



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 217 538**

⑤① Int. Cl.⁷: **A61K 38/06**
// (A61K 38/06
A61K 31:565)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **98903560 .5**

⑧⑥ Fecha de presentación: **16.01.1998**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0977578**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **09.02.2000**

⑤④ Título: **Composiciones para mejorar los efectos citoprotectores de compuestos fenólicos policíclicos mediante la interacción sinérgica con antioxidantes.**

③⑩ Prioridad: **16.01.1997 US 35537 P**
23.07.1997 US 53516 P
05.09.1997 US 58104 P

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2004

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2004

⑦③ Titular/es: **UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH
FOUNDATION, Inc.**
223 Grinter Hall
Gainesville, Florida 32611, US

⑦② Inventor/es: **Simpkins, James, W.;**
Gridley, Kelly, E. y
Green, Pattie, S.

⑦④ Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 217 538 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

Composiciones para mejorar los efectos citoprotectores de compuestos fenólicos policíclicos mediante la interacción sinérgica con antioxidantes.

5

Antecedentes

Se necesitan tratamientos que protejan las células de la muerte celular causada por episodios de enfermedad, traumatismo, aislamiento y extracción de tejidos o células del cuerpo o exposición a toxinas. Esta necesidad se extiende a los tratamientos para evitar la pérdida de células nerviosas asociada a los trastornos neurodegenerativos agudos o traumatismos: tratamientos para reducir la lesión tisular resultante de isquemia en los que la isquemia puede haberse producido como resultado de apoplejía, cardiopatía o una intervención de trasplante, u otra intervención que produzca una limitación del suministro de nutrientes a los tejidos; y el tratamiento para modular la muerte celular asociada a condiciones como la osteoporosis o la anemia. La ausencia de un tratamiento citoprotector eficaz puede dar como resultado la pérdida de vida o un deterioro general de la calidad de vida incluida la incapacidad permanente con costes sanitarios altos para los pacientes, sus familias y los profesionales sanitarios. Un enfoque para reducir al mínimo los cambios patológicos ha sido intentar neutralizar el estrés oxidativo asociado a una acumulación de radicales libres en el espacio extracelular. Mooradian [J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 45 (1993) 509-511] ha notificado que ciertos estrógenos tienen propiedades antioxidantes importantes en los estudios bioquímicos *in vitro* pero este efecto no se observa con todos los estrógenos. Debido a la variación de las propiedades antioxidantes observadas por Mooradian en sus estudios bioquímicos, este autor concluyó que las moléculas esteroides debían tener ciertos determinantes antioxidantes que aún se desconocían. En WO 95/13076 se describen observaciones similares relativas a los esteroides con anillos A fenólicos usando análisis bioquímicos para comprobar la actividad antioxidante. Los análisis usados por Mooradian y en WO 95/13076 fueron análisis bioquímicos y, como tales, no examinaron directamente los efectos de estas moléculas sobre las células. Sin embargo, el documento US 5.554.601 (1996) ha descrito pruebas en cultivos celulares para determinar un procedimiento para conferir neuroprotección a una población de células usando compuestos estrógenos que se basa en efectos protectores demostrados en las células.

El daño oxidativo se ha asociado a diversas enfermedades neurodegenerativas que incluyen la enfermedad de Alzheimer (AD) y el proceso de envejecimiento [Benzi *et al.* Free Radic. Biol. Med. 19, (1995); 77-101 y U.S. 5.554.601 incorporados en la presente memoria como referencia]. La muerte celular también ocurre después de un evento isquémico producido en el cuerpo resultante de la carencia de nutrientes que puede estar asociada a la falta de oxígeno producida por una oclusión en una localización cerebrovascular o cardiovascular, o puede estar asociada a un traumatismo o una enfermedad.

35

Se necesitan mejores procedimientos para la protección de los hombres y mujeres de las consecuencias de la muerte celular anormal en los tejidos corporales.

Sumario

40

En una realización de la invención, se proporciona un procedimiento que confiere citoprotección a una población de células, que incluye proporcionar un compuesto fenólico policíclico y un compuesto antioxidante, y administrar el compuesto fenólico policíclico y el compuesto antioxidante a la población de células a una dosis eficaz para conferir citoprotección de modo tal que el efecto citoprotector combinado del compuesto fenólico policíclico y el compuesto antioxidante sea mayor que el efecto aditivo de cada compuesto administrado por separado en condiciones, por lo demás, similares.

45

Otra realización de la invención es un procedimiento para conferir citoprotección a una población de células de una persona que incluye los pasos necesarios para proporcionar una dosis terapéutica combinada que contenga un antioxidante y un compuesto fenólico policíclico en una formulación farmacéutica, administrar la formulación a una dosis eficaz a la población de células de modo tal que el efecto citoprotector que produce la combinación en la persona sea mayor que el efecto aditivo de cada compuesto proporcionado por separado; y proteger las células de la persona que de lo contrario, en ausencia de la formulación farmacéutica, se deteriorarían y morirían.

50

En otras realizaciones de la invención, el efecto combinado puede ser un aumento de la citoprotección de 100-10.000 veces, más particularmente un aumento de 100-5.000 veces, más particularmente un aumento de 1.000-5.000 veces, como resultado del efecto combinado del compuesto policíclico y el antioxidante en comparación con cada compuesto proporcionado por separado. En otras realizaciones de la invención, el compuesto fenólico policíclico es un compuesto estrógeno, más particularmente, un compuesto estrógeno que tiene una actividad sexual insustancial ejemplificado por el isómero α del estradiol. En ciertas realizaciones de la invención, el antioxidante se selecciona de un grupo constituido por un tiol, un fenol, un agente trampa de espín, una amina aromática, un carotenoide, un flavonoide, un selenio, un aminoesteroide y una ubiquinona. En otra realización de la invención, la citoprotección incluye neuroprotección.

55

60

Breve descripción de las figuras

65

La Figura 1 muestra el efecto del glutatión (GSH) y el 17β -estradiol sobre células neuronales (células SK-N-SH) tratadas con la proteína neurotóxica β -amiloide (β AP) siendo β AP un péptido de 10 aminoácidos (aminoácidos

25-35), al que en lo sucesivo se hace referencia como “ β AP 25-35”. Se muestran los efectos del 17β -estradiol (2 nM) y el GSH (3,25 μ M) sobre la toxicidad inducida por β AP 25-35 (20 μ M) en células SK-N-SH (10⁶ células/ml) cultivadas en diferentes medios de cultivo celular que carecen de GSH en la receta de cultivo celular. Las células se sembraron en placas a razón de 10⁶ células/ml y se expusieron al vehículo, β AP 25-35, 17β -estradiol y GSH o una combinación de estos como se ha indicado. Los controles representan el valor medio para los grupos vehículo, GSH, 17β -estradiol y GSH \pm 17β -estradiol; luego se los agrupó una vez que las pruebas estadísticas determinaron que no eran significativamente diferentes entre. Se representan los valores medios \pm SEM para 4-5 pocillos/grupo. * $p < 0,05$ frente a los controles determinado por ANOVA seguido de la prueba de Scheffe *post-hoc*.

La Figura 2 muestra el efecto del GSH y el 17β -estradiol sobre el número de células vivas SK-N-SH tratadas con el neurotóxico β AP 25-35 en presencia o ausencia de una dosis no protectora de 17β -estradiol (2 nM). Las células se sembraron en placas a razón de 10⁶ células/ml. El efecto de la variación de las concentraciones de GSH en presencia de 17β -estradiol (triángulos sólidos) se comparó con células tratadas con GSH en ausencia de 17β -estradiol (triángulos huecos). Se representan los valores medios \pm SEM para 6 pocillos por grupo. El efecto del 17β -estradiol sobre la respuesta al GSH fue muy significativo ($F = 41,48$; $p < 0,001$). Una comparación de los valores de CE_{50} para las diferentes curvas de dosis y respuesta usando la prueba de suma de los rangos de Mann-Whitney mostró una $p = 0,036$, donde CE_{50} para β AP 25-35 \pm 17β -estradiol (2 nM) fue $0,041 \pm 0,025$ y β AP 25-35 (20 μ M) fue $82,5 \pm 60,4$.

La Figura 3 muestra el efecto de GSH y 17β -estradiol sobre el número de células vivas SK-N-SH expuestas a β AP 25-35 (20 μ M) a varias concentraciones de 17β -estradiol en presencia de 3,25 μ M de GSH (triángulos sólidos) en comparación con los efectos en células tratadas con 17β -estradiol en ausencia de GSH (triángulos huecos). Se representan los valores medios \pm SEM para 4 pocillos por grupo. El efecto de GSH sobre la respuesta al 17β -estradiol fue muy significativo ($F = 44,33$; $p < 0,001$). Una comparación de los valores de CE_{50} para las diferentes curvas de dosis y respuesta, usando la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney, mostró una $p < 0,057$ donde el CE_{50} para β AP 25-35 \pm GSH (3,25 μ M) fue $0,33 \pm 0,031$, y para β AP 25-35 (20 μ M) fue $126 \pm 87,8$.

