilustra la disminución de la MAP (mm Hg) indicando vasodilatación como respuesta a ACh en ratas anestesiadas, la respuesta dilatadora a ACh se potenció por un tratamiento previo de 30 minutos con 3 mg/kg de DiOHF3HA. Un aumento en la MAP (mm Hg) indicando vasoconstricción en respuesta a PE en ratas anestesiadas, las respuestas constrictoras a PE disminuyeron por el tratamiento previo de 30 min de 3 mg/kg de DiOHF3HA.

**Figura 14** ilustra las curvas de concentración respuesta a PE generadas en presencia de control, DiOHF3HA con y sin BuCHE y DiOHF en anillos aórticos de rata. DiOHF3HA en presencia de BuCHE y DiOHF parecen inhibir ambos la respuesta a PE de una forma que depende de la concentración.

|                              | Contracción máxima (porcentaje de $\text{Ca}^{2+}$ 3 mM) |
|------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Control                      | 101±1                                                    |
| DiOHF3HA $10^{-4}$ M         | 101±1                                                    |
| DiOHF3HA $10^{-4}$ M + BuCHE | 35±6                                                     |
| DiOHF $10^{-4}$ M            | 18±2                                                     |

**Figura 15** ilustra el efecto de fosfatasa (1000U/l) y 3-fosfato de flavona, (F3P) ( $10^{-5}$  M- $10^{-4}$  M) con fosfatasa sobre las curvas de concentración respuesta a ACh en anillos aórticos con el endotelio intacto de ratas (n=5). La respuesta relajadora a ACh no parece ser efectuada únicamente por la fosfatasa, sin embargo, las respuesta relajadoras a ACh se potenciaron en presencia de F3P con fosfatasa en ambas concentraciones probadas cuando se comparan con anillos control.

|                        | pEC <sub>50</sub> | R     |
|------------------------|-------------------|-------|
| Control                | 7,31±0,03         | 100±3 |
| Fosfatasa $10^4$ M (P) | 7,30±0,04         | 100±1 |
| F3P $10^{-5}$ M + P    | 7,80±0,06         | 100±1 |
| F3P $10^{-4}$ M + P    | 7,70±0,07         | 100±1 |

**Figura 16a** ilustra las disminuciones dependientes de la dosis en MAP (mm Hg) en respuesta a F3P y DiOHF en ratas anestesiadas.

**Figura 16b** ilustra la disminución dependiente de la dosis en la frecuencia cardíaca (latidos/min) en respuesta a F3P y DiOHF en ratas anestesiadas.

**Figura 17** ilustra el área de miocardio en riesgo (panel izquierdo) y tamaño del infarto de miocardio (panel derecho) en los grupos control (n=4), tratados con DiOHF (2 mg/kg, n=2 y 5 mg/kg, n=3) y DiOHF3HA (2,7 mg/kg, n=3 y 6,6 mg/kg, n=4) de ovejas anestesiadas. AR/LV% = área en riesgo expresada como porcentaje del volumen ventricular izquierdo total. IS/AR% = tamaño del infarto expresado como porcentaje del área de miocardio en riesgo. \* indica diferencia significativa en el tamaño del infarto entre los animales control y tratados con adipato (6,6 mg/kg).

**Figura 18** ilustra la latencia al tacto (A & C) y retirada (B & D) de un estímulo en la extremidad anterior contralateral

comparado con la extremidad anterior ipsilateral valorada 24, 48 y 72 horas después de un accidente cerebrovascular inducido por ET-1 y tratamiento con vehículo (A & B) o DiOHF3HA (15 mg/kg/día) (C & D) en ratas con accidente cerebrovascular de leve a moderado.

5 **Figura 19** ilustra el efecto de la administración retrasada de DiOHF3HA (15 mg/kg/día) o vehículo sobre el área del infarto en la corteza (A) y cuerpo estriado (B) en ratas con accidente cerebrovascular de leve a moderado.

### Definiciones

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “alquilo” incluye cadenas hidrocarbonadas ramificadas y no ramificadas tales como, metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo, *n*-butilo, *sec*-butilo, *iso*-butilo, *terc*-butilo, octa-decilo y 2-metilpentilo. Estos grupos pueden estar sustituidos o no sustituidos con uno o más grupos funcionales que están unidos habitualmente a tales cadenas, tales como, hidroxilo, bromo, fluoro, cloro, yodo, mercapto o tio, ciano, alquiltio, heterociclilo, arilo, heteroarilo, carboxilo, carbalcoilo, alquilo, alqueniilo, nitro, amino, alcoxi, amido, y similares para formar grupos alquilo tales como trifluorometilo, 3-hidroxihexilo, 2-carboxipropilo, 2-fluoroetilo, carboximetilo, cianobutilo y similares.

El término “inferior” en el presente documento incluye una cadena lineal o ramificada de 1 a 6 átomos de carbono.

15 El término “alquilenilo” se refiere a un alquilo divalente como se ha definido antes, tal como metileno ( $-\text{CH}_2-$ ), propileno ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), cloroetileno ( $-\text{CHClCH}_2-$ ), 2-tiobuteno  $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{SH})\text{CH}_2\text{CH}_2$ , 1-bromo-3-hidroxil-4-metilpenteno ( $-\text{CHBrCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ ), metiletileno, trimetileno, 1-propileno, 2-propileno, tetrametileno, 1-metiltrimetileno, 2-metiltrimetileno, 3-metiltrimetileno, 1-etiletileno, 2-etiletileno, pentametileno, 1-metiltetrametileno, 2-metiltetrametileno, 3-metiltetrametileno, 4-metiltetrametileno y hexametileno y similares.

20 El término “alqueniilo” incluye cadenas hidrocarbonadas ramificadas o no ramificadas que contienen uno o más dobles enlaces carbono-carbono.

El término “alquiniilo” incluye cadenas hidrocarbonadas ramificadas o no ramificadas que contienen uno o más triples enlaces carbono-carbono.

25 “Arilo” significa un grupo aromático carbocíclico que tiene un anillo único (por ejemplo, fenilo), varios anillos (por ejemplo, bifenilo), o varios anillos condensados en los cuales al menos uno es aromático (por ejemplo, 1,2,3,4-tetrahidronaftilo, naftilo), que está opcionalmente mono-, di- o trisustituido. Los grupos arilo en el presente documento no están sustituidos o, como se especifica, están sustituidos en una o más posiciones sustituibles con diversos grupos.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término “cicloalquilo” se refiere a radicales carbocíclicos saturados que tienen tres a doce átomos de carbono. El cicloalquilo puede ser monocíclico o un sistema condensado policíclico. Ejemplos de tales radicales incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo. Los grupos cicloalquilo en el presente documento no están sustituidos o, como se especifica, están sustituidos en una o más posiciones sustituibles con diversos grupos. Por ejemplo, tales grupos cicloalquilo pueden estar opcionalmente sustituidos con alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , alcoxi  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , halógeno, hidroxilo, ciano, nitro, amino, mono(alquil  $\text{C}_1\text{-C}_6$ )amino, di(alquil  $\text{C}_1\text{-C}_6$ )amino, alqueniilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , alquiniilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , haloalquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , haloalcoxi  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , amino(alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ ), mono(alquil  $\text{C}_1\text{-C}_6$ )amino(alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ ) o di(alquil  $\text{C}_1\text{-C}_6$ )amino(alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ ).

El término “acilo” incluye un grupo  $-\text{C}(\text{O})\text{R}$  en el que R es alquilo o arilo como se define antes, tal como formilo, acetilo, propionilo, o butirilo.

40 El término “alcoxi” incluye  $-\text{OR}-$ , donde R es alquilo. El término “radicales alcoxi inferiores” puede ser los citados grupos alcoxi lineales o ramificados de 1 a 6 átomos de carbono, tales como grupos metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, isobutoxi, *sec*-butoxi, *terc*-butoxi, pentiloxi, isopentiloxi, hexiloxi e isohexiloxi.

El término “amido” incluye una unión amida:  $-\text{C}(\text{O})\text{NR}-$  (donde R es hidrógeno o alquilo).

El término “amino” incluye una unión amina:  $-\text{NR}-$ , donde R es hidrógeno o alquilo.

El término “carboxilo” indica  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ , y el término “carbonilo” indica  $-\text{C}(\text{O})-$ .

45 El término “carbonato” indica  $-\text{OC}(\text{O})\text{O}-$ .

El término “sulfonato” indica  $-\text{S}(\text{O})_2\text{O}^-$ .

El término “éster fosfonato” indica

El término “ácido carboxílico” indica  $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ .

El término “ácido sulfónico” indica  $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ .

50 El término “ácido fosfónico” indica  $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ .



El término “fosfamato” indica  $\text{-Ar-NHPO}_4^-$ .

El término “éster fosfato” indica  $\text{-O-P(O)(OR)}_2$ .

El término “sulfamato” indica  $\text{-Ar-NHSO}_3^-$ .

El término “ésteres sulfónicos” indica  $\text{-S(O)}_2\text{-OR}$ .

5 El término “sulfonato” indica  $\text{-S(O)}_2\text{O}^-$ .

El término “éster fosfonato” indica  $\text{R-P(O)(OR)}_2$ .

El término “ácido carboxílico” indica  $\text{-C(O)OH}$ .

El término “ácido sulfónico” indica  $\text{-S(O)}_2\text{OH}$ .

El término “ácido fosfónico” indica  $\text{-P(O)(OH)}_2$ .

10 El término “fosfamato” indica  $\text{-Ar-NHPO}_4^-$ .

El término “carbamato” indica  $\text{NHC(O)O-}$ .

Las cadenas hidrocarbonadas pueden estar opcionalmente interrumpidas por uno o más heteroátomos.

Cuando está presente, el grupo enlazador puede ser cualquiera de una serie de tales moléculas conocidas en el área descritas en el presente documento.

15 Como es evidente de la descripción anterior, el grupo espaciador D puede estar ausente. Como es evidente de la descripción anterior, el grupo enlazador puede estar ausente.

## DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES

La presente invención proporciona derivados de flavonoides y composiciones que contienen derivados de flavonoides, y procedimientos de uso de los mismos.

20 La presencia de especies reactivas de oxígeno (ERO) en tejido vivo ha mostrado estar asociada con muchos trastornos en animales. Las especies reactivas de oxígeno pueden contener tanto nitrógeno como oxígeno, o solo átomos de oxígeno. Algunos ejemplos de moléculas ERO incluyen singlete  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , radicales libres tales como  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{O}_2^\cdot$ ,  $\text{NO}^\cdot$  y  $\text{ROO}^\cdot$ . Muchas de estas especies se forman durante la actividad metabólica normal, pero sus niveles de concentración pueden elevarse en condiciones de estrés oxidativo asociado con inflamación crónica, infecciones u otras enfermedades.

25 Muchas moléculas ERO son el resultado de procesos que se producen naturalmente tales como metabolismo del oxígeno y procesos inflamatorios. Por ejemplo, cuando las células usan oxígeno para generar energía, se crean radicales libres como consecuencia de la producción de ATP por las mitocondrias. El ejercicio puede elevar los niveles de radicales libres como lo pueden hacer los estímulos medioambientales tales como la radiación ionizante (de la industria, exposición solar, rayos cósmicos y rayos X médicos), toxinas medioambientales, condiciones atmosféricas alteradas (por ejemplo, hipoxia e hiperoxia), ozono y óxido de nitrógeno (principalmente de los gases de escape de los automóviles, terapéuticos). Los factores de estrés por el estilo de vida tales como el consumo de tabaco y el consumo excesivo de alcohol también son conocidos por afectar a los niveles de radicales libres. Las especies de radicales pueden combinarse para formar otras especies más dañinas o tóxicas tales como peroxinitrito  $\text{ONOO}^-$ , un producto de la reacción de radicales superóxido y óxido nítrico.

30 Otra fuente de especies de ERO son algunos agentes terapéuticos, tales como fármacos antineoplásicos. Los derivados de antraciclina son agentes antineoplásicos muy útiles en el tratamiento de neoplasias tales como leucemia aguda, linfoma maligno, etc., Sin embargo, una característica no deseable de su administración puede ser la lesión oxidativa al tejido, que puede conducir a cardiomiopatía y posible insuficiencia cardíaca. La presencia del agente terapéutico puede, por tanto, causar el desarrollo de insuficiencia cardíaca congestiva (CHF). Esta característica de algunos agentes terapéuticos puede limitar su eficacia y sería útil desarrollar una pauta de coadministración apropiada.

Así, en un aspecto, se describe un procedimiento de prevención y/o al menos mejoría de la lesión a un sujeto causada por la administración de un agente terapéutico, comprendiendo el procedimiento coadministrar a un sujeto:

i) un agente terapéutico; y

45 ii) una cantidad eficaz de al menos un compuesto de acuerdo con la Fórmula I, Fórmula II o Fórmula III, en las que  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^3$ ,  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^5$ , Q, W, X, n tienen los mismos significados que antes, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvatos de los mismos.

En otro aspecto, se describe un procedimiento de prevención y/o al menos mejoría de la lesión a la piel de un sujeto,

que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de la invención. Con este aspecto, preferiblemente la composición se formula en un protector solar. La composición puede aplicarse por vía tópica a la piel. La composición puede contener emolientes e hidratantes.

5 En otro aspecto, se describe un procedimiento de prevención y/o reversión de los efectos del envejecimiento, de reducción de las arrugas aparentes y/o tratamiento o prevención de la piel seca.

Se describe un procedimiento de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno que conlleve lesión oxidativa, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de la invención.

10 Preferiblemente, la enfermedad o trastorno que conlleva lesión oxidativa está seleccionada del grupo que consiste en cáncer, cardiopatía, trastornos neurológicos, enfermedades autoinmunitarias, lesión por isquemia-reperusión, complicaciones diabéticas, choque séptico, hepatitis, aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer y complicaciones derivadas del VIH o hepatitis, incluyendo hepatitis B.

En una realización particular, el sujeto es un mamífero. El animal puede seleccionarse del grupo que consiste en seres humanos, primates no humanos, ganado vacuno, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos, pájaros, pollos u otras aves, patos, gansos, faisanes, pavos, codornices, cobayos, conejos, hámsteres, ratas y ratones.

15 En algunos aspectos, el derivado o derivados de flavonoides se administran de forma simultánea, por separado o secuencialmente con el uno o más agentes terapéuticos.

Cuando se usan en dicha combinación el uno o más agentes terapéuticos y el uno o más derivados de flavonoides de acuerdo con la presente invención pueden administrarse como agentes separados al mismo tiempo o en diferentes tiempos o pueden formularse como una única composición que comprende ambos compuestos.

20 Los radicales libres reaccionan con sustratos orgánicos fundamentales en células tales como lípidos, proteínas y ADN. La oxidación de estas biomoléculas puede dañar las mismas, alterar las funciones normales y puede contribuir a una diversidad de estados de enfermedad. Se ha observado que determinados sistemas de órganos están predispuestos a mayores niveles de estrés oxidativo o estrés nitrosativo. Estos sistemas de órganos más susceptibles a la lesión son el sistema pulmonar (expuesto a altos niveles de oxígeno), el cerebro (presenta intensa actividad metabólica y todavía tiene menores niveles de antioxidantes endógenos), el ojo (constantemente expuesto a radiación UV perjudicial), sistema circulatorio (víctima de niveles de oxígeno y óxido nítrico fluctuantes) y sistemas reproductores (en riesgo de actividad metabólica intensa de los espermatozoides).

25 Ejemplos de trastornos agudos relevantes que causan la producción de ERO incluyen isquemia y reperusión, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio o traumatismo mecánico, tal como lesión por aplastamiento o cirugía. Algunas formas de cirugía tal como cirugía de derivación cardíaca o cirugía de trasplante causan necesariamente isquemia y reperusión del tejido. De forma típica, se administran uno o más derivados de flavonoides de acuerdo con la presente invención al sujeto antes y/o durante la cirugía.

30 Trastornos crónicos pueden elegirse del grupo que incluye cáncer, enfermedad cerebrovascular, aterosclerosis, enfermedad arterial incluyendo enfermedad coronaria, enfermedad vascular periférica (incluyendo lesión causada por enfermedades tales como diabetes), hipertensión, hipertensión pulmonar, enfermedad obstructiva de las vías respiratorias, enfisema, trastornos neurológicos, trastornos autoinmunitarios, complicaciones diabéticas, choque séptico e hipovolémico, quemaduras, hepatitis y complicaciones derivadas de la hepatitis y el VIH. Otro trastorno crónico puede elegirse de las complicaciones derivadas de la administración de atmósferas hiperbáricas y de alta presión de oxígeno, aplicadas frecuentemente para ayudar a respirar en particular en bebés prematuros, incluyendo lesión retiniana o en otras partes del ojo. Puede diagnosticarse a los sujetos en riesgo de trastornos crónicos relevantes por análisis de síntomas, pruebas diagnósticas, marcadores enzimáticos o por pruebas genéticas para identificar una predisposición genética. La predisposición a determinados trastornos agudos tales como ataque al corazón o accidente cerebrovascular pueden identificarse por pruebas genéticas y pueden dar lugar a la aplicación profiláctica de uno o más derivados de flavonoides al sujeto en riesgo. Trastornos inducidos por fármacos debido a ERO, por ejemplo, insuficiencia cardíaca congestiva inducida por fármacos.

35 Si la enfermedad o trastorno es accidente cerebrovascular o riesgo de accidente cerebrovascular, la composición descrita antes se administra preferiblemente antes de que se produzca el accidente cerebrovascular como medida profiláctica para reducir el riesgo de que se produzca el accidente cerebrovascular, o en las doce horas siguientes (preferiblemente en las cuatro horas) después de que se produzca el accidente cerebrovascular.

50 Un ejemplo de una patología inducida por ERO es la isquemia en la que un déficit de flujo sanguíneo a partir del cuerpo da lugar a una perfusión tisular inadecuada con oxígeno. La isquemia causa lesión tisular, dependiendo la gravedad de la lesión del lapso de tiempo en que el tejido está privado de oxígeno y de si se produce una reperusión adecuada de oxígeno después del evento isquémico.

