



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 279 946**

51 Int. Cl.:
C07J 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03721508 .4**

86 Fecha de presentación : **01.04.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1490392**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **29.12.2004**

54 Título: **Quinoles esteroideos como profármacos de antioxidantes.**

30 Prioridad: **01.04.2002 US 369589 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.09.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.09.2007

73 Titular/es:
**University of Florida Research Foundation, Inc.
223 Grinter Hall
Gainesville, Florida 32611, US**

72 Inventor/es: **Prokai, Laszlo;
Prokai, Katalin y
Simpkins, James**

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 279 946 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

Quinoles esteroideos como profármacos de antioxidantes.

5 **Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a profármacos para tratamiento antioxidante. En particular, la presente invención se refiere a quinoles esteroides relacionados con estrógeno y su uso como profármacos para estrógenos de anillo A fenólico y análogos de estrógeno.

10 Las células de los mamíferos están continuamente expuestas a especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como peróxido de lípidos, oxoperoxinitrato, superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($OH\cdot$), y oxígeno singlete (1O_2). *In vivo*, las células generan estos intermediarios reactivos de oxígeno en respuesta al metabolismo aeróbico, catabolismo de fármacos y otros xenobióticos, radiación ultravioleta y de rayos x, y en respuesta a
15 la explosión respiratoria de las células fagocíticas (tales como leucocitos sanguíneos) para matar bacterias invasoras tales como aquellas introducidas a través de heridas. El peróxido de hidrógeno, por ejemplo, se produce durante la respiración de la mayoría de los organismos vivientes especialmente por parte de las células dañadas y sometidas a estrés.

20 Cuando las ROS están presentes en exceso pueden ser dañinas para las células. Si el equilibrio celular del nivel de especies oxidativas (es decir, especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno) no se restablece, se provocan varios procesos patológicos, que incluyen daño del ADN, peroxidación de lípidos, pérdida de la homeostasis intracelular de calcio, y alteración en las señales celulares y vías metabólicas. El estrés oxidativo causa daño celular, que da como resultado la alteración del estado redox (es decir, depleción de coenzimas de nucleótidos y trastornos
25 de las enzimas que contienen sulfhidrilo), y saturación y destrucción de la defensa antioxidante y del sistema de reparación de ADN.

Por ejemplo, el exceso de peróxido de hidrógeno puede reaccionar con ADN causando ruptura del esqueleto, produciendo mutaciones y alterando y liberando bases. Tal daño bioquímico oxidativo puede dar como resultado
30 la pérdida de integridad de la membrana celular, disminución de la actividad enzimática, cambios en la cinética de transporte, cambios en el contenido lipídico de membrana y pérdida de iones potasio, aminoácidos y otro material celular.

Otro ejemplo de la capacidad de las ROS para dañar células es la peroxidación de lípidos, que incluye la degradación oxidativa de lípidos insaturados. La peroxidación de lípidos es altamente dañina para la estructura y función de
35 membrana y puede causar numerosos efectos citopatológicos. Los investigadores proponen que la aterosclerosis y sus mortales efectos de ataque cardíaco e ictus se desarrollan en relación con la modificación de oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) que transportan colesterol en la sangre. Se ha sugerido la hipótesis de que los radicales libres generados por las propias células inmunes del cuerpo oxidan las LDL, que son captadas por las células de la capa
40 íntima vascular iniciando la lesión aterosclerótica.

Por ello, se ha asociado al estrés oxidativo con una diversidad de enfermedades y trastornos, que incluyen envejecimiento y muerte de células neuronales (Jenner, P., "Oxidative damage in neurodegenerative disease", *Lancet*, 344, 796-798 (1994)). Por ejemplo, el estrés oxidativo está asociado con la patología de numerosas enfermedades y afecciones
45 neurodegenerativas que incluyen, pero no se limitan a la enfermedad de Alzheimer, neuropatía periférica diabética, esclerosis múltiple, esclerosis amiotrófica lateral, enfermedad de Huntington y enfermedad de Parkinson.

El cerebro es un órgano especializado que concentra metales necesarios para las funciones neurológicas normales. Sin embargo, se sabe que el trauma, la isquemia y muchas otras agresiones de origen neuropatológico liberan iones
50 metálicos unidos a proteínas tales como el hierro de las células dañadas. La liberación de iones metálicos aumenta el estrés oxidativo en el sistema nervioso central (SNC) al promover la generación de ROS.

Se ha demostrado que los antioxidantes inhiben el daño asociado con ROS. Por ejemplo, se ha publicado que el piruvato y otros alfacetoácidos reaccionan rápidamente y de manera estequiométrica con peróxido de hidrógeno para
55 proteger a las células de los efectos citolíticos (O'Donnell-Tormey y col., "Secretion of pyruvate. An antioxidant defense of mammalian cells", *J Exp. Med.*, 165, 500-514 (1987)). Se ha observado que el selegiline, que puede actuar como un antioxidante dado que inhibe la desaminación oxidativa, retarda el establecimiento de la enfermedad de Parkinson (Youdim, M. B. H., y Riederer, P., "Understanding Parkinson's disease", *Scientific American*, 276, 52-59 (1997)). Se ha demostrado que el tratamiento antioxidante retrasa la velocidad del deterioro motor de manera temprana en el curso de la enfermedad de Huntington (Peyser C. E., y col., "Trial of d-alpha-tocopherol in Huntington's
60 disease", *Am J. Psychiatry*, 152, 1771-1775 (1995)). El PROBUCOL (4,4'-[(1-metiletilideno)bis(tio)]bis[2,6-bis(1,1-dimetiletil)] (Lorelco, Marion Merrell Dow), un antioxidante, es eficaz reduciendo la tasa de reestenosis tras la angioplastia coronaria con balón (Tardif, J. C. y col., "Probuco and multivitamins in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. Multivitamins and Probuco Study Group", *New Engl. J. Med.* 337, 365-372 (1997)).
65

Desafortunadamente, muchos antioxidantes son liposolubles y su uso está restringido por la baja solubilidad en agua. Aquellos antioxidantes solubles en agua y con un uso menos restringido, tales como la vitamina C, pueden actuar como un prooxidante, es decir, un promotor de la oxidación en presencia de un ión metálico, y tienen el

inconveniente de promover la peroxidación de lípidos bajo ciertas condiciones. El ácido úrico también es soluble en agua, pero cuando se acumula *in vivo*, puede generar efectos secundarios indeseables tales como gota o cálculos renales. PROBUCOL ha demostrado tener baja biodisponibilidad.

5 Los estrógenos han sido reconocidos como antioxidantes y potentes agentes neuroprotectores. Se cree que su acción antioxidante se debe a su capacidad para barrer radicales libres que causan muerte celular neuronal. Los estrógenos, como el altamente potente antioxidante endógeno vitamina E (α -Tocoferol), tienen un resto fenólico considerado una característica fundamental para lograr la protección contra el estrés oxidativo. Sin embargo, hay estudios que llegaron a la conclusión de que la potencia del estrógeno estradiol como antioxidante fenólico para inhibir la peroxidación
10 de lípidos inducida por hierro es mayor que la de la vitamina E a pesar de las concentraciones totales extremadamente más bajas de estrógenos comparadas con las de vitamina E. Además, la energía de disociación del enlace -OH (BDE) del estradiol es mayor que la de la vitamina E, lo que podría implicar que la vitamina E es un desactivador de oxirradicales más fuerte que el estrógeno. La potencia antioxidante se determina generalmente no sólo por la reactividad química hacia ROS, sino también por la movilidad y/o distribución de la molécula en el microambiente y el destino de los radicales derivados de antioxidante (es decir, la dinámica de la acción antioxidante). Por consiguiente, los estrógenos lipófilos pueden actuar *in vivo* como antioxidantes altamente localizados a pesar de sus bajos niveles de carga
15 debido a la afinidad de unión a membrana y altas concentraciones cerca del sitio de actividad.

El tratamiento de reemplazo de estrógenos (ERT) ha sido asociado con numerosos beneficios para la salud, que incluyen el alivio de los síntomas de la menopausia, protección ósea y cardiovascular, reducción de incidencia de enfermedad de Alzheimer, y mejora en las funciones cognitivas, enfermedad de Parkinson, y resolución de ictus.

Estas diversas actividades de los estrógenos pueden estar relacionadas con sus efectos citoprotectores y capacidad antioxidante. Los efectos neuroprotectores de los estrógenos contra numerosas agresiones tóxicas que incluyen el estrés oxidativo han sido extensamente investigados *in vivo* e *in vitro* en varios tipos de células neuronales. Existe una evidencia creciente de que los estrógenos ejercen su efecto neuroprotector contra el estrés oxidativo suprimiendo el estímulo neurotóxico por medio de su actividad directa en el barrido de radicales.

Los estrógenos se degradan en el tracto intestinal y se metabolizan rápidamente en el hígado. Específicamente, los estrógenos sufren recirculación enterohepática vía conjugación de sulfato y glucurónido en el hígado, secreción biliar de los conjugados en el intestino, e hidrólisis intestinal seguida por reabsorción. La concentración de estrógenos encontrada por el hígado es generalmente cuatro a cinco veces mayor que los niveles de estrógeno en sangre periférica (el "efecto de primer paso"). La administración de estrógenos orales presenta altos niveles al hígado y puede llevar a un aumento indeseable en la producción de ciertos factores de coagulación y sustratos de renina por parte del hígado.
30 Sin embargo, existe una necesidad de agentes terapéuticos farmacéuticamente eficaces en aquellas regiones donde se los necesita.

Se ha demostrado que altas dosis de estrógeno lograron un efecto antioxidante *in vitro*. Se ha demostrado que el estrógeno biológicamente más activo, 17β -estradiol, es un potente antioxidante y tiene actividad neuroprotectora; sin embargo, el mecanismo de acción aún no está aclarado. Tales dosis, aunque eficaces en células *in vivo*, podrían haber limitado la utilidad en el tratamiento de afecciones asociadas con el estrés oxidativo debido a problemas asociados con toxicidad, aumento de la incidencia de algunas formas de cáncer, y efectos feminizantes en varones. Por ello, la utilidad de tal procedimiento de tratamiento es muy limitada.

Numazawa y col. (Oxygenation of 2,4-Dibromoestrogens with Nitric Acid: A New Synthesis of 19-Nor Steroids, Chem Pharm Bull, Vol. 37; (8) 1989, pág. 2058-2062) describen procedimientos para sintetizar 19-nor esteroides a partir de 2,4-dibromoestrógenos. De acuerdo con Numazawa y col., 4-bromo- $10\beta,17\beta$ -dihidroxi-1,4-estradien-3-ona (7a) es un subproducto obtenido cuando se hidrodesebroma 2,4-dibromo- 10β -acetoxi-1,4-estradien-3,17-diona (2b) usando ácido fórmico, paladio en carbón vegetal, y trietilamina (ver pág. 2059, 1° columna). Numazawa y col. describen brevemente al pasar que no está claro por qué 7a se sintetiza a partir de 2b cuando se usa ácido fórmico; aparte de eso, no hay más análisis con respecto a 7a porque aparentemente los 19-nor esteroides no pueden producirse a partir de 7a. Numazawa y col. no describen el uso de 7a como un profármaco para la administración de compuestos de estrógenos biológicamente activos para capturar especies reactivas de oxígeno de radicales libres.

