

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 821 888**

51 Int. Cl.:

A61K 31/57 (2006.01)
A61P 25/30 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61P 13/10 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2012** **E 16206880 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2020** **EP 3170501**

54 Título: **Antagonistas del receptor CB1**

30 Prioridad:

20.05.2011 EP 11305625

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.04.2021

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (50.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR y
UNIVERSITE DE BORDEAUX (50.0%)

72 Inventor/es:

PIAZZA, PIER VINCENZO;
VALLEE, MONIQUE;
MARSICANO, GIOVANNI;
FELPIN, FRANÇOIS-XAVIER;
BELLOCCHIO, LUIGI;
COTA, DANIELA;
REVEST, JEAN-MICHEL;
VITIELLO, SERGIO;
SPAMPINATO, UMBERTO y
MALDONADO, RAFAEL

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 821 888 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

Antagonistas del receptor CB1

5 Sector de la técnica

La presente invención se refiere a pregnenolona para su uso en el tratamiento de una afección o trastorno patológico seleccionado entre el grupo que consiste en adicción al cannabis, dependencia, abuso, intoxicación y trastornos relacionados con recaídas, uso de cannabis y productos derivados, abuso de cannabis y productos derivados, cannabis y toxicidad por productos derivados y psicosis inducida por cannabis y productos derivados.

Estado de la técnica

El receptor CB1 es uno de los principales receptores acoplados a proteínas G con siete dominios transmembrana (GPCR, del inglés "G-coupled seven membrane receptor") del cuerpo. Es el principal GPCR del cerebro y también está expresado por la mayoría de los tejidos corporales incluyendo, entre otros, el tejido adiposo, hígado, páncreas, músculos, riñón, vejiga y los huesos.

El CB1 se activa por ligandos endógenos denominados endocannabinoides que incluyen, entre otros, anandamida y 2-araquidonil glicerol (2-AG).

A través de la activación mediante ligandos endógenos, el CB1 ha estado involucrado en la regulación de un gran número de funciones fisiológicas y estados patológicos. Una lista no exhaustiva de funciones en donde ha estado involucrada la activación del receptor CB1 incluye: metabolismo energético; inflamación e inmunidad; fibrosis, homeostasis de huesos; almacenamiento y acumulación de lípidos en varios órganos, comportamientos; autoadministración de drogas de abuso, memoria, adaptación relacionada con estrés, comportamientos mediados por reforzadores positivos; motilidad gastrointestinal y motilidad de otros órganos contráctiles viscerales; proliferación y diferenciación de células; regulación del dolor; reproducción y fertilidad. (Marsicano et al., J Endocrinol Invest., 2006;29(Supl 3):27-46 Revisión; Pagotto U et al., Int J Obes. 2006, Supl 1:S39-43 Revisión; Pagotto U et al., Endocr Rev., 2006 (1):73-100. Revisión; Bifulco M, et al. Mol Pharmacol. 2007, 71(6):1445-56 Revisión).

Debido a este rol fisiológico muy extendido, la sobreactivación del receptor CB1 ha estado involucrada en un gran número de patologías, enfermedades y procesos patofisiológicos. Una lista no exhaustiva de ejemplos de enfermedades y procesos relacionados con enfermedades en los cuales ha estado involucrada la activación del receptor CB1 incluye: trastornos de la vejiga y gastrointestinales; enfermedades inflamatorias; enfermedades cardiovasculares; nefropatías; glaucoma; espasticidad; cáncer; osteoporosis; trastornos metabólicos; obesidad; trastornos relacionados con la adicción, la dependencia, el abuso y las recaídas; trastornos psiquiátricos y neurológicos; trastornos neurodegenerativos; hepatitis y encefalitis autoinmunitarias; dolor; trastornos de la reproducción y enfermedades inflamatorias y fibróticas de la piel. (Di Marzo et al., Nat. Rev., Drug Discov., 2004, 3 : 771-784).

El receptor CB1 es el principal objetivo del Δ tetrahidrocannabinol (THC), el principio activo contenido en las drogas de abuso obtenidas del Cannabis sativa. A través de la activación del CB1, el THC ejerce sus efectos adictivos y sus efectos perturbadores conductuales y fisiológicos. Además, el receptor CB1 también está involucrado en la mediación de los efectos de todas las otras drogas conocidas de abuso incluyendo, entre otras, nicotina, opioides, psicoestimulantes y alcohol. El receptor CB1 también está involucrado en la mediación de las propiedades del apetito de estímulos reforzadores que no son drogas que son capaces de inducir la adicción, incluyendo, entre otras, alimentos, parejas sexuales y el juego. Los efectos generales del CB1 sobre drogas de abuso y otros estímulos reforzadores que son capaces de inducir adicción se explica por el control de la excitación que ejerce la activación del receptor CB1 sobre la actividad de la transmisión dopaminérgica. Por lo tanto, la activación de la transmisión dopaminérgica está involucrada en la mediación de las propiedades de apetito y responsabilidad adictiva de la droga de abuso y de reforzadores positivos que no son drogas. Por esta razón, se ha propuesto un bloqueo de la actividad del CB1 como un método para tratar adicción, abuso de drogas, dependencia de drogas y las recaídas de drogas (Scherma M et al., CNS Neurol Disord Drug Targets. 2008;7(5):468-81. Revisión; Wiskerke J et al., Addict Biol. 2008;13(2):225-38. Revisión; Moreira FA, et al., Addict Biol. 2008;13(2):196-212 Revisión; López-Moreno JA et al, Addict. Biol. 2008;13(2):160-87. Revisión; Janero DR et al., Curr Psychiatry Rep., 2007; 9(5):365-73. Revisión; Laviolette SR et al., Cell Mol Life Sci., 2006;63(14):1597-613. Revisión; Maldonado R, et al. Trends Neurosci., 2006; 29(4):225-32. Revisión; Colombo G et al., Pharmacol Biochem Behav., 2005; 81(2):369-80. Revisión; Gardner EL. Pharmacol Biochem Behav., 2005; 81(2):263-84. Revisión).

Se ha demostrado que la inhibición del receptor CB1 reduce peso y fortalece las mejoras de los parámetros de riesgo cardiometabólico. Así, se ha demostrado que antagonistas del receptor CB1 previenen profilácticamente el sobrepeso, ayudan a la regulación de ingesta alimentaria, sirven como ayuda de la dieta, para tratar la obesidad y mejorar trastornos metabólicos asociados a menudo con la obesidad, tales como diabetes y dislipidemia. (Bermudez-Silva FJ et al., 2010; Lee HK et al. 2009; Xie S et al., 2007).

La señalización del receptor CB1 central está funcionalmente ligada a neurotransmisión monoaminérgica. Esto hace a los antagonistas de CB1 candidatos para el tratamiento de la psicosis, trastornos afectivos y cognitivos originados por alteraciones en cualquiera de los sistemas monoaminérgicos centrales. Además, los agonistas del CB1 llevan a deterioro de la memoria. Por ello, los antagonistas del CB1 son buenos agentes candidatos para mejorar la memoria (ver Reibaud M et al., Eur. J. Pharmacol, 1999; 379 (1):R1-2, y Terranova JP et al, Psychopharmacology, 1996;126(2): 165-72). La activación del CB1 puede llevar también a deterioro en el movimiento y trastornos del movimiento como enfermedad de Parkinson se han asociado con endocannabinoides del cerebro elevados. El antagonismo del CB1 podría ser, por ello, un buen tratamiento candidato para la enfermedad de Parkinson (ver Di Marzo V et al, FASEB J., 2000; 14(10): 1432-8). Por ello, antagonistas del CB1 son candidatos para el tratamiento de varias enfermedades psiquiátricas y neurológicas.

El receptor del CB1 también está involucrado en la espasticidad como se ha descrito por Pryce G et al., (Br J Pharmacol, 2007, 150 (4): 519–525) y por Baker D. et al. (FASEB J., 2001, 15: 300–302).

Chien FY, et al. han demostrado que el WIN 55212-2, un agonista cannabinoide del receptor CB(1), reduce la presión intraocular en ojos de monos tanto normales como glaucomatosos.

Receptores CB1 que están expresados en algunos tejidos periféricos tales como terminaciones nerviosas del tracto gastrointestinal deprimen la motilidad gastrointestinal, principalmente por inhibición de la liberación del transmisor contráctil en curso. Antagonistas del receptor CB1 por ello podrían encontrar uso en estados patológicos que consisten en motilidad intestinal disminuida tales como íleo paralítico causado por peritonitis, cirugía u otras situaciones nocivas (Mascolo N et al, FASEB J., 2002 Dec; 16(14): 1973-5).