55 Al menos un compuesto de acuerdo con la presente invención puede administrarse por una serie de vías diferentes, por ejemplo, por vía tópica, oral, subcutánea, intramuscular, intraarterial y/o intravenosa.

## Síntesis de compuestos

La presente invención proporciona compuestos flavonoides de acuerdo con la Fórmula I, II, III o IV, V y procedimientos de síntesis de tales compuestos.

## Derivados de flavonoides

- 5 Se producen derivados de fosfato flavonoides por una estrategia de síntesis de protección/desprotección selectiva.

### *Sal disódica de 3-fosfato de 3-hidroxi flavona (5)*

- Con referencia a la Figura 1, se muestra el enfoque para la síntesis de sal disódica de 3-fosfato de 3-hidroxi flavona. Se sometió a fosfitilación 3-hidroxi flavona (1) cuando se trató con N,N-diisopropilfosforamidito de dibencilo y se oxidó directamente el fosfato intermedio por ácido *m*-cloroperbenzoico (mCPBA) a su fosfato protegido correspondiente. El éster fosfato se purificó por cromatografía ultrarrápida seguida de recristalización, rendimiento 45%.

El éster fosfato se sometió a hidrogenólisis en etanol con hidróxido de paladio para formar el fosfato, que se convirtió inmediatamente en su sal disódica mediante adición de un ligero exceso de solución de hidróxido sódico 0,1 M. La desprotección por hidrogenólisis proporcionó una muestra pura de sal disódica de 3-fosfato de 3-hidroxi flavona con un rendimiento del 73%.

- 15 La sal diamonio correspondiente se produjo por cromatografía de intercambio iónico usando una columna de dietilaminoetilo (DEAE) de (5).

### *3-Fosfato de 3',4'-dihidroxi flavona (como sal disódica) (10)*

Se llevó a cabo un procedimiento idéntico para la síntesis del análogo de trihidroxi flavona como se muestra en la Figura 2.

- 20 Así, se sometió 3',4'-dibenciloxi-3-hidroxi flavona (6) a fosfitilación por diisopropil N,N-dibenciloxifosforamidita en presencia de 1*H*-tetrazol para formar el dibenciloxi éster de 3-fosfito de 3',4'-dibenciloxi-flavonafosfito (7), que se oxidó por mCPBA al éster fosfato protegido, dibenciloxi éster de 3-fosfato de 3',4'-dibenciloxi-flavona (8). Estas dos etapas produjeron el compuesto deseado con un rendimiento del 40% después de cristalización.

- 25 El éster fosfato se sometió entonces a hidrogenólisis en etanol con paladio para formar el 3-fosfato de 3',3'-dihidroxi-flavona (9) deseado que se convirtió en la sal disódica correspondiente, sal disódica de 3-fosfato de 3',4'-dihidroxi-flavona (10) mediante la adición de NaOH.

## Derivados éster de flavonoides

### *3-Hemisuccinato de 3-hidroxi flavona (15)*

- 30 Se produjo 3-hemisuccinato de 3-hidroxi flavona (15) de acuerdo con la reacción representada en la Figura 3. La reacción de anhídrido succínico (11) y alcohol bencilico (12) en presencia de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) y piridina en diclorometano produjo el monobencil éster del ácido succínico (13) como escamas cristalinas blancas con un 77% de rendimiento. Este derivado de ácido succínico protegido se acopló con 3-hidroxi flavona (1) en presencia de DCC y DMAP, formando monobencil éster de 3-hemisuccinato de flavona (14) como aceite amarillo o pardo que solidificó en reposo, con rendimientos de hasta un 96% producido.

- 35 La desprotección del monobencil éster para formar el hemisuccinato correspondiente usando Pd(OAc)<sub>2</sub> en el sistema disolvente de THF:EtOH:ácido acético, se llevó a cabo la reacción a mayor escala proporcionando el 3-hemisuccinato de 3-hidroxi flavona (15) requerido.

### *3-Hemiadipato de 3-hidroxi flavona (19)*

- 40 Se sintetizó 3-hemiadipato de 3-hidroxi flavona (19) siguiendo un procedimiento similar al descrito antes para el hemisuccinato, como se muestra en la Figura 4.

Se produjo monobencil éster del ácido adípico (17) a partir de ácido adípico y alcohol bencilico en presencia de *p*-TsOH proporcionando el producto deseado como un aceite incoloro con un 34% de rendimiento.

- 45 El ácido adípico protegido se sometió a acoplamiento con DCC con 3-hidroxi flavona (1) para formar monobencil éster de 3-hemiadipato de flavona como una goma amarillo/pardo con un 59% de rendimiento. La hidrogenación de este compuesto en presencia de catalizador de Pd(OH)<sub>2</sub>, usando un sistema disolvente basado en THF (THF:EtOH 9:1 + 0,05% de ácido acético) dio lugar a la hidrogenólisis del monobencil éster, formando 3-hemiadipato de flavona como un sólido amarillo con un 89% de rendimiento.

### *3-Hemiadipato de 3',4'-dihidroxi flavona (21)*

El esquema para la síntesis de 3-hemiadipato de 3',4'-dihidroxi flavona (21) se ilustra en la Figura 5. Siguiendo la

metodología establecida antes, se sometió 3',4'-dibenciloxi-3-hidroxi-flavona (6) y monobencil éster del ácido adípico (17) a acoplamiento con DCC para producir el monobencil éster de hemiadipato como una goma color pardo con un 59% de rendimiento.

- 5 La desprotección por hidrogenólisis a pequeña escala (100-500 mg) transcurrió suavemente hasta finalización en 3-5 horas dando el 3-hemiadipato de 3',4'-dihidroxi-flavona (21) con un 33% de rendimiento.

### III Composiciones y procedimientos

- 10 Los compuestos de la presente invención pueden formularse en una diversidad de vehículos y sistemas de liberación. La cantidad del compuesto terapéutico a administrar y la concentración del compuesto dependen del vehículo o dispositivo seleccionado, del estado clínico del paciente, de los efectos secundarios y de la estabilidad del compuesto de la formulación. Así, el médico emplea la preparación apropiada que contiene la concentración apropiada del compuesto terapéutico y selecciona la cantidad de formulación administrada, dependiendo de la experiencia clínica con el paciente en cuestión o con pacientes similares.

- 15 Además, pueden incluirse en la formulación excipientes. Ejemplos incluyen codisolventes, tensioactivos, aceites, humectantes, emolientes, conservantes, estabilizadores y antioxidantes. Puede usarse cualquier tampón farmacológicamente aceptable, por ejemplo, Tris o fosfato. Cantidades eficaces de diluyentes, aditivos o excipientes son aquellas cantidades que son eficaces para obtener una formulación farmacéuticamente aceptable en términos de solubilidad, actividad biológica, etc.

- 20 Así, una composición de la invención incluye un compuesto terapéutico que puede formularse con vehículos convencionales, farmacéuticamente aceptables para administración tópica, oral o parenteral. Las formulaciones pueden incluir también pequeñas cantidades de adyuvantes tales como tampones y conservantes para mantener la isotonicidad, estabilidad fisiológica y pH.

### IV Administración

Los compuestos de la invención pueden administrarse tanto a seres humanos como a animales.

- 25 Los compuestos de la presente invención pueden administrarse en composiciones en las que el compuesto activo esté íntimamente mezclado con uno o más ingredientes inertes y opcionalmente incluye uno o más ingredientes activos adicionales. Los compuestos pueden usarse en cualquier composición conocida por los expertos en la técnica para la administración a seres humanos y animales.

- 30 La composición de la invención puede administrarse mediante una vía apropiada de acuerdo con la forma de dosificación. Por ejemplo, la inyección puede ser administrada por vía intravenosa, intraarterial, subcutánea, intramuscular y similares.

- 35 Para administración oral, pueden prepararse cualquiera de las formas de monodosis sólidas o fluidas. Las formas solubles en agua pueden disolverse en un vehículo acuoso junto con azúcar, agentes aromatizantes aromáticos y conservantes para formar un jarabe. Se prepara un elixir usando un vehículo hidro-alcohólico (por ejemplo, etanol) con edulcorantes adecuados tales como azúcar y sacarina, junto con un agente aromatizante aromático. Pueden prepararse suspensiones con un vehículo acuoso con la ayuda de un agente de suspensión tal como goma arábiga, tragacanto, metilcelulosa y similares. Los compuestos flavonoides sintéticos de la presente invención pueden formularse también con agentes estabilizadores, por ejemplo, agentes reductores quelantes metálicos tal como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o un agente reductor tal como metabisulfito sódico.

- 40 Formulaciones apropiadas para uso parenteral son evidentes para los profesionales con conocimientos medios de la técnica. Normalmente, el compuesto terapéutico se prepara en una solución acuosa en una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg/ml. De forma más típica, la concentración varía de aproximadamente 10 a 60 mg/ml o aproximadamente 20 mg/ml. Concentraciones por debajo de 1 mg/ml pueden ser necesarias en algunos casos dependiendo de la solubilidad y potencia del compuesto seleccionado para su uso. La formulación, que es estéril, es adecuada para diversas vías parenterales que incluyen intradérmica, intraarticular, intramuscular, intravascular, intravenosa, por inhalación y subcutánea.

- 45 Las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden formularse en protectores solares, composiciones para el cuidado de la piel, emolientes o hidratantes.

- 50 Con las composiciones descritas en el presente documento para proporcionar una fuente continua a largo plazo de compuesto terapéutico pueden usarse sistemas de liberación lenta o liberación prolongada, incluyendo cualquiera de una serie de biopolímeros (sistemas con base biológica), sistemas que emplean liposomas y sistemas de liberación poliméricos, por ejemplo, dendrímeros. Tales sistemas de liberación lenta son aplicables a formulaciones para uso tópico, oftálmico, oral y parenteral.

El compuesto o compuestos flavonoides sintéticos de la presente invención también pueden formularse como nutrafarmacéuticos o nutracéuticos. Por ejemplo, el compuesto o compuestos flavonoides sintéticos pueden

formularse en un alimento, tal como un cereal, bebidas, tal como zumo de frutas, bebidas alcohólicas, pan, etc., para su consumo oral.

#### V Actividad vasorrelajadora y antioxidante de derivados de flavonoides

5 Se determinaron y expresaron como porcentaje del control, los efectos del vehículo, 3-hemidipato de flavona ( $10^{-8}$  a  $10^{-4}$  M) y DiOHF ( $10^{-4}$  M) sobre el nivel de aniones superóxido generados en la aorta de la rata en presencia de NADPH. La presencia de 3-hemidipato de flavona pareció no tener efecto sobre la producción de superóxido en ninguna concentración.

10 Con referencia a la Figura 6, se ilustran los efectos del vehículo, 3-hemidipato de flavona (F3HA), en presencia y ausencia de butiril colinesterasa (BuCHE, 1000 U/l) y DiOHF ( $10^{-4}$  M) sobre el nivel de aniones superóxido generados en la aorta de la rata en presencia de NADPH expresado como porcentaje del control. En ausencia de la esterasa no parece haber efecto sobre la producción de superóxido. La presencia de colinesterasa revela un efecto inhibitor dependiente de la concentración de 3-hemidipato de flavona. Esto es consistente con el grupo de hemidipato que se retiró *in vitro* para formar el derivado de hidroxilo libre, 3-hidroxi flavona. La supresión de la producción de superóxido por la inclusión del 3-hemidipato de flavona (19) y esterasa se compara favorablemente con la actividad de DiOHF (3',4'-dihidroxi flavonol). Se ha asociado una reducción en la concentración de superóxido y otras ERO con una posible reducción en la lesión miocárdica por la presencia de estos radicales.

20 Se determinaron las curvas de concentración respuesta a  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de vehículo o concentraciones crecientes de 3-hemidipato de flavona ( $15$ ) (F3HA,  $10^{-8}$  M -  $10^{-4}$  M) en anillos aórticos con el endotelio intacto de ratas. A las menores concentraciones ( $10^{-8}$  a  $10^{-5}$  M), 3-hemidipato de flavona no tuvo efecto sobre la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  del anillo aórtico. Al mayor nivel probado,  $10^{-4}$  M, 3-hemidipato de flavona tiene cierto efecto inhibitor, lo más posiblemente debido a la presencia de una esterasa en el tejido aórtico de la rata.

25 Los efectos del vehículo ( $\text{dH}_2\text{O}$ ), 3-hemidipato de 3',4'-dihidroxi flavona (21) (DiOHF3HA,  $10^{-8}$  M -  $10^{-4}$  M) y DiOHF ( $10^{-4}$  M) sobre el nivel de aniones superóxido generados en la aorta de la rata en presencia de NADPH se expresaron como porcentaje del control. La concentración de superóxido permaneció constante en todo el intervalo de concentración de DiOHF3HA estudiado, así, DiOHF3HA, no tuvo efecto sobre la generación de superóxido.

30 Con referencia a la Figura 7, se ilustran los efectos del vehículo, 3-hemidipato de 3',4'-dihidroxi flavona (21) (DiOHF3HA,  $10^{-6}$  M -  $10^{-4}$  M) en presencia y ausencia de butiril colinesterasa (BuCHE, 1000 U/l) sobre el nivel de aniones superóxido generados en la aorta de la rata en presencia de NADPH expresado como porcentaje del control. Para comparar, también se muestran los resultados usando DiOHF ( $10^{-4}$  M) en el nivel de aniones superóxido generados en la aorta de la rata en presencia de NADPH expresado como porcentaje del control. La presencia de colinesterasa reveló una inhibición dependiente de la concentración de niveles de superóxido.

35 Curvas de concentración respuesta a  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de vehículo o concentraciones crecientes de 3-hemidipato de 3',4'-dihidroxi flavona (21) (DiOHF3HA,  $10^{-6}$  M -  $10^{-4}$  M) en anillos aórticos con el endotelio intacto de ratas. Las concentraciones se expresan como porcentaje de la respuesta inicial a  $\text{Ca}^{2+}$  ( $3 \times 10^{-3}$  M) observado antes del tratamiento con DiOHF3HA. DiOHF3HA parece tener una ligera acción inhibitora de  $\text{Ca}^{2+}$  a  $10^{-4}$  M. Este efecto se debe posiblemente a la presencia de alguna esterasa en el tejido aórtico de la rata.

40 Volviendo a la Figura 8, se ilustran las curvas de concentración respuesta a  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de vehículo o 3-hemidipato de 3',4'-dihidroxi flavona (21) (DiOHF3HA,  $10^{-4}$  M), en presencia y ausencia de BuCHE comparada con DiOHF en anillos aórticos con el endotelio intacto de ratas. Las concentraciones se expresan como porcentaje de la respuesta inicial a  $\text{Ca}^{2+}$  ( $3 \times 10^{-3}$  M) observado antes del tratamiento con DiOHF3HA. La presencia de colinesterasa potenció notablemente el efecto inhibitor de DiOHF3HA.

45 Haciendo referencia a la Figura 9, se muestran los efectos de vehículo, 3-fosfato de flavona (F3P,  $10^{-8}$  M -  $10^{-4}$  M) en presencia de fosfatasa (1000 U/l) y DiOHF ( $10^{-4}$  M) sobre el nivel de aniones superóxido generados en aorta de la rata en presencia de NADPH expresado como porcentaje del control. La presencia de 3-fosfato de flavona causó una disminución dependiente de la concentración en los niveles de superóxido. Este efecto es contrario a los estudios previos que han demostrado que la presencia del grupo 3',4'-dihidroxilo en el anillo B es determinante en la disminución de los niveles de superóxido.

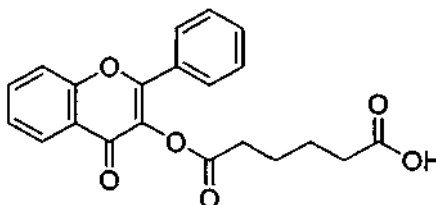
50 Se determinaron las curvas de concentración respuesta a  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de vehículo o concentraciones crecientes de 3-fosfato de flavona (F3P,  $10^{-6}$  M -  $10^{-4}$  M) en anillos aórticos con el endotelio intacto de ratas. 3-Fosfato de flavona causó una inhibición parcial de la contracción inducida por calcio a la mayor concentración.

55 Con referencia a la Figura 10, se muestran las curvas de concentración respuesta a  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de vehículo o 3-fosfato de flavona (F3P,  $10^{-8}$  M -  $10^{-4}$  M) en presencia y ausencia de fosfatasa (P, 1000 U/l) en anillos aórticos con el endotelio intacto aislados de ratas. Las contracciones se expresan como porcentaje de la respuesta inicial a  $\text{Ca}^{2+}$  ( $3 \times 10^{-3}$  M) observada antes del tratamiento con 3-fosfato de flavona. La presencia de fosfatasa potenció notablemente los efectos inhibidores de 3-fosfato de flavona.

La invención se ilustra por los siguientes ejemplos no limitantes.