Galdecki y col. (Structure of 2,4-Dibromo-10beta, 17beta-dihidroxi-1,4-estradien-3-one, Acta Cryst, Vol. c43, 1987, pág. 967-968) describen procedimientos para síntesis de 2,4-dibromo- $10\beta,17\beta$ -dihidroxi-1,4-estradien-3-one (compuesto I) así como características estructurales específicas del compuesto I. Como se indicó anteriormente, la reivindicación 1 no nombra la sustitución de Y o Z con un halógeno. Galdecki y col. no describen un uso de tales quinoles como profármacos para la administración de compuestos de estrógenos biológicamente activos para barrer átomos de oxígeno.

Kupfer y col. (Comparisons of hydroperoxide isomerase and monooxygenase activities of cytochrome P450 for conversions of allylic hydroperoxides and alcohols to epoxyalcohols and diols: probing substrate reorientation in the active site. Biochemistry, 25 de Septiembre de 2001; 40(38):11490-11501) describen procedimientos para identificar la regio- y estereoquímica de la actividad de citocromo P450 isomerasa sobre $6\beta,10\beta,17\beta$ -trihidroxi-1,4-estradien-3-ona (también llamado 6β -hidroxi-E2OH por Kupfer y col.). Kupfer y col. describieron además E2OH, conocido también como $10\beta,17\beta$ -dihidroxi-1,4-estradien-3-ona, como un subproducto de estradiol cuando reacciona con PIFA o [bis-(trifluoroacetoxi)yodo]benceno; la posterior oxidación de E2OH con citocromo P450 isomerasa da como resultado

ES 2 279 946 T3

cantidades iguales de 6 β -hidroxilación y 1,2-epoxidación (como entenderán los expertos en la técnica, esta reacción no involucra un mecanismo de escisión de O-O).

5 Ohe y col. (Novel metabolic pathway of estrone and 17 β -estradiol catalyzed by cytochrome P-450. Drug Metab Dispos. Febrero de 2000; 28(2):110-112) describen la síntesis de 10 β ,17 β -dihidroxi-1,4-estradien-3-ona a partir de estradiol por sistemas enzimáticos (citocromo P450). Ohe y col. no describen ni sugieren los quinoles y usos de los mismos como se reivindican. Ohe y col. tampoco enseñan ni sugieren ningún mecanismo de escisión de O-O.

10 Por consiguiente, existe una necesidad de composiciones y procedimientos para administrar barredores de radicales libres o antioxidantes relacionados con estrógenos a tejidos que muestran alteraciones en condiciones oxidativas. En particular, existe una necesidad de composiciones y procedimientos que puedan proveer beneficios terapéuticos a sujetos que sufren enfermedades neurodegenerativas asociadas con estrés oxidativo. Además, existe una necesidad de un compuesto de estrógeno terapéuticamente eficaz que mantenga su actividad terapéutica sin efectos secundarios asociados relacionados con el sexo.

15 **Breve resumen de la invención**

La presente invención provee composiciones y procedimientos para la administración controlada de compuestos antioxidantes a mamíferos. En una forma de realización de preferencia, la presente invención provee quinoles esteroides relacionados con estrógeno y su uso como profármacos para tratamiento antioxidante para tratar y/o prevenir diversas afecciones y enfermedades asociadas con radicales libres y daño oxidativo.

20 En un aspecto de la invención, se administran quinoles esteroides relacionados con estrógeno para tratar enfermedades neurológicas que incluyen estrés oxidativo, tales como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson. En otros aspectos de la invención, se administran quinoles esteroides relacionados con estrógeno para aliviar los efectos adversos asociados con el envejecimiento, ictus y trauma.

25 En una forma de realización de preferencia, la presente invención provee compuestos inactivos que se convierten *in vivo* en compuestos terapéuticos, biológicamente activos por transformación química o enzimática. Los quinoles relacionados con esteroides de la presente invención son ventajosos porque solucionan problemas asociados con estabilidad, toxicidad, falta de especificidad y biodisponibilidad limitada, que pueden existir con la forma activa del esteroide. Los quinoles de acuerdo con la presente invención son particularmente ventajosos como barredores oxidativos.

30 La presente invención aprovecha la identificación de un mecanismo por el que los estrógenos sirven como potentes barredores de radicales hidroxilo a través de la captura de especies reactivas de oxígeno dañinas. Específicamente, en una forma de realización de preferencia, la presente invención provee un quinol relacionado con estrógeno que se convierte rápidamente en un compuesto de estrógeno biológicamente activo a través de la reducción catalizada por enzimas que usa un agente reductor endógeno. El agente reductor endógeno puede ser, por ejemplo, las formas reducidas de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) o nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Una ventaja de la reacción de conversión química es que el consiguiente ciclo redox no genera especies de oxígeno reactivas.

35 En una forma de realización específica la presente invención provee un quinol esteroide relacionado con estrógeno que está relacionado con una estructura de 10 β -hidroxiestra-1,4-dien-3-ona. Tales quinoles son ventajosos porque pueden convertirse *in vivo* en un estrógeno de anillo A fenólico precursor, o un compuesto análogo de estrógeno, tras la exposición a un agente reductor que incluye, por ejemplo NADPH endógeno.

40 Ventajosamente, la captura de un radical libre tras la reducción *in vivo* a la estructura fenólica precursora activa regenera los quinoles esteroides relacionados con estrógeno de la presente invención. Esto es ventajoso porque usualmente otros profármacos no se regeneran tras su activación *in vivo*. Al tener la capacidad de regenerarse, los efectos terapéuticos beneficiosos de los quinoles son prolongados.

45 La presente invención también se refiere a quinoles que tienen propiedades fisicoquímicas mejoradas comparadas con los fenoles lipófilos tales como estrógenos y análogos de estrógenos. Ventajosamente, los quinoles de la invención demuestran lipofilia disminuida. Para compuestos de preferencia de la presente invención hay una disminución de 10 a 50 veces en el coeficiente de reparto (P) en n-octanol/agua equivalente con $\Delta\log P$ de 1,0 a 1,7.

50 Además, la presente invención provee quinoles que tienen distribución mejorada en el sistema nervioso central (SNC) comparada con los fenoles lipófilos tales como estrógenos y análogos de estrógenos. Además, los quinoles de la invención demuestran mayor penetración a través de la barrera hematoencefálica.

55 La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más quinoles relacionados con esteroides en una forma de dosificación farmacéutica para tratar y/o prevenir enfermedades y trastornos asociados con el estrés oxidativo. El uso de los quinoles relacionados con esteroides da como resultado la reducción de picos y valles característicos de dosificaciones con agentes precursores farmacéuticamente activos. Las administraciones mejoradas de dosis da como resultado la reducción de toxicidad

comparada con la administración de compuestos de estrógeno activos. Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención tienen un índice terapéutico aumentado comparado con el esteroide activo precursor.

5 En otro aspecto, la presente invención se refiere a procedimientos terapéuticos para la administración controlada de una cantidad eficaz de al menos uno o más quinoles relacionados con esteroides descritos en este documento a un mamífero para proveer tratamiento antioxidante.

Breve descripción de los dibujos

10 La Figura 1 ilustra el mecanismo de activación de los quinoles esteroides relacionados con estrógeno de la presente invención.

15 Las Figuras 2A, 2B y 2C ilustran análisis LC/APCI-MS, MS/MS, y MS³ que demuestran a 10 β -hidroxiestra-1,4-dien-3,17-diona (estrona-quinol) como el producto de la Reacción de Fenton a partir de estrona.

La Figura 3 ilustra esquemas preliminares para la síntesis de formas de profármacos sustituidos en posición 4 o sustituidos en posición 2 de compuestos de la presente invención.

20 La Figura 4 ilustra esquemas preliminares para la síntesis de formas de profármacos disustituidos en posiciones 2 y 4 de compuestos de la presente invención.

La Figura 5 ilustra esquemas preliminares para la síntesis de formas de profármacos trisustituidos en posiciones 1, 2 y 4 de compuestos de la presente invención.

25 La Figura 6 ilustra los trazados cromatográficos de los analitos, estrona-quinol y estrona, y el patrón interno (etinil-estradiol) en el experimento de control.

30 Las Figuras 7A y 7B ilustran los trazados cromatográficos de los analitos, estrona-quinol y estrona, y el patrón interno (etinil-estradiol) en NADPH, y análisis LC/APCI-MS/MS que demuestran la reducción de estrona-quinol a estrona por NADPH, respectivamente.

35 Las Figuras 8A y 8B ilustran los análisis LC/APCI-MS/MS del extracto de acetato de etilo del microdializado cerebral *in vivo* obtenido tras la perfusión de sonda a 1 μ l/minuto con 10-picomol/ μ l de estrona-quinol de líquido cefalorraquídeo artificial.

La Figura 9 ilustra la viabilidad celular tras la exposición a estrés oxidativo inducido por glutamato y tratamiento con una forma de realización de la presente invención comparada con el compuesto precursor fenólico activo.

40 La Figura 10 ilustra el efecto de un quinol de la presente invención en el daño isquémico asociado con reperfusión.

Descripción detallada de la invención

45 De acuerdo con la presente invención, se administran ciertos compuestos quinoles esteroides relacionados con estrógeno para el tratamiento y/o prevención de afecciones patológicas asociadas con especies de oxígeno reactivas (ROS). Los procedimientos y composiciones de la presente invención aprovechan la identificación de un mecanismo por el que los estrógenos sirven como potentes barredores de hidroxilos. Debido a la capacidad de los presentes compuestos para convertirse en compuestos esteroides activos relacionados con estrógeno a través de una reducción catalizada por enzimas, su administración como profármacos es muy ventajosa.

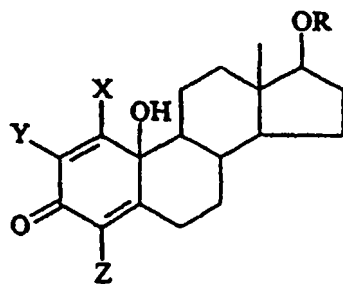
50 Ventajosamente, la presente invención provee formas de profármacos de estrógeno y análogos de estrógeno que proveen efectos farmacéuticos beneficiosos prolongados, propiedades fisicoquímicas mejoradas, distribución tisular mejorada, mayor biodisponibilidad, resistencia a la inactivación metabólica y toxicidad reducida en comparación con los estrógenos fenólicos y análogos de estrógenos, lipófilos. Los compuestos profármacos de acuerdo con la presente invención son barredores de radicales únicos y ventajosos debido a su capacidad para regenerar una estructura esteroidea activa tras la activación por reducción *in vivo*.

60 A diferencia de la estructura de catecol de los productos de estrógenos fenólicos bien conocidos, los presentes quinoles esteroides confieren una naturaleza no aromática al anillo A esteroide. Por ello, la bioquímica de los quinoles esteroides de acuerdo con la presente invención es sustancialmente diferente de la de los estrógenos de catecol para proveer mejores propiedades beneficiosas. En una forma de realización particular, los quinoles esteroides relacionados con estrógeno no son aromáticos hasta la introducción en un proceso de aromatización reductora química o enzimática para proveer un resto fenólico y neuroprotección. Por ello, el compuesto quinol esteroide sirve como un profármaco para estrógenos activos neuroprotectores.