La Figura 4 muestra los efectos de la dosis de 17β -estradiol sobre el número medio de neuronas corticales primarias de rata por campo fotográfico cuando se expusieron a β AP 25-35 en presencia y en ausencia de una dosis no protectora de GSH. Las células se sembraron y se expusieron a los tratamientos según se indicó anteriormente a las dosis observadas. Se representan los valores medios \pm SEM para 4-7 pocillos por grupo. El efecto del GSH sobre la respuesta al 17β -estradiol fue muy significativo ($F = 8,53$; $p < 0,005$). Una comparación de los valores de CE_{50} para las diferentes curvas de dosis y respuesta, usando la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney, mostró una $p < 0,057$.

La Figura 5 muestra los efectos de estratrienos en presencia y en ausencia de GSH sobre la neurotoxicidad inducida por β AP (25-35) inducida en células HT22. Los símbolos representan:

<u>con GSH (3,25 μm)</u>	<u>sin GSH</u>
-o- 17β -estradiol	-●- 17β -estradiol
-Δ- α -estradiol	-▲- α -estradiol
-□- E-3-ol	-■- E-3-O

La Figura 6 muestra los efectos del 17β -estradiol en presencia y en ausencia de GSH sobre la neurotoxicidad inducida por β AP 1-40 en células HT22. □ indica la presencia de GSH y ■ indica la ausencia de GSH. La línea representa el valor del grupo de control (sin β AP 1-40). Los datos se representan como media \pm SEM para cuatro pocillos por grupo. * = $p < 0,05$ frente al grupo de β AP 1-40 solo; ** = $p < 0,05$ frente al grupo de β AP 1-40 solo y el grupo de control (grupo sin β AP 1-40).

Descripción detallada

Una realización preferida de la invención está dirigida al novedoso descubrimiento de que el efecto citoprotector de los compuestos fenólicos policíclicos aumenta considerablemente si se lo administra al menos junto con un compuesto antioxidante adicional.

Más específicamente, la presente invención proporciona una formulación citoprotectora que se caracteriza por comprender un compuesto fenólico policíclico y un compuesto antioxidante para conferir citoprotección a una población de células en casos de enfermedad degenerativa crónica, enfermedad aguda, envejecimiento, traumatismo, osteoporosis, quemaduras, trasplante de tejidos y cirugía que produzcan una pérdida del flujo de nutrientes al tejido, en la que el compuesto fenólico policíclico (i) incluye dos o más estructuras anulares de las cuales al menos una es un anillo fenólico terminal, y (ii) tiene un tamaño menor de 1.000 dalton, y se selecciona entre compuestos anulares de ciclopentanofen (A) anteno de dos, tres o cuatro anillos que tienen un grupo hidroxilo en los carbonos 1, 2, 3 y/o 4 del anillo A.

La presente invención también proporciona el uso de un compuesto fenólico policíclico asociado a un compuesto antioxidante para la fabricación de un medicamento para conferir citoprotección a una población de células en casos de enfermedad degenerativa crónica, enfermedad aguda, envejecimiento, traumatismo, osteoporosis, quemaduras,

ES 2 217 538 T3

trasplante de tejidos y cirugía que produzcan una pérdida del flujo de nutrientes al tejido, en la que el compuesto fenólico policíclico (i) incluye dos o más estructuras anulares de las cuales al menos una es un anillo fenólico terminal y (ii) tiene un tamaño menor de 1.000 dalton, y se selecciona entre compuestos anulares de ciclopentanofen (A) antreno de dos, tres o cuatro anillos que tienen un grupo hidroxilo en los carbonos 1, 2, 3 y/o 4 del anillo A.

5 El término “citoprotección” se define aquí y en las reivindicaciones como la protección de células contra la muerte o el daño celular que, de lo contrario, ocurriría en ausencia del agente protector, pudiendo la muerte celular o el daño celular ser causada por cualquier daño mecánico, carencia de nutrientes incluida la carencia de oxígeno, traumatismo, proceso patológico, lesión debida a la exposición a productos químicos o temperaturas extremas, envejecimiento u
10 otras causas.

El término “compuesto estrógeno” según se lo utiliza aquí y en las reivindicaciones se define como cualquiera de las estructuras descritas en la Edición 11ª de “Steroids” de Steraloids Inc., Wilton N.H., incorporada a la presente memoria como referencia. En esta definición se incluyen los isómeros y enantiómeros, entre ellos los estrógenos no
15 esteroides formados por modificación o sustitución de los compuestos de la referencia Steroloid. Otros compuestos estrógenos incluidos en esta definición son los derivados de estrógeno, los metabolitos de estrógenos y los precursores de estrógeno, además de las moléculas capaces de unirse a los receptores de estrógeno asociados a la célula, además de otras moléculas cuando el resultado de la unión desencadene específicamente un efecto estrógeno caracterizado. También están incluidas las mezclas de más de un estrógeno, ejemplos de las cuales se proporcionan en la Tabla 2
20 incluida más abajo. En la Figura 5 se presentan ejemplos de estructuras α -estrógenas que tienen utilidad por sí solas o en combinación con otros agentes.

Los términos “17-E2, β -estradiol, 17 β -estradiol, β -17-E2, 17 β -E2, E2, 17 β E2, β E2” según se los utiliza aquí y en las reivindicaciones se consideran sinónimos. Del mismo modo, los términos “ α 17-E2, α -17-E2, α -estradiol, 17 α -
25 estradiol, 17 α E2, α E2” según se los utiliza aquí y en las reivindicaciones se consideran sinónimos y corresponden al isómero α del 17 β -estradiol.

La abreviatura “E-3-ol” según se la utiliza aquí y en las reivindicaciones representa el estratrieno-3-ol.

30 El significado de los términos “compuesto fenólico policíclico, compuestos policíclicos o fenoles policíclicos” según se los utiliza aquí y en las reivindicaciones se ejemplifica conforme a la descripción del documento de US-A-5.859.001 (es decir, el compuesto fenólico policíclico que (i) incluye dos o más estructuras anulares de las cuales al menos una es un anillo fenólico terminal y (ii) tiene un tamaño menor de 1.000 dalton), e incluye un compuesto que tiene un anillo A fenólico según se define más abajo y puede contener hasta 3 estructuras anulares más conforme al
35 ejemplo siguiente:

(a) Compuestos con anillo ciclopentanofen (A) antreno de dos, tres o cuatro anillos y con un grupo hidroxilo en los carbonos 1, 2, 3 y/o 4 del anillo A. Además, los grupos R seleccionados entre sales de sodio, potasio y/o amonio pueden estar unidos a las posiciones alfa o beta reemplazando el hidrógeno o cualquier carbono disponible de la estructura. Ese tipo de compuestos puede tener más sustituciones en el anillo A para proteger un único grupo OH y formar además piridina, piazina, pirimidina, s-triazina, v-triazina o as-triazina.
40

(b) El anillo A fenólico con las posibles sustituciones adicionales antes enumeradas puede unirse, además, a un anillo de seis carbonos con una o más de las siguientes estructuras: benceno; ciclohexano; 1,2- pirano; 1, 4-pirano; 1, 2-pirona; 1, 4-pirona; 1, 2-dioxina; 1, 3-dioxina (forma dihidro); piridina; piridazina; pirimidina; pirazina; piperazina; s-triazina; a-triazina; v-triazina; 1, 2, 4-oxazina; 1, 3, 2-oxazina; 1, 3, 6-oxazina (pentoxazol); 1, 2, 6-oxazina; p-isoxazina; 1, 2, 5-oxatiazina; 1, 2, 6-oxatiazina; 1, 4, 2-oxadiazina; 1, 3, 5, 2-oxadiazina; morfolina (tetrahidro-p-isoxazina). Cualquiera de las estructuras de seis anillos enumeradas arriba puede unirse a cualquiera de las siguientes estructuras de 5 anillos: furano; tiofeno (tiofurano), pirrol (azol); isopirrol (isoazol); 3-isopirrol (isoazol); pirazol (1, 2-diazol); 2-isoimidazol (1, 3-isodiazol); 1, 2, 3-triazol; 1, 2, 4-triazol; 1, 2-ditiol; 1, 2, 3-oxatiol; isoxazol (furo(a) monozol); oxazol (furo(b) monazol); tiazol; isotiazol; 1, 2, 3- oxadioazol; 1, 2, 3, 4- oxatriazol; 1, 2, 3, 5-oxatriazol; 1, 2, 3-dioxazol; 1, 2, 4- dioxazol; 1, 3, 2-dioxazol; 1, 3, 4-dioxazol; 1, 2, 5-oxatiazol; 1, 3-oxatiol; ciclopentano.
50