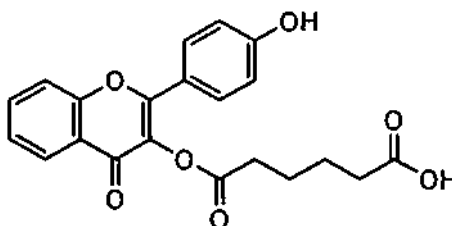
### Síntesis de derivados de flavonoides

#### 3-Hemiadipato de 3-hidroxiflavona



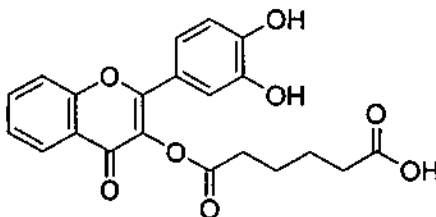
- 5 Se trató una mezcla de 3-(benciloxycarbonilbutilcarboniloxi)flavona (312 mg, 0,7 mmol) y  $\text{Pd}(\text{OH})_2$  (49,4 mg) en THF:EtOH 9:1 + ácido acético al 0,05% (15 ml) con  $\text{H}_2$  durante 5 h. el producto bruto se filtró (Celite), el filtrado se concentró y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (EtOAc al 10-25% en tolueno + ácido acético al 1%) dando el hemiadipato como un sólido amarillo claro (0,211 g, 89%). Se cristalizó una pequeña porción en EtOH/distilados del petróleo; p.f. = 118-121 °C; RMN de  $^1\text{H}$  (399,7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,66 - 1,83 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2$ ); 2,38 (t, J = 6,8 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ); 2,63 (t, J = 6,8 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ); 7,42 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 8,0$  Hz,  $J_{6,7} = 8,0$  Hz, H6); 7,47 - 7,53 (m, 3H, H3', 4', 5'); 7,54 (d, 1H,  $J_{7,8} = 8,4$  Hz, H8); 7,70 (ddd, 1H,  $J_{5,7} = 1,6$  Hz, J = 8,0 Hz,  $J_{7,8} = 8,4$  Hz, H7); 7,81 - 7,86 (m, 2H, H2', 6'); 8,24 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 8,0$  Hz,  $J_{5,7} = 1,6$  Hz, H5). RMN de  $^{13}\text{C}$  (100,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  25,01, 25,20 (2C,  $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ); 34,57 (2C,  $\text{CO}_2\text{CH}_2$ ); 119,20, 124,66, 126,33, 127,21, 129,41, 129,76, 131,04, 132,40, 134,70, 135,10, 156,74, 157,60 (14C, Ar); 171,52, 173,38, 179,36 (3C, C=O). Anal. Encontrado: C, 68,89; H, 4,91;  $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_6$  requiere C, 68,85; H, 4,95%. EMAR (IEP $^+$ ) m/z 389,1000,  $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{NaO}_6$  [M + Na] $^+$  requiere 389,1001].

#### 3-Hemiadipato de 4'-hidroxiflavona



- 20 Se trató una mezcla de 4'-(benciloxi)-3-(benciloxycarbonilbutilcarboniloxi)flavona (400 mg, 0,711 mmol) y  $\text{Pd}(\text{OH})_2$  (56 mg) en THF (10 ml), etanol (1,2 ml) y AcOH (100  $\mu\text{l}$ ) con hidrógeno (344,7 kPa (50 psi)) durante 18 h. La mezcla de reacción se filtró a continuación (Celite) y la almohadilla se lavó con THF. El filtrado se concentró y el residuo sólido se purificó por cromatografía ultrarrápida (THF al 70%/tolueno + AcOH al 1%) y el sólido resultante se recrystalizó en THF/petróleo proporcionando el ácido como un sólido incoloro (150 mg, 55%); p.f. 177-180 °C; RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO)  $\delta$  1,56-1,66 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2,25 (t, 2H, J = 7,0 Hz,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2,64 (t, 2H, J = 7,0 Hz,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 6,96 (d ap., 2H, J = 8,5 Hz, H2', 6'), 7,52 (t, 1H,  $J_{6,7} = J_{7,8} = 7,5$  Hz, H7), 7,80 (d ap., 2H, J = 7,5 Hz, H3', 5'), 7,78 (m, 1H, H8), 7,85 (t, 1H,  $J_{5,6} = J_{6,7} = 7,5$  Hz, H6), 8,06 (d, 1H,  $J_{5,6} = 8,0$  Hz, H5); RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO)  $\delta$  23,8, 23,9, 32,9, 33,3 (4C,  $\text{CH}_2$ ), 115,9, 118,5, 119,7, 122,7, 125,0, 125,6, 130,1, 131,9, 134,5, 154,9, 155,8 160,6 (Ar), 170,4 170,9, 174,3 (3C, C=O); IR 3257, 2944, 2869, 1765, 1706, 1595, 854  $\text{cm}^{-1}$ ; EMAR (IEP $^+$ ) m/z 383,1123,  $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_7$  [M + H] $^+$  requiere 383,1131.

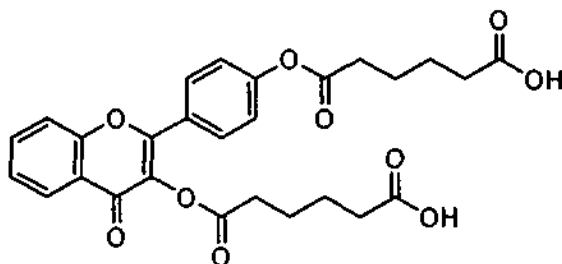
#### 3-Hemiadipato de 3',4'-dihidroxiflavona



- 30 Se trató una mezcla de 3',4'-dibenciloxi-3-(benciloxycarbonilbutilcarboniloxi)flavona (2,12 g, 3,16 mmol) y  $\text{Pd}(\text{OH})_2$  (107 mg) en THF:EtOH 9:1 que contenía ácido acético al 0,05% (50,0 ml) con  $\text{H}_2$  a alta presión durante 5 h. La mezcla de reacción se filtró (Celite) y se concentró dando un sólido verde oscuro. El residuo verde se purificó por cromatografía ultrarrápida (THF al 30 - 90%/tolueno + ácido acético al 1%) seguido de cristalización en THF/distilados del petróleo

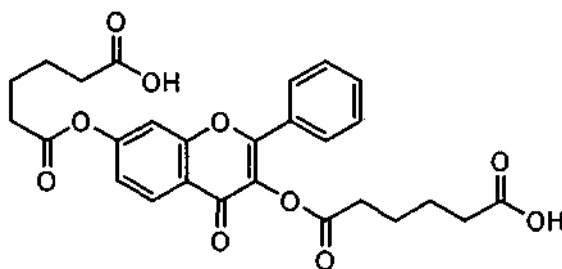
proporcionando el hemiadipato puro como un sólido color pardo pálido (0,70 g, 56%); p.f. = 194-197 °C; RMN de  $^1\text{H}$  (399,8 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,44 - 1,62 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ); 2,10 (t, 2H,  $J = 6,8$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ); 2,44 (t, 2H,  $J = 6,8$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ); 6,73 (d, 1H,  $J_{5,6} = 8,4$  Hz, H5'); 7,09 (dd, 1H,  $J_{2,6'} = 2,0$  Hz,  $J_{5,6'} = 8,4$  Hz, H6'); 7,16 - 7,22 (m, 2H, H6, 2'); 7,32 (d, 1H,  $J_{7,8} = 8,0$  Hz, H8); 7,48 (ddd, 1H,  $J_{5,7} = 1,6$  Hz,  $J_{6,7} = 6,8$  Hz,  $J_{7,8} = 8,0$  Hz, H7); 7,94 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 8,4$  Hz,  $J_{5,7} = 1,6$  Hz, H5). RMN de  $^{13}\text{C}$  (100,5 MHz,  $d_6$ -DMSO)  $\delta$  25,30, 25,62 (2C,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2$ ); 34,43, 34,81 (2C,  $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ); 116,59, 117,42, 119,98, 121,41, 122,06, 124,13, 126,51, 127,07, 133,32, 136,04, 146,97, 150,65, 156,35, 157,27 (14C, Ar); 171,97, 173,46, 179,95 (3C, C=O). Anal. Encontrado: C, 68,89; H, 4,91;  $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_6$  requiere C, 68,85; H, 4,95 %. EMAR (IEP $^+$ ) m/z 389,1000,  $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{NaO}_6$  [M + Na] $^+$  requiere 389,1001.

### 3,4'-bis(Hemiadipato) de flavona



Se trató una mezcla de 3,4'-di-(benciloxicarbonilbutilcarboniloxi)flavona (435 mg, 0,629 mmol) y  $\text{Pd}(\text{OH})_2$  (50 mg) en EtOAc (5 ml) con hidrógeno durante 2 h dando lugar a un precipitado gris. Se añadió THF para disolver el precipitado y se filtró la mezcla (Celite). La almohadilla se lavó con THF, y se concentró el filtrado. El residuo sólido se recrystalizó en THF/petróleo proporcionando el bis(hemiadipato) como un sólido incoloro (183 mg, 50%); p.f. 133 °C; RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $d_6$ -DMSO)  $\delta$  1,55-1,70 (m, 8H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2,24 (t, 2H,  $J = 7,0$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2,27 (t, 2H,  $J = 7,0$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2,63 (t, 2H,  $J = 7,0$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2,64 (t, 2H,  $J = 7,0$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 7,37 (d ap., 2H,  $J = 9,0$  Hz, H3',5'), 7,55 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 8,5$ ,  $J_{6,7} = 7,5$  Hz, H6), 7,80 (d, 1H,  $J_{7,8} = 8,5$  Hz, H8), 7,88 (ddd, 1H,  $J_{6,7} = 7,5$ ,  $J_{7,8} = 8,5$ ,  $J_{5,7} = 1,5$  Hz, H7), 7,96 (d ap., 2H,  $J = 9,0$  Hz, H2',6'), 8,08 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 8,5$ ,  $J_{5,7} = 1,5$  Hz, H5); RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $d_6$ -DMSO)  $\delta$  23,77, 23,82, 32,6, 33,2, 33,3, 44,3 ( $\text{CH}_2$ ), 118,7, 122,5, 122,6, 122,7, 125,1, 126,8, 129,7, 132,9, 134,8, 152,7, 154,9, 155,1 (Ar), 170,4, 171,1, 171,4, 174,3, 174,3 (5C, C=O); IR 3059, 2940, 2873, 1768, 1706, 1504, 759  $\text{cm}^{-1}$ ; EMAR (IEP) m/z 509,1441,  $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{O}_{10}$  [M-H] $^-$  requiere 509,1442.

### 3,7-bis(Hemiadipato) de 3,7-dihidroxiflavona



Se trató una mezcla de 3,7-di-(benciloxicarbonilbutilcarboniloxi)flavona (565 mg, 0,818 mmol) y  $\text{Pd}(\text{OH})_2$  (65 mg) en EtOAc (10 ml) con hidrógeno durante 3 h. Se formó un precipitado gris y se añadió THF hasta que se disolvió. La mezcla se filtró (Celite) y la almohadilla se lavó con THF, y se concentró el filtrado. El residuo sólido se recrystalizó en THF/petróleo proporcionando el diácido como un sólido incoloro (311 mg, 76%); p.f. 128 °C; RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $d_6$ -DMSO)  $\delta$  1,55-1,74 (m, 8H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2 \times 2$ ), 2,23 (t, 2H,  $J = 7,0$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2,28 (t, 2H,  $J = 7,0$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2,61-2,68 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CO} \times 2$ ), 7,34 (m, 1H, H4'), 7,58-7,61 (m, 3H, H6, H2', 6'), 7,68 (d, 1H,  $J_{6,8} = 1,6$  Hz, H8), 7,87-7,89 (m, 2H, H3', 5'), 8,12 (d, 1H,  $J_{5,6} = 8,8$  Hz, H5); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $d_6$ -DMSO)  $\delta$  23,7, 23,76, 23,78, 23,9, 32,9, 33,19, 33,24, 33,28 ( $\text{CH}_2$ ), 111,9, 120,5, 120,6, 126,6, 128,1, 129,0, 129,2, 131,7, 133,0, 154,9, 155,6, 155,9 (Ar), 170,4, 170,6, 171,1, 174,2, 174,3 (5C, C=O); IR 3035, 2952, 2920, 1762, 1708, 1112  $\text{cm}^{-1}$ ; Anal. Encontrado C, 63,64; H, 5,14%,  $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$  requiere C, 63,53; H, 5,13%.

### Preparación de flavonol fosfatos

#### Actividad vasorrelajadora y antioxidante de derivados de flavonoides

##### Efecto de derivados de flavonoides sobre la contracción inducida por $\text{Ca}^{2+}$

Para determinar los efectos de flavonoides sobre las respuestas a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, se examinaron las respuestas contráctiles a la aplicación exógena de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de flavonoides en solución rica en  $\text{K}^+$  y exenta de

- 5  $\text{Ca}^{2+}$  (60 mM, KPSS). Se equilibraron inicialmente anillos aórticos a una tensión de reposo de 1 g en PSS exenta de  $\text{Ca}^{2+}$  normal durante 45 minutos. Se reemplazó el medio del baño por KPSS exenta de  $\text{Ca}^{2+}$  KPSS durante 45 minutos para determinar una contracción de referencia al  $\text{Ca}^{2+}$  ( $3 \times 10^{-3}$  M). Después de un período de reequilibrado de 30 minutos con PSS exenta de  $\text{Ca}^{2+}$ , se determinaron las respuestas contráctiles acumuladas a  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-5}$  -  $3 \times 10^{-3}$  M) en KPSS en presencia de una gama de concentraciones ( $10^{-8}$  -  $10^{-4}$  M) de vehículo, 3',4'-dihidroxi flavonol, 3-hemidipato de 3-hidroxi flavona, 3-hemidipato de 3',4'-dihidroxi flavona, 3-fosfato de 3-hidroxi flavona. Se dejó un período de incubación de 30 minutos para los flavonoides antes de examinar las respuestas a  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### *Relajación por derivados de flavonoides*

- 10 Después de probar la integridad endotelial, los anillos se lavaron repetidas veces y se reequilibraron durante 30 minutos antes de la adición de PE ( $10^{-8}$  -  $2 \times 10^{-7}$  M) y 9,11-didesoxi-9 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -epoximetano-prostaglandina  $\text{F}_{2a}$  (U46619,  $10^{-9}$  -  $10^{-8}$  M) produciendo una fuerza activa en el intervalo de 40-60% de contracción inducida por KPSS. Se emparejó el nivel de precontracción entre los diversos grupos ajustando las concentraciones de PE y U46619. Se llevaron a cabo curvas de concentración-respuesta en el intervalo de  $10^{-8}$  -  $10^{-4}$  M para 3',4'-dihidroxi flavonol, 3-hemidipato de 3-hidroxi flavona, 3-hemidipato de 3',4'-dihidroxi flavona, 3-fosfato de 3-hidroxi flavona.
- 15 Se llevaron a cabo experimentos en presencia de una esterasa, butiril colinesterasa (BuCHE, 1000 U/l) para los derivados hemidipato y una fosfatasa (1000 U/l) en el caso de derivados fosfato.

#### *Efectos de derivados de flavonoides sobre los niveles de superóxido en un ensayo in vitro*

- 20 Se determinó la producción de anión superóxido en segmentos aislados de aorta de rata usando quimioluminiscencia de lucigenina. Se prepararon anillos aórticos como se ha descrito antes y luego se colocaron en Krebs-(ácido N-[2-hidroxi etil]piperazin-N'-[2-etanosulfónico) (tampón HEPES) enfriado en hielo (composición (mM); NaCl 99,0, KCl 4,7,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1-2, D-glucosa 11,0,  $\text{NaHCO}_3$  25,0,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2,5, Na-HEPES 20,0). Se preincubaron anillos aórticos durante 45 minutos a 37 °C con un pH 7,4, en tampón de Krebs-HEPES que contenía ácido dietiltiocarbámico (DETCA,  $10^{-3}$  M) para inactivar la superóxido dismutasa y fosfato de p-nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH,  $10^{-4}$  M) como un sustrato para NADPH oxidasa y 3',4'-dihidroxi flavonol ( $10^{-4}$  M) como control
- 25 positivo, vehículo, 3-hemidipato de 3-hidroxi flavona, 3-hemidipato de 3',4'-dihidroxi flavona, 3-fosfato de 3-hidroxi flavona ( $10^{-8}$  -  $10^{-4}$  M). Se midió la emisión de fotones de fondo durante 12 ciclos en Optiplate de 96 pocillos que contenía 0,3 ml por pocillo de tampón de Krebs-HEPES junto con lucigenina ( $5 \times 10^{-5}$  M) y vehículo o flavonoide ( $10^{-8}$  -  $10^{-4}$  M). Cada ciclo se contó cada un minuto. Después de completarse las lecturas de fondo se transfirieron los anillos aórticos incubados a los pocillos apropiados y se volvió a contar la emisión de fotones como se ha descrito
- 30 antes. El tejido se colocó entonces en un horno a 65 °C durante 48 horas para dejar que la producción de superóxido se normalizase hasta peso de tejido seco.

#### *Efectos de derivados de flavonoides sobre los niveles de superóxido en un ensayo in vitro en presencia o ausencia de una esterasa*

- 35 Los efectos de vehículo, 3-hemidipato de 3',4'-dihidroxi flavona (21) (DiOHF3HA,  $10^{-8}$  M -  $10^{-4}$  M) y DiOHF ( $10^{-4}$  M) en presencia y ausencia de butiril colinesterasa (BuCHE), 100, 300 y 1000 U/l) sobre el nivel de aniones superóxido generados en segmentos aórticos de rata en presencia de NADPH se expresó como porcentaje de control. El procedimiento usado fue como se describe anteriormente salvo por la adición de butiril colinesterasa.

#### *Efectos de derivados de flavonoides sobre los niveles de superóxido en un ensayo in vitro en presencia o ausencia de fosfato*

- 40 Se determinó el efecto de vehículo, 3-fosfato de 3-hidroxi flavona ( $10^{-8}$  a  $10^{-4}$  M) en presencia o ausencia de fosfatasa (1000 U/l) sobre el nivel de aniones superóxido generados en la aorta de la rata en presencia de NADPH expresado como porcentaje de control como se describe anteriormente para 3-hemidipato de 3',4'-dihidroxi flavona. Se observó un efecto medible sobre la generación de anión superóxido usando la 3-fosfato-3-hidroxi flavona en ausencia de la fosfatasa. Se pensó que esto se producía debido a la presencia de fosfatasas naturales en tejido de rata aislado.

- 45 *Estudio in vivo de los efectos de derivados de flavonoides sobre la función vascular de una rata*

Se administró una monodosis de una solución acuosa de 3-hemidipato de 3-hidroxi flavona (15) a un grupo de ratas Sprague Dawley macho anestesiadas por vía intravenosa y se controló la presión sanguínea durante un período de tiempo.