También respecto a enfermedades gastrointestinales, los receptores CB1 han demostrado igualmente estar involucrados en enfermedades del hígado y, en particular, en esteatosis, esteatohepatitis (NASH) y cirrosis del hígado. La activación del CB1 juega un papel en estas enfermedades por un mecanismo doble: 1. Promoviendo la acumulación de grasa en el hígado; 2. Promoviendo la liberación de factores inflamatorios tales como TNF α . Los inhibidores de CB1 son beneficiosos en estas patologías porque reducen tanto la acumulación de grasa como la liberación de TNF α . 3. En este caso, para ejemplos, ver: 1. Mallat A y Lotersztajn S. Diabetes and Metabolism 34(2008) 680-684; 2. Tam J et al., HEPATOLOGY 2011;53:346-355; 3. Sören V. Siegmund SV y Schwabe RF Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 294: G357–G362, 2008; 4. DeLeve DL et al., The American Journal of Pathology, 173, No. 4, 2008; 5. Roche M et al., Immunology, 2008 125, 263–271; 6. Murumalla R et al., Journal of Inflammation 2011, 8:33; 7. Croci T, et al., British Journal of Pharmacology (2003) 140, 115–122.

Los receptores CB1 también están expresados en terminales noradrenérgicos que inervan el hueso. La activación de CB1 es capaz de inhibir la liberación de noradrenalina en el hueso lo que, a su vez, aumenta la actividad del osteoclasto disminuyendo la masa ósea, incluyendo, entre otras, la osteoporosis asociada a menopausia. Por esta razón, también se han propuesto antagonistas del CB1 como tratamiento para la osteoporosis. (Idris AI Curr Neuropharmacol. 2010 8(3):243-53.

Los receptores CB1 también juegan un papel en células endoteliales vasculares donde median los efectos hipotensivos de endocannabinoides derivados de plaquetas y macrófagos. Los antagonistas del CB1 podrían ser agentes útiles para inhibir la hipotensión inducida por endotoxinas o cirrótica (ver Batkai S et al, Nat Med., 2001 Jul;7(7): 827-32) ambas caracterizadas por niveles elevados de endocannabinoides. Los CB1 también estimulan la angiogénesis, pues una consecuencia del bloqueo del receptor CB1 se ha propuesto para el tratamiento de enfermedades en las cuales un aumento de la angiogénesis juega un papel patofisiológico como, por ejemplo, en el desarrollo de tumores.

Los receptores CB1 también se han involucrado en patologías del sistema cardiovascular incluyendo cardiomiopatías tales como cardiomiopatía cirrótica y cardiomiopatías inducidas por fármacos antineoplásicos, disfunciones contráctiles, infarto y aterosclerosis. Los receptores CB1 juegan un papel en aquellas enfermedades con mecanismos múltiples que involucran control de la presión sanguínea, inflamación, acumulación de lípidos, vascularización y contractilidad cardíaca. Por ejemplo, ver: 1. Batkai S et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007, 293: H1689–H1695; 2. Seyed Ali Gaskari SA et al., British Journal of Pharmacology (2005) 146, 315–323; 3. Batkai S y Pacher P. Pharmacol Res. 2009, 60: 99–106. 4. Nissen SE et al., JAMA. 2008;299(13):1547-1560. 5. Mukhopadhyay P et al., J Am Coll Cardiol. 2007, 50: 528–536.

Los receptores CB1 también han demostrado estar involucrados en enfermedades inflamatorias y en particular, entre otras, en enfermedades de la piel, incluyendo inflamación de la piel, inflamación de la piel y cáncer inducidos por UV, fibrosis de la piel y cicatrización de heridas. En este contexto, se ha demostrado que una inhibición o supresión del receptor CB1 es beneficiosa para todos estos estados patológicos. Por ejemplo, ver: 1. Marquart S et al., ARTHRITIS & RHEUMATISM, 2010, 62:3467–3476; 2. Zheng D et al., Cáncer Res. 2008 May 15; 68(10): 3992–3998.

Además, se encuentra señalización del endocannabinoide en algunas afecciones humanas comparadas con los tejidos sanos correspondientes, así como en células de cáncer humano con un alto grado de agresividad (Sarnataro D et al., 2006; Gazerro P et al., 2010; Santoro A, et al. 2009).

La señalización de endocannabinoides también está implicada en la fertilización, preimplantación del embrión y espermatogénesis y por ello en un objetivo importante para mejorar la infertilidad y salud reproductiva en humanos.

- 5 Por estas razones, se ha sugerido la inhibición del receptor CB1 como una terapia de todos estos estados patológicos y enfermedades asociadas.

Se han desarrollado y sometido a pruebas clínicas métodos enfocados al bloqueo de la actividad del CB1 a través de inhibición del sitio de unión ortoestérico, el sitio en el cual se unen los ligandos endógenos para activar al receptor.

- 10 Uno de estos compuestos, el rimonabant, incluso se ha puesto en el mercado con el nombre de marca Acomplia. El Acomplia se ha probado y reveló tener un efecto beneficioso para el tratamiento de trastornos metabólicos, diabetes y dislipidemia, obesidad y también en un estudio para adicción de nicotina.

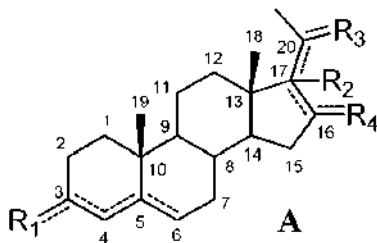
- 15 Desafortunadamente, antagonistas ortoestéricos disponibles tales como rimonabant también actúan como agonistas inversos del receptor CB1, es decir, que no solamente inhiben la activación del CB1, sino también la actividad basal del receptor en ausencia del ligando. Debido a esta acción antagonista inversa y la inhibición total de la actividad del receptor, métodos disponibles basados en la administración de antagonistas de CB1 ortoestéricos tienen también una serie de efectos adversos serios. Debido a estos efectos adversos, se ha suspendido la comercialización de Acomplia y se ha detenido el desarrollo de otros métodos que inhiben el sitio ortoestérico del CB1.

- 20 Muchas de las patologías para las cuales han demostrado buena eficacia terapéutica antagonistas ortoestéricos del receptor CB1 tienen aún necesidad de nuevas terapias eficaces. Existe, por consiguiente, necesidad de desarrollar métodos que puedan permitir inhibir el receptor CB1 sin interferir con la unión ortoestérica y que tengan menos efectos secundarios que antagonistas ortoestéricos.

- 25 Por ello, aún existe la necesidad de desarrollar ligandos que permitan una inhibición de los receptores CB1 sin modificar la unión ortoestérica o inducir efectos adversos.

Objeto de la invención

- 30 La presente se refiere a un compuesto de fórmula (A) o una sal farmacéutica del mismo:



alcoxi C1-8,
alqueno C2-6,
Bn- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, amino, carboxilo o halógeno,
Ph- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, carboxilo o halógeno, o
Bn-O-,

--- R3 denota que C20 está sustituido con

-H,
-OH,
alquilo C1-8,
Bn-,
-NR₈R₉ en donde R₈ y R₉ cada uno independientemente es H, alquilo C1-8 o, Bn-
=CR₁₀R₁₁ en donde R₁₀ y R₁₁ cada uno independientemente es H o alquilo C1-7, u
=O,

--- R₄ denota que C16 está sustituido con

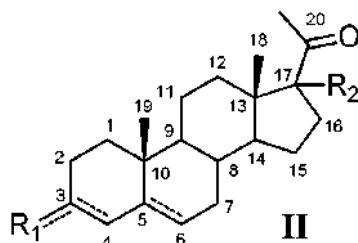
-H,
-OH, u
=O,

con la condición de que

cuando el enlace entre C16 y C17 es doble, R₂ está ausente y el enlace entre C17 y C20 es sencillo, y
cuando el enlace entre C17 y C20 es doble, C20 está sustituido con -H o - OH y R₂ está ausente,

cuando el enlace entre C4 y C5 es doble, el enlace entre C5 y C6 es sencillo e inversamente,
para su uso en el tratamiento de un estado o trastorno patológico seleccionado del grupo que consiste en
trastornos de la vejiga y gastrointestinales; enfermedades inflamatorias; enfermedades cardiovasculares;
nefropatías; glaucoma; espasticidad; cáncer; osteoporosis; trastornos metabólicos; obesidad; trastornos
relacionados con la adicción, la dependencia, el abuso y las recaídas; trastornos psiquiátricos y neurológicos;
trastornos neurodegenerativos; hepatitis y encefalitis autoinmunitarias; dolor; enfermedades inflamatorias y
fibróticas de la piel.

La presente divulgación también se refiere a un compuesto de fórmula (II)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde :

--- denota que la unión es un enlace sencillo o doble

--- R1 denota que C3 está sustituido con -OH, y

-R2 denota que C17 está sustituido con

alquilo C3-8,

alcoxi C2-8,

Bn- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, amino, carboxilo o halógeno,

Ph- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, carboxilo o halógeno, o

Bn-O-,

o en donde

--- R1 denota que C3 está sustituido con

alcoxi C1-8,

Bn-O, o

Halógeno, y

-R2 denota que C17 está sustituido con

alquilo C1-8,
alquenilo C2-6,
alcoxi C1-8,

- 5 Bn- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, amino, carboxilo o halógeno,
Ph- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, carboxyl, o halógeno, o
Bn-O-.

