

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 364 683**

21 Número de solicitud: 200902399

51 Int. Cl.:

A61K 31/7016 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **29.12.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **12.09.2011**

Fecha de la concesión: **27.07.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **08.08.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
08.08.2012

73 Titular/es:

**BIOIBÉRICA S.A.
PL. FRANCESC MACIÀ 7
08029 BARCELONA, ES y
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

72 Inventor/es:

**VERGÉS MILANO, JOSEP;
GARCÍA GARCÍA, ANTONIO;
RUHÍ ROURA, RAMÓN;
MONTELL BONAVENTURA, EULALIA;
GARCÍA LÓPEZ, MANUELA;
ALÁEZ VERSÓN, CARLOS RAÚL;
ESCAICH FERRER, JOSEP y
EGEA MAÍQUEZ, JAVIER**

74 Agente/Representante:

Sugrañes Moliné, Pedro

54 Título: **DISACÁRIDOS SULFATADOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS Y/O NEUROVASCULARES.**

57 Resumen:

La presente invención se refiere al uso de una serie de disacáridos sulfatados para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa y/o neurovascular, de un traumatismo craneoencefálico o de un traumatismo de la médula espinal. La presente invención también se refiere al uso de dichos disacáridos sulfatados para la preparación de un medicamento neuroprotector o de un medicamento antioxidante. Preferentemente las enfermedades neurodegenerativas y/o neurovasculares son: la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, y el ictus.

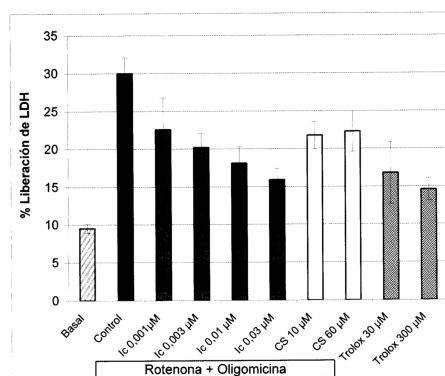


FIGURA 1

ES 2 364 683 B1

DESCRIPCIÓN

Disacáridos sulfatados para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y/o neurovasculares.

5 Sector técnico de la invención

La presente invención se refiere al uso de una serie de disacáridos sulfatados para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa y/o neurovascular, así como para el tratamiento de un traumatismo craneoencefálico o de la médula espinal. De igual modo, la presente invención se refiere al uso de dichos disacáridos sulfatados para la preparación de un medicamento neuroprotector.

Antecedentes de la invención

Las enfermedades neurodegenerativas, las enfermedades neurovasculares y los traumatismos craneoencefálicos y de la médula espinal constituyen una de las causas de incapacidad y muerte más importantes en la población. Entre éstas enfermedades destacan la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y el ictus.

Estas enfermedades se caracterizan en general por una pérdida de neuronas, lo cual se traduce en la aparición de alteraciones en el lenguaje y la memoria en la enfermedad de Alzheimer, alteraciones en la coordinación de movimientos en la enfermedad de Parkinson, la paralización de los músculos voluntarios que intervienen en la motilidad, el habla y la respiración en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), las hemiplejías y pérdidas sensoriales en el ictus y la parálisis en los traumatismos craneoencefálicos y de la médula espinal.

El estrés oxidativo celular está implicado en diversas enfermedades neurodegenerativas y neurovasculares. El sistema nervioso central, y en concreto el cerebro, tiene un alto requerimiento de oxígeno. El consumo de oxígeno conduce a la sobreproducción de las denominadas especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como los radicales libres tipo superóxido o hidroxilo o el oxígeno no radical como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que producen daños tanto en las células neuronales como en las vasculares (*Oxidative neurotoxicity in rat cerebral cortex neurons synergistic effects of H_2O_2 and NO on apoptosis involving activation of p38 mitogen-activated protein kinase and caspase-3*, J.Y. Wang et al., *J. Neurosci. Res.* 72, 508-519 (2003)). Para controlar los niveles de estos compuestos oxidantes, las células disponen de sistemas antioxidantes, tales como superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, transferrina o la vitamina E. En condiciones fisiológicas normales existe un equilibrio entre estos sistemas antioxidantes y las especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, pueden surgir problemas cuando dicho equilibrio se altera debido a una disminución de las defensas antioxidantes y/o a una sobreproducción de las especies reactivas de oxígeno. En esas condiciones, el estrés oxidativo puede producir lesión celular y posterior muerte celular, siendo las neuronas las células particularmente vulnerables.

Es conocido que el estrés oxidativo es uno de los principales mecanismos de muerte celular en distintos modelos citotóxicos, tales como el del glutamato (*Glutamate induces oxidative stress and apoptosis in cerebral vascular endothelial cells: contributions of HO-1 and HO-2 to cytoprotection*, H. Parfenova et al., *Am. J. Physiol.* 290, C1399-C1410 (2006)) o en el modelo de citotoxicidad inducida por H_2O_2 (*Distinct protective mechanisms of HO-1 and HO-2 against hydroperoxide-induced cytotoxicity*, Y.S. Kim et al., *Free Radic. Biol. Med.* 38, 85-92 (2005)) y en enfermedades neurodegenerativas y neurovasculares tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, el ictus y la arterioesclerosis (*Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview*, E. Mariani et al., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 827, 65-75 (2005); *Oxidative stress and neuronal death/survival signaling in cerebral ischemia*, A. Saito et al., *Mol. Neurobiol.* 31, 105-116 (2005); *Oxidative stress in the context of acute cerebrovascular stroke*, M.M.H. El Kossi et al., *Stroke* 31, 1889-1892 (2000); *The oxidant stress hypothesis of atherogenesis*, L. Iuliano, *Lipids* 36, suppl: S41-44 (2001)).

Los compuestos de la presente invención son disacáridos que contienen uno o más grupos sulfato en su estructura, descritos por primera vez en la patente EP 1300411 (US 6,680,304). Son útiles en el tratamiento de la artrosis (patente EP 1300411) y en el tratamiento de enfermedades de tendones, ligamentos y huesos (solicitud de patente WO 2008/151898).

La estructura básica de estos compuestos contiene los monosacáridos ácido glucurónico y glucosamina, enlazados mediante uniones β -(1 $\rightarrow$ 3), y con un grupo sulfato en el C-4 y/o en el C-6 del monosacárido glucosamina.

A la vista de lo anterior, es de gran interés encontrar fármacos capaces de proteger a las neuronas bajo condiciones de estrés oxidativo, y de reducir la generación de especies reactivas de oxígeno. Dichos fármacos podrían ser de gran utilidad como herramientas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y/o neurovasculares, así como para el tratamiento de traumatismos craneoencefálicos o de la médula espinal.

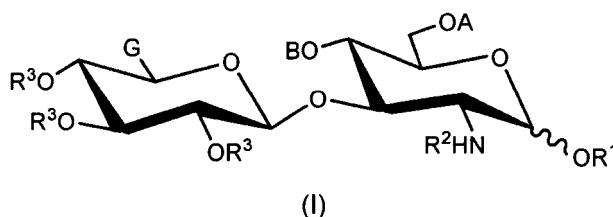
Hasta el momento no se ha encontrado descrito el uso de los disacáridos sulfatados de la presente invención en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa y/o de una enfermedad neurovascular así como en el tratamiento de un traumatismo craneoencefálico o de la médula espinal.

Explicación de la invención

Los presentes inventores han encontrado que, sorprendentemente, los compuestos descritos en la patente EP 1300411, definidos por la fórmula (I), reducen la formación de especies reactivas de oxígeno, presentan actividad neuroprotectora, protegiendo frente a la muerte celular inducida por estrés oxidativo y protegiendo frente a la muerte celular ocasionada por la privación de oxígeno y glucosa. Además, dichos compuestos no presentan toxicidad celular y reducen la liberación de marcadores inflamatorios por parte de los astrocitos. Por ello, los compuestos de fórmula (I) pueden ser utilizados en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y/o neurovasculares, de un traumatismo craneoencefálico o de un traumatismo de la médula espinal, y también como neuroprotectores.

Los presentes inventores también han encontrado que el proceso de obtención del disacárido disulfatado le descrito en la presente invención, presenta la ventaja de obtener dicho compuesto con un mayor rendimiento respecto al procedimiento descrito anteriormente en la patente EP 1300411.

Así pues, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I):



o una sal farmacéuticamente aceptable, profármaco o solvato del mismo,

en la que:

R^1 se selecciona entre hidrógeno, C_1 - C_4 alquilo lineal o ramificado, fenilalquilo de menos de diez átomos de carbono y $-\text{COCH}_3$;

R^2 se selecciona entre hidrógeno, $-\text{COCH}_3$ y $-\text{SO}_3\text{Y}$;

R^3 se selecciona entre hidrógeno, C_1 - C_4 alquilo lineal o ramificado, fenilalquilo de menos de diez átomos de carbono, $-\text{COCH}_3$ y $-\text{COPh}$, donde Ph es fenilo;

G se selecciona entre $-\text{COOR}^4$ y $-\text{COOY}$;

A y B se seleccionan, independientemente entre sí, entre hidrógeno, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{Y}$ y $-\text{COCH}_3$,

en donde necesariamente o A o B es o bien $-\text{SO}_3\text{H}$, o bien $-\text{SO}_3\text{Y}$;

R^4 se selecciona entre hidrógeno y C_1 - C_2 alquilo o arilalquilo de menos de dieciséis átomos de carbono,

Y es un catión orgánico o inorgánico,

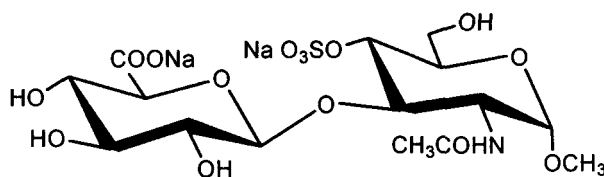
para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa y/o neurovascular, de un traumatismo craneoencefálico o de un traumatismo de la médula espinal en un mamífero, especialmente en el hombre.