65

ES 2 279 946 T3

En una forma de realización de preferencia, la presente invención provee compuestos quinoles esteroides relacionados con estrógeno de la fórmula:



en la que

R es H, alquilo, cicloalquilo, arilo, heterociclo, heteroarilo, alquilamino, hidroxialquilo, alcoxialquilo o alquilarilo;

X es hidrógeno, isopropilo, alquilo, alqueno, alquino, carbociclo, cicloalquilo, arilo, heterociclo, heteroarilo, alquilamino, hidroxialquilo, alcoxialquilo, o un hidrocarburo lineal o ramificado de 1-15 átomos de carbono de longitud, que puede opcionalmente incluir uno o más heteroátomos en la cadena;

Y es isopropilo, alquilo, alqueno, alquino, carbociclo, cicloalquilo, arilo, heterociclo, heteroarilo, alquilamino, hidroxialquilo, alcoxialquilo, o un hidrocarburo lineal o ramificado de 1-15 átomos de carbono de longitud, que puede opcionalmente incluir uno o más heteroátomos en la cadena; y

Z es isopropilo, alquilo, alqueno, alquino, carbociclo, cicloalquilo, arilo, heterociclo, heteroarilo, alquilamino, hidroxialquilo, alcoxialquilo, o un hidrocarburo lineal o ramificado de 1-15 átomos de carbono de longitud, que puede opcionalmente incluir uno o más heteroátomos en la cadena.

En una forma de realización, R es una cadena de alquilo C_{1-20} lineal o ramificada y X es hidrógeno.

La expresión “compuesto de estrógeno”, como se usa en este documento, se refiere a estrógeno; metabolitos de estrógeno; análogos, antagonistas o moduladores de estrógeno; y compuestos con atributos que están clasificados como similares o análogos a estrógeno, metabolitos de estrógeno o análogos, antagonistas o moduladores de estrógeno.

El término “paciente”, como se usa en este documento, describe a un animal, incluyendo mamíferos, a los que se provee el tratamiento con las composiciones de acuerdo con la presente invención. Las especies de mamíferos que se benefician de los procedimientos de tratamiento descritos incluyen, y no se limitan a, simios, chimpancés, orangutanes, seres humanos, monos; y animales domésticos (por ejemplo, mascotas) tales como perros, gatos, cobayas y hámsters.

Como se usa en este documento, el término “profármaco” significa una molécula que es incapaz de ejercer la actividad farmacológica del compuesto activo. El compuesto activo ejercerá sus efectos terapéuticos tras su bioactivación por un agente reductor.

Se conoce una diversidad de agentes reductores endógenos y pueden usarse para lograr la bioactivación preferencial del compuesto activo dentro del cuerpo. Los agentes reductores candidatos que podrían usarse para activar profármacos de acuerdo con la presente invención incluyen NADH o NADPH. Como resultado de la bioactivación, los profármacos quinoles se convierten en un estrógeno fenólico o análogo de estrógeno activo. Los quinoles esteroides relacionados con estrógeno de la presente invención son ventajosos como profármacos porque, una vez reducidos a un compuesto activo por un agente reductor, el compuesto activo se reoxida otra vez fácilmente dando el quinol esteroide relacionado con estrógeno por un oxidante, tal como un radical hidroxilo. Este procedimiento se muestra en la Figura 1. Ventajosamente, la capacidad para regenerar los compuestos profármaco de la invención tras la bioactivación facilita la prolongación de los efectos farmacológicos beneficiosos.

Los compuestos de la invención pueden usarse con vehículos, aditivos o excipientes farmacéuticamente aceptables, cuyas proporciones se determinan por la solubilidad y naturaleza química del compuesto, vía de administración elegida y práctica médica convencional. En una forma de realización de la presente invención, las composiciones farmacéuticas incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los compuestos de la invención en una forma de dosificación farmacéutica para tratar y/o prevenir enfermedades y afecciones asociadas con el estrés oxidativo. La cantidad terapéuticamente eficaz variará con la afección a tratar, su gravedad, el régimen de tratamiento a usar, la farmacocinética del agente usado, así como con el paciente a tratar.

Los compuestos profármacos de la presente invención pueden formularse de acuerdo con procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles. Las formulaciones están descritas en varias fuentes, bien conocidas y fácilmente disponibles para aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science (Martin E W [1995] Easton Pa., Mack Publishing Company, 19^o ed.) describe formulaciones que pueden usar-

se con relación a la presente invención. Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas estériles para inyección, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos, que aportan a la formulación isotónica con la sangre del receptor; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas, que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden estar presentadas en envases de dosis unitarias o dosis múltiples, por ejemplo ampollas selladas y viales, y pueden almacenarse liofilizadas requiriendo sólo del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, previo al uso. Las soluciones y suspensiones extemporáneas para inyección pueden prepararse a partir de polvo estéril, gránulos, comprimidos, etc. Debería entenderse que además de los ingredientes particularmente mencionados anteriormente, las formulaciones de la presente invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica con relación al tipo de formulación en cuestión.

Los tejidos protegidos por el uso de compuestos quinoles esteroides relacionados con estrógeno como profármacos pueden ser de niños, adultos o fetos e incluyen, pero no se limitan a, células madre, sangre y todos sus componentes, que incluyen eritrocitos, leucocitos, plaquetas y suero, tejido nervioso central, que incluye tejido de cerebro y tejido de médula espinal, neuronas y glia; tejido nervioso periférico, que incluye ganglios, glándula pituitaria posterior, medula adrenal y pineal; tejido conectivo, piel, ligamentos, tendones, y fibroblastos; tejido muscular, que incluye esquelético, liso y tejidos cardíacos o las células de los mismos; tejido endocrino, que incluye glándula pituitaria anterior, glándula tiroidea, glándula paratiroides, corteza adrenal, páncreas y sus subpartes, testículos, ovarios, placenta, y las células endocrinas que son parte de cada uno de estos tejidos; vasos sanguíneos, que incluyen arterias, venas, capilares y las células de estos vasos; tejido pulmonar; tejido cardíaco y el órgano completo; válvulas cardíacas; hígado; riñón, intestinos; hueso, que incluye osteocitos, osteoblastos y osteoclastos; tejido inmune, que incluye células sanguíneas, médula ósea y bazo; ojos y sus partes; tejidos del tracto reproductor; o tejido del tracto urinario.

Los ejemplos de enfermedades, afecciones y trastornos degenerativos que pueden tratarse con los compuestos quinoles esteroides relacionados con estrógeno de la presente invención incluyen: enfermedades y afecciones neurológicas y neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis amiotrófica lateral (ALS), esclerosis múltiple, neuropatía periférica, herpes, ictus, daño traumático, y diversas consecuencias neurológicas y otras degenerativas de cirugías neurológicas y de tórax, esquizofrenia, epilepsia, Síndrome de Down, y Síndrome de Turner; afecciones degenerativas asociadas con SIDA; diversos trastornos óseos que incluyen osteoporosis, osteomielitis, enfermedad isquémica ósea, displasia fibrosa, raquitismo, Síndrome de Cushing y osteoartritis; otros tipos de artritis y afecciones del tejido conectivo y degeneración del cartilago que incluyen artritis reumatoide, soriatrica e infecciosa; diversas enfermedades infecciosas; trastornos de consumo muscular tales como distrofia muscular; trastornos de la piel tales como dermatitis, eccema, soriasis y envejecimiento de la piel; trastornos degenerativos del ojo que incluyen degeneración macular y degeneración retiniana; trastornos del oído tales como otosclerosis; cicatrización afectada de heridas; diversas enfermedades y afecciones cardiovasculares que incluyen ictus, isquemia cardíaca, infarto de miocardio, fallo cardíaco crónico o agudo, disritmias cardíacas, fibrilación auricular, taquicardia paroxística, fibrilación ventricular y fallo cardíaco congestivo; trastornos circulatorios que incluyen aterosclerosis, esclerosis arterial y enfermedad vascular periférica, diabetes (Tipo I o Tipo II); diversas enfermedades del pulmón, enfermedades y trastornos que incluyen cáncer de pulmón, neumonía, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (bronquitis, enfisema, asma); trastornos del tracto gastrointestinal tales como úlceras y hernia; afecciones dentarias tales como periodontitis; enfermedades del hígado que incluyen hepatitis y cirrosis; dolencias pancreáticas que incluyen pancreatitis aguda; enfermedades del riñón tales como fallo renal agudo y glomerulonefritis; y diversos trastornos de la sangre tales como amiloidosis vascular, aneurismas, anemia, hemorragia, anemia de células falciformes, enfermedad autoinmune, síndrome de fragmentación de hematies, neutropenia, leucopenia, afasia de médula ósea, pancitopenia, trombocitopenia y hemofilia. La anterior lista de enfermedades y afecciones que son tratables de acuerdo con la presente invención no pretende ser exhaustiva o limitante pero presenta ejemplos de tales enfermedades y afecciones degenerativas.

Las composiciones farmacéuticas basadas en estos compuestos quinoles esteroides relacionados con estrógeno pueden formularse para una diversidad de vías de administración, que incluyen, por ejemplo, formas de administración oral como comprimidos, cápsulas o similares, o por vía parenteral, intravenosa, intramuscular, transdérmica, bucal, subcutánea, por medio de supositorios u otra vía. En ciertas formas de dosificación farmacéutica, algunos de los compuestos presentes pueden ser más adecuados que otros compuestos, dependiendo de la vía de administración y el sitio diana dentro del paciente.

Los procedimientos terapéuticos como se describen en la presente invención incluyen la administración controlada a un paciente de una cantidad eficaz de al menos uno o más de los compuestos que se establecieron anteriormente para proveer tratamiento antioxidante. La administración a un paciente puede variar de continua (goteo intravenoso) a intramuscular, hasta varias administraciones orales por día (por ejemplo Q.I.D.) y puede incluir administración parenteral, (que incluyen intravenosa e intramuscular), oral, tópica, subcutánea, transdérmica (que puede incluir un agente de penetración), bucal y por supositorios, entre otras vías de administración.

Para preparar las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, se mezcla de preferencia una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los compuestos de acuerdo con la presente invención con un vehículo opcional farmacéuticamente aceptable de acuerdo con las técnicas convencionales de preparación de compuestos farmacéuticos para producir una dosis. Un vehículo puede tomar una diversidad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para administración, por ejemplo, oral o parenteral.

ES 2 279 946 T3

Para formulaciones parenterales, el vehículo puede comprender agua estéril o solución acuosa de cloruro de sodio estéril en combinación con otros ingredientes para ayudar a la dispersión, tales como etanol y otros disolventes farmacéuticamente aceptables. Por supuesto, cuando las soluciones deben usarse y mantenerse estériles, las composiciones y vehículos también deben esterilizarse. Pueden también prepararse suspensiones inyectables, en cuyo caso pueden usarse vehículos líquidos adecuados, agentes de suspensión y similares.

Para preparar composiciones farmacéuticas en forma de dosificación oral de acuerdo con la presente invención, puede usarse uno o más medios farmacéuticos usuales. Por consiguiente, para preparaciones orales líquidas tales como suspensiones, elixires y soluciones, puede usarse vehículos y aditivos adecuados que incluyen agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares. Para preparaciones orales sólidas tales como polvos, comprimidos, cápsulas y para preparaciones sólidas tales como supositorios, pueden usarse vehículos y aditivos adecuados que incluyen almidones, vehículos azúcares, tales como dextrosa, manitol, lactosa y vehículos relacionados, diluyentes, agentes de granulado, lubricantes, ligantes, agentes desagregantes y similares. Si se desea, los comprimidos o cápsulas pueden recubrirse con un recubrimiento entérico o de liberación prolongada por técnicas convencionales.