La presente invención se define en las reivindicaciones.

10

Descripción detallada de la invención

Definiciones

- 15 “Agonista” se refiere a un compuesto que realza la actividad de otro compuesto o sitio receptor.

- Los términos “antagonista” e “inhibidor” se refieren a un compuesto que disminuye o previene la actividad de otro compuesto en un sitio receptor y, más generalmente, se refiere a un compuesto que disminuye o previene la activación y/o la actividad de un receptor. “Tratamiento o tratar” se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en donde el objetivo es prevenir o retrasar el estado o trastorno patológico seleccionado como objetivo. Los necesitados de tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno así como los propensos a tenerlo o aquellos en los que se va a prevenir el trastorno. Por tanto, el sujeto que va a tratarse en el presente documento puede haber sido diagnosticado por tener el trastorno o puede estar predispuesto o susceptible al trastorno.

- 25 Como se usa en el presente documento, el término “sujeto” denota un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate. De preferencia, un sujeto de acuerdo a la invención es un ser humano.

- Se pretende que una “cantidad terapéuticamente eficaz” sea una cantidad mínima de agente activo (p.ej.) que es necesaria para impartir un beneficio terapéutico o un beneficio preventivo a un sujeto. Por ejemplo, una “cantidad terapéuticamente eficaz” para un mamífero es la cantidad que induce, mejora o de otra manera causa una mejora en los síntomas patológicos, progresión de la enfermedad o condiciones fisiológicas asociadas con un trastorno o con resistencia a sucumbir a él.

- Como se usa en el presente documento, el término “cáncer” se refiere a o describe un estado fisiológico en sujetos que se caracteriza típicamente por crecimiento celular irregular o muerte de las células. Ejemplos de cáncer incluyen, entre otros, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia o afecciones linfoides. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer celular escamoso (p.ej. cáncer celular escamoso epitelial), cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o del estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer tiroideo, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma del pene, así como cáncer de cabeza y cuello.

- 45 Tal como se usan en el presente documento, los términos “adicción y dependencia” se refieren a alteraciones del comportamiento hacia un estímulo reforzador, incluyendo, entre otros, compuestos farmacológicos, alimentos, parejas sexuales, juego, comportamientos de toma de riesgos. Esta alteración del comportamiento se caracteriza por una o todas las siguientes características: 1. la incapacidad de un individuo para restringir el consumo, toma o contacto con los estímulos mencionados anteriormente, que produce consumos de cantidad más elevada del estímulo que la pretendida originalmente e intentos infructuosos para discontinuar estos comportamientos durante periodos prolongados de tiempo; 2. una fuerte motivación para obtener, consumir, tomar o estar en contacto con los estímulos mencionados anteriormente que llega a ser la principal actividad del sujeto y que puede estar asociada con la negligencia de otras actividades; 3. la aparición de una molestia física o psicológica al discontinuar el consumo o en ausencia de los estímulos reforzadores.

- 55 Tal como se usa en el presente documento, el término “abuso” se refiere a un estado fisiológico en el cual la integridad del organismo de un individuo se altera permanente o transitoriamente como resultado del consumo, toma o contacto de estímulos reforzadores, incluyendo, entre otros, compuestos farmacológicos, alimentos, parejas sexuales, juego. Estas alteraciones incluyen, entre otras, complicaciones cardiovasculares, problemas respiratorios, enfermedades del hígado, enfermedades infecciosas, daños traumáticos. Estas alteraciones de la integridad del organismo pueden estar asociadas o no con manifestaciones conductuales que caracterizan la adicción y dependencia tal como se describió anteriormente.

- 65 Tal como se usa en el presente documento, el término “recaída” se refiere al restablecimiento de la adicción, la dependencia o el abuso después de un periodo de restricción continua del consumo, toma o contacto de estímulos reforzadores, incluyendo, entre otros, compuestos farmacológicos, alimentos, parejas sexuales, juego.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “trastornos metabólicos” se refiere a un estado fisiológico en la cual están alterados los niveles normales de productos químicos usados por el organismo como energéticos o más generalmente como componentes que son necesarios para garantizar la integridad estructural o funcional de los organismos. Estos productos químicos incluyen, entre otros: glúcidos, lípidos, aminoácidos y electrolitos. Las patologías generalmente resultan de trastornos metabólicos incluyen, entre otros, diabetes y dislipidemia. El trastorno metabólico también puede facilitar enfermedades gastrointestinales y cardiovasculares tales como aterosclerosis, NASH y cirrosis. Los trastornos metabólicos pueden estar asociados con obesidad o pueden ser de naturaleza idiopática.

“Dolor” significa la sensación más o menos localizada de malestar, ansiedad o agonía, que resulta de la estimulación de terminaciones nerviosas especializadas. Existen muchos tipos de dolor, incluyendo, entre otros, dolores fulminantes, dolores fantasmas, dolores punzantes, dolores agudos, dolores inflamatorios, dolores neuropáticos, dolor regional complejo, neuralgia, neuropatía y similares (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, 28ª Edición, W. B. Saunders Company, Filadelfia, Pa.). El objetivo del tratamiento del dolor es reducir el grado de gravedad del dolor percibido por el sujeto del tratamiento.

Enfermedades inflamatorias y fibróticas de la piel se refieren a patologías de la piel, idiopáticas o inducidas por un agente externo, incluyendo UV, que dan como resultado una alteración de la piel, cáncer de la piel y/o una interrupción del proceso de curación de una herida.

La otra designación de patologías usadas en este respecto, incluyendo, entre otras, osteoporosis, enfermedades neurodegenerativas, de Parkinson, de Alzheimer, esquizofrenia, trastornos del ánimo, trastornos de la vejiga y gastrointestinales; enfermedades inflamatorias; enfermedades cardiovasculares; aterosclerosis, esteatosis hepática, NASH y nefropatías crónicas; glaucoma; espasticidad; hepatitis y encefalitis autoinmunitarias; trastornos de la reproducción se usan en su acepción médica tal como se definen en cualquier manual de medicina.

La expresión “Ci está sustituido con X” significa que el carbono en posición i de la fórmula química lleva un sustituyente X, que puede ser un átomo tal como H o un halógeno, o un grupo funcional.

“Alquilo” significa un resto de hidrocarburo saturado, lineal o ramificado, monovalente, que consiste solamente en átomos de carbono e hidrógeno. Alquilo C1-8 significa un alquilo lineal o ramificado que tiene de uno a ocho átomos de carbono.

“Alcoxilo” significa un resto de la fórmula -OR, en donde R es un resto de alquilo tal como se definió en el presente documento.

El término “halógeno”, se refiere a un átomo de flúor, cloro, bromo, o yodo.

“Amino” significa un resto de la fórmula -NRR' en donde R y R' son cada uno independientemente hidrógeno o alquilo tal como se definió en el presente documento.

La abreviatura Bn se refiere a un grupo bencilo.

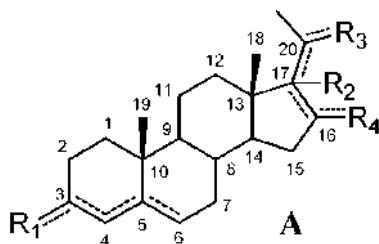
La abreviatura Ph se refiere a un grupo fenilo.

Los sustituyentes por encima del plano de la molécula se muestran como una línea llena (—) y se describen como β; aquellos por debajo del plano se muestran por una línea de puntos (·····) y se describen como α.

“Opcionalmente” significa que el evento o circunstancia descritos a continuación puede no necesitar ocurrir y que la descripción incluye instancias donde el evento o circunstancia ocurre e instancias en las cuales no.

Inhibición del receptor CB1

La presente divulgación se refiere a un compuesto de fórmula (A) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



en donde:

- 5 --- denota que la unión es un enlace sencillo o doble,
 ---R1 denota que C3 está sustituido con
- 10 -H,
 -halógeno,
 -OH,
 alcoxi C1-8,
 Bn-O-
 Bn- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, amino, carboxilo o halógeno,
 Ph- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, amino, carboxilo o halógeno,
 =O,
 15 -NR5R6 en donde R5 y R6 cada uno independientemente es H, alquilo C1-8, Bn- o Ph,
 -O-CO-R7 en donde R7 es alquilo,
 -O-CO-C₂H₄-COOH, o
 -N₃,
- 20 -R2 denota que C17 está sustituido con
- 25 -H,
 -OH,
 halógeno,
 alquilo C1-8,
 alcoxi C1-8,
 alquenilo C2-6,
 Bn- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, amino, carboxilo o halógeno,
 Ph- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, carboxilo o halógeno, o
 30 Bn-O-,
- R3 denota que C20 está sustituido con
- 35 -H,
 -OH,
 alquilo C1-8,
 Bn-,
 -NR8R9 en donde R8 y R9 cada uno independientemente es H, alquilo C1-8 o Bn-,
 =CR10R11 en donde R10 y R11 cada uno independientemente es H o alquilo C1-7, u
 40 =O,
- R4 denota que C16 está sustituido con
- 45 -H,
 -OH, u
 =O,
 con la condición de que
 cuando el enlace entre C16 y C17 sea doble, R2 está ausente y el enlace entre C17 y C20 es sencillo, y
 cuando el enlace entre C17 y C20 sea doble, C20 está sustituido con -H u -OH y R2 está ausente,
 50 cuando el enlace entre C4 y C5 sea doble, el enlace entre C5 y C6 es sencillo e inversamente,

para su uso en el tratamiento de un estado o trastorno patológico seleccionado del grupo que consiste en trastornos de la vejiga y gastrointestinales; enfermedades inflamatorias; enfermedades cardiovasculares; nefropatías; glaucoma; espasticidad; cáncer; osteoporosis; trastornos metabólicos; obesidad; trastornos relacionados con la adicción, la dependencia, el abuso y las recaídas; trastornos psiquiátricos y neurológicos; trastornos neurodegenerativos; encefalitis y hepatitis autoinmunitarias; dolor; trastornos de la reproducción y enfermedades inflamatorias y fibróticas de la piel.