En una realización preferida, los compuestos de fórmula (I) son aquellos donde R^1 se selecciona entre hidrógeno y C_1 - C_4 alquilo lineal y G se selecciona entre $-\text{COOR}^4$ y $-\text{COOY}$, donde R^4 es hidrógeno o C_1 - C_2 alquilo e Y es un catión inorgánico.

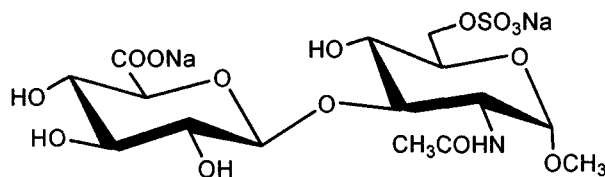
En una realización más preferida, los compuestos de fórmula (I) son aquellos donde: R^1 es hidrógeno, R^2 es $-\text{COCH}_3$ y R^3 es hidrógeno. Igualmente preferidos son los compuestos de fórmula (I) donde R^1 es metilo, R^2 es $-\text{COCH}_3$ y R^3 es hidrógeno.

En una realización particularmente preferida, los compuestos de fórmula (I) son aquellos donde: A es hidrógeno, B es $-\text{SO}_3\text{Y}$ y G es $-\text{COOY}$, donde Y es un catión inorgánico. Son también particularmente preferidos los compuestos de fórmula (I) donde: A es $-\text{SO}_3\text{Y}$, B es hidrógeno y G es $-\text{COOY}$, donde Y es un catión inorgánico. Igualmente, son particularmente preferidos los compuestos de fórmula (I) donde: A y B son $-\text{SO}_3\text{Y}$ y G es $-\text{COOY}$, donde Y es un catión inorgánico.

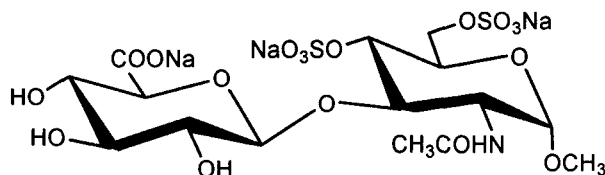
Un compuesto individual especialmente preferido de la invención es: la sal disódica de 2-acetamido-2-desoxi-3-*O*-(ácido β -D-glucopiranosil urónico)-4-*O*-sulfo- α -D-glucopiranosido de metilo, de fórmula:



Otro compuesto individual especialmente preferido de la invención es: la sal disódica de 2-acetamido-2-desoxi-3-*O*-(ácido β -D-glucopiranosil urónico)-6-*O*-sulfo- α -D-glucopiranosido de metilo, de fórmula:



Otro compuesto individual especialmente preferido de la invención es: la sal trisódica de 2-acetamido-2-desoxi-3-*O*-(ácido β -D-glucopiranosil urónico)-4,6-di-*O*-sulfo- α -D-glucopiranosido de metilo, de fórmula:



En otra realización preferida, la enfermedad neurodegenerativa y/o neurovascular está asociada a estrés oxidativo.

En otra realización igualmente preferida, la enfermedad neurodegenerativa y/o neurovascular está asociada a neuroinflamación.

En otra realización igualmente preferida, el medicamento es un medicamento antioxidante.

En otra realización igualmente preferida, el medicamento es un medicamento neuroprotector y/o neuroreparador.

En otra realización igualmente preferida, el medicamento es un medicamento para promover la neurogénesis, la emisión de neuritas o la plasticidad neuronal en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa y/o neurovascular, de un traumatismo craneoencefálico o de un traumatismo de la médula espinal.

En otra realización igualmente preferida el tratamiento resulta en el tratamiento de la neuroinflamación asociada a una enfermedad neurodegenerativa o neurovascular.

Preferentemente, la enfermedad neurodegenerativa y/o neurovascular se selecciona de entre el grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, ictus, accidente isquémico transitorio cerebral, enfermedad de Huntington, ataxia de Friedreich, encefalopatías espongiiformes, enfermedad con cuerpos de Lewy, enfermedad de Pik, deterioro cognitivo leve, epilepsia, migraña, esquizofrenia, enfermedad bipolar, demencia vascular y arterioesclerosis. De entre éstas enfermedades, las más preferidas son: la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y el ictus.

Preferentemente, el tratamiento resulta en el tratamiento de un traumatismo craneoencefálico o de la médula espinal.

La presente invención también se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable, profármaco o solvato del mismo, para la preparación de un medicamento neuroprotector y/o neuroreparador.

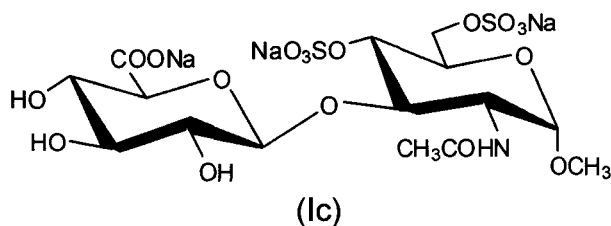
La presente invención también se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable, profármaco o solvato del mismo, para la preparación de un medicamento antioxidante, preferentemente útil en el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad.

Igualmente, la presente invención también se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I), para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad causada por estrés oxidativo, de una enfermedad que requiera neuroprotección o de una enfermedad que requiera neurogénesis en un mamífero.

Preferentemente el medicamento se adapta para administración oral o tópica o se presenta en forma inyectable.

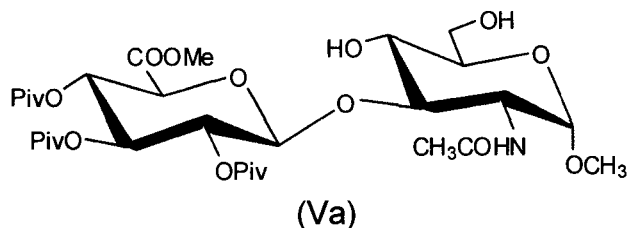
La presente invención también se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I), en la preparación de un reactivo para ensayos biológicos de estrés oxidativo en células o de privación de oxígeno y glucosa en tejidos.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para la preparación del compuesto de fórmula (Ic),



caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

(a) hacer reaccionar el compuesto de fórmula (Va)



con el complejo SO_3 .piridina;

(b) tratar el compuesto intermedio obtenido en la etapa (a) con hidróxido de sodio;

(c) purificar por precipitación en agua/alcohol isopropílico; y

(d) en caso de que después de la etapa (c) el compuesto de fórmula (Ic) todavía contenga sales, opcionalmente, purificarlo por cromatografía en columna.

La presente invención también se refiere a un compuesto representado por la fórmula (I) definida anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable, profármaco o solvato del mismo, para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa y/o neurovascular, de un traumatismo craneoencefálico o de un traumatismo de la médula espinal. Igualmente, la presente invención también se refiere a un compuesto representado por la fórmula (I) definida anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable, profármaco o solvato del mismo, para su uso en la preparación de un medicamento neuroprotector o de un medicamento antioxidante.

Los compuestos de fórmula (I) utilizados en la presente invención poseen un carbono anomérico en su estructura, por lo que las formas anoméricas α y β , así como sus mezclas están incluidas en la presente invención.

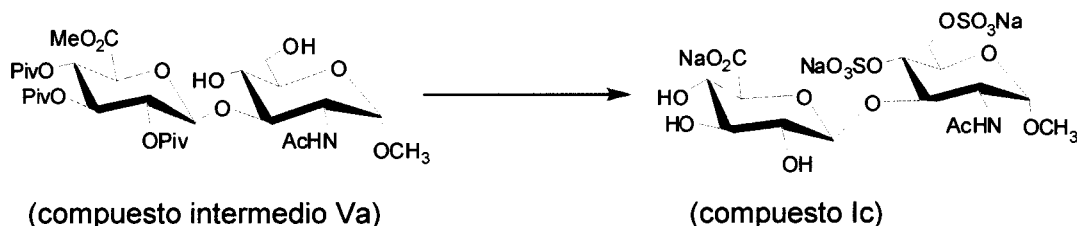
Los compuestos de fórmula (I) de la presente invención pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos. Los solvatos adecuados son solvatos farmacéuticamente aceptables. Preferentemente el solvato es un hidrato.

Los compuestos de fórmula (I) de la presente invención presentan niveles de pureza como principios activos superiores al 70%, preferiblemente superiores al 95%.

La preparación de los compuestos de fórmula (I), de acuerdo con la presente invención, puede llevarse a cabo siguiendo las rutas sintéticas descritas en la patente EP 1300411.

Dependiendo de la naturaleza del catión Y (orgánico o inorgánico, y entre estos últimos preferentemente los cationes metálicos), se pueden obtener sales orgánicas o inorgánicas. Ejemplos de sales inorgánicas incluyen, por ejemplo, las sales de sodio, potasio, calcio, magnesio, aluminio, amonio y litio. Ejemplos de sales orgánicas incluyen, por ejemplo, las sales de etanolamina, trietanolamina y aminoácidos básicos.

Además, en la presente invención se describe un procedimiento mejorado en planta piloto para obtener el compuesto Ic a partir del compuesto intermedio Va, ya que un inconveniente del procedimiento descrito anteriormente para esa etapa sintética era el bajo rendimiento.



A partir del compuesto intermedio Va, que puede ser preparado mediante el procedimiento descrito en la patente EP 1300411, se introducen los dos grupos sulfato empleando el complejo SO_3 .piridina y, sin aislar el intermedio formado, se lleva a cabo la eliminación de los grupos protectores pivaloilo para obtener el compuesto Ic. La purificación del compuesto Ic se lleva a cabo por precipitación, seguida, si se desea, de una cromatografía en columna.

