



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 310 182**

(51) Int. Cl.:

**A61K 31/5685** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

**A61P 25/16** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **01945494 .1**

(96) Fecha de presentación : **29.06.2001**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1294382**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **26.03.2003**

(54) Título: **7-hidroxiiepiandrosterona con actividad neuroprotectora.**

(30) Prioridad: **29.06.2000 GB 0016022**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.01.2009**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.01.2009**

(73) Titular/es: **Hunter-Fleming Limited**  
**Lamb House, Ludwell**  
**Shaftsbury, Dorset SP7 9ND, GB**

(72) Inventor/es: **Pringle, Ashley, Ker;**  
**Sundstrom, Lars, Eric y**  
**Wülfert, Ernst**

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 310 182 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

7-hidroxiiepiandrosterona con actividad neuroprotectora.

La presente invención se refiere al uso de ciertos compuestos de 7-hidroxi-esteroides para protección contra la muerte de células neuronales, y que son así útiles en el tratamiento y prevención de dolencias o secuelas de dolencias tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, discapacidad cognitiva no demencial (CIND), ictus, trauma cerebral, lesión de la médula espinal y lesión del nervio periférico; también es útil para mejorar la función cognitiva.

La producción de metabolitos 7 $\alpha$ -hidroxilados de deshidroepiandrosterona (DHEA) *in vivo* ha sido conocida desde 1959 con la identificación de 7 $\alpha$ -hidroxi-DHEA en orina [J J Schneider, M L Lewbart, Recent Prog. Horm. Res. 15 (1959) 210-230; L Starka y col, Clin. Chim Acta. 7 (1961) 309-316]. Desde entonces, se han reseñado extensa 7 $\alpha$ -hidroxilación de sustratos de 3 $\beta$ -hidroxiesteroides (que incluyen DHEA y epiandrosterona - EPIA) en preparaciones de tejidos de muchos órganos humanos, que incluyen hígado adulto y fetal, testículos, epidídimo, piel, tejido mamario, próstata, células adiposas estromales y amígdalas. La hidroxilación de DHEA en la posición 7 también se ha demostrado en hígado de rata y en numerosos tejidos y órganos de ratón. En todos esos estudios, 7 $\alpha$ -hidroxi DHEA fue a distancia el principal metabolito producido. Efectivamente, Doostzadeh y col [Steroids 63 (1998) 608-614] informaron de que la velocidad de producción de 7 $\alpha$ -hidroxi-DHEA por microsomas de hígado de ratón era más de quince veces la velocidad de producción de 7 $\beta$ -hidroxi-DHEA.

También se ha mostrado que EPIA, DHEA y pregnenolona son rápidamente y extensamente transformadas en sus correspondientes metabolitos 7 $\alpha$ -hidroxi en el cerebro de ratón [J M Guiraud y col, Steroids 34 (1979) 241-248; M Warmer y col, Endocrinology 124 (1989) 2699-2706; Y Akwa y col, Biochem. J. 288 (1992) 959-964].

El documento WO97/37664 describe el uso de ciertos compuestos específicos, que incluyen esteroides 7 $\alpha$ -hidroxi-sustituídos, para tratar trastornos neuropsiquiátricos, inmunes o endocrinos. Entre los trastornos sugeridos en WO97/37664 que se pueden tratar mediante el uso de estos compuestos se incluye la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, el mecanismo sugerido por para esta acción es que se hace la hipótesis de que el trastorno resulta de un déficit de esteroide 7 $\alpha$ -hidroxi-sustituído en el cerebro y el tratamiento que se propone en WO97/37664 rectifica así este déficit mediante la administración de esteroide 7 $\alpha$ -hidroxi-sustituído para reemplazar el compuesto perdido. El procedimiento descrito en WO97/37664 trata así una dolencia existente, en vez de prevenir la dolencia o prevenir un empeoramiento de la dolencia previniendo un daño neuronal adicional. Por lo tanto, WO97/37664 no describe un efecto neuroprotector. Tampoco sugiere que los compuestos se puedan usar para prevenir el daño causado por sucesos repentinos y traumáticos tales como ictus.

Los autores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que 7-hidroxi-epiandrosterona, ya sea  $\alpha$ ,  $\beta$  o una mezcla, se puede usar para proteger contra daño neuronal agudo y crónico causado por sucesos tales como ictus, trauma cerebral e isquemia cerebral que pueden ser inducidos por hemorragia sub-aracnoidea o que ocurren durante cirugía de puenteo de corazón etc.

Se encuentra uso en sucesos tales como hipoxia e isquemia prolongadas, que pueden estar asociados o no con hipoglicemia, daño neuronal, en varios grados.