Los quinoles esteroides relacionados con estrógeno de la presente invención pueden prepararse usando reactivos y reacciones conocidos, que incluyen por ejemplo, oxidación de estradiol o estrona con talio, trifluoroacetato, tetraacetato de plomo, ácido para-nitroperoxibenzoico, fotooxigenación y similares. A continuación se proveen los siguientes Ejemplos 1-10 a modo ilustrativo y no pretenden ser limitantes.

Los Ejemplos 1-6 son esquemas preliminares para compuestos profármacos de acuerdo con la presente invención.

Ejemplo 1

Síntesis de Estrona-Quinol por Transformación de Fenol en Quinol

Como comprenderán los técnicos expertos, puede sintetizarse 10 β -hidroxiestra-1,4-dien-3,17-diona (estrona-quinol) usando una transformación de fenol a quinol "en un recipiente". El procedimiento de síntesis usa ácido meta-cloroperbenzoico (m-CPBA) como oxidante, peróxido de d[i]benzoilo [(PheCO)₂O₂] como iniciador de radical y radiación de luz visible que, en disolvente aprótico a reflujo, produce excelente rendimiento de los quinoles de la presente invención.

A manera de ejemplo, Milic y col., Tetrahedron Letters, 37:21, 3765-3768 (1996) describen un procedimiento "en un recipiente" para sintetizar estrona-quinol. La oxidación de estrona para sintetizar 10 β -hidroxiestra-1,4-dien-3,17-diona se lleva a cabo calentando una solución en agitación de estrona (10,00 g, 37,0 mmol), ácido meta-cloroperbenzoico (m-CPBA) (22,53 g, 111,0 mmol; 85% Jansen Chimica), y (PheCO)₂O₂ (900 mg, 3,70 mmol) en 2 litros de mezcla de CCl₄/Me₂CO (4/1) hasta reflujo durante 3 horas mientras se irradia con una lámpara de tungsteno de 60 Vatios. Tras evaporar el disolvente, se realiza la extracción con CHCl₃ (3 veces 200 ml), se lava con NaHCO₃ (2 veces 100 ml) y H₂O (100 ml), y se seca sobre Na₂SO₄ anhidro. Posteriormente se somete el residuo a cromatografía en columna de SiO₂. La elución puede llevarse a cabo con PhMe/EtOAc (1/1 y 7/3, respectivamente) y la cristalización desde benceno produce 5,19 g (49%) de estrona quinol como agujas incoloras.

Los datos referidos a los estrona quinoles resultantes, como señalan Milic y col. son los siguientes: pf = 219-221°C (benceno); Bibl⁴ = 215-217°C; [α]_D²⁰ 546 = +62, [α]_D²⁰ 578 = +68 (c=1,32, chl); UV: λ MeOH máx = 229 nm (15500); IR(KBr): 3359x, 2941 m, 1736s, 1664s, 1622s, 1601m cm⁻¹; ¹H RMN (250 MHz, DMSO-d₆): 7,13 (d,j=10,4 Hz, H-C(1)), 6,07 (dd, J=10,4, 2,4 Hz, H-C(2)), 5,92 (irreg. T, J_{4,2} = 2,4, J_{4,6 β} = 1,2 Hz, H-C(4)), 5,67 (s, H-O, cambiabile con D₂O), 2,67 (tdd, J=15,2, 6,4, 1,2 Hz, H β -C(6)), 1,97-1,83 (m, H β -C(8) y H β -C(11) - de NOE DIFF. Spectrum), 1,30-1,18 (m, H α -C(11)), 0,97 (s, H₃C-C(13)); ¹³C RMN (62,9 MHz, DMSO-d₆): 220,33 (C(17)), 185,53 (C(3)), 165,09 (C(5)), 150,25 (C(1)), 128,30 (C(2)), 123,09 (C(4)), 70,10 (C(10)), 51,18(C(1)), 50,10 (C(14)), 47,75 (C(13)), 35,62 (C(16)), 34,58 (C(8)), 32,19 (C(7)), 31,80(C(6)), 31,03 (C(11)), 22,00 (C(12)), 21,90 (C(15)), 13,73 (C(18)); MS (EI, m/z): 286(M⁺, 84), 268(M⁺-H₂O, 39), 150(68), 145(100), 124(75), 107(50), 91(50), 79(54), 55(60); Análisis Calculado para C₁₈H₂₂O₃ (286,37): C, 75,50; H, 7,74; Hallado: C = 75,41, H = 7,76.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Boetius PMHD y no se corrigieron. Las rotaciones específicas se midieron en polarímetros Perkin-Elmer 141 MC y Karl Zeiss Polamat A a las temperaturas deseadas. Los espectros de IR se registraron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer FT-IR 1725X. Los espectros UV se registraron en un espectrofotómetro Beckman DU-420. Los espectros ¹H RMN se registraron en espectrómetros Bruker AM-600, Bruker AM-250 y Varian Gemini-200 (a 600, 250, y 200 MHz, respectivamente). Los espectros 2D y ¹³C RMN se registraron en un espectrómetro Bruker AC-250 (a 62,9 y 250 MHz) en el disolvente indicado usando TMS como patrón interno. Los desplazamientos químicos se expresan en valores de ppm (δ) y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. Los espectros de masa se tomaron en un espectrómetro Finnigan-MAT 8230. La mención de instrumentos específicos, configuraciones de instrumentos y medios cromatográficos tienen una finalidad de servir de ejemplos y no pretenden ser limitantes.

Ejemplo 2

Síntesis de Estrona a Quinol Usando el Modelo de Reacción de Fenton

5 10β -Hidroxiestra-1,4-dien-3,17-diona (estrona-quinol) puede sintetizarse también a partir de estrona usando el modelo de Reacción de Fenton. Como saben los expertos en la técnica, en la reacción de Fenton, la velocidad para obtener los productos hidroxilados de estrona, incluyendo un 10β -hidroxiestra-1,4-dien-3,17-diona quinol de la presente invención, puede influenciarse por varios parámetros que incluyen las concentraciones de sustrato, Fe(II) y H_2O_2 , y el pH del medio. Se incubaron un ml de solución de ácido sulfúrico, pH 3,0 que contenía $300\ \mu M$ de Fe(II), $1,3\ mM$ de H_2O_2 , y $100\ \mu M$ de estrona a $37^\circ C$ durante 10 minutos, y a continuación se extrajo con diclorometano.

15 Para evaluar los productos de reacción de estrona bajo las condiciones anteriormente aplicadas, se realizaron análisis HPLC y LC/MS, incluyendo los espectros de fragmentación de MS/MS y MS/MS/MS (MS^3). Se lavó la fase orgánica extraída libre de ácido con agua destilada, se secó sobre Na_2SO_4 , y se evaporó el disolvente bajo vapor de nitrógeno. La separación por LC se realizó usando una columna de fase inversa de $5\ cm \times 2,1\ mm$ de d.i. Discovery HS C-18 (SUPELCO) con $0,25\ ml/min$ de agua:metanol:2-propanol:ácido acético:diclorometano (53:35:5:5:2, v/v) como fase móvil. Se retiró el residuo de la muestra para análisis y se disolvió en $1\ ml$ de la fase móvil, a continuación se inyectaron $5\ \mu l$ de solución para análisis. Los espectros de masas se registraron en un instrumento de cuadrupolo de trampa iónica (LCQ, Finnigan MAT) usando modo de adquisición de datos dependiente, y APCI en modo de ionización positivo para registrar los espectros de masa de exploración completa, espectros de fragmentación MS/MS y MS^3 tras la disociación inducida por colisión (CID) con helio como gas diana.

20 Aunque no pudieron detectarse catecol estronas (2-OH-E1 y 4-OH-E1), los análisis por HPLC, LC/MS y los espectros de fragmentación de MS/MS y MS^3 revelaron que el principal producto de la reacción fue estrona-quinol, como se muestra en las Figuras 2A, 2B y 2C. En particular, la coelución de los resultados para el control de iones seleccionados (SIM; $m/z\ 287$ extraídos de los espectros de masas de exploración completa registrados exitosamente), el espectro de masas APCI completo para el pico cromatográfico (tiempo de retención (t_R) = 1,3 minutos), los espectros de fragmentación MS/MS (pico con $m/z\ 287$ aislado como el ión precursor), y los espectros de fragmentación MS^3 (pico con $m/z\ 269$) con un compuesto de estrona-quinol de referencia sintético demostraron inequívocamente que el producto de reacción era 10β -hidroxiestra-1,4-dien-3,17-diona (estrona-quinol).

30 Los estudios cinéticos además demostraron que la oxidación de estrona para dar estrona-quinol se produce rápidamente bajo las condiciones anteriormente aplicadas. Los estudios cinéticos revelaron que la constante de velocidad de segundo orden (k) de la reacción fue de aproximadamente $20\ M^{-1}s^{-1}$ y la semivida de estrona y la velocidad inicial eran aproximadamente 2,5 minutos y $1\ \mu M/s$, respectivamente. Otros estudios de los productos de la reacción de Fenton formados a partir de estrona verificaron que el producto estrona-quinol no sufrió otra oxidación (es decir, a un epóxido) y que las catecol estronas detectables permanecieron relativamente estables bajo las condiciones de Fenton.

Ejemplo 3

Síntesis de Quinoles Esteroides Relacionados con Estrógeno 17β -OH Alquilados

40 Para alquilar el grupo $17-OH$ de los presentes quinoles esteroides, se sintetiza inicialmente un quinol esteroide usando una transformación fenol a quinol "en un recipiente" o el Modelo de Reacción de Fenton. El $3-OH$ del compuesto quinol esteroide resultante se protege como bencil (Bz) éter. El grupo $17-OH$ del compuesto 3-bencilquinol esteroide se alquila con un haluro de alquilo en presencia de hidruro de sodio en N,N-dimetilformamida (DMF). La posterior eliminación del grupo protector 3-bencilo puede realizarse usando procedimientos conocidos por los técnicos expertos. Por ejemplo, puede eliminarse el grupo protector 3-bencilo usando un hidrogenador Parr con Paladio en carbón vegetal (Pd/C) como catalizador en ácido acético glacial.

Ejemplo 4

Síntesis de Quinoles Esteroides Relacionados con Estrógeno Sustituídos en Posición 2 o Sustituídos en Posición 4

55 La Figura 3 ilustra la síntesis de quinoles relacionados con estrógeno de acuerdo con la presente invención sustituidos en posición 4 o en posición 2. Como con estrona quinol, la primera etapa en la síntesis de quinol esteroide relacionado con estrógeno sustituido en posición 2 o sustituido en posición 4 incluye una transformación de fenol a quinol "en un recipiente". A modo de ejemplo, la etapa inicial en la síntesis de 10β -hidroxi- $4\beta,5\beta$ -epoxiestr-1-en-3,17-diona incluye agitar una solución de estrona, m-CPBA, y $(BzO)_2$ en una mezcla de CH_2Cl_2/Me_2CO (4/1) que se calienta a reflujo durante 24 horas mientras se irradia con una lámpara de tungsteno de 60 Vatios (no mostrada). A continuación se somete el compuesto quinol esteroide relacionado con estrógeno resultante a un compuesto modelo de hidroperóxido de lípido tal como hidroperóxido de terc-butilo (tBuOOH) y acetilacetato de vanadilo $[VO(acac)_2]$. Se agrega un nucleófilo (por ejemplo bromuro de sodio o metilato de litio) del sustituyente 2- o 4- a los compuestos epóxidos resultantes. El agregado del nucleófilo da como resultado la eliminación espontánea de H_2O para proveer un quinol esteroide sustituido en posición 2 o sustituido en posición 4 de acuerdo con la presente invención.

Ejemplo 5

Síntesis de Quinoles Esteroides Relacionados con Estrógeno Disustituídos en Posiciones 2,4

5 La síntesis de quinoles esteroides relacionados con estrógeno disustituídos en posiciones 2 y 4 se ilustra en la Figura 4. Como con la síntesis de los sustituidos en posición 2 o en posición 4, la primera etapa en la síntesis de un compuesto quinol esteroide relacionado con estrógeno sustituido en posiciones 2 y 4 incluye una transformación de fenol a quinol “en un recipiente”. El quinol esteroide relacionado con estrógeno se somete posteriormente a un compuesto modelo de hidroperóxido de lípido tal como hidroperóxido de terc-butilo (tBuOOH) y acetilacetato de vanadilo [VO(acac)₂]. Se introduce un nucleófilo (por ejemplo bromuro de sodio o metilato de litio) a los compuestos epóxido resultantes para proveer un sustituyente 2- o 4-. El agregado del nucleófilo da como resultado la eliminación espontánea de H₂O para proveer un quinol esteroide sustituido en posición 2 o sustituido en posición 4 de acuerdo con la presente invención. A continuación se somete el quinol esteroide sustituido en posición 2- o en posición 4- a cinc en ácido acético para producir los compuestos fenólicos. Posteriormente se someten los compuestos fenólicos a una transformación de fenol a quinol “en un recipiente”. A modo de analogía, el compuesto esteroide relacionado con estrógeno fenólico sustituido en posición 2- o en posición 4- se somete a un compuesto modelo hidroperóxido de lípido tal como hidroperóxido de terc-butilo (tBuOOH) y acetilacetato de vanadilo [VO(acac)₂]. Se introduce un nucleófilo (por ejemplo bromuro de sodio o metilato de litio) a los compuestos epóxido resultantes para proveer un sustituyente 2- o 4-. El agregado del nucleófilo da como resultado la eliminación espontánea de H₂O para proveer un compuesto esteroide fenólico disustituido en posiciones 2 y 4. El compuesto esteroide disustituido en posiciones 2 y 4 se agita posteriormente con m-CPBA y (PhCO)₂O₂ en CCl₄/Me₂CO a reflujo mientras se irradia con una lámpara de tungsteno de 60 Vatios para proveer un quinol esteroide disustituido en posiciones 2 y 4 de acuerdo con la presente invención.

Ejemplo 6

Síntesis de Quinoles Esteroides Relacionados con Estrógeno Trisustituídos en Posiciones 1, 2 y 4

30 La síntesis de quinoles esteroides trisustituídos en posiciones 1, 2 y 4 se ilustra en la Figura 5. Como con la síntesis de los sustituidos en posición 2 y 4, la primera etapa en la síntesis de un compuesto quinol esteroide relacionado con estrógeno sustituido en posiciones 2 y 4 incluye una transformación de fenol a quinol “en un recipiente” de un compuesto de estrógeno sustituido en posición 1. El quinol esteroide relacionado con estrógeno sustituido en posición 1 resultante se somete posteriormente a un compuesto modelo de hidroperóxido de lípido tal como hidroperóxido de terc-butilo (tBuOOH) y acetilacetato de vanadilo [VO(acac)₂]. Se introduce un nucleófilo (por ejemplo bromuro de sodio o metilato de litio) a los compuestos epóxido resultantes para proveer un sustituyente 2- o 4-. El agregado del nucleófilo da como resultado la eliminación espontánea de H₂O para proveer un quinol esteroide disustituido en posiciones 1 y 2 o disustituido en posiciones 1 y 4 de acuerdo con la presente invención. A continuación se somete el quinol esteroide disustituido en posiciones 1 y 2 o en posiciones 1 y 4 a cinc en ácido acético para producir los compuestos fenólicos. Posteriormente se someten los compuestos fenólicos a una transformación de fenol a quinol “en un recipiente”. A modo de analogía, el compuesto de estrógeno fenólico disustituido en posiciones 1 y 2 o en posiciones 1 y 4 se somete a un compuesto modelo hidroperóxido de lípido tal como hidroperóxido de terc-butilo (tBuOOH) y acetilacetato de vanadilo [VO(acac)₂]. Se introduce un nucleófilo (por ejemplo bromuro de sodio o metilato de litio) a los compuestos epóxido resultantes para proveer un sustituyente 2- o 4-. El agregado del nucleófilo da como resultado la eliminación espontánea de H₂O para proveer un compuesto esteroide fenólico trisustituido en posiciones 1, 2 y 4. El compuesto esteroide trisustituido en posiciones 1, 2 y 4 se agita posteriormente con m-CPBA y (PhCO)₂O₂ en CCl₄/Me₂CO a reflujo mientras se irradia con una lámpara de tungsteno de 60 Vatios para proveer un quinol esteroide trisustituido en posiciones 1, 2 y 4 de acuerdo con la presente invención.

50 Otros numerosos quinoles para estrógenos o análogos de estrógenos fenólicos de acuerdo con la presente invención, así como compuestos equivalentes, relacionados, pueden sintetizarse fácilmente por analogía simplemente modificando las vías sintéticas descritas anteriormente, usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

Los siguientes Ejemplos 7-9 describen experimentos que demuestran la capacidad de los compuestos de la presente invención para reducirse para dar una estructura esteroide fenólica activa y regenerarse capturando radicales hidroxilo.

Ejemplo 7

Estudio In Vitro que Demuestra la Reducción de Quinol Esteroide Relacionado con Estrógeno para dar una Estructura Activa

60 Se incubó estrona-quinol (0,1 mM) a 37°C en tampón fosfato 0,1M, pH 7,5 en presencia de 1 mM de NADH, NADPH, ascorbato de sodio y glutatión (GSH). Se tomaron alícuotas (500 µl) tras 60 minutos de incubación y se extrajeron con acetato de etilo. Tras eliminar el disolvente, se analizó en el residuo de los extractos orgánicos combinados el contenido de estrona por LC/MS/MS usando etinil-estradiol como patrón interno. Se realizaron incubaciones de control (0,1 mM de estrona-quinol en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,5 y 37°C sin agregado de agente reductor, como se muestra en la Figura 6, así como la incubación con GSH resultaron libres de estrona incluso tras 12 horas de incubación. Pudieron detectarse trazas de estrona cuando la incubación se realizó en presencia de NADH y, especialmente, NADPH, como se muestra en las Figuras 7A y 7B.

Ejemplo 8

Reducción In Vitro de un Quinol Esteroide Relacionado con Estrógeno para dar una Estructura Esteroide Fenólica Activa

5 Se incubó estrona-quinol (100 μ M, 286 μ g/ml) a 37°C en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,5) en presencia de NADPH (1 mM) y microsomas de hígado de rata macho (concentración proteica final, 1 mg/ml). Se tomaron alícuotas (500 μ l) tras 5 minutos de incubación con microsomas de hígado de rata. Se vio que el estrona quinol sufrió reducción para formar estrona. Además, la concentración de estrona alcanzada tras 5 minutos de incubación microsomal fue
10 aproximadamente 12 veces mayor (15,1 μ g/ml) que el valor de 1,2 μ g/ml medido sin el agregado de microsomas en el experimento de control relevante (NADPH presente pero sin agregado de microsomas).

Ejemplo 9

Experimento In Vivo que Demuestra la Reducción de un Quinol Esteroide Relacionado con Estrógeno para dar una Estructura Esteroide Fenólica Activa

15 Se realizaron experimentos de microdiálisis cerebral para establecer que estrona-quinol sufre reducción a estrona en células neuronales *in vivo*.

20 Se anestesiaron ratas Sprague, macho (300 - 400 g), se colocaron en un instrumento estereotáxico, y se les implantó una cánula guía (cánula guía CMA/12) en el hipocampo ventral bajo condiciones asépticas. Se fijó la cánula guía al cráneo, junto con tornillos de acero inoxidable unidos a dos agujeros adicionales, con acrílico dental. Previo a comenzar el experimento (usualmente 5-7 días tras la implantación de la cánula guía) se colocaron las ratas en una unidad de
25 contención (BAS, Inc.) durante al menos 30 minutos. A continuación se insertó una sonda de microdiálisis (CMA/12, diámetro de membrana de policarbonato: 0,5 mm; longitud de la membrana: 4 mm; corte molecular: 5.000 Da) en el hipocampo ventral a través de la cánula guía. Tras la inserción, se perfundió la sonda con un líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa) a un caudal de 1 μ l/min mantenido con una bomba de microperfusión (BAS BeeStinger) fijada a la sonda por medio de un entubado de polietileno y un circulador de líquido. Tras equilibrar durante 50 minutos, se
30 usó un recolector de fracciones automático refrigerado (BAS HoneyComb) para tomar muestras continuamente del líquido efluente de la sonda durante 24 horas en fracciones de 60 minutos recogidas en viales de vidrio de 300 μ l (control). A continuación se reemplazó el líquido cefalorraquídeo artificial por una solución de perfusión que contenía 10 picomol/ μ l de estrona-quinol en LCRa (Midiendo la disminución en la concentración de compuesto de la solución perfundida, estrona-quinol entró al cerebro con un flujo de aproximadamente 2 picomol/minuto). La recogida de muestras continuó durante otras 24 horas. Para los análisis LC/APCI-MS/MS, se combinaron 50 μ l de cada una de las 20
35 fracciones (volumen total: 1 ml) de los experimentos de microdiálisis de control con estrona-quinol, respectivamente, y se extrajeron con acetato de etilo tras el agregado de un patrón interno.

Aunque no se detectó estrona en los microdializados de control, estaba presente en una cantidad detectable en las
40 muestras recogidas durante la perfusión de las sondas con la solución LCRa que contenía estrona-quinol, como se muestra en las Figuras 8A y 8B. Los trazados cromatográficos mostraron el SRM (material de referencia estándar) m/z 287 \rightarrow m/z 269 SRM para estrona-quinol y m/z 271 m/z 253 para estrona. Se identificó inequívocamente el pico en $t_R = 4,5$ minutos, basado en la coelución con un compuesto de referencia auténtico y espectros de APCI, MS/MS (dados junto con el origen de los fragmentos principales observados) y MS³ idénticos, que la estrona.

45 Los siguientes Ejemplos 10 y 11 describen experimentos que demuestran la equivalencia de bioactividad y eficacia de los quinoles de la presente invención comparados con el compuesto de estrógeno fenólico.

Ejemplo 10

Viabilidad Celular Neural In Vitro tras Exposición a Estrés Oxidativo y Tratamiento con Quinol Esteroide de la Presente Invención Comparado con el Tratamiento con Estructura Fenólica Activa

50 Se cultivaron células HT-22 en medio de Eagle Modificado por Dulbecco suplementado con 10% de suero fetal de bovino. Los experimentos se realizaron en placas de cultivo de 96 pocillos conteniendo aproximadamente 5.000 células/pocillo determinado por medio de un hemocitómetro de Neubauer. Se incubaron las células durante 24 horas. Se disolvieron 10 β -hidroxi-17 β -butoxiestra-1,4-dien-3-ona y la estructura precursora esteroide fenólica 3-hidroxi-17 β -
55 butoxiestra-1,3,5-trieno cada uno en etanol absoluto y se diluyeron con el medio de cultivo, las placas se incubaron durante 24 horas tras el agregado de glutamato de sodio (20 mM). La viabilidad celular se cuantificó por medio del ensayo de Calcein AM en una solución de tampón fosfato.

60 A concentraciones de 10 β -hidroxi-17 β -butoxiestra-1,4-dien-3-ona de 1 μ M y 10 μ M, resultó demostrable la actividad neuroprotectora contra estrés oxidativo inducido por glutamato en células neuronales HT22, como se muestra en la Figura 9. Aunque el compuesto 10 β -hidroxi-17 β -butoxiestra-1,4-dien-3-ona no tiene un anillo A fenólico considerado como un componente esencial para la actividad barredora de radicales, el requerimiento estructural para la actividad
65 barredora de radicales, tal como un resto fenólico, se provee por medio de la activación por reducción. Esencialmente, el quinol 10 β -hidroxi-17 β -butoxiestra-1,4-dien-3-ona de la presente invención sirve como un profármaco para la estructura esteroide activa 3-hidroxi-17 β -butoxiestra-1,3,5-trieno.

Ejemplo 11

Protección Celular Neural In Vivo Contra el Ictus y Tratamiento con un Quinol Esteroide de la Presente Invención Comparado con el Tratamiento con la Estructura Fenólica Activa

5 La restauración aguda del flujo sanguíneo tras la isquemia lleva a la producción de ROS (Forman, L. G. y col., “Augmentation of nitric oxide, superoxide, and peroxytrite production during cerebral ischemia and reperfusion in the rat”, *Neurochem. Res.*, 23:141-148 (1998); Peters, O. y col., “Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat”, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 18:196-205 (1998);
 10 y Mason, R. B. y col., “Production of reactive oxygen species after reperfusion *in vitro* and *in vivo*: protective effect of nitric oxide”, *J. Neurosurg.*, 93:99-107 (2000)) que son directamente tóxicas para las neuronas. El barrido terapéutico, no enzimático de radicales libres puede ser una estrategia viable para la reducción del daño tisular cerebral isquémico.

15 Se aclimataron ratas Sprague-Dawley hembra (con un peso de 200 - 250 g, Charles River, Wilmington, MA) durante tres días previo a la cirugía. Se realizó ovariectomía bilateral 2 semanas antes de la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO). Se anestesiaron los animales por inyección intraperitoneal de ketamina (60 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg). La temperatura rectal se mantuvo en $37,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante el procedimiento. Se ocluyó la arteria cerebral media durante una hora y posteriormente se retiró la sutura para permitir la reperusión. Se disolvieron estrona y un
 20 quinol de la presente invención (E1-quinol) en aceite de maíz y se administraron en una dosis de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por vía subcutánea (sc) 2 horas previo al comienzo de la MCAO de 1 hora.

25 Se decapitó a los animales 24 horas tras la reperusión. Se recogieron los cerebros y se colocaron en una matriz cerebral para realizar cortes (Harvard Apparatus, Holliston, MA). Se realizaron siete cortes a 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 mm posteriores al bulbo olfativo. Se incubaron los cortes durante 30 minutos en solución de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio al 2% a 37°C , y a continuación se fijaron en formalina al 10%. Se fotografiaron los cortes teñidos y posteriormente se midió el volumen de lesión isquémica (Image-Pro Plus 4.1, Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

30 Cuando se administró previo a la isquemia, el estrógeno (estrona) redujo significativamente el volumen de infarto en un 53% ($P < 0,05$) comparado con el control tras MCAO transitoria seguida por reperusión de 24 horas en ratas ovariectomizadas. Además, el E1-quinol de la presente invención tuvo la misma potencia que el estrógeno precursor (estrona) para reducir la lesión, como se ilustra en la Figura 10. Los datos de la Figura 10 están expresados como media \pm EEM. Se hicieron evaluaciones estadísticas con análisis ANOVA de una vía seguido por pruebas de Dunnett *post hoc* (comparación con un único grupo control) o de Student-Newman-Keuls (comparaciones múltiples).

35 Este Ejemplo y los estudios previos demuestran que los estrógenos naturales empleados en concentraciones suprafisiológicas (Yang, S. H. y col., “Estradiol exerts neuroprotective effects when administered after ischemic insult”, *Stroke*, 31:745-749 (2000) y Shi, J. y col., “Estrogens decrease reperfusion-associated cortical ischemic damage: an MRI analysis in a transient focal ischemia model”, *Stroke*, 32:987-992 (2001)) y análogos de estrógeno sin afinidad con receptores de estrógeno (Liu, R. y col., “Neuroprotective effects of a novel non-receptor-binding estrogen analogue: *in vitro* and *in vivo* analysis”, *Stroke*, 33:2485-2491 (2002)) son neuroprotectores. Por consiguiente, el efecto observado tanto con estrona como con E1-quinol de la presente invención pueden deberse en parte a un mecanismo
 40 antioxidante en este Ejemplo. El E1-quinol de la presente invención mostró una disminución del daño isquémico asociado con reperusión equivalente a la obtenida con el estrógeno precursor (estrona) en el paradigma *in vivo*, lo que indica la conversión del quinol en el compuesto de estrógeno de anillo A fenólico biológicamente activo, neuroprotector. Además, los quinoles de la presente invención son farmacéuticamente más aceptables (es decir, como profármacos) debido a su capacidad *in vivo* de ser menos lipófilos, más resistentes al metabolismo oxidativo, más seguros, menos tóxicos y con menos probabilidad de causar efectos hormonales no deseados que los compuestos estrógeno/fenólicos
 45 precursores.

50

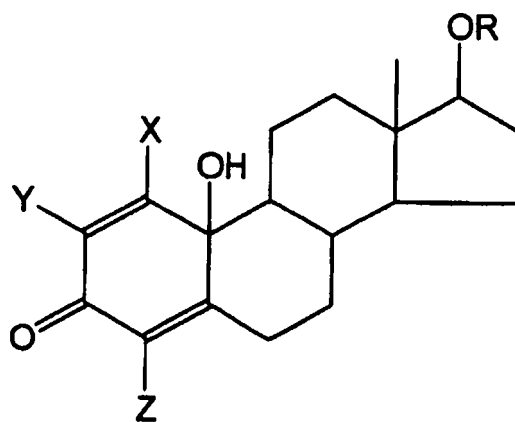
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un quinol que tiene la estructura general



en la que

R se selecciona del grupo constituido por H, alquilo, cicloalquilo, arilo, heterociclo, heteroarilo, alquilamino, hidroxialquilo, alcoxialquilo y alquilarilo;

X se selecciona del grupo constituido por hidrógeno, isopropilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, carbociclo, cicloalquilo, arilo, heterociclo, heteroarilo, alquilamino, hidroxialquilo, alcoxialquilo, y un hidrocarburo lineal o ramificado de 1-15 átomos de carbono de longitud, que puede opcionalmente incluir uno o más heteroátomos en la cadena;

Y se selecciona del grupo constituido por isopropilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, carbociclo, cicloalquilo, arilo, heterociclo, heteroarilo, alquilamino, hidroxialquilo, alcoxialquilo, y un hidrocarburo lineal o ramificado de 1-15 átomos de carbono de longitud, que puede opcionalmente incluir uno o más heteroátomos en la cadena; y

Z se selecciona del grupo constituido por hidrógeno, isopropilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, carbociclo, cicloalquilo, arilo, heterociclo, heteroarilo, alquilamino, hidroxialquilo, alcoxialquilo, y un hidrocarburo lineal o ramificado de 1-15 átomos de carbono de longitud, que puede opcionalmente incluir uno o más heteroátomos en la cadena.

2. El quinol de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R es una cadena de alquilo C_{1-20} lineal o ramificada y X es hidrógeno.

3. Un procedimiento *in vitro* para producir un compuesto de estrógeno biológicamente activo, que comprende proveer un quinol de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, y convertir dicho quinol en un compuesto de estrógeno biológicamente activo por medio de reducción catalizada por enzimas.

4. Un procedimiento *in vitro* para producir un quinol regenerado, que comprende el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, y regenerar dicho quinol a través de la captura de una especie reactiva de oxígeno de radicales libres por medio de dichos compuestos de estrógeno biológicamente activos.

5. Una composición farmacéutica que comprende un quinol que se convierte en un compuesto de estrógeno biológicamente activo a través de la reducción catalizada por enzimas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que dicha composición además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la reducción catalizada por enzimas se produce con NADH o NADPH como un agente reductor.

7. El uso de un quinol que se convierte en un compuesto de estrógeno biológicamente activo a través de la reducción catalizada por enzimas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, para la producción de un medicamento para el tratamiento o prevención de una afección patológica asociada con especies reactivas de oxígeno de radicales libres.

8. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, que además comprende administrar el quinol por una vía seleccionada del grupo constituido por vía oral, bucal, intramuscular, transdérmica, intravenosa y subcutánea.

9. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el quinol se regenera cuando los compuestos de estrógeno biológicamente activos capturan una especie reactiva de oxígeno de radicales libres.

ES 2 279 946 T3

10. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la reducción catalizada por enzimas se produce con NADH o NADPH como un agente reductor.

5 11. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la afección patológica asociada con especies reactivas de oxígeno de radicales libres es una enfermedad neurodegenerativa.

10 12. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que los compuestos de estrógeno biológicamente activos se proveen al mamífero para el tratamiento o prevención de afecciones cardiacas o el tratamiento o prevención de afecciones asociadas con los huesos.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

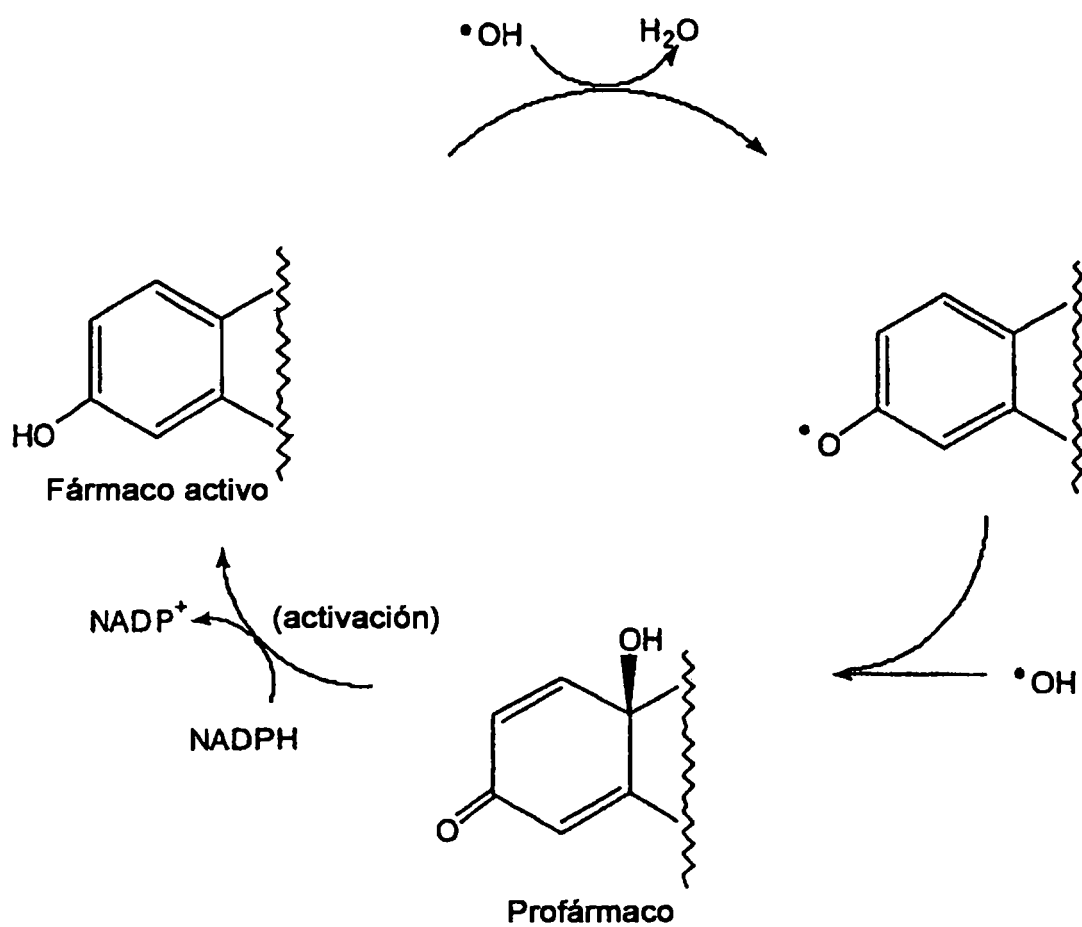


FIG. 1

FIG. 2A

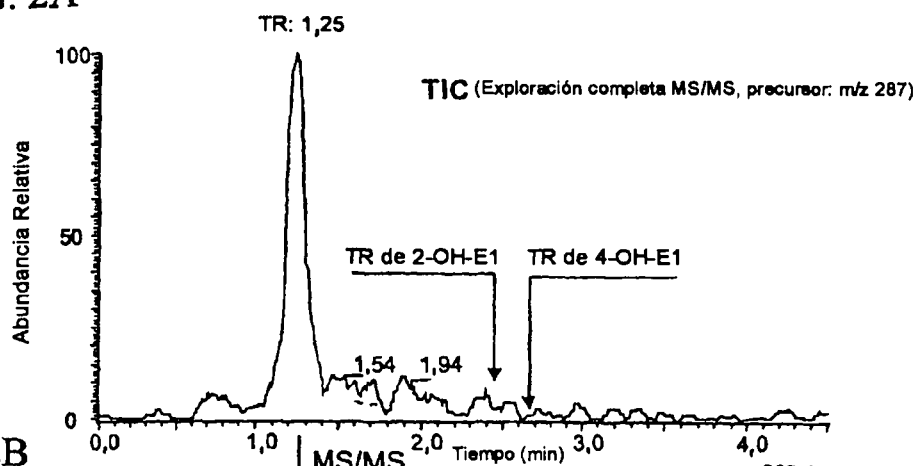


FIG. 2B

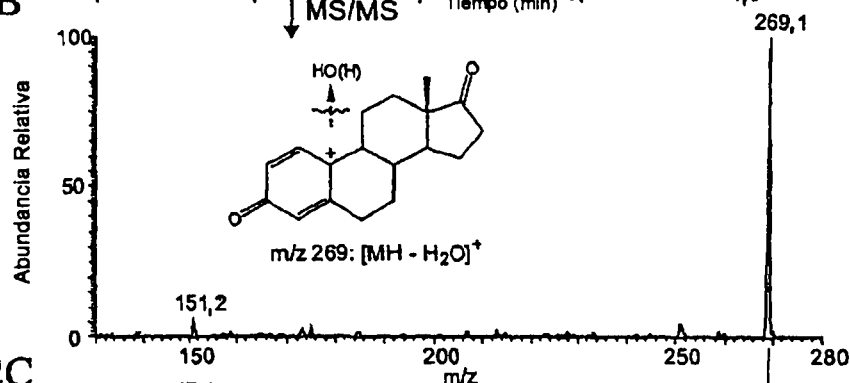
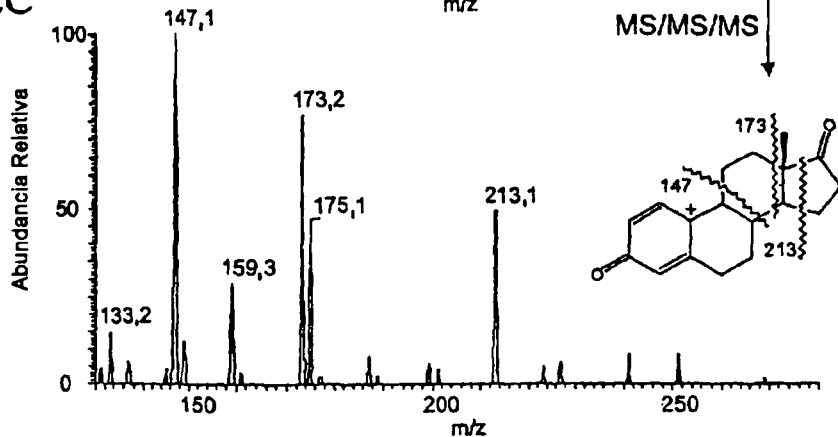


FIG. 2C



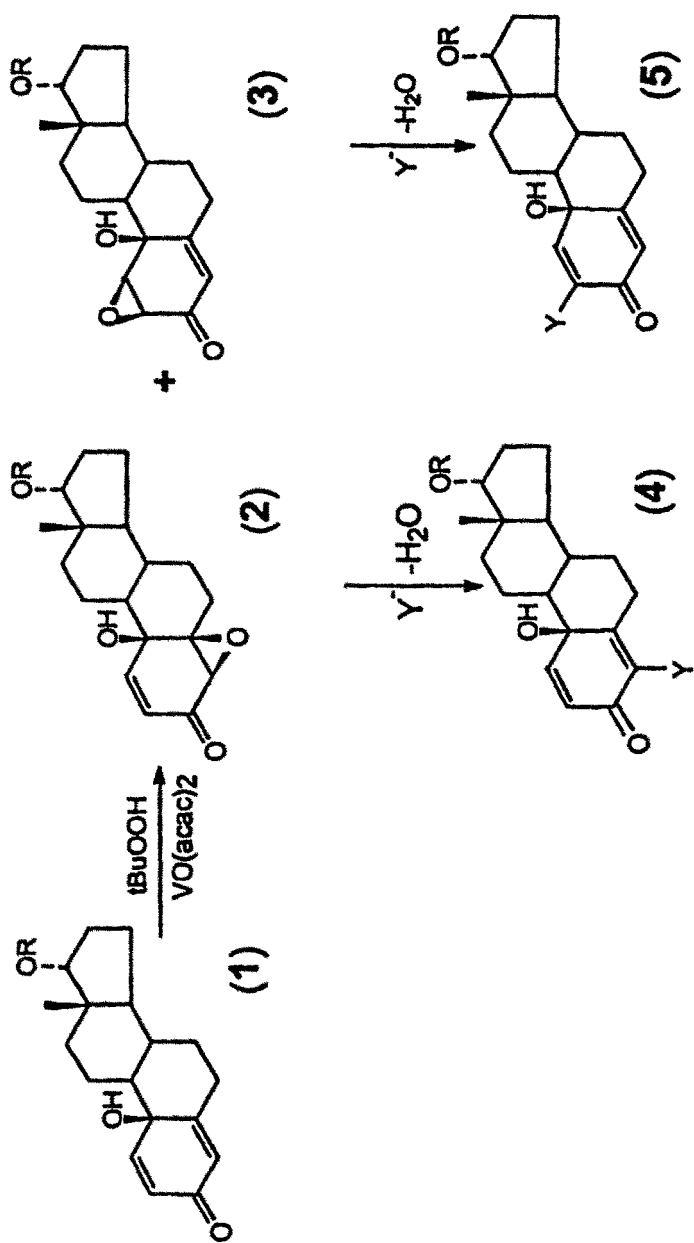


FIG. 3

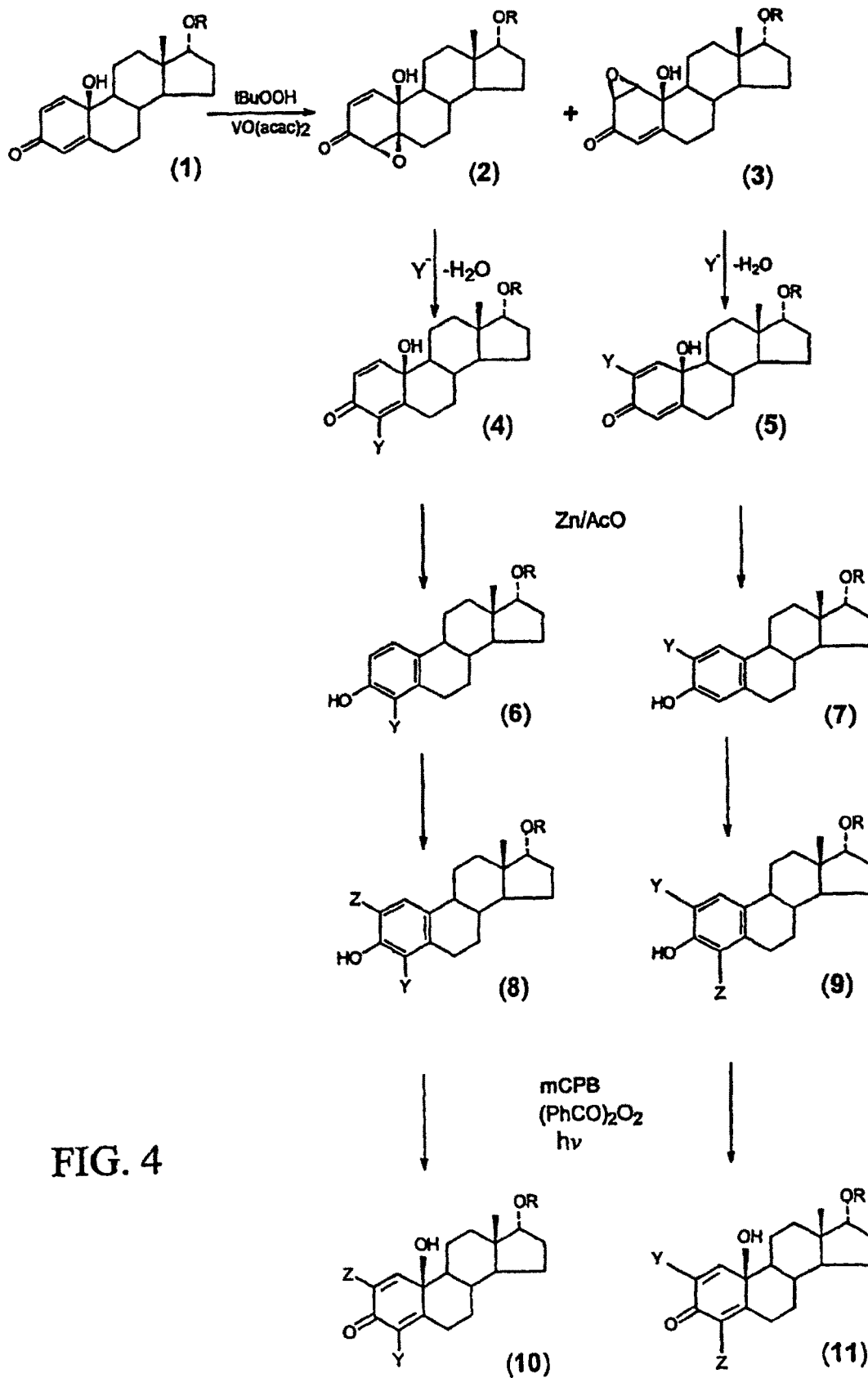


FIG. 4

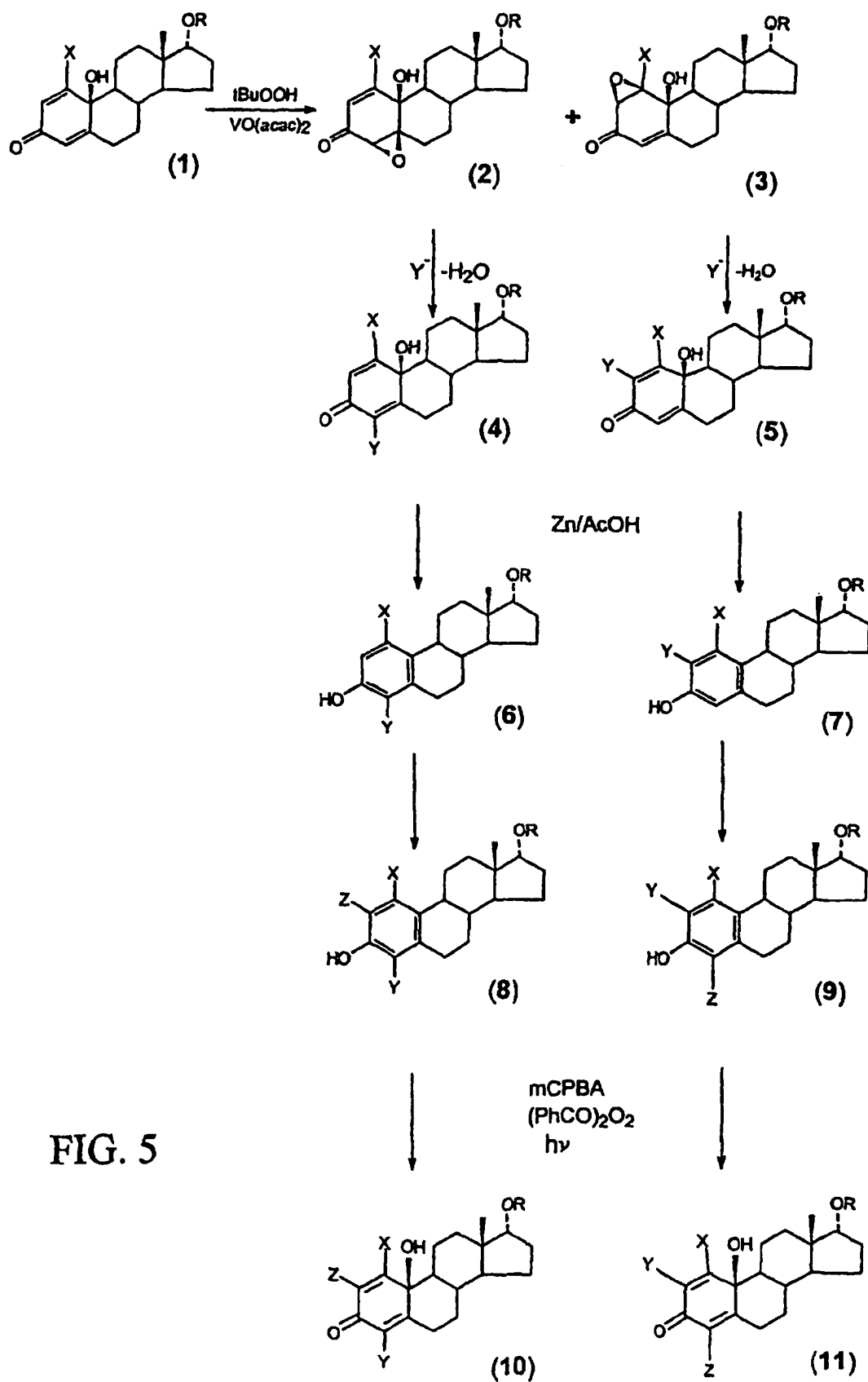


FIG. 5

FIG. 6

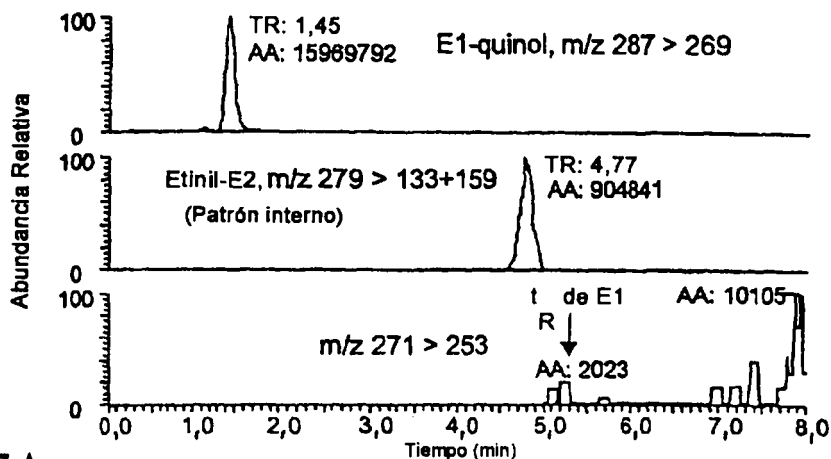


FIG. 7A

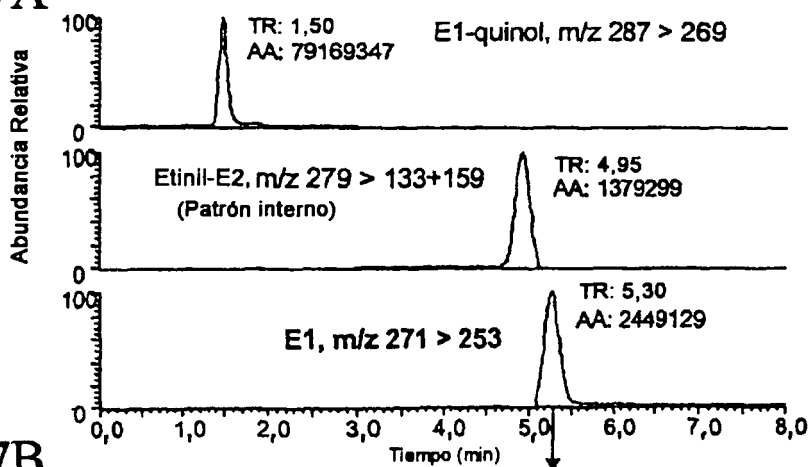
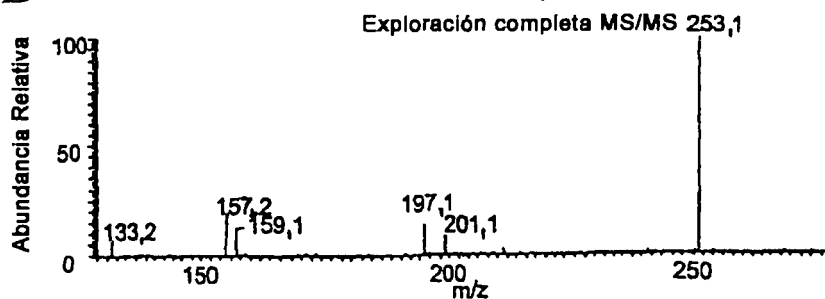


FIG. 7B



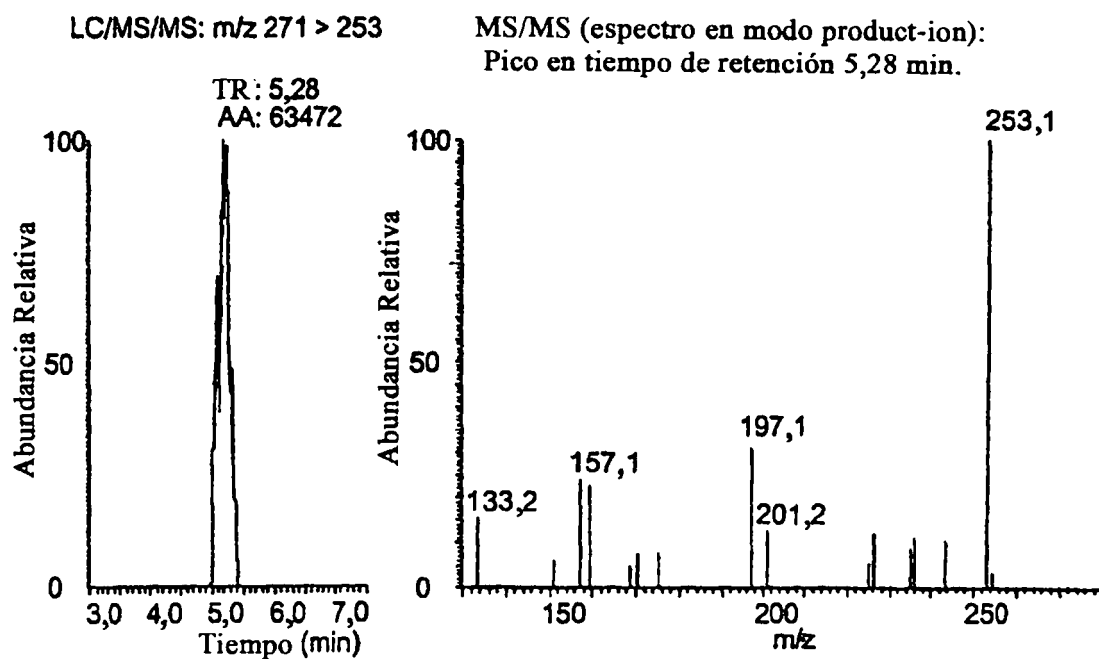


FIG. 8A

FIG. 8B

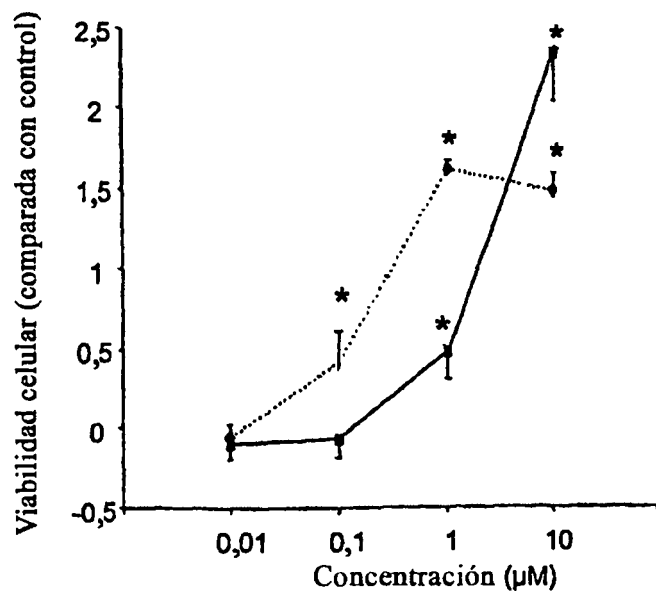


FIG. 9