Ciertamente, los inventores han demostrado que la pregnenolona y algunos de sus derivados son inhibidores del receptor CB1 y son capaces de bloquear la activación del receptor CB1 inducida por agonistas naturales o sintéticos o ligandos endógenos, sin modificar la unión ortoestérica.

Por ello, los compuestos de la divulgación actúan de forma similar a otros antagonistas del receptor CB1 tales como rimonabant y se pueden usar en el tratamiento de patologías en donde se requiere un antagonista del receptor CB1.

Además, esta inhibición es un mecanismo endógeno. Entonces, modifica la actividad del receptor de un modo más fisiológico, modulando la respuesta del receptor a agonistas endógenos o exógenos y no bloquea la unión de los

agonistas al receptor. Debido a este mecanismo más fisiológico, inhibidores tales como la pregnenolona y sus derivados son susceptibles de presentar menos efectos secundarios que antagonistas ortoestéricos.

Ejemplos de trastornos de vejiga y gastrointestinales que pueden ser tratados con un antagonista del receptor CB1 incluyen, entre otros, fibrosis del hígado; esteatosis del hígado; esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cirrosis hepática; estosis alcohólica; daño por reperfusión isquémica hepática complicada por endotoxemia; pancreatitis aguda; trastornos de la vejiga hiperactiva y con dolor y alteración de la motilidad en órganos viscerales contráctiles.

Ejemplos de enfermedades inflamatorias que pueden ser tratados con un antagonista del receptor CB1 incluyen, entre otros, inflamación y artritis asociada con obesidad; enfermedades inflamatorias inmunitarias crónicas y úlcera.

Ejemplos de enfermedades cardiovasculares que pueden ser tratadas con un antagonista del receptor CB1 incluyen, entre otros, cardiomiopatía tal como cardiomiopatía cirrótica, cardiomiopatía inducida por fármacos antineoplásicos, disfunciones endoteliales y muerte celular involucrada en el desarrollo de disfunción vascular asociada con insuficiencia cardíaca congestiva; hipertensión; enfermedad de la arteria coronaria; aterosclerosis; infarto del miocardio; enfermedades que resultan de acumulación de lípidos tales como aterosclerosis, patologías derivadas por angiogénesis aumentada y enfermedades que involucran angiogénesis.

Ejemplos de trastornos metabólicos que pueden ser tratados con un antagonista del receptor CB1 incluyen, entre otros, dislipidemia, diabetes y complicaciones diabéticas.

Ejemplos de trastornos relacionados con la adicción, la dependencia, el abuso y las recaídas que pueden ser tratados con un antagonista del receptor CB1 incluyen, entre otros, dependencia de drogas; abuso de fármacos; recaídas de dependencia, abuso y adicción de drogas; uso de cannabis y productos derivados; abuso de cannabis y productos derivados; toxicidad de cannabis y productos derivados; psicosis inducida por cannabis y productos derivados.

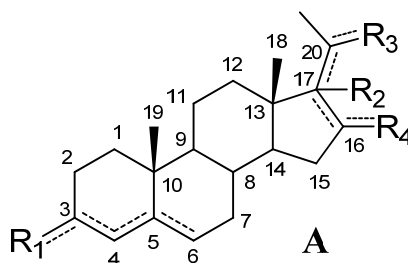
Ejemplos de trastornos neurodegenerativos que pueden ser tratados con un antagonista del receptor CB1 incluyen, entre otros, enfermedad de Parkinson y de Alzheimer.

Ejemplos de trastornos psiquiátricos y neurológicos que pueden ser tratados con un antagonista del receptor CB1 incluyen, entre otros, esquizofrenia; trastornos del estado de ánimo; disquinesia inducida por L-DOPA; trastornos de la memoria.

Ejemplos de trastornos de la reproducción que pueden ser tratados con un antagonista del receptor CB1 incluyen, entre otros, infertilidad y aborto recurrente.

Ejemplos de enfermedades inflamatorias y fibróticas de la piel que pueden ser tratados con un antagonista del receptor CB1 incluyen, entre otros, inflamación de la piel, inflamación de la piel y cáncer inducidos por UV, fibrosis de la piel y cicatrización de heridas.

La divulgación se refiere a un método para el tratamiento de un estado o trastorno patológico seleccionado del grupo que consiste en trastornos de la vejiga y gastrointestinales; enfermedades inflamatorias; enfermedades cardiovasculares; nefropatías; glaucoma; espasticidad; cáncer; osteoporosis; trastornos metabólicos; obesidad; trastornos relacionados con la adicción, la dependencia, el abuso y las recaídas; trastornos psiquiátricos y neurológicos; trastornos neurodegenerativos; hepatitis y encefalitis autoinmunitarias; dolor; trastornos de la reproducción y enfermedades inflamatorias y fibróticas de la piel en un sujeto que lo necesita, el cual comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (A) o una sal farmacéutica del mismo:



en donde:

---denota que la unión es un enlace sencillo o doble,
 ---R1 denota que C3 está sustituido con

-H,
 halógeno,
 -OH,

alcoxilo C1-8,
Bn-O-
Bn- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxilo C1-8, ciano, nitro, amino, carboxilo o halógeno,
Ph- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxilo C1-8, ciano, nitro, amino, carboxilo o halógeno,
=O,
-NR₅R₆ en donde R₅ y R₆ son cada uno independientemente H, alquilo C1-8, Bn o Ph,
-O-CO-R₇ en donde R₇ es alquilo,
-O-CO-C₂H₄-COOH, o
-N₃,

-R₂ denota que C17 está sustituido con

-H,
-OH,
halógeno,
alquilo C1-8,
alcoxilo C1-8,
alqueno C2-6,
Bn- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxilo C1-8, ciano, nitro, amino, carboxilo o halógeno,
Ph- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxilo C1-8, ciano, nitro, carboxilo o halógeno, o
Bn-O-,

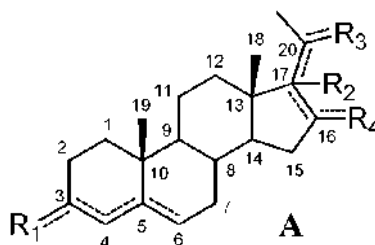
---R₃ denota que C20 está sustituido con

-H,
-OH,
alquilo C1-8,
Bn,
-NR₈R₉ en donde R₈ y R₉ son cada uno independientemente H, alquilo C1-8 o Bn,
=CR₁₀R₁₁ en donde R₁₀ y R₁₁ son cada uno independientemente H o alquilo C1-7, o
=O,

---R₄ denota que C16 está sustituido con

-H,
-OH, u
=O,
con la condición de que
cuando el enlace entre C16 y C17 sea doble, R₂ está ausente y el enlace entre C17 y C20 es sencillo, y
cuando el enlace entre C17 y C20 sea doble, C20 está sustituido con -H u -OH y R₂ está ausente,
cuando el enlace entre C4 y C5 sea doble, el enlace entre C5 y C6 es sencillo e inversamente,

La divulgación se refiere al uso de un compuesto de fórmula (A) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



en donde :

--- denota que la unión es un enlace sencillo o doble,
---R₁ denota que C3 está sustituido con

-H,
-halógeno,
-OH,
alcoxi C1-8,
Bn-O-

Bn- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, amino, carboxilo o halógeno,
 Ph- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, amino, carboxilo o halógeno,
 =O,
 -NR₅R₆ en donde R₅ y R₆ cada uno independientemente es H, alquilo C1-8, Bn o Ph,
 -O-CO-R₇ en donde R₇ es alquilo,
 -O-CO-C₂H₄-COOH, o
 -N₃,

-R₂ denota que C17 está sustituido con

-H,
 -OH,
 halógeno,
 alquilo C1-8,
 alcoxi C1-8,
 alqueno C2-6,
 Bn- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, amino, carboxilo o halógeno,
 Ph- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, carboxilo o halógeno, o
 Bn-O-,

