

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 754**

51 Int. Cl.:

A61K 31/568 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.07.2011 PCT/CN2011/076967**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2012 WO2012003802**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2011 E 11803155 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017 EP 2591785**

54 Título: **Uso de 5-androstano (alquil)-3,5,6-triol en la preparación de fármacos neuroprotectores**

30 Prioridad:

09.07.2010 CN 201010224173

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

29.06.2017

73 Titular/es:

GUANGZHOU CELLPROTEK PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)

**G401-415, 3 Lanyue Road International Business Incubator Guangzhou Science City
Guangzhou 510663 , CN**

72 Inventor/es:

**YAN, GUANGMEI;
HU, HAIYAN;
LENG, TIANDONG;
SANG, HANFEI;
ZHANG, JINGXIA;
QIU, PENGXIN;
ZHOU, SHUJIA;
CHEN, JIESI y
YOU, XIUHUA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 620 754 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

Uso de 5-androstano (alquil)-3,5,6-triol en la preparación de fármacos neuroprotectores

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al nuevo uso médico del compuesto 5 α -androstano-3 β ,5,6 β -triol (aquí en lo sucesivo abreviado como YC-6).

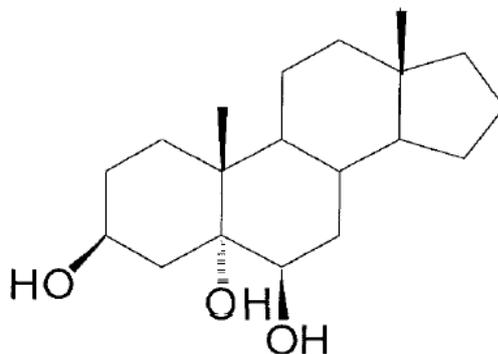
Antecedentes de la invención

10 El accidente cerebrovascular isquémico agudo (AIS, de sus siglas en inglés) se trata de manera habitual principalmente mediante trombolisis o neuroprotección. Neuroprotección se refiere a medicamentos o medidas, durante el tratamiento del AIS, que son capaces de inhibir reacciones patológicas y bioquímicas del tejido cerebral causadas por isquemia, que interfieren en las rutas en cascada de la isquemia y prolongan la supervivencia de las neuronas.

15 La neuroprotección se ha convertido en la actualidad en uno de los focos de investigación en el campo del tratamiento del AIS. En varios de los neuroprotectores que están bajo desarrollo clínico, el mecanismo por el cual previenen o limitan el daño cerebral resultado de la isquemia, es mediante el bloqueo de varios procesos patológicos perjudiciales debido a la isquemia, para reducir la muerte del tejido cerebral y promover la recuperación de la función. Los neuroprotectores pueden reducir el tamaño del infarto cerebral; sin dar como resultado una complicación hemorrágica, la cual puede ocurrir durante la terapia con trombolíticos o anticoagulantes; y se pueden emplear sin confirmación de la etiología, facilitando un tratamiento precoz. El efecto terapéutico de los neuroprotectores es, por lo tanto, prometedor.

20 Sin embargo, no existe aún un neuroprotector que haya demostrado ser seguro y eficaz. Los fármacos que están bajo ensayos clínicos y tienen un valor potencial de aplicación clínica incluyen los bloqueadores de los canales de calcio (CCB), moduladores de los canales de calcio, inhibidores de la liberación de glutamato, agonistas del receptor del ácido γ -aminobutírico (GABA), eliminadores de radicales libres, anticuerpos de moléculas de adhesión anti-intercelulares, etcétera.

25 De entre los diferentes compuestos, los esteroides neuroactivos despiertan un interés creciente debido a su amplio efecto en neuroprotección. Los niveles de los esteroides neuroactivos se correlacionan con el desarrollo y progresión de algunas enfermedades del sistema central (SNC), y juegan un papel significativo en la modulación del daño neurológico y, muerte, de estas enfermedades del SNC. Estas hormonas esteroides con actividad en los tejidos nerviosos, bien naturales o bien sintéticas, se llamaron esteroides neuroactivos (NAS) desde los años 1980. Estas hormonas esteroides se han utilizado clínicamente como terapia sustitutiva. El estrógeno se conoce por ser uno de
30 los NAS que tiene el más potente efecto neuroprotector. Los ovarios de las mujeres menopáusicas no producen estrógeno de nuevo, conduciendo probablemente a la deposición de la proteína β -amiloide ($A\beta$) y a la enfermedad de Alzheimer (AD). La administración de estrógeno puede reducir significativamente los niveles de $A\beta$ en el cerebro. Clínicamente, el tratamiento de la AD con estrógeno ha conseguido buenos resultados. Se demostró que la alopregnanolona protege las neuronas del hipocampo cultivadas in vitro, frente al daño neurotóxico irreversible por hipoxia o glutamato. El 5 α -androstano-3 β ,5,6 β -triol (YC-6) es un compuesto que se ha encontrado que tiene un efecto neuroprotector durante nuestra investigación sobre neuroesteroides, con la siguiente fórmula estructural. La información hasta el momento no revela ningún dato acerca del efecto farmacológico de YC-6 o de su neuroactividad/efecto neuroprotector.



40

Estructura de 5 α -androstano-3 β ,5,6 β -triol

Compendio de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar el uso del 5 α -androstano-3 β ,5,6 β -triol en la preparación de fármacos neuroprotectores, para proporcionar un nuevo fármaco para el tratamiento de enfermedades relacionadas con las neuronas.

- 5 La invención se refiere a 5 α -androstano-3 β ,5,6 β -triol para el uso en la protección contra el daño neurológico. Otras realizaciones de la invención se especifican en las reivindicaciones dependientes.

Nuestra invención ha demostrado que 5 α -androstano-3 β ,5,6 β -triol (YC-6) inhibe significativamente el daño excitotóxico inducido por glutamato en las neuronas granulares del cerebelo, neuronas corticales, y neuronas motoras de la médula espinal, aumenta la tasa de supervivencia de las neuronas y reduce la liberación de lactato deshidrogenasa de una manera dependiente de la dosis, con una concentración eficaz mínima de 1 μ M. YC-6 también inhibe significativamente el daño de las neuronas corticales del cerebro, causado por isquemia, de una manera dependiente de la dosis, con una concentración eficaz mínima de 2,5 μ M.

10 Para confirmar el efecto neuroprotector de YC-6 in vivo, se utilizó un modelo de lesión medular y un modelo isquémico cerebral focal, inducido mediante bloqueo de la aorta abdominal, para explorar el efecto neuroprotector de YC-6 contra el daño neurológico causado por isquemia cerebral en rata e isquemia de la médula espinal en conejo.

Se administró 1 mg. Kg⁻¹ de YC-6 a través de una inyección en la vena caudal a ratas del grupo YC-6, 30 minutos antes de la isquemia cerebral. Los animales en el grupo YC-6 tienen una puntuación neurológica mucho mayor y un volumen del infarto cerebral más pequeño que en el grupo control sin tratar, indicando que YC-6 tiene un efecto protector significativo contra el daño de neuronas cerebrales.

20 Los conejos que recibieron la administración de 2mg. Kg⁻¹ de YC-6, 30 minutos antes de la isquemia de la médula espinal, tienen una puntuación neurológica significativamente mayor que la del grupo control sin tratar. En el grupo YC-6 no se observó parálisis, mientras que los animales en el grupo control sí muestran parálisis. Histopatológicamente se demostró que, en los animales del grupo YC-6, permanecía una mayor cantidad de neuronas motoras del asta anterior de la médula espinal que en los del grupo control, indicando además que YC-6 tiene un efecto protector significativo contra el daño de la médula espinal.

Tomado lo anterior en su conjunto, YC-6 tiene un efecto protector contra el daño neurológico causado por isquemia cerebral, isquemia de la médula espinal o por hipoxia. Hasta el momento no se han reportado otras investigaciones sobre la neuroactividad / efecto neuroprotector de YC-6.

Breve descripción de los dibujos

30 Figura 1. El efecto protector de YC-6 contra la excitotoxicidad inducida por glutamato en neuronas granulares del cerebelo, neuronas motoras de la médula espinal, y neuronas corticales cerebrales. Morfología de (A) neuronas granulares del cerebelo (CGN), (B) neuronas motoras de la médula espinal (SP), y (C) neuronas corticales cerebrales (CN); (D) tasa de liberación de LDH y (E) tasa de supervivencia de las neuronas. * y **: neuronas granulares del cerebelo del grupo de Glutamato (Glu) significativamente diferentes, * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$; # y ## : neuronas motoras de la médula espinal del grupo Glutamato (Glu) significativamente diferentes, # $P < 0,05$ y ## $P < 0,01$; \$ y \$\$: neuronas corticales cerebrales del grupo Glutamato (Glu) significativamente diferentes, \$ $P < 0,05$ y \$\$ $P < 0,01$.

40 Figura 2. El efecto protector de YC-6 contra el daño de neuronas corticales inducido por hipoxia. (A) el resultado del microscopio de contraste de fase; (B) tasa de supervivencia de neuronas; (C) tasa de liberación de LDH. ## : diferencias significativas frente el grupo control, $P < 0,01$; * y **: diferencias significativas frente al grupo con hipoxia, * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$.

Figura 3. El efecto neuroprotector de YC-6 en isquemia de la médula espinal inducida por bloqueo de la aorta abdominal en conejos. (A) puntuación de la función neurológica; (B) cortes histopatológicos (tinción HE); (C) el número de neuronas motoras de la médula espinal normales.

45 Figura 4: El efecto neuroprotector de YC-6 en isquemia cerebral focal de rata. (A) puntuación de la función neurológica; (B) cortes cerebrales (tinción TTC); (C) comparación del volumen del infarto cerebral.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá a continuación en más detalle en ejemplos específicos. Pero, la presente invención no está limitada por los siguientes ejemplos.

50 Ejemplos

Ejemplo 1. Cultivo de Neuronas Granulares del Cerebelo primarias

1. Cultivos Primarios de Neuronas Granulares del Cerebelo de rata.

A partir de ratas con 7~8 días de edad y un peso de 15~20g, se retiró y obtuvo el cerebelo con las meninges y los vasos sanguíneos. Se utilizaron 0,05 g/L DNasa I para pipetear la célula a una suspensión celular única después de la digestión de 0,25 g/L de tripsina. Después, la suspensión se centrifugó para recoger la precipitación y se resuspendió en un medio BME que contiene 10% (v/v) de FBS y 25 mM de KCl. Después, las células se sembraron sobre placas recubiertas previamente con poli-lisina. 24 horas después del sembrado, se añadió 10 µM Ara-C para inhibir el crecimiento y la proliferación de células no neuronales, tal que, las neuronas granulares de cerebelo tenían una pureza de no menos del 95%. Durante el cultivo se añadió glucosa para proporcionar energía suplementaria para el metabolismo celular. Se llevaron a cabo experimentos a 8 DIV.

2. Neuronas Motoras de la Médula espinal de rata.

Se obtuvo la médula espinal de ratas SD preñadas de 15 días. Se eliminaron la membrana y la película de sangre. Los tejidos de la médula espinal de ratas fetales se digirieron con 0,125% de tripsina y se centrifugaron después para recoger la capa intermedia enriquecida en neuronas motoras. Se eliminaron los residuos celulares mediante centrifugación y las células se adherieron mediante la técnica adherente de velocidad diferencial durante 1 hora. La suspensión de neuronas motoras de la médula espinal con una menor velocidad de adhesión, se recogieron y sembraron. 24 horas después de la siembra, se añadió Ara-C. El medio de cultivo se reemplazó por 3 DIV con medio libre de suero L-15, seguido de un cambio de la mitad del medio cada 2~3 por semana. Los experimentos se llevaron a cabo en 3-5 DIV.

3. Neuronas Corticales de rata.

A partir de ratas recién nacidas (1 día de vida) se retiró y obtuvo el córtex con las meninges y los vasos sanguíneos. Se utilizaron 0,05 g/L de DNasa I para pipetear la célula a una suspensión celular única después de la digestión de 0,25 g/L de tripsina. Después, la suspensión se centrifugó para recoger la precipitación y se diluyó con medio DMEM-F12 que contiene 5% (v/v) de FBS y 2% de B27. La célula se sembró sobre placas previamente recubiertas con poli-lisina. 24 horas después de la siembra, se añadió Ara-C 10 µM para inhibir el crecimiento y la proliferación de las células no neuronales. Se realizó un cambio de la mitad del medio 2~3 por semana. Los experimentos se llevaron a cabo en 10 DIV.

Ejemplo 2. Efecto Protector de YC-6 en Neuronas Primarias Cultivadas

1. Efecto protector de YC-6 contra la excitotoxicidad inducida por glutamato en neuronas granulares del cerebelo

Las neuronas granulares del cerebelo cultivadas durante 8 días se dividieron en cuatro grupos: grupo control, grupo glutamato, grupo MK801+glutamato, y grupo YC-6+glutamato. El grupo control no recibió tratamiento. El grupo glutamato se trató con 200 µM de glutamato. El grupo MK801 y el grupo YC-6 se pre-trataron con MK801 (10 µM) y YC-6 con diferentes concentraciones, respectivamente, seguido por incubación a 37°C durante 30 minutos, después se añadió glutamato. Después de 24 horas se utilizó el microscopio de contraste de fase para observar las morfologías neuronales. Las células se tiñeron mediante FDA y se observaron bajo microscopio óptico fluorescente para contar células y calcular la tasa de neuronas supervivientes. La actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) también se determinó para cada grupo.

Tasa de Supervivencia = Número de células vivas para cada grupo / Número de células vivas en el grupo control * 100%

Los resultados mostraron que la mayoría de las neuronas granulares del cerebelo en el grupo YC-6+glutamato y el grupo MK801+glutamato, podían mantener la integridad del soma y de los procesos, incrementaron la tasa de supervivencia y descendieron la liberación de LDH. Se observaron diferencias estadísticas entre los grupos YC-6 y MK801 y el grupo glutamato. Como muestran las Figuras 1-A, D, y E, el efecto de YC-6 era dependiente de la concentración. YC-6 no se mostró afectado en la tasa de supervivencia de las células de neuronas normales dentro de los intervalos de dosis indicados.

2. Efecto protector de YC-6 contra la excitotoxicidad inducida por glutamato en neuronas motoras de la médula espinal

Las neuronas motoras de la médula espinal primariamente cultivadas a 5 DIV se dividieron en cuatro grupos: grupo control, grupo glutamato, grupo MK801+glutamato, y grupo YC-6+glutamato. El grupo control no recibió tratamiento. El grupo glutamato se trató con 200 µM de glutamato. El grupo MK801 y el grupo YC-6 se pre-trataron con MK801 (10 µM) y YC-6 con diferentes concentraciones, respectivamente, seguido de incubación a 37 °C durante 30 minutos, después se añadió glutamato. Después de 24 horas, se utilizó un microscopio en fase de contraste para observar las morfologías neuronales. Las células se tiñeron mediante FDA y se observaron bajo microscopio fluorescente invertido para contar células y calcular la tasa de supervivencia de las neuronas. La actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) se determinó también para cada grupo.

Tasa de Supervivencia = Número de células vivas para cada grupo / Número de células vivas en el grupo control * 100%

La observación del microscopio en fase de contraste mostró que un gran número de neuronas motoras espinales sobrevivieron en el grupo control, con un soma en forma de triángulo o de polígono intacto. Las células eran estereoscópicas y tenían un halo y neuritas visibles. En el grupo glutamato sobrevivieron pocas células motoras espinales, aunque con neuritas formadas. Las células en este grupo estaban gravemente dañadas. El número de neuronas motoras espinales en el grupo MK801+glutamato y en el grupo YC-6+glutamato, estaba significativamente aumentado y se veían muchas neuritas, aunque un pequeño número de células estaban muertas. Comparado con el grupo control, las tasas de supervivencia de los demás grupos descendieron, aunque en grados diferentes. Comparado con el grupo glutamato, la tasa de supervivencia del grupo YC-6+glutamato era significativamente mayor y, era dependiente de la concentración de YC-6, como se muestra en las Figuras 1-B, D, y E. YC-6 no mostró efecto sobre la tasa de supervivencia de neuronas normales dentro de los intervalos de dosis indicados.

3. Efecto protector de YC-6 contra la excitotoxicidad inducida por glutamato en neuronas corticales

Las neuronas corticales primariamente cultivadas a 10 DIV se dividieron en cuatro grupos: grupo control, grupo glutamato, grupo MK801+glutamato, y grupo YC-6+glutamato. El grupo control no recibió tratamiento. El grupo glutamato se trató con 200 μ M de glutamato. El grupo MK801 y el grupo YC-6 se pre-trataron con MK801 (10 μ M) y YC-6 con diferentes concentraciones, respectivamente, seguido de incubación a 37 °C durante 30 minutos, después se añadió glutamato. Después de 24 horas, se utilizó un microscopio en fase de contraste para observar las morfologías neuronales. Las células se tiñeron mediante FDA y se observaron bajo microscopio fluorescente invertido para contar células y calcular la tasa de supervivencia de las neuronas. La actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) se determinó también para cada grupo.

Tasa de Supervivencia = Número de células vivas para cada grupo / Número de células vivas en el grupo control * 100%

Los resultados mostraron que un gran número de neuronas corticales en el grupo YC-6+glutamato y el grupo MK801+glutamato mantenía los somas y las neuritas intactas y, tenían tasas de supervivencia mayores y, una menor liberación de LDH. Se observaron diferencias estadísticas entre los grupos YC-6 y MK801 y, el grupo glutamato. Como se muestra en las Figuras 1-C, D, y E, el efecto de YC-6 era dependiente de la concentración. YC-6 no mostró efecto sobre la tasa de supervivencia de células neuronales normales dentro de los intervalos de dosis indicados.

4. Efecto protector de YC-6 contra el daño inducido por hipoxia en neuronas corticales

Las neuronas corticales primariamente cultivadas a 10 DIV se dividieron en cuatro grupos: grupo control, grupo hipoxia, grupo MK801+hipoxia, y grupo YC-6+hipoxia. Se proporcionaron para cada grupo pocillos duplicados por 3. El grupo control se incubó en un incubador normóxico de CO₂. El grupo con hipoxia se colocó en una estación de trabajo con hipoxia (oxígeno concentrado: 1%). El grupo MK801+ hipoxia y el grupo YC-6+ hipoxia se trataron con MK801 (10 μ M) y YC-6 con diferentes concentraciones 30 minutos antes de desplazarlos a la estación de trabajo con hipoxia (oxígeno concentrado: 1%). Después de 12 horas, las células se observaron y fotografiaron bajo microscopio de contraste de fase.

El tratamiento se realizó en 96 pocillos. Se añadieron 200 μ l de disolución madre MTT a cada pocillo y se incubó durante 4 horas. Se formaron cristales de color jacinto en las células vivas. Se eliminó el líquido de cada pocillo y se sustituyó con 150 μ l de DMSO para disolver los cristales. Los cristales se disolvieron después de media hora y el valor OD se detectó a 570 nm de longitud de onda mediante un Lector de Microplacas. Se obtuvieron 50 μ l de un medio de cultivo a partir de todos los grupos a diferentes puntos de tiempo y se determinó la liberación LDH para cada pocillo según las instrucciones del fabricante. Los datos se presentaron como la media \pm SD, mediante ANOVA unidireccional, se analizaron estadísticamente usando un test-t de muestras emparejadas y el análisis de la varianza por medio de muestras múltiples. Véanse las referencias [1] y [2]. [1] Brewer G.J. Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *J. Neurosci. Meth.* 1997, 71:143-155. [2] Lee M.M., Hseih M.T. Magnolol protects cortical neuronal cells from chemical hypoxia in rats. *Neuroreport* 1998, 9:3451-3456.

Los resultados mostraron neuronas corticales de rata cultivadas primariamente a 10 DIV con forma cónica o forma multi-polar con soma brillante, límite y núcleo claros. Las células tenían una refractividad muy alta y las neuritas se conectaban para formar una red.

Las neuronas corticales expuestas a hipoxia mostraron una integridad alterada y una refractividad disminuida. Las neuritas se rompieron o desaparecieron. El citoplasma experimentó degeneración granular. Alguno de los somas estaba hinchado o había desaparecido.

Comparado con el grupo control, el grupo MK801+hipoxia y el grupo YC-6 +hipoxia no mostraron diferencias en la morfología de las células neuronales corticales. El efecto de protección neuronal de YC-6 era dependiente de la concentración (Figura 2A). El método MTT mostró que el tratamiento con hipoxia descendió significativamente la tasa de supervivencia de neuronas ($P < 0,05$), mientras que el YC-6 aumentó la tasa de supervivencia de las neuronas de una manera dependiente de la concentración (Figura 2B). Los datos de la liberación de LDH estaban en consonancia con los resultados del método MTT. El grupo pre-tratado con YC-6 atenuó el daño neuronal causado por hipoxia de una manera dependiente de la concentración (Figura 2-C, $P < 0,05$).

Ejemplo 3: Efecto Neuroprotector de YC-6 contra isquemia de la médula espinal de conejo inducida mediante bloqueo de la aorta abdominal

Se agruparon 40 conejos blancos macho de Nueva Zelanda en 4 grupos (n = 10): Grupo control para el establecimiento del modelo isquémico de la médula espinal de conejo; grupo YC-6, con 2 mg.kg⁻¹ de esteroide YC-6 inyectado a través de la vía intravenosa en la vena marginal de la oreja del conejo 30 minutos antes de la isquemia de la médula espinal; Grupo de vehículos, con una capacidad equivalente de hidroxipropil ciclodextrinas (1 mg.kg⁻¹) inyectada de la misma forma 30 minutos antes de la isquemia de la médula espinal; Grupo de simulación, únicamente con exposición de la aorta abdominal pero sin bloqueo.

El establecimiento del proceso del modelo isquémico de la médula espinal de conejo se realizó según las referencias [3] y [4] y nuestro informe previo [5]. [3] Celik M. *et al.* Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 2002, 99:2258-2263. [4] Johnson SH, Kraimer J.M., Graeber G.M. Effects of flunarizine on neurological recovery and spinal cord blood flow in experimental spinal cord ischemia in rabbits, *Stroke*, 1993, 24: 1547-1553. [5] Sang H., Cao L., Qiu P., Xiong L., Wang R., Yan G. Isoflurane produces delayed preconditioning against spinal cord ischemic injury via release of free radicals in rabbits. *Anesthesiology*, 2006, 105: 953-960.

Se obtuvieron parámetros fisiológicos para cada grupo inmediatamente antes de la isquemia, 10 minutos después de la isquemia y 20 minutos después de la reperfusión. Se utilizó la puntuación de Tarlov [5] para obtener puntuaciones funcionales para cada grupo: 0 puntos, parálisis completa de las extremidades posteriores; 1 punto, notable movimiento articular de las extremidades posteriores; 2 puntos, movimiento libre del conjunto de las extremidades posteriores pero incapacidad para levantarse; 3 puntos, capaz de levantarse pero incapaz de caminar; 4 puntos, recuperación completa de la función de movimiento de las extremidades posteriores y capaz de caminar con normalidad.

Después de puntuar la función neurológica, los conejos se sometieron a anestesia y se obtuvieron los segmentos lumbares (L₅-L₇) de los tejidos de la médula espinal. Los tejidos se embebieron en parafina, se cortaron, y después se sometieron a tinción HE. Se observaron cambios patológicos bajo un microscopio óptico por un observador que no sabía cómo se agruparon los conejos y se contaron las neuronas motoras normales del asta anterior de la médula espinal. El recuento de neuronas motoras normales del asta anterior de la médula espinal se presentó como el valor medio de 3 muestras.

Los resultados mostraron que no había diferencia estadística ($P > 0,05$) en los parámetros obtenidos inmediatamente antes de la isquemia, 10 minutos después de la isquemia y 20 minutos después de la reperfusión. Se determinó la puntuación de la función neurológica y se muestran en la Figura 3-A. La función neurológica de las extremidades posteriores de los conejos en el grupo de Simulación era completamente normal durante la observación completa (4 puntos); ninguno de los conejos en los grupos Control y de los Vehículos se podían levantar; 7 de los conejos en el grupo YC-6 se podían levantar (puntuación 3 o más). Las puntuaciones de la función neurológica de los grupos YC-6 y de Simulación eran significativamente mayores que la de los grupos Control y de Vehículos ($P < 0,05$).

En los grupos Control y de Vehículos, los segmentos lumbares de los tejidos de la médula espinal se dañaron gravemente, reflejada como una desaparición importante de las neuronas motoras normales y una degeneración vacuolar extensa. En el grupo YC-6, sin embargo, el daño de la médula espinal se atenuó sustancialmente y se observaron neuronas motoras normales (Figura 3-B). El número de neuronas motoras normales del asta de la médula espinal en los grupos YC-6 y de Simulación era significativamente mayor (Figura 3-C).

En conclusión, YC-6 es neuroprotector contra la isquemia de la médula espinal.

Ejemplo 4. Efecto neuroprotector de YC-6 contra isquemia cerebral focal de rata (MCAO)

30 ratas machos SD se dividieron de forma aleatoria dentro de 3 grupos (n = 10): Grupo Control, para el establecimiento del modelo isquémico cerebral focal de rata; grupo YC-6, con 1 mg.kg⁻¹ de YC-6 inyectado intravenosamente a través de la vena caudal 30 minutos antes de la isquemia cerebral; Grupo del Vehículo, con una capacidad equivalente de hidroxipropil ciclodextrinas (2 mg.kg⁻¹) inyectado de la misma manera 30 minutos antes de la isquemia cerebral.

Las ratas se sometieron a ayuno post-operatorio durante 12 horas y mientras se les permitió beber libremente. Se estableció el modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) mediante la técnica de la hebra intraluminal [6]. [6] Wang Q., Peng Y., Chen S., Gou X., Hu B., Du J., Lu Y., Xiong L. El pretratamiento con electroacupuntura induce tolerancia rápida a la isquemia cerebral a través de la regulación del sistema endocannabinoide. *Stroke*, 2009, 40(6): 2157-2164. Después de la oclusión durante 120 minutos, la hebra se liberó y se siguió de una reperfusión continuada. Se monitoreó el flujo sanguíneo cerebral regional mediante un láser Doppler medidor del flujo sanguíneo. Los animales se devolvieron a la jaula cuando despertaron y se les permitió beber y comer libremente. 72 horas de reperfusión después de la isquemia cerebral, se utilizó el método de puntuación Longa [7] para ensayar y puntuar la función neurológica mediante un observador que no sabía cómo se habían agrupado las ratas: grado 0, sin disfunción; grado 1, incapaz de estirar la extremidad anterior izquierda; grado 2, rotación hacia la

izquierda; grado 3, descenso hacia la izquierda; grado 4, sin actividades autonómicas acompañado por inhibición de la consciencia; grado 5, muerte. [7] Longa E.Z., Weinstein P.R., Carlson S., Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.

5 Después de la puntuación de la función neurológica, las ratas se sacrificaron y rápidamente se les sacaron los cerebros. Después de cortarlos, las secciones del cerebro se tiñeron inmediatamente en una disolución TTC durante 30 minutos, seguido de la fijación con paraformaldehído. Después de 24 horas, los cortes se fotografiaron utilizando una cámara digital y las imágenes se importaron a un ordenador. Se utilizó un programa informático de procesamiento de la imagen (ADOBE, PHOTOSHOP 8.0) para calcular el volumen del infarto (el tejido cerebral normal se muestra en rosa y el área del infarto se muestra en blanco). Para calibrar la desviación en el volumen del infarto causado por el edema cerebral, el volumen del infarto se presentó como el porcentaje del volumen normal en el lado opuesto.

Volumen del infarto = (Volumen tisular normal del lado opuesto – volumen tisular normal del lado correspondiente) / volumen tisular normal del lado opuesto * 100%

15 Se ensayó la puntuación del comportamiento neurológico (NBS, de sus siglas en inglés) utilizando el test de Kruskal-Wallis. Si se presentaba una diferencia entre los grupos, se utilizó el test de Mann-Whitney U y la calibración Bonferroni para la comparación por parejas. El volumen del infarto y los parámetros fisiológicos se presentaron como la media ± error SD y se analizó utilizando ANOVA en una dirección siguiendo el test Post hoc Student-Newman-Keuls (SNK) para la comparación por parejas entre grupos múltiples. * $P < 0,05$ indica diferencia estadística.

20 Las puntuaciones de la función neurológica para los animales de cada grupo se muestran en la Figura 5. El grupo YC-6 comparado con los grupos Control y de Vehículos, tienen una mejora significativa en la función neurológica y en la reducción del volumen del infarto (* $P < 0,05$).

Tomando en conjunto lo anterior, YC-6, es decir, 5α -androstano- $3\beta,5,6\beta$ -triol tiene efecto protector contra los daños neuronales causados por hipoxia, isquemia cerebral o isquemia de la médula espinal.

REIVINDICACIONES

1. 5α -androstano- $3\beta,5,6\beta$ -triol para el uso en la protección contra el daño neuronal.
2. El 5α -androstano- $3\beta,5,6\beta$ -triol para el uso según la reivindicación 1, en donde el daño neuronal es causado por isquemia cerebral.
- 5 3. El 5α -androstano- $3\beta,5,6\beta$ -triol para el uso según la reivindicación 1, en donde el daño neuronal es causado por isquemia de la médula espinal.
4. El 5α -androstano- $3\beta,5,6\beta$ -triol para el uso según la reivindicación 1, en donde el daño neuronal es causado por hipoxia.

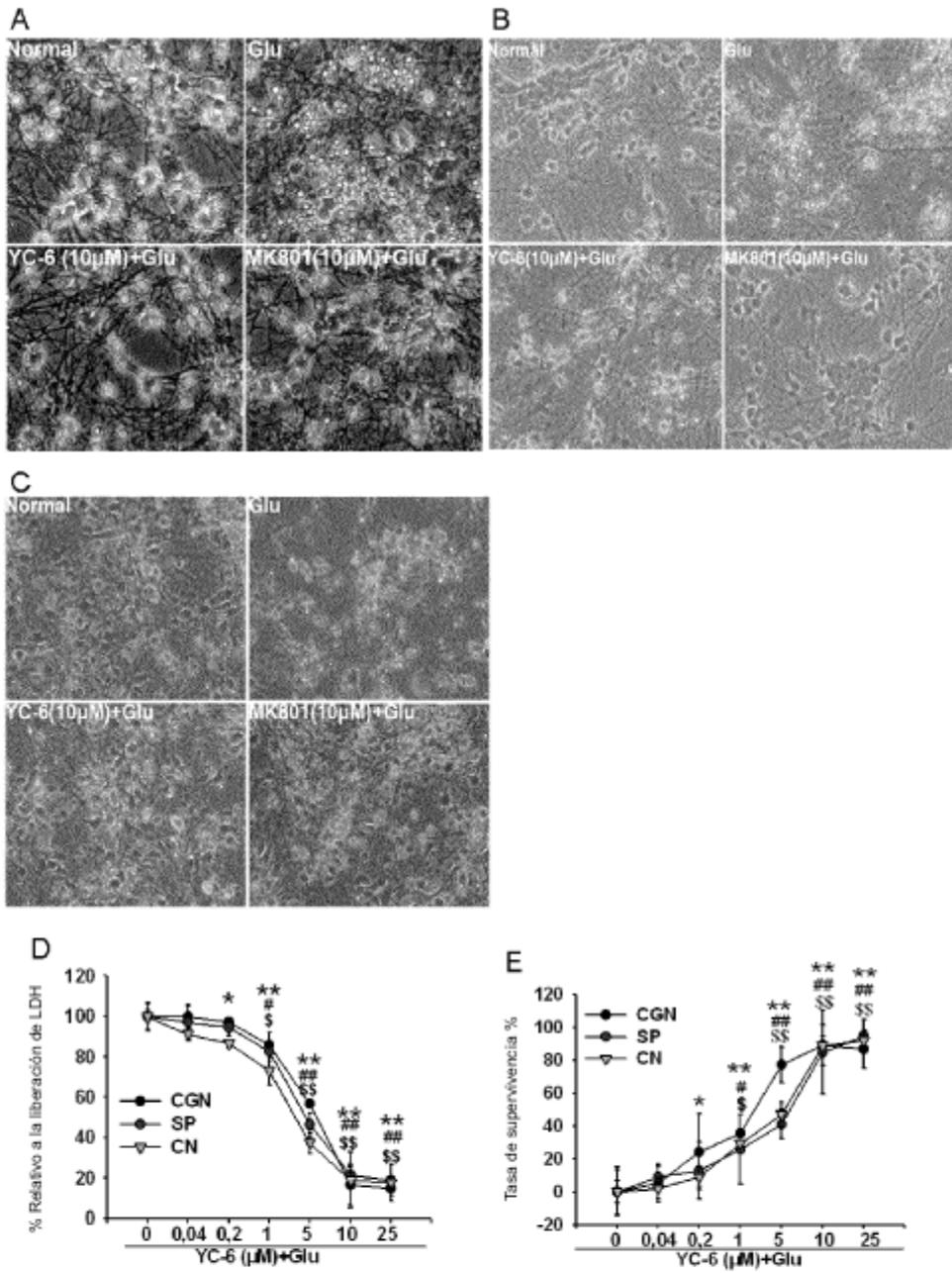


FIGURA 1

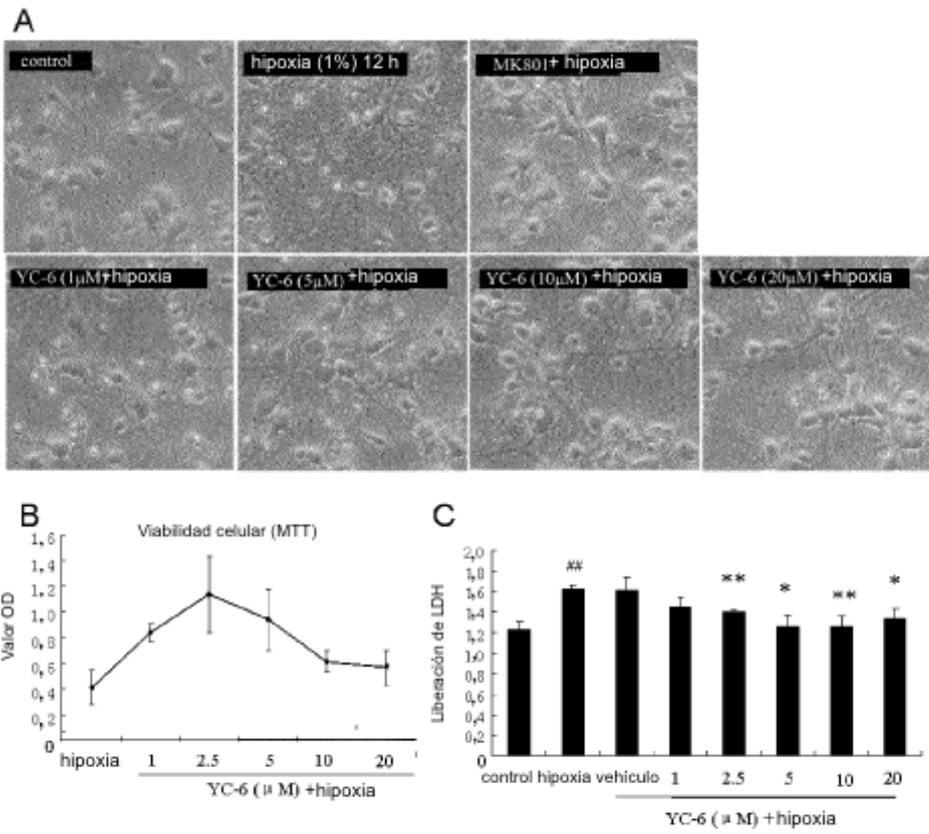


FIGURA 2

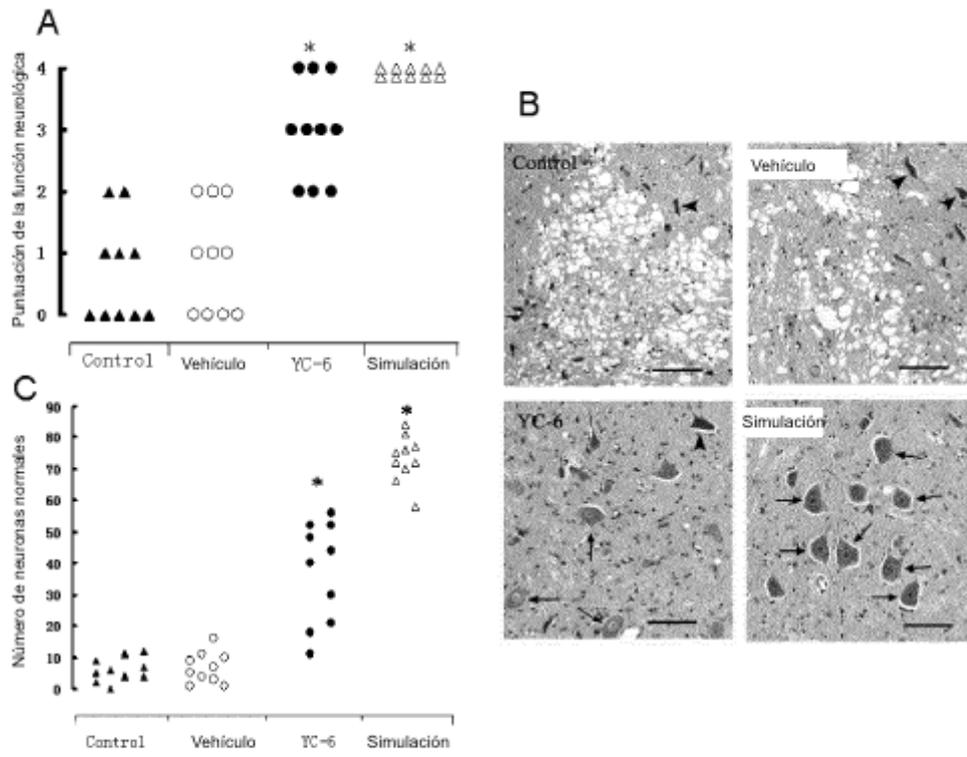


FIGURA 3

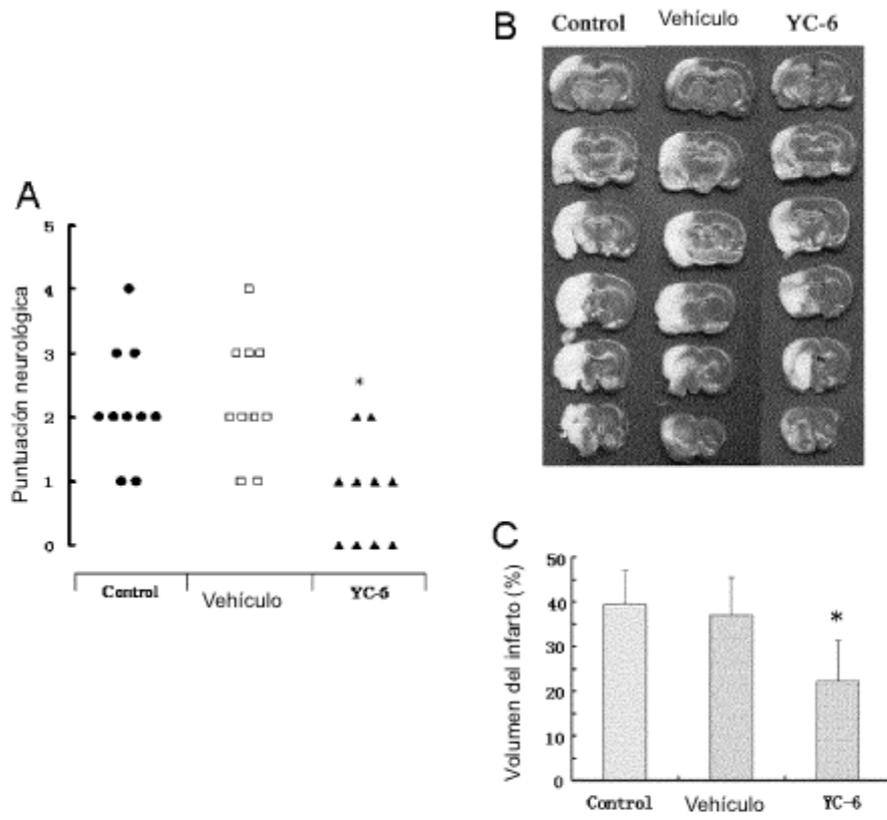


FIGURA 4