- 50 Se observó una reducción significativa en la presión sanguínea de ratas que es indicativo de vasorrelajación *in vivo* causada por el derivado de flavonoide. No se observó efecto cuando se administró una solución acuosa a un segundo grupo de ratas.

El experimento se repitió con soluciones acuosas del resto de derivados de flavonoides sintetizados que también dieron como resultado reducciones características en las presiones sanguíneas de las ratas.



**Selección para actividad y farmacocinética***Preparación de aorta de rata*

Se diseccionó rápidamente la aorta torácica descendente de ratas y se colocó en solución de Krebs-bicarbonato. Se retiró el tejido conjuntivo superficial y la grasa que rodea la aorta y se cortó la aorta en segmentos de 2-3 mm de longitud y se montaron en baños de órganos.

*Efecto de flavonoides sobre la relajación de ACh y SNP*

Después de lavar y reequilibrar durante 30 minutos, se precontrajeron los anillos aórticos por debajo del máximo con PE y U46619, que se usaron para producir una tensión activa de 45-60% de la contracción máxima inducida por KPSS. Cuando se investigan los efectos del flavonoide, flavonol, 3-hemidipato de flavona (F3HA), 3',4'-dihidroxi flavona, 3',4'-dihidroxi flavonol, 3-hemidipato de 3',4'-dihidroxi flavona (DiOHF3HA) y 3-fosfato de flavona (F3P) sobre las respuestas vasorrelajadoras, se incubaron los anillos con uno de los compuestos durante 20 minutos antes de que se precontrajeran a valores submáximos, seguido por una curva de concentración-respuesta acumulativa a ACh (100 nM - 10 µM) o SNP (10 pM - 1 µM). En experimentos que usan F3P se usaron 1000U/l de fosfatasa en algunos experimentos para escindir el fosfato. Algunos experimentos se llevaron a cabo en presencia y ausencia de butiril colinesterasa (BuCHE, 1000U/l) para escindir el adipato en DiOHF3HA y F3HA.

*Efecto de flavonoles y flavonas sobre la contracción inducida por PE*

Se incubaron anillos durante 20 minutos con DiOHF3HA en un intervalo de concentraciones ( $10^{-7}$ - $10^{-4}$  M) o vehículo (0,1% de dimetil sulfóxido, DMSO). A continuación, se realizó una curva de concentración-respuesta a PE ( $10^{-9}$  -  $10^{-5}$  M) en anillos aórticos con el endotelio intacto (EI). Los experimentos se llevaron a cabo en presencia y ausencia de BuCHE (1000U/l) para escindir el adipato en DiOHF3HA.

*Efecto de flavonoles sobre la contracción inducida por  $Ca^{2+}$* 

Para determinar el efectos de flavonoides sobre las respuestas a la entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular, se examinaron las respuestas contráctiles a la aplicación exógena de  $Ca^{2+}$  en presencia de flavonoides en solución rica en  $K^+$  y exenta de  $Ca^{2+}$  (60 mM,  $K^+$ -PSS). Se equilibraron inicialmente anillos aórticos a una tensión de reposo de 1 g en PSS exenta de  $Ca^{2+}$  durante 45 minutos. Se reemplazó el medio del baño con  $K^+$ -PSS exenta de  $Ca^{2+}$  KPSS durante 45 minutos para determinar una contracción de referencia al  $Ca^{2+}$  (3 mM). Después de un período de reequilibrado de 30 minutos con PSS exenta de  $Ca^{2+}$ , se determinaron las respuestas contráctiles acumulativas a  $Ca^{2+}$  ( $10^{-5}$  -  $3 \times 10^{-3}$  M) en  $K^+$  PSS en presencia de vehículo (DMSO al 0,1%), o una gama de concentraciones ( $10^{-7}$  -  $10^{-4}$  M) de 3'-hidroxiflavonol, F3HA, DiOHF3HA o F3P. Se dejó un período de incubación de 30 minutos para los flavonoides antes de examinar las respuestas a  $Ca^{2+}$ . Los experimentos se llevaron a cabo en presencia y ausencia de BuCHE (1000U/l) para escindir el adipato en F3HA y DiOHF3HA. En experimentos que usan F3P se usó fosfatasa (1000U/l) en algunos experimentos para escindir el fosfato.

*Relajación por flavonoides*

Después de probar la integridad endotelial, los anillos se lavaron repetidas veces y se reequilibraron durante 30 minutos antes de la adición de PE ( $10^{-8}$  -  $2 \times 10^{-7}$  M) y 9,11-didesoxi- $9\alpha$ , $11\alpha$ -epoximetano-prostaglandina  $F_{2\alpha}$  (U46619,  $10^{-9}$  -  $10^{-8}$  M) produciendo una fuerza activa en el intervalo de 40 - 60% de la contracción inducida por KPSS. Se realizaron curvas de concentración-respuesta acumulativas en el intervalo de  $10^{-7}$  -  $10^{-4}$  M para vehículo, 3'-hidroxiflavonol, F3HA, DiOHF3HA, F3P. Los experimentos se llevaron a cabo en presencia y ausencia de BuCHE (1000U/l) para escindir el adipato en F3HA y DiOHF3HA. En experimentos que usan F3P se usaron 1000U/l de fosfatasa en algunos experimentos para escindir el fosfato.

*Efecto de flavonoles y flavonas sobre la vasorrelajación a ACh en presencia de estrés oxidativo*

Se compararon las respuestas de relajación acumulativa control a ACh con las obtenidas a partir de anillos aórticos con el endotelio intacto con pirogalol ( $2 \times 10^{-5}$  M). También se determinaron los efectos de vehículo (DMSO al 0,1%), fosfatasa (1000U/l) o F3P ( $10^{-6}$ - $10^{-4}$  M) sobre las respuestas a ACh en los anillos aórticos aislados de rata expuestos a pirogalol ( $2 \times 10^{-5}$  M). Se añadió pirogalol cuando los anillos aórticos habían alcanzado un nivel estable de contracción con PE y U46619 a un nivel de 50 y 70% de la tensión inducida por KPSS y se dejaron 10 minutos antes de determinar las curvas de concentración-respuesta acumulativas a ACh. En algunos experimentos que usan F3P se usaron 1000U/l de fosfatasa en algunos experimentos para escindir el fosfato.

**Efecto de DiOHF3HA y F3P en ratas anestesiadas**

Se anestesiaron ratas Sprague-Dawley (250-350 g) con pentobarbitona sódica (60 mg  $kg^{-1}$ , ip). Se aisló la tráquea y se canuló con un tubo traqueal de polietileno (D.I. 2,0 mm), y se dejó que la rata respirara espontáneamente.

*Medida de la presión arterial y la frecuencia cardíaca*

Se canuló la arteria carótida derecha y se conectó con una cánula llena de solución salina heparinizada (D.E 0,75, D.I.

0,58 mm) y se conectó a un transductor de presión. Se midieron de forma continua la presión arterial media y basal y se registraron en un polígrafo. La frecuencia cardíaca se derivó de la presión arterial fásica usando un tensiómetro.

#### *Efectos antioxidantes y vasculares de flavonol y dihidroxiflavona*

Flavonol y dihidroxiflavona (DiOHFne) causaron disminuciones dependientes de la concentración en los niveles de superóxido generados por anillos aórticos de rata. A la mayor concentración probada (0,1 mM) flavonol y DiOHFne redujeron ambos los niveles de superóxido hasta un  $36 \pm 3\%$  del control. Flavonol no afectó los efectos relajadores de ACh o SNP. DiOHFne causó una relajación dependiente de la concentración en aorta de rata que fue más débil que el efecto de DiOHF. Flavonol causó disminuciones dependientes de la concentración en la contracción inducida por calcio de anillos aórticos de rata que eran relativamente débiles en comparación con las observaciones previas con DiOHF.

#### *Efectos antioxidantes y vasculares de 3-hemidipato de flavona (F3HA)*

F3HA ( $10^{-7}$  M -  $10^{-4}$  M) no tuvo efecto inhibitor sobre la generación de superóxido por aorta de rata pero la presencia de butiril colinesterasa (BuCHE, 100-1000 U/ml) causó un aumento dependiente de la concentración en el efecto inhibitor de F3HA (Figura 6). F3HA solo inhibió respuestas contráctiles a concentraciones crecientes de calcio extracelular a la concentración más alta probada (0,1 mM).

#### *Efectos antioxidantes y vasculares de 3-hemidipato de dihidroxiflavona (DiOHF3HA)*

DiOHF3HA ( $10^{-7}$  M -  $10^{-4}$  M) no tuvo efecto inhibitor sobre la generación de superóxido por aorta de rata pero la presencia de butiril colinesterasa (BuCHE, 1000-1000 U/ml) reveló un efecto inhibitor dependiente de la concentración. DiOHF3HA sola no tuvo efecto sobre las respuestas relajadoras a ACh o SNP. A contrario, en presencia de BuCHE (1000 U/ml) DiOHF3HA aumentó de forma significativa la sensibilidad de la respuesta relajadora a SNP. De igual modo, DiOHF3HA solo tuvo poco efecto sobre la contracción inducida por calcio en aorta de rata, pero en presencia de BuCHE (1000 U/ml) DiOHF3HA (0,1 mM) tuvo un efecto inhibitor equivalente a DiOHF. Esto sugiere que cuando el adipato fue eliminado por la esterasa, el hemidipato era igualmente activo que el DiOHF promotor. Se encontró también que DiOHF3HA causaba relajación directa de anillos aórticos de rata previamente contraídos en presencia de la esterasa (Figura 11).

Se inyectó DiOHF3HA (0,1, 0,3, 1, 3 mg/kg) por vía intravenosa, dejando al menos 30 minutos entre inyecciones, y se midieron los cambios máximos en la presión arterial media y en la frecuencia cardíaca. DiOHF3HA causó disminuciones dependientes de la dosis en la presión arterial (Figura 12a) y frecuencia cardíaca (Figura 12b). En un grupo separado de experimentos se inyectaron ACh (0,3 mg/kg iv) y fenilefrina (PE, 30 mg/kg iv) antes y 30 minutos después de DiOHF3HA (3 mg/kg iv), momento en el que la presión arterial y la frecuencia cardíaca retornaron a los niveles del control. DiOHF3HA potencia de forma significativa la respuesta depresora a ACh y atenuó el aumento inducido por PE en la presión arterial (Figura 13).

En anillos aórticos de rata DiOHF3HA (0,1 mM), en ausencia o en presencia de colinesterasa, no tuvo efecto sobre la relajación dependiente del endotelio en respuesta al ionóforo de calcio A23187 o a isoprenalina. DiOHF3HA (0,1 mM) administrado solo no tuvo efecto sobre la contracción inducida por PE pero provocó una notable inhibición en presencia de esterasa. El nivel de inhibición fue similar al observado en respuesta a la presencia de la misma concentración (0,1 mM) de DiOHF.

#### *Efectos antioxidantes y vasculares de 3-fosfato de flavona (F3P)*

F3P o fosfatasa (1000 U/l) no tuvo efecto sobre la generación de superóxido por segmentos de aorta de rata mientras que F3P causó una inhibición dependiente de la concentración de los niveles de superóxido en presencia de fosfatasa. F3P, en presencia de fosfatasa aumentó la sensibilidad de anillos aórticos de rata a la relajación por ACh pero no SNP. El estrés oxidativo, provocado por la presencia de pirogalol ( $2 \times 10^{-5}$  M), redujo significativamente la respuesta máxima a ACh pero la respuesta se restauró por la presencia de F3P más fosfatasa. Las respuestas a SNP no se vieron afectadas por cualquiera de estos tratamientos. F3P causó una pequeña inhibición de la contracción inducida por calcio pero el efecto se mejoró significativamente por la presencia de fosfatasa.

Se inyectó F3P (0,1, 0,3, 1, 10 mg/kg) por vía intravenosa, dejando al menos 30 minutos entre inyecciones, y se midieron los cambios máximos en la presión arterial media y en la frecuencia cardíaca (Figura 16a). DiOHF3HA causó disminuciones dependientes de la dosis en la presión arterial y en la frecuencia cardíaca (Figura 12 a y 12b) pero la respuesta depresora fue pequeña comparada con DiOHF (1 mg/kg iv).

#### **Sumario**

Estos estudios implicaron una valoración de la actividad vascular y antioxidante de flavonoles, 3',4'-dihidroxiflavona (DiOHFne), 3',4'-dihidroxiflavonol (DiOHF), 3-hemidipato de flavona (F3HA), 3-hemidipato de 3',4'-dihidroxiflavona (DiOHF3HA) y 3-fosfato de flavona.

3-Hemidipato de flavona (F3HA) solo no tuvo actividad antioxidante o vascular cuando se aplicó solo pero la

presencia de una colinesterasa para escindir la sustitución de adipato reveló la capacidad de F3HA de inhibir la contracción inducida por calcio.

5 3-Hemidipato de dihidroxiflavona (DiOHF3HA) no tuvo actividad antioxidante o vascular cuando se aplicó solo pero la presencia de una colinesterasa para escindir la sustitución de adipato reveló la capacidad de DiOHF3HA de inhibir los niveles de superóxido producidos por aorta de rata, para inhibir la contracción inducida por calcio y causar relajación directa de anillos aórticos de rata. En presencia de la esterasa, el nivel de actividad de DiOHF3HA fue similar a DiOHF. En la rata anestesiada DiOHF3HA causó disminuciones dependientes de la concentración en la presión arterial y la frecuencia cardíaca.

10 3-Fosfato de flavona (F3P) solo no tuvo actividad antioxidante o vascular pero la presencia de una fosfatasa para escindir la sustitución de fosfato reveló la capacidad de F3P de inhibir los niveles de superóxido producidos por aorta de rata, para inhibir la contracción inducida por calcio y mejorar la relajación dependiente del endotelio en presencia de estrés oxidativo. En presencia de la fosfatasa el nivel de actividad de F3P fue similar a DiOHF. En la rata anestesiada F3P causó solo pequeñas disminuciones dependientes de la concentración en la presión arterial y la frecuencia cardíaca. Los efectos fueron mucho menores que los observados con DiOHF.

### 15 **Cardioprotección de adipato de 3',4'-dihidroxiflavanol (DiOHF3HA) después de reperfusión de isquemia de miocardio**

Se determinó la capacidad del flavonol sintético, adipato de 3',4'-dihidroxiflavanol (DiOHF3HA) de prevenir la lesión por isquemia y reperfusión en ovejas anestesiadas. A diferencia del compuesto principal DiOHF, el derivado de adipato era soluble en solución acuosa, en particular en agua.

20 DiOHF3HA administrado en solución acuosa causó una reducción relacionada con la dosis del tamaño del infarto, que fue similar al causado por una dosis molar similar de DiOHF cuando se disolvió en DMSO.

La infusión intravenosa de DiOHF3HA no alteró los índices hemodinámicos (presión arterial, frecuencia cardíaca, presión diastólica final del ventrículo izquierdo (LV-EDP)).

25 Puesto que DiOHF3HA causó un grado equivalente de cardioprotección al compuesto principal después de lesión por isquemia cardíaca-reperfusión en ovejas anestesiadas, estos datos apoyan la hipótesis de que este novedoso compuesto derivado se convierte de forma eficaz en el compuesto principal *in vivo*.

#### *Preparación quirúrgica*

Se examinaron cinco grupos de ovejas merinas adultas anestesiadas (carneros de 34-45 kg)

(1) Control (n=5)

30 (2) DiOHF (2 mg/kg, n=2)

(3) DiOHF3HA (2,7 mg/kg, n=3)

(4) DiOHF (5 mg/kg, n=3)

(5) DiOHF3HA (6,6 mg/kg, n=4).

35 La anestesia se indujo por tiopentona sódica intravenosa (15 mg/kg) y después se mantuvo la intubación traqueal por isoflurano (1,5-2%). Se insertó un catéter en la arteria facial derecha para la toma de muestras de sangre arterial y control de la presión arterial. Se realizaron infusiones intravenosas a través de un catéter insertado en la vena yugular. El corazón se expuso a una toracotomía izquierda realizada en el cuarto espacio intercostal. Se insertó un manómetro con punta de catéter 4F a través de la aurícula izquierda en el ventrículo izquierdo para medir la presión en el ventrículo izquierdo (LVP). Se insertó una cánula adicional en el apéndice auricular izquierdo para la inyección de lignocaína y para infusión de azul de Evans. La arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD) se diseccionó desde el epicardio inmediatamente distal a su segunda rama diagonal, y se colocó una sonda de flujo de 2 mm de tiempo de tránsito alrededor de la misma para controlar el flujo sanguíneo en la LAD. Se hizo pasar una sutura de seda bajo la LDA proximal a la sonda y se ataron ambos extremos del hilo a través de un tubo de plástico para formar una trampa vascular.

### 45 **Diseño experimental**

Se dejó que los animales se estabilizaran durante 10-15 minutos después de completarse el procedimiento quirúrgico. Las ovejas se dividieron al azar a continuación en diferentes grupos de tratamiento. Todas las ovejas tuvieron 30 minutos de registro basal seguido de 1 hora de isquemia y 3 horas de reperfusión.

50 Durante el curso del experimento, se registraron medidas hemodinámicas a intervalos de 5 minutos y se tomaron muestras de sangre en los puntos de tiempo designados. Después de 30 minutos de isquemia, se administró el tratamiento con flavonol. Se disolvió DiOHF en 2 ml de DMSO más 14 ml de polietilenglicol:agua (1:1). Se disolvió

DiOHF3HA en 20 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1M. Los fármacos se administraron a 1 ml/min i.v. Las dos dosis de DiOHF3HA (2,7 mg/kg y 6,6 mg/kg) se eligieron para conseguir dosis molares equivalentes al compuesto DiOHF principal (a 2 mg/kg y 5 mg/kg, respectivamente). Los animales de control no recibieron ninguna solución intravenosa. Se usó lignocaína, según se necesitó, para mejorar las arritmias.