---R₃ denota que C20 está sustituido con

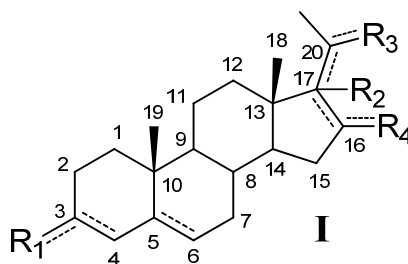
-H,
 -OH,
 alquilo C1-8,
 Bn,
 -NR₈R₉ en donde R₈ y R₉ cada uno independientemente es H, alquilo C1-8 o Bn- =CR₁₀R₁₁ en donde R₁₀
 y R₁₁ cada uno independientemente es H o alquilo C1-7, u
 =O,

---R₄ denota que C16 está sustituido con

-H,
 -OH, u
 =O,
 con la condición de que
 cuando el enlace entre C16 y C17 es doble, R₂ está ausente y el enlace entre C17 y C20 es sencillo, y
 cuando el enlace entre C17 y C20 es doble, C20 está sustituido con -H o -OH y R₂ está ausente,
 cuando el enlace entre C4 y C5 es doble, el enlace entre C5 y C6 es sencillo e inversamente,

para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un estado o trastorno patológico seleccionado del grupo que consiste en trastornos de la vejiga y gastrointestinales; enfermedades inflamatorias; enfermedades cardiovasculares; nefropatías; glaucoma; espasticidad; cáncer; osteoporosis; trastornos metabólicos; obesidad; trastornos relacionados con la adicción, la dependencia, el abuso y las recaídas; trastornos psiquiátricos y neurológicos; trastornos neurodegenerativos; hepatitis y encefalitis autoinmunitarias; dolor; trastornos de la reproducción y enfermedades inflamatorias y fibróticas de la piel.

La presente divulgación también se refiere a un compuesto de la invención, siendo el compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéutica del mismo:



en donde:

--- denota que la unión es un enlace sencillo o doble,
 ---R₁ denota que C3 está sustituido con
 -H,

- halógeno,
-OH,
alcoxilo C1-8,
Bn-O-
- 5 Bn- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxilo C1-8, ciano, nitro, amino, carboxilo o halógeno,
Ph- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxilo C1-8, ciano, nitro, amino, carboxilo o halógeno,
=O,
-NR5R6 en donde R5 y R6 son cada uno independientemente H, alquilo C1-8, Bn o Ph,
-O-CO-R7 en donde R7 es alquilo, o
- 10 -O-CO-C2H4-COOH,
-R2 denota que C17 está sustituido con
-H,
-OH,
halógeno,
- 15 alquilo C1-8,
alcoxi C1-8,
alqueno C2-6, Bn- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, amino, carboxilo o halógeno,
Ph- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, carboxilo o halógeno, o
- 20 Bn-O-,
---R3 denota que C20 está sustituido con
-H,
-OH,
alquilo C1-8,
- 25 Bn-
-NR8R9 en donde R8 y R9 cada uno independientemente es H, alquilo C1-8 o Bn-,
=CR10R11 en donde R10 y R11 cada uno independientemente es H o alquilo C1-7 u
=O,
---R4 denota que C16 está sustituido con
- 30 -H,
-OH u
=O,
con la condición de que
cuando el enlace entre C16 y C17 es doble, R2 está ausente y el enlace entre C17 y C20 es sencillo, y
- 35 cuando el enlace entre C17 y C20 es doble, C20 está sustituido con -H o -OH y R2 está ausente,

para su uso en el tratamiento de un estado o trastorno patológico seleccionado del grupo que consiste en trastornos de la vejiga y gastrointestinales; enfermedades inflamatorias; enfermedades cardiovasculares; nefropatías; glaucoma; espasticidad; cáncer; osteoporosis; trastornos metabólicos; obesidad; trastornos relacionados con la adicción, la dependencia, el abuso y las recaídas; trastornos psiquiátricos y neurológicos; trastornos neurodegenerativos; hepatitis y encefalitis autoinmunitarias; dolor; y trastornos de la reproducción y enfermedades inflamatorias y fibróticas de la piel.

La divulgación también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención o una sal farmacéutica del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

“Farmacéutico” o “farmacéuticamente aceptable” se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica o desfavorable cuando se administran a un mamífero, especialmente a un ser humano, cuando sea apropiado. Un vehículo farmacéuticamente aceptable se refiere a un material de encapsulación o auxiliar de formulación sólido, semisólido, líquido, diluyente de cualquier tipo.

Un vehículo farmacéuticamente aceptable se refiere, entre otros, a una carga, diluyente, agente aglutinante, agente desintegrante, agente disolvente, agente estabilizante, agente formador de sal, agente lubricante y material encapsulado o auxiliar de formulación sólido, semisólido o líquido, de cualquier tipo.

La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración, la dosis y el régimen naturalmente dependen del estado que se va a tratar, la gravedad de la enfermedad, la edad, peso y sexo del paciente, etc.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser formuladas para cualquier vía de administración incluyendo, entre otras, oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, transdérmica, tópica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, sublingual, vaginal y rectal.

De preferencia, de acuerdo a la invención, el principio activo se administra por vía oral y se presenta como una forma de dosis unitaria tal como forma de dosis sólida. Esta forma de dosis unitaria puede ser comprimidos, comprimidos recubiertos, píldoras, polvos o gránulos, sobrecitos o cápsulas de gelatina duras con el fin de facilitar la administración del producto a adultos o niños. Para administración oral, en cualquier forma de dosis convencional, las composiciones

se preparan por una técnica clásica con excipientes farmacéuticamente aceptables incluyendo, entre otros, agentes aglutinantes (p.ej. almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, derivados de goma tales como goma guar, carragenina, ácido alginico o sus sales,...); cargas (p.ej. lactosa, sacarosa, celulosa microcristalina, fosfato hidrógeno de calcio, fosfato dicálcico, polioles tales como manitol, sorbitol o xilitol, fructosa, dextrina, maltodextrina...); lubricantes (p.ej. estearato de magnesio, estearil fumarato de sodio, talco o sílice); agentes desintegrantes (p.ej. almidón de patata o almidón glicolato de sodio, crospovidona, croscarmelosa...), agentes formadores de sales (p.ej. n-metilglucamina, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o ácido clorhídrico...), o agentes humectantes (p.ej., lauril sulfato de sodio). Los comprimidos o las cápsulas de gelatina duras se pueden recubrir por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el comprimido o la cápsula de gelatina duras puede tener un recubrimiento entérico o liberación prolongada que protege el principio activo hasta que alcanza el colon.

Otra posibilidad es mantener la liberación o controlar la liberación del principio activo con el fin de administrarlo durante un periodo de tiempo largo (máximo 24 horas) y limitar el número de administraciones por día. Los comprimidos o las cápsula de gelatina duras se pueden recubrir con polímeros que aseguran la liberación controlada del principio activo o, en el caso de comprimidos, pueden ser comprimidos de matrices y dichos comprimidos presentan en su composición componentes que aseguran la liberación controlada del principio activo; dichos ingredientes son generalmente, entre otros, polímeros hidrófilos (p.ej. hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, goma xantán, quitosano, óxido de polietileno...), polímeros insolubles en agua e hidrófobos (p.ej. etilcelulosa, poli(acetato de vinilo) acetato de celulosa...), ácidos grasos (p.ej. ácido vegetal hidrogenado, palmitoesterato de glicerilo...), alcohol (p.ej. alcohol cetílico, alcohol estearílico...), ceras (p.ej. cera de abejas, cera carnauba...). En el caso específico de pregnenolona, la formulación de liberación sostenida también servirá para las funciones de reducir la producción de metabolitos de pregnenolona activos aguas abajo.

Cuando se prepara una composición sólida en forma de comprimidos, los comprimidos se pueden fabricar ya sea por compresión directa, proceso de granulación en húmedo o proceso de granulación en seco. El principio activo, cualquiera que sea el principio activo usado, primero se mezcla con todos los vehículos descritos anteriormente o una parte de ellos, luego se lubrica antes de comprimirlo para dar un comprimido.

En otra realización, la presente invención puede ser útil para la administración por vía bucal del principio activo; las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formulados de la manera convencional. Los ingredientes usados son los mismos que para el comprimido; solo cambian las proporciones de los ingredientes.

De preferencia, el principio activo puede ser administrado solo para actividad local; los comprimidos se presentan como comprimidos mucoadhesivos.