(c) Cualquiera de los compuestos enumerados arriba en los que el compuesto con anillo ciclopentanofen (a) antreno se selecciona de un grupo que consiste en 1, 3, 5 (10), 6, 8-estrapentaen; 1, 3, 5 (10), 6, 8, 11-estrapentaen; 1, 3, 5 (10), 6-estratetraen, 1, 3, 5 (10) 7 -estratetraen; 1, 3, 5 (10) 8-estratetraen; 1, 3, 5 (10) 16-estratetraen; 1, 3, 5 (10) 15-estratetraen; 1, 3, 5 (10)- estratrien; 1, 3, 5 (10) 15-estratrien.
55

El término “antioxidante” según se lo define aquí y en las reivindicaciones se refiere a cualquier molécula que evite la oxidación de un sustrato particular por una segunda molécula. En la invención se incluyen los siguientes ejemplos de antioxidantes aunque no son limitantes:
60

Tioles incluidos el glutatión, la taurina, la cisteína, la homocisteína y el ácido α -lipoico; fenoles, incluidos el probucol, los salicilatos, el Trolox C, el 3, 4-dihidroxitolueno, el 3, 4- dihidroxicinámico, el ácido nordihidroxicuairéctico, la 2', 4'-dihidroxiacetofenona, la 2', 5'-dihidroxiacetofenona, la 3', 4'-dihidroxiacetofenona, el propilgalato; agentes trampa de espín incluidos el dimetil-1-pirrolin-N-óxido, la N-terc-butil- α -fenilnitrona; aminas aromáticas incluidas la prometazina, la clorpromazina, la etoquinina, la etoquinina, el alopurinol, el ácido úrico; caroteno ideas, incluido el β -caroteno, el α -caroteno, el γ -caroteno, el licopeno, el caratol; flavonoides incluidos la (\pm)-catequina, la dihidroquercetina,
65

la hesperetina, la texasina, la biochanina A, el caempferol, la quercetina y el 6, 7-dihidroxi-4'-metoxi-isoflavanol; aminoesteroides de selenio incluidos el mesilato de trilazad, la metil prednisolona, el suleptanato; lazaroides; y ubi-quinonas como la coenzima Q2, la coenzima Q10. Esta lista no es limitante.

5 *Compuestos policíclicos que tienen un anillo A fenólico terminal en combinación con antioxidantes para mejorar la potencia citoprotectora de forma sinérgica*

Hemos demostrado por primera vez que en el ambiente extracelular un antioxidante proporciona mayor citoprotección cuando se lo administra a una persona junto con un compuesto policíclico que tiene un anillo A fenólico, como el estrógeno, a dosis con relevancia fisiológica y farmacológica. El mayor efecto de la combinación de los compuestos fenólicos policíclicos y los antioxidantes, más particularmente los compuestos estrógenos que tienen una actividad sexual insustancial en combinación con antioxidantes tioles, más particularmente compuestos estrógenos con actividad sexual insustancial y glutatión, promueve una protección celular mayor que la observada con cualquier compuesto por separado. La combinación de antioxidantes y compuestos fenólicos policíclicos incluidos los estrógenos tiene utilidad para la protección de las células del daño causado por cualquiera de los diversos eventos que son conocidos como perjudiciales para la célula, incluido el daño químico como el causado por los radicales libres, los aminoácidos excitadores y la placa amiloide. Por ejemplo, la combinación anterior es más eficaz para la neuroprotección que el compuesto antioxidante o el compuesto fenólico policíclico por separado y, por lo tanto, representa un enfoque terapéutico novedoso para tratar la pérdida neuronal que se produce en las personas en las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer. Además, el tratamiento combinado descrito aquí se ha utilizado para tratar otros estados patológicos que resultan del aumento de la muerte celular, incluida la isquemia, el traumatismo y el envejecimiento.

Las observaciones anteriores son una ampliación sorprendente e inesperada de observaciones previas realizadas por los autores en las que identificaron la aplicación de compuestos fenólicos policíclicos que tienen un anillo A fenólico para la protección celular. Previamente, los autores han demostrado que los compuestos fenólicos policíclicos pueden proteger contra: la neurodegeneración (US-A-5.859.001), la muerte celular asociada a la isquemia (US-A-5.877.169), la osteoporosis (US-A-5.554.601), y la muerte celular que se produce en los tejidos durante la separación de tejidos del cuerpo y el trasplante (US-A-5.824.672).

Como se muestra en la Figura 1, el efecto citoprotector del 17β -estradiol y el glutatión sobre células neuronales humanas (SK-N-SH) fue significativamente mayor que el efecto citoprotector del 17β -estradiol y el glutatión por separado. Este efecto se observó sistemáticamente cuando se incubaron las células en diferentes medios. La Figura 2 ilustra también este efecto; la protección celular máxima se observó antes y a concentraciones menores de glutatión cuando se incluyó 17β -estradiol en el medio. Una observación similar se hizo en las Figuras 3 y 4 cuando se agregó glutatión en una cantidad constante con concentraciones crecientes de 17β -estradiol a células neuronales humanas y también a neuronas corticales primarias de rata. También se observó un marcado efecto sinérgico cuando se usó un estrógeno que tiene actividad sexual insustancial (α -estradiol) (Figura 5). La Figura 5 ilustra también aumentos de los efectos neuroprotectores de 100-600 veces para tres compuestos estrógenos diferentes. Los autores han encontrado que los estratrienos muestran un aumento del efecto citoprotector de aproximadamente 1.000-5.000 veces cuando se los administra con el antioxidante, glutatión. En las realizaciones de la invención, el aumento observado con diferentes combinaciones de agentes se encuentra dentro del intervalo de las 100 veces a las 10.000 veces. El efecto sinérgico del antioxidante y el compuesto estrógeno también se observó en células que carecían de un receptor de estrógeno. La Figura 6 muestra el efecto sinérgico del glutatión con 17β -estradiol en células HT-22.

Los procedimientos de determinación del efecto citoprotector que se describen en estos ejemplos pueden aplicarse fácilmente para identificar el grado de sinergia del efecto de otros compuestos fenólicos policíclicos y antioxidantes, además de los descritos en la presente memoria. Además de las células neuronales pueden usarse otras células, de acuerdo con las determinaciones descritas en la presente memoria, para demostrar el efecto citoprotector de los compuestos fenólicos policíclicos con antioxidantes. Estas determinaciones y aplicaciones se encuentran dentro del alcance de la invención según se expresa aquí.

Aunque los ejemplos anteriores describen la sinergia usando el glutatión como antioxidante, pueden usarse otros antioxidantes para obtener el efecto sinérgico observado. La Tabla 1 proporciona un resumen de los efectos del 17β -estradiol junto con varios antioxidantes y su combinación sobre las células neuronales.

Los solicitantes no tienen el deber ni la obligación de explicar el mecanismo por el cual funciona la invención. Sin embargo, sugieren el siguiente mecanismo para explicar el efecto sinérgico observado. Es conocido en estado anterior de la técnica que los compuestos estrógenos son moléculas lipófilas. Dado el carácter lipófilo del estrógeno, este puede insertarse en la membrana. Partiendo de la observación de que es deseable la presencia de un grupo fenólico intacto para la citoprotección, es posible que done el hidrógeno hidroxílico evitando así la cascada de peroxidación lipídica en la membrana. Además, la mayor potencia de los estrógenos podría ser el resultado de su capacidad de donar desde varias posiciones del anillo A (Jelnick y Bradlow, 1990). Como resultado de esta donación de hidrógeno puede producirse una forma de estradiol oxidada relativamente estable. Se propone aquí, por ejemplo, que una glutatión peroxidasa podría regenerar la forma reducida del estrógeno. Esta enzima depende del GSH como sustrato para volver a donar el grupo hidrógeno al estrógeno y, por lo tanto, se produce una sinergia entre la actividad de las dos moléculas.

La especificidad de la interacción de los estrógenos con este sistema de glutatión está apoyada por dos líneas de evidencias. Primero, no hay interacciones aparentes observadas entre el estrógeno y los otros tioles probados, ácido

lipoico o taurina, o algún otro antioxidante, incluido el ácido ascórbico o el α -tocoferol. Debe observarse que mientras el α -tocoferol es un antioxidante potente por derecho propio, se han presentado argumentos convincentes de que el estrógeno es aún más potente. Segundo, la capacidad del glutatión oxidado de funcionar en este sistema es un argumento de que el estrógeno puede estar interactuando con el proceso de glutatión peroxidasa/reductasa.