##### 5 *Determinación del área en riesgo y del tamaño del infarto*

Se delimitaron el área de miocardio en riesgo y el tamaño del infarto por tinción con azul de Evan y cloruro de trifeníltetrazolio (TTC). Después de 3 horas de reperfusión, se volvió a ocluir la LAD en el sitio original de la oclusión. Inmediatamente después de la inyección intravenosa de pentobarbitona ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) para detener el corazón, se inyectó colorante azul de Evan (1,5%, 40 ml) en la aurícula izquierda para definir el miocardio en riesgo. Se extirpó rápidamente el corazón y se cortó el ventrículo izquierdo en secciones transversales de aproximadamente 1 cm de grosor. El área en riesgo sin teñir se trazó sobre las mismas transparencias. Las secciones se incubaron en tampón fosfato de sodio 0,1 M que contenía TTC al 1% durante 20 minutos (37 °C, pH 7,4). El área infartada se trazó sobre las transparencias. El área de miocardio en riesgo, y el tamaño del infarto, se midieron por planimetría computarizada. La primera se expresó como porcentaje del volumen ventricular izquierdo total (AR/LV%) y el tamaño del infarto se expresó como porcentaje del área de miocardio en riesgo (IS/AR%).

##### *Marcadores plasmáticos para el infarto de miocardio*

Se recogieron muestras de sangre (5 ml) en tubos heparinizados enfriados en condición basal y en tres puntos temporales durante el período de reperfusión (1 hora, 2 horas y 3 horas). Después de centrifugación a 4 °C, las muestras de plasma se almacenaron a -20 °C hasta la medida para determinar los niveles de lactato deshidrogenasa y creatinina cinasa.

##### *Resultados*

En el siguiente sumario de resultados, se informa del tamaño del infarto de miocardio en los 5 grupos de tratamiento diferentes. Dada la eficacia de la dosis mayor de DiOHF3HA, solo se informa de cambios en todos los demás parámetros con respecto al grupo control de animales frente al grupo de animales con DiOHF3HA (6,6 mg/kg).

En el grupo control, una oveja murió debido a fibrilación ventricular en los primeros 10 minutos de reperfusión. Así, los datos de control están basados en  $n=4$  ovejas.

##### *Tamaño del infarto de miocardio*

En este estudio, el área del ventrículo izquierdo sometida a isquemia (AR) entre los 5 grupos de tratamiento diferentes de ovejas fue similar, (11%-20%, Figura 17, panel izquierdo). Al contrario, el tamaño del infarto, normalizado al AR, fue menor en los grupos tratados con DiOHF y DiOHF3HA comparado con los animales control (Figura 17, panel derecho). Específicamente, el tamaño del infarto normalizado al área en riesgo (IS/AR) se redujo desde  $83 \pm 4\%$  en controles a  $49 \pm 8\%$  por DiOHF3HA (6,7 mg/kg) y a  $47 \pm 8\%$  por DiOHF (5 mg/kg). Con las dosis menores de DiOHF3HA (2,7 mg/kg) y DiOHF (2 mg/kg) el IS/AR fue de 64% y 73%, respectivamente.

##### *Flujo en la LAD*

El flujo basal en la LAD fue similar en los grupos de ovejas (7-9 ml/min) de control y de DiOHF3HA (6,6 mg/kg). Durante la isquemia, el flujo en la LAD cayó hasta cero en todos los animales. Durante la primera etapa de la reperfusión, se produjo en todas las ovejas hiperperfusión coronaria. En general, este aumento transitorio en el flujo en la LAD volvió a niveles basales después de 30 a 60 minutos de reperfusión. La regresión del flujo parece ser más rápida en el grupo de DiOHF3HA.

##### 40 *Respuesta hemodinámica a la isquemia/reperfusión*

La presión arterial basal no fue diferente entre los dos grupos de ovejas (promedio después de 30 minutos, ~80 mmHg). Al contrario, la frecuencia cardíaca en reposo fue menor ( $P<0,05$ ) en las ovejas control ( $90 \pm 4$  lpm) comparada con la del grupo tratado con DiOHF3HA ( $105 \pm 3$  lpm). Esta diferencia permaneció durante todo el curso del experimento. Tanto la presión arterial media como la frecuencia cardíaca permanecieron sin cambios durante el período de infusión de 20 minutos de administración de DiOHF3HA. Además, no se observó un cambio drástico en la presión arterial o en la frecuencia cardíaca en cualquiera de los grupos de ovejas durante la isquemia y reperfusión del miocardio.

La LV-EDP en reposo no fue diferente entre los dos grupos de ovejas (~11 mmHg) pero el valor positivo máximo de la primera derivada de LVP ( $dP/dt_{\text{máx}}$ ) fue menor ( $P<0,05$ ) en las ovejas control ( $1454 \pm 62$  mmHg/s) comparado con ovejas tratadas con DiOHF3HA ( $1967 \pm 103$  mmHg/s). Esta diferencia permaneció durante todo el curso del experimento. Tanto la LV-EDP como la  $dP/dt_{\text{máx}}$  permanecieron sin cambios durante el período de infusión de 20 minutos de administración de DiOHF3HA. Además, no se observó un cambio drástico en la LV-EDP o en la  $dP/dt_{\text{máx}}$  en cualquiera de los grupos de ovejas durante la isquemia y reperfusión del miocardio. Los beneficios del fármaco se mostraron más claramente después de 24 horas de la reperfusión.

En ovejas anestesiadas, después de 1 hora de isquemia y 3 horas de reperusión, la lactato deshidrogenasa en plasma aumentó en  $227 \pm 141$  U/l en el grupo control ( $n=3$ ) y en  $67 \pm 32$  U/l en el grupo tratado con DiOHF3HA ( $n=4$ ). En estas ovejas, la creatina cinasa en plasma aumentó en  $2411 \pm 958$  U/l en el grupo control y en  $1579 \pm 936$  U/l en el grupo tratado con DiOHF3HA.

## 5 Recuperación de un accidente cerebrovascular isquémico en ratas usando flavonoides sintéticos

### *Marcadores plasmáticos para el infarto de miocardio*

Se estudió el accidente cerebrovascular isquémico en ratas conscientes, con control diario de la función neurológica y la valoración morfológica *post mortem* de los infartos cerebrales a las 72 horas después del accidente cerebrovascular. Se indujo isquemia y reperusión transitoria, unilateral en ratas conscientes por inyección del potente vasoconstrictor endotelina-1 exteriormente pero cerca de la arteria cerebral media derecha (MCA) (a través de un tubo guía preimplantado). El accidente cerebrovascular resultante se calificó en una escala de 0 a 5 por el comportamiento inmediato, y se inyectaron compuestos neuroprotectores potenciales vía intravenosa 3 horas después del accidente cerebrovascular, y en intervalos de 24 horas seguidamente.

### *Preparación quirúrgica*

Se anestesiaron ratas Hooded Wistar macho (280-340 g) con pentobarbitona sódica en un volumen de 0,6 ml (60 mg/kg i.p.) para inserción de un catéter intravenoso (i.v.) en la vena yugular para la administración aguda del fármaco. Se implantó a continuación una guía de acero inoxidable calibre 23 estereotáxicamente en la corteza piriforme 2 mm dorsal a la MCA derecha (0,2 mm anterior, -5,2 mm lateral y -5,9 mm ventral). La cánula se aseguró con cemento de acrílico dental y dos pequeños tornillos insertados en el cráneo. El cuero cabelludo se cerró con suturas. Las ratas se alojaron individualmente en un ciclo de 12 horas día/noche a una temperatura de 18-22 °C y se dejaron recuperar durante 5 días antes de inducirles el accidente cerebrovascular.

### *Inducción del accidente cerebrovascular*

Se indujo vasoconstricción de la arteria cerebral media derecha (MCA) en ratas conscientes por administración del potente agente vasoconstrictor endotelina-1 (ET-1) (60 pmol en 3 µl de solución salina durante 10 minutos) a través de un inyector calibre 30 que sobresalía 2 mm más allá del extremo de la cánula guía estereotáctica previamente implantada. El inyector se mantuvo en su lugar por un manguito de Poly-tubing y la rata se colocó en una caja de Plexiglass transparente para la observación durante la inyección de ET-1. Durante la inducción del accidente cerebrovascular se observó que daban vueltas en sentido antihorario, apretaban y arrastraban la pata delantera contralateral, validando la correcta colocación de la cánula. Estos cambios de comportamiento se produjeron en los 2 a 10 minutos después de comenzar la inyección de ET-1 y se describieron comportamientos similares por otros investigadores que emplearon este modelo. Los autores han asignado una escala de puntuación de la intensidad del accidente cerebrovascular basada en estos cambios de comportamiento durante el accidente cerebrovascular y han mostrado que las ratas tratadas con vehículo a las que se asignaron mayores puntuaciones de accidente cerebrovascular tienen mayores volúmenes de infarto y deficiencias neurológicas. Se consideró que las ratas que no presentaron ningún cambio en el comportamiento no habían tenido un accidente cerebrovascular y se excluyeron del estudio. Las ratas inyectadas de forma simulada sufrieron implantación de la cánula pero no recibieron inyección de ET-1. Se tomaron las temperaturas rectales con una sonda con termistor, antes del accidente cerebrovascular y a intervalos de 30 o 60 minutos durante 3 horas después del accidente cerebrovascular.

### *Valoración del resultado funcional*

Todas las pruebas de comportamiento se llevaron a cabo antes de cualquier procedimiento (previo a la cirugía, día 1), inmediatamente antes de la oclusión de la MCA inducida por ET-1, día 6) y 24, 48 y 72 horas después de la oclusión de la MCA inducida por ET-1. El comportamiento de cada rata se comparó al previo al accidente cerebrovascular, así cada rata actuó como su propio control. Todas las ratas se codificaron de modo que el investigador estaba enmascarado respecto a la condición del tratamiento. Las anomalías neurológicas se evaluaron con el uso de una puntuación del déficit neurológico basada en la detección de postura anormal y hemiplejía. Las posturas anormales se valoraron suspendiendo ratas por la cola y puntuando la torsión del tórax y la extensión de los miembros anteriores. La hemiplejía se evaluó cuando las ratas se colocaron en una plataforma elevada. Se consideró que había déficits presentes cuando la extremidad posterior contralateral al hemisferio infartado se deslizaba fuera del borde de la plataforma y/o cuando la extremidad anterior se deslizaba fuera cuando los hocicos y bigotes no estaban en contacto con la superficie. Todos los comportamientos se puntuaron en la siguiente escala: 0 = sin déficit; 1 = ligero; 2 = moderado; y 3 = grave. Así, cuando las puntuaciones se totalizaron, la puntuación del déficit neurológico máximo fue 12. Una puntuación de 0 se consideró normal.

Se evaluó la semidesatención sensorial usando una prueba que consiste en colocar cintas adhesivas (etiqueta adhesiva Avery, círculos de 100 mm de diámetro) en la región distal-radial de cada articulación. La colocación de la primera cinta se realizó al azar entre los miembros contralaterales e ipsilaterales. La cinta en ambos miembros traseros se tocó simultáneamente antes de colocar al animal en una jaula de Plexiglass y medir con un cronómetro, se registraron tanto la latencia hasta tocar como la latencia hasta retirar cada estímulo de los miembros traseros

contralaterales e ipsilaterales. La prueba terminó a los 180 segundos si las cintas no se habían retirado.

#### *Tratamiento farmacológico*

5 Todos los compuestos se administraron intravenosamente en una única dosis rápida 3 horas después del accidente cerebrovascular a una concentración que proporcionó 37  $\mu\text{mol/kg}$ . También se usaron vehículos control y fueron específicos para cada compuesto. Después de la primera dosis 3 horas después del accidente cerebrovascular, se inyectó a los animales una vez al día con fármaco, o vehículo a las 24 y 48 horas. El volumen total de inyección para cada compuesto fue de aproximadamente 300  $\mu\text{l}$  para una rata de 300 g, con 200  $\mu\text{l}$  de solución salina para garantizar la administración de todo el fármaco.

#### *Cuantificación de la lesión isquémica*

10 Se decapitaron las ratas 72 horas después de la isquemia y se extirparon sus cerebros y congelaron en nitrógeno líquido y almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$ . Se realizaron cortes criostáticos en corona (16  $\mu\text{m}$ ) en ocho planos de la corona predeterminados en todo el cerebro desde -3,2 a 6,8 mm relativo al Bregma. El infarto se midió en secciones no teñidas por triplicado basado en la observación de que las áreas lesionadas en secciones de cerebro montadas en  
15 portas no teñidas son visibles al ojo humano como áreas escarchadas u oscuras claramente definidas, mientras que el tejido normal es esencialmente traslúcido. Aplicando el principio de la propagación de luz balística y usando un aparato sencillo combinado con un sistema de análisis de imagen computarizado, la sección montada en el porta sin teñir que muestra áreas lesionadas fue claramente visible en el monitor. La luz pasa directamente a través del tejido no lesionado transparente a la cámara, mientras que los rayos de luz son difractados por el tejido lesionado. Las áreas de lesión pueden determinarse así fácilmente, seleccionarse y registrarse usando el sistema de análisis de imagen. El  
20 volumen del infarto total se calculó integrando el área de la sección transversal de la lesión en cada nivel estereotáxico con las distancias entre niveles. La influencia de edema en el área infartada se corrigió aplicando la siguiente Fórmula: (área de hemisferio normal/área de hemisferio infartado) x área de infarto. Los portas también se codificaron de modo que el investigador estaba enmascarado respecto a la condición del tratamiento.

#### *Puntuación del accidente cerebrovascular*

25 Las ratas mostraron déficits de comportamiento neurológico indicativo de accidente cerebrovascular en 2-10 minutos después de la inyección de ET-1 pero no después de un volumen igual de solución salina. Estos déficits incluyeron respuestas con comportamiento específico tales como apretar e incapacidad para extender el miembro delantero contralateral, y dar vueltas en la dirección contralateral a la oclusión. El comportamiento higiénico precedió a las vueltas y se observó en casi todas las ratas. El comportamiento higiénico se produjo de una forma estereotípica,  
30 estando seguido el comportamiento higiénico facial por comportamiento higiénico en todo el cuerpo en un movimiento continuo. Otros comportamientos tales como castañeteo de dientes, morder la jaula y el lecho y asomar la lengua, se observaron menos frecuentemente. Estas respuestas de comportamiento observadas al mismo tiempo que el accidente cerebrovascular pudieron calificarse basándose en su grado e intensidad. Los autores también han mostrado que existe una correlación positiva entre la puntuación del accidente cerebrovascular y la puntuación del déficit neurológico y la puntuación del accidente cerebrovascular y el volumen del infarto, en ratas tratadas con  
35 vehículo (n=40). Después de esta calificación, se emparejaron las ratas con accidente cerebrovascular basándose en una puntuación igual del accidente cerebrovascular de modo que las puntuaciones del accidente cerebrovascular se distribuyeron de forma uniforme entre los grupos de tratamiento con vehículo y con fármaco. Estas ratas se codificaron a continuación de modo que las siguientes valoraciones se pudieron realizar de forma enmascarada al tratamiento.

#### *Estratificación del tratamiento farmacológico*

Se usan modelos de pronóstico para predecir el resultado funcional y la capacidad de supervivencia en pacientes humanos con accidente cerebrovascular con el fin de apoyar el manejo clínico de pacientes con accidente cerebrovascular y estratificar correctamente los grupos de tratamiento en ensayos clínicos. El uso de modelos similares en animales experimentales con accidente cerebrovascular no se ha intentado con anterioridad. En el  
45 modelo de oclusión de la MCA por ET-1, es posible observar respuesta de comportamiento durante la inducción del accidente cerebrovascular y asignar una escala de puntuación de la intensidad del accidente cerebrovascular basándose en estas respuestas. Por tanto, es posible predecir qué animales sufrirán accidente cerebrovascular intensos y qué animales sufrirán accidente cerebrovascular de leves a moderados. Este proceso también permite cierta predicción del área de riesgo, que es potencialmente salvable por agentes neuroprotectores después del  
50 accidente cerebrovascular. Los accidentes cerebrovasculares intensos dejan poca área de riesgo para la neuroprotección dado que el infarto ocupa más del 70% del volumen del hemisferio total. Los accidentes cerebrovasculares de leves a moderados sin embargo revelan una mayor área de riesgo salvable y, por tanto, presentan una mayor oportunidad de neuroprotección. De hecho, ahora se están usando estudios clínicos de IRM en pacientes para estratificar pacientes de una forma similar con el fin de determinar quién es más propenso a beneficiarse de un futuro tratamiento farmacológico. Por esta razón, los autores han eliminado los animales que  
55 tuvieron accidentes cerebrovasculares intensos con puntuaciones de 4 o 5 al final del análisis del tratamiento farmacológico, y han vuelto a analizar los datos en los grupos de accidente cerebrovascular de leve a moderado (puntuaciones 1 a 3) para todos los futuros compuestos probados.

*3',4'-Dihydroxiflavalona (DiOHF)*

Los experimentos iniciales llevados a cabo en nuestro laboratorio valoraron el potencial neuroprotector retrasado de DiOHF (10 mg/kg) administrado por vía intravenosa 3 horas después de iniciarse el accidente cerebrovascular. Cada rata recibió 3 dosis rápidas de DiOHF disuelto en DMSO al 20%, polietilenglicol al 40% y agua estéril para inyección al 40%. La administración de 3',4'-dihydroxiflavalona (DiOHF) en ratas con accidente cerebrovascular modesto (puntuaciones 2-3, n=6 y 5, compuesto y vehículo, respectivamente) redujo los déficits neurológicos a las 48 y 72 horas, y eliminó el aumento en las puntuaciones de semidesatención ("prueba de las cintas adhesivas") después del accidente cerebrovascular, que se observaron en ratas control a las que se administró endotelina más vehículo solo. Resulta destacable, DiOHF redujo el volumen del infarto producido en la corteza cerebral y previno totalmente un desarrollo de infarto en el cuerpo estriado del cerebro.