Las modificaciones introducidas en la preparación del compuesto Ic a partir de Va, respecto al procedimiento descrito en la patente EP 1300411, son las siguientes:

- utilización del complejo trióxido de azufre-piridina (SO_3 .piridina) en presencia de piridina como solvente, en lugar de utilizar el complejo trióxido de azufre-trimetilamina (SO_3 .NMe₃) en el seno de *N,N*-dimetilformamida;
- eliminación de una etapa en el proceso sintético, al no aislar el intermedio con los dos grupos sulfato y los grupos protectores pivaloilo; y
- purificación del producto por precipitación con mezclas de agua/alcohol isopropílico.

Con estas modificaciones en el procedimiento de obtención del compuesto Ic a partir del compuesto intermedio Va, se consiguió un rendimiento del 31%, en lugar del 13,8% de rendimiento descrito anteriormente (dos pasos de síntesis).

Cuando en la presente invención se habla de profármaco se hace referencia a aquellos derivados que *in vivo* se convierten en los compuestos de la presente invención. Son preferidos aquellos profármacos que aumentan la biodisponibilidad de los compuestos de la presente invención cuando se administran a un paciente, o que potencian la liberación del compuesto de fórmula (I) en, por ejemplo, el cerebro.

Cuando en la presente invención se habla de medicamento neuroprotector se hace referencia a un medicamento para proteger las neuronas vulnerables en las enfermedades neurodegenerativas, neurovasculares y en los traumatismos craneoencefálicos y de la médula espinal.

Cuando en la presente invención se habla de medicamento neuroreparador se hace referencia a un medicamento para reparar las neuronas dañadas en las enfermedades neurodegenerativas, neurovasculares y en los traumatismos craneoencefálicos y de la médula espinal.

Cuando en la presente invención se habla de neurogénesis se hace referencia a la formación de nuevas neuronas y nuevas neuritas y conexiones interneuronales.

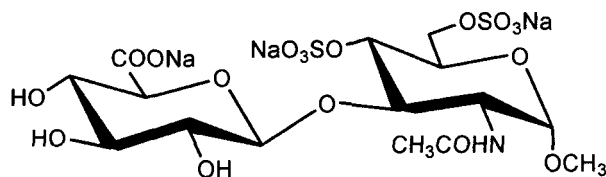
Cuando en la presente invención se habla de medicamento antioxidante se hace referencia a un medicamento anti especies reactivas de oxígeno o antirradicales libres.

Cuando en la presente invención se habla de neuroinflamación se hace referencia a la astrogliosis que se presenta en el sistema nervioso de pacientes con enfermedades neurodegenerativas y/o neurovasculares o con traumatismos craneoencefálicos o de la médula espinal.

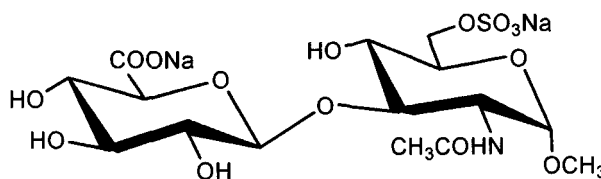
Para utilizar en el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa, de una enfermedad neurovascular, de un traumatismo craneoencefálico, de un traumatismo de la médula espinal, de una enfermedad causada por estrés oxidativo, de una enfermedad que requiera neuroprotección o neurogénesis, en el tratamiento o prevención de la neuroinflamación asociada a una enfermedad neurodegenerativa o neurovascular, como medicamento antioxidante o como medicamento neuroprotector y/o neuroreparador, los compuestos de fórmula (I) se formulan en composiciones farmacéuticas adecuadas, recurriendo a técnicas y excipientes o vehículos convencionales, como los descritos en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy 2000, edited by Lippincott Williams and Wilkins, 20th edition, Philadelphia*. Las composiciones farmacéuticas comprenden al menos un compuesto de fórmula (I) de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable, profármaco o solvato del mismo con un vehículo farmacéuticamente aceptable para la administración al paciente. Dichas composiciones farmacéuticas pueden administrarse al paciente en dosis requeridas. La administración de las composiciones farmacéuticas puede efectuarse por diferentes vías, por ejemplo, oral, intravenosa, intraperitoneal, intralesional, perilesional, intratendinosa, peritendinosa, intratecal, subcutánea, intramuscular, tópica, sublingual, transdérmica o intranasal. Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz de compuesto activo de fórmula (I), dependiendo dicha cantidad de muchos factores, como por ejemplo, el estado físico del paciente, edad, sexo, compuesto particular a utilizar, vía de administración, frecuencia de administración o gravedad de la enfermedad. Además, se entenderá que dicha dosificación de compuesto activo de fórmula (I) puede administrarse en unidades de dosis única o múltiple para proporcionar los efectos terapéuticos deseados.

Las preparaciones farmacéuticas de la invención generalmente estarán en forma sólida, líquida o como gel. Entre las preparaciones farmacéuticas en forma sólida que pueden prepararse de acuerdo con la presente invención se incluyen polvos, minigránulos (pellets), microesferas, nanopartículas, comprimidos, gránulos dispersables, cápsulas, sellos y supositorios. Entre las preparaciones en forma líquida se incluyen soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes y elixires. Se contemplan también las preparaciones de formas sólidas que se desean convertir, inmediatamente antes de ser utilizadas, en preparaciones en forma líquida. Dichas formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones.

En las Figuras y Ejemplos descritos a continuación, el compuesto Ic es:



Y el compuesto Ib es:



Breve descripción de las figuras

En la Figura 1 se representa, a cuatro concentraciones (0,001, 0,003, 0,01, y 0,03 μM), el efecto del compuesto Ic sobre la liberación de LDH (lactato deshidrogenasa) al medio extracelular como indicador de muerte celular inducida por la combinación de rotenona y oligomicina como estímulo tóxico. El efecto del compuesto Ic se comparó con el efecto del sulfato de condroitina (CS) a dos concentraciones (10 y 60 μM) y con el efecto ejercido por el trolox a dos concentraciones (30 y 300 μM). También se incluyen el basal (células SH-SY5Y en ausencia del compuesto Ic y de estímulo tóxico) y el control (células SH-SY5Y cultivadas en ausencia del compuesto Ic y en presencia de rotenona+oligomicina).

En la Figura 2 se representa, a cuatro concentraciones (0,001, 0,003, 0,01 y 0,03 μM), el efecto del compuesto Ib sobre la liberación de LDH al medio extracelular como indicador de muerte celular inducida por la combinación de rotenona y oligomicina como estímulo tóxico. El efecto del compuesto Ib se comparó con el efecto del sulfato de condroitina a dos concentraciones (10 y 60 μM) y con el efecto ejercido por el trolox a dos concentraciones (30 y 300 μM). También se incluyen el basal (células SH-SY5Y en ausencia del compuesto Ib y de estímulo tóxico) y el control (células SH-SY5Y cultivadas en ausencia del compuesto Ib y en presencia de rotenona+oligomicina).

En la Figura 3 se representa, a dos concentraciones (0,01 y 0,1 μM), el efecto del compuesto Ic sobre la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares a los 30 y 60 minutos tras la exposición de las células SH-SY5Y (incubadas con el compuesto Ic) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). También se incluyen el basal (células en ausencia del compuesto Ic y de H_2O_2) y el control (células en ausencia del compuesto Ic y con H_2O_2).

En la Figura 4 se representa, a dos concentraciones (1, y 10 μM), el efecto del compuesto Ic sobre la liberación de LDH al medio extracelular como indicador de muerte celular en rodajas de hipocampo de rata sometidas a una hora de privación de oxígeno y glucosa (POG) y dos horas de reoxigenación. También se incluyen el basal (rodajas sin el compuesto Ic y sin POG) y el control (rodajas en ausencia del compuesto Ic y con POG).

En la Figura 5 se representa, a dos concentraciones (0,3 y 1 μM), el efecto del compuesto Ic sobre la viabilidad celular (cuantificada mediante reducción de MTT) en rodajas de hipocampo de rata sometidas a 15 minutos de POG y dos horas de reoxigenación. El efecto del compuesto Ic se comparó con el efecto de la *N*-acetilcisteína (NAC) a 10 mM. También se incluyen el basal (rodajas en ausencia del compuesto Ic y de POG) y el control (rodajas en ausencia del compuesto Ic y con POG).

En la Figura 6 se representa, a dos concentraciones (1 y 3 μM), el efecto del compuesto Ib sobre la viabilidad celular (cuantificada mediante reducción de MTT) en rodajas de hipocampo de rata sometidas a 15 minutos de POG y dos horas de reoxigenación. El efecto del compuesto Ib se comparó con el efecto de la *N*-acetilcisteína a 10 mM. También se incluyen el basal (rodajas en ausencia del compuesto Ib y de POG) y el control (rodajas en ausencia del compuesto Ib y con POG).

En la Figura 7 se representa el efecto del compuesto Ic (0,03 μM) sobre la producción de $\text{TNF } \alpha$ tras la exposición de los astrocitos de corteza cerebral de rata (incubados con el compuesto Ic) a lipopolisacárido (LPS) durante dos horas. El efecto del compuesto Ic se comparó con el efecto del sulfato de condroitina a 10 μM . También se incluyen el basal (células en ausencia del compuesto Ic y LPS) y el control (células en ausencia del compuesto Ic y en presencia de LPS).