Por otra parte, el principio activo puede ser administrado directamente en la boca, pero para absorción sistémica cuando no hay agua disponible, la forma de dosificación es un comprimido de desintegración oral que presente la ventaja de ser administrado sin agua. En otra realización, la presente invención también se puede presentar como preparaciones líquidas para administración oral. Pueden tomar la forma, por ejemplo, de soluciones, jarabes o suspensiones o se pueden presentar como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Estas formas farmacéuticas pueden estar en forma de dosis unitaria como ampolla o multidosis generalmente incluida en viales. Dichas preparaciones líquidas se pueden preparar por técnicas convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables incluyendo, entre otros, agentes de suspensión (p.ej. jarabe de sorbitol o manitol, jarabe de sacarosa, derivados de celulosa tales como carboximetilcelulosa sódica o hidroxipropilcelulosa, derivados de goma tales como goma guar, goma xantán o goma de acacia... o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (p.ej. lecitina, polisorbato, aceite de ricino polioxietilado, éster de sorbitán o ploxamer...); vehículos acuosos y no acuosos (p.ej. agua, monopropilenglicol, polietilenglicol, glicerol, aceite de sésamo, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de soja, aceite de ricino, aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados, triglicéridos de cadena media...); y conservantes (p.ej. generalmente, metil o propil-p-hidroxibenzoatos y sus sales, ácido ascórbico y sus sales, ácido benzoico y sus sales). Las preparaciones también pueden contener sales tampón, agente estabilizante, agente antioxidante, saborizante, colorante y agentes edulcorantes, cuando sea apropiado.

Otra vía de administración adecuada para la invención es la vía parenteral. El principio activo se puede presentar como un producto inyectable adecuado para vía intravenosa, vía intramuscular o vía subcutánea; las composiciones farmacéuticas pueden contener vehículos que sean farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Estas composiciones se pueden presentar como una solución o una emulsión (por ejemplo, emulsión fina, microemulsión o nanoemulsión...) y pueden ser estériles. Dicha composición puede contener componentes salinos (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y los análogos o mezclas de dichas sales) con el fin de hacerlos isotónicos. En algunos casos, cuando el principio activo no es suficientemente estable para ser presentado directamente como una solución, el principio activo se presenta seco, ya sea como una composición liofilizada o en forma de polvo que, después de adición, dependiendo del caso, de solución no acuosa esterilizada adecuada para inyectable, agua esterilizada o solución salina fisiológica permite la constitución de soluciones inyectables para ser administradas a un paciente.

El producto final se presenta generalmente incluido en un vial o en forma de ampolla.

Las dosis usadas para la administración se pueden adaptar como una función de varios parámetros y, en particular, como una función del modo de administración usado de la patología relevante o, alternativamente, de la duración deseada del tratamiento.

Con el fin de mantener un nivel sistémico del fármaco y para evitar inyección frecuente, se puede usar formulación parenteral tipo depósito. Estas formas farmacéuticas están generalmente, entre otras, en la forma de micropartículas, implantes o un líquido que forma *in situ* un depósito de gel o coloide o semisólido después de la inyección. Dicha formulación de depósito se puede preparar por técnicas convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables incluyendo, entre otros, polímeros biocompatibles y biodegradables (p.ej. poli(ϵ -caprolactona), poli(óxido de etileno), poli(ácido glicólico), poli[(ácido láctico)-co-(ácido glicólico)...]), poli(ácido láctico)...), polímeros no-biodegradables (p.ej. copolímero de vinilacetato de etileno, poliuretano, poliéster(amida), policloruro de vinilo...) vehículos acuosos y no acuosos (p.ej. agua, aceite de sésamo, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de soja, aceite de ricino, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados, propilenglicol, DMSO, THF, 2-pirrolidona, N-metilpirrolidinona, N-vinilpirrolidinona...). En el caso específico de pregnenolona la formulación de depósito también servirá para la función de disminuir la producción de metabolito de pregnenolona activo aguas abajo.

Para preparar composiciones farmacéuticas, se puede disolver o dispersar una cantidad eficaz de los compuestos de la invención en un vehículo o medio acuoso farmacéuticamente aceptable.

Las formas farmacéuticas líquidas adecuadas para su uso inyectable, incluyen, entre otras, soluciones o dispersiones acuosas estériles; o formulaciones no acuosas que incluyen componentes oleosos estériles tales como aceite de sésamo, aceite de maní, aceite de semilla de algodón..., triglicéridos de cadena media, aceite de triacetina, propilenglicol estéril, polietilenglicol estéril, glicerol estéril o solución de poliol estéril.

Se pueden preparar soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables en un solvente adecuado, en mezcla, si fuera necesario, con un agente solubilizante generalmente como surfactante, tal como, entre otros, derivados de polisorbato, aceite de ricino polietoxilado (cremophor RH40 por ejemplo...), hidroxistearato de PEG 15 (solutol HS15), poloxamer (como lutrol F68), con agente estabilizante, por ejemplo EDTA y sus sales, con agente tamponante o con agente antioxidante (ácido ascórbico y su sal, acetato de tocoferol o metabisulfito de sodio). Dicha preparación puede contener agente conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

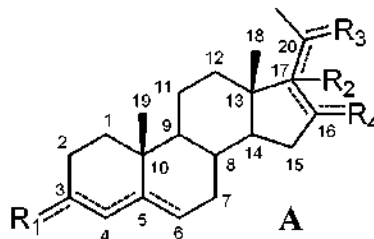
Por razones de estabilidad, la formulación se puede presentar en forma de polvo y dicho polvo es estéril y se solubiliza extemporáneamente mediante un solvente acuoso o no acuoso. Dicha preparación es generalmente para administración extemporánea en soluciones o dispersiones inyectables.

En todos los casos, tiene que ser estéril y estable bajo las condiciones de uso, fabricación y almacenamiento y tiene que estar preservada contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Compuestos de la invención

Fórmulas generales:

Los compuestos de la divulgación tienen la fórmula:



en donde:

---denota que la unión es un enlace sencillo o doble,
 ---R1 denota que C3 está sustituido con

-H,
 -halógeno,
 -OH,
 alcóxido C1-8,

Bn-O-

Bn- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxilo C1-8, ciano, nitro, amino, carboxilo o halógeno,

Ph- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxilo C1-8, ciano, nitro, amino, carboxilo o halógeno,

=O,

5 -NR₅R₆ en donde R₅ y R₆ son cada uno independientemente H, alquilo C1-8, Bn o Ph,

-O-CO-R₇ en donde R₇ es alquilo,

-O-CO-C₂H₄-COOH o

-N₃,

10 -R₂ denota que C17 está sustituido con

-H,

-OH,

halógeno,

15 alquilo C1-8,

alcoxi C1-8,

alqueno C2-6,

Bn- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, amino, carboxilo o halógeno,

Ph- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, carboxilo o halógeno, o

20 Bn-O-,

---R₃ denota que C20 está sustituido con

-H,

25 -OH,

alquilo C1-8,

Bn-,

-NR₈R₉ en donde R₈ y R₉ cada uno independientemente es H, alquilo C1-8 o Bn-, =CR₁₀R₁₁ en donde R₁₀ y R₁₁ cada uno independientemente es H o alquilo C1-7, u =O,

30

---R₄ denota que C16 está sustituido con

-H,

-OH, u

35 =O,

con la condición de que

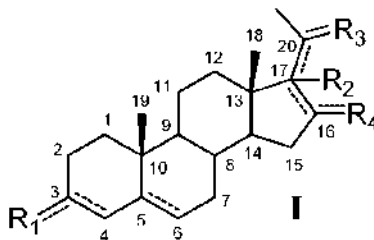
cuando el enlace entre C16 y C17 es doble, R₂ está ausente y el enlace entre C17 y C20 es sencillo, y

cuando el enlace entre C17 y C20 es doble, C20 está sustituido con -H o -OH y R₂ está ausente,

cuando el enlace entre C4 y C5 es doble, el enlace entre C5 y C6 es sencillo e inversamente.

40

En una realización, los compuestos de la divulgación tienen la fórmula (I):



45 en donde:

--- denota que la unión es un enlace sencillo o doble,

---R₁ denota que C3 está sustituido con

50 -H,

-halógeno,

-OH,

alcoxi C1-8,

Bn-O-

55 Bn- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, amino, carboxilo o halógeno,

Ph- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, amino, carboxilo o halógeno,

=O,

-NR5R6 en donde R5 y R6 cada uno independientemente es H, alquilo C1-8, Bn- o Ph,
 -O-CO-R7 en donde R7 es alquilo, o -O-CO-C₂H₄-COOH,

-R2 denota que C17 está sustituido con

-H,
 -OH,
 halógeno,
 alquilo C1-8,
 alcoxi C1-8,
 alqueno C2-6,
 Bn- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, amino, carboxilo o halógeno,
 Ph- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, carboxilo o halógeno, o
 Bn-O-,

---R3 denota que C20 está sustituido con

-H,
 -OH,
 alquilo C1-8,
 Bn-
 -NR8R9 en donde R8 y R9 cada uno independientemente es H, alquilo C1-8 o Bn-
 =CR10R11 en donde R10 y R11 cada uno independientemente es H o alquilo C1-7, u
 =O,

---R4 denota que C16 está sustituido con

-H,
 -OH, u
 =O,
 con la condición de que
 cuando el enlace entre C16 y C17 es doble, R2 está ausente y el enlace entre C17 y C20 es sencillo, y
 cuando el enlace entre C17 y C20 es doble, C20 se sustituye con -H o - OH y R2 está ausente.