La presencia de estrógeno en las membranas celulares es un reflejo de las cantidades de estrógeno introducidas en la circulación sanguínea. Si el estrógeno está disponible puede insertarse en la membrana celular o en cualquier célula disponible sin especificidad, proporcionando así un efecto de protección celular. Sin embargo, en la medida en que las cantidades de estrógeno se vuelven limitantes, estos pueden localizarse predominantemente en las membranas celulares que tienen receptores de estrógeno.

Basándose en el mecanismo anterior, los solicitantes afirman que la protección celular producida por el efecto sinérgico de los compuestos fenólicos policíclicos y los antioxidantes puede producirse para cualquiera de las células del cuerpo y no se restringe a los ejemplos proporcionados aquí. Los solicitantes han demostrado previamente el efecto de protección celular de los compuestos fenólicos policíclicos solos en las neuronas, las células neurogliales, (US 5.554.601), las células endoteliales (US-A-5.877.169), las células del músculo esquelético y los eritrocitos (US-A-5.824.672). Además, los osteoblastos, las células del músculo liso incluidas las células musculares cardíacas, los fibroblastos y las células madre estarían todas protegidas mediante el efecto sinérgico de los compuestos fenólicos y los antioxidantes.

El efecto sinérgico es independiente del receptor

Hemos demostrado que el efecto sinérgico observado no depende del receptor de estrógeno (ER) nuclear. Esta observación puede llevar a nuevos procedimientos de diseño de fármacos para tratar la pérdida celular anormal en seres humanos.

El efecto sinérgico independiente de ER fue confirmado por experimentos que usaban la línea celular neuronal murina (HT-22) que carece de receptor funcional de estrógeno (Figuras 5 y 6). Cuando estas células se expusieron al neurotóxico β AP 25-35, se produjo aproximadamente un 50-60% de muerte celular. El tratamiento concurrente con cualquiera de los tres estratrienos, β -estradiol, α -estradiol o estratrien-3-ol, produjo una neuroprotección dependiente de la dosis (Figura 5). La presencia de 3 H-estradiol con unión específica a extractos nucleares y preparados de células completas se determinó mediante las pruebas descritas por Miranda *et al.* [J. Neurobiol 31, (1996), 77-78] y Nakao *et al.* [Atherosclerosis 38 (1981) 75-80]. La unión del estradiol a células HT-22 se comparó con la unión a células MCF-7 portadoras del receptor ER. Las células HT-22 no demostraron tener una unión específica en ninguna determinación, observándose sólo $6 \pm 3,93$ fmol uniones específicas por millón de células en comparación con $56 \pm 6,5$ para la línea celular MCF-7 ER positiva en los preparados de células completas y 0,05 fmol por millón de células en comparación con 35,21 para las células MCF-7 del sedimento nuclear bruto. La protección conferida a estas células por dosis fisiológicas de estrógenos confirma que la mayor parte de los efectos protectores de los estrógenos es independiente de ER.

Debe observarse que mientras que β -estradiol es una hormona sexual y se sabe que actúa a través del receptor estrógeno, por lo general, se considera que el α -estradiol y el estratrien-3-ol son biológicamente inactivos según se describe en la técnica. Estos compuestos son todos ejemplos de compuestos fenólicos policíclicos. La invención comprende el uso de cualquier clase de compuesto fenólico policíclico independientemente de su capacidad para unirse al receptor de estrógeno.

Los autores han probado el estradiol conjugado con albúmina de suero bovino (BSA) para determinar si el estradiol podría proteger células HT-22 de la β -AP (25-35) si se restringe el estrógeno al ambiente extracelular. La inmovilización del esteroide por conjugación con BSA (17 β -estradiol-6-(carboximetil) oxime:BSA que contiene 17 β -estradiol 20 μ M) anuló la capacidad del esteroide de proteger las células HT22 de la toxicidad producida por β AP (25-35) en presencia de GSH (Ejemplo 2a, Tabla 2). Esto es coherente con observaciones similares realizadas con células SK-N-SH. En conjunto estos datos indican que es deseable la interacción libre de estratrienos con la membrana celular o el espacio intracelular para que ejerzan sus efectos neuroprotectores.

La dosis de GSH usada en estos estudios no tuvo efecto sobre la toxicidad inducida por β -AP (25-35) por sí misma en la medida en que β -AP (25-35) causó un $54 \pm 4\%$ y un $55 \pm 3\%$ de disminución de la disponibilidad celular en ausencia y en presencia de 3,25 pM GSH, respectivamente. Sin embargo, una dosis de GSH de 325 μ M mostró una protección significativa de la toxicidad producida por β -AP en células de neuroblastoma SK-N-SH (Figura 2). Además, la exposición de células HT-22 a GSH 3,25 μ M solo, 17 β -estradiol 200 nM solo o ambos combinados no causó un aumento del número de células en ausencia de agresión (Figura 6) lo cual indica que el aumento del número de células se debe a la protección y no a un efecto mitógeno de los compuestos.

Aplicaciones del efecto sinérgico observado entre los compuestos fenólicos policíclicos y los antioxidantes

Es posible utilizar un preparado farmacéutico que incluya un compuesto fenólico policíclico y un antioxidante para tratar personas que padecen un traumatismo, una enfermedad crónica degenerativa o una enfermedad aguda como la inducida por un ataque isquémico. Entre los ejemplos se incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la apoplejía, la isquemia, el infarto de miocardio o la angioplastia, o el traumatismo cerebral o de la médula

ES 2 217 538 T3

espinal, la hipoglucemia, la anoxia, las quemaduras o las cirugías que producen pérdida del flujo de nutrientes al tejido.

Las realizaciones de la invención pueden aplicarse, además, al proceso de trasplante de tejido, antes, durante o después de la extracción o reperfusión celular, tisular o de órganos, o durante el almacenaje de células, tejidos u órganos y se aplica a cualquier tipo de células del cuerpo. A continuación se presentan ejemplos que no tienen la intención de ser limitantes sino una ilustración eficaz del novedoso efecto biológico de la invención.

Ejemplo 1

10 *Efecto sinérgico de un antioxidante con un compuesto fenólico policíclico usando células neuronales humanas SK-N-SH*

Se eligió glutatión como antioxidante y 17 β -estradiol como compuesto policíclico. La prueba usó las células de neuroblastoma humano SK-N-SH. Se trataron las células con toxinas que se sabe que producen la muerte celular, encontradas en la placa amiloide β -AP (1-40) y β -AP (25-35). Los números que siguen a "AP" corresponden al tamaño y el tipo del fragmento proteico identificado por el número de residuos aminoácidos.

Materiales: β -AP (25-35) liofilizado (1 mg) (Bachem, Torrance, California, EE.UU.) se disolvió inicialmente en 200 μ l de ddH₂O y con el agregado de 800 μ l de PBS se observó una agregación rápida. Se disolvió inicialmente 17 β -estradiol (17 β -estradiol, Steraloids, Wilton, New Hampshire, EE.UU.) en etanol absoluto (Fisher Scientific Inc., Orlando, Florida, EE.UU.) a razón de 10 mg/ml y se diluyó en el medio de cultivo celular para obtener las concentraciones adecuadas. Se disolvió inicialmente acetato de α -tocoferol en 200 μ l de etanol absoluto y se diluyó en el medio de cultivo celular hasta las concentraciones adecuadas. Se disolvieron inicialmente ácido lipoico (ácido tiótico), taurina (ácido 2-aminoetanoico) y ácido ascórbico en medio de cultivo celular y se usó a la concentración indicada. A no ser que se indique lo contrario, los materiales se obtuvieron de Sigma Chemical Corp.

Cultivo celular de neuroblastoma SK-N-SH: Se obtuvieron células de neuroblastoma SK-N-SH de American Type Collection (Rockville, MD). Los cultivos celulares se dejaron proliferar hasta que confluyeron en un medio RPMI-1640 (Fisher Scientific, Inc.) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) tratado con carbón/dextrano (Hyclone[®], Logan, Utah, EE.UU.), 100 U/ml de penicilina G y 100 mg/ml de estreptomycin (Sigma Chemical Corp.) en monocapas en matraz Corning de 150 cm² (Fisher Scientific, Inc.), a una temperatura de 37°C y con un 5% de CO₂ y un 95% de aire. Se cambió el medio tres veces a la semana. Se observaron las células con un microscopio de contraste de fase (Nikon Diaphot-300).

(a) Las células SK-N-SH usadas en los siguientes experimentos estaban en los pases 4 a 12. El medio de cultivo se decantó inicialmente y se enjuagaron las células con EDTA al 0,02% durante 30 minutos a 37°C. Luego se contaron las células en un hemacitómetro Neubauer (Fisher Scientific) y se volvieron a suspender en un medio adecuado. Se iniciaron los estudios sembrando 1 x 10⁶ células por pocillo en 24 placas, permitiendo la unión en medio normal, y luego decantando ese medio y reemplazándolo con el tratamiento adecuado después de 4 horas. Se cultivaron las células en DMEM o RPMI-1640 sin GSH (reducido), suplementado con FBS al 10% y anticuerpos con etanol absoluto como un control del vehículo o suplementado con el agregado de β AP 25-35 (20 μ M), 17 β -estradiol (0,002 - 200 nM), GSH (0,0325-325 μ M), acetato de α -tocoferol (50 μ M), ácido ascórbico (100 μ M), ácido lipoico (10 μ M), taurina (5 mM) o una combinación como se indicó. Se eligió la concentración de 20 μ M de β AP porque es cercana a LD₅₀ para este péptido, como han demostrado los autores (Green *et al.*, 1996). La elección de las concentraciones de antioxidante se realizó a partir de las evaluaciones preliminares de dosis y respuesta usadas para identificar la concentración a la cual no se obtiene neuroprotección.

La viabilidad de células SK-N-SH se determinó usando el procedimiento de exclusión con azul de tripano (Black and Berenbaum, 1964; Tennant, 1964). Tras 72 horas de incubación, se decantó el medio de tratamiento y se separaron las células por incubación con 0,2 ml de EDTA al 0,02% durante 30 minutos a 37°C. Se suspendieron las células por pipeteado repetido. Se incubaron alícuotas de 100 μ l de cada suspensión de células con alícuotas de 100 μ l de colorante azul de tripano al 0,4% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se contaron todas las suspensiones en un hemacitómetro en el transcurso de los 10 minutos posteriores a la adición del colorante azul de tripano. Se hicieron dos recuentos independientes de células vivas y muertas para cada alícuota.

TABLA 1

Efectos del 17 β -estradiol (17 β -estradiol), un tipo de antioxidante, y su combinación sobre la toxicidad inducida por β AP 25-35 en el número de células vivas de SK-N-SH. Los números indican el número de células vivas

	Ácido ascórbico (100 μ M)	Tocoferol (50 μ M)	Taurina (5 μ M)	Ácido lipoico (10 μ M)	GSH (3,25 μ M)	GSSG (1,5 μ M)
Control	365 \pm 9	641 \pm 25	628 \pm 13	628 \pm 13	657 \pm 30,0	657 \pm 30
β AP	118 \pm 9 *	366 \pm 24 *	408 \pm 10 *	408 \pm 10 *	331 \pm 17 *	331 \pm 17 *
β AP+ β E2	144 \pm 9	407 \pm 21	94 \pm 3	393 \pm 3	357 \pm 19	357 \pm 19
β AP+TRT	124 \pm 6 *	448 \pm 12	402 \pm 9 *	406 \pm 7 *	369 \pm 7 *	350 \pm 29 *
β AP+ β E2 +TRT	188 \pm 11 *	456 \pm 14 *	439 \pm 11 *	416 \pm 10 *	534 \pm 16 *	513 \pm 7 *

* $p < 0,05$ frente a los controles tratados con vehículo

x = $p < 0,05$ frente a los controles tratados con β AP

TRT = tratamiento con antioxidante indicado

Estadística: Se determinaron los efectos significativos del tratamiento sobre la viabilidad celular usando un ANOVA seguido por la prueba de Scheffe *post-hoc*, con una significación establecida en $p < 0,05$. Para las evaluaciones de dosis y respuesta, se calcularon valores de CE_{50} asignando al azar recuentos de células a las dosis indicadas para generar 3-5 líneas por tratamiento y determinar el valor promedio para esas líneas. Se usó el análisis no paramétrico de la suma de rangos de Mann-Whitney sobre los valores de CE_{50} porque las varianzas de la desviación típica no fueron equivalentes. Se calcularon las comparaciones para las relaciones entre dosis y respuesta usando un ANOVA bilateral para determinar la significación de la presencia o ausencia de GSH o 17 β -estradiol.

(b) Se volvieron a cultivar células SK-N-SH humanas en placas de 96 pocillos en un medio RPMI sin glutatión. Cuatro horas más tarde, un grupo de placas de células se trataron simultáneamente con la proteína β -amiloide β -AP 25-35: (20 μ M) y una serie de concentraciones de glutatión que variaron entre 0-325 μ M. Se trató un segundo grupo de placas de células simultáneamente con $A\beta$ 25-35: (20 μ M), una serie de concentraciones de glutatión que variaron entre 0-325 μ M y una concentración de dosis única de 17 β -estradiol (2 nM). Después de 72 horas de incubación, se determinaron las células vivas por exclusión con Trypan Blue. Como se muestra en la Figura 2, en ausencia de 17 β -estradiol, el glutatión tenía una DE_{50} de 32,5 μ M y mostró poco efecto neuroprotector a 3,25 μ M. Por el contrario, en la presencia de 17 β -estradiol, se comprobó que la DE_{50} era 0,325 μ M y que proporcionaba 1.000 veces más neuroprotección que el glutatión solo.

(c) Utilizando la determinación antes descrita, se trataron células SK-N-SH con $A\beta$ 25-35 (20 μ M), una dosis única de glutatión (3,25 μ M) y concentraciones variables de 17 β -estradiol en el intervalo de 0-200 nM. Después de 72 horas de incubación, se tiñeron las células con Trypan Blue. Se observó neuroprotección a concentraciones de 200 nM de 17 β -estradiol en ausencia de glutatión con un DE_{50} de 100 nM. En presencia de glutatión y 17 β -estradiol, la DE_{50} fue 0,02 nM. Por lo tanto, la potencia neuroprotectora del 17 β -estradiol alcanza las 5.000 veces en presencia de glutatión en comparación con la ausencia de glutatión (Figura 3).

La neuroprotección proporcionada por el 17 β -estradiol solo fue 628 veces menor que en presencia de GSH. Después del tratamiento de las células con β AP (1-40), una dosis de 200 nM de 17 β -estradiol proporcionó una protección del 99,9% en presencia de GSH y 35,6% en ausencia de GSH (Figuras 1). Los estrógenos α -17-E2 y E-3-ol se comportaron ambos de forma similar con un DE_{50} de 6 nM y 14 nM, respectivamente, en presencia de GSH y un DE_{50} de 1.014 nM y 3.683 nM, respectivamente, en ausencia de GSH.

Ejemplo 2

Efecto neuroprotector sinérgico de un antioxidante con un compuesto fenólico policíclico sobre células neuronales murinas que carecen de receptores funcionales estrógenos (HT-22) usando una prueba in vitro

(a) Efecto del 17 β -estradiol y el conjugado 17 β -estradiol-6-(carboxi-metil)oxima: BSA sobre la toxicidad inducida por β AP 25-35 en células HT-22.

ES 2 217 538 T3

Se iniciaron los experimentos sembrando las células en una placa Nunc® de 24 pocillos y se dejó que las células se adhirieran durante 4 horas antes del tratamiento. Se expusieron las células a β AP 25-35 20 μ M en presencia de la dosis indicada de 17 β -estradiol o 17 β -estradiol - BSA en medio RPMI que contenía GSH 3,25 μ M. Después de 48 horas se suspendieron las células y se determinó la viabilidad usando el debido procedimiento de exclusión por Trypan Blue [Tennant J.R. (1964) Transplantation 2 (1964) 685-694]. Se prepararon los esteroides y β AP como se describió anteriormente [Green *et al.*, Neuroscience Lett. 218 (1996) 165-168]. Se analizaron los datos con Análisis de Varianza unilaterial y se usó un análisis de Scheffe *post-hoc* para las comparaciones entre los grupos previstas. Se presentaron los datos como media \pm SEM para 4 pocillos por grupo. * = $p < 0,05$ frente a β AP (20 μ M) grupo.

TABLA 2

Efectos del 17 β -estradiol y el conjugado 17 β -estradiol -6 (carboxi-metil)oxima:BSA sobre la toxicidad inducida por β AP (25-35) en células HT-22

Tratamiento	Número de células vivas (x 10 ³ células) \pm SEM
Control (Sin β AP)	427 \pm 11 *
β AP (20 μ M)	189 \pm 11
β AP + β 17-E2 0,2 μ M	324 \pm 14 *
β AP + β 17-E2:BSA 20 μ M	216 \pm 17

(b) Efectos de los estratrienos en presencia y ausencia de glutatión sobre la neurotoxicidad inducida por β AP 25-35 en células HT-22.

Se iniciaron los experimentos sembrando células en placas Nunc® de 24 pocillos: se dejó que las células se adhirieran durante 4 horas antes del tratamiento. Se expusieron las células a 20 μ M de β AP en presencia de la dosis indicada de β 17-estradiol β AP o α 17-E2 o E-3-ol (0-20.000 nM) ya sea en medio RPMI que contiene 3,25 μ M GSH o medio RPMI sin GSH. Después de 48 horas se suspendieron las células y se determinó la viabilidad usando el procedimiento de exclusión con colorante Trypan Blue (Tennant, 1964). Se prepararon los esteroides y β AP como se describió anteriormente (Green *et al.*, 1996). Se analizaron los valores de DE₅₀ con Análisis de Varianza bilateral. Se determinaron las diferencias entre efectos con un análisis *post-hoc* de Scheffe considerando significativa una $p < 0,05$. El efecto del glutatión es significativo con una $p < 0,001$. Se normalizaron los datos al grupo de control sin β AP como una protección del 100% y el grupo con β AP solo como una protección del 0%. En la Figura 3 se presenta la media \pm SEM para 3-5 pocillos por grupo.

(c) Efectos del 17 β -estradiol en presencia y en ausencia de glutatión sobre la neurotoxicidad inducida por β AP (1-40) en células HT-22.

Se llevaron a cabo experimentos según se describió en el Ejemplo 2(b) con la excepción de que β AP (1-40) se dejó incubarse durante 4 días antes de diluir con 20 μ M en el medio de cultivo. El envejecimiento de β AP es necesario para agregar el péptido, para que tenga así el efecto tóxico sobre las células [Pike *et al.* J. Neurosci, 13 (1993) 1676-1687]. Se presentaron los datos como media \pm SEM para 3-4 pocillos por grupo. Se analizaron los datos por análisis de varianza unilaterial y se consideró significativa una $p < 0,05$ (Figura 5).

Como muestran las Figuras 5 y 6 los resultados demuestran el efecto neuroprotector del GSH con β -estradiol sobre las células HT22 después del tratamiento con uno de dos tipos de la neurotoxina β -AP. Se observó un efecto sinérgico entre los estrógenos neuroprotectores y la protección conferida por antioxidante intracelular GSH. El 17 β -estradiol, el potente estrógeno natural, protegió las células HT-22 de la muerte celular inducida por el fragmento amiloide neurotóxico, el fragmento β -AP (25-35) con un ED₃₀ de 5 nM y neuroprotección significativa con esteroide 2 nM y GSH 3,25 μ M (Figura 5).

Ejemplo 3

Efecto neuroprotector de compuestos estrógenos con un antioxidante sobre cultivos de neuronas corticales primarias de rata

Para asegurar que el efecto sinérgico observado en los Ejemplos 1 y 2 no se debió al origen o la tumorigenicidad de las células, llevamos a cabo experimentos similares en neuronas corticales primarias de rata. *Cultivo de neuronas corticales primarias de rata*: Se prepararon los cultivos de neuronas primarias siguiendo el procedimiento usado por Chandler *et al.* [Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 17 (1993) 54-60].

Los tratamientos se agregaron directamente a los cultivos primarios el día 10 de cultivo, manteniendo un volumen agregado constante independientemente del tratamiento de la siguiente forma: *Controles*: etanol absoluto y PBS; *muestras*: β AP 25-35 (10 μ M), 17 β -estradiol (0,02 mM - 2 μ M), GSH (3,25 μ M) o combinaciones según se indicaron. Una vez agregados los tratamientos, se incubaron los cultivos primarios durante otras 24 horas y se determinó la viabilidad usando el equipo LIVE/DEAD® de viabilidad/citotoxicidad (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células vivas se distinguen por la presencia de actividad de la esterasa

ES 2 217 538 T3

intracelular que escinde el colorante calceína AM, produciendo una fluorescencia verde brillante cuando se excita. El homodímero etidio entra en las células que tienen la membrana dañada y produce una fluorescencia roja al unirse a los ácidos nucleicos. Ambos colorantes se excitan a 485 nm, y se observaron las placas de cultivo con microscopio de fluorescencia (Nikon Diaphot-300). Se fotografiaron tres campos al azar y se determinó el número de células vivas por campo contando el número de células coloreadas de verde brillante. Nuevamente se evaluó la capacidad del estradiol en presencia y en ausencia de GSH (3,25 μM) (Fig. x). El agregado de βAP 25-35 (10 μM) a neuronas corticales primarias dio como resultado una reducción del número medio de células viables por campo del 39% en ausencia de GSH y del 40% en presencia de GSH (Figura 4). Cuando se evaluaron dosis crecientes de 17β -estradiol con βAP 25-35, la dosis de 200 μM de 17β -estradiol fue la menor dosis que se resultó protectora, lo cual está totalmente de acuerdo con nuestros estudios en la línea celular SK-N-SH (Figuras 1-3). Con el agregado de GSH (3,25 μM) al 17β -estradiol, todas las dosis de 17β -estradiol de 2 μM o mayores fueron neuroprotectoras (Fig. 4). La evaluación de los valores de CE_{50} demuestra cambios similares de la potencia, desde $68,1 \pm 79 \mu\text{M}$ en ausencia de GSH, a $4,3 \pm 5,9 \mu\text{M}$ en presencia de GSH. Asimismo, la evaluación del efecto de GSH sobre el efecto neuroprotector del 17β -estradiol en neuronas corticales primarias de rata usando un ANOVA bilateral demostró un efecto significativo ($F: 8,53; p < 0,005$).

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Una formulación citoprotectora **caracterizada** porque comprende un compuesto fenólico policíclico y un compuesto antioxidante para conferir citoprotección a una población de células en casos de enfermedad degenerativa crónica, enfermedad aguda, envejecimiento, traumatismo, osteoporosis, quemaduras, trasplante de tejidos y cirugía que produzcan una pérdida del flujo de nutrientes al tejido, en la que el compuesto fenólico policíclico (i) incluye dos o más estructuras anulares de las cuales al menos una es un anillo fenólico terminal, y (ii) tiene un tamaño menor de 1.000 dalton, y se selecciona entre compuestos anulares de ciclopentanofeno (A) antreno de dos, tres o cuatro anillos que tienen un grupo hidroxilo en los carbonos 1, 2, 3 y/o 4 del anillo A.

10 2. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el compuesto fenólico policíclico es un compuesto estrógeno, que preferiblemente tiene una actividad sexual insustancial.

15 3. Una formulación como la reivindicada en la reivindicación 2, en la que el compuesto estrógeno es un estratrieno.

20 4. Una formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el antioxidante se elige entre un tiol, un fenol, un agente trampa de espín, una amina aromática, un carotenoide, un flavonoide, un aminoesteroide de selenio y una ubiquinona.

25 5. Una formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el antioxidante es el glutatión.

30 6. Una formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que hay un efecto sinérgico observado sobre la citoprotección, atribuible a la asociación entre el compuesto fenólico policíclico y el compuesto antioxidante.

35 7. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el efecto sinérgico es del orden de las 100-10.000 veces.

40 8. Una formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la citoprotección se confiere en los casos de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, isquemia o apoplejía.

45 9. Una formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la población de células es de células neuronales, células cardiovasculares, células cerebrovasculares o células corporales que han estado expuestas a un suceso isquémico.

50 10. El uso de un compuesto fenólico policíclico en asociación con un compuesto antioxidante para la fabricación de un medicamento para conferir citoprotección a una población de células en casos de enfermedad degenerativa crónica, enfermedad aguda, envejecimiento, traumatismo, osteoporosis, quemaduras, trasplante de tejidos y cirugía que produzcan una pérdida del flujo de nutrientes al tejido, en el que el compuesto fenólico policíclico (i) incluye dos o más estructuras anulares de las cuales al menos una es un anillo fenólico terminal, y (ii) tiene un tamaño menor de 1.000 dalton, y se selecciona entre compuestos anulares de ciclopentanofeno (A) antreno de dos, tres o cuatro anillos que tienen un grupo hidroxilo en los carbonos 1, 2, 3 y/o 4 del anillo A.

45

50

55

60

65

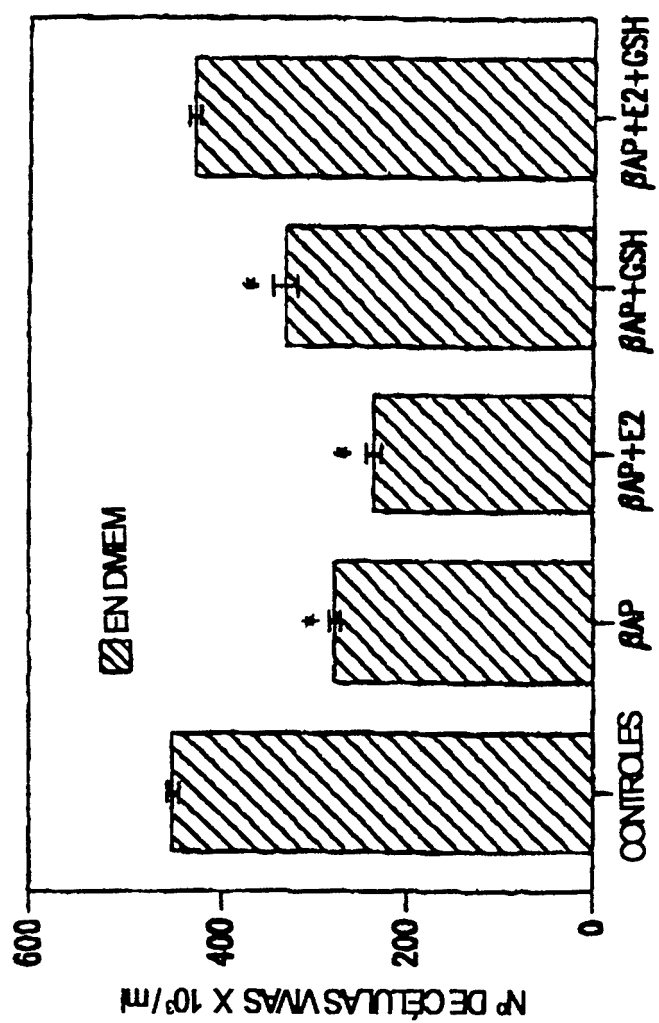


FIG.1A

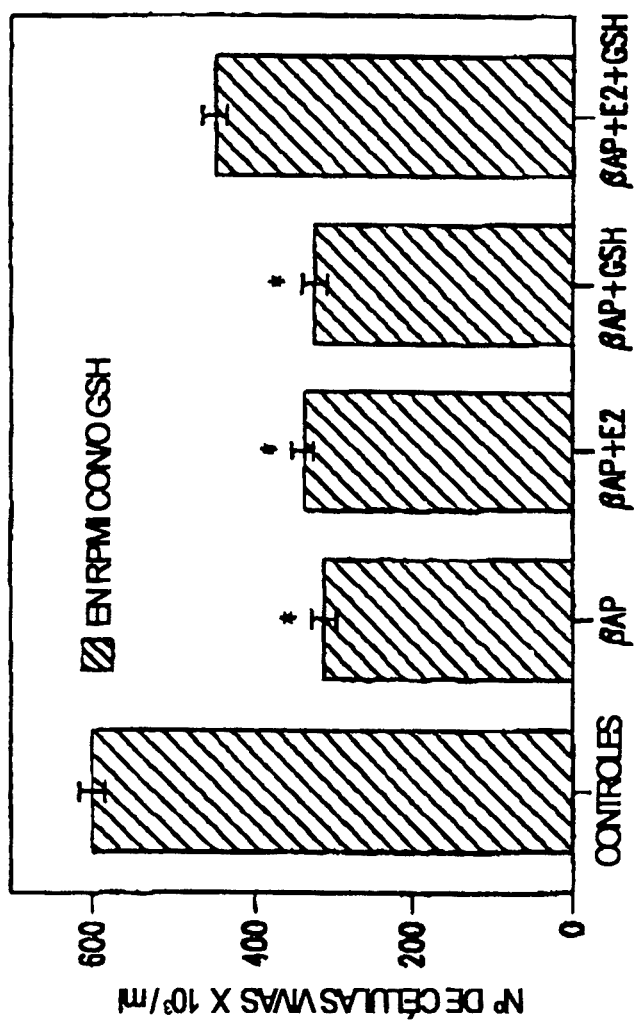


FIG.1B

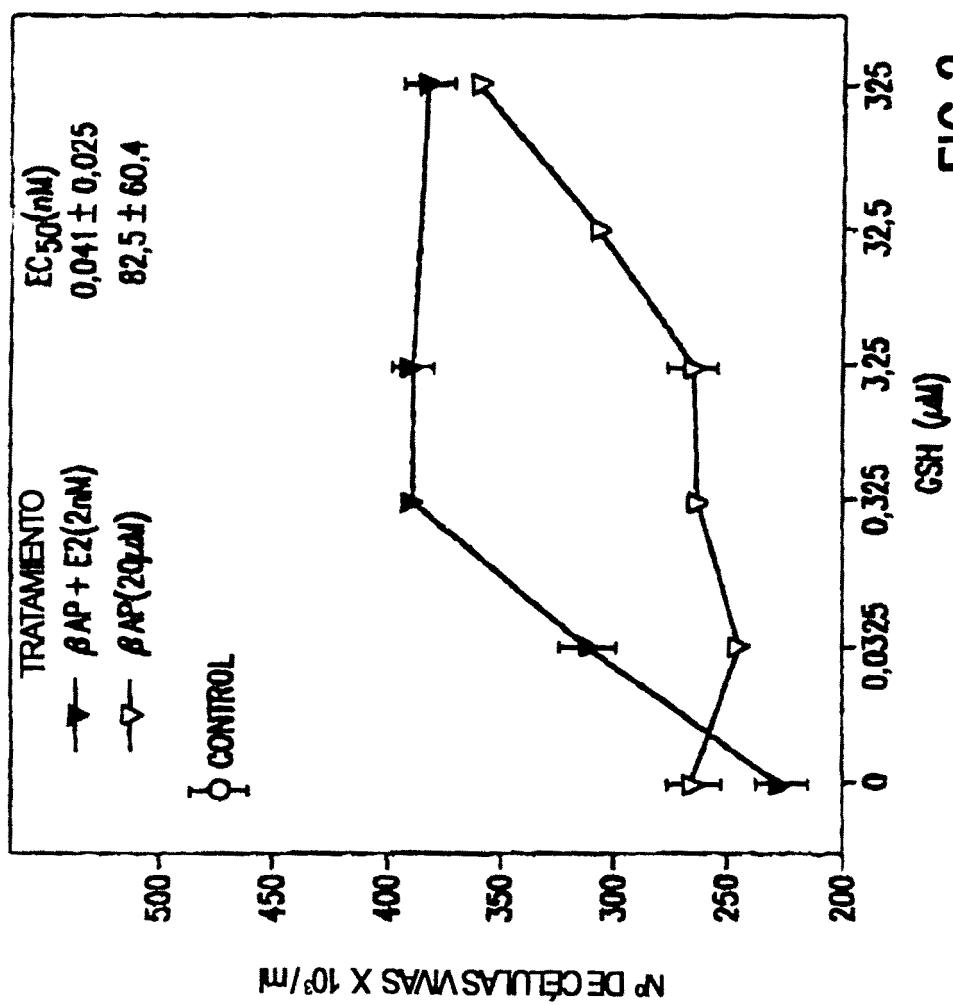


FIG.2