El tratamiento con DiOHF (10 mg/kg) en ratas con accidente cerebrovascular de leve a moderado redujo de forma significativa el área de infarto en toda la corteza y el cuerpo estriado comparado con el tratamiento con vehículo. El tratamiento con DiOHF también mejoró significativamente el resultado neurológico en ratas con accidente cerebrovascular de leve a moderado, en comparación con las ratas tratadas con vehículo.

*3-Hemidipato de 3',4'-dihydroxiflavona (DiOHF3HA) para el tratamiento de accidente cerebrovascular*

Cada rata recibió 3 dosis rápidas de DiOHF3HA (15 mg/kg/día i.v.) disuelto en una solución salina tamponada con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,1M, pH 7,8) para inyección.

| Vehículo          | DiOHF3HA    |
|-------------------|-------------|
| Grado n.º 2 (n=3) | n.º 2 (n=1) |
| Grado n.º 3 (n=4) | n.º 3 (n=4) |
| Grado n.º 4 (n=7) | n.º 4 (n=6) |

Después del accidente cerebrovascular, no se produjo pérdida de peso significativa en cada grupo de tratamiento. La temperatura central antes del accidente cerebrovascular en ambos grupos de tratamiento estuvo dentro de los límites fisiológicos. Después del accidente cerebrovascular, se produjo un aumento significativo en la temperatura a los 30 minutos en ambos grupos de tratamiento, sin embargo, la temperatura volvió a los niveles normales después de este tiempo. Después de la inyección intravenosa de vehículo o DiOHF3HA, la temperatura pareció aumentar en ambos grupos de tratamiento pero esta no fue significativamente diferente de la temperatura antes del accidente cerebrovascular.

Después del accidente cerebrovascular, las ratas en ambos grupos de tratamiento presentaron puntuaciones de déficits neurológicos significativamente mayores a las 24, 48 y 72 horas después del accidente cerebrovascular cuando se comparan con las puntuaciones antes del accidente cerebrovascular. El tratamiento con DiOHF3HA (15 mg/kg/día) mejora de forma cuantificable las puntuaciones de déficits neurológicos a las 24, 48 o 72 horas después del accidente cerebrovascular cuando se comparan con las ratas tratadas con vehículo. Las ratas tratadas con vehículo mostraron una mayor latencia para retirar las etiquetas adhesivas del miembro anterior contralateral afectado cuando se comparan con el lado ipsilateral (P<0,05, RM-ANOVA de dos vías con 2 factores de repetición, horas después del accidente cerebrovascular y lado). Este efecto se eliminó después del tratamiento con DiOHF3HA (15 mg/kg/día).

El área de infarto en la corteza se redujo significativamente después del tratamiento con DiOHF3HA (15 mg/kg i.v.) cuando se compara con el vehículo.

En resumen, el tratamiento con DiOHF3HA (15 mg/kg) mejoró significativamente la función neurológica en las pruebas de semidesatención, y también redujo el área de lesión en el cuerpo estriado después de un accidente cerebrovascular comparado con el tratamiento con vehículo.

*Efecto de DiOHF3HA en accidentes cerebrovasculares de leves a moderados*

Se estudiaron un grupo seleccionado de ratas con accidentes cerebrovasculares de leves a moderados.

| Vehículo          | DiOHF3HA    |
|-------------------|-------------|
| Grado n.º 3 (n=4) | n.º 2 (n=1) |
| Grado n.º 4 (n=3) | n.º 3 (n=4) |

Las ratas no perdieron peso después del accidente cerebrovascular de leve a moderado en ninguno de los grupos de tratamiento. La temperatura central antes del accidente cerebrovascular en ambos grupos de tratamiento estuvo dentro de los límites fisiológicos. Después del accidente cerebrovascular de leve a moderado, se produjo un aumento significativo en la temperatura a los 30 minutos en ambos grupos de tratamiento, pero la temperatura volvió a los niveles normales después de este tiempo.

Después de accidentes cerebrovasculares de leves a moderados, las ratas en ambos grupos de tratamiento presentaron puntuaciones de déficits neurológicos significativamente mayores antes del accidente cerebrovascular y a las 24, 48 y 72 horas después del accidente cerebrovascular comparadas con las puntuaciones previas a la cirugía. El

tratamiento con DiOHF3HA (15 mg/kg/día) no tuvo efecto sobre las puntuaciones de déficits neurológicos cuando se compararon con ratas tratadas con vehículo. Las ratas tratadas con vehículo con accidente cerebrovascular de leve a moderado mostraron una mayor latencia hasta tocar las etiquetas adhesivas del miembro anterior contralateral afectado de accidente cerebrovascular cuando se comparan con el lado ipsilateral a las 24 y 48 horas ( $P < 0,05$ , RM-ANOVA de dos vías con 2 factores de repetición, horas después del accidente cerebrovascular y lado). Las ratas tratadas con vehículo también mostraron una mayor latencia para retirar etiquetas adhesivas a las 24 horas ( $P < 0,05$ , RM-ANOVA de dos vías con 2 factores de repetición, horas después del accidente cerebrovascular y lado). Estos efectos se eliminaron después del tratamiento con DiOHF3HA (15 mg/kg/día) (Figura 18).

El área de infarto en ratas con accidente cerebrovascular de leve a moderado en la corteza se redujo significativamente después de tratamiento con DiOHF3HA (15 mg/kg i.v. por día) cuando se compara con vehículo (Figura 19). El tratamiento con DiOHF3HA también redujo significativamente el área de infarto en el cuerpo estriado.

En resumen, el tratamiento con DiOHF3HA (15 mg/kg) en ratas con accidente cerebrovascular de leve a moderado redujo el área de infarto en la corteza y el cuerpo estriado comparado con el tratamiento con vehículo. El tratamiento con DiOHF3HA también restauró significativamente la función neurológica en la prueba de semidesatención.

A no ser que se indique de otro modo, todos los valores en los gráficos son medias, mostrándose el error típico de la media por líneas verticales.

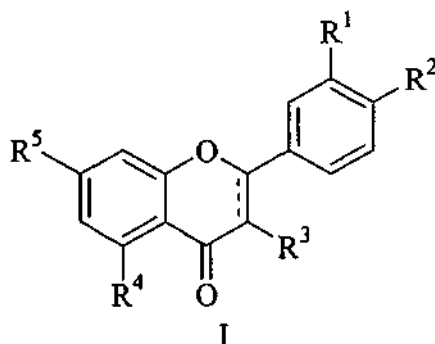
Toda discusión de documentos, actos, materiales, dispositivos, artículos o similares que se ha incluido en la presente memoria descriptiva tiene el único propósito de proporcionar un contexto para la presente invención. No se considerará como una admisión que ninguno o todos estos asuntos formen parte de la base de la técnica anterior o fueran de conocimiento general común en el campo pertinente al de la presente invención ya que existían antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de la presente solicitud.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, se entenderá que la palabra “comprenden”, o variaciones tales como “comprende” o “comprendiendo”, implica la inclusión de un elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas indicado pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos o números enteros.



## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la Fórmula general I:



en la que:

5 ---- denota un enlace sencillo o doble; y

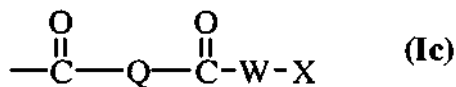
(i)  $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5$  están seleccionados independientemente de H, OH o un grupo de acuerdo con la Fórmula (Ia):



en la que:

O es oxígeno;

10 L y D están ausentes y E es un éster de acuerdo con la Fórmula (Ic):



en la que

Q es un alquileo de cadena lineal o ramificada no sustituido de 1 a 6 átomos de carbono;

W es O; y

15 X es H, alquilo sustituido o no sustituido, una sal mono-catiónica, o una sal de amonio catiónica; y

con la condición de que al menos uno de  $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5$  sea distinto de H u OH;

o su sal farmacéuticamente aceptable.

2. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que  $R^4$  y  $R^5$  son ambos H.

3. Un compuesto según la reivindicación 2, en el que  $R^1$  y  $R^2$  son ambos OH.

20 4. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que cada uno de  $R^1, R^2$  y  $R^4$  es H.

5. Un compuesto según la reivindicación 3, en el que ---- denota un doble enlace, Q es  $(CH_2)_n$ , donde n es un número entero de 2 a 6 y X es H.

6. Un compuesto según la reivindicación 5, en el que n es 4.

7. Un compuesto según la reivindicación 1 seleccionado del grupo que comprende  
 25 3-(benciloxycarbonilbutilcarboniloxi)flavona; 3-hemiadipato de 3-hidroxi-  
 4'-(benciloxi)-3-(benciloxycarbonilbutilcarboniloxi)flavona; 3-hemiadipato de 4'-hidroxi-  
 3',4'-dibenciloxi-3-(benciloxycarbonilbutilcarboniloxi)flavona; 3-hemiadipato de 3',4'-dihidroxi-  
 3,4'-di-(benciloxycarbonilbutilcarboniloxi)flavona; 3,4'-bis(hemiadipato) de flavona;  
 3,7-di-(benciloxycarbonilbutilcarboniloxi)flavona; 3,7-bis(hemiadipato) de 3,7-dihidroxi-  
 30 4'-hidroxi-3-hidroxi-  
 flavona-3-amonio cuaternario. o éster de

8. Una composición que comprende un vehículo o diluyente farmacéuticamente y/o veterinariamente aceptable junto con al menos un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
9. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad(es) en un sujeto asociada(s) con la presencia de especies reactivas de oxígeno (ERO).
- 5 10. Un compuesto según la reivindicación 9, en el que sujeto que necesita dicho tratamiento está en riesgo de desarrollar isquemia.
11. Un compuesto según la reivindicación 9, en el que sujeto padece isquemia y/o lesión por reperusión como resultado de una patología aguda o crónica.
- 10 12. Un compuesto según la reivindicación 11, en el que la patología crónica está seleccionada de cáncer, enfermedad cerebrovascular, enfermedad vascular pulmonar, aterosclerosis, enfermedad arterial, cardiopatía congestiva, enfermedad coronaria, enfermedad vascular periférica, diabetes, hipertensión, migraña, quemaduras, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfermedad vascular retiniana.
13. Un compuesto según la reivindicación 12, en el que la patología aguda está seleccionada de accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, traumatismo mecánico originado por lesión por aplastamiento o cirugía.
- 15 14. Un compuesto según la reivindicación 13, en el que la cirugía es cirugía vascular.
15. Un compuesto según la reivindicación 14, en el que la cirugía vascular es cirugía de derivación cardíaca y/o de trasplante.
16. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en la prevención, retraso del inicio de y/o ralentización de la progresión de aterosclerosis y/o cardiopatía coronaria en un sujeto.
- 20 17. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en la prevención y/o al menos mejoría de la lesión a un sujeto causada por isquemia y/o lesión por reperusión.
18. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en la prevención y/o al menos mejoría de la lesión a un sujeto causada por la administración de un agente terapéutico.
19. Un compuesto según la reivindicación 18, en el que el agente terapéutico es un agente terapéutico oxidante.
- 25 20. Un compuesto según la reivindicación 18, en el que el agente terapéutico es un agente terapéutico antineoplásico.
21. Un compuesto según la reivindicación 20, en el que el agente antineoplásico es antraciclina y homólogos de la misma.
22. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 21, en el que el compuesto es administrado al sujeto por vía oral.