Pregnenolona:

El compuesto de la invención es la pregnenolona.

La pregnenolona es un esteroide bien conocido (CAS número 145-13-1). Es la primera etapa de la síntesis de esteroides en el cerebro y otros órganos.

Tal como se describió anteriormente, los inventores han demostrado que la pregnenolona y sus sales farmacéuticas, tales como acetato o hemisuccinato de pregnenolona, son inhibidores del receptor CB1 y entonces se puede usar en el tratamiento de trastornos patológicos y enfermedades en donde se requiere un antagonista del receptor CB1.

En una realización preferida, la pregnenolona se administra a un sujeto en una dosis tal que la concentración plasmática de pregnenolona en el sujeto no exceda de 100 ng/ml. Preferentemente, la pregnenolona se administra mediante una formulación de liberación sostenida.

Por supuesto que, cuando se administra a dosis bajas que permiten que la pregnenolona esté en el intervalo de dosis eficaz (alrededor de 100 ng/ml o 100 ng/g en tejido) la conversión de pregnenolona en metabolito activo aguas abajo está disminuida. Por ello, los inventores han demostrado que la pregnenolona administrada en concentraciones bajas que no inducen el incremento del metabolito activo aguas abajo es capaz de inhibir el efecto de la activación del receptor CB1. Esto constituye una diferencia e innovación importantes comparadas con documentos previos en los cuales la pregnenolona se administra a dosis altas con el fin de aumentar el metabolito activo aguas abajo, al cual se han atribuido los efectos terapéuticos observados. La administración de pregnenolona en dosis bajas es ventajosa porque permite actuar en patologías dependientes de CB1 sin los efectos no queridos y no deseados debidos al aumento de derivados de esteroides activos aguas abajo de pregnenolona que están provistos de propiedades progestivas, androgénicas, estrogénicas, actividad glucocorticoide o propiedades neuromoduladoras como en el caso de otros esteroides del cerebro derivados de pregnenolona, incluyendo, entre otros, alopregnanolona, testosterona, DHEA.

Compuestos con metabolización nula o baja

Alternativamente, el compuesto de la divulgación no se convierte sustancialmente en derivados de pregnenolona activos aguas abajo después de administración a un sujeto.

La pregnenolona generalmente se considera un precursor inactivo de esteroides activos aguas abajo. Derivados de pregnenolona activos aguas abajo incluyendo, entre otros, sulfato de pregnenolona, alopregnanolona, DHEA, sulfato de DHEA, se han involucrado en la regulación de varias funciones conductuales.

Sin embargo, los inventores han demostrado que la inhibición del receptor CB1 es específica de pregnenolona y no involucra a derivados de pregnenolona activos aguas abajo. El uso de derivados de pregnenolona que no son convertidos en metabolitos de pregnenolona o que no son convertidos sustancialmente en ella evita efectos secundarios que pueden estar relacionados con metabolitos de los cuales es precursor la pregnenolona y que están provistos de actividad progestativa, androgénica, glucocorticoide o propiedades neuromoduladoras como en el caso de otros esteroides del cerebro derivados de pregnenolona, incluyendo, entre otros, alopregnanolona, testosterona, DHEA.

La capacidad de un compuesto de la divulgación para ser o no convertido en derivados de pregnenolona activos aguas abajo puede ser evaluada administrando este compuesto, por ejemplo inyectando 50 mg/kg, a una rata, sacrificando la rata 30 min más tarde, midiendo la concentración de alopregnanolona y epialopregnanolona en el *núcleo accumbens* de la rata por CG/EM y comparando estas concentraciones con alopregnanolona y epialopregnanolona en una rata a la cual se ha inyectado solamente un vehículo o pregnenolona.

Alternativamente, el compuesto puede ser administrado a cualquier línea celular que exprese la enzima que metaboliza la pregnenolona in vitro, midiendo luego el contenido de alopregnanolona y epialopregnanolona dentro de la célula o en el medio de cultivo celular o por CG/EM y comparando estas concentraciones con alopregnanolona y epialopregnanolona en cultivos de células que han recibido solo un vehículo o pregnenolona.

En una realización, el compuesto de la invención es un compuesto de fórmula I en donde

---R1 denota que C3 está sustituido con

-H, -halógeno, -OH, alcoxi C2-8, Bn-O-,
 Bn- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, amino, carboxilo o halógeno,
 Ph- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, amino, carboxilo o halógeno,
 =O,
 -NR5R6 en donde R5 y R6 cada uno independientemente es H, alquilo C1-8, Bn- o Ph,
 -O-CO-R7 en donde R7 es alquilo, o
 -O-CO- C₂H₄-COOH y -R2, ---R3, ---R4 son como se definen previamente.

Los inventores han probado una amplia selección de derivados de pregnenolona para encontrar derivados de pregnenolona que no se convierten sustancialmente en derivados de pregnenolona activos aguas abajo después de administración a un sujeto, pues mantienen una actividad inhibidora de CB1.

Se han encontrado varios grupos de derivados:

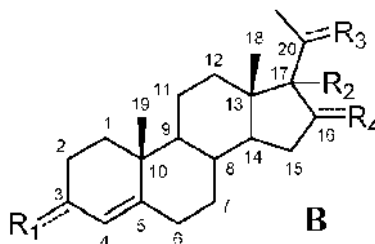
Las uniones entre C16 y C17 y C17 y C20 son enlaces sencillos.

En una realización, el enlace entre C16 y C17 y el enlace entre C17 y C20 son enlaces sencillos.

El enlace entre C4 y C5 es un doble enlace.

En una realización, los enlaces entre C3 y C4 y C5 y C6 son enlaces sencillos y el enlace entre C4 y C5 es doble.

En esta realización, el compuesto de la invención tiene la fórmula B:



en donde:

---R1 denota que C3 está sustituido con -OH o =O,
 -R2 denota que C17 está sustituido con -H, -OH alquilo C1-8, halógeno o Bn-,
 ---R3 denota que C20 está sustituido con -OH o =O,

---R4 denota que C16 está sustituido con -H.

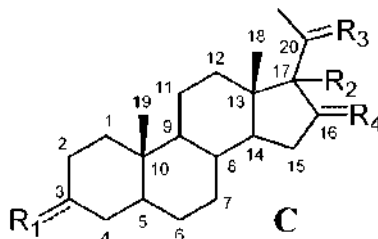
Por supuesto que los inventores han encontrado que derivados de pregnenolona con un doble enlace entre C4 y C5 y sustituidos en R1, R2 y/o R3 como se indicó anteriormente no fueron metabolizados dando derivados aguas abajo de pregnenolona.

Preferentemente, el compuesto se selecciona entre el grupo que consiste en 4-pregnen-17 α ,20 α -diol-3-ona, 4-pregnen-3 β ,20 α -diol, 4-pregnen-20 α -ol-3-ona, 17 α -metilprogesterona y 17 α -bencilprogesterona.

Los enlaces entre C5 y C6 y entre C4 y C5 son enlaces sencillos

En una realización, los enlaces entre C3 y C4, C5 y C6 y entre C4 y C5 son enlaces sencillos.

En esta realización, el compuesto de la invención tiene la fórmula (C)



en donde:

---R1 denota que C3 está sustituido con =O u -OH

---R2 denota que C17 está sustituido con -H

---R3 denota que C20 está sustituido con =O, y

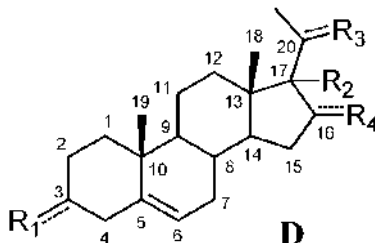
---R4 denota que C16 está sustituido con -H.

Preferentemente, dicho compuesto es 5 β -pregnan-3,20-diona o 5 β -pregnan-3 β -ol-20-ona.

El enlace entre C5 y C6 es un doble enlace

En una realización, los enlaces entre C3 y C4 y C4 y C5 son sencillos y el enlace entre C5 y C6 es un doble enlace.

En esta realización, el compuesto de la invención tiene la fórmula (D):



En esta realización, el compuesto de la invención de preferencia es una pregnenolona modificada en C3, C17 y/o C20.

Modificación en C3:

En una realización, el compuesto es una pregnenolona modificada en C3.

En esta realización, el compuesto tiene la fórmula (D)

y

---R1 denota que C3 está sustituido con

-H, -halógeno, alcoxi C1-8, Bn-O-,

Bn- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, amino, carboxilo o halógeno,

Ph- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, amino, carboxilo o halógeno,

=O,
 -NR₅R₆ en donde R₅ y R₆ cada uno independientemente es H, alquilo C1-8, Bn- o Ph,
 -O-CO-R₇ en donde R₇ es alquilo, u
 -O-CO-C₂H₄-COOH,

5

-R₂ denota que C17 está sustituido con -H
 ---R₃ denota que C20 está sustituido con =O, y
 ---R₄ denota que C16 está sustituido con -H.

10 También, en esta realización, el compuesto tiene la fórmula (D) y

---R₁ denota que C3 está sustituido con
 Bn-O- Halógeno o -N₃,
 -R₂ denota que C17 está sustituido con -H,
 ---R₃ denota que C20 está sustituido con =O, y
 ---R₄ denota que C16 está sustituido con -H.

15

De preferencia, el compuesto de esta realización está seleccionado del grupo que consiste en 3β-benciloxipregnenolona, 3-azidopregnenolona y 3β-fluoropregnenolona.

20

Modificación en C3 y C17:

En una realización, el compuesto de la invención es una pregnenolona modificada en C3 y en C17.

25 En esta realización, el compuesto tiene la fórmula (D) y

---R₁ denota que C3 está sustituido con alcoxilo C1-8, halógeno, Bn-O- o N₃
 -R₂ denota que C17 está sustituido con Bn-, -CH₃ o alqueno C2-6,
 ---R₃ denota que C20 está sustituido con =O y
 ---R₄ denota que C16 está sustituido con -H.

30

De preferencia, el compuesto de esta realización está seleccionado del grupo que consiste en 3β-fluoro-17α-metilpregnenolona, 17α-bencil-3β-fluoropregnenolona, 17α-bencil-3β-benciloxipregnenolona y 3β-benciloxi-17α-metilpregnenolona.

35

Modificación en C17:

En una realización, el compuesto es una pregnenolona modificada solo en C17.

40 En esta realización, el compuesto tiene la fórmula (D) y:

---R₁ denota que C3 está sustituido con -OH
 -R₂ denota que C17 está sustituido con

45

-OH, halógeno, alquilo C1-8, alcoxi C1-8, alqueno C2-6,
 Bn- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, amino, carboxilo o halógeno,
 Ph- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, carboxilo o halógeno o
 Bn-O-,

50

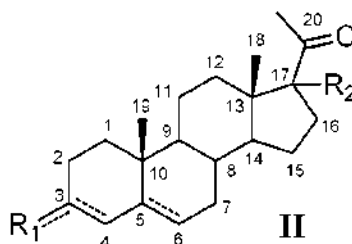
---R₃ denota que C20 está sustituido con =O, y
 ---R₄ denota que C16 está sustituido con -H.

De preferencia, -R₂ denota que C17 está sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8 o Bn-.

55 Más preferentemente, dicho compuesto está seleccionado del grupo que consiste en 17α-metilpregnenolona, 17α-bencilpregnenolona, 17-metoxipregnenolona y 17α-etilpregnenolona.

Modificación en C3 y/o C17

60 La presente invención también se refiere a un compuesto de fórmula (II)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

- 5 --- denota que la unión es un enlace sencillo o doble,
 ---R1 denota que C3 está sustituido con -OH, y
 -R2 denota que C17 está sustituido con

- 10 alquilo C3-8,
 alcoxi C2-8,
 Bn- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, amino, carboxilo o halógeno,
 Ph- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, carboxilo o halógeno, o
 Bn-O-,
 o en donde

- 15 ---R1 denota que C3 está sustituido con

- 20 alcoxi C1-8,
 Bn-O o
 Halógeno, y

-R2 denota que C17 está sustituido con

- 25 alquilo C1-8,
 alqueno C2-6,
 alcoxi C1-8,
 Bn- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, amino, carboxilo o halógeno,
 Ph- opcionalmente sustituido con alquilo C1-8, alcoxi C1-8, ciano, nitro, carboxyl, o halógeno, o
 Bn-O-.

- 30 Preferentemente, el compuesto de fórmula II se selecciona del grupo que consiste en 3 β -fluoro-17 α -
 metilpregnenolona, 17 α -bencil-3 β -fluoropregnenolona, 17 α -bencil-3 β -benciloxipregnenolona, 3 β -benciloxi-17 α -
 metilpregnenolona, 17 α -bencilpregnenolona 3 β -metoxi-17 α -metilpregnenolona, 17 α -alil-3 β -metoxipregnenolona, y
 17 α -bencil-3 β -metoxipregnenolona.

- 35 La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula II o una sal
 farmacéutica del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Modificación en C20:

- 40 En una realización, el compuesto es una pregnenolona modificada en C20.

En esta realización, el compuesto tiene la fórmula D, en donde:

- 45 ---R1 denota que C3 está sustituido con -OH,
 -R2 denota que C17 está sustituido con -H,
 ---R3 denota que C20 está sustituido con

- 50 -H, -OH y
 -NR8R9 en donde R8 y R9 son cada uno independientemente H, alquilo C1-8 o Bn-
 =CR10R11 en donde R10 y R11 cada uno independientemente es H o alquilo C1-7 u
 =O, y

- 55 ---R4 denota que C16 está sustituido con -H.

Preferentemente, ---R3 denota que C20 está sustituido con -H, -OH o -NR8R9 en donde R8 y R9 cada uno
 independientemente es H o alquilo C1-8.

Más preferentemente, dicho compuesto se selecciona entre el grupo que consiste en 5-pregnen-3 β ,20 α -diol, 20-deoxipregnenolona y 20-metilamino-5-pregnen-3 β -ol.

5 Modificación en C20 y C16:

En una realización el compuesto es una pregnenolona modificada en C20 y/o en C16.

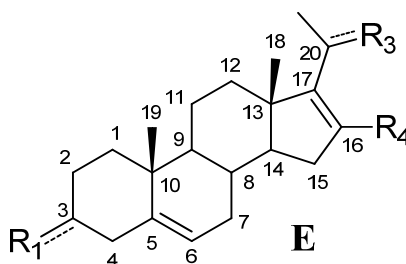
En esta realización, el compuesto tiene la fórmula D en donde

- R1 denota que C3 está sustituido con -OH,
- R2 denota que C17 está sustituido con -H,
- R3 denota que C20 está sustituido con -OH o -H, y
- R4 denota que C16 está sustituido con -OH u =O.

El enlace entre C16 y C17 es un doble enlace y el enlace entre C17 y C20 es un enlace sencillo.

En otra realización, el enlace entre C16 y C17 es un doble enlace y el enlace entre C17 y C20 es un enlace sencillo y ---R1 denota que C3 está sustituido con -H, -OH u =O, ---R3 denota que C20 está sustituido con -H, -OH u =O y ---R4 denota que C16 está sustituido con -H.

Esta realización está representada en la siguiente fórmula E.



De preferencia, dicho compuesto es 5,16 pregnadien-20-ona.

R1 está en posición β :

En la realización más preferida, cuando los enlaces entre C3 y R1 y C3 y C4 son sencillos, R1 está en posición β .

Por supuesto que los inventores han demostrado que, a diferencia de los derivados con R1 en posición α , los derivados con R1 en posición β no tienen ningún efecto sobre receptores de GABA y glutamato y evitan los efectos secundarios inducidos por modificaciones en estos receptores, como, por ejemplo, entre otros, sedación, trastornos de la memoria, agitaciones motoras. Además, los derivados con C3 en posición β mantienen su actividad inhibidora del receptor CB1.

Tratamiento de estados o trastornos patológicos:

La presente invención también se refiere a un compuesto de la invención definido anteriormente o a una de sus sales farmacéuticas para su uso en un método de tratamiento.

En una realización, el compuesto de fórmula II definido anteriormente o una de sus sales farmacéuticas es para su uso en un método de tratamiento.

La presente invención también se refiere a un compuesto de la invención definido anteriormente o a una de sus sales farmacéuticas para la preparación de un medicamento.

En una realización, el compuesto de fórmula II definido anteriormente o una de sus sales farmacéuticas es para la preparación de un medicamento.

La presente invención también se refiere a un método para el tratamiento de un estado o trastorno patológico en un sujeto que lo necesita el cual comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de la invención definido anteriormente o una de sus sales farmacéuticas.

La presente invención se refiere específicamente a pregnenolona para su uso en el tratamiento de un estado o trastorno patológico seleccionado del grupo que consiste en trastornos de la vejiga y gastrointestinales; enfermedades inflamatorias; enfermedades cardiovasculares; nefropatías; glaucoma; espasticidad; cáncer; osteoporosis; trastornos

metabólicos; obesidad; trastornos relacionados con la adicción, la dependencia, el abuso y las recaídas; trastornos psiquiátricos y neurológicos; trastornos neurodegenerativos; hepatitis y encefalitis autoinmunitarias; dolor; trastornos de la reproducción; y enfermedades inflamatorias y fibróticas de la piel.

- 5 La invención se refiere a un método para el tratamiento de un estado o trastorno patológico seleccionado del grupo que consiste en trastornos de la vejiga y gastrointestinales; enfermedades inflamatorias; enfermedades cardiovasculares; nefropatías; glaucoma; espasticidad; cáncer; osteoporosis; trastornos metabólicos; obesