

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 111**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/56** (2006.01)

**A61K 31/565** (2006.01)

**A61K 31/567** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.04.2013 PCT/EP2013/057279**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2013 WO13156329**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2013 E 13714917 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2838539**

54 Título: **Derivados estrogénicos para su uso en el tratamiento de trastornos neurológicos**

30 Prioridad:

**19.04.2012 EP 12164741**

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

**19.12.2017**

73 Titular/es:

**UNIVERSITE DE LIEGE (100.0%)**

**Avenue Pré-Aily 4**

**4031 Angleur, BE**

72 Inventor/es:

**FOIDART, JEAN-MICHEL y**

**TSKITISHVILI, EKATERINE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 647 111 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**

Derivados estrogénicos para su uso en el tratamiento de trastornos neurológicos

**Campo de la invención**

5 La presente invención está en el campo de la medicina. La invención se refiere más particularmente a nuevos usos médicos de un componente estrogénico, estetrol (1,3,5(10)-estratrien-3,15 $\alpha$ ,16  $\alpha$ ,17 $\beta$ tetrol).

**Antecedentes de la invención**

10 Los trastornos neurológicos, en particular los trastornos del sistema nervioso central (SNC), abarcan numerosas afecciones, que incluyen, entre otras, lesión aguda del SNC (por ejemplo, encefalopatías hipóxico-isquémicas, apoplejía, lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal, parálisis cerebral), enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, demencia frontotemporal) y un gran número de disfunciones del sistema nervioso central (por ejemplo, depresión, epilepsia y esquizofrenia).

15 La encefalopatía hipóxico-isquémica neonatal (HIE) es un trastorno neurológico que causa daño a las células del cerebro en recién nacidos debido a un suministro de oxígeno inadecuado. La hipoxia cerebral y la isquemia debido a hipoxemia sistémica y flujo sanguíneo cerebral reducido (CBF) son las principales razones que conducen a HIE neonatal acompañado por lesiones de materia gris y blanca que ocurren en recién nacidos. La HIE neonatal puede causar la muerte en el período neonatal o resultar en lo que luego se reconoce como retraso en el desarrollo, retraso mental o parálisis cerebral (CP). A pesar de que recientemente se han desarrollado diferentes estrategias terapéuticas, la HIE neonatal sigue siendo una enfermedad grave que causa mortalidad y morbilidad significativas en recién nacidos a término o próximos a término y, por lo tanto, sigue siendo un desafío para la medicina perinatal.

20 En los últimos años, un modelo de rata de daño cerebral hipóxico-isquémico se convirtió en el modelo más utilizado en la medicina perinatal. En el día 7 postnatal (P7, día de nacimiento = P1), el cerebro de las ratas es histológicamente similar al de un feto humano de 32 a 34 semanas de gestación o recién nacido, es decir, las capas neuronales corticales cerebrales están completas, la matriz germinal está involucionando, y la materia blanca todavía ha sufrido poca mielinización. Para producir daño cerebral hipóxico-isquémico en las crías de rata de 7 días, se someten a ligadura de la arteria carótida común unilateral seguido por hipoxia sistémica producida por la inhalación de 8% oxígeno/balance de nitrógeno, a temperatura constante (37°C) (Vanucci y otros, 2005. Dev Neurosci, volumen 27, 81-86).

25 El modelo de rata ha demostrado proporcionar información importante sobre los mecanismos subyacentes del daño cerebral hipóxico-isquémico perinatal y cómo la lesión tisular puede prevenirse o minimizarse a través de la intervención terapéutica. En particular, se han aplicado manipulaciones fisiológicas y terapéuticas al modelo de rata inmadura de daño cerebral hipóxico-isquémico perinatal con el fin de evaluar tratamientos potenciales, incluyendo hipotermia, tratamiento con xenón y administración de eritropoyetina.

30 Los prometedores agentes neuroprotectores incluyen fármacos antiepilépticos, eritropoyetina, melatonina y xenón. Los datos de modelos animales de asfixia sugieren además que el resultado neurológico después de HIE se puede mejorar agregando terapias adyuvantes para la hipotermia, comenzando en las horas a días después de la lesión. Estos tratamientos prometedores ahora deben evaluarse en ensayos clínicos. Los estudios clínicos 1-2 que usan resultados de biomarcadores, por ejemplo, espectroscopía de resonancia magnética de fósforo, y que involucran a un pequeño número de lactantes son clave para evaluar la seguridad y la eficacia potencial antes de que los nuevos tratamientos se tomen en ensayos pragmáticos. Los ensayos 1-2 de xenón y eritropoyetina ya están planificados o en marcha.

35 Las terapias para trastornos neurológicos, en particular las lesiones del SNC o enfermedades neurodegenerativas, pueden centrarse en la protección contra el daño cerebral o de la médula espinal o restaurar la actividad de las células nerviosas, por ejemplo, mediante el uso de factores neurotróficos. Los factores neurotróficos, tales como, por ejemplo, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), son polipéptidos que respaldan de diversas maneras la supervivencia, proliferación, diferenciación, tamaño y función de las células nerviosas. El tratamiento de trastornos neurológicos también puede abarcar la administración de células madre para reemplazar aquellas células neuronales perdidas por muerte, lesión o enfermedad de células naturales.

40 Un problema que se encuentra con la administración de tales factores neurotróficos o células madre es la barrera hematoencefálica, que puede impedir su transferencia del flujo sanguíneo al SNC. Por lo tanto, los tratamientos a menudo requieren la aplicación directa de un factor neurotrófico o infusión de células madre a un sitio de lesión o daño en el SNC en un sujeto que necesita dicho tratamiento.

45 Dada la escasez de tratamientos exitosos para trastornos neurológicos en general, sigue existiendo la necesidad de agentes y métodos terapéuticos adicionales, que preferentemente no dependan de procedimientos invasivos intracraneales o sustancias con un mejor paso de la barrera hematoencefálica.

55

**Compendio de la invención**

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas y se limita a las mismas.

5 La presente invención aborda una o más de las necesidades debatidas anteriormente en la técnica. Como se muestra en la sección experimental, los inventores descubrieron que un componente estrogénico, el estetrol, tiene efecto para el tratamiento de la lesión cerebral en la región del hipocampo.

10 Por ejemplo, los inventores demostraron sorprendentemente que tratar crías de rata con estetrol las protegía contra el daño cerebral debido a hipoxia-isquemia. También notablemente, se demostró que el tratamiento de las crías de rata con ciertos componentes estrogénicos, ejemplificados por estetrol, después de (es decir, posterior a) hipoxia-isquemia da como resultado menos lesión cerebral, corroborando que estos compuestos exhiben efectos terapéuticos ventajosos. Además, se demostró que el tratamiento de las crías de rata con ciertos compuestos estrogénicos, ejemplificados por estetrol, promueve la neurogénesis y la vasculogénesis.

15 Estetrol (E4) es una sustancia esteroide estrogénica sintetizada exclusivamente por el hígado del feto durante el embarazo humano y que alcanza la circulación materna a través de la placenta. El mismo se encuentra en la orina materna tan pronto como a las 9 semanas de gestación, aumentando sustancialmente a medida que progresa el embarazo (Holinka et. al., 2008. J Steroid Biochem Mol Biol, volumen 110, 138-143). El E4 no conjugado también se encuentra en el líquido amniótico. Estetrol es un metabolito principal del estradiol (E2), formado a partir de sus precursores a través de la hidroxilación.

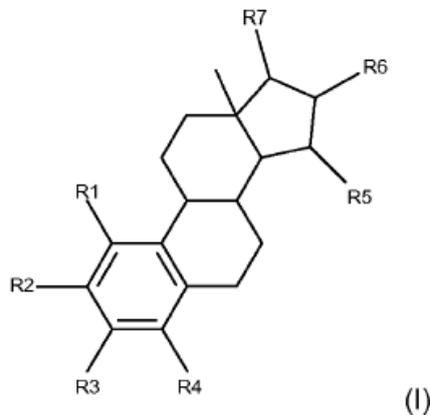
20 Se considera que E4 es menos potente en comparación con E2 debido a su baja afinidad de unión al receptor de estrógeno en comparación con E2. Los estudios competitivos de unión al receptor revelaron una baja afinidad de unión de E4 a receptores estrogénicos nucleares y citosólicos con respecto a E2, mostrando valores de unión a receptores de estrógenos citosólicos de 1,0 y 0,015 para E2 y E4, respectivamente (Holinka et. al, supra). E4 actúa como un estrógeno débil en la promoción del crecimiento de células MCF-7 sensibles a estrógenos cultivadas en comparación con E2: la potencia de E2 demostró ser 50 veces mayor que E4.

25 Warmerdam et al. 2008 (Climacteric, volumen 11 (suplemento 1), 59-63) informó el coeficiente de partición octanol-agua (Pow), que es una medición de las propiedades lipofílicas o hidrofílicas de un compuesto, expresada como logaritmo de Pow o "Pow Log "- de estetrol, Pow Log = 1,47 o 1,695, dependiendo de la configuración experimental. Debido a que Pow Log de 2,0 se considera óptimo para permitir el paso de compuestos a través de la barrera hematoencefálica (Warmerdam et al., 2008, supra), es sorprendente la fuerte acción neuroprotectora del estetrol en el modelo de rata de HIE neonatal.

30 Los datos farmacológicos y clínicos recientes respaldan el uso clínico potencial de E4 para aplicaciones tales como terapia hormonal, anticoncepción, prevención de osteoporosis y sofocos menopáusicos, terapia contra el cáncer y tratamiento o prevención de patologías cardiovasculares. Hasta donde sabemos, hasta el momento no se han descrito efectos de los componentes estrogénicos ilustrados con E4 en el sistema nervioso central.

35 Por consiguiente, en un aspecto, la presente divulgación proporciona un componente estrogénico seleccionado del grupo que consiste en:

sustancias estrogénicas que tienen la fórmula (I):



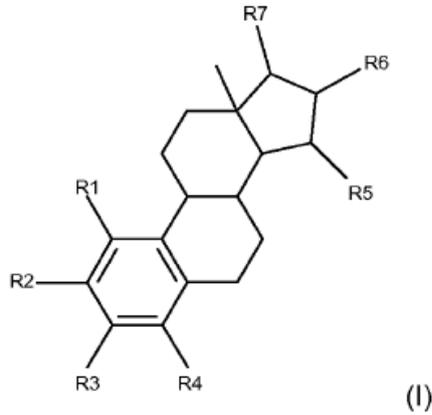
40 en donde R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> cada uno independientemente son un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, o un grupo alcoxi con 1-5 átomos de carbono; en donde cada uno de R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> es un grupo hidroxilo; y en donde no más de 3 de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> son átomos de hidrógeno;

precursores de las sustancias estrogénicas; y

mezclas de una o más de las sustancias estrogénicas y/o los precursores; para su uso en el tratamiento de un trastorno neurológico.

La divulgación particularmente se refiere a un componente estrogénico seleccionado del grupo que consiste en:

sustancias estrogénicas que tienen la fórmula (I):



5 en donde R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> cada uno independientemente son un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, o un grupo alcoxi con 1-5 átomos de carbono; en donde cada uno de R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> es un grupo hidroxilo; y en donde no más de 3 de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> son átomos de hidrógeno;

10 precursores de las sustancias estrogénicas, en donde los precursores son derivados de las sustancias estrogénicas, en donde el átomo de hidrógeno de al menos uno de los grupos hidroxilo ha sido sustituido por un radical acilo de un hidrocarburo ácido carboxílico, sulfónico o sulfámico de 1-25 átomos de carbono; tetrahidrofuranilo; tetrahidropiranilo; o un residuo glicosídico de cadena lineal o ramificada que contiene 1-20 unidades glicosídicas por residuo; y

15 mezclas de una o más de las sustancias estrogénicas y/o los precursores; para su uso en el tratamiento de un trastorno neurológico.

La presente divulgación también proporciona un procedimiento para tratar un trastorno neurológico en un paciente que necesita dicho tratamiento, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del componente estrogénico según lo enseñado en la presente memoria a dicho paciente.

20 La presente divulgación también proporciona el uso del componente estrogénico según lo enseñado en la presente memoria para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno neurológico. En realizaciones preferentes R<sub>3</sub> representa un grupo hidroxilo o un grupo alcoxi con 1-5 átomos de carbono, más preferentemente R<sub>3</sub> representa un grupo hidroxilo.

En realizaciones preferentes, al menos 2, más preferentemente 3 de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> representan átomos de hidrógeno. En realizaciones particularmente preferentes, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> representan átomos de hidrógeno.

25 En ciertas realizaciones, R<sub>3</sub> representa un grupo hidroxilo o un grupo alcoxi con 1-5 átomos de carbono, más preferentemente R<sub>3</sub> representa un grupo hidroxilo, y al menos 1, más preferentemente al menos 2, y aún más preferentemente la totalidad de los 3 grupos R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> representan átomos de hidrógeno.

30 En la presente invención R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> representan átomos de hidrógeno y R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son grupos hidroxilo; por lo tanto, la sustancia estrogénica o el componente estrogénico es 1,3,5(10)-estratrien-3,15,16,17-tetrol. En la presente invención, la sustancia estrogénica o el componente estrogénico es 1,3,5(10)-estratrien-3,15 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol (estetrol).

35 En realizaciones preferentes, los precursores son derivados de las sustancias estrogénicas, en donde el átomo de hidrógeno de al menos uno de los grupos hidroxilo ha sido sustituido por un radical acilo de un hidrocarburo ácido carboxílico, sulfónico o sulfámico de 1-25 átomos de carbono; tetrahidrofuranilo; tetrahidropiranilo; o un residuo glicosídico de cadena lineal o ramificada que contiene 1-20 unidades glicosídicas por residuo.

Como se indicó, la presente invención proporciona un componente estrogénico según lo reivindicado más arriba para su uso en el tratamiento de lesión cerebral en la región del hipocampo.

40 En realizaciones preferentes, la presente divulgación proporciona un componente estrogénico según lo reivindicado para su uso en el tratamiento terapéutico de un trastorno neurológico, es decir, tratamiento de un trastorno neurológico, en donde el componente estrogénico se administra a un sujeto al que se le diagnosticó el trastorno

neurológico.

Con el término "trastorno neurológico" generalmente se entiende un trastorno que afecta el sistema nervioso, incluido el sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico.

5 El trastorno neurológico es una lesión, preferentemente una lesión del sistema nervioso central, más preferentemente una lesión cerebral, o es una enfermedad neurodegenerativa. Preferentemente, el trastorno neurológico de ese modo se selecciona del grupo que comprende o que consiste en una lesión cerebral, una lesión de la médula espinal, y una enfermedad neurodegenerativa. En la presente invención el trastorno neurológico es una lesión cerebral.

10 En la presente invención, el trastorno neurológico se selecciona del grupo que comprende lesión cerebral hipóxica, lesión cerebral anóxica, lesión cerebral traumática.

15 Con los términos "lesión hipóxica" o "lesión anóxica" se quiere decir lesión cerebral como resultado de la privación de oxígeno debido a mecanismos hipóxicos (es decir, un suministro reducido de oxígeno al cerebro) o anóxicos (es decir, una falta completa de oxígeno al cerebro), respectivamente. Las lesiones hipóxicas/anóxicas pueden afectar áreas localizadas del cerebro o todo el cerebro. En la presente invención, las lesiones cerebrales hipóxicas/anóxicas/traumáticas afectan el hipocampo.

En realizaciones preferentes de la presente invención, el trastorno neurológico es una encefalopatía hipóxico-isquémica (HIE).

20 Con los términos "encefalopatía hipóxico-isquémica" o "HIE" se entiende específicamente una afección que se produce cuando todo el cerebro se ve privado de un suministro adecuado de oxígeno, pero la privación no es total. El suministro de oxígeno inadecuado puede ser de origen hipóxico, es decir, disponibilidad reducida de oxígeno, y/o de origen isquémico, es decir, privación de oxígeno debido a una interrupción en el flujo sanguíneo. En la presente invención, el HIE afecta el hipocampo.

En realizaciones particularmente preferentes de la presente invención, el componente estrogénico según lo reivindicado se utiliza para el tratamiento de encefalopatía hipóxico-isquémica neonatal (HIE).

25 Como se usa en este documento, la expresión "tratamiento de HIE neonatal" puede abarcar la protección contra daño cerebral, y puede abarcar además la prevención de, alivio de síntomas asociados con, o disminución del alcance de trastornos relacionados con HIE neonatal, tales como, por ejemplo, retraso en el desarrollo, retraso mental o parálisis cerebral (CP) (la mejora de la CP incluye, por ejemplo, mejoría en la función motora, comportamiento y/o función cognitiva). Como se usa en este documento, el término "parálisis cerebral" se refiere a un grupo de afecciones que se caracterizan por trastornos crónicos de movimiento o postura. La parálisis cerebral puede estar acompañada de trastornos convulsivos, deterioro sensorial y/o limitación cognitiva.

### Breve descripción de las figuras

35 **Figura 1 Pesos corporales postoperatorios de crías de rata.** Los pesos corporales postoperatorios de crías de rata que se inyectaron por vía intraperitoneal desde el día 4 hasta el día 7 incluso después del parto ya sea en vehículo (solución salina) (Vehículo), 5 mg/kg de E4 (5 mg/kg E4) o 50 mg/kg de E4 (50 mg/kg E4) o no inyectadas (intervención simulada). Se muestra la media  $\pm$  SEM de los pesos corporales de 7 crías de rata del grupo de intervención simulada, 11 crías de rata de los grupos del vehículo, 7 crías de rata del grupo 5 mg/kg E4 y 5 crías de rata del grupo 50 mg/kg E4 .

40 **Figura 2 Pesos cerebrales de crías de rata.** Los pesos cerebrales de crías de rata que se inyectaron por vía intraperitoneal desde el día 4 al día 7, incluso después del parto, ya sea en vehículo (solución salina) (Vehículo), 5 mg/kg de E4 (5 mg/kg) o 50 mg/kg de E4 (50 mg/kg) o no inyectadas (intervención simulada). Se muestra la media  $\pm$  SEM de pesos cerebrales tras el sacrificio en el día 14 después del parto de 7 crías de rata del grupo de intervención simulada, 11 crías de rata del grupo del Vehículo, 7 crías de rata del grupo 5 mg/kg E4 y 5 crías de rata del grupo 50 mg/kg E4 . Barra de escala: 2 mm.

45 **Figura 3 Tinción con hematoxilina-eosina de secciones cerebrales de la región del hipocampo de las crías de rata.**

50 El cerebro de crías de rata se retiró tras el sacrificio en el día 14 después del parto y se procedió a seccionar en la región del hipocampo las muestras fijadas con paraformaldehído y embebidas en parafina y la tinción con Hematoxilina-Eosina. Las crías de rata se inyectaron por vía intraperitoneal desde el día 4 al día 7 incluso después del parto ya sea en vehículo (solución salina) (Vehículo), 5 mg/kg E4 (5 mg/kg E4) o 50 mg/kg E4 (50 mg/kg E4 ) o no inyectadas (intervención simulada).

**Figura 4 Recuento de células intactas en secciones cerebrales teñidas con Hematoxilina-Eosina de crías de rata.** Se contaron las células intactas en el hipocampo en la zona de giro dentado (DG), zona subgranular (SGZ) y cornu ammonis (CA1, CA2/CA3) y en la corteza en secciones cerebrales teñidas con hematoxilina-eosina de crías

de rata. Se contaron las células intactas con un aumento de 400x en 3 campos del área cerebral respectiva y el promedio se expresó como el número de células intactas por campo visual. Se muestran la media  $\pm$  SEM del número de células intactas/pesos del campo visual de 7 crías de rata del grupo de intervención simulada, 11 crías de rata de los grupos del vehículo, 7 crías de rata del grupo 5 mg/kg E4 y 5 crías de rata del grupo 50 mg/kg E4 .

5 **Figura 5 Peso corporal postoperatorio de crías de rata que fueron tratadas previamente con estetrol.** En cada día postnatal indicado (eje X), las 6 barras representan, de izquierda a derecha, peso corporal postoperatorio (en g) de crías de rata que, respectivamente, no se inyectaron con vehículo o E4 (grupo de intervención simulada) , n = 24), se inyectaron por vía intraperitoneal desde el día 4 al día 7 postnatal inclusive con vehículo (grupo Vehículo, n = 14), se inyectaron por vía intraperitoneal desde el día 4 al día 7 postnatal inclusive con 1 mg/kg de E4 (n = 11), se inyectaron por vía intraperitoneal desde el día 4 al día 7 postnatal inclusive con 5 mg/kg de E4 (n = 14), se inyectaron por vía intraperitoneal desde el día 4 al día 7 postnatal inclusive con 10 mg/kg de E4 n = (14), o se inyectaron por vía intraperitoneal desde el día 4 al día 7 postnatal inclusive con 50 mg/kg de E4 (n = 19). En el día 7 postnatal, 30 minutos después de la última inyección, las crías de rata sufrieron una lesión hipóxica-isquémica. Los animales de intervención simulada pasaron por procedimientos similares sin lesión hipóxica-isquémica. Las mediciones se expresan como media  $\pm$  SEM.

20 **Figura 6 Peso cerebral de las crías de rata que fueron tratadas previamente con estetrol.** El peso cerebral (en g) de las crías de rata que no fueron inyectadas con vehículo o con E4 (grupo de intervención simulada, n=24), o fueron inyectadas por vía intraperitoneal desde el día 4 al día 7 postnatal inclusive con vehículo (grupo Vehículo, n=14), 1 mg/kg de E4 (n=11), 5 mg/kg de E4 (n=14), 10 mg/kg de E4 (n=14) o 50 mg/kg de E4 (n=19). En el día 7 postnatal, 30 minutos después de la última inyección, las crías de rata sufrieron una lesión hipóxica-isquémica. Los animales de intervención simulada pasaron por procedimientos similares sin lesión hipóxica-isquémica. Las mediciones se expresan como media  $\pm$  SEM.

25 **Figura 7 Tinción con hematoxilina-eosina de secciones cerebrales coronales y recuento de células intactas en crías de rata que fueron tratadas previamente con estetrol.** Las crías de rata (a) no fueron inyectadas con vehículo o con E4 (grupo de intervención simulada, n=14), o fueron inyectadas por vía intraperitoneal desde el día 4 al día 7 postnatal inclusive con (b) vehículo (grupo Vehículo, n=16), (c) 1 mg/kg de E4 (n=10), (d) 5 mg/kg de E4 (n=13), (e) 10 mg/kg de E4 n=(10) o (f) 50 mg/kg de E4 (n=14). En el día 7 postnatal, 30 minutos después de la última inyección, las crías de rata sufrieron una lesión hipóxica-isquémica. Los animales de intervención simulada pasaron por procedimientos similares sin lesión hipóxica-isquémica. Los cerebros fueron extraídos después del sacrificio el día 14 postnatal y las muestras de cerebro embebidas en parafina y fijadas en paraformaldehído se seccionaron coronalmente en la región del hipocampo. Se muestra la tinción con hematoxilina-eosina de (A) secciones cerebrales coronales (barra de escala: 2 mm), (B) región del hipocampo (barra de escala: 500  $\mu$ m), y (C) corteza (barra de escala: 100  $\mu$ m) de los grupos de estudio. (D) Las células intactas se contaron en diferentes regiones del hipocampo: giro dentado (DG), zona subgranular (SGZ), y cornu ammonis (CA1, CA2/CA3), y en la corteza en las secciones cerebrales coronales teñidas con hematoxilina-eosina de las crías de rata. Las células intactas se contaron con un aumento de 400x en 3 campos del área cerebral respectiva y el promedio se expresó como el número de células intactas por campo visual. Para cada región cerebral indicada (DG, SGZ, CA1, CA2/3, Corteza en el eje X), las 6 barras representan, de izquierda a derecha, el número de células intactas por campo visual de las crías de rata de, respectivamente, el grupo de intervención simulada, grupo Vehículo, crías de rata tratadas con 1 mg/kg de E4, crías de rata tratadas con 5 mg/kg de E4, crías de rata tratadas con 10 mg/kg de E4 o crías de rata tratadas con 50 mg/kg de E4. Todas las mediciones se muestran como media  $\pm$  SEM

45 **Figura 8 Tinción con proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP2) de secciones coronales cerebrales en crías de rata que fueron tratadas previamente con estetrol.** Las crías de rata (a) no fueron inyectadas con vehículo o con E4 (grupo de intervención simulada), o fueron inyectadas por vía intraperitoneal desde el día 4 al día 7 postnatal inclusive con (b) vehículo (grupo Vehículo), (c) 1 mg/kg E4, (d) 5 mg/kg E4, (e) 10 mg/kg E4 o (f) 50 mg/kg E4. En el día 7 postnatal, 30 minutos después de la última inyección, las crías de rata sufrieron una lesión hipóxica-isquémica. Los animales de intervención simulada pasaron por procedimientos similares sin lesión hipóxica-isquémica. Los cerebros fueron extraídos después del sacrificio el día postnatal 14 y las muestras de cerebro embebidas en parafina y fijadas con paraformaldehído se seccionaron coronalmente en la región del hipocampo. Las secciones se procesaron para la detección de alteración del citoesqueleto neuronal mediante tinción inmunohistológica con anticuerpo anti-MAP2. (A) Se muestra la tinción con MAP2 de las secciones coronales cerebrales (barra de escala: 2 mm). (B) Se calculó la relación de las áreas positivas para MAP2 como el área positiva de MAP2 del hemisferio ipsilateral dividido por el área positiva de MAP2 del hemisferio contralateral. 10 muestras de cada grupo de estudio fueron analizadas. La relación del área positiva de MAP2 en el grupo de intervención simulada se consideró por defecto como 1.

60 **Figura 9 Tinción con factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y doblecortina (DCX) en el hipocampo y la corteza de crías de rata tratadas previamente con estetrol.** Las crías de rata no fueron inyectadas con vehículo o con E4 (grupo de intervención simulada), o fueron inyectadas por vía intraperitoneal desde el día 4 al día 7 postnatal inclusive con vehículo (grupo Vehículo), 1 mg/kg E4, 5 mg/kg E4, 10 mg/kg E4 o 50 mg/kg E4. En el día 7 postnatal, 30 minutos después de la última inyección, las crías de rata sufrieron una lesión hipóxica-isquémica. Los animales de intervención simulada pasaron por procedimientos similares sin lesión hipóxica-isquémica. Los cerebros fueron extraídos después del sacrificio el día postnatal 14 y las muestras de cerebro embebidas en parafina y fijadas

en paraformaldehído fueron seccionadas coronalmente en la región del hipocampo. Las secciones se tiñeron doblemente con anticuerpo anti-DCX y anticuerpo anti-VEGF. El porcentaje de células positivas para DCX (A) y VEGF (B) se cuantificó como la suma de células teñidas positivamente con DCX o VEGF dividido por el número total de células positivas para DAPI. Se realizaron cuantificaciones en diferentes regiones del hipocampo (giro dentado (DG), cornu ammonis 1 (CA1), cornu ammonis 2/3 (CA2/CA3)), y en la corteza. Se analizaron 10 muestras en los grupos de intervención simulada, 1 mg/kg E4, 5 mg/kg E4, 10 mg/kg E4, 50 mg/kg E4 y se compararon con 12 muestras del grupo Vehículo. Para cada región del cerebro indicada (DG, CA1, CA2/3, Corteza en el eje X), las 6 barras representan, de izquierda a derecha, el porcentaje de células positivas para DCX (A) o VEGF (B) en, respectivamente, grupo de intervención simulada, grupo Vehículo, grupo 1 mg/kg E4, grupo 5 mg/kg E4, grupo 10 mg/kg E4, o grupo 50 mg/kg E4. Todas las mediciones se muestran como media  $\pm$  SEM.

**Figura 10 Expresión de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y S100B en suero sanguíneo de crías de rata que fueron tratadas previamente con estetrol.** Las crías de rata no fueron inyectadas con vehículo o con E4 (grupo de intervención simulada, n=20 y n=21 para S100B y GFAP, respectivamente), o fueron inyectadas por vía intraperitoneal desde el día 4 al día 7 postnatal inclusive con vehículo (grupo Vehículo, n=13 y n=15 para S100B y GFAP, respectivamente), 1 mg/kg E4 (n=10 y n=11 para S100B y GFAP, respectivamente), 5 mg/kg E4 (n=11 y n=11 para S100B y GFAP, respectivamente), 10 mg/kg E4 (n=13 y n=10 para S100B y GFAP, respectivamente) o 50 mg/kg E4 (n=19 y n=18 para S100B y GFAP, respectivamente). En el día 7 postnatal, 30 minutos después de la última inyección, las crías de rata sufrieron una lesión hipóxico-isquémica. Los animales de intervención simulada pasaron por procedimientos similares sin lesión hipóxico-isquémica. Se extrajeron muestras de sangre tras el sacrificio en el día 14 postnatal. Se realizó ELISA para las proteínas S100B y GFAP para examinar la concentración de S100B (A) GFAP (B) en los sueros sanguíneos. Todas las mediciones se muestran como media  $\pm$  SEM.

**Figura 11 Peso corporal postoperatorio de crías de rata que fueron tratada con estetrol.** En el día 7 postnatal, las crías de rata sufrieron una lesión hipóxico-isquémica. Tras la recuperación de la hipoxia, las crías de rata fueron inyectadas por vía intraperitoneal mediante una única dosis de vehículo (grupo Vehículo, n=20), 1 mg/kg E4 (n=16), 5 mg/kg E4 (n=19), 10 mg/kg E4 (n=17) o 50 mg/kg E4 (n=15). Los animales de intervención simulada se sometieron a procedimientos similares sin lesión hipóxico-isquémica y no fueron inyectados con vehículo ni E4 (grupo de intervención simulada, n=29). En cada día postnatal indicado (eje X), las 6 barras representan, de izquierda a derecha, el peso corporal postoperatorio (en g) de las crías de rata de, respectivamente, el grupo de intervención simulada, grupo Vehículo, grupo 1 mg/kg de E4, grupo 5 mg/kg de E4, grupo 10 mg/kg E4, o grupo 50 mg/kg E4. Las mediciones se expresan como media  $\pm$  SEM.

**Figure 12 Peso cerebral de las crías de rata que fueron tratadas con estetrol.**

En el día 7 postnatal, las crías de rata sufrieron una lesión hipóxico-isquémica. Tras la recuperación de la hipoxia, las crías de rata fueron inyectadas por vía intraperitoneal mediante una única dosis de vehículo (grupo Vehículo, n=20), 1 mg/kg de E4 (n=16), 5 mg/kg de E4 (n=19), 10 mg/kg de E4 (n=17) o 50 mg/kg de E4 (n=15). Los animales de intervención simulada se sometieron a procedimientos similares sin lesión hipóxico-isquémica y no fueron inyectados con vehículo ni E4 (grupo de intervención simulada, n=29). Se muestra el peso cerebral (en g) de las crías de rata i. Las mediciones se expresan como media  $\pm$  SEM.

**Figure 13 Tinción con hematoxilina-eosina de secciones cerebrales coronales y recuento de células intactas en crías de rata que fueron tratadas con estetrol.**

En el día 7 postnatal, las crías de rata sufrieron una lesión hipóxico-isquémica. Tras la recuperación de la hipoxia, las crías de rata fueron inyectadas por vía intraperitoneal mediante una única dosis de (b) vehículo (grupo Vehículo, n=10), (c) 1 mg/kg E4 (n=10), (d) 5 mg/kg E4 (n=10), (e) 10 mg/kg E4 (n=10) o (f) 50 mg/kg E4 (n=10). Los animales de intervención simulada (a) se sometieron a procedimientos similares sin lesión hipóxico-isquémica y no fueron inyectados con vehículo ni E4 (grupo de intervención simulada, n=10). Los cerebros fueron extraídos después del sacrificio el día postnatal 14 y se procedió con el seccionamiento coronal de las muestras fijadas con paraformaldehído y embebidas en parafina en la región del hipocampo seguido de tinción con hematoxilina-eosina. Se muestra la tinción con hematoxilina-eosina de (A) secciones coronales del cerebro (barra de escala: 2 mm), (B) región del hipocampo (barra de escala: 500  $\mu$ m), corteza y (C) corteza (barra de escala: 100  $\mu$ m). (D) Las células intactas se contaron en diferentes regiones del hipocampo: giro dentado (DG), zona subgranular (SGZ), y cornu ammonis (CA1, CA2/CA3), y en la corteza en secciones cerebrales coronales teñidas con hematoxilina-eosina. Las células intactas se contaron con un aumento de 400x en 3 campos del área cerebral respectiva y el promedio se expresó como el número de células intactas por campo visual. Para cada región cerebral indicada (DG, SGZ, CA1, CA2/3, Corteza en el eje X), las 6 barras representan, de izquierda a derecha, el número de células intactas por campo visual de las crías de rata de, respectivamente, el grupo de intervención simulada, grupo Vehículo, crías de rata tratadas con 1 mg/kg de E4, crías de rata tratadas con 5 mg/kg de E4, crías de rata tratadas con 10 mg/kg de E4, o crías de rata tratadas con 50 mg/kg de E4. Todas las mediciones se muestran como media  $\pm$  SEM.

**Figure 14 Tinción de proteína 2 asociada a microtúbulos (2) de secciones coronales cerebrales en crías de rata tratadas con estetrol.** En el día 7 postnatal, las crías de rata sufrieron una lesión hipóxico-isquémica. Tras la recuperación de la hipoxia, las crías de rata fueron inyectadas por vía intraperitoneal mediante una única dosis de (b) vehículo (grupo Vehículo, n=10), (c) 1 mg/kg E4 (n=10), (d) 5 mg/kg E4 (n=10), (e) 10 mg/kg E4 (n=10) o (f) 50

mg/kg E4 (n=10). Los animales de intervención simulada (a) se sometieron a procedimientos similares sin lesión hipóxico-isquémica y no fueron inyectadas con vehículo ni E4 (grupo de intervención simulada, n=10). Los cerebros fueron extraídos después del sacrificio el día postnatal 14 y las muestras de cerebro embebidas en parafina y fijadas en paraformaldehído fueron seccionadas coronalmente en la región del hipocampo. Las secciones fueron procesadas para la detección de alteración del citoesqueleto neuronal a través de tinción inmunohistológica con anticuerpo anti-MAP2. (A) Se muestra la tinción de MAP2 de las secciones coronales del cerebro (barra de escala: 2 mm). (B) La relación de las áreas positivas para MAP2 se calculó como el área positiva para MAP2 del hemisferio ipsilateral dividida por el área positiva para MAP2 del hemisferio contralateral. 10 muestras de cada grupo fueron analizadas. La relación del área positiva para MAP2 en el grupo de intervención simulada se consideró por defecto como 1,0.

**Figura 15 Tinción con factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y doblecortina (DCX) en el hipocampo y la corteza de crías de rata tratadas con estetrol.** En el día 7 postnatal, las crías de rata sufrieron una lesión hipóxico-isquémica. Tras la recuperación de la hipoxia, las crías de rata fueron inyectadas por vía intraperitoneal mediante una única dosis de vehículo (grupo Vehículo, n=10), 1 mg/kg E4 (n=10), 5 mg/kg E4 (n=10), 10 mg/kg E4 (n=10) o 50 mg/kg E4 (n=10). Los animales de intervención simulada (a) se sometieron a procedimientos similares sin lesión hipóxico-isquémica y no fueron inyectadas con vehículo ni E4 (grupo de intervención simulada, n=10). Los cerebros fueron extraídos después del sacrificio el día 14 postnatal y las muestras de cerebro embebidas en parafina y fijadas en paraformaldehído fueron seccionadas coronalmente en la región del hipocampo. Las secciones se tiñeron doblemente con anticuerpo anti-DCX y anticuerpo anti-VEGF. El porcentaje de células positivas para DCX (A) y VEGF (B) se cuantificó como la suma de células teñidas positivamente con DCX o VEGF dividido por el número total de células positivas para DAPI. Se realizaron cuantificaciones en diferentes regiones del hipocampo (giro dentado (DG), cornu ammonis 1 (CA1), cornu ammonis 2/3 (CA2/CA3)), y en la corteza. Se analizaron 10 muestras de cada grupo de estudio. Para cada región del cerebro indicada (DG, CA1, CA2/3, Corteza en el eje X), las 6 barras representan, de izquierda a derecha, porcentaje de células positivas para DCX (A) o VEGF (B) en, respectivamente, grupo de intervención simulada, grupo Vehículo, grupo 1 mg/kg E4, grupo 5 mg/kg E4, grupo 10 mg/kg E4, o grupo 50 mg/kg E4. Todas las mediciones se muestran como media  $\pm$  SEM.

**Figura 16 Expresión de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y S100B en suero sanguíneo de crías de rata que fueron tratadas con estetrol.** En el día 7 postnatal, las crías de rata sufrieron una lesión hipóxico-isquémica. Tras la recuperación de la hipoxia, las crías de rata fueron inyectadas por vía intraperitoneal mediante una única dosis de vehículo (grupo Vehículo, n=14 y n=16 para S100B y GFAP, respectivamente), 1 mg/kg E4 (n=13 y n=15 para S100B y GFAP, respectivamente), 5 mg/kg E4 (n=16 y n=15 para S100B y GFAP, respectivamente), 10 mg/kg E4 (n=13 y n=13 para S100B y GFAP, respectivamente) o 50 mg/kg E4 (n=15 y n=14 para S100B y GFAP, respectivamente). Los animales de intervención simulada (a) se sometieron a procedimientos similares sin lesión hipóxico-isquémica y no fueron inyectadas con vehículo ni E4 (grupo de intervención simulada, n=20 y n=21 para S100B y GFAP, respectivamente). Se extrajeron muestras de sangre tras el sacrificio en el día 14 postnatal. Se realizó ELISA para las proteínas S100B y GFAP para examinar la concentración de S100B (A) GFAP (B) en los sueros sanguíneos. Todas las mediciones se muestran como media  $\pm$  SEM.

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas y se limita a las mismas.

Como se usa en la presente memoria, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen tanto referencias en singular como plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Los términos "que comprende", "comprende" y "compuesto por", tal como se utilizan en la presente memoria, son sinónimos de "que incluye", "incluye" o "que contiene", "contiene", y son inclusivos o de extremos abiertos y no excluyen información adicional, miembros, elementos o etapas del procedimiento no recitados. El término también abarca "que consiste en" y "que consiste esencialmente en".

La recitación de intervalos numéricos por puntos finales incluye todos los números y fracciones subsumadas dentro de los intervalos respectivos, así como los puntos finales enumerados.

El término "aproximadamente" como se usa en la presente memoria cuando se refiere a un valor medible tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de y desde el valor especificado, en particular variaciones de  $\pm$  10 % o menos, preferentemente  $\pm$  5% o menos, más preferentemente  $\pm$  1% o menos, y aún más preferentemente  $\pm$  0,1% o menos y desde el valor especificado, en la medida en que dichas variaciones sean adecuadas para realizar en la invención divulgada. Debe entenderse que el valor al que se refiere el modificador "aproximadamente" también se describe específicamente, y preferiblemente, en sí mismo.

Mientras que el término "uno o más", tal como uno o más miembros de un grupo de miembros, es claro per se, por medio de una ejemplificación adicional, el término abarca, entre otras cosas, una referencia a cualquiera de dichos miembros, o a cualquiera de los dos o más de dichos miembros, tales como, por ejemplo, cualquiera  $\geq 3$ ,  $\geq 4$ ,  $\geq 5$ ,  $\geq 6$  o  $\geq 7$  etc. de dichos miembros, y hasta todos los miembros mencionados.

A menos que se especifique lo contrario, todos los términos utilizados en la divulgación de la invención, incluidos los

términos técnicos y científicos, tienen el significado que comúnmente entiende un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Por medio de una guía adicional, se pueden incluir definiciones de términos para apreciar mejor la enseñanza de la presente invención. Cuando ciertos términos se explican o definen en relación con un aspecto o realización particular, tal connotación pretende aplicarse a lo largo de esta especificación, es decir, también para otros aspectos o realizaciones, a menos que se especifique lo contrario o salvo que el contexto indique claramente lo contrario.

Los presentes inventores descubrieron que el estetrol y los componentes estrogénicos relacionados tienen efectos neuroprotectores, como se ilustra en un modelo establecido de encefalopatía hipóxico-isquémica neonatal en crías de rata. También revelaron que el estetrol y los componentes estrogénicos relacionados exhiben efectos terapéuticos como se muestra en el mismo modelo de rata encefalopatía hipóxico-isquémica neonatal. Además, descubrieron que el estetrol y los componentes estrogénicos relacionados inducen o promueven la neurogénesis y la vasculogénesis en el cerebro de crías de rata.

Como se usa en la presente memoria, el término "componente estrogénico" se refiere a una sustancia estrogénica según lo enseñado en la presente memoria, un precursor de la misma o una mezcla de una o más de dichas sustancias estrogénicas y/o precursores.

En ciertas realizaciones, el componente estrogénico se selecciona del grupo que consiste en:

sustancias estrogénicas que tienen la fórmula (I), en donde R<sub>1</sub> es un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, o un grupo alcoxi con 1-5 átomos de carbono; en donde R<sub>2</sub> es un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, o un grupo alcoxi con 1-5 átomos de carbono; en donde R<sub>3</sub> es un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, o un grupo alcoxi con 1-5 átomos de carbono; en donde R<sub>4</sub> es un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, o un grupo alcoxi con 1-5 átomos de carbono; en donde R<sub>5</sub> es un grupo hidroxilo; en donde R<sub>6</sub> es un grupo hidroxilo; en donde R<sub>7</sub> es un grupo hidroxilo; y en donde no más de 3 de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, y R<sub>4</sub> son átomos de hidrógeno;

precursores de las sustancias estrogénicas; y

mezclas de una o más de las sustancias estrogénicas y/o los precursores.

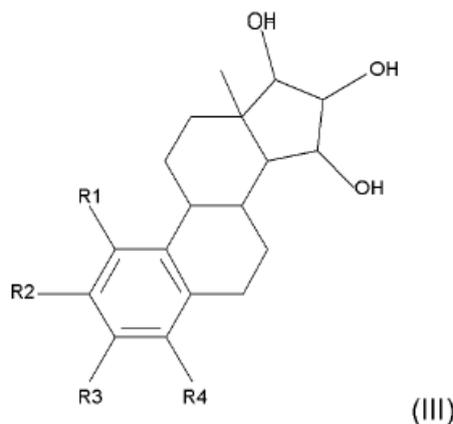
En ciertas realizaciones, el componente estrogénico se selecciona del grupo que consiste en: precursores de las sustancias estrogénicas; y

mezclas de una o más de las sustancias estrogénicas y/o los precursores.

En la presente divulgación,

el componente estrogénico se selecciona del grupo que consiste en:

sustancias estrogénicas que tienen la fórmula (III):



en donde R<sub>1</sub> es un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, o un grupo alcoxi con 1-5 átomos de carbono; en donde R<sub>2</sub> es un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, o un grupo alcoxi con 1-5 átomos de carbono; en donde R<sub>3</sub> es un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, o un grupo alcoxi con 1-5 átomos de carbono; en donde R<sub>4</sub> es un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, o un grupo alcoxi con 1-5 átomos de carbono; y

en donde al menos uno de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, y R<sub>4</sub> es un grupo hidroxilo, o un grupo alcoxi con 1-5 átomos de carbono;

precursores de las sustancias estrogénicas; y

mezclas de una o más de las sustancias estrogénicas y/o los precursores.

La expresión "grupo alcoxi con 1-5 átomos de carbono" también se puede designar como "alcoxi C1-5" o "alquiloxi C1-5" y se refiere a un radical que tiene la fórmula:  $-OR^a$  en donde  $R^a$  es alquilo C1-5 tal como se define en la presente memoria. Los ejemplos no limitantes de alquiloxi C1-5 incluyen metiloxi, etiloxi, propiloxi, isopropiloxi, butiloxi, isobutiloxi, sec-butiloxi, terc-butiloxi y pentiloxi.

- 5 Las sustancias estrogénicas según lo enseñado en la presente memoria son distintas de los estrógenos biogénicos y sintéticos que se aplican comúnmente en formulaciones farmacéuticas en que el anillo de 5 miembros en el esqueleto esteroideo comprende al menos 3 sustituyentes hidroxilo en lugar de 0-2.

Las sustancias estrogénicas también abarcan sus formas estereoisoméricas, sus sales de adición farmacéuticamente aceptables, hidratos y solvatos.

- 10 Las sustancias estrogénicas representadas por las fórmulas (I) y (III) abarcan diversos enantiómeros ya que los átomos de carbono que llevan sustituyentes hidroxilo, en particular  $R_5$ ,  $R_6$  y  $R_7$ , son quiralmente activos. En realizaciones preferentes, la sustancia estrogénica está sustituida con  $15\alpha$ -hidroxilo. En otras realizaciones preferidas, la sustancia está sustituida con  $16\alpha$ -hidroxilo. En aún otras realizaciones preferidas, la sustancia está sustituida con  $17\beta$ -hidroxilo. Mucho más preferentemente las sustancias estrogénicas están sustituidas con  $15\alpha$ ,  $16\alpha$ ,  $17\beta$ -trihidroxilo.
- 15 Los otros átomos de carbono quiralmente activos en el esqueleto esteroideo de las sustancias estrogénicas según lo enseñado en la presente memoria tienen la misma configuración que los correspondientes átomos de carbono en  $17\beta$ -estradiol y otros estrógenos biogénicos.

- 20 Preferentemente, las sustancias estrogénicas como se usan en la presente memoria son los llamados estrógenos biogénicos, es decir, estrógenos que se producen naturalmente en el cuerpo humano. Debido a que los estrógenos biogénicos están presentes de forma natural en el cuerpo fetal y femenino, no se espera que ocurran efectos secundarios, particularmente no si los niveles séricos que resultan de la administración exógena de tales estrógenos no exceden sustancialmente las concentraciones naturales.

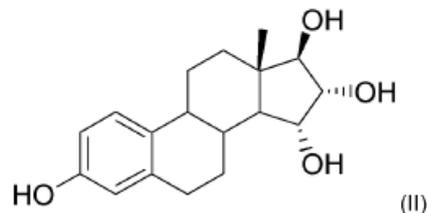
- 25 En realizaciones preferentes, al menos uno, más exactamente uno, de  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  representa un grupo hidroxilo, lo que significa que la sustancia estrogénica contiene al menos 4, más preferiblemente exactamente 4, grupos hidroxilo. En caso de que la sustancia estrogénica contenga 4 grupos hidroxilo, también esto puede estar indicado como un estrógeno tetrahidroxilado.

- 30 Los ejemplos de estrógenos comercialmente disponibles que contienen al menos 4 grupos hidroxilo o sus precursores son: 1,3,5(10)-estratrien-2,3,  $15\alpha$ ,  $16\alpha$ ,  $17\beta$ -pentol 2-metil éter; 1,3,5(10)-estratrien-2,3,  $15\alpha$ ,  $16\alpha$ ,  $17\beta$ -pentol 2-metil éter; 1,3,5(10)-estratrien-3,  $15\alpha$ ,  $16\alpha$ ,  $17\beta$ -tetrol; 1,3,5 (10) -estratrien-3,  $15\alpha$ ,  $16\alpha$ ,  $17\beta$ -tetrol tetra acetato; o 1,3,5(10) -estratrien-3,  $15\alpha$ ,  $16\alpha$ ,  $17\beta$ -tetrol tetra acetato.

En sustancia particularmente preferentes, la sustancia estrogénica es 1,3,5(10) -estratrien-3,  $15\alpha$ ,  $16\alpha$ ,  $17\beta$ -tetrol.

De acuerdo con la invención, la sustancia estrogénica es estetrol.

- 35 "Estetrol", "1,3,5 (10) -estratrien-3,  $15\alpha$ ,  $16\alpha$ ,  $17\beta$ -tetrol" y "E4" son sinónimos y se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a un compuesto estrogénico, conocido por ser producido en la naturaleza por el hígado fetal humano durante el embarazo solamente. Es un estrógeno tetrahidroxilado, que se caracteriza por la presencia de cuatro grupos hidroxilo, de ahí su acrónimo E4. Su fórmula general está representada por la fórmula (II):



- 40 La presente divulgación también se relaciona con el uso de precursores de las sustancias estrogénicas como se enseña aquí. Estos precursores son capaces de liberar las sustancias estrogénicas, en particular cuando se usan de acuerdo con la invención, por ejemplo, como resultado de la conversión metabólica.

Preferentemente, estos precursores son derivados de las sustancias estrogénicas, en donde el átomo de hidrógeno de al menos uno de los grupos hidroxilo ha sido sustituido por un radical acilo de un hidrocarburo ácido carboxílico, sulfónico o sulfámico de 1-25 átomos de carbono; tetrahidrofuranilo; tetrahidropiranilo; o un residuo glicosídico de cadena lineal o ramificada que contiene 1-20 unidades glicosídicas por residuo

- 45 Los ejemplos no limitativos de precursores según la presente divulgación son ésteres que se pueden obtener haciendo reaccionar los grupos hidroxilo de las sustancias estrogénicas con sustancias que contienen uno o más grupos carboxi ( $M^+OOC^-$ ), en donde  $M^+$  representa un hidrógeno o catión de metal (alcalino). Por lo tanto, ejemplos particularmente preferidos de precursores son derivados de las sustancias estrogénicas, en donde el átomo de

hidrógeno de al menos uno de los grupos hidroxilo in formula (I) o (II) o (III) ha sido sustituido por -CO-R, en donde R es un radical hidrocarburo que comprende de 1-25 átomos de carbono, preferentemente R es un hidrógeno, o un radical alquilo, alqueno, cicloalquilo o arilo que comprende de 1-20 átomos de carbono.

5 El término "alquilo", como un grupo o parte de un grupo, en la presente memoria se refiere a un radical hidrocarburo de fórmula  $C_nH_{2n+1}$  en donde n es un número que varía de 1 a aproximadamente 25. Preferentemente, los grupos alquilo según lo previsto en la presente memoria comprenden de 1 a 20 átomos de carbono, tal como de 1 a 10 átomos de carbono, de 1 a 5 átomos de carbono, de 1 a 4 átomos de carbono, o de 1 a 3 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a 2 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden ser lineales o ramificados y pueden estar sustituidos como se indica en la presente memoria. Cuando se utiliza un subíndice en este documento después de un átomo de carbono, el subíndice se refiere al número de átomos de carbono que el grupo mencionado puede contener. Por lo tanto, por ejemplo, alquilo C1-5 significa un alquilo de uno a cinco átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo, en particular grupos alquilo C1-5, son metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, 2-metilbutilo, pentilo, iso-amilo y sus isómeros.

15 El término "alqueno", como un grupo o parte de un grupo, se refiere a un grupo hidrocarburo insaturado, que puede ser lineal, o ramificado, que comprende uno o más enlaces dobles carbono-carbono. Los grupos alqueno pueden comprender al menos 2 átomos de carbono, tal como de 2 a aproximadamente 25 átomos de carbono, y como se utiliza en la presente memoria preferentemente de 2 a aproximadamente 20 átomos de carbono, tal como de 2 a 10 átomos de carbono, de 2 a 5 átomos de carbono, de 2 a 4 átomos de carbono, o de 2 a 3 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alqueno son etenilo, 2-propenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 2-pentenilo y sus isómeros, 2-hexenilo y sus isómeros, 2,4-pentadienilo y similares.

20 El término "cicloalquilo", como un grupo o parte de un grupo, se refiere a un radical hidrocarburo saturado o parcialmente insaturado que tiene 1 (es decir, monocíclico) o más, tal como 2 (es decir, bicíclico), estructuras cíclicas. Los anillos adicionales de radicales cicloalquilo de múltiples anillos pueden estar fusionados, unidos por puente y/o unidos a través de uno o más átomos de espiro. Los grupos cicloalquilo pueden comprender independientemente 3 o más átomos de carbono en un anillo, tal como de 3 a 25 átomos de carbono, preferiblemente de 3 a 20 átomos de carbono, más preferiblemente de 3 a 8 átomos de carbono, como 5, 6 o 7 átomos de carbono. Preferentemente, los grupos cicloalquilo como se pretende en la presente memoria se refieren a grupos cicloalquilo monocíclicos y comprenden de 3 a 20 átomos de carbono. Los ejemplos de radicales cicloalquilo monocíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclohexilo, y similares.

30 El término "arilo" como grupo o parte de un grupo se refiere a un grupo hidrocarburo aromático, poliinsaturado que comprende un solo anillo aromático (por ejemplo, fenilo) o múltiples (por ejemplo, dos, tres o cuatro) anillos aromáticos fusionados (por ejemplo, naftilo) o enlazados covalentemente (por ejemplo, bifenilo). Los grupos arilo comprenden al menos 6 átomos de carbono y preferiblemente 6 a aproximadamente 20 átomos de carbono, más preferiblemente 6 a 10 átomos de carbono en un anillo. Un anillo aromático en un grupo arilo puede incluir opcionalmente uno o dos anillos adicionales (cicloalquilo, heterociclilo y/o heteroarilo) fusionados al mismo. Los ejemplos no limitantes de arilo comprenden fenilo, bifenilo, 5- o 6-tetralinilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- o 8-azulenilo, naftalen-1- o -2-ilo, 4-, 5-, 6 o 7-indenilo, 1- 2-, 3-, 4- o 5-acenaftilenilo, 3-, 4- o 5-acenafteno, 1-, 2-, 3-, 4 - o 10-fenantrilo, 1- o 2-pentalenilo, 4- o 5-indanilo, 5-, 6-, 7- o 8-tetrahidronaftilo, 1,2,3,4-tetrahidronaftilo, 1,4-dihidronaftilo, 1 -, 2-, 3-, 4- o 5-pirenilo.

40 Como se señaló, los componentes estrogénicos según lo reivindicado son útiles en el tratamiento de trastorno neurológico en sujetos.

45 Como se utiliza en la presente memoria, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, cuando el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico indeseado, como el desarrollo de un trastorno neurológico. Los resultados clínicos beneficiosos o deseables incluyen, pero no se limitan a, la prevención de un trastorno, la reducción de la incidencia de un trastorno, el alivio de los síntomas asociados con un trastorno, la disminución de la extensión de un trastorno, el estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de un trastorno, el retraso o ralentización del avance de un trastorno, mejora o paliación del estado de un trastorno, remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable, o combinaciones de los mismos. El "tratamiento" también puede significar la prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

55 En ciertas realizaciones, los componentes estrogénicos según lo reivindicado pueden utilizarse para tratamiento profiláctico o preventivo de un trastorno neurológico, es decir, en donde al sujeto se le administra el componente estrogénico mientras no se le diagnostica (por ejemplo, previo a que se le diagnostique) el trastorno neurológico. Por ejemplo, el sujeto puede considerarse en riesgo de contraer/desarrollar el trastorno neurológico. Por lo tanto, dicho tratamiento está dirigido a prevenir el trastorno neurológico.

En realizaciones preferentes, los componentes estrogénicos según lo reivindicado pueden utilizarse para el tratamiento terapéutico de un trastorno neurológico. Por consiguiente, en realizaciones preferentes, la invención se refiere a un componente estrogénico según lo enseñado en la presente memoria para su uso en el tratamiento de un trastorno neurológico, en donde el componente estrogénico se administra a un sujeto al que se le diagnosticó el

trastorno neurológico. Por lo tanto, dicho tratamiento está dirigido a la terapia del trastorno neurológico existente.

5 Como se utiliza en la presente memoria, los términos "tratamiento terapéutico" o "terapia" y similares se refieren a tratamientos en los que el objeto es llevar el cuerpo de un sujeto o un elemento del mismo de un cambio o desorden fisiológico indeseado, como un trastorno neurológico, a un estado deseado, tal como un estado menos desagradable o severo (por ejemplo, alivio o paliación), o de nuevo a su estado normal y saludable (por ejemplo, restablecer la salud, la integridad física y el bienestar físico de un sujeto), para mantenerlo (es decir, que no empeore) en dicho cambio o desorden fisiológico indeseado (por ejemplo, estabilización), o para evitar o ralentizar el avance a un estado más grave o peor en comparación con dicho cambio o desorden fisiológico indeseado.

10 Excepto cuando se indique lo contrario, "sujeto" o "paciente" se usan indistintamente y se refieren a animales, preferiblemente animales de sangre caliente, más preferentemente vertebrados, incluso más preferentemente mamíferos, aún más preferentemente primates, y específicamente incluyen pacientes humanos y mamíferos no humanos y primates. Los sujetos "mamíferos" se refieren a cualquier animal clasificado como tal e incluyen, pero no se limitan a, humanos, animales domésticos, animales comerciales, animales de granja, animales de zoológico, animales para deporte, mascotas y animales de experimentación tales como perros, gatos, conejillos de Indias, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, vacas; primates tal como simios, monos, orangutanes y chimpancés; cánidos tales como perros y lobos; felinos tal como gatos, leones y tigres; équidos tal como caballos, burros y cebras; animales de alimento tales como vacas, cerdos y ovejas; ungulados tal como ciervos y jirafas; roedores tal como ratones, ratas, hámsteres y conejillos de Indias; y así sucesivamente. Los pacientes preferidos son sujetos humanos.

20 Como se utiliza en la presente memoria, una frase como "un sujeto que necesita tratamiento" incluye sujetos que se beneficiarían del tratamiento, preferentemente el tratamiento terapéutico de un trastorno recitado, en particular un trastorno neurológico. Dichos sujetos pueden incluir, sin limitación, aquellos que han sido diagnosticados con dicho trastorno, aquellos propensos a contraer o desarrollar dicho trastorno y aquellos en los que dicho trastorno debe prevenirse. Particularmente se prevén los pacientes a los que se diagnostica un trastorno neurológico o en los que se debe prevenir un trastorno neurológico.

30 Como se utiliza en la presente memoria, el término "diagnóstico" se refiere a establecer y concluir que un sujeto se ve afectado por un trastorno recitado, en particular, un trastorno neurológico. El diagnóstico puede basarse en el examen de los síntomas asociados con un trastorno recitado (como, por ejemplo, el diagnóstico clínico). Alternativamente o además, el diagnóstico puede hacerse antes de que los síntomas puedan ser examinados (es decir, diagnóstico preclínico) o porque los síntomas son leves o no se limitan a un trastorno recitado mediante, por ejemplo, la detección de biomarcadores indicativos para el trastorno recitado y/o técnicas de imagen.

35 El término "cantidad terapéuticamente efectiva" como se usa en la presente memoria se refiere a una cantidad de un componente estrogénico o una composición farmacéutica según lo enseñado en la presente memoria efectiva para tratar un trastorno neurológico en un sujeto, es decir, para obtener un efecto y rendimiento sistémico o local deseado. Por lo tanto, el término se refiere a la cantidad de componente estrogénico o composición farmacéutica que provoca la respuesta biológica o medicinal en un tejido, sistema, animal o ser humano que está siendo buscada por un investigador, veterinario, médico u otro clínico. En particular, el término se refiere a la cantidad de componente estrogénico o composición farmacéutica según lo enseñado en la presente memoria que es necesaria para prevenir, curar, mejorar, o al menos minimizar el deterioro clínico, los síntomas o complicaciones asociadas con un trastorno neurológico en ya sea una o múltiples dosis.

40 Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "tratamiento de un trastorno neurológico", tal como tratamiento terapéutico de un trastorno neurológico, puede abarcar la protección contra o la prevención del daño cerebral, incluida la alteración de la integridad de las células cerebrales y/o pérdida de la función o estructura de la célula cerebral, disminución del grado de daño cerebral, el no empeoramiento del daño cerebral o restauración del daño cerebral, y puede abarcar inducir o promover la neurogénesis y/o vasculogénesis.

45 En ciertas circunstancias, el tratamiento de trastorno neurológico, tal como el tratamiento terapéutico del trastorno neurológico, comprende proteger contra el daño cerebral, disminuir el grado de daño cerebral, no empeorar el daño cerebral o restaurar el daño cerebral. En realizaciones particulares, el tratamiento terapéutico del trastorno neurológico comprende no empeorar el daño cerebral o restaurar el daño cerebral.

50 En realizaciones, el tratamiento de trastorno neurológico, tal como el tratamiento terapéutico del trastorno neurológico, comprende promover la neurogénesis, vasculogénesis, la neurogénesis y vasculogénesis.

55 Los ejemplos para examinar el daño cerebral, la neurogénesis y la vasculogénesis incluyen técnicas de imagen, en particular técnicas de neuroimagen, detección y medición de marcadores biológicos adecuados en por ejemplo suero sanguíneo o fluido cerebroespinal. Las técnicas adecuadas de neuroimagen incluyen resonancia magnética (MRI) y tomografía por emisión de positrones (PET). Los marcadores biológicos adecuados para el daño cerebral incluyen por ejemplo S100B y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Las técnicas para detectar y medir marcadores biológicos en fluidos corporales son bien conocidas e incluyen, por ejemplo, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA).

Como se utiliza en la presente memoria, el término "trastorno neurológico" se refiere a cualquier enfermedad neurológica, afección neurológica, comportamiento neurológico, y/o cualquier síntoma relacionado con esto, que afecte al sistema nervioso central y/o al sistema nervioso periférico.

5 Preferentemente, el trastorno neurológico puede afectar el sistema nervioso central, incluido el cerebro y la médula espinal, más preferiblemente puede afectar al menos el cerebro, incluso más preferiblemente puede afectar al menos el hipocampo, tal como al menos el hipocampo y la corteza.

10 Los términos "hipocampo" y "formación del hipocampo" se usan como sinónimos en la presente memoria y se refieren a una región del cerebro ubicada en el lóbulo temporal medio del cerebro que está involucrada en la memoria, la memoria espacial y la navegación. Los mamíferos tienen dos hipocampos, en cada lado del cerebro y el término abarca ambos hipocampos. Como se usa en la presente memoria, el hipocampo se refiere al giro dentado (DG), cornu ammonis (CA) y subiculum. El giro dentado abarca la fascia dentata, el hilus, la zona subgranular (SGZ), la capa de células granulares y la capa molecular. La zona subgranular (SGZ) es una capa estrecha de células ubicadas entre la capa de células granulares y el hilus de la DG. Cornu ammonis (CA) se diferencia en los campos cornu ammonis 1 (CA1), cornu ammonis 2 (CA2), cornu ammonis 3 (CA3), y cornu ammonis 4 (CA4). El trastorno  
15 neurológico puede afectar al menos una, más de una o todas estas regiones, como en particular, al menos uno, más de uno o la totalidad de giro dentado, cornu ammonis 1, cornu ammonis 2, cornu ammonis 3, o zona subgranular.

Los términos "corteza" y "corteza cerebral" se usan como sinónimos en la presente memoria y generalmente indican la lámina más externa del tejido neural del cerebro. La corteza se puede ver generalmente como compuesta de áreas sensoriales, motoras y de asociación.

20 El trastorno neurológico puede afectar la corteza, como cualquier región de la corteza cerebral, y en particular puede afectar la corteza somatosensorial primaria, más particularmente la región primaria del tronco de la corteza somatosensorial primaria unida a la corteza motora primaria.

25 Los trastorno neurológicos que deben tratarse utilizando los componentes estrogénicos o composiciones farmacéuticas enseñadas en la presente memoria pueden implicar disfunción y/o degeneración, daño o pérdida neuronal. Preferentemente, el trastorno neurológico a tratar implica degeneración, daño o pérdida neuronal, como por ejemplo, pero sin limitación, lesiones cerebrales, lesiones de la médula espinal, o enfermedades neurodegenerativas.

30 Las lesiones cerebrales ejemplares incluyen, pero no se limitan a, lesiones cerebrales hipóxicas/anóxicas, incluyendo encefalopatía hipóxico-isquémica (HIE) tal como HIE neonatal, y además isquemia cerebral, o apoplejía, o lesión cerebral traumática.

Preferentemente, la lesión cerebral, tal como lesión cerebral hipóxica, lesión cerebral anóxica, o lesión cerebral traumática, afecta al menos al hipocampo, más preferiblemente la lesión cerebral altera la integridad de las células cerebrales en al menos el hipocampo.

35 Las lesiones ejemplares de la médula espinal y ganglios asociados incluyen, pero no se limitan a, síndrome post-polio, lesión traumática, lesión quirúrgica o enfermedades paralíticas.

Con el término "enfermedad o trastorno neurodegenerativo" generalmente se entiende un trastorno neurológico caracterizado por la pérdida progresiva de la estructura o función de las neuronas, incluida la muerte de las neuronas.

40 Las enfermedades neurodegenerativas ejemplares preferidas incluyen, pero sin limitación, enfermedades caracterizadas por la pérdida progresiva de la estructura o función de las neuronas en el hipocampo y/o corteza, tales como Enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Parkinson (PD), demencia frontotemporal (FD) (que cubre una variedad de afecciones, incluida la enfermedad de Pick, degeneración del lóbulo frontal), esclerosis lateral amiotrófica (ALS); enfermedades caracterizadas por la pérdida progresiva de la estructura o función de las neuronas, incluida la muerte de neuronas en los ganglios basales (en particular, núcleo subtalámico, sustancia negra y globo pálido), tronco encefálico (en particular, la porción del mesencéfalo donde reside el movimiento supranuclear del ojo), núcleo dentado del cerebelo, tal como parálisis supranuclear progresiva, degeneración estriatonigral, degeneración corticobasal, atrofia olivopontocerebelosa, y similares.

45 Otros ejemplos de enfermedades neurodegenerativas incluyen, entre otros, Enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Parkinson (PD), demencia frontotemporal (FTD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de Huntington (HD) y otras enfermedades de expansión de la poliglutamina, enfermedad de Pick, parálisis supranuclear progresiva, degeneración estriatonigral, degeneración corticobasal, atrofia olivopontocerebelosa, enfermedad de Leigh, encefalomiopatía necrosante infantil, enfermedad de Hunter, mucopolisacaridosis, diversas leucodistrofias (tal como la enfermedad de Krabbe, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher y similares), idiotismo amaurotica (familiar), enfermedad de Kuf, enfermedad de Spielmayer-Vogt, enfermedad de Tay Sachs, enfermedad de Batten, enfermedad de Jansky-Bielschowsky, enfermedad de Reye, ataxia cerebral, alcoholismo crónico, beriberi, síndrome de Hallervorden-Spatz, degeneración cerebelosa y similares.

Preferentemente, la enfermedad neurodegenerativa es Enfermedad de Alzheimer (AD) o Enfermedad de Parkinson (PD).

5 En la Enfermedad de Alzheimer, el hipocampo es una de las primeras regiones del cerebro en sufrir daños (Hampel et al., 2008. *Alzheimer & Dementia* 4: 38-48). Por lo tanto, en ciertas realizaciones los componentes estrogénicos y las composiciones farmacéuticas según lo establecido en la presente memoria pueden ser particularmente adecuados para tratar, en particular tratar terapéuticamente, sujetos en las primeras etapas de AD, tal como en la etapa preclínica o las primeras etapas clínicas de AD. Por consiguiente, en ciertas realizaciones preferentes, el trastorno neurológico a tratar es AD en etapa temprana (es decir, la etapa preclínica o las primeras etapas clínicas de AD).

10 También la enfermedad de Parkinson se correlaciona con el daño del hipocampo. En particular, se observó atrofia del hipocampo en pacientes con PD sin demencia en etapa temprana que presentaba memoria deteriorada (Bruck et al., 2004. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75: 1467-1469) y en pacientes con PD con deficiencia cognitiva leve o demencia ( Camicioli et al., 2003. *Mov Disorder* 18: 784-790). Por consiguiente, en ciertas realizaciones preferentes, el trastorno neurológico que debe tratarse es la PD sin demencia en etapa temprana o PD con deterioro cognitivo leve (MCI).

15 Otros trastornos neurológicos ejemplares preferidos que se pueden tratar usando los componentes estrogénicos o composiciones farmacéuticas que se enseñan en la presente memoria pueden incluir, pero no se limitan a: trastornos autoinmunes desmielinizantes, tales como esclerosis múltiple; déficits neurológicos causados por infección o enfermedades inflamatorias, enfermedades virales del sistema nervioso central (SNC), tales como encefalopatía por SIDA, parkinsonismo post-encefalítico, encefalitis viral, meningitis bacteriana u otros efectos sobre el SNC de enfermedades infecciosas; trastornos de la percepción sensorial cortical, tales como trastornos de la función vestibular, trastornos de equilibrio y coordinación, mareos, problemas de la marcha, dislexia, torpeza, discriminación de audición y trastornos de modulación, problemas de visión, trastornos de la coordinación y movimiento ocular, o trastornos sensoriales tal como síntomas de enfermedades neurológicas; trastornos de la función intestinal tales como estreñimiento o incontinencia; y trastornos del control de la vejiga urinaria, tal como incontinencia urinaria, como síntomas de enfermedades del SNC; disfunciones respiratorias después de parálisis cerebral; trastornos de la función neural autónoma que causan flujo sanguíneo anormal a la piel, respuesta sexual anormal, disfunción eréctil, dolores de cabeza, dolor de cuello, dolor de espalda, encefalomielopatía en el contexto del trauma, taquicardia ortostática postural, intolerancia ortostática, hipotensión ortostática, síncope, intestino neurogénico, y vejiga neurogénica.

20 Los trastornos neurológicos ejemplares que se pueden tratar usando los componentes estrogénicos o composiciones farmacéuticas enseñadas en la presente memoria pueden incluir, pero no se limitan a: desórdenes autoinmunes desmielinizantes, tales como esclerosis múltiple; déficits neurológicos causados por la infección de enfermedades inflamatorias, tal como la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob u otras enfermedades infecciosas del sistema nervioso central (SNC) del virus lento, encefalopatía por SIDA, parkinsonismo post-encefalítico, encefalitis viral, meningitis bacteriana u otros efectos sobre el SNC de enfermedades infecciosas; trastornos de la función motora cortical, tales como espasticidad, paresia, clones, o hiperreflexia; trastornos de la percepción sensorial cortical, tales como trastornos de la función vestibular, trastornos de coordinación y equilibrio, mareos, problemas de la marcha, dislexia, torpeza, retraso del desarrollo, trastornos de modulación y discriminación auditiva, trastornos del habla mecánica y retardada, problemas de visión, trastornos de coordinación y movimiento ocular o trastornos de perturbación sensorial; disfunciones del nervio craneal inferior, tal como falta de coordinación entre el habla, la deglución o la articulación suave; trastornos de la función intestinal, tales como problemas de control del esfínter gastroesofágico; funcionamiento urinario anormal, tal como enuresis, orinarse en la cama, o trastornos del control de la vejiga urinaria; disfunciones respiratorias, tal como ronquidos excesivos, apnea central u obstructiva, o respuesta respiratoria anormal a los niveles de oxígeno y dióxido de carbono; respiración desordenada por el sueño, tal como apnea, disfunción muscular o muerte súbita de lactantes; trastornos del desarrollo, tal como malformación de Chiari; o enfermedades congénitas, tal como síndrome de Down, síndrome de Morquio, displasia espondiloepifisaria, acondroplasia o osteogénesis; trastornos neurológicos del comportamiento, tal como trastorno por déficit de atención e hiperactividad, problemas psicológicos, incluida ansiedad, trastorno bipolar, esquizofrenia o depresión, trastornos del espectro autista, que incluyen autismo, síndrome de Asperger y trastornos generales del comportamiento no especificados de otra manera; afecciones anatómicas, tales como platibasia, odontoides retroflexionadas, invaginación basilar y estenosis de foramen magnum; afecciones adquiridas de ablandamiento óseo, tal como raquitismo, enfermedad de Paget, o hiperparatiroidismo; trastornos óseos metabólicos; trastornos del tejido conectivo, que incluyen trastornos del tejido conectivo de hipermovilidad, tal como síndrome de Ehlers Danlos; 55 síndrome cervico-medular; síndromes renal, metabólico o endocrino; trastornos de la función neural autónoma que causan flujo sanguíneo anormal a la piel, respuesta sexual anormal, GERDS, dispraxia, escoliosis idiopática, cefaleas, dolor de cuello, dolor de espalda, dolor de cabeza, encefalomielopatía en el contexto de trauma, neoplasia, taquicardia ortostática posicional, y hallazgos bulbares.

60 Como se muestra en la sección experimental, los componentes estrogénicos según lo enseñado en la presente memoria exhiben efectos terapéuticos sobre el daño cerebral y promueven la neurogénesis y la vasculogénesis después de la hipoxia-isquemia. Por consiguiente, los componentes estrogénicos o composiciones farmacéuticas según lo enseñado en la presente memoria pueden ser apropiados para tratar lesión cerebral hipóxica, lesión

5 cerebral anóxica y/o lesión cerebral traumática, en donde el componente estrogénico o composición farmacéutica se administra después de la hipoxia, isquemia y/o trauma. En particular, los componentes estrogénicos o composiciones farmacéuticas según lo enseñado en la presente memoria pueden ser apropiados para tratar encefalopatía hipóxico-isquémica, tal como preferentemente encefalopatía hipóxico-isquémica neonatal, en donde el  
 10 componente estrogénico o composición farmacéutica se administra después de hipoxia-isquemia (es decir, tratamiento terapéutico de HIE). Preferentemente, el componente estrogénico o composición farmacéutica se administra tan pronto como sea posible después de hipoxia, isquemia, trauma o hipoxia-isquemia, tal como dentro de 12 horas, 9 horas, o 6 horas después de hipoxia, isquemia, trauma o hipoxiaisquemia, más preferentemente dentro de 6 horas, tal como dentro de 5 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas, 1 hora, 30 minutos o 15 minutos, después de hipoxia, isquemia, trauma o hipoxiaisquemia, en sujetos tal como en sujetos humanos.

15 Como se indicó más arriba, los componentes estrogénicos o composiciones farmacéuticas según lo enseñado en la presente memoria también pueden ser particularmente apropiadas para el tratamiento de AD. Por ejemplo, los componentes estrogénicos o composición farmacéutica según lo enseñado en la presente memoria puede ser apropiada para el tratamiento profiláctico o preventivo de AD, en donde el componente estrogénico o la composición farmacéutica se administra a mujeres menopáusicas con antecedentes familiares de AD. Los componentes estrogénicos o composición farmacéutica según lo enseñado en la presente memoria también pueden ser apropiados para el tratamiento terapéutico de AD en etapa temprana, en donde el componente estrogénico o la composición farmacéutica se administra a un paciente al que se le diagnosticó AD en etapa temprana.

20 El diagnóstico de AD en etapa temprana se puede lograr, por ejemplo, mediante neuroimágenes, tales como MRI, mediante lo cual los pacientes con AD en etapa temprana se caracterizan por atrofia de la formación del hipocampo (Hampel et al., 2008. supra). Alternativamente o además, el diagnóstico de AD en etapa temprana se puede establecer sobre la base de biomarcadores de evaluación, tales como, por ejemplo, amiloide beta 42 (Aβ42), proporción de amiloide beta 40 (Aβ40), proteína tau total, proteína tau hiperfosforilada, β-secretasa (BACE), o cualquier combinación de los mismos, en el fluido cerebroespinal (Hampel et al., 2008. supra).

25 Como se indicó más arriba, los componentes estrogénicos o composiciones farmacéuticas según lo enseñado en la presente memoria también pueden ser particularmente apropiados para el tratamiento de PD sin demencia en etapa temprana o PD con deterioro cognitivo leve (MCI), más específicamente tratamiento médico de PD sin demencia en etapa temprana o PD con deterioro cognitivo leve, en donde el componente estrogénico o la composición farmacéutica se administra a un paciente al que se le diagnosticó PD sin demencia en etapa temprana, en particular un paciente al que se le diagnosticó PD sin demencia en etapa temprana que exhibe una memoria deteriorada, o un  
 30 paciente al que se le diagnosticó PD que tiene MCI.

35 El diagnóstico de pacientes con PD sin demencia en etapa temprana puede basarse en el examen de los síntomas clínicos de PD, por lo que los pacientes con PD sin demencia en etapa temprana tienen al menos dos de los síntomas de PD seleccionados del grupo que consiste en temblor, rigidez, e hipoquinesia, opcionalmente en combinación con técnicas de neuroimagen como, por ejemplo, MRI. Las imágenes de MRI volumétricas pueden proporcionar un marcador temprano de demencia en PD, por lo que los pacientes con PD sin demencia en etapa temprana y pacientes con PD que tienen deterioro cognitivo leve se caracterizan por la atrofia del hipocampo. La memoria deteriorada se puede evaluar a través de pruebas neuropsicológicas, como por ejemplo, la prueba revisada de la escala de memoria de Wechsler para memoria verbal (VEM).

40 Los componentes estrogénicos enseñados en la presente memoria pueden usarse solos o en combinación con cualquiera de las terapias conocidas para trastorno neurológico ("terapia de combinación").

45 Las terapias de combinación tal como se contemplan en la presente memoria pueden comprender la administración de al menos un componente estrogénico según lo enseñado en la presente memoria y al menos otro ingrediente farmacéuticamente o biológicamente activo. Dicho/s componente/s estrogénico/s y dicho/s ingrediente/s farmacéuticamente o biológicamente activo/s puede/n administrarse en la/s misma/s composición/es farmacéutica/s o composición/es farmacéutica/s separada/s, simultáneamente, por separado o secuencialmente en cualquier orden.

50 El al menos un "otro ingrediente farmacéuticamente o biológicamente activo" se refiere particularmente a una sustancia distinta de los componentes estrogénicos descritos en la presente memoria que es eficaz para tratar un trastorno neurológico y que puede o no conducir a un efecto sinérgico con el componente estrogénico. Los ejemplos no limitantes de ingredientes farmacéuticamente o biológicamente activos adecuados para la administración combinada con el componente estrogénico enseñado en la presente memoria, particularmente para su uso en el tratamiento de HIE tal como preferentemente HIE neonatal, incluyen fármacos antiepilépticos, eritropoyetina, melatonina y xenón.

55 También se contempla en la presente memoria la combinación de la administración de al menos un componente estrogénico según lo enseñado en la presente memoria con hipotermia moderada (es decir, reducir la temperatura corporal a 33°C a 34°C). Dicha terapia de combinación puede ser particularmente adecuada para el tratamiento, preferiblemente el tratamiento terapéutico, de encefalopatía hipóxico-isquémica (HIE) tal como preferentemente HIE neonatal.

Los componentes estrogénicos tal como se describen en la presente memoria pueden formularse generando composiciones farmacéuticas o formulaciones con uno o más vehículos/excipientes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender uno o más componentes estrogénicos como se describe en la presente memoria. Las t composiciones farmacéuticas también pueden comprender además uno o más ingredientes farmacéuticamente o biológicamente activos como se definió anteriormente. Por consiguiente, también se divulga en la presente memoria una composición farmacéutica que comprende un componente estrogénico como se describe la presente memoria.

El término "farmacéuticamente aceptable" como se usa en la presente memoria es consistente con la técnica y significa compatible con los otros ingredientes de una composición farmacéutica y no perjudicial para el destinatario de la misma.

Como se utiliza en la presente memoria, "vehículo" o "excipiente" incluye todos los disolventes, diluyentes, tampones (tales como, por ejemplo, solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato, u opcionalmente, tampones de Tris-HCl, acetato o fosfato), solubilizantes (tal como, por ejemplo Tween 80, Polisorbato 80), coloides, medios de dispersión, vehículos, rellenos, agentes quelantes (tal como, por ejemplo, EDTA o glutatión), aminoácidos (tal como, por ejemplo, glicina), proteínas, disgregantes, aglutinantes, lubricantes, agentes humectantes, estabilizantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, sborizantes, aromatizantes, espesantes, agentes para lograr un efecto de depósito, recubrimientos, agentes antifúngicos, conservantes (tal como, por ejemplo, Thimerosal<sup>TM</sup>, alcohol bencílico), antioxidantes (tal como, por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), agentes de control de la tonicidad, agentes de retardo de la absorción, adyuvantes, agentes de carga (tales como, por ejemplo, lactosa, manitol) y similares. El uso de tales medios y agentes para formular composiciones farmacéuticas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el/los ingrediente/s activo/s, se puede contemplar su uso en las composiciones terapéuticas. Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen, entre otros, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990).

La composición farmacéutica puede prepararse de una manera conocida per se para un experto en la técnica. Para este fin, al menos un componente estrogénico como se describe en la presente memoria, uno o más excipientes farmacéuticos sólidos o líquidos y, si se desea, en combinación con uno o más otros ingredientes farmacéuticamente o biológicamente activos como se define anteriormente, se llevan a una forma de administración adecuada o forma de dosificación que luego puede usarse como un producto farmacéutico en la medicina humana o medicina veterinaria. La naturaleza precisa del vehículo o excipiente u otro material dependerá de la vía de administración. Tales formas de administración adecuadas, que pueden ser sólidas, semisólidas o líquidas, dependiendo de la forma de administración, así como los métodos y vehículos para su uso en la preparación de las mismas, serán claros para los expertos en la materia; se hace referencia, por ejemplo, a los manuales estándar, tales como Remington's Pharmaceutical Sciences (supra).

Por ejemplo, la composición farmacéutica según lo enseñado en la presente memoria se puede administrar por vía parenteral (tal como por inyección intravenosa, intracerebral, intracerebroventricular, intramuscular, o subcutánea, o infusión intravenosa) en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, que es libre de pirógenos y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Alternativamente, la composición farmacéutica según lo enseñado en la presente memoria puede administrarse por vía oral, por ejemplo, en forma de píldoras, comprimidos, comprimidos laqueados, comprimidos recubiertos de azúcar, gránulos, cápsulas de gelatina dura y blanda, soluciones acuosas, alcohólicas o oleosas, jarabes, emulsiones o suspensiones, o por vía rectal, por ejemplo en forma de supositorios, por vía percutánea o tópica (incluida la administración ocular), por ejemplo en forma de ungüentos, tinturas, aerosoles o sistemas terapéuticos transdérmicos (tal como, por ejemplo, un parche cutáneo), o por inhalación en forma de aerosoles nasales o mezclas de aerosoles, o, por ejemplo, en forma de microcápsulas, implantes o varillas.

Para la producción de píldoras, comprimidos, comprimidos recubiertos con azúcar y cápsulas de gelatina dura es posible usar, por ejemplo, lactosa, almidón, por ejemplo almidón de maíz, o derivados de almidón, talco, ácido esteárico o sus sales, etc. Los vehículos para cápsulas de gelatina blanda y supositorios son, por ejemplo, grasas, ceras, polioles semisólidos y líquidos, aceites naturales o endurecidos, etc. Los vehículos adecuados para la preparación de soluciones, por ejemplo de soluciones para inyección, o de emulsiones o jarabes son, por ejemplo, agua, solución fisiológica de cloruro de sodio, alcoholes como etanol, glicerol, polioles, sacarosa, azúcar invertida, glucosa, manitol, aceites vegetales, etc. También es posible liofilizar los ingredientes activos y usar los liofilizados resultantes, por ejemplo, para preparar preparaciones para inyección o infusión. Los vehículos adecuados para microcápsulas, implantes o varillas son, por ejemplo, copolímeros de ácido glicólico y ácido láctico.

Para una forma de administración oral, las composiciones de la presente invención se pueden mezclar con aditivos adecuados, tales como excipientes, estabilizantes, o diluyentes inertes, y convertirlas por medio de los métodos habituales en las formas de administración adecuadas, tales como comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas duras, soluciones acuosas, alcohólicas o aceitosas. Los ejemplos de vehículos inertes adecuados son goma arábiga, magnesia, carbonato de magnesio, fosfato de potasio, lactosa, glucosa o almidón, en particular almidón de maíz. En este caso, la preparación puede llevarse a cabo tanto en seco como en gránulos húmedos. Los excipientes oleosos o disolventes adecuados son aceites vegetales o animales, tales como aceite de girasol o aceite de hígado de bacalao. Los disolventes adecuados para soluciones acuosas o alcohólicas son agua, etanol, soluciones de azúcar o

mezclas de los mismos. Los polietilenglicoles y polipropilenglicoles también son útiles como auxiliares adicionales para otras formas de administración. Como comprimidos de liberación inmediata, estas composiciones pueden contener celulosa microcristalina, fosfato dicálcico, almidón, estearato de magnesio, y lactosa y/o otros excipientes, aglutinantes, extendedores, disgregantes, diluyentes y lubricantes conocidos en la técnica.

- 5 La administración oral de una composición farmacéutica que comprende al menos un componente estrogénico como se describe en la presente memoria, se lleva a cabo adecuadamente mezclando uniforme e íntimamente una cantidad adecuada de dicho componente en forma de un polvo, opcionalmente también incluyendo un vehículo sólido finamente dividido, y encapsulando la mezcla, por ejemplo, en una cápsula de gelatina dura. El vehículo sólido puede incluir una o más sustancias, que actúan como aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes, agentes colorantes y similares. Los vehículos sólidos adecuados incluyen, por ejemplo, fosfato de calcio, estearato de magnesio, talco, azúcares, lactosa, dextrina, almidón, gelatina, celulosa, polivinilpirrolidina, ceras de bajo punto de fusión y resinas de intercambio iónicos.

10 Los comprimidos que contienen la composición farmacéutica descrita en la presente memoria se pueden preparar mezclando uniforme e íntimamente el/los ingrediente/s activo/s con un vehículo sólido tal como se describió anteriormente para proporcionar una mezcla que tenga las propiedades de compresión necesarias, y luego compactar la mezcla en un máquina apropiada para generar la forma y tamaño deseados. Los comprimidos moldeados pueden prepararse mediante moldeado en una máquina adecuada, una mezcla de ingrediente/s activo/s en polvo humedecidos con un diluyente líquido inerte.

15 Cuando se administran mediante aerosol nasal o inhalación, estas composiciones pueden prepararse de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica de formulación farmacéutica y pueden prepararse como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de absorción para mejorar la biodisponibilidad, fluorocarbonos, y/o otros agentes solubilizantes o dispersantes conocidos en la técnica. Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para administración en forma de aerosoles o pulverizaciones son, por ejemplo, soluciones, suspensiones o emulsiones de los compuestos de la invención o sus sales fisiológicamente tolerables en un disolvente farmacéuticamente aceptable, tal como etanol o agua, o una mezcla de tales disolventes. Si es necesario, la formulación también puede contener adicionalmente otros auxiliares farmacéuticos tales como tensioactivos, emulsionantes y estabilizadores así como un propeleante.

20 Para la administración subcutánea o intravenosa, el/los componente/s estrogénico/s descrito/s en la presente memoria, si se desea con las sustancias habituales, por lo tanto, tales como solubilizantes, emulsionantes o auxiliares adicionales, se convierten en solución, suspensión o emulsión. El/los ingrediente/s activo/s también se pueden liofilizar y los liofilizados obtenidos se usan, por ejemplo, para la producción de preparaciones de inyección o infusión. Los disolventes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina fisiológica, alcoholes, por ejemplo etanol, propanol, glicerol, además también soluciones de azúcar tales como soluciones de glucosa o manitol, o alternativamente mezclas de los diversos disolventes mencionados. Las soluciones o suspensiones inyectables pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida, usando diluyentes o disolventes no tóxicos, aceptables para uso parenteral, adecuados, tales como manitol, 1,3-butanodiol, agua, solución de Ringer, o solución isotónica de cloruro de sodio, o agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados, tales como aceites fijos, insípidos, estériles, que incluyen mono- o diglicéridos sintéticos y ácidos grasos, incluido ácido oleico.

25 Cuando se administran por vía rectal en forma de supositorios, estas formulaciones se pueden preparar mezclando el componente estrogénico descrito en la presente memoria con un excipiente no irritante adecuado, tal como manteca de cacao, ésteres de glicéridos sintéticos o polietilenglicoles, que son sólidos a temperaturas ordinarias, pero se licuan y/o disuelven en la cavidad rectal para liberar el fármaco.

30 Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes de tales preparaciones incluyen comprimidos, píldoras, polvos, pastillas, bolsitas, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles, ungüentos, cremas, lociones, cápsulas de gelatina dura y blanda, supositorios, gotas, soluciones inyectables estériles y polvos envasados estériles (que usualmente se reconstituyen antes del uso) para administración en bolo y/o para administración continua, que pueden formularse con vehículos, excipientes y diluyentes que son adecuados per se para tales formulaciones, tales como lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, polietilenglicol, celulosa, agua (estéril), metilcelulosa, metil-y propilhidroxibenzoatos, talco, estearato de magnesio, aceites comestibles, aceites vegetales y aceites minerales o mezclas adecuadas de los mismos. Las formulaciones pueden contener opcionalmente otras sustancias farmacéuticamente activas (que pueden o no conducir a un efecto sinérgico con los compuestos de la invención) y otras sustancias que se usan comúnmente en formulaciones farmacéuticas, tales como agentes lubricantes, agentes humectantes, emulsionantes y agentes de suspensión, agentes dispersantes, disgregantes, agentes de carga, rellenos, conservantes, edulcorantes, aromatizantes, reguladores de flujo, agentes de liberación, etc.

35 Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del o de los principios activos contenidos en ellas, por ejemplo usando liposomas o matrices poliméricas hidrofílicas basadas en geles naturales o polímeros sintéticos.

- La dosificación o cantidad del componente estrogénico como se describe en el presente documento utilizada, opcionalmente en combinación con uno o más ingredientes farmacéuticamente o biológicamente activos como se define anteriormente, depende del caso individual y, como es habitual, se debe adaptar a las circunstancias individuales para lograr un efecto óptimo. Por lo tanto, depende de la naturaleza y la gravedad del trastorno que se va a tratar, y también del sexo, edad, peso corporal, dieta, la salud general, capacidad de respuesta individual del ser humano o animal a tratar, sobre la eficacia, estabilidad metabólica y duración de la acción de los componentes usados, en el modo y tiempo de administración, tasa de excreción, en si la terapia es aguda o crónica o profiláctica, o si se administran otros ingredientes farmacéutica o biológicamente activos como se definió anteriormente, u otras terapias aplicadas , además del componente estrogénico.
- Sin limitación, dependiendo del tipo y la gravedad del trastorno, una dosis diaria típica puede variar de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 250 mg/kg de peso corporal o más, tal como de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 0,4 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 5 µg/kg a aproximadamente 0,4 mg/kg de peso corporal, dependiendo de los factores mencionados más arriba. Preferentemente, la dosis diaria puede variar de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, más preferentemente de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal, even más preferentemente de aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal, tal como aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal.
- Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación preferente del componente estrogénico puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, más preferentemente de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal, aún más preferentemente de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal. Por lo tanto, una o más dosis de aproximadamente 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg o 20 mg/kg (o cualquier combinación de los mismos) pueden ser administradas al paciente. Otras dosis disponibles pueden estar en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg, tal como aproximadamente 0,05 mg/kg aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, una o más dosis de aproximadamente 0,1 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de los mismos) se puede administrar al paciente. Dichas dosis se pueden administrar como una única dosis diaria, dividida en una o más dosis diarias, o esencialmente de forma continua, por ejemplo, usando una infusión por goteo, o intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas.
- Las preparaciones farmacéuticas descritas en la presente memoria se presentan preferentemente en una forma de dosificación unitaria, y pueden empaquetarse adecuadamente, por ejemplo en una caja, blíster, vial, frasco, sobrecito, ampolla o en cualquier otro soporte o recipiente de dosis única o múltiples dosis adecuado. (que puede estar debidamente etiquetado); opcionalmente con uno o más prospectos que contengan información del producto y/o instrucciones para su uso. En general, tales dosis unitarias contendrán entre 1 y 1000 mg, como entre 5 y 500 mg, de al menos un componente estrogénico de la invención, por ejemplo, aproximadamente 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 , 600, 700, 800, 900 o 1000 mg por dosis unitaria.
- Dependiendo del modo de administración, la composición farmacéutica se compondrá preferentemente de 0,05 a 99 % en peso, más preferentemente de 0,1 a 70 % en peso, aún más preferentemente de 0,1 a 50 % en peso del componente estrogénico según lo descrito en la presente memoria, y, de 1 a 99,95 % en peso, más preferentemente de 30 a 99,9 % en peso, even más preferentemente de 50 a 99,9 % en peso de un vehículo farmacéuticamente aceptable, donde todos los porcentajes se basan en el peso total de la composición.
- Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por separado en diferentes momentos durante el transcurso de la terapia o al mismo tiempo en formas de combinación divididas o únicas. La presente divulgación abarca todos los regímenes de tratamiento simultáneo o alternante y el término "administrar" debe interpretarse por consiguiente.
- La administración puede realizarse con alimentos, por ejemplo, una comida rica en grasas. El término "con alimentos" significa el consumo de una comida durante o no más de aproximadamente una hora antes o después de la administración de una composición farmacéutica según lo descrito en la presente memoria.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1: Procedimientos experimentales

#### Animales de estudio:

Las ratas Sprague-Dawley preñadas se obtuvieron de Janvier (Francia). Después del parto las crías de rata recién nacidas fueron alojadas con sus madres y criadas normalmente a temperatura ambiente (25°C) bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la

Universidad de Liege. Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales.

*Manipulaciones in vivo:*

Las crías de rata recién nacidas fueron asignadas al grupo de intervención simulada, grupo Vehículo, o grupo E4.

5 Estetrol (E4) se disolvió en solución salina a diferentes concentraciones y se inyectó un volumen igual (5µl/ g) de la solución por vía intraperitoneal en las crías de el/los grupo/s E4. Las crías de rata del grupo Vehículo fueron inyectadas por vía intraperitoneal con una solución salina. Las crías de rata del grupo de intervención simulada no fueron inyectadas en absoluto.

10 La isquemia se produjo por cirugía abarcando doble ligación y corte de la arteria carótida común izquierda; la hipoxia se produjo por inhalación de 11% -8% de oxígeno equilibrado por nitrógeno en una reducción de la concentración durante 20 minutos, seguido de la inhalación de 8% de oxígeno y 92% de nitrógeno a una concentración constante durante 35 minutos. El grupo de intervención simulada no sufrió lesión hipóxico-isquémica.

Todas las manipulaciones se realizaron a 37°C.

*Medición de la temperatura rectal de las crías de rata:*

15 La temperatura rectal de los crías de rata se midió con un termómetro multipropósito (BAT-10R, Physitemp Instruments Inc., Clifton, NJ, EE.UU.) junto con una sonda rectal (RET-4, BioMedical Instruments, Zollnitz, Alemania) 0, 2, y 4 horas después de la exposición a la lesión hipóxica. Para mantener baja la variabilidad de la temperatura, las mediciones de la temperatura rectal se realizaron en una sala a 25 °C 15 minutos después de la remoción de las crías del nido (excepto la primera medición post-hipóxica que se realizó de inmediato). Se ha demostrado que la temperatura rectal se corresponde muy bien con la temperatura del núcleo cerebral (Thoresen et al., 1996. Arch Dis Child Fetal Neonatal 74: F3-F9, Yager et al., 1993. Pediatr Res 34: 525-529).

20

*Preparación de muestras de sangre y cerebro:*

Los crías de rata se sacrificaron en el día 14 postnatal. Los animales se anestesiaron profundamente con una sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/kg, ip).

Se extrajo sangre, se centrifugó y las muestras de suero se almacenaron a -80°C.

25 Los animales se perfundieron transcardiacamente con solución salina al 0,9% a 4°C, y luego con paraformaldehído al 4% en una solución salina tamponada con fosfato 0,1 mol/l (pH 7,4) a 4°C. Los cerebros se aislaron rápidamente, se pesaron y se sumergieron en la misma solución de fijación a 4°C durante 24 horas, se deshidrataron con una serie graduada de etanol y xileno, y se embebieron en parafina.

*Tinción con hematoxilina-eosina (histoquímica):*

30 Las muestras de los cerebros retirados embebidas en parafina fijadas en paraformaldehído se seccionaron coronalmente en el mismo nivel de la región del hipocampo de acuerdo con el atlas de cerebro de rata Paxinos (Paxinos y Watson 2007. En: The rat brain in stereotaxic coordinates, 6° edición). El grosor de las secciones era de 5µm. Se realizó tinción con hematoxilina-eosina. Brevemente, las secciones se desparafinaron en xileno y se rehidrataron en concentraciones graduales de etanol antes de la tinción. Las láminas se tñieron con hematoxilina, se enjuagaron durante unos segundos en agua y luego se colocaron en eosina al 1%, se lavaron, se deshidrataron y se cubrieron con cubreobjetos.

35

*Recuento de células intactas*

40 El recuento de células intactas se realizó en secciones teñidas con hematoxilina-eosina de los cerebros de crías de rata con un aumento de 400x en 3 campos del área cerebral respectiva. Se realizaron recuentos en la corteza y el hipocampo (regiones: giro dentado (DG), zona subgranular (SGZ), cornu ammonis (CA1, CA2/CA3)). Las secciones se analizaron con la ayuda de un microscopio (Olympus BX51, Olympus, Tokio, Japón), un escáner de imágenes (DotSlide Digital Virtual Microscopy, Olympus, Alemania) y software ImageJ (NIH, EE.UU.)

Las células intactas no están dañadas. Las células lesionadas se caracterizan por una tinción eosinófila pálida junto con densidades nucleares no uniformes: encogidas, condensadas, o pálidas y agrandadas.

45 *Tinción de proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP2):*

50 Las secciones cerebrales se procesaron para la detección inmunohistoquímica de la alteración del citoesqueleto neuronal. Para la recuperación del antígeno, las secciones se calentaron en tampón de citrato 10 mmol/l (pH 6,0) a 100°C durante 10 minutos. La actividad de peroxidasa endógena se bloqueó con peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos y después de un segundo bloqueo con 5% de suero de cabra normal, las secciones se incubaron con anticuerpo anti-proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2), diluido 1: 1000 (anticuerpo monoclonal de ratón ; Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.) 1 hora a temperatura ambiente. Después del enjuague, se añadió

inmunoglobulina G antiratón de cabra biotinilada (Vector Laboratories, Burlingame, California), y la detección de anticuerpos se realizó con el método de complejo de avidina-biotina (Vector Laboratories), con 3,3'-diaminobenzidina (DAB) como el cromógeno. Después de la reacción con DAB, las láminas se lavaron, se deshidrataron y se cubrieron con cubreobjetos.

5 Las muestras se analizaron con la ayuda de un escáner de imágenes (Nanozoomer Virtual Microscopy, Hamamatsu, Tokio, Japón) y el software ImageJ (NIH, EE.UU.). Se midieron las áreas positivas para MAP2 en los hemisferios ipsilateral y contralateral. La relación de las áreas positivas para MAP2 se calculó como el área positiva de MAP2 del hemisferio ipsilateral dividida por el área positiva de MAP2 del hemisferio contralateral. La relación del área positiva de MAP2 en el grupo de intervención simulada se consideró por defecto como 1,0.

10 *Tinción doble del factor de crecimiento endotelial vascular - Doblecortina:*

Las secciones se calentaron en 10 mmol/l de tampón de citrato (pH 6,0) a 100°C durante 10 minutos. La actividad de peroxidasa endógena se bloqueó con peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos y después de un segundo bloqueo con suero de cabra normal al 5%, las secciones se incubaron con anticuerpo anti-doblecortina (DCX), diluido 1: 1000 (anticuerpo policlonal de conejo; Abcam, Cambridge, Reino Unido) y anticuerpo anti-factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), diluido 1: 100 (anticuerpo monoclonal de ratón, Abcam, Cambridge, Reino Unido) durante la noche a 4°C. Después del enjuague, se añadieron Alexa Fluor® anti-conejo de cabra, diluido 1: 1000 y Alexa Fluor® anti-ratón de cabra, diluido 1: 1000 (Invitrogen Inc., Gante, Bélgica) y las secciones se incubaron 1 hora a temperatura ambiente. Se usó medio de montaje que contenía 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para estudios fluorescentes (Vector Laboratories). Las muestras se analizaron con la ayuda de un microscopio (Olympus Vanox AHBT3, Olympus), y el software ImageJ (NIH). El porcentaje de células teñidas positivamente se cuantificó como una suma de células teñidas positivamente con DCX o VEGF dividida por el número total de células positivas para DAPI expresado en porcentaje.

*Detección de proteína ácida fibrilar glial(GFAP) y S100B en muestras de suero sanguíneo:*

25 Se realizó ELISA para detectar marcadores de daño cerebral proteína S100B (Catálogo # CSB-E08066r, Cusabio Biotech Co., LTD, China), proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Catálogo # E90068Ra, Uscn Life Sciences Inc., China) en muestras de suero sanguíneo de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes.

*Análisis estadístico:*

30 El análisis se realizó utilizando el software StatView (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA, EE.UU.). Las comparaciones estadísticas se realizaron usando ANOVA seguido de PLSD de Fisher, ensayos post-hoc de Scheffe y Bonferroni/Dunn con  $P < 0,05$  consideradas como significativas. Todos los valores se expresan como media  $\pm$  SEM.

**Ejemplo 2: Efecto neuroprotector de estetrol en un modelo de animal de encefalopatía hipóxico-isquémica neonatal**

35 Después del parto, las crías de rata recién nacidas se asignaron a uno de los siguientes 4 grupos: grupo de intervención simulada, grupo Vehículo, grupo 5 mg/kg E4/por día y grupo 50 mg/kg E4/por día. Desde el día 4 hasta el día 7 inclusive, las crías de rata se inyectaron por vía intraperitoneal, ya sea con vehículo (grupo Vehículo) o E4 (5 mg/kg o 50 mg/kg de acuerdo con la asignación del grupo) o no fueron inyectadas en absoluto (grupo de intervención simulada). En el día 7, 30 minutos después de la última inyección, los animales del vehículo y E4 (5 mg/kg o 50 mg/kg) pasaron por cirugía que incluía corte y doble ligadura de la arteria carótida común izquierda, seguido de hipoxia producida por la inhalación de 11% -8% de oxígeno equilibrado por nitrógeno a una concentración disminuida durante 20 minutos, seguido por la inhalación de 8% de oxígeno y 92% de nitrógeno a una concentración constante durante 35 minutos. El grupo de intervención simulada realizó procedimientos similares sin ligadura de la arteria carótida común izquierda e hipoxia. Todas las manipulaciones se realizaron a 37°C. Las crías de rata se recuperaron con sus madres hasta ser sacrificadas en el día 14 postnatal.

45 *Peso de las crías de rata*

Las mediciones de peso de las crías de rata se realizaron desde el día 4 al día 7 para determinar la cantidad de vehículo y E4 necesaria para inyectar, y desde el día 7 hasta el día 14 con el fin de monitorear el bienestar postoperatorio de las crías de rata.

50 En los días postoperatorios 13 y 14 las crías de rata tratadas con 5 mg/kg de E4 tuvieron un peso corporal significativamente más alto que los animales tratados con vehículo, mientras que en otros días postoperatorios el grupo de intervención simulada tuvo un peso corporal significativamente más alto que los otros grupos: días 8 (Intervención simulada frente a Vehículo y 5 mg/kg E4), 10 (Intervención simulada frente a 50 mg/kg E4), 12 (Intervención simulada frente a Vehículo), 13 (Intervención simulada frente a Vehículo) y 14 (Intervención simulada frente a Vehículo) (Fig 1).

55

*Peso cerebral*

La medición del peso de los cerebros reveló que eran significativamente superiores en los grupos E4 5 mg/kg y de intervención simulada que en el grupo tratado con vehículo (Fig. 2).

*Tinción con hematoxilina-eosina (histoquímica):*

- 5 Solo las secciones del grupo tratado con vehículo mostraron una desorganización visible de la región ipsilateral del hipocampo al daño (lado izquierdo), rodeada de áreas de infarto extendidas hasta la región del hipocampo contralateral al daño (lado derecho) (Fig. 3). Estos resultados muestran que E4, en ambas dosis, tiene efecto neuroprotector.

*Recuento de células intactas:*

- 10 En la región DG del hipocampo el número de células intactas por campo visual fue significativamente más alto en los grupos de animales de intervención simulada y 5 mg/kg E4 que en el grupo Vehículo (Fig. 4). El número de células intactas SGZ fue significativamente más alto en el grupo 5 mg/kg E4 solo en comparación con los grupos de intervención simulada y Vehículo, mientras que en CA1 se detectó una diferencia no significativa entre los grupos de estudio. En la región CA2/CA3 del hipocampo el grupo 50 mg/kg E4 solo tuvo un número significativamente más alto  
15 de células intactas que los grupos tratado con Vehículo y 5 mg/kg E4, mientras que en la corteza el grupo 50 mg/kg E4 tuvo un número de células intactas significativamente más alto en comparación con el grupo Vehículo solo. Estos resultados muestran que el estetrol tiene efecto neuroprotector.

**Ejemplo 3: Efecto neuroprotector de estetrol en un modelo de animal de encefalopatía hipóxico-isquémica neonatal**

- 20 Las crías de rata recién nacidas fueron asignadas a uno de los siguientes 6 grupos desde el día 4 postnatal: grupo de intervención simulada (n=24), grupo Vehículo (n=14), grupo 1 mg/kg E4 /por día (n=11), grupo 5 mg/kg E4/por día (n=14), grupo 10 mg/kg E4/por día (n=14), o grupo 50 mg/kg E4 /por día (n=19). Desde el día 4 postnatal, las crías de ratas fueron inyectadas por vía intraperitoneal, ya sea vehículo (grupo Vehículo) o E4 (1, 5, 10 o 50 mg/kg/por día de acuerdo con la asignación del grupo E4) o ni vehículo ni E4 ( grupo de intervención simulada). En el día 7, 30  
25 minutos después de la última inyección, los animales fueron anestesiados con isoflurano (inducción, 3,0%; mantenimiento, 1,5%), y las crías de rata de los grupos Vehículo y E4 pasaron por cirugía que abarcó corte y doble ligadura de la arteria carótida común izquierda. Después del procedimiento, las crías fueron devueltas a sus madres y se les permitió recuperarse durante 1 hora. Las crías fueron colocadas en el gabinete in vivo hipóxico humidificado (CoyLab, Grass Lake, MI, EE.UU.). La hipoxia se produjo por la inhalación de 11%-8% de oxígeno equilibrado por  
30 nitrógeno en una reducción de la concentración de oxígeno durante 20 minutos, seguido de inhalación de 8% de oxígeno y 92% de nitrógeno a una concentración constante durante 35 minutos. Todas las manipulaciones se realizaron a 37°C. El grupo de intervención simulada paso por procedimientos similares sin ligadura de la arteria carótida común, seguido de hipoxia ni inyección. Las crías de rata se recuperaron con sus madres y se crió normalmente hasta ser sacrificadas en el día 14 postnatal.

35 *Temperatura rectal:*

Las temperaturas rectales no fueron significativamente diferentes entre los grupos de estudio, lo que indica que el tratamiento previo con estetrol no afectó la temperatura corporal (datos no mostrados).

*Peso corporal*

- 40 Para controlar el bienestar postoperatorio de las crías de rata debido a las manipulaciones realizadas y el tratamiento previo de estetrol, se controló el peso corporal desde el día 7 postnatal hasta el día 14 inclusive. La Figura 5 muestra que en los días 8 y 13 postnatales las crías de rata tratadas previamente con estetrol y de intervención simulada tenían un peso corporal postoperatorio significativamente más alto que los animales tratados previamente con vehículo. Además, en el día 9 postnatal los animales tratados previamente con 10mg/kg de estetrol y de intervención simulada tenían significativamente mayor peso corporal que el grupo vehículo, mientras que en los días 10, 11 y 12 postnatales simulacro las crías de rata de intervención simulada, tratadas previamente con 1 mg/kg  
45 y 10 mg/kg de estetrol mostraron un peso corporal significativamente más alto que el grupo vehículo. En el día 14 postnatal los animales tratados previamente con 1 mg/kg, 5 mg/kg, y 10 mg/kg de estetrol y de intervención simulada tenían un peso corporal significativamente más alto que el grupo vehículo solo. Sin embargo, en los días 8, 9, 10, 12 postnatales, el peso corporal de los animales de intervención simulada fue significativamente más alto que los  
50 grupos tratados previamente con 5 mg/kg y 50 mg/kg de estetrol, mientras que en los días 11, 13, 14 postnatales los animales de intervención simulada tuvieron un peso corporal significativamente más alto que el grupo tratados previamente con 50 mg/kg de estetrol solo.

*Peso cerebral*

- 55 Para evaluar posible daño cerebral, se realizó la medición de los cerebros de crías de rata. La Figura 6 demuestra que el peso del cerebro fue significativamente más alto en el grupo de intervención simulada (1,225 ± 0,006 g), y los

grupos tratados previamente 1 mg/kg E4 (1,155 ± 0,022 g), 5 mg/kg E4 (1,181 ± 0,023 g), 10 mg/kg E4 (1,179 ± 0,012 g), y 50 mg/kg E4 (1,163 ± 0,016 g) que en el grupo vehículo (1,016 ± 0,042 g).

*Tinción con hematoxilina-eosina y recuento de células intactas:*

5 Las secciones cerebrales de las crías de rata tratadas previamente con vehículo mostraron desorganización visible y daño de la región del hipocampo ipsilateral al daño (lado izquierdo) extendido hasta la corteza (Fig.7 A-C).

En la región DG del hipocampo el número de células intactas por campo visual fue significativamente más alto en animales de intervención simulada (154,5±7,942) (Fig. 7B(a)) y animales inyectados con 5 mg/kg E4 (121,0±8,098) (Fig. 7B(d)) que en el grupo vehículo (84,563±5,954) (Fig. 7B(b)) (Fig. 7D). Además, el número de células intactas SGZ fue significativamente más alto en el grupo de intervención simulada (58,357±3,653) (Fig. 7B(a)), el grupo 5 mg/kg E4 (42,846± 3,884) (Fig. 7B(d)) y el grupo 10 mg/kg E4 (47,6± 4,672) (Fig. 7B(e)) que en el grupo vehículo (23,875±3,363) (Fig. 7B(b)) (Fig. 7D), mientras que en la misma región el grupo de intervención simulada mostró un número significativamente más alto de células intactas que el grupo 1 mg/kg E4 (35,6±2,75) (Fig. 7B(c)) y el grupo 50 mg/kg E4 (30,714±3,615) (Fig. 7B(f)) (Fig. 7D). En la región CA1 se detectó una diferencia significativa entre el grupo de intervención simulada (70,714± 4,819) (Fig. 7B(a)), y los grupos 1 mg/kg E4 (43,2± 2,435) (Fig. 7B(c)) y 10 mg/kg E4 (57,4±4,566) (Fig. 7B(e)), mientras que otros grupos no mostraron diferencia significativa (Fig. 7D). En la región CA2/CA3 del hipocampo los grupos de intervención simulada (56,929±4,859) (Fig. 7B(a)) y 50 mg/kg E4 (53,0±4,7) (Fig. 7B(f)) tuvieron un número significativamente más alto de células intactas que el grupo vehículo (29± 3,543) (Fig. 7B(b)), mientras que el grupo de intervención simulada solo tuvo un número significativamente más alto de células intactas que el grupo 1 mg/kg E4 (32,8±2,808) (Fig. 7B(c)) (Fig. 7D). En la corteza el grupo 50 mg/kg E4 (76,286±3,962) (Fig. 7C(f)) mostró un número significativamente más alto de células intactas que el grupo vehículo solo (51,938± 5,304) (Fig. 7C(b)) (Fig. 7D).

*Tinción con MAP2:*

25 La pérdida de la tinción con MAP2 ipsilateral como se determinó después de hipoxia-isquemia (HI) en el día 14 postnatal se usó como un marcador de la pérdida temprana de área de materia gris. El área con neuronas intactas mostró tinción con MAP2, mientras que el área infartada mostró una pérdida de tinción de MAP2. En particular, en el grupo vehículo hubo una pérdida de la tinción con MAP2 en el área del hipocampo del hemisferio ipsilateral al hemisferio con daño extendido hasta la corteza (Fig. 8A (b)). La cuantificación de la relación de las áreas positivas para MAP2 revelaron que después del tratamiento previo con estetrol (Fig. 8B) la relación de área positiva de MAP2 fue significativamente más alta en los animales de intervención simulada (por defecto 1,0) (Fig. 8A(a)), y grupos tratados previamente con estetrol (1 mg/kg E4 (0,929±0,019) (Fig. 8A(c)), E45 mg/kg (0,889±0,063) (Fig. 8A(d)), 10 mg/kg E4 (0,898±0,022) (Fig. 8A(e)), E4 50mg/kg (0,922±0,031) (Fig. 8A(f))) que en el grupo vehículo (0,675±0,046) (Fig. 8A(b)).

*Tinción doble del factor de crecimiento endotelial vascular doblecortina:*

35 La expresión de DCX y VEGF en el día 14 postnatal se utilizó como marcador de neurogénesis y vasculogénesis, respectivamente. El tratamiento previo con estetrol resultó en la región DG del hipocampo en un porcentaje significativamente mayor de células teñidas positivamente con DCX en animales tratados previamente con 10 mg/kg de E4 (55,8 ± 5,658%) que en el grupo vehículo (32,833 ± 2,625%) ( Fig 9A), mientras que en la misma región el porcentaje de células teñidas positivamente con VEGF fue significativamente más alto en el grupo tratado previamente con 1 mg/kg de E4 (43,5±2,083%), 5 mg/kg de E4 (46,0±4,361%), 10 mg/kg de E4 (47,0± 5,362%), y 50 mg/kg de E4 (46,0±4,465%) que en el grupo vehículo (25,333±2,271%) (Fig. 9B). Además, en la región CA1 el porcentaje de células teñidas positivamente con DCX fue significativamente más alto en los grupos 5 mg/kg E4 (35,2± 3,309%), y 10 mg/kg E4 (34,1± 6,664%) que en el grupo vehículo (11± 1,518%) (Fig. 9A), mientras que el porcentaje de células teñidas positivamente con VEGF fue significativamente más alto en el grupo 10 mg/kg E4 (37,4± 7,645%) solo (Fig. 9B). En la región CA2/CA3 el porcentaje de células teñidas positivamente con DCX fue significativamente más alto en el grupo 5 mg/kg E4 (30,3± 3,7%) que en el grupo vehículo (6,417± 1,033%), mientras que el porcentaje de células teñidas positivamente con VEGF alcanzó una diferencia significativa solamente en el grupo 1 mg/kg E4 (34,1± 6,855%) (Fig. 9B). En la corteza el porcentaje de células teñidas positivamente con DCX y VEGF fue significativamente más alto en el grupo 10 mg/kg E4 (52,1±7,762% y 46,2± 7,646%, respectivamente) que en el grupo vehículo solo (26,0±4,156% y 20,5±2,414%, respectivamente) (Fig. 9A-B, respectivamente).

50 *Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP) y S100B en suero sanguíneo:*

La proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y S100B se usaron como marcadores de daño cerebral. Su concentración se midió en suero sanguíneo mediante ELISA para proteínas S100B y GFAP. Como se muestra en la figura 10A, después del tratamiento previo con estetrol la concentración de S100B fue significativamente menor en animales de intervención simulada (344,614 ± 50,328 pg/ml), y el grupo 50 mg/kg E4 (361 ± 32,914 pg/ml) que en los animales tratado previamente con vehículo (698,925 ± 57,342 pg/ml), aunque en el grupo 10 mg/kg E4 la concentración de S100B fue significativamente mayor que en los grupos de intervención simulada, 5 mg/kg E4 y 50 mg/kg E4.

La Figura 10B muestra que se observó una concentración significativamente disminuida de GFAP en animales de intervención simulada (407,567 ± 49,258 pg/ml), y los animales tratados previamente con 50 mg/kg de E4 (300,388 ±

31,232 pg/ml) que en el grupo vehículo (1003,926 ± 288,345 pg/ml).

**Conclusión:**

Los presentes resultados demuestran que el estetrol tiene un efecto neuroprotector dependiente de la dosis en la formación del hipocampo y la corteza en un modelo animal de HIE. También de acuerdo con los resultados actuales, el tratamiento previo con estetrol disminuye la pérdida temprana de materia gris y promueve la neurogénesis y vasculogénesis. Además, el tratamiento previo con estetrol no tiene efectos adversos sobre el peso corporal, peso cerebral o la temperatura corporal.

**Ejemplo 4: Efecto terapéutico del estetrol en un modelo animal de encefalopatía hipóxico-isquémica neonatal**

Para estudiar el efecto terapéutico del estetrol, los crías de rata recién nacidas se asignaron a uno de los siguientes 6 grupos en el día 7 postnatal: grupo de intervención simulada (n = 29), grupo vehículo (n = 20), grupo 1 mg/kg E4 (n = 16), grupo 5 mg/kg E4 (n = 19), grupo 10 mg/kg día E4 (n = 17) y grupo 50 mg/kg día E4 (n = 15). En el día 7 postnatal se anestesiaron los animales con isoflurano (inducción, 3,0%; mantenimiento, 1,5%), y los crías de rata del vehículo y grupos E4 pasaron por cirugía que abarcó el corte y ligadura de la arteria carótida común izquierda. Después de la cirugía, las crías fueron devueltas a sus madres y se les permitió recuperarse durante 1 hora. Las crías fueron colocadas en un gabinete in vivo hipóxico humidificado (CoyLab). La hipoxia se produjo por la inhalación de 11%-8% de oxígeno equilibrado por nitrógeno en una reducción de la concentración de oxígeno durante 20 minutos, seguido de la inhalación de 8% de oxígeno y 92% de nitrógeno a una concentración constante durante 35 minutos. Todas las manipulaciones se realizaron a 37°C.

Al recuperarse de la cámara de hipoxia, los crías de rata se inyectaron por vía intraperitoneal, ya sea por vehículo (grupo vehículo) o por E4 (1 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg o 50 mg/kg) de acuerdo con la asignación grupal. Los animales del grupo de intervención simulada pasaron por procedimientos similares, pero no procedieron ni al corte y ligadura de la arteria carótida común izquierda seguido por hipoxia ni a la administración de vehículo o estetrol. Las crías de rata se recuperaron con sus madres hasta ser sacrificadas en el día 14 postnatal.

**Temperatura rectal:**

Las temperaturas rectales no fueron significativamente diferentes entre los grupos de estudio, lo que indica que el tratamiento con estetrol no afectó la temperatura corporal (datos no mostrados).

**Peso corporal**

Para evaluar el bienestar postoperatorio de los crías de rata debido a las manipulaciones realizadas y el tratamiento con estetrol, se midió el peso corporal postoperatorio en los días 7 y 14 postnatales. La Figura 11 muestra que en el día 14 postnatal los animales de intervención simulada, y los animales de los grupos 1 mg/kg E4, 5 mg/kg E4, 10 mg/kg E4 y 50 mg/kg E4 tuvieron un peso corporal significativamente más alto que el grupo vehículo. Los animales de intervención simulada mostraron un peso corporal significativamente más alto que el grupo tratado con 5 mg/kg de E4.

**Peso cerebral**

La Figura 12 demuestra que el peso cerebral fue significativamente más alto en animales de intervención simulada (1,214±0,007 g), y los grupos 1 mg/kg E4 (1,099±0,037 g), 5 mg/kg E4 (1,06±0,035 g), 10 mg/kg E4 (1,12±0,33 g), y 50 mg/kg E4 (1,163±0,025 g) que en el grupo vehículo (0,937±0,022 g). Los animales de intervención simulada mostraron peso cerebral significativamente mayor que el grupo 5 mg/kg E4. Este patrón de resultados es el mismo que en el ejemplo 3.

**Tinción con hematoxilina-eosina y recuento de células intactas:**

En las regiones DG y SGZ del hipocampo el número de células intactas por campo visual fue significativamente más alto en animales de intervención simulada (Fig. 13B(a)) que en los animales del grupo vehículo (Fig. 13B(b)) (160,8±7,074 frente a 88,2±19,477, y 60,8±4,635 frente a 28,3±6,73, respectivamente) (Fig. 13D). En la región CA1, el número de células intactas fue significativamente más alto en el grupo de intervención simulada (69,4± 5,256) (Fig. 13B(a)) y el grupo 1 mg/kg E4 (51,5± 2,5) (Fig. 13B(c)) que en el grupo vehículo (28,4± 6,997) (Fig. 13B(b)), y en el grupo de intervención simulada que en el grupo 5 mg/kg E4 (45,3±2,989) (Fig. 13B(d)), el grupo 10 mg/kg E4 (46,0±3,19) (Fig. 13B(e)), y el grupo 50 mg/kg E4 (46,6±5,336) (Fig. 13B(f)) (Fig. 13D). En la región CA2/CA3 del hipocampo, los animales de intervención simulada (57,1± 6,192) (Fig. 13B(a)) y animales tratados con 10 mg/kg de E4 (35,2± 3,169) (Fig. 13B(e)) tuvieron un número significativamente más alto de células intactas que el grupo vehículo (13,8±3,018), mientras que el grupo de intervención simulada tuvo un número significativamente más alto de células intactas que los grupos 1 mg/kg E4 (33,9±4,306), 5 mg/kg E4 (33,8±4,704), 10 mg/kg E4 (35,2±3,169), y 50 mg/kg E4 (30,5±2,527) (Fig. 13D). En la corteza animales de intervención simulada (70,1± 6,165) (Fig. 13C(a)) y animales tratados con 5 mg/kg E4 (57,1± 7,012) (Fig. 13C(d)), 10 mg/kg E4 (56,9± 5,958) (Fig. 13C(e)) y 50 mg/kg E4 (54,5± 3,403) (Fig. 13C(f)) mostraron número de células intactas significativamente superior que el grupo

vehículo (23,2±3,872) (Fig. 13C(b)), mientras que el grupo de intervención simulada tuvo un número significativamente más alto de células intactas que el grupo 1 mg/kg E4 (42,4±4,865) (Fig. 13C(c)) (Fig. 13D).

*Tinción con MAP2:*

5 Se observó el mismo patrón de tinción con MAP2 que en el ejemplo 3. La cuantificación de la relación de las áreas positivas para MAP2 (Fig. 14B) reveló que la relación de área positiva de MAP2 fue significativamente más alta en animales de intervención simulada (por defecto 1,0) (Fig. 14A(a)), y grupos tratados con estetrol (1 mg/kg E4 (0,943±0,028) (Fig. 14A(c)), 5 mg/kg E4 0,89±0,037 (Fig. 14A(d)), 10 mg/kg E4 (0,938±0,044) (Fig. 14A(e)), 50 mg/kg E4 (0,966±0,036) (Fig. 14A(f))) que en el grupo vehículo (0,656±0,091) (Fig. 14A(b)).

*Tinción doble con factor de crecimiento endotelial vascular – doblecortina:*

10 En la región DG del hipocampo ni la tinción con DCX ni la tinción con VEGF fue significativamente diferente entre los grupos de estudio (Fig. 15). En la región CA1, el porcentaje de células teñidas positivamente con DCX fue significativamente más alto en el grupo 10 mg/kg E4 (37,1± 3,84) y grupos 50 mg/kg E4 (37,3± 4,784%) que en el grupo vehículo (12,8±2,947%) (Fig.15 A), mientras que el porcentaje de células teñidas positivamente con VEGF fue significativamente más alto en el grupo 5 mg/kg E4 (37,4±4,833%), el grupo 10 mg/kg E4 (37,1±3,84%), y el grupo 15 50 mg/kg E4 (45,1±4,753%) que en los animales tratados con vehículo (15,7± 4,924%) (Fig. 15B). En la región CA2/CA3 el porcentaje de células teñidas positivamente con DCX fue significativamente más alto en el grupo 10 mg/kg E4 (42,5±5,986%) que en los animales tratados con vehículos (10,4± 2,868%) (Fig. 15A), mientras que el porcentaje de células teñidas positivamente con VEGF no fue significativamente diferente entre los grupos de estudio (Fig. 15B). En la corteza el porcentaje de células teñidas positivamente con DCX fue significativamente más alto en el grupo 5 mg/kg E4 (45,2±3,339%), el grupo 10 mg/kg E4 (49,4±4,949%), y el grupo 50 mg/kg E4 (49,6± 20 3,11%) que en el grupo vehículo (23,3±4,74%) (Fig. 15A), mientras que el porcentaje de células teñidas positivamente con VEGF fue significativamente inferior en animales de intervención simulada (24,6±3,7%) que en el grupo tratado 10 mg/kg E4 (49,4±4,949%) (Fig. 15B).

*Suero sanguíneo S100B y proteína ácida fibrilar glial (GFAP):*

25 Como se muestra en la Figura 16, se observa una expresión significativamente menor de proteínas S100B y GFAP en animales de intervención simulada y animales tratados con estetrol que en animales del grupo vehículo.

*Conclusión:*

30 Los presentes resultados demuestran que el estetrol tiene un efecto terapéutico dependiente de la dosis en la formación del hipocampo y la corteza en un modelo animal de HIE. También de acuerdo con los resultados actuales, el tratamiento con estetrol disminuye la pérdida temprana de materia gris y promueve la neurogénesis y vasculogénesis. Además, el tratamiento con estetrol no tiene efectos adversos sobre el peso corporal, el peso cerebral o la temperatura corporal.

**Ejemplo 5: Efecto terapéutico del estetrol en recién nacidos después de asfixia perinatal o neonatal**

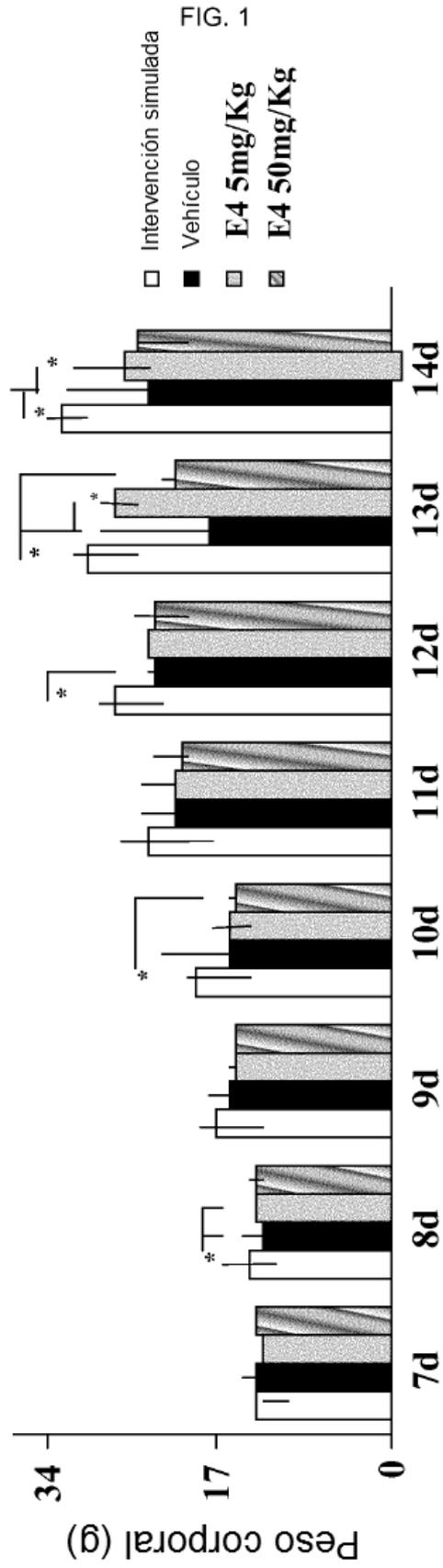
35 Los recién nacidos que han sufrido asfixia de nacimiento y que presentan al menos uno de los siguientes síntomas: disminución de la conciencia y acidosis (pH <7,00 o déficit básico > 12), puntaje de Apgar de 10 minutos ≤ 5 o reanimación continua a los 10 minutos, son tratados con estetrol.

Estetrol se administra por vía intravenosa en una sola inyección o por infusión dentro de las 6 horas posteriores al nacimiento a una dosis de 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal. Las dosis pueden repetirse.

40 Opcionalmente, los recién nacidos pueden experimentar simultáneamente hipotermia durante 72 horas comenzando dentro de las 6 horas del parto.

**REIVINDICACIONES**

1. 1,3,5(10)-estratrien-3,15 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -tetrol (Estetrol) para su uso en el tratamiento de lesión cerebral en la región del hipocampo.
- 5 2. El Estetrol para su uso de acuerdo a la reivindicación 1, en donde el tratamiento de la lesión cerebral es terapéutico.
3. El Estetrol para su uso de acuerdo a las reivindicaciones 1 o 2, en donde la lesión cerebral se selecciona del grupo que comprende lesión cerebral hipóxica, lesión cerebral anóxica, lesión cerebral traumática.
4. El Estetrol para su uso de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en el tratamiento de encefalopatía hipóxico-isquémica (HIE).
- 10 5. El Estetrol para su uso de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 8, para su uso en el tratamiento de encefalopatía hipóxico-isquémica neonatal (HIE).



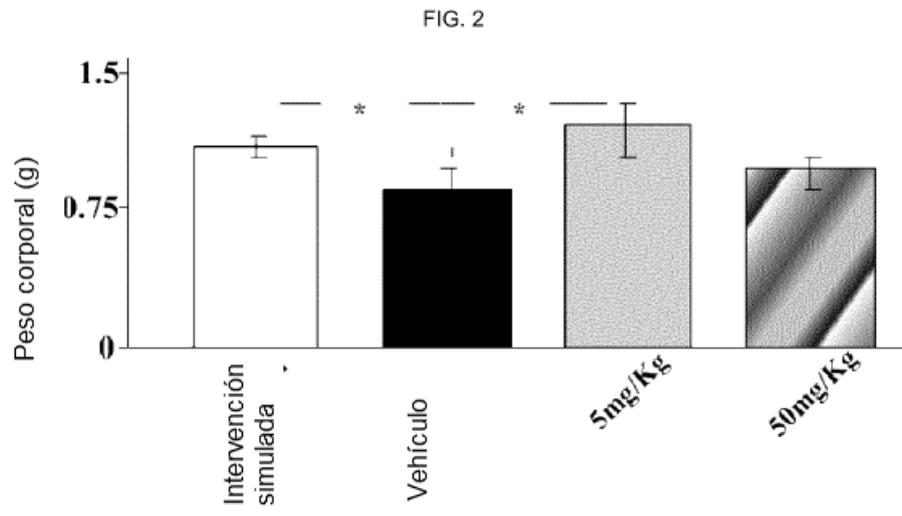
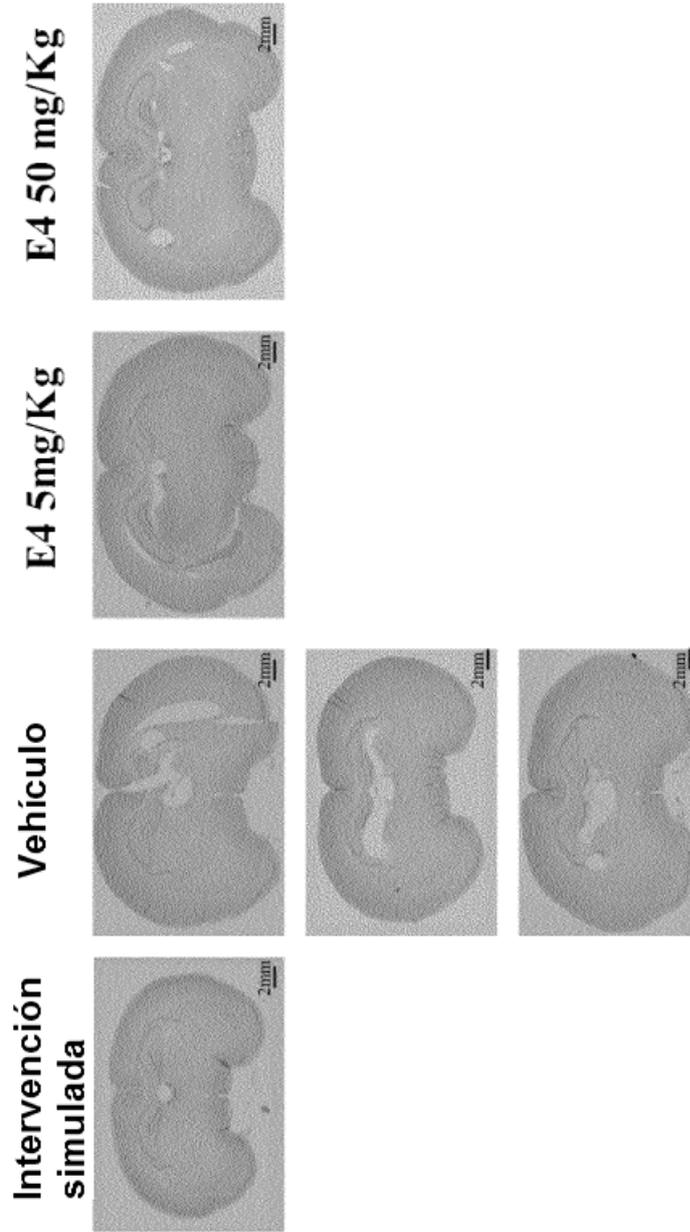


FIG. 3



- Intervención simulada
- Vehículo
- ▤ E4 5mg/Kg
- ▥ E4 50mg/Kg

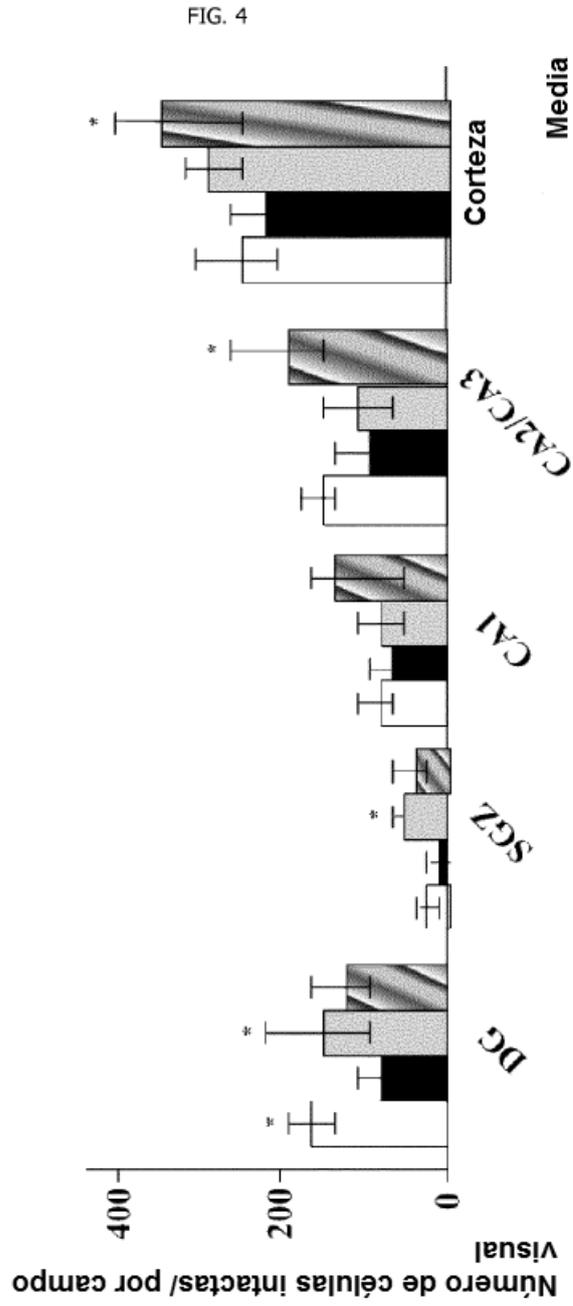


FIG. 5

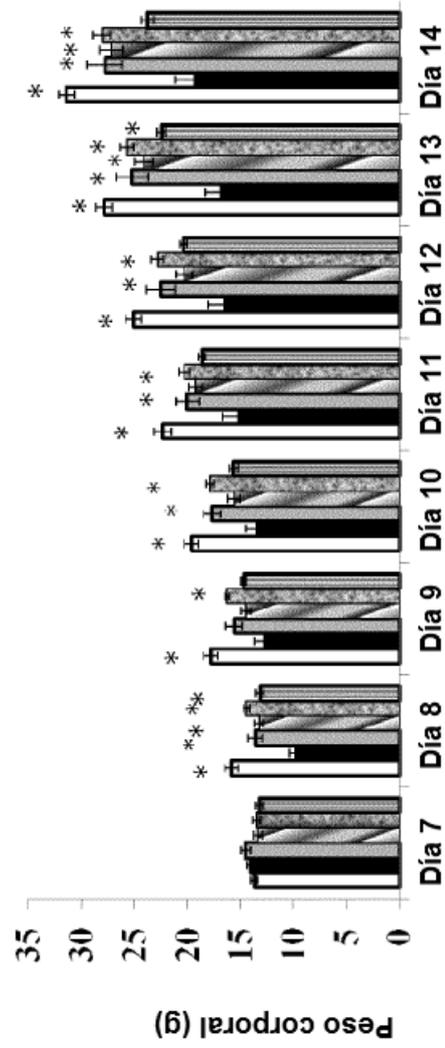


FIG. 6

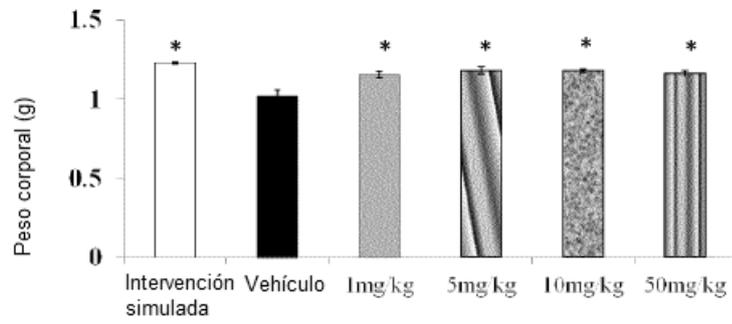


FIG.7

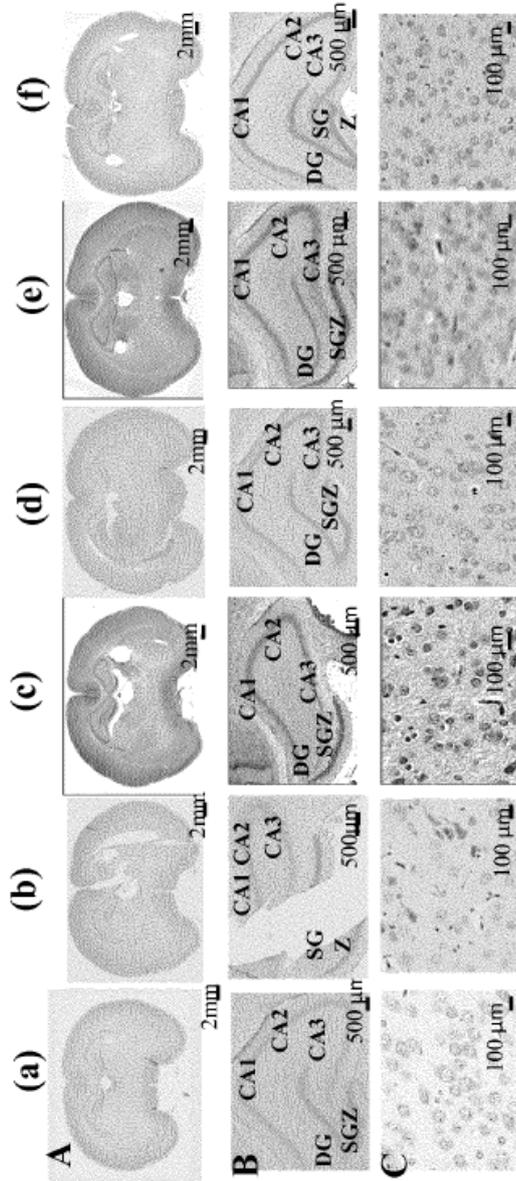


FIG.7

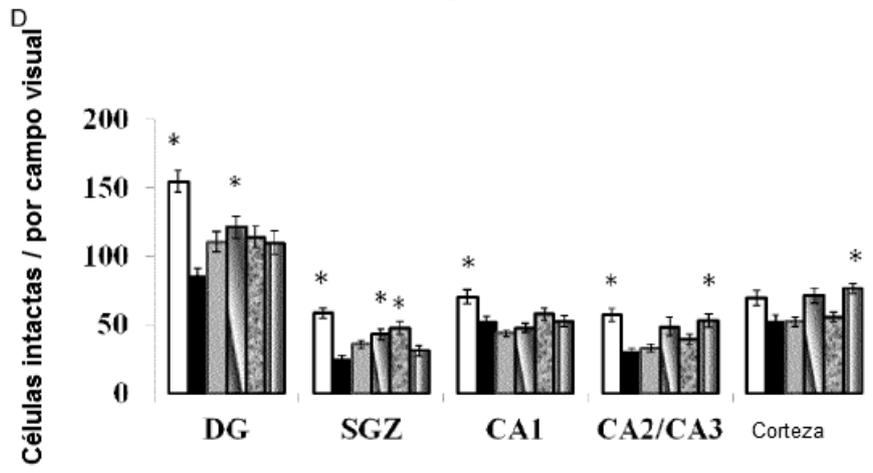


FIG.8

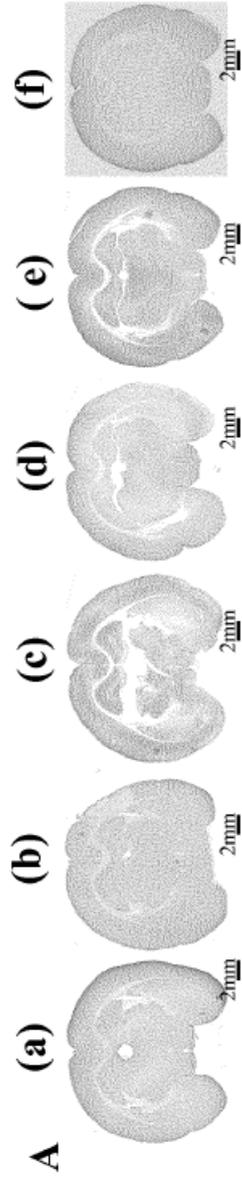


FIG. 8

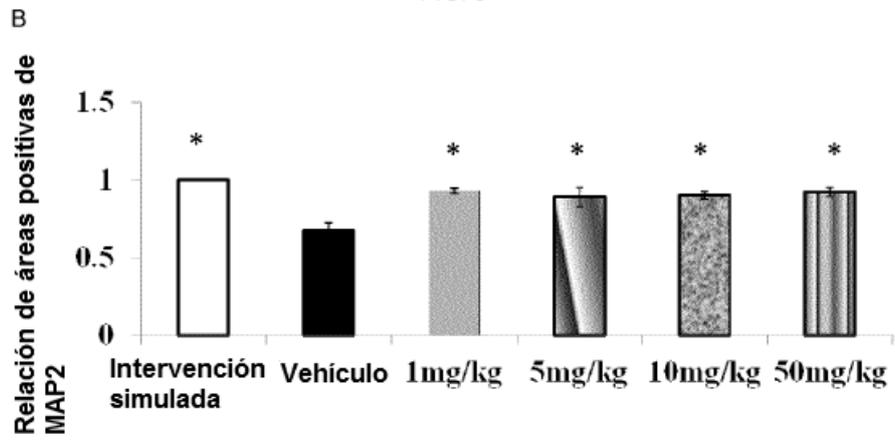
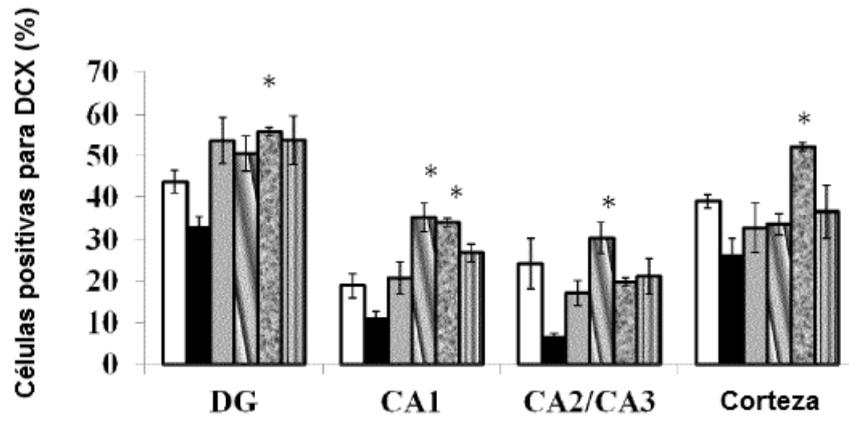


FIG. 9

A



B

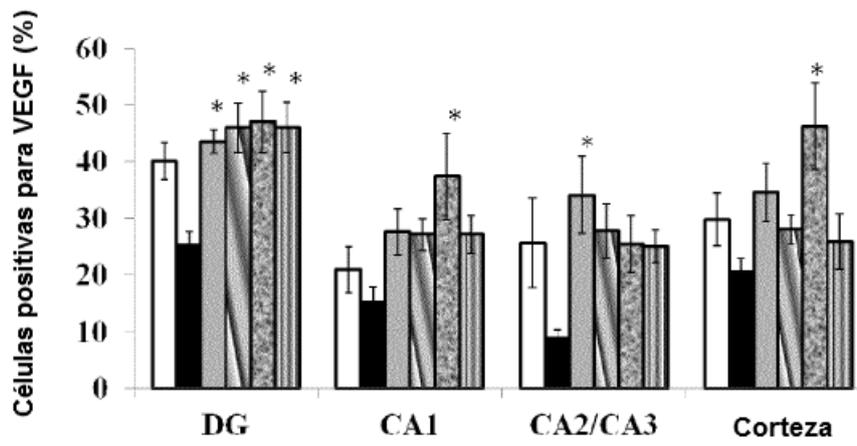
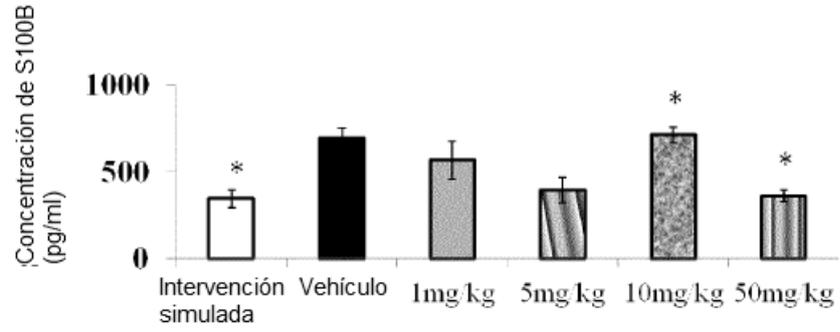


FIG. 10

A



B

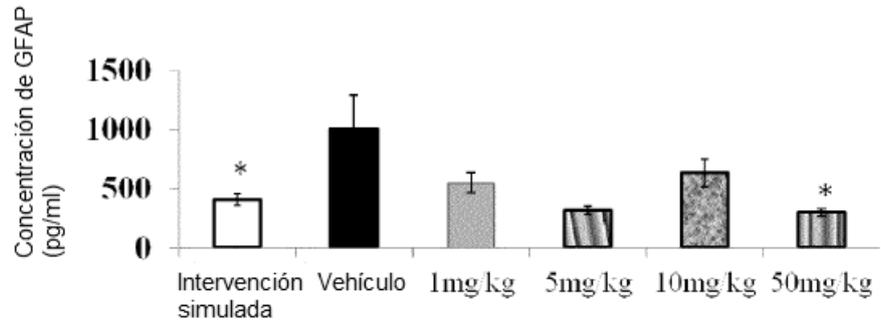


FIG. 11

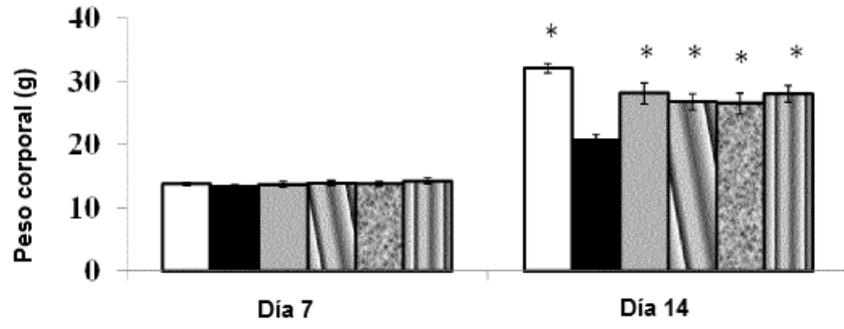
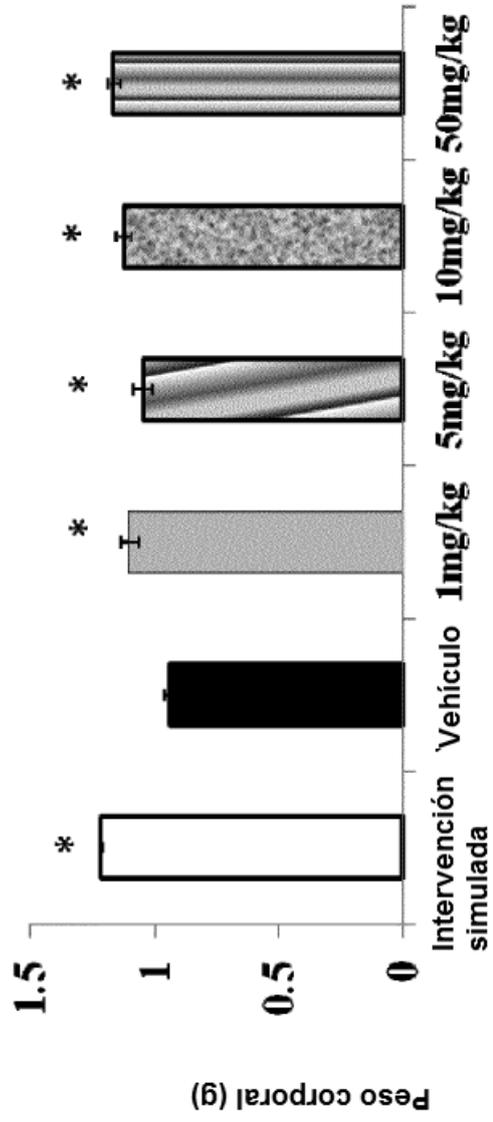


FIG. 12



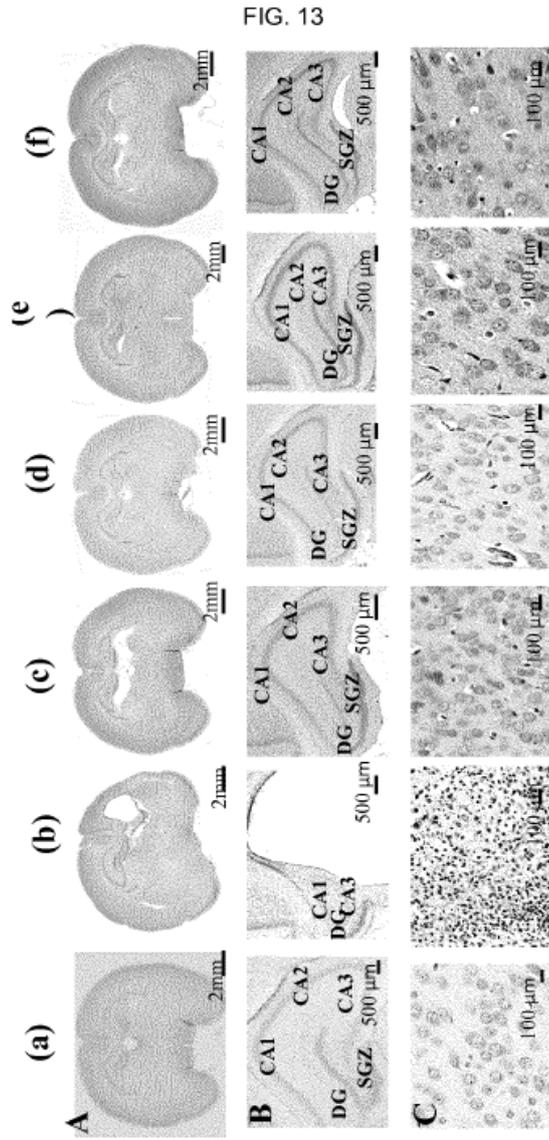
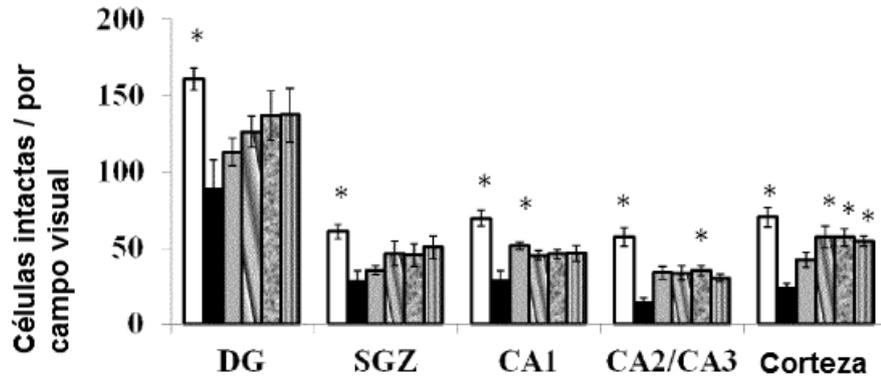
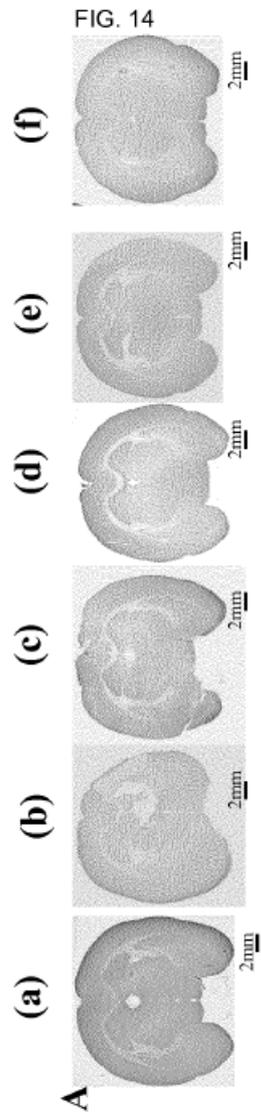


FIG. 13

D





B

FIG. 14

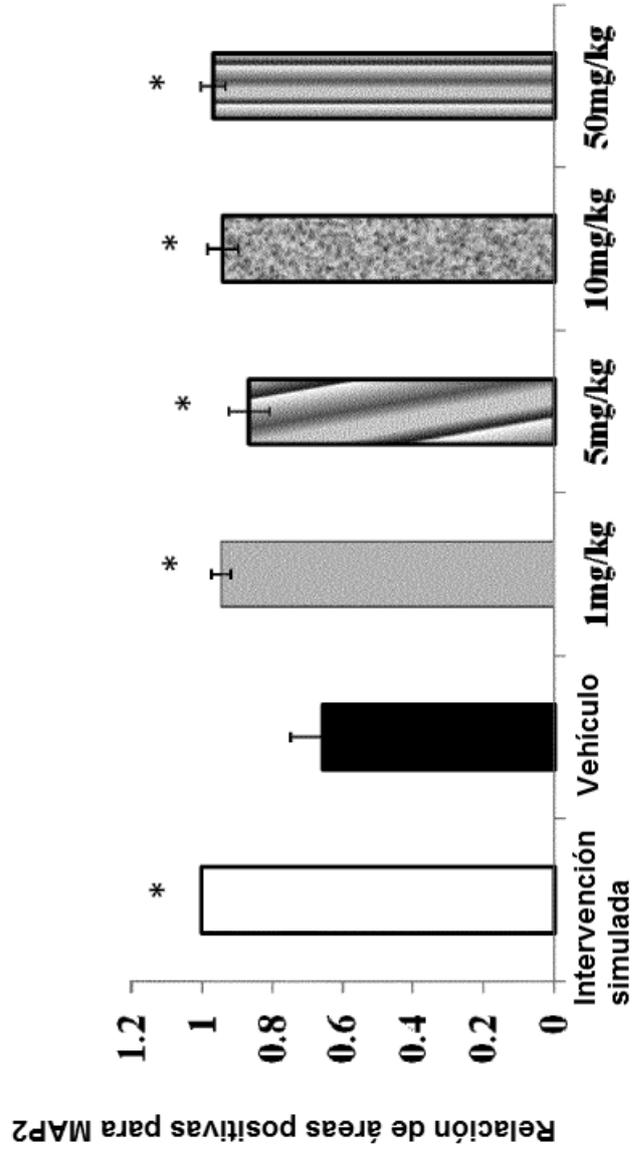
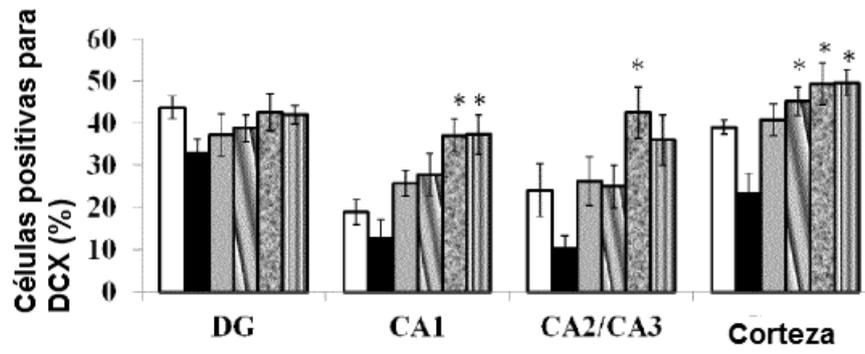


FIG. 15

A



B

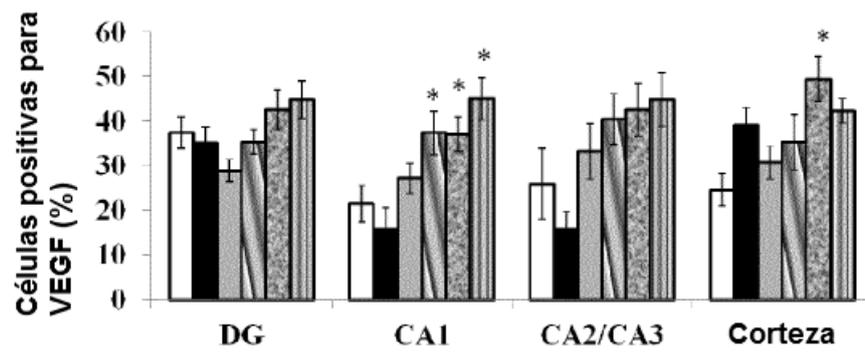
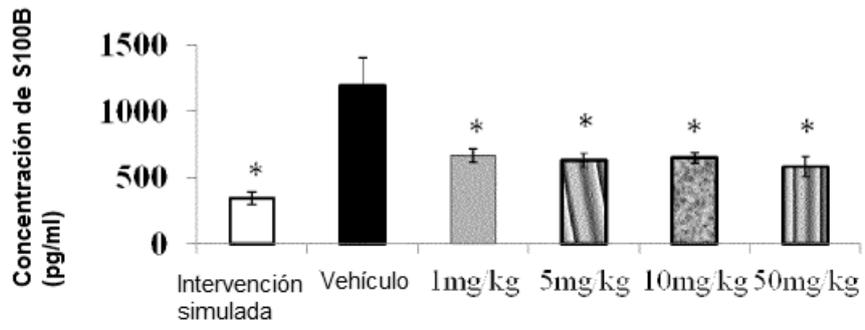


FIG. 16

A



B