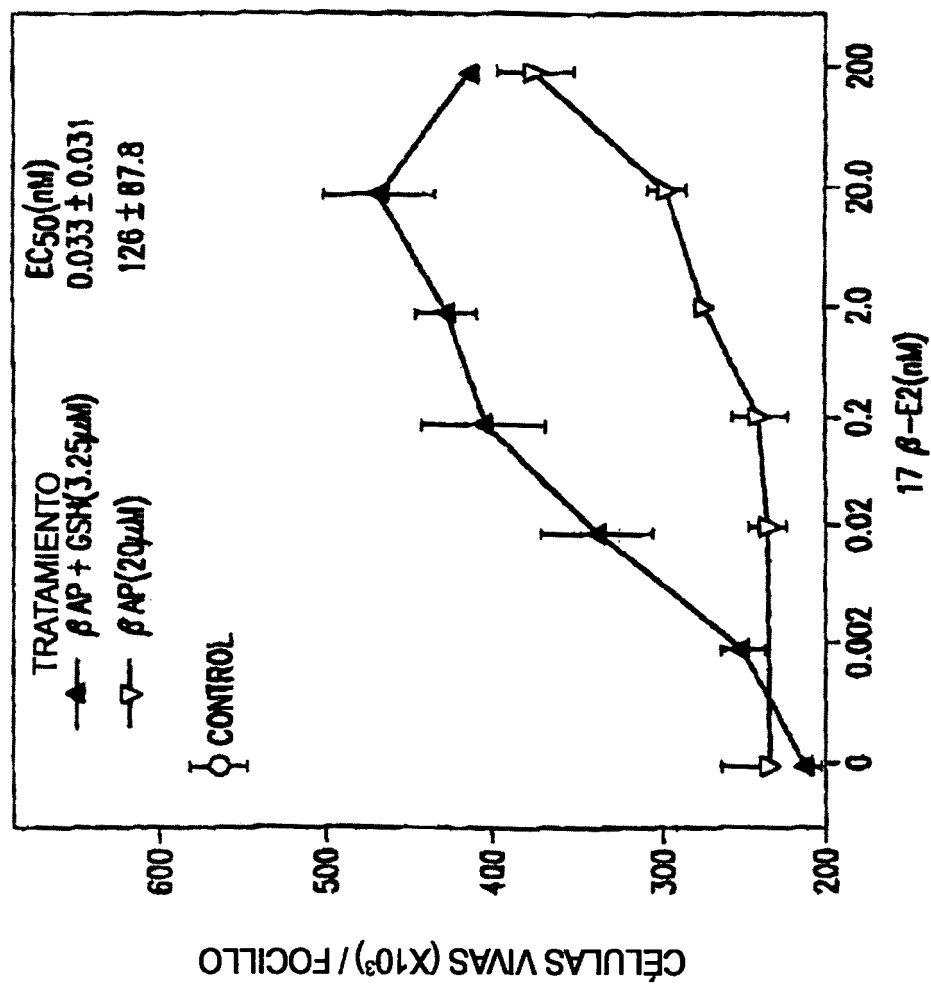


FIG.3

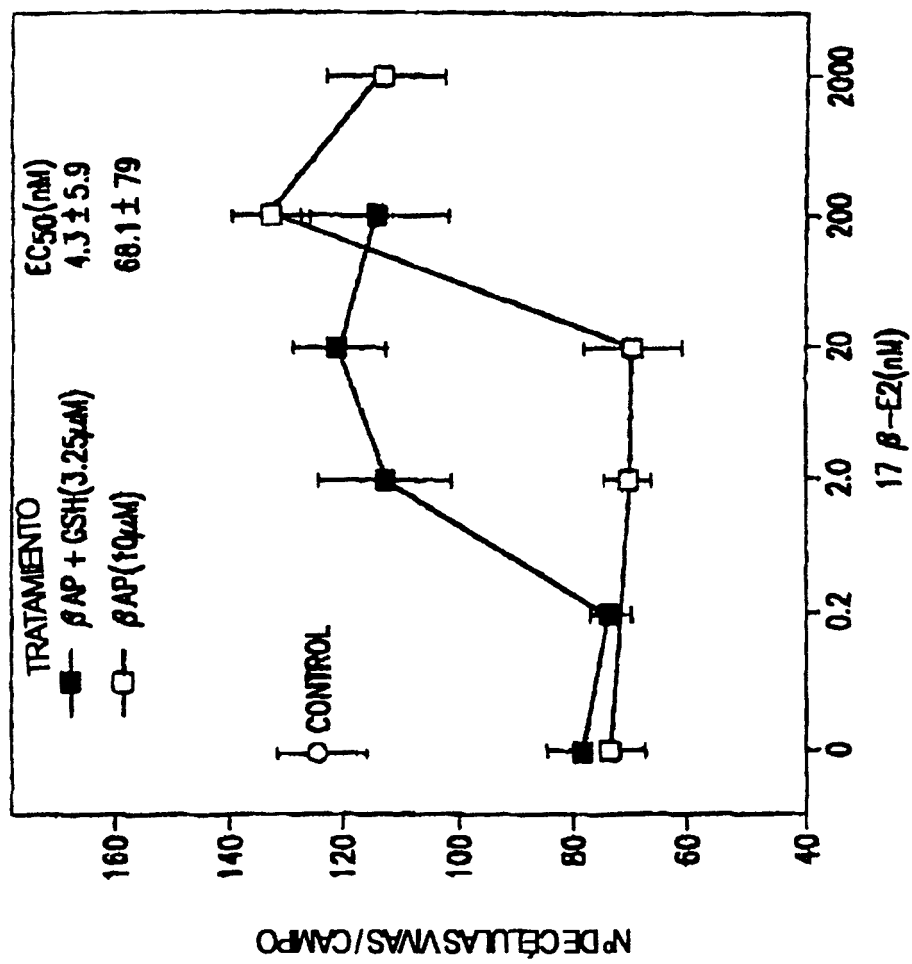


FIG.4

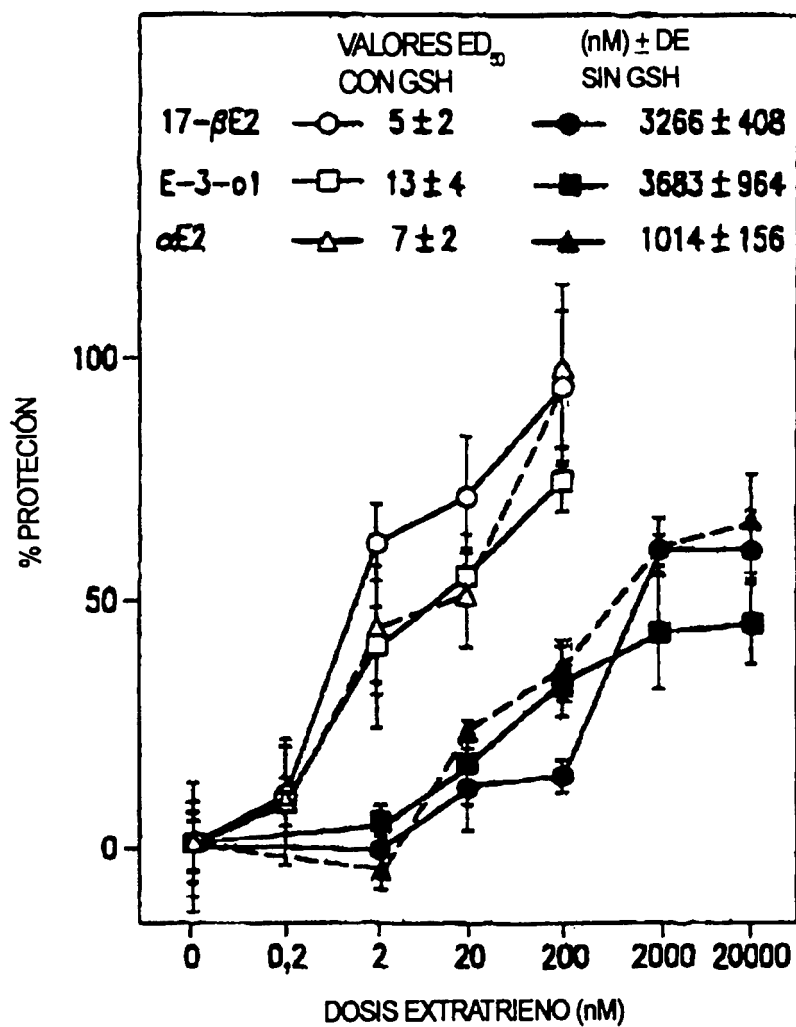
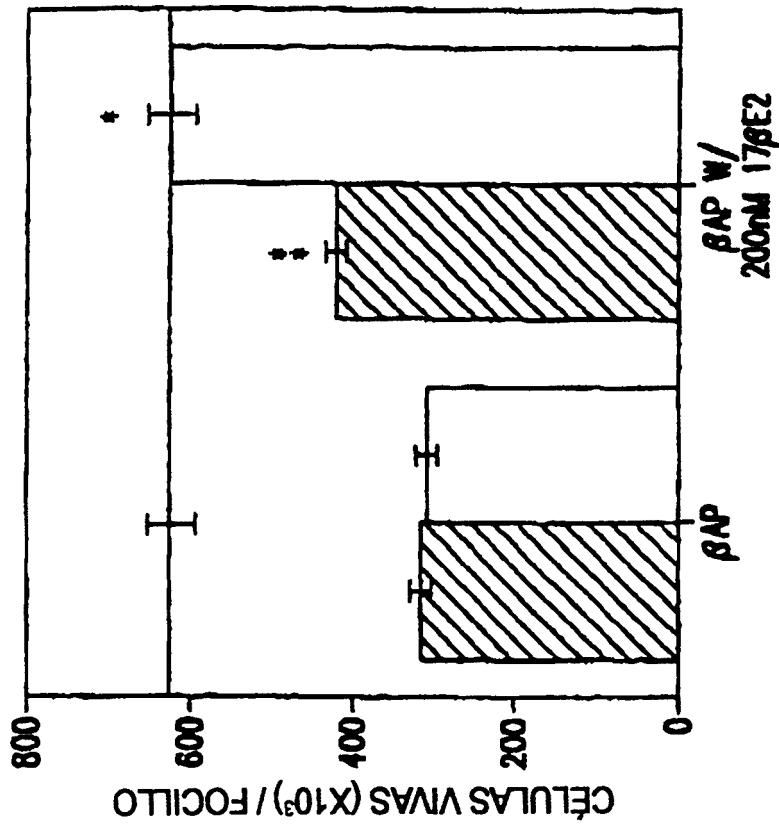


FIG.5



TRATAMIENTO
FIG.6