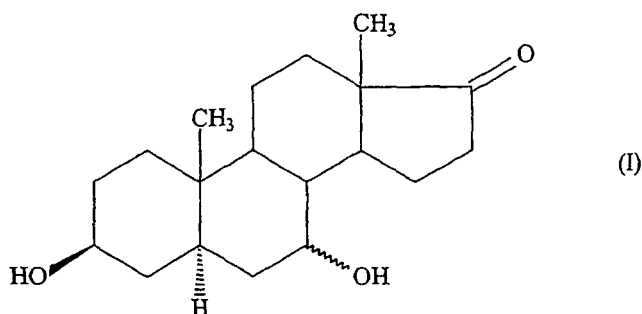
Se produce típicamente isquemia durante ataques cardíacos, pero el daño infringido en esos momentos se limita sustancialmente a los tejidos cardíacos, y se han desarrollado ciertos tratamientos. Con respecto a la presente invención, los autores se han implicado en los efectos de la isquemia sobre el cerebro a más largo plazo, tal como ocurre con los pacientes de ictus o como resultado de lesión encefálica. La gravedad de la isquemia depende de la naturaleza del ictus o de la lesión, pero, invariablemente, hay daño cerebral y es a éste al que se dirige la presente invención.

Se conocen en la técnica diversos agentes neuroprotectores que intentan aliviar el problemas del daño cerebral, pero todos los que se conocen actualmente tienden a estar asociados con efectos laterales adversos. Por ejemplo, MK801 (maleato de dizocilpina) es una molécula bastante simple y se sabe que proporciona un nivel de protección a pacientes isquémicos. Sin embargo, MK801 también está asociado con "efectos psicotrópicos alarmantes" (Martindale), así como efectos motores adversos. Los efectos neuroprotectores se detallan en Brain Research 755 (1997) 36-46 (Pringle, A.K., y col.) que se incorpora en este documento por referencia. Estos mismos autores también describen los efectos neuroprotectores de conotoxina en una comunicación anterior pero, a pesar de los efectos neuroprotectores de este compuesto, se observan, *in vivo*, efectos laterales adversos.

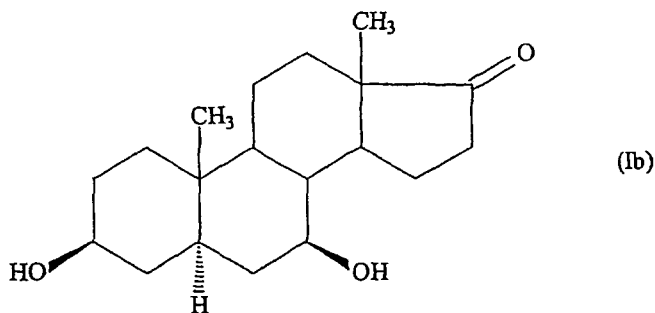
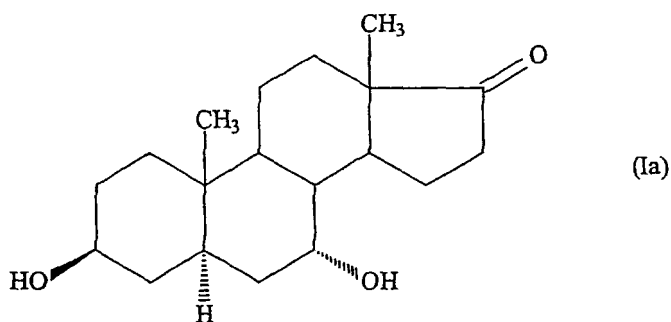
Así, la presente invención consiste en el uso para la fabricación de un medicamento para protección contra daño neuronal agudo y crónico de 7-hidroxiiepiandrosterona (7-hidroxi-EPIA),

## ES 2 310 182 T3

Este compuesto se puede representar por la fórmula (I):



y los isómeros  $7\alpha$  y  $7\beta$  son, respectivamente:



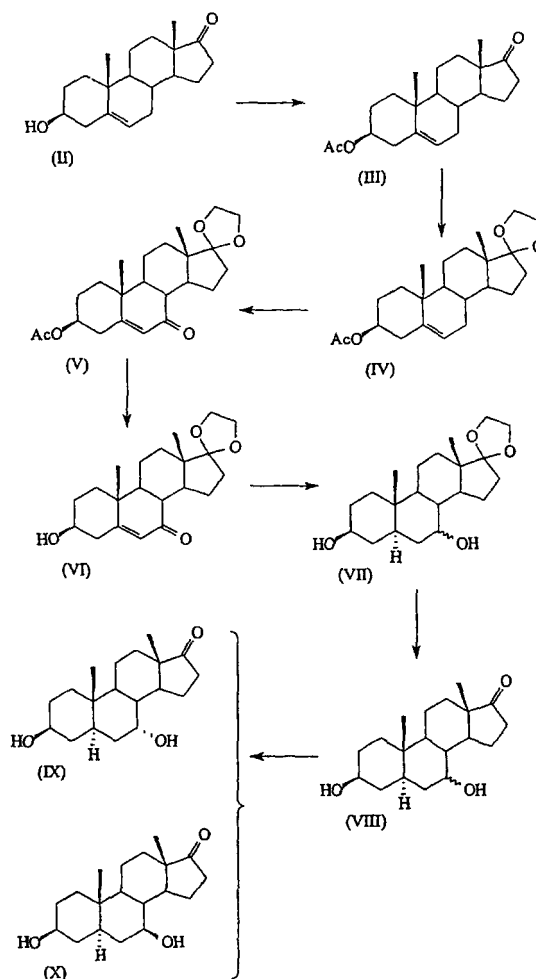
La invención también abarca el uso de precursores de estos compuestos y compuestos que, *in vivo*, son metabolizados para dar esos compuestos.

Los isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  se pueden usar solos o en mezcla y, si se usan en mezcla, se pueden presentar en proporciones cualesquiera. Sin embargo, el isómero  $7\beta$  parece que muestra mayor actividad y por lo tanto se prefiere actualmente.

Los compuestos de la presente invención se pueden preparar mediante una diversidad de procedimientos, bien conocidos por sí mismos, partiendo de esteroides padres. Por ejemplo, se pueden preparar mediante los procedimientos que se describen en la bibliografía anteriormente mencionada, que darían una mezcla de los compuestos  $7\beta$  y los correspondientes  $7\alpha$ , que se pueden separar a continuación mediante técnicas bien conocidas.

Como un ejemplo, se pueden obtener  $7\alpha$  y/o  $7\beta$ -hidroxi EPIA a partir de DHEA por oxidación alílica después de protección del grupo  $3\beta$ -hidroxi y el grupo 17-cetona usando procedimientos convencionales. El producto se reduce a continuación con un catalizador de compuesto de metal soluble (tal como hidruro de sodio) y se desprotegen los grupos  $3\beta$ -hidroxi y 17-cetona. Los epímeros  $7\alpha$ -hidroxi y  $7\beta$ -hidroxi se pueden separar a continuación, si se desea, por procedimientos convencionales, por ejemplo cromatografía de columna, y se pueden cristalizar para purificación  $7\alpha$ - y  $7\beta$ -hidroxi EPIA.

Alternativamente se pueden preparar 7 $\alpha$ - y 7 $\beta$ -hidroxi-EPIA según se ilustra en el siguiente esquema de reacción:



En este esquema de reacción, se acetila DHEA (II) para dar el correspondiente acetato de fórmula (III), que se hace reaccionar a continuación con etilenglicol, para dar el cetal de fórmula (IV). El cetal (IV) se oxida a continuación según se describe en el Ejemplo 3, para dar el correspondiente compuesto 7-ceto (V), que se desacetila a continuación, para dar el compuesto de fórmula (VI). Éste se reduce para dar 7-hidroxi-17-cetal-EPIA de fórmula (VII), que se trata a continuación con un ácido para eliminar el grupo cetal y dar 7-hidroxi-EPIA, que se separa finalmente en isómeros 7 $\beta$ - y 7 $\alpha$ - por cromatografía para dar 7 $\alpha$ - hidroxi-EPIA (IX) y 7 $\beta$ -hidroxi EPIA (X).

Los compuestos de la presente invención se pueden aplicar a un paciente si se sospecha que está en peligro de un suceso isquémico, especialmente un ictus o lesión encefálica, o si se sospecha que va a desarrollar una enfermedad crónica neurodegenerativa, tal como enfermedad de Alzheimer o CIND, que pueda ser facilitada por isquemia cerebral crónica subumbral o por producción reducida de energía neuronal, tal como se observa frecuentemente en el cerebro de edad avanzada. La aplicación profiláctica de este tipo puede ser sobradamente útil. Sin embargo, también se ha demostrado que los compuestos de la presente invención tienen actividad útil, aún cuando se apliquen después de un suceso isquémico, pero se apreciará que se prefiere administrar los compuestos lo antes posible, a fin de evitar lo más posible la degeneración neuronal. En algunas circunstancias puede ser deseable administrar dosis repetidas, especialmente cuando el paciente permanece en peligro de un suceso isquémico.

Los procedimientos de administración adecuados generalmente son por inyección, a fin de conseguir el resultado deseado lo antes posible. Así, se prefiere particularmente la inyección intravenosa pero, en algunas circunstancias puede ser preferible administrar el compuesto directamente en el fluido cefalorraquídeo.

La dosis del compuesto de la presente invención variará dependiendo de muchos factores, que incluyen la edad, peso corporal y estado general del paciente, así como del modo, frecuencia y ruta de administración. Sin embargo, se recomienda generalmente una dosis de 0,01 a 50 mg/kg de peso corporal, siendo más preferida una dosis de 0,05 a 20 mg/kg de peso corporal. Ésta se puede administrar en una dosis sencilla o en dosis divididas.

## ES 2 310 182 T3

La invención se ilustra adicionalmente por los siguientes Ejemplos no limitativos, de los que los Ejemplos 1 a 7 ilustran la preparación de compuestos de la presente invención y los Ejemplos 8 y 9 ilustran su actividad. En los Ejemplos 1 a 7, los números romanos se refieren a las fórmulas en los esquemas de reacción que se han mostrado anteriormente.

### Ejemplo 1

#### *DHEA-3-acetato (III)*

Una solución de 50 ml de piridina y 50 ml de anhídrido acético que contenía 10 g de DHEA (II) (34,72 mmol) se calentó a reflujo durante 4 horas. Se enfrió el medio de reacción, se vertió en agua y se extrajo con acetato de etilo. Se secó la fase orgánica sobre sulfato sódico anhidro y se evaporó a sequedad. Se obtuvieron 11,0 g de DHEA-3-acetato (III) (33,33 mmol, 96%), que se recrystalizó con etanol.

### Ejemplo 2

#### *17-cetal-DHEA-3-acetato (IV)*

Una solución de 100 ml de tolueno que contenía 5 g de DHEA-3-acetato (III) (15,15 mmol), 5 ml de etilenglicol y una cantidad catalítica de ácido p-toluenosulfónico se calentó a reflujo con destilación a vapor usando un aparato de Dean-Stark durante 24 horas. El medio de reacción se vertió en 100 ml de solución acuosa de carbonato potásico al 10% peso/volumen. Se decantó la fase orgánica. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. Se combinaron las fases orgánicas y se evaporaron a sequedad. Se obtuvieron 5,10 g de 17-cetal-3-DHEA-acetato (IV) (13,64 mmol, 90%), que se recrystalizó con etanol.

### Ejemplo 3

#### *7-ceto-17-cetal-DHEA-3-acetato (V)*

Una solución de 70 ml de piridina que contenía 5 g de 17-cetal-DHEA-3-acetato (IV) (13,37 mmol) y una cantidad catalítica de rosa bengala se irradió usando una lámpara de vapor de mercurio de presión media con burbujeo de oxígeno. Se añadió una cantidad catalítica de acetato de cobre al medio de reacción después de 24 horas. El medio de reacción, después de 24 horas, se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía relámpago ( $\text{SiO}_2$ /acetato de etilo:ciclohexano 3/7). Se obtuvieron 3,11 g de 7-ceto-17-cetal-DHEA-3-acetato (V) (8,02 mmol, 60%).

### Ejemplo 4

#### *7-ceto-17-cetal-DHEA (VI)*

Una solución de 50 ml de metanol que contenía 1% de hidróxido potásico y 1 g de 7-ceto-17-cetal-DHEA-3-acetato (V) (2,58 mmol) se calentó a reflujo durante 2 horas. A continuación se enfrió el medio de reacción, se neutralizó y se extrajo a continuación con acetato de etilo. Se secó la fase orgánica sobre sulfato sódico anhidro y se evaporó a continuación a sequedad. Se obtuvieron 802 mg de 7-ceto-17-cetal-DHEA (VI) (2,32 mmol, 90%), que se recrystalizó con metanol.

### Ejemplo 5

#### *7-hidroxi-17-cetal-EPIA (VII)*

Se añadieron 10 g de 7-ceto-17-cetal-DHEA (VI) (28,90 mmol) a una solución de amoníaco líquido a  $-33^\circ\text{C}$  que contenía 2,65 g de sodio. Después de 4 horas, se añadió cloruro amónico hasta que desapareció el color azul. Se añadieron a continuación 2,65 g de sodio. Después de 4 horas, se añadió de nuevo cloruro amónico hasta que desapareció el color azul. Se añadió agua y se dejó evaporar el amoníaco. Se extrajo el medio de reacción con acetato de etilo. Se secó la fase orgánica sobre sulfato sódico anhidro y se evaporó a continuación a sequedad. Se obtuvieron 6,07 g de 7-hidroxi-17-cetal-EPIA (VII) (17,34 mmol, 60%).

### Ejemplo 6

#### *7-hidroxi-EPIA (VIII)*

Una solución de 100 ml de acetona que contenía 5 g de agua, 10 g de 7-hidroxi-17-cetal-EPIA (VII) (28,57 mmol, 50%) y una cantidad catalítica de ácido p-toluenosulfónico se calentó a reflujo durante 4 horas. Se enfrió el medio de reacción, se vertió en 100 ml de solución acuosa de carbonato potásico al 10% peso/volumen y a continuación se extrajo con acetato de etilo. Se secó la fase orgánica sobre sulfato sódico anhidro y se evaporó a continuación a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía relámpago ( $\text{SiO}_2$ /acetato de etilo). Se obtuvieron 5,24 g de 7-hidroxi-EPIA (VIII) (17,14 mmol, 60%).

## Ejemplo 7

*7 $\alpha$ -hidroxi-EPIA (IX) y 7 $\beta$ -hidroxi-EPIA (X)*

5 7-hidroxi-EPIA (VIII) (5 g) que contenían epímeros 7 $\alpha$  y 7 $\beta$  en una relación 65/35 se purificó por cromatografía relámpago (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/CHCl<sub>3</sub>). En primer lugar se obtuvo 7 $\beta$ -hidroxi-EPIA (X) (2,5 g), antes de 7 $\alpha$ -hidroxi-EPIA (IX) (1,34 g). 7 $\beta$ -hidroxi-EPIA (X) y 7 $\alpha$ -hidroxi-EPIA (IX) se recrystalizaron con acetato de etilo.

## Ejemplo 8

10

*Protocolo para estudiar el daño neuronal hipóxico*

Se prepararon cultivos organotípicos de rodajas de hipocampo usando el procedimiento básico de Pringle y col (1996, 1997) modificado como sigue:

15

Se decapitaron crías de rata Wistar (de 8-11 días de edad) y se hicieron rápidamente las disecciones de los hipocampos en solución salina equilibrada de Gey enfriada en hielo y suplementada con 4,5 mg/ml de glucosa. Se separaron las rodajas y se extendieron en inserciones de cultivo Millicell CM (4 por pocillo) y se mantuvieron a 37°C/5% CO<sub>2</sub> durante 14 días. El medio de mantenimiento consistió en 25% de suero de caballo inactivado por calor, 25% de solución salina equilibrada de Hank (SSEH) y 50% de medio esencial mínimo al que se han añadido sales de Earle (MEM) suplementado con glutamina 1 mM y 4,5 mg/ml de glucosa. El medio se cambió cada 3-4 días.

20

Se llevó a cabo la hipoxia experimental según se ha descrito previamente (Pringle y col., 1996; 1997). En resumen, los cultivos se transfirieron a un medio exento de suero (MES - 75% MEM, 25% SSEH suplementado con glutamina 1 mM y 4,5 mg/ml de glucosa) que contenía 5  $\mu$ g/ml del colorante fluorescente de exclusión yoduro de propidium (YP). Se dejó que se equilibraran los cultivos en MES durante 60 minutos antes del estudio por imágenes. La fluorescencia de YP se detectó usando un microscopio invertido Leica provisto de un juego de filtros de rodamina. Cualquier cultivo en el que se detectó fluorescencia de YP en esta etapa se excluyó de continuar en el estudio. Se indujo hipoxia transfiriendo cultivos a MES (+YP) que había sido saturado con 95%N<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>. Las placas de cultivo (sin tapas) se cerraron a continuación en una cámara estanca en la se que había saturado la atmósfera con 95%N<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub> insuflando continuamente a través de ella gas a 10L/min durante 10 minutos antes de que fuera cerrada y colocada en la incubadora durante 170 minutos (el tiempo total de hipoxia fue por tanto 180 minutos). Al final del período hipóxico los cultivos se devolvieron a MES normóxico que contenía YP y se volvieron a colocar en la incubadora durante 24 horas.

Se evaluó el daño neuronal en según se ha descrito previamente (Pringle y col., 1996; 1997) usando NIH Image 1.60 que corre en un ordenador Apple IIsi u Openlab 2.0 (Improvision) que corre en un Macintosh G4/400. Las imágenes se capturaron usando una cámara monocroma y se guardaron en un disco óptico para análisis por separado. Se capturaron imágenes de transmisión de luz con anterioridad a la adición de fármacos, y las imágenes de fluorescencia de YP se registraron al final del período de recuperación post- hipoxia de 24 horas. A partir de la imagen de transmisión se determinó el área de la capa celular CA1. Se midió el área de fluorescencia de YP en CA1 usando la función de densidad de rodaja dentro de NIH Image u Openlab, y se expresó el daño neuronal como el porcentaje de CA1 en la que se detectó fluorescencia de YP por encima del fondo.

Se prepararon compuestos de esteroide haciendo una solución inicial de 1 mg/ml en etanol y diluyendo posteriormente en MES. Se añadieron compuestos a los cultivos durante 45 minutos antes de la hipoxia, durante el episodio hipóxico y durante el período de recuperación post-hipóxico. Los experimentos de control consistieron en cultivos tratados con vehículo solo.

*Resultados*

50

## Experimento 1

Se llevó a cabo un experimento inicial para determinar si 7 $\alpha$ OH-EPIA y 7 $\beta$ OH-EPIA eran neuroprotectores a una concentración alta de 100 nM. La hipoxia produjo lesión en 25,5 $\pm$ 6,4% de CA1. Este daño se redujo significativamente por ambas 7 $\alpha$ OH-EPIA y 7 $\beta$ OH-EPIA cuando estaban presentes antes, durante y después de la hipoxia según se muestra en la Tabla 1, a continuación.

55

TABLA 1

60

Compuesto	N	% Daño en CA1
Control hipoxia	17	25,5 $\pm$ 6,4
Hipoxia + 100nM 7 $\alpha$ OH-EPIA	16	4,0 $\pm$ 2,9
Hipoxia + 100nM 7 $\beta$ OH-EPIA	16	9,0 $\pm$ 4,7

65

## Experimento 2

Habiendo determinado que ambos isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  de 7OH-EPIA eran neuroprotectores, los autores de la presente invención evaluaron la dependencia de la concentración de este efecto. El control de hipoxia dio como resultado un daño neuronal de  $31,9 \pm 4,7\%$  de CA1. 7 $\alpha$ OH-EPIA fue significativamente protectora a 100 nM. Se observó una reducción pequeña, pero no significativa estadísticamente, en daño neuronal a 10 nM, y no hubo efecto a 1 nM. En contraposición, 7 $\beta$ OH-EPIA fue significativamente neuroprotectora a 10 nM y 100 nM, pero la actividad se perdía si la concentración se reducía a 1 nM (véase Tabla 2).

TABLA 2

Compuesto	N	% Daño en CA1
Control hipoxia	29	$31,9 \pm 4,7$
Hipoxia + 1nM 7 $\alpha$ OH-EPIA	14	$28,8 \pm 5,8$
Hipoxia + 10nM 7 $\alpha$ OH-EPIA	15	$21,9 \pm 8,1$
Hipoxia + 100nM 7 $\alpha$ OH-EPIA	16	$11,8 \pm 2,8^{**}$
Hipoxia + 1nM 7 $\beta$ OH-EPIA	15	$20,6 \pm 7,2$
Hipoxia + 10nM 7 $\beta$ OH-EPIA	12	$11,9 \pm 4,7^*$
Hipoxia + 100nM 7 $\beta$ OH-EPIA	13	$14,3 \pm 5,0^*$

## Ejemplo 9

*Isquemia cerebral global en ratas (oclusión de 4 vasos)*

Se indujo isquemia cerebral por oclusión de cuatro vasos (4VO) en ratas Wistar macho (250-280 g). Se ocluyeron ambas arterias vertebrales mediante electrocauterización con anestesia de pentobarbital (60 mg/kg i.p.). Se dejó que los animales se recuperaran durante 24 horas con acceso libre al agua pero no a la comida. Al día siguiente las arterias carótidas se expusieron bajo anestesia de 2% de halotano en 30% oxígeno/70% óxido nitroso y se ocluyeron durante 10 minutos usando pinzas microvasculares. Posteriormente, se retiraron ambas pinzas y se inspeccionaron ambas arterias respecto a reperusión inmediata. Durante la operación y las 3 horas siguientes se mantuvo la normotermia de los animales ( $37,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ) usando una manta calefactora controlada termostáticamente conectada a un termómetro rectal. Para control, en animales sometidos a operación ficticia se cauterizaron ambas arterias vertebrales con anestesia de pentobarbital y ambas arterias carótidas comunes se expusieron pero no se pinzaron bajo anestesia de 2% de halotano en 30% oxígeno/70% óxido nitroso al día siguiente. La herida se trató con lidocaína y se suturó a continuación. Los animales se mantuvieron bajo una lámpara calefactora a temperatura ambiente de  $30^\circ\text{C}$  hasta que recuperaron la consciencia.

Se investigaron siete grupos de animales:

1. (n=8) compuesto esteroideo, 7 $\beta$ OH EPIA (0,1 mg/kg, i.v. vía vena de la cola, tres inyecciones: 15 minutos antes de la inducción de la isquemia, durante la isquemia y 5 minutos después de reperusión);
2. (n=8) compuesto esteroideo, 7 $\beta$ OH EPIA (0,3 mg/kg, i.v., tres inyecciones según se describe en 1.);
3. (n=8) compuesto esteroideo, 7 $\beta$ OH EPIA (1 mg/kg, i.v., tres inyecciones según se describe en 1.);
4. (n=8) NBQX (sal disódica, por más soluble en agua) como sustancia de referencia y control positivo (TOCRIS, Alemania, 30 mg/kg, i.p., tres inyecciones según se describe en 1.);
5. (n=8) recibieron vehículo (0,9% NaCl, que contenía 100  $\mu\text{l}$  de etanol) tres inyecciones según se describe en 1.);
6. (n=8) isquemia sola;
7. (n=8) controles operados ficticios

NBQX es 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)quinoxalina y se sabe que tiene actividad neuroprotectora [Gill, R., Nordholm, L., Lodge, D.: The neuroprotective action of 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)quinoxaline (NBQX) in a rat focal ischaemia model. Brain Res. 580, 35-43, 1992].

7 $\beta$ OH EPIA es 7 $\beta$ -hidroxiepiandrosterona, un compuesto de la presente invención.

Las sustancias se disolvieron en 100  $\mu$ l de etanol y finalmente se diluyeron con NaCl al 0,9%.

Después de un tiempo de supervivencia de 7 días después de la isquemia, todos los animales fueron sometidos a perfusión fijada transcardíacamente con paraformaldehído al 4%. Se retiraron a continuación los cerebros cuidadosamente y se postfijaron en el mismo fijador durante 2 horas. Después de crioprotección en sacarosa al 30%, los cerebros se congelaron rápidamente en isopentano y se almacenaron a -80°C. Secciones criostáticas de veinte micrómetros que comprendían la formación del hipocampo se sometieron a tinción de Nissl con azul de toluidina o fluorescencia NeuroTrace.

#### *Análisis de los datos*

La gravedad del daño neuronal en la región del hipocampo CA1 después de la isquemia se evaluó mediante el número de neuronas supervivientes usando tinción de Nissl. Se calculó el número medio de neuronas morfológicamente intactas por 400  $\mu$ m de longitud en la región CA1 para cada grupo. El conteo celular se llevó a cabo en 3-5 secciones en serie por animal y 6 veces un área de CA1 de 400  $\mu$ m por sección usando un microscopio óptico equipado con objetivo 20x. Los datos se analizaron estadísticamente mediante la prueba t de Student pareada. Los datos se presentaron como media $\pm$ SEM.

#### *Resultados y discusión*

Los resultados se muestran en las Figuras 1 a 3 de los dibujos que se acompañan.

Las neuronas morfológicamente intactas del hipocampo CA1 fueron caracterizadas mediante tinción de Nissl (azul de toluidina y NeuroTrace, Fig. 2) con los siguientes criterios: forma clara de perikarya neuronal, núcleo grande con nucleolo positivo marcado, una pequeña zona de citoplasma alrededor del núcleo con tinción de Nissl positiva, que indica el retículo endoplasmático aproximadamente intacto con ribosomas y por lo tanto la maquinaria de síntesis de proteína intacta.

10 minutos de isquemia global (isquemia suave) y un tiempo de supervivencia de 7 días conducen a neurodegeneración de células selectivamente en la región del hipocampo CA1 (Fig. 1A-1C). El número medio de células piramidales en CA1 de animales sometidos a operación ficticia fue 121,5 $\pm$ 4,3 (fijado como 100%). Por lo tanto, 60% de neuronas de CA1 murieron después de 10 minutos de isquemia global (Fig. 1B). El número de neuronas en el grupo de animales de isquemia e inyección i.v. de vehículo (NaCl más 100  $\mu$ l de etanol) aplicada según se describe en el experimento fue comparable al del grupo de isquemia sola (Fig. 1A, 1B). NBQX (30 mg/kg, i.v. tres inyecciones según se describe en el experimento) mostró una neuroprotección significativa ( $p=0,03$ ) en células piramidales CA1 en comparación con el grupo de isquemia. En comparación con isquemia sola NBQX conduce a 47,5% de neuroprotección mientras que si se comparaba con los animales sometidos a operación ficticia el efecto protector era de 68,5%. La neuroprotección producida por NBQX estaba en conformidad con Gill y col., 1992 y Gill 1994 demostrando la validez del modelo de isquemia global que los autores de la presente invención han usado en sus experimentos. 7 $\beta$ OH EPIA conduce a neuroprotección, que depende de la concentración, de las células piramidales de hipocampo CA1 después de 10 minutos de isquemia global y un tiempo de supervivencia de 7 días (Fig. 1A). El análisis de la prueba t reveló un efecto neuroprotector altamente significativo de 7 $\beta$ OH EPIA a concentraciones de 0,1 mg/kg ( $p=0,01$ ) y 0,3 mg/kg ( $p=0,0008$ ). En comparación con el grupo sometido a operación ficticia 7 $\beta$ OH EPIA mostró un efecto neuroprotector de 74,8% (0,1 mg/kg) y un 83,9% (0,3 mg/kg) sobre células piramidales CA1, respectivamente (Fig. 1C). 7 $\beta$ OH EPIA a una concentración de 1,0 mg/kg mostró sólo tendencia a neuroprotección, pero el efecto no fue significativo.

En todos los experimentos con 7 $\beta$ OH EPIA inyectada antes, durante y después de la isquemia los autores de la presente invención nunca observaron anomalía alguna en el comportamiento de los animales.

#### *Leyendas de las Figuras*

Número de células piramidales de hipocampo CA1 morfológicamente intactas en ratas 7 días después de isquemia cerebral global en ratas y bajo influencia de compuestos diferentes.

Los datos se presentaron como número medio  $\pm$ SEM de neuronas intactas por 400  $\mu$ m de longitud de la región CA1.

Los datos se expresaron como porcentaje de neuronas intactas por 400  $\mu$ m de longitud de la región CA1 comparados con los de animales sometidos a operación ficticia fijados como 100%.

Los datos se presentaron como porcentaje absoluto de neuroprotección cuando el número de neuronas supervivientes en el grupo de isquemia se fijó en cero y las del grupo sometido a operación ficticia se fijó en 100%.

REIVINDICACIONES

1. El uso de 7-hidroxiapiandrosterona para la fabricación de un medicamento para protección contra daño neuronal agudo y crónico.

2. El uso según la reivindicación 1, en el que la 7-hidroxiapiandrosterona es 7 $\alpha$ -hidroxiapiandrosterona.

3. El uso según la reivindicación 1, en el que la 7-hidroxiapiandrosterona es 7 $\beta$ -hidroxiapiandrosterona.

4. El uso según la reivindicación 1, en el que la 7-hidroxiapiandrosterona es una mezcla de 7 $\alpha$ -hidroxiapiandrosterona y 7 $\beta$ -hidroxiapiandrosterona.

5. El uso según cualquier reivindicación precedente, en el que el daño neuronal está producido por ictus o trauma cerebral.

6. El uso según cualquier reivindicación precedente, en el que el daño neuronal está producido por enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, discapacidad cognitiva no demencial, lesión de la médula espinal o lesión del nervio periférico.

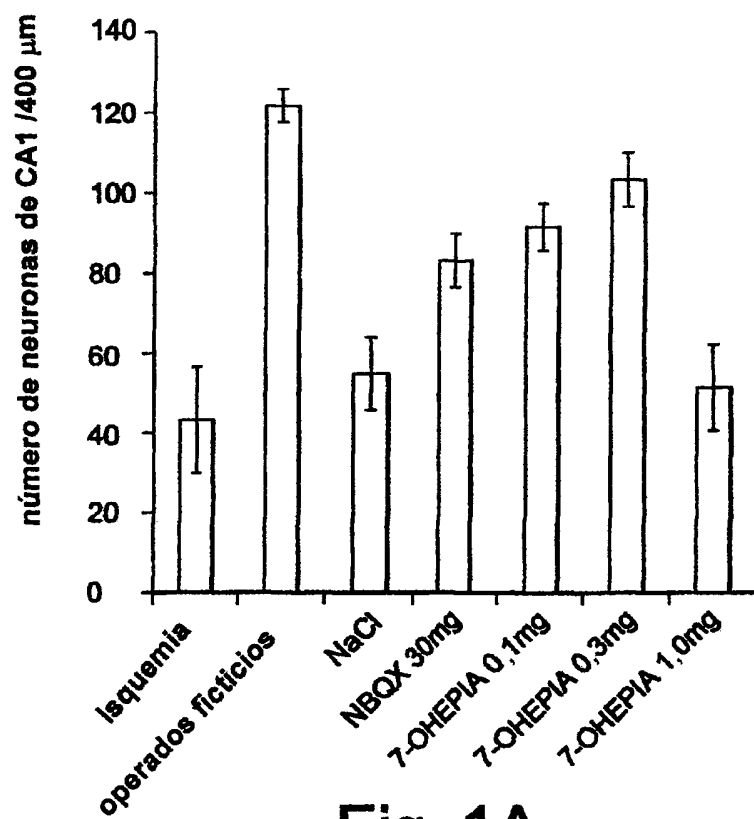


Fig. 1A

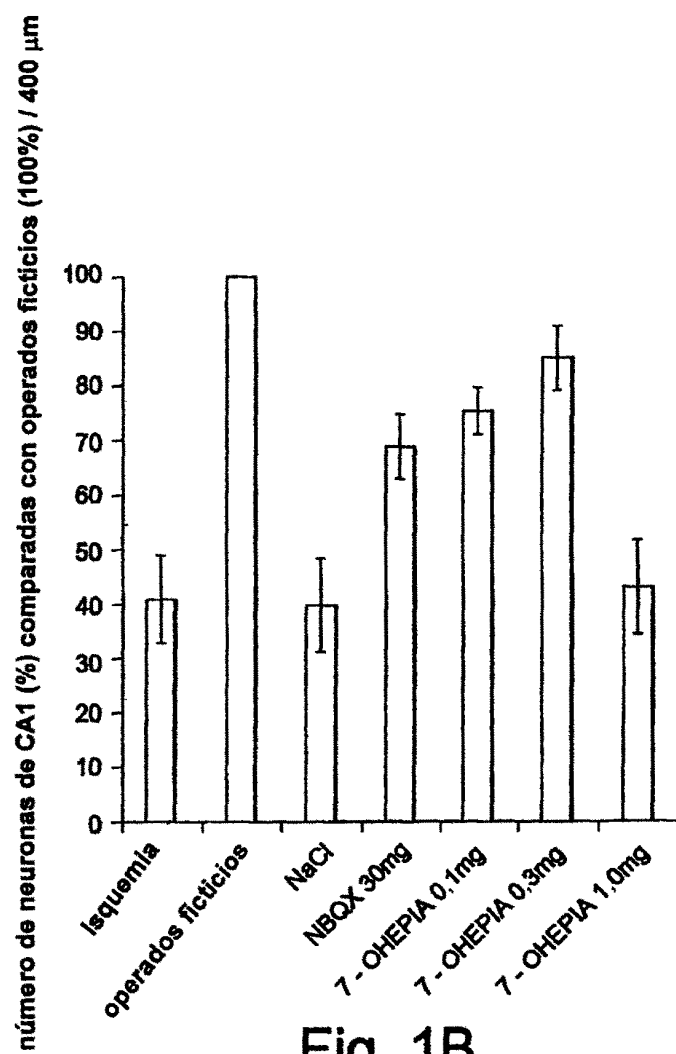


Fig. 1B

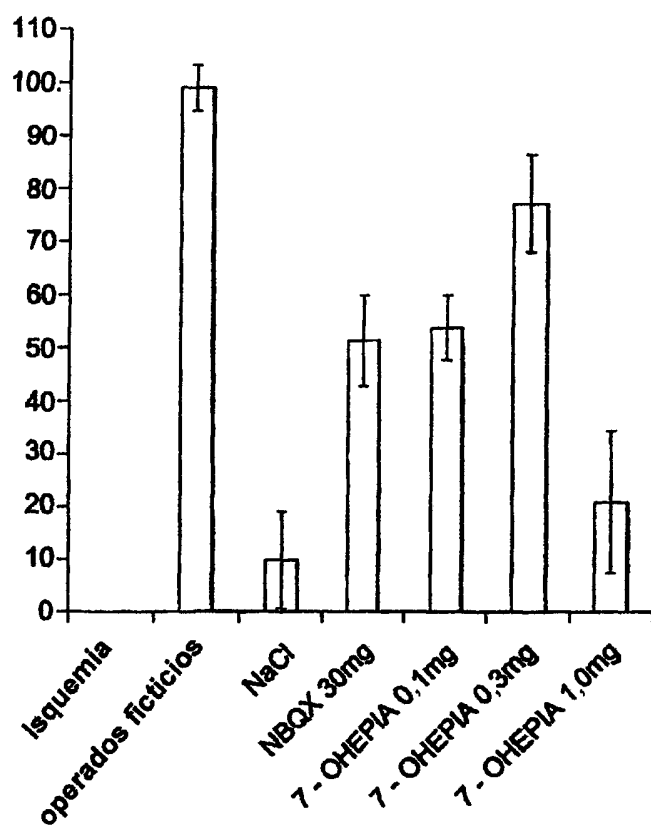


Fig. 1C