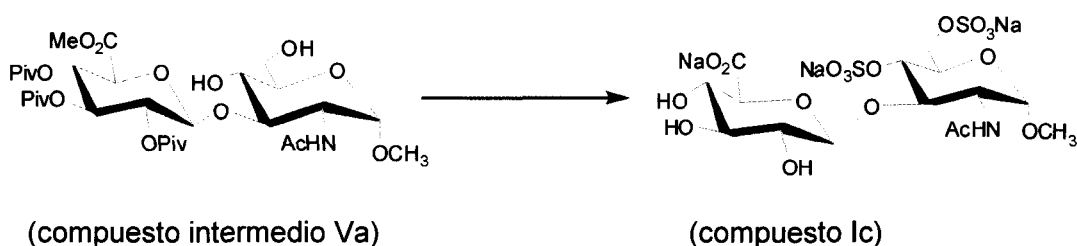
Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos y no representan una limitación del alcance de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Procedimiento mejorado para la preparación de la sal trisódica de 2-acetamido-2-desoxi-3-O-(ácido β -D-glucopiranosil urónico)-4,6-di-O-sulfo- α -D-glucopiranosido de metilo (compuesto Ic) a partir del compuesto intermedio Va



En un reactor seco se introdujeron bajo una ligera corriente de nitrógeno, y a temperatura ambiente, 4,7 L de piridina. Se añadieron 900 g (1,475 moles) de 2-acetamido-2-desoxi-3-O-(metil 2,3,4-tri-O-pivaloil- β -D-glucopiranosiluronato)- α -D-glucopiranosido de metilo (compuesto intermedio Va) y 864 g (6,031 moles) del complejo SO_3 .piridina. La mezcla se calentó a 40°C durante 5 horas con agitación. A continuación se enfrió a 20°C, se añadieron 0,9 L de agua y se añadió lentamente durante 30 minutos una disolución de 216 g de hidróxido de sodio en 5,4 L de agua, enfriando a 15-20°C. A continuación se destiló al vacío hasta sequedad, y se eliminaron los restos de piridina añadiendo agua y destilando con vacío sin sobrepasar los 55°C de temperatura. El residuo resultante se dispersó en 3,8 L de metanol y 0,9 L de agua y se enfrió a 0°C, añadiendo a continuación durante 30 minutos y a 0°C una disolución de 324 g de hidróxido de sodio en 2,7 L de agua. Se dejó que la temperatura alcanzara los 20°C, se calentó a 40°C durante 2 horas, y posteriormente se dejó a temperatura ambiente con agitación toda la noche. A continuación se añadieron 99 mL de ácido acético glacial hasta pH 8 y se destiló con vacío la mayor parte del disolvente, sin sobrepasar los 55°C de temperatura. A continuación, y bajo agitación, se añadieron 9 L de alcohol isopropílico. La mezcla se calentó a 55°C durante 15 minutos y se enfrió a temperatura ambiente. Después de agitar durante 2 horas, se filtró en un Büchner para obtener, después de secar, 875 g de producto que contenía el compuesto Ic y sales. Se procedió a la purificación del compuesto Ic mediante precipitación para eliminar las sales. Para ello, 875 g de producto de reacción se disolvieron

en 1.800 mL de agua desionizada, calentando a 45-50°C. Posteriormente se añadieron 900 mL de alcohol isopropílico, se enfrió lentamente a temperatura ambiente, y se dejó a ésta temperatura y bajo agitación durante una hora. Al cabo de ese tiempo, se enfrió a 0-5°C durante 2 horas, se filtró el sólido formado, constituido por sales, lavando con una solución fría de agua-alcohol isopropílico (2:1). Las aguas madres obtenidas se precipitaron añadiendo alcohol isopropílico con buena agitación que se mantuvo durante 2 horas, obteniéndose, después de filtrar y secar el sólido a 40°C en la estufa de vacío, un producto que todavía contenía sales. Se repitió de nuevo la precipitación, obteniéndose 271 g de producto con un bajo contenido en sales. Finalmente, se procedió a la purificación mediante cromatografía en columna de Dowex 50WX2 (200-400 mesh) en forma cálcica (eluyente: agua), obteniéndose 265 g (31% de rdto.) de Ic puro.

Rotación Óptica: $[\alpha]_D +18.5^\circ$ (c 0,54, H₂O). Se obtuvo a una $\lambda=589$ nm, 20°C y una celda de 10 cm con capacidad para 1 mL.

EM: calculado para C₁₅H₂₂NO₁₈S₂Na₂: 614,4. Encontrado: m/z 613,7 [M⁻ - Na].

Espectro de RMN-¹H (400 MHz, D₂O): δ ppm 4,76 (d, 1 H, J₁₂ = 3,6 Hz, H-1), 4,60 (d, 1H, J₁₂ = 7,6 Hz, H-1'), 4,52-4,58 (m, 1 H, H-6a), 4,36 (dd, 1 H, J₃₄ = 10,0 Hz, J₃₂ = 8,8 Hz, H-3), 4,26-4,29 (m, 4 H, H-4, H-2, H-6b, H-5), 3,64-3,69 (m, 1H, H-5'), 3,56 (m, 1 H, H-4'), 3,37-3,49 (5 H, H-3', OCH₃, H-2'), 2,03 (s, 3 H, COOCH₃).

Espectro de RMN-¹³C (100 MHz, D₂O): δ ppm 176,61, 174,93 (2 x C, COONa, COOCH₃), 101,77 (C-1'), 98,46 (C-1), 77,63 (C-5'), 76,22 (C-3'), 75,97 (C-4), 73,41 (C-2'), 73,23 (C-3), 72,52 (C-4'), 69,59 (C-5), 68,29 (C-6), 56,07 (OCH₃), 53,91 (C-2), 22,84 (COOCH₃).

Los espectros de RMN se registraron en un instrumento Varian de 400 MHz. Todas las asignaciones se realizaron utilizando experimentos estándar ¹H-¹H-COSY y HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence).

Ejemplo 2

Estudios de toxicidad

Los ensayos de toxicidad celular se realizaron sobre la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, incubando dichas células durante 48 horas con el compuesto en estudio. Se valoró la viabilidad celular cuantificando la liberación de la lactato deshidrogenasa (LDH), la cual es una enzima citoplasmática que se libera al medio extracelular cuando la integridad de la membrana citoplasmática se pierde. Los compuestos Ic y Ib no mostraron toxicidad a la dosis de 100 μ M.

Ejemplo 3

Efecto neuroprotector de los compuestos de fórmula (I) frente a la muerte celular inducida por estrés oxidativo

Es conocido que el estrés oxidativo está implicado en enfermedades neurodegenerativas y neurovasculares, por lo que el objetivo era determinar el efecto neuroprotector de los compuestos de fórmula (I), al exponer las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y a estrés oxidativo.

Un modelo de estrés oxidativo consiste en bloquear los complejos I y V de la cadena respiratoria mitocondrial mediante la combinación de rotenona más oligomicina-A, respectivamente. Como resultado de la interrupción de la cadena respiratoria mitocondrial, la célula se ve incapaz de seguir produciendo ATP, y los radicales libres se generan excediendo la capacidad de la célula para neutralizarlos, y como resultado, se produce la muerte celular.

Además, con el fin de comparar, se determinó el efecto neuroprotector del sulfato de condroitina (CS), glicosaminoglicano sulfatado con una estructura polimérica caracterizada por un disacárido que se repite, constituido por N-acetilgalactosamina y ácido D-glucurónico. La mayoría de las unidades de N-acetilgalactosamina están sulfatadas. El sulfato de condroitina empleado en el ensayo de la presente invención era mayoritariamente una mezcla de 4-sulfato de condroitina y 6-sulfato de condroitina. Es conocido que el sulfato de condroitina protege a las neuronas de daños inducidos por glutamato (*A protective action of chondroitin sulfate proteoglycans against neuronal cell death induced by glutamate*, Okamoto *et al.*, *Brain Res.* 637, 57-67 (1994)), así como que el sulfato de condroitina protege a las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y sometidas a estrés oxidativo (*Chondroitin sulfate protects SH-SY5Y cells from oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt*, (N. Cañas *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 323(3), 946-953 (2007)).

Finalmente, también se determinó a efectos comparativos el efecto del trolox (componente de la vitamina E con actividad antioxidante) en el mismo modelo de estrés oxidativo.

Material y métodos

Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y se cultivaron en monocapa en frascos de 75 cm² con tapón ventilado. El medio de cultivo utilizado fue Medio Dulbecco Modificado por Eagle (DMEM) con alto contenido en glucosa (4,5 mg/L) y, suplementado con 10% de suero bovino fetal, 2 mM de L-Glutamina, 50 UI/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomycin.

Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador a 37°C en un ambiente húmedo, con un 5% de CO₂ y un 95% de aire. El medio de cultivo se cambió dos veces por semana haciendo pases 1:4 cuando las células llegaban al 70-80% de confluencia. Para realizar los pases, las células se despegaron mediante su tratamiento con Tripsina-EDTA.

Para los ensayos de viabilidad celular, las células se sembraron en placas estériles de 48 pocillos a una densidad de 80.000 células/pocillo. Los experimentos se realizaron 24-48 horas tras su siembra.

Para evaluar el efecto neuroprotector de los compuestos, se preincubaron las células SH-SY5Y durante 24 horas con el compuesto en estudio, y posteriormente se incubaron durante 24 horas con el compuesto en estudio en presencia de los tóxicos (una combinación de 10 µM de rotenona y 1 µM de oligomicina-A); al final de este periodo se evaluó la viabilidad celular cuantificando la liberación de la enzima LDH.

La valoración de esta enzima se realizó mediante un kit comercial (Cytotoxicity detection kit-LDH; Roche) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Las muestras se analizaron colorimétricamente en un lector de placas (Labsystems iEMS Reader MF), empleando el filtro adecuado a 490-600 nm y obteniendo los valores de absorbancia.

Se definió % de muerte celular como el % de LDH liberada al medio extracelular respecto a la total (suma de la LDH intra y extracelular).

Los compuestos Ic y Ib se estudiaron a cuatro concentraciones (0,001, 0,003, 0,01 y 0,03 µM), el sulfato de condroitina (suministrado por Bioibérica, S.A.) se ensayó a dos concentraciones (10 y 60 µM) y el trolox (Sigma Aldrich) se ensayó a dos concentraciones (30 y 300 µM). En el experimento también se incluyeron el basal (células SH-SY5Y en ausencia de compuesto y de estímulo tóxico) y el control (células SH-SY5Y cultivadas en ausencia de compuesto y en presencia del estímulo tóxico rotenona más oligomicina).

Resultados

En las Figuras 1 y 2 se muestran los resultados de neuroprotección de los compuestos Ic y Ib frente a la muerte celular (% de LDH liberada) inducida por la combinación de rotenona y oligomicina. En dichas Figuras también se muestran los resultados comparativos del sulfato de condroitina y del trolox.

El compuesto Ic (Figura 1) consiguió la máxima protección (47%), estadísticamente significativa, a la concentración de 0,03 µM.

El compuesto Ib (Figura 2) también consiguió la máxima protección, estadísticamente significativa, a la concentración de 0,03 µM, aunque en este caso la protección fue de un 40%.

Como se puede observar en las Figuras 1 y 2, los compuestos Ic y Ib fueron más eficaces que el sulfato de condroitina y que el trolox en cuanto a sus efectos protectores, ya que si bien el sulfato de condroitina y el trolox redujeron la muerte celular inducida por rotenona y oligomicina, este efecto protector se detectó a concentraciones sustancialmente mayores (10 y 60 µM para el sulfato de condroitina; 30 y 300 µM para el trolox) que las concentraciones requeridas para los compuestos Ic y Ib.

Ejemplo 4

Efecto de los compuestos de fórmula (I) sobre la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

La sobreproducción de ROS conduce a daños tanto en las células neuronales como en el endotelio vascular, debido a la destrucción de la membrana lipídica de la célula y a la ruptura de ADN.

El objetivo era determinar la capacidad de los compuestos de fórmula (I) para reducir la generación de ROS tras la exposición de las células a peróxido de hidrógeno.

Se utilizó el peróxido de hidrógeno como productor de radicales libres con el objeto de inducir una lesión celular por estrés oxidativo.

Para determinar la producción de radicales libres se empleó la sonda fluorescente 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFDA), que es sensible a la presencia de radicales libres, de tal modo que cuando éstos se generan intracelularmente se produce un aumento de fluorescencia.

Cuando la sonda fluorescente pasa al interior celular, las esterasas intracelulares hidrolizan la sonda convirtiéndola en DCFH₂. Las peroxidasas, el citocromo C y el Fe²⁺, pueden oxidar la sonda a DCF en presencia de peróxido de hidrógeno, y la acumulación de DCF en la célula se puede medir como un incremento de fluorescencia a 530 nm cuando se excita a 485 nm.

Materiales y métodos

Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y se cultivaron siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 3.

Para los ensayos de fluorescencia, las células se sembraron en placas de 96 pocillos con paredes opacas a una densidad de 10.000 células/pocillo. Los experimentos se realizaron 24-48 horas después de la siembra.

Para evaluar los efectos del compuesto Ic sobre la generación de ROS, las células se incubaron con concentraciones crecientes de compuesto Ic (0,01 y 0,1 μ M) durante 24 horas y a continuación se preincubaron con la sonda fluorescente DCFDA durante 45 minutos. Posteriormente se cuantificó la fluorescencia basal de cada pocillo, tanto de los pocillos que contenían células y compuesto Ic como de los que contenían solamente las células. A continuación, se añadió peróxido de hidrógeno a la concentración de 50 μ M, tanto a los pocillos que contenían células y compuesto Ic como a los que contenían sólo las células, y se valoró la fluorescencia de DCFDA como indicador de la generación de ROS a los 30 y 60 minutos tras la adición de peróxido de hidrógeno. A cada pocillo que contenía el compuesto Ic se le restó su fluorescencia basal para obtener la fluorescencia neta. Los valores de fluorescencia se normalizaron respecto a la fluorescencia ocasionada por el peróxido de hidrógeno a los 30 minutos (este valor se consideró 1).

En el estudio también se incluyeron el basal del ensayo (células en ausencia de compuesto y de estímulo tóxico) y el control (células en ausencia de compuesto y en presencia de peróxido de hidrógeno).

Resultados

La Figura 3 muestra que la adición de peróxido de hidrógeno a las células SH-SY5Y triplicó la producción de ROS a los 30 y 60 minutos de incubación (barras Control de la Figura).

Cuando las células se trataron durante 24 horas con el compuesto Ic, antes de la exposición al peróxido de hidrógeno, se consiguió reducir de forma significativa los ROS generados por peróxido de hidrógeno, a los 30 y 60 minutos. Cuando el compuesto Ic estaba presente en las células a la concentración de 0,1 μ M, se observó una reducción estadísticamente significativa de un 40% en la formación de radicales libres inducida por peróxido de hidrógeno.

Estos resultados indican que los compuestos de la presente invención son capaces de reducir la formación de especies radicalarias, con el consiguiente efecto neuroprotector y antioxidante, lo que convierte a los compuestos de la presente invención en potenciales fármacos para el tratamiento de enfermedades asociadas a estrés oxidativo, tales como las enfermedades neurodegenerativas y neurovasculares.

Ejemplo 5

Efecto neuroprotector de los compuestos de fórmula (I) en rodajas de hipocampo sometidas a privación de oxígeno y glucosa (POG)

Un conocido modelo de isquemia cerebral *in vitro* consiste en la privación de oxígeno y glucosa en rodajas de hipocampo de rata (*Galantamine and memantine produce different degrees of neuroprotection in rat hippocampal slices subjected to oxygen-glucose deprivation*, M. Sobrado *et al.*, *Neurosci. Lett.* 365, 132-136 (2004); *Neuroprotective effects of the new thiadiazolidone NP00111 against oxygen and glucose deprivation in rat hippocampal slices: implication of Erk1/2 and PPAR γ receptors*, AO. Rosa *et al.*, *Experimental Neurology* 212, 93-99 (2008)).

El objetivo del ensayo era determinar el efecto neuroprotector de los compuestos de fórmula (I) frente a la lesión ocasionada por la POG en rodajas de hipocampo de rata. La lesión se evaluó midiendo la liberación de LDH al medio extracelular como indicador de muerte celular o bien determinando la viabilidad celular mediante la reducción de la sal de tetrazolio MTT a formazán.

Materiales y métodos

Se emplearon ratas macho de la cepa Spague Dawley (250-325g). Previa anestesia mediante una inyección intraperitoneal de 60 mg/Kg de pentobarbital sódico (Euta-Lender®), se decapitaron con guillotina y tras una craneotomía se extrajo el cerebro. El cerebro se sumergió inmediatamente en solución de disección, un Krebs-Henseleit modificada en frío (4°C), a pH 7,4 cuya composición es: NaCl 120 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 0,5 mM, NaHCO₃ 26 mM, MgSO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,18 mM, glucosa 11 mM y sacarosa 200 mM, burbujeadas con 95% O₂-5% CO₂. Los hipocam-

pos se aislaron, se embebieron en agarosa de bajo punto de fusión al 2% (Sigma-Aldrich), y se cortaron en rodajas transversales de 350 μm en un vibratomo (Leica VT1000S).

Tras el corte en el vibratomo, las rodajas se transfirieron a un vial con Krebs de disección sin sacarosa, burbujeado con 95% O_2 -5% CO_2 durante 60 minutos (periodo de equilibrio).

Tras el periodo de equilibrado, se retiró el medio y se introdujo una solución oxigenada (Krebs normal (NaCl 120 mM, KCl 2 mM, CaCl_2 2 mM, NaHCO_3 26 mM, MgSO_4 1,19 mM, KH_2PO_4 1,18 mM y glucosa 11 mM), burbujeada con 5% de CO_2 y 95% de O_2 durante 30 min (periodo de preincubación). Las rodajas basal se mantuvieron en esta solución oxigenada a lo largo de todo el experimento. Para inducir la POG, se sustituyó la solución oxigenada por otra que carecía de glucosa y estaba burbujeada con una mezcla de gases de 5% de CO_2 y 95% de N_2 (solución anóxica). Las rodajas se encontraban en un baño a 37°C. Tras inducir la POG, se sustituyó el medio anóxico por otro que contenía la solución oxigenada (periodo de reoxigenación).

Para evaluar el efecto de los compuestos, estos se incubaron durante los 30 minutos de la pre-incubación y a lo largo de la POG y durante la reoxigenación. Se emplearon dos protocolos de POG-reoxigenación: (i) 1 hora de POG y 2 horas de reoxigenación y (ii) 15 min de POG seguido de 2 horas de reoxigenación.

Cuando se empleó el protocolo de POG-reoxigenación (i): 1 hora de POG y 2 horas de reoxigenación, las rodajas se incubaron con concentraciones crecientes de compuesto Ic (1 y 10 μM). En el mismo estudio también se incluyeron el basal (rodajas sin compuesto Ic y sin POG) y el control (rodajas en ausencia de compuesto Ic y con POG).

Cuando se empleó el protocolo de POG-reoxigenación (ii): 15 min de POG seguido de 2 horas de reoxigenación, las rodajas se incubaron con concentraciones crecientes de compuesto Ic (0,3 y 1 μM) o bien con concentraciones crecientes de compuesto Ib (1 y 3 μM). En el mismo estudio se compararon estos dos compuestos de la invención con la *N*-acetilcisteína (NAC) a 10 mM. También se incluyeron el basal (rodajas en ausencia de compuesto Ic o Ib y de POG) y el control (rodajas en ausencia de compuesto Ic o Ib y con POG).

Para el protocolo de 1 hora de POG seguido de 2 horas de reoxigenación, la viabilidad se determinó midiendo la liberación de LDH al medio extracelular según el método descrito en el Ejemplo 3. La cuantificación de LDH se realizó en muestras tomadas (i) después del periodo de preincubación, (ii) después de la hora de POG y (iii) después de cada hora de reoxigenación (1 hora y 2 horas).

Para el protocolo de 15 min de POG seguido de 2 horas de reoxigenación, la viabilidad celular se evaluó mediante la sal de tetrazolio MTT, la cual se internaliza en aquellas células que son viables y por tanto, son capaces de reducir el tetrazolio a formazán que es un producto insoluble y coloreado que se deposita en el exterior celular. Para ello, tras finalizar el experimento, las rodajas de hipocampo se incubaron con MTT a una concentración final de 0,5 mg/mL en una solución de Krebs-HEPES (en mM: NaCl, 144; KCl, 5,9; MgCl_2 , 1,2; CaCl_2 , 2; HEPES, 10; glucosa, 11; a pH 7,3) a 37°C. Transcurridas 3 horas, se retiró el medio y el formazán precipitado en la solución se disolvió en dimetilsulfóxido. A continuación se midió la absorbancia en un lector de placas (Labsystems iEMS Reader MF), a 500 nm. Los datos se representaron tomando como el 100% de viabilidad el resultado de las rodajas basal, es decir, las no sometidas a POG.

Resultados

En la Figura 4 se observa que el compuesto Ic redujo en forma concentración-dependiente la muerte celular tras una hora de POG seguida de 2 horas de reoxigenación. Si bien se observó un efecto protector del compuesto Ic frente a la POG, el efecto protector fue mayor durante la etapa de reoxigenación. A las 2 horas de reoxigenación y a la concentración de 1 μM , el compuesto Ic presentó un efecto protector, estadísticamente significativo, de un 40%.

Las Figuras 5 y 6 muestran que en el protocolo de 15 min de POG seguido de 2 horas de reoxigenación, la POG-reoxigenación redujo la viabilidad celular del 100% (Basal) al 67% (Control) y que los dos compuestos Ic y Ib fueron capaces de ofrecer protección.

El compuesto Ib mostró la máxima protección (85%), estadísticamente significativa, a la concentración de 3 μM , mientras que el compuesto Ic fue más potente, mostrando la máxima protección (93%), estadísticamente significativa, a una concentración de 1 μM .

En las Figuras 5 y 6 también se muestra la mayor eficacia de los compuestos Ic y Ib en comparación con la *N*-acetilcisteína, la cual presentó la máxima protección (83%), estadísticamente significativa, a una concentración de rango milimolar (10 mM).

Ejemplo 6

Efecto antiinflamatorio de los compuestos de fórmula (I) en astrocitos de corteza cerebral de rata activados por lipopolisacárido (LPS)

La inflamación en el sistema nervioso, conocida como neuroinflamación, tiene un comportamiento diferente a la que se manifiesta en el resto del organismo, debido principalmente a la presencia de células inflamatorias propias del tejido cerebral.

En algunas enfermedades neurodegenerativas y neurovasculares encontramos un componente neuroinflamatorio, por lo que el objetivo del presente estudio era determinar si los compuestos de la presente invención eran capaces de reducir la liberación de marcadores inflamatorios por parte de la astrogliosis.

Materiales y métodos

Se emplearon ratas neonatas macho de 2-3 días de edad. Tras una craneotomía se extrajeron ambas cortezas y se depositaron en una placa de Petri con PBS frío. Bajo una lupa microscópica se extrajeron las meninges de cada corteza. Una vez limpias, se sumergieron en DMEM frío y se realizó una disección mecánica con pipeta. A continuación, se centrifugó la muestra a 1.000 rpm durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante. El precipitado fue resuspendido en DMEM con 20% de SBF y una mezcla de antibióticos (penicilina/estreptomicina). Por último, se pasó por un filtro de 70 μm y se sembraron en frasco de 75 cm^2 con tapón de filtro aireado. El cálculo para la siembra de las células fue de un frasco (15 mL de medio) por cada neonato utilizado.

El medio de cultivo se sustituyó a los 3 días por un DMEM con 10% de suero y los mismos antibióticos. Al cabo de una semana, se le añadió a cada frasco 4 μM de ARAC (citosina arabinosido) para eliminar la microglia en el cultivo.

Tras 3 días de incubación con este inhibidor del crecimiento celular, los frascos se agitaron a una velocidad de 250 rpm en un agitador horizontal dentro de una estufa a 37°C. Transcurridas 3 horas, se les retiró el medio y se sustituyó por una mezcla de tripsina (0,25% EDTA) PBS 1:5. Al retirar el medio, se retiró la microglia que se despegaba con la agitación.

A continuación, se dejaron unos minutos a 37°C para que la tripsina actuara. Durante este tiempo los astrocitos se observaron al microscopio y cuando adoptaron una forma redondeada, o se despegaron, se les añadió una mezcla de FBS/PBS 1:5 para bloquear los efectos enzimáticos de la tripsina.

Posteriormente, se recogió el medio de cada frasco y se llevó a tubos Falcon de 50 mL, se centrifugaron 5 minutos a 1.000 rpm y se decantó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en DMEM con 10% de FBS y antibióticos, y se contaron las células para su siembra posterior.

La inducción de inflamación en los astrocitos se realizó mediante la adición de 10 $\mu\text{g/mL}$ de lipopolisacárido junto a los compuestos a estudiar (compuesto Ic a 0,03 μM y sulfato de condroitina a 10 μM) durante 2 h. A continuación se extrajo el ARN de los astrocitos por el método del fenol, con todo el material libre de ARNs. La cuantificación se hizo por medida directa de absorbancia a 260/280 nm en un espectrofotómetro nanodrop®. La amplificación de 500 ng de ARN se realizó por retrotranscripción (5 min. a 65°C, se le añadió la retrotranscriptasa, 10 min a 25°C, 50 min a 50°C y 5 min a 85°C), llevándolo a un volumen final de 15,20 μL .

Para hacer el análisis de la RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), se utilizó un sistema MyiQ5 iCycler system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Las condiciones térmicas de anillado fueron como sigue: la desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Durante cada paso de anillado fueron recogidas medidas de fluorescencia. Al final de cada PCR, los datos fueron analizados automáticamente por el sistema y se obtuvieron gráficas de amplificación. Para cada PCR, se añadieron 3 μL de cADN molde, que fue añadido a 12 μL de IQ™ SYBR-Green Supermix 2X (Bio-Rad) y al que se añadieron los oligómeros F y R para TNF- α , IP-10, SOCS, y actina, que fue empleada para preparar las curvas patrón de la RT-PCR. Todas las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo por duplicado, y el número de duplicados del ciclo umbral medio (C_t), fueron utilizados para calcular el nivel de expresión (número de copias) de las citoquinas, utilizando como estándar la curva generada por la actina.

En el mismo estudio se comparó la actividad del compuesto Ic con el sulfato de condroitina. También se incluyeron el basal (en ausencia de compuesto y de LPS) y el control (en ausencia de compuesto y con LPS).

Resultados

En la Figura 7 se muestra el efecto antiinflamatorio del compuesto Ic y del sulfato de condroitina en astrocitos de rata activados por LPS.

Cuando los astrocitos de rata se activaron con LPS durante 2 horas se produjo un incremento en la producción de $\text{TNF}\alpha$ de casi diez veces respecto al basal (barra Control).

5 El tratamiento de los astrocitos, de forma simultánea, con LPS y con sulfato de condroitina ($10\ \mu\text{M}$) o con el compuesto Ic ($0,03\ \mu\text{M}$), redujo de forma significativa la producción de $\text{TNF}\alpha$, siendo mayor la reducción en los astrocitos tratados con Ic (75%) que con sulfato de condroitina (31%).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

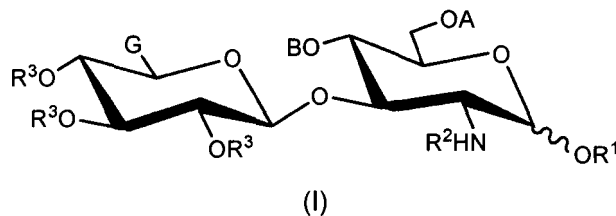
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula (I),



en la que:

R^1 se selecciona entre hidrógeno, C_1 - C_4 alquilo lineal o ramificado, fenilalquilo de menos de diez átomos de carbono y $-COCH_3$;

R^2 se selecciona entre hidrógeno, $-COCH_3$ y $-SO_3Y$;

R^3 se selecciona entre hidrógeno, C_1 - C_4 alquilo lineal o ramificado, fenilalquilo de menos de diez átomos de carbono, $-COCH_3$ y $-COPh$, donde Ph es fenilo;

G se selecciona entre $-COOR^4$ y $-COOY$;

A y B se seleccionan, independientemente entre sí, entre hidrógeno, SO_3H , $-SO_3Y$ y $-COCH_3$,

en donde necesariamente o A o B es o bien $-SO_3H$, o bien $-SO_3Y$;

R^4 se selecciona entre hidrógeno y C_1 - C_2 alquilo o arilalquilo de menos de dieciséis átomos de carbono,

Y es un catión orgánico o inorgánico;

o una sal farmacéuticamente aceptable, profármaco o solvato del mismo, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa y/o neurovascular, de un traumatismo craneoencefálico o de un traumatismo de la médula espinal en un mamífero.

2. Uso según la reivindicación 1, en el que R^1 se selecciona entre hidrógeno y C_1 - C_4 alquilo lineal y G se selecciona entre $-COOR^4$ y $-COOY$, donde R^4 es hidrógeno o C_1 - C_2 alquilo e Y es un catión inorgánico.

3. Uso según la reivindicación 2, en el que R^1 es hidrógeno, R^2 es $-COCH_3$ y R^3 es hidrógeno.

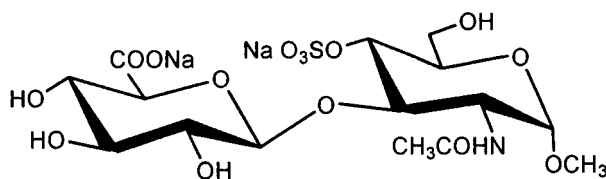
4. Uso según la reivindicación 2, en el que R^1 es metilo, R^2 es $-COCH_3$ y R^3 es hidrógeno.

5. Uso según la reivindicación 3 ó la reivindicación 4, en el que A es hidrógeno, B es $-SO_3Y$ y G es $-COOY$, donde Y es un catión inorgánico.

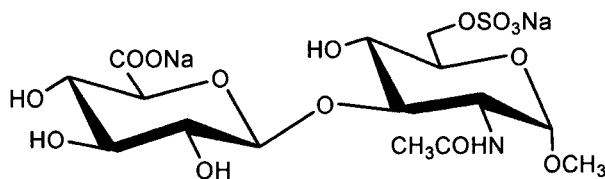
6. Uso según la reivindicación 3 ó la reivindicación 4, en el que A es $-SO_3Y$, B es hidrógeno y G es $-COOY$, donde Y es un catión inorgánico.

7. Uso según la reivindicación 3 ó la reivindicación 4, en el que A y B son $-SO_3Y$ y G es $-COOY$, donde Y es un catión inorgánico.

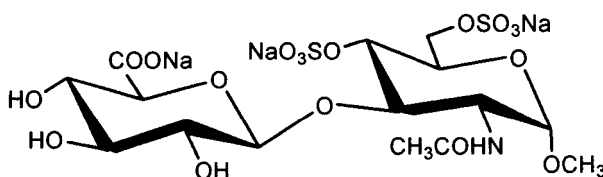
8. Uso según la reivindicación 5, en el que el compuesto de fórmula (I) es:



9. Uso según la reivindicación 6, en el que el compuesto de fórmula (I) es:



10. Uso según la reivindicación 7, en el que el compuesto de fórmula (I) es:



11. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la enfermedad neurodegenerativa y/o neurovascular está asociada a estrés oxidativo.

12. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la enfermedad neurodegenerativa y/o neurovascular está asociada a neuroinflamación.

13. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el medicamento es un medicamento antioxidante.

14. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el medicamento es un medicamento neuro-protector y/o neuroreparador.

15. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la enfermedad neurodegenerativa y/o neuro-vascular se selecciona de entre el grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclero-sis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, ictus, accidente isquémico transitorio cerebral, enfermedad de Huntington, ataxia de Friedreich, encefalopatías espongiiformes, enfermedad con cuerpos de Lewy, enfermedad de Pik, deterioro cognitivo leve, epilepsia, migraña, esquizofrenia, enfermedad bipolar, demencia vascular y arterioesclerosis.

16. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer.

17. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enfermedad es la enfermedad de Parkinson.

18. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enfermedad es la esclerosis lateral amiotrófica.

19. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enfermedad es el ictus.

20. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el tratamiento resulta en el tratamiento de un traumatismo craneoencefálico o de la médula espinal.

21. Uso de un compuesto de fórmula (I), según se ha definido en la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable, profármaco o solvato del mismo, para la preparación de un medicamento neuroprotector y/o neuroreparador.

22. Uso de un compuesto de fórmula (I), según se ha definido en la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable, profármaco o solvato del mismo, para la preparación de un medicamento antioxidante.

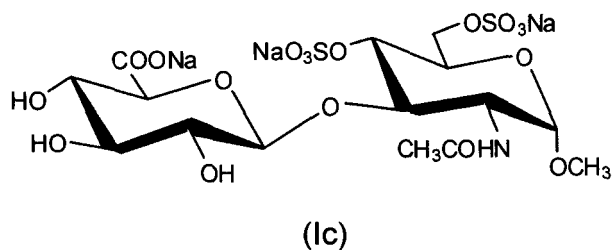
23. Uso según la reivindicación 22, en el que el medicamento antioxidante es útil en el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad.

24. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medicamento se adapta para administración oral o tópica.

25. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medicamento se presenta en forma inyectable.

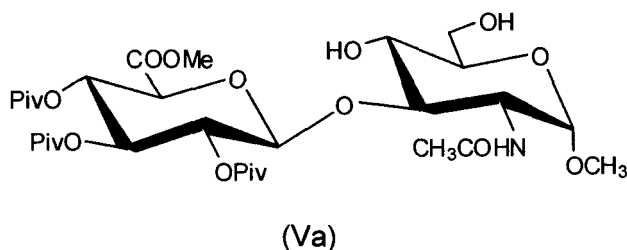
26. Uso de un compuesto de fórmula (I), según se ha definido en la reivindicación 1, en la preparación de un reactivo para ensayos biológicos de estrés oxidativo en células o de privación de oxígeno y glucosa en tejidos.

27. Procedimiento para la preparación del compuesto de fórmula (Ic),



caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

(a) hacer reaccionar el compuesto de fórmula (Va)



con el complejo SO_3 .piridina;

(b) tratar el compuesto intermedio obtenido en la etapa (a) con hidróxido de sodio;

(c) purificar por precipitación en agua/alcohol isopropílico; y

(d) en caso de que después de la etapa (c) el compuesto de fórmula (Ic) todavía contenga sales, opcionalmente, purificarlo por cromatografía en columna.

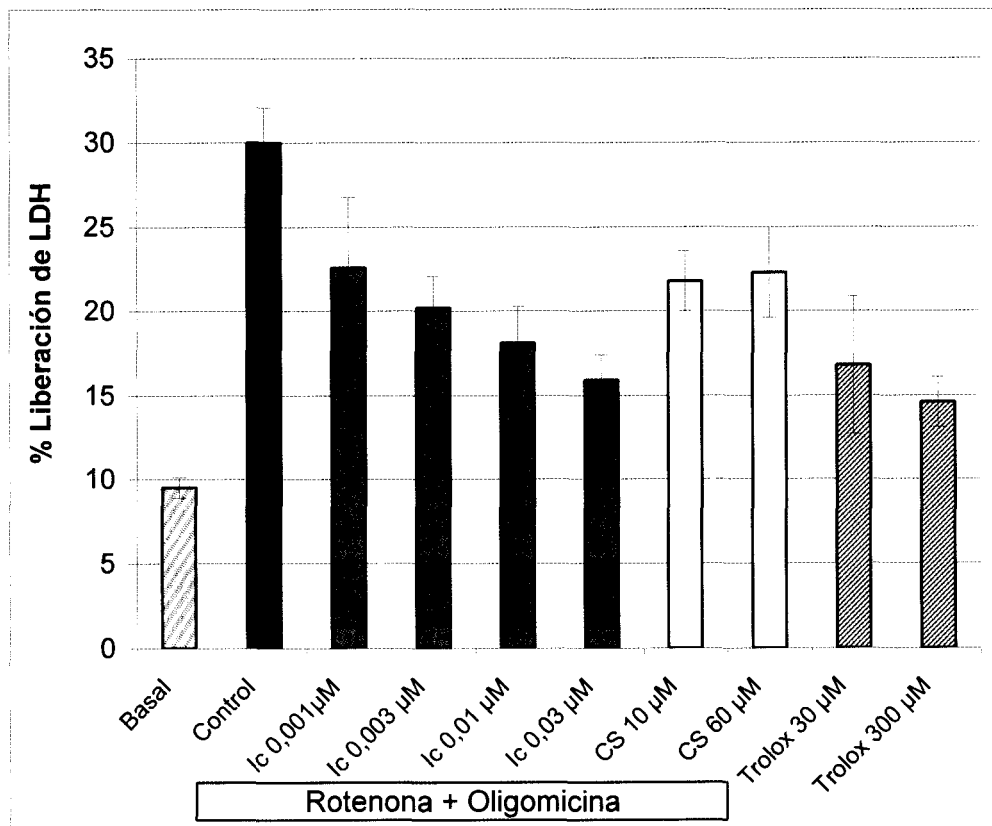


FIGURA 1

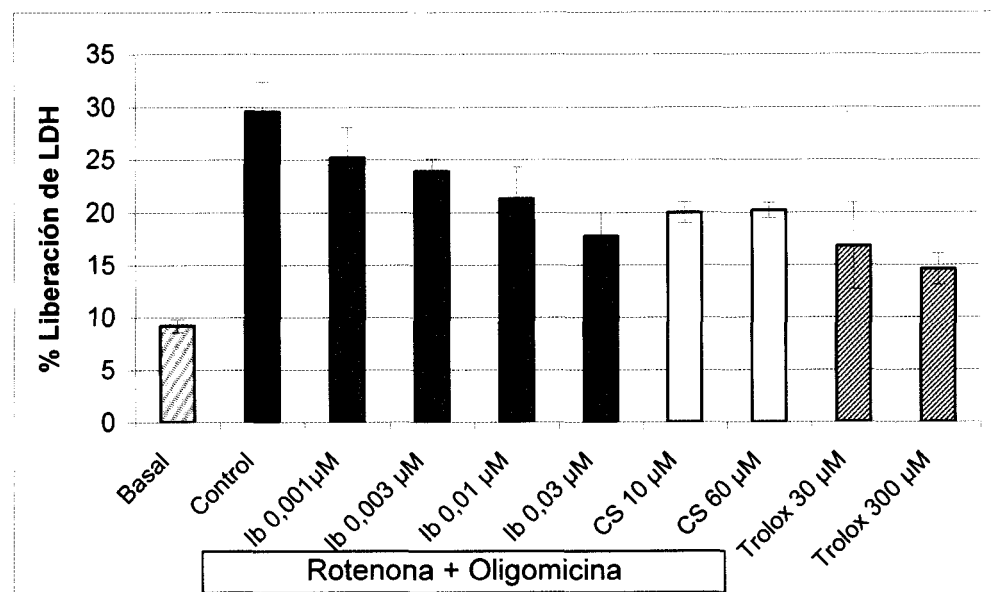


FIGURA 2

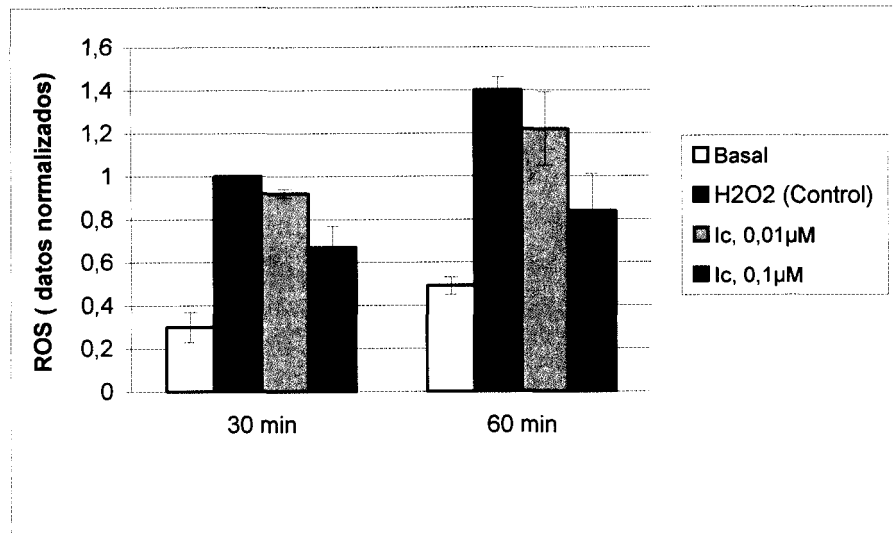


FIGURA 3

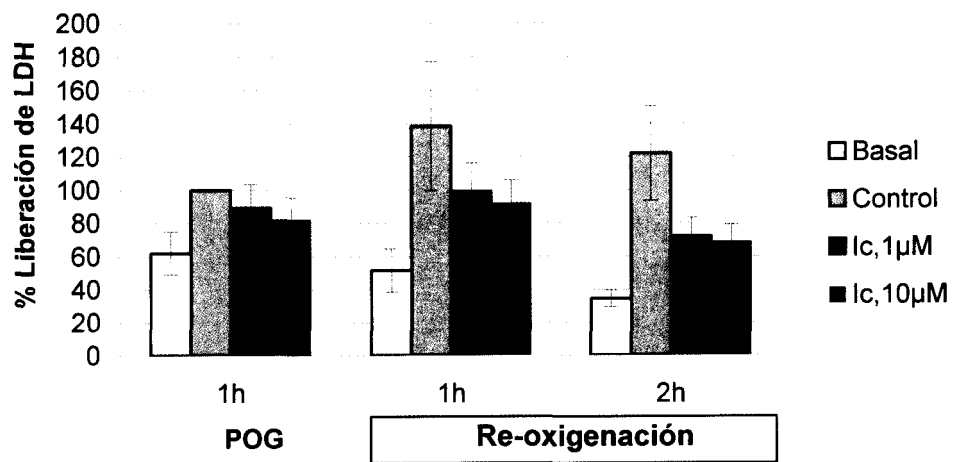


FIGURA 4

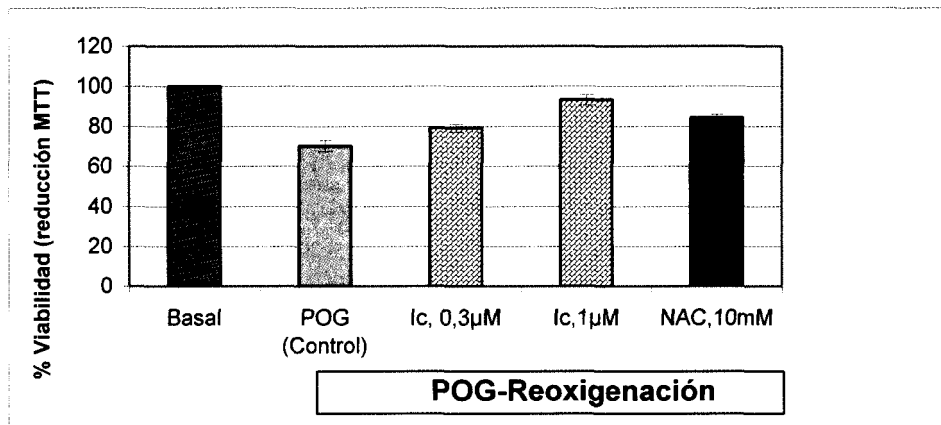


FIGURA 5

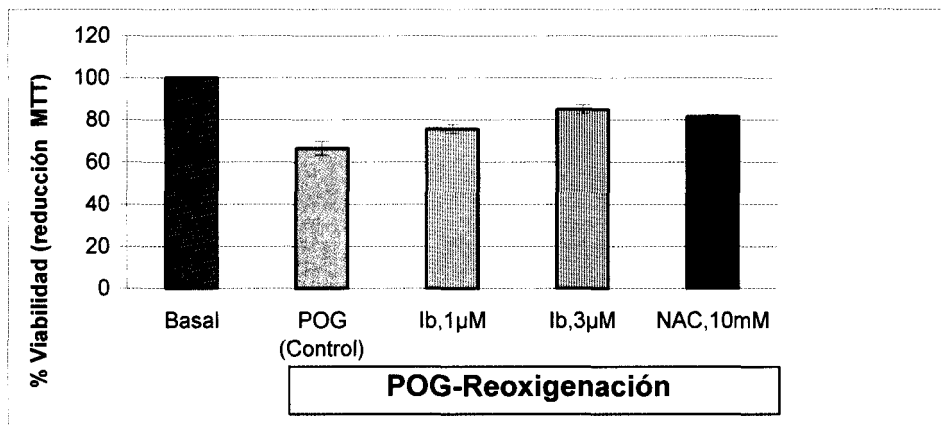


FIGURA 6

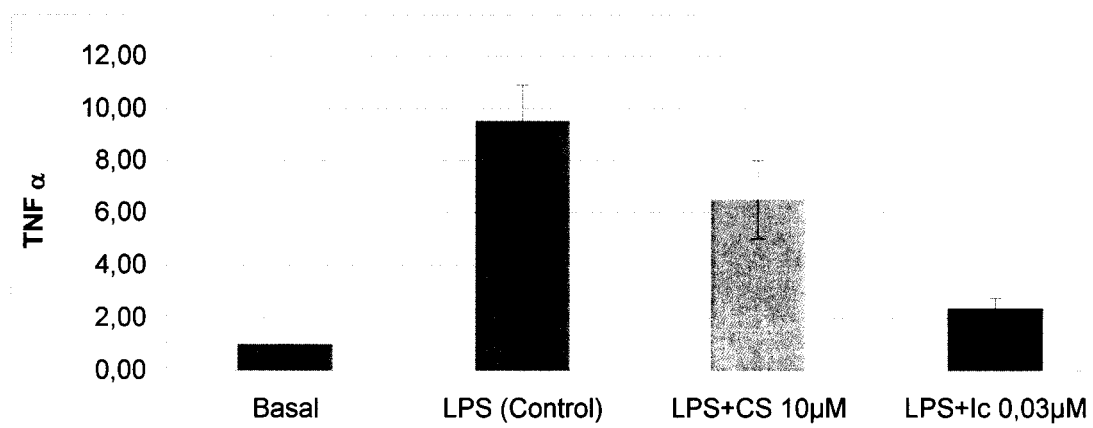


FIGURA 7



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200902399

②② Fecha de presentación de la solicitud: 29.12.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 1300411 A1 (BIOIBERICA) 09.04.2003, todo el documento.	1-27
A	WO 2008151898 A1 (BIOIBERICA et al.) 18.12.2008, todo el documento.	1-27
A	WO 9855514 A1 (LEO PHARM PROD LTD et al.) 10.12.1998, Reivindicaciones.	1-27
A	WO 2005025502 A2 (YEDA RES & DEV et al.) 24.03.2005, todo el documento.	1-27
A	WO 2005076743 A2 (YEDA RES & DEV et al.) 25.08.2005, todo el documento.	1-27

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
22.08.2011

Examinador
H. Aylagas Cancio

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/7016 (2006.01)

A61P25/28 (2006.01)

A61P25/16 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.08.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-27	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-27	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EP 1300411 A1 (BIOIBERICA)	09.04.2003
D02	WO 2008151898 A1 (BIOIBERICA et al.)	18.12.2008
D03	WO 9855514 A1 (LEO PHARM PROD LTD et al.)	10.12.1998
D04	WO 2005025502 A2 (YEDA RES & DEV et al.)	24.03.2005
D05	WO 2005076743 A2 (YEDA RES & DEV et al.)	25.08.2005

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud se refiere al uso de disacáridos sulfatados para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa y/o neurovascular, de un traumatismo craneoencefálico o de un traumatismo de la médula espinal en un mamífero y al procedimiento de preparación de dichos compuestos.

Los documentos D1 y D2 divulgan la utilización de derivados de disacáridos sulfatados en la artritis (documento D1) y en el tratamiento o prevención de enfermedades relacionadas con tendones, ligamentos y huesos (ver documento D2). El documento D3 se refiere a oligosacáridos formados por unidades de disacáridos sulfatados y que poseen actividad antitrombica.

A la vista de los documentos citados, no se conoce la utilización de estos derivados de disacáridos sulfatados en las enfermedades a la que se refiere la reivindicación 1 y específicamente la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica o en el ictus, así como en el resto de las enfermedades citadas en las reivindicaciones 20 a 23. Asimismo el procedimiento de obtención difiere del citado en el documento D1.

Ninguno de los documentos citados, ni ninguna combinación relevante de ellos revela el uso al que se refieren las reivindicaciones 1-26 de la presente solicitud, ni su procedimiento de obtención, por lo tanto, la presente solicitud presenta novedad y actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.