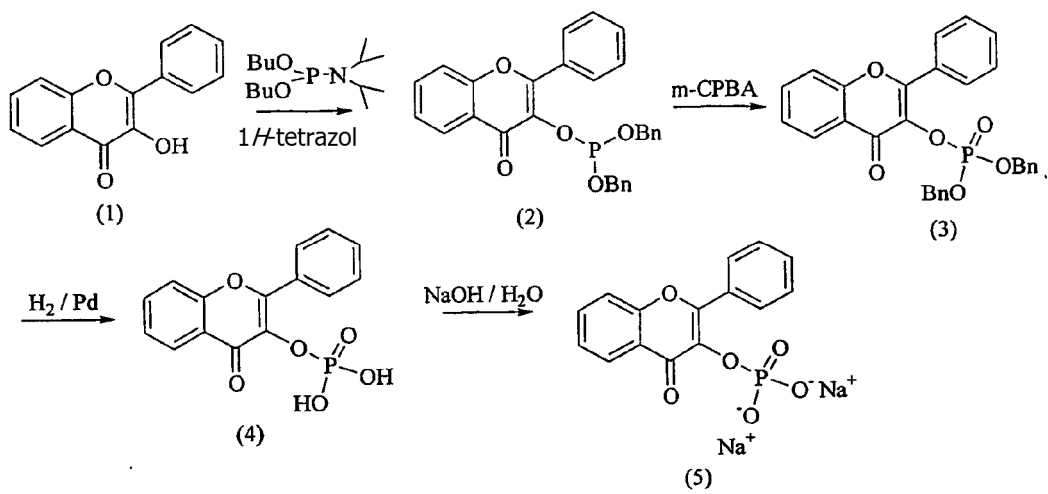


Figura 1

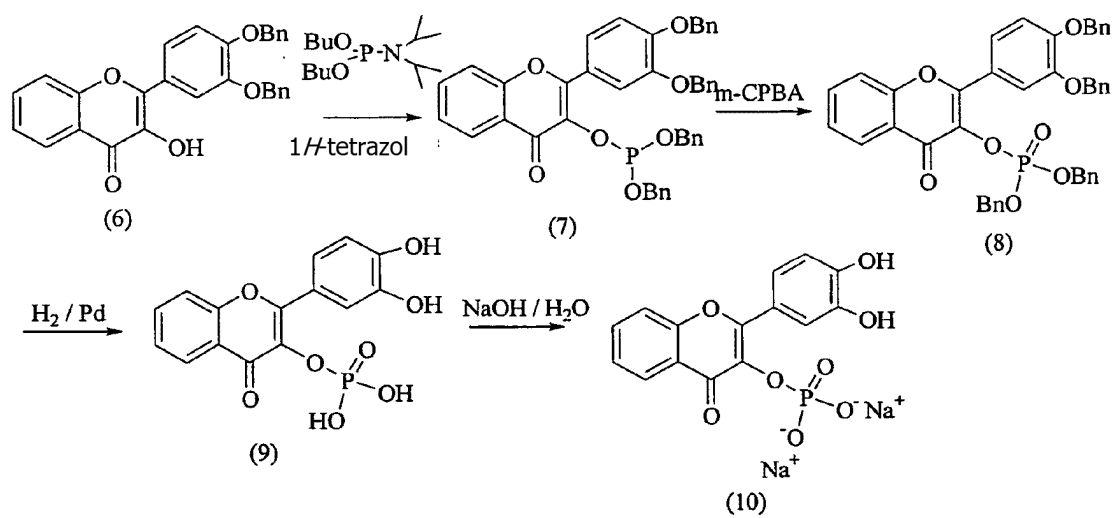


Figura 2

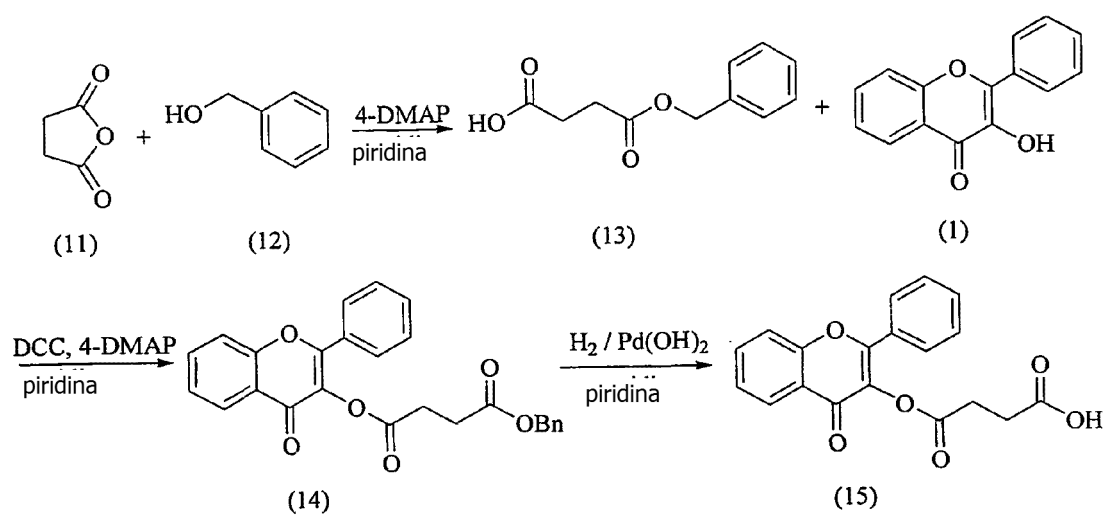


Figura 3

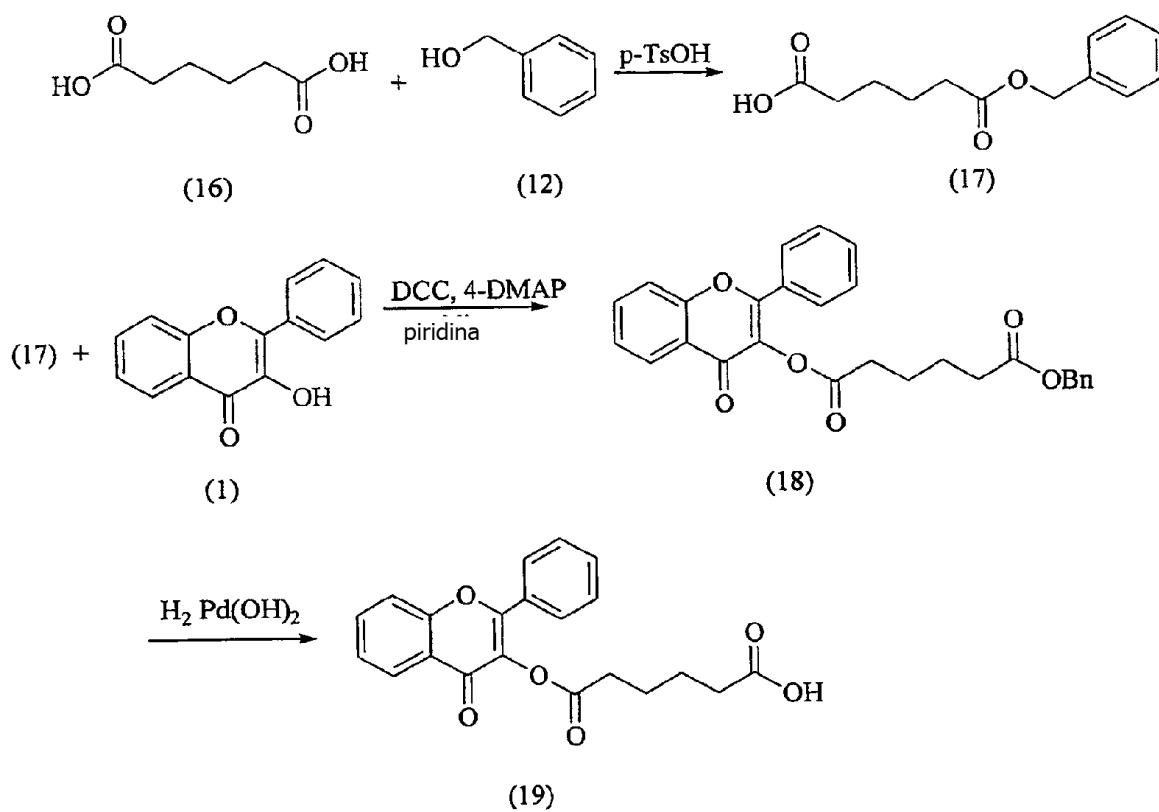


Figura 4

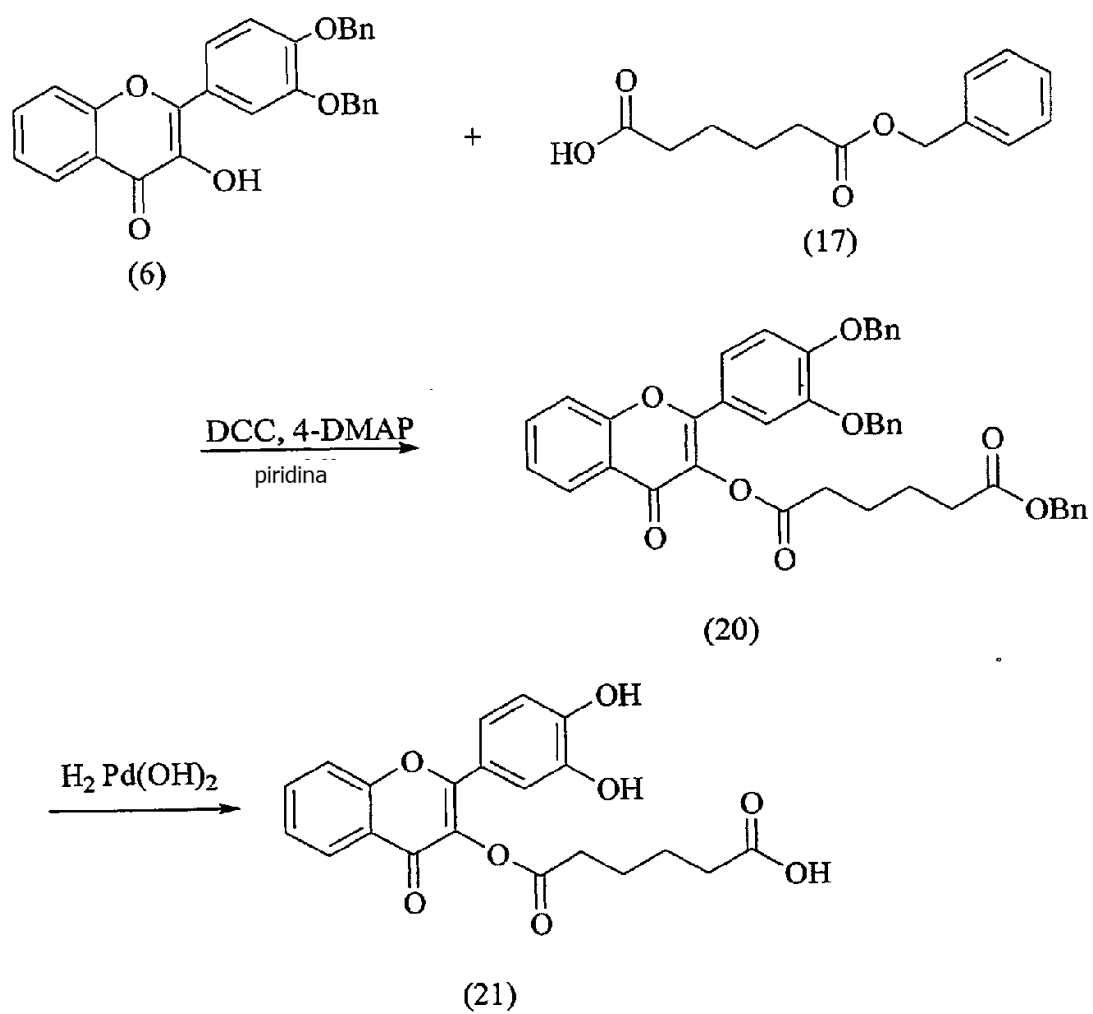


Figura 5

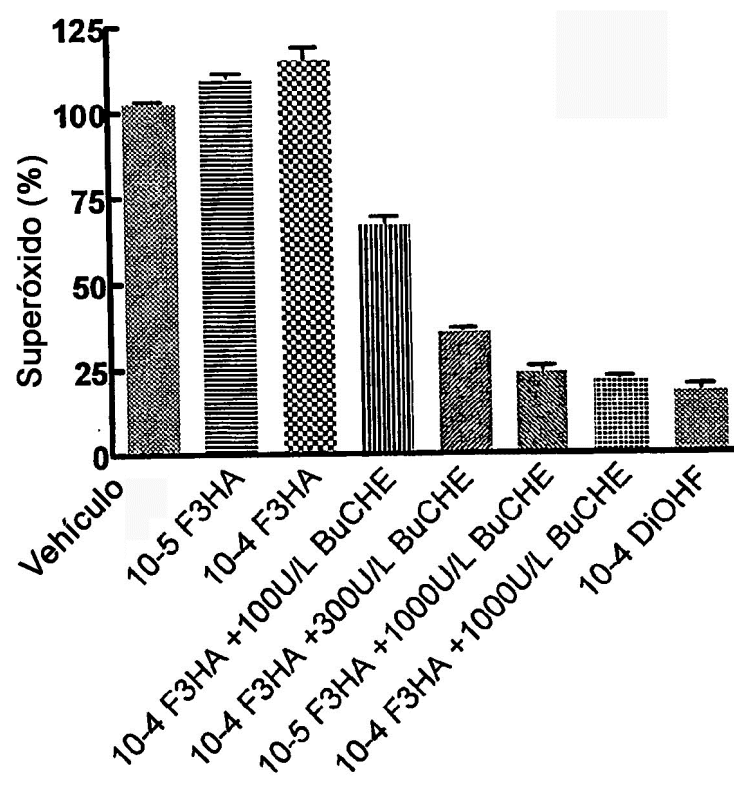


Figura 6



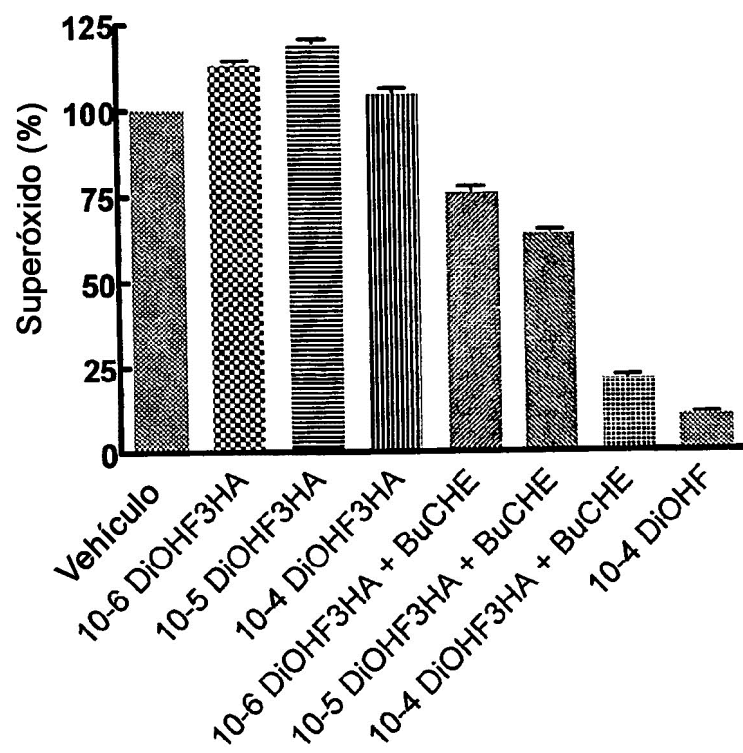


Figura 7

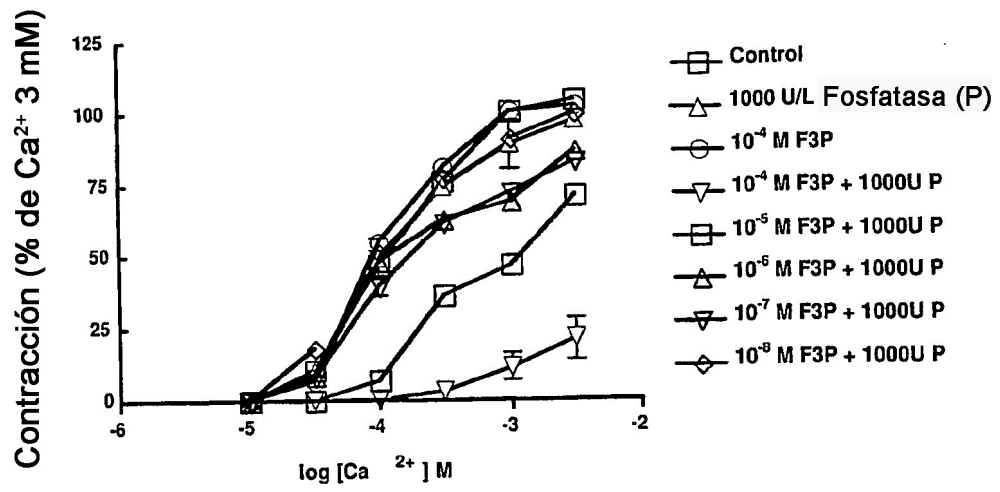


Figura 8

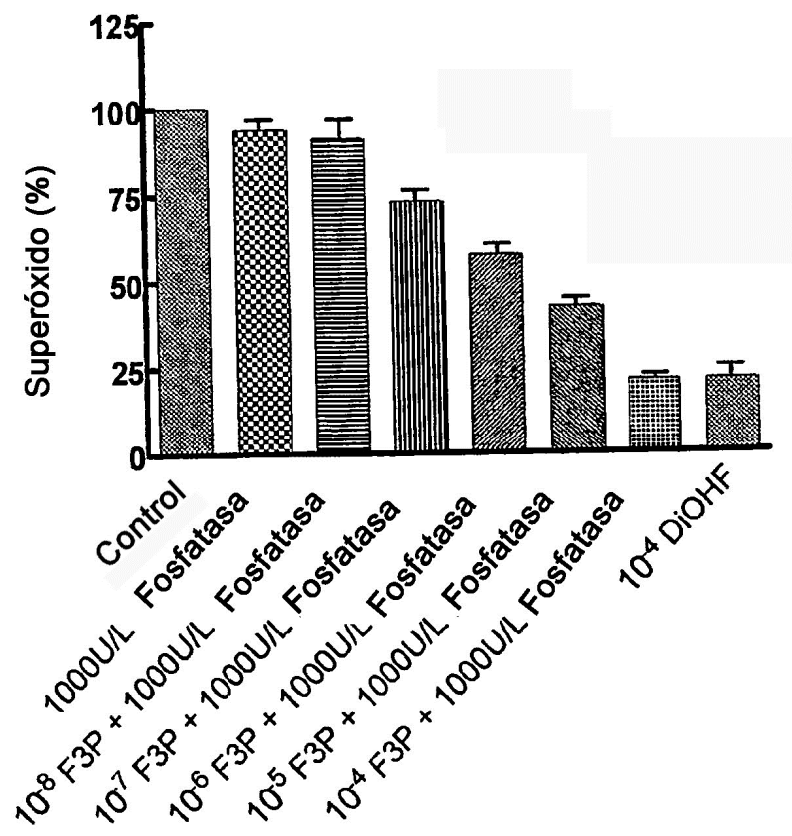


Figura 9

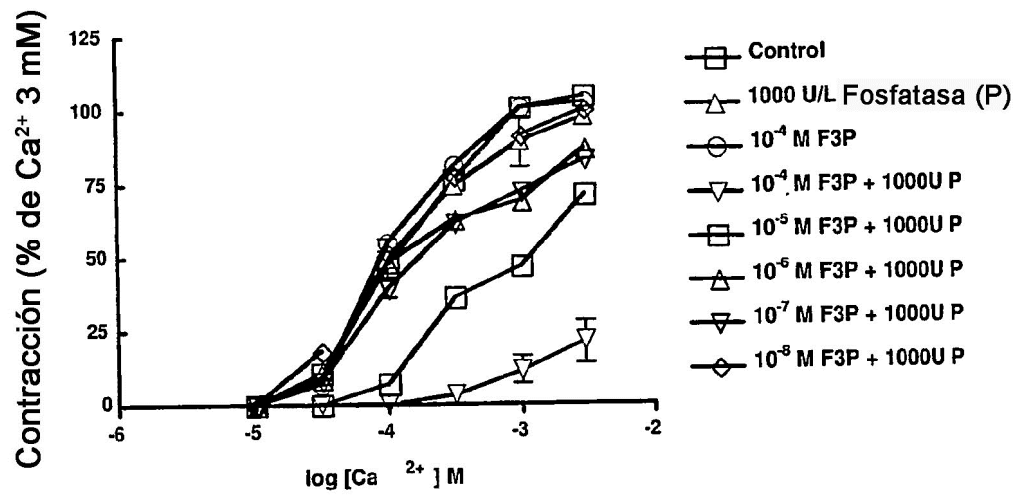


Figura 10

Efectos de DiOHF3Ha con BuCHE en el tono vascular de la aorta

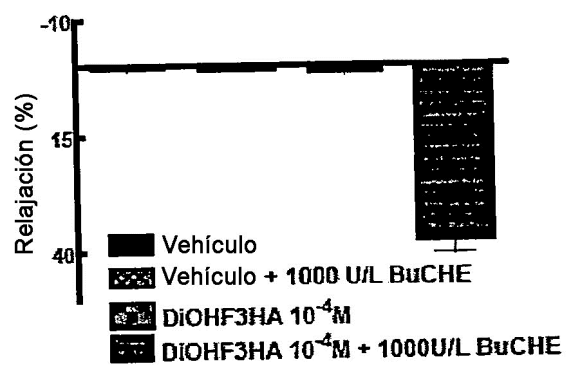
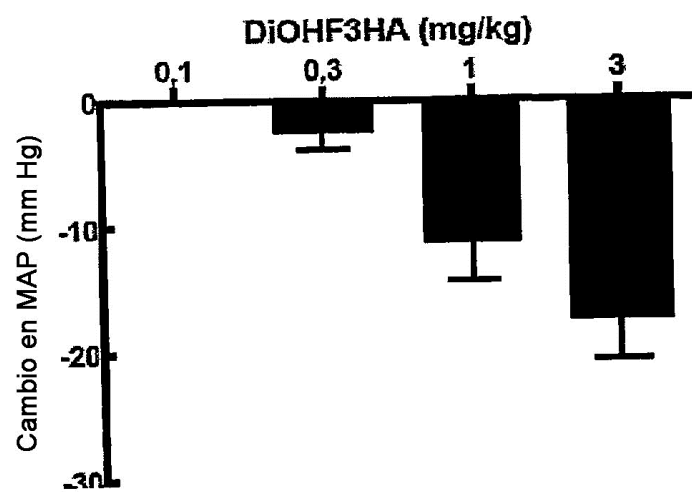


Figura 11



(a)

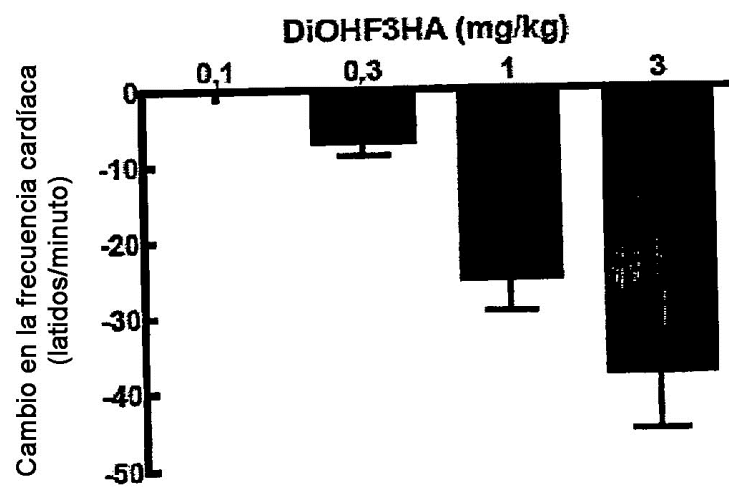


Figura 12 (b)

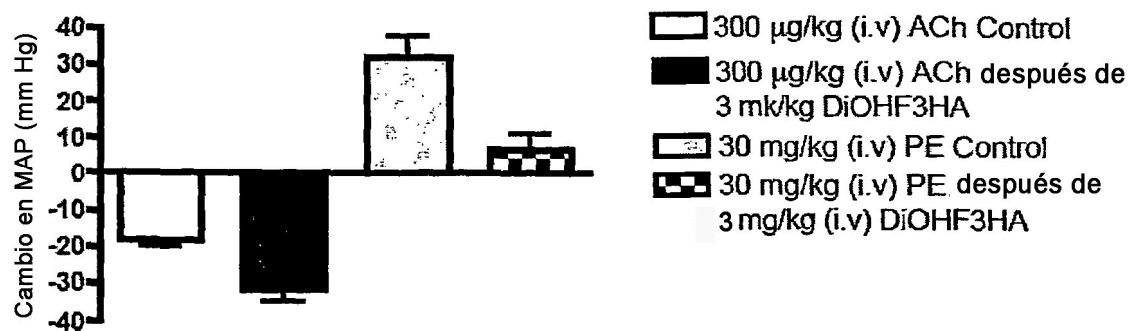


Figura 13

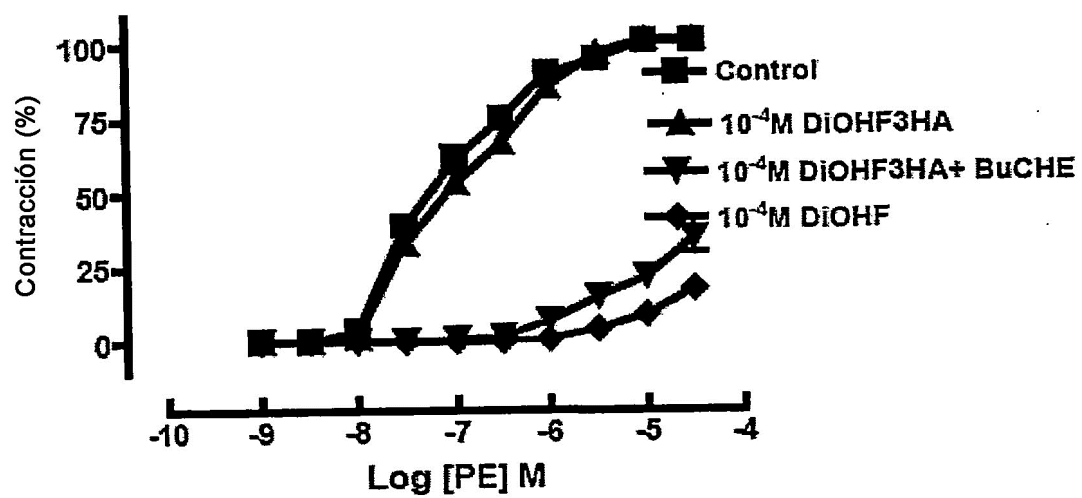


Figura 14



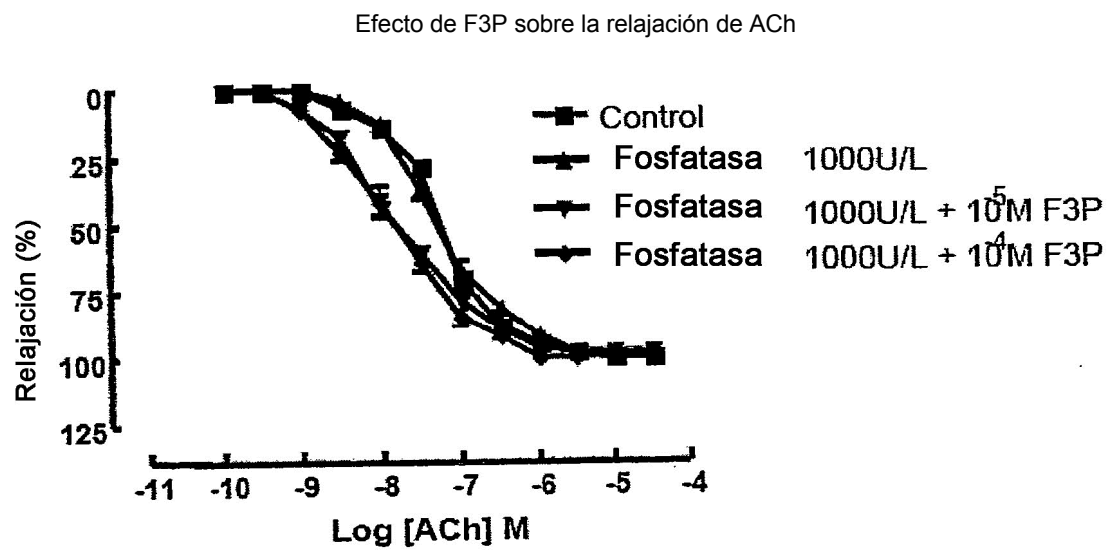


Figura 15

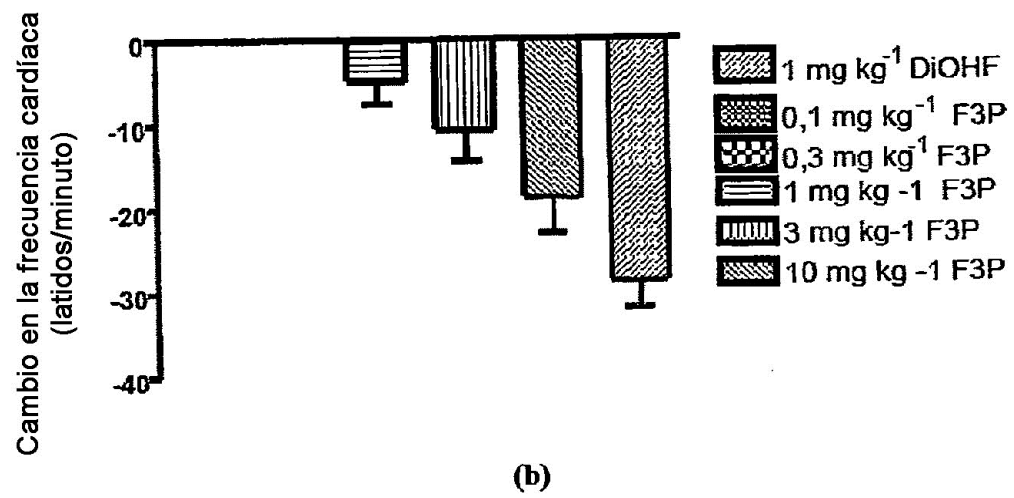
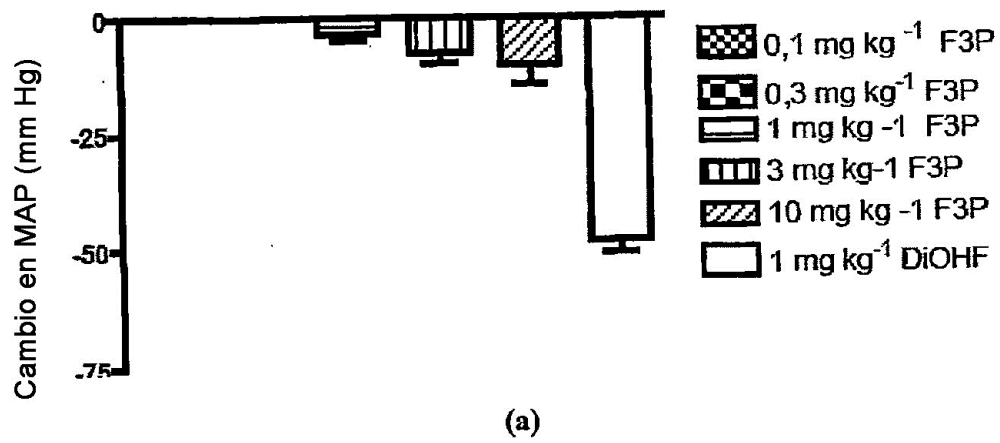


Figura 16

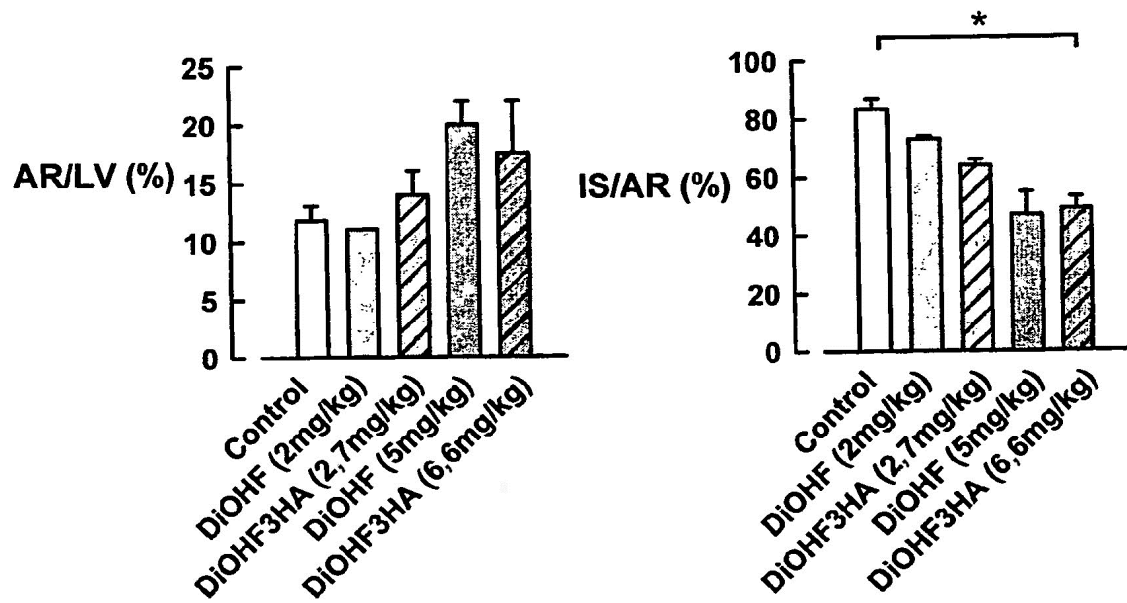


Figura 17

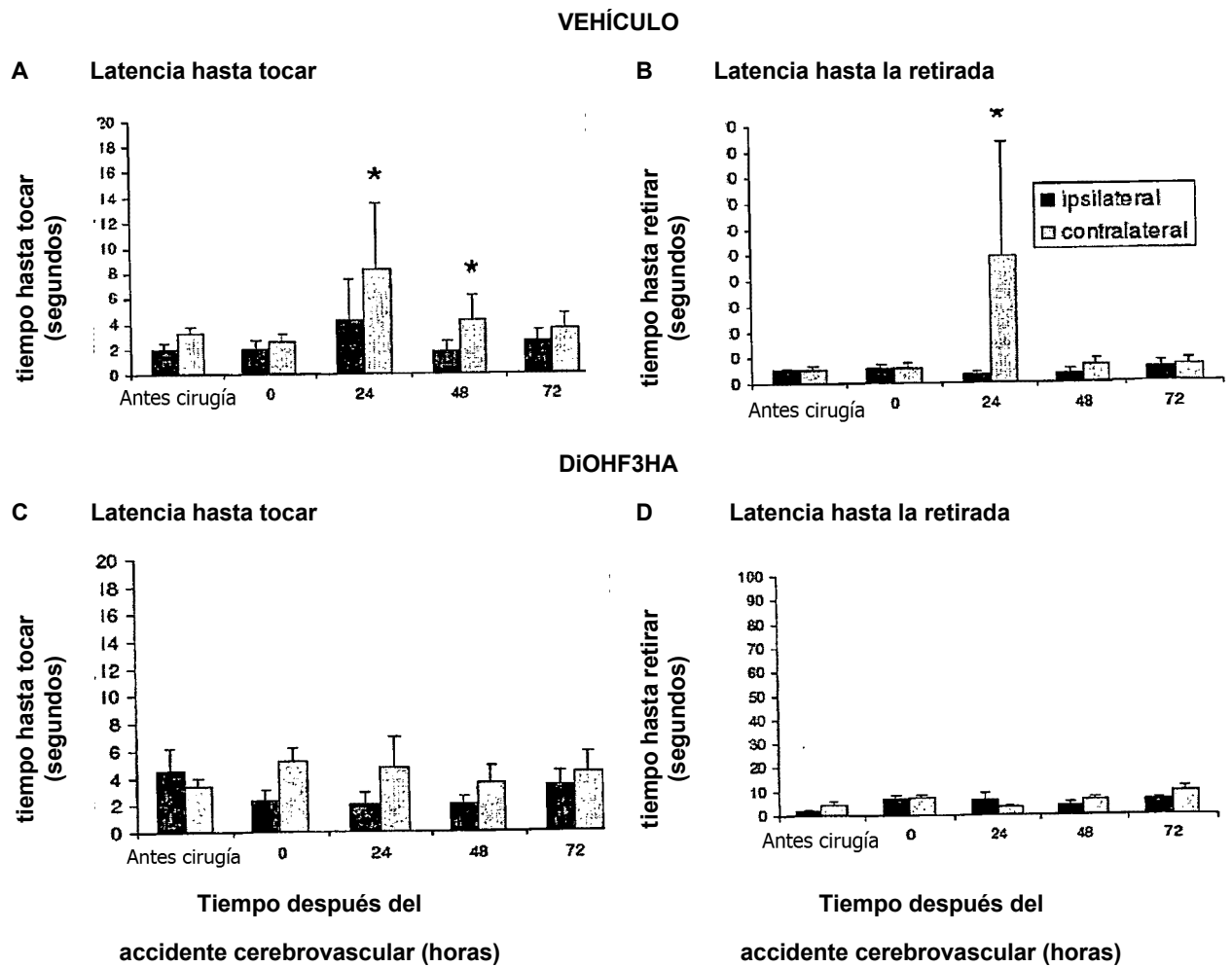


Figura 18

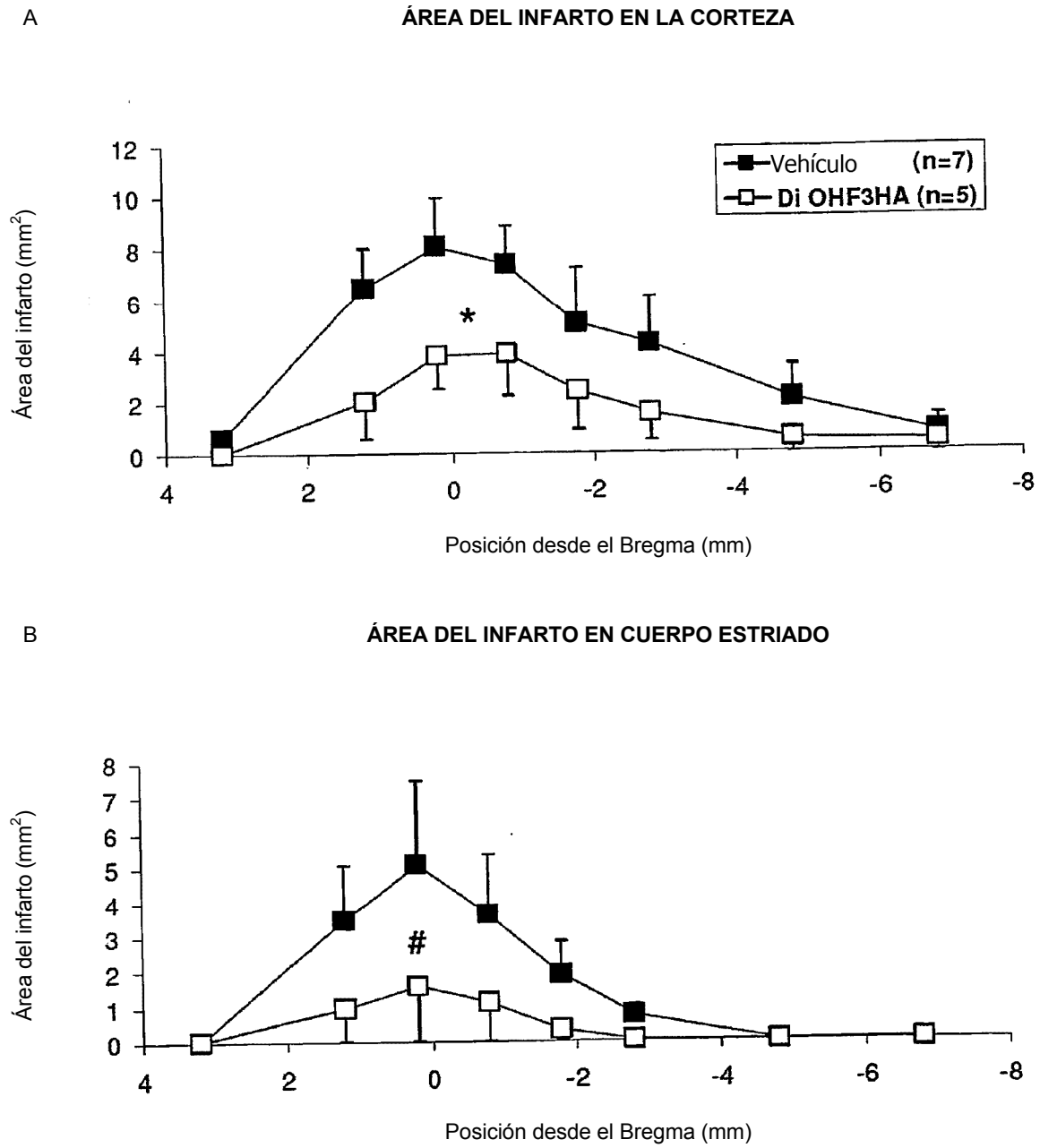


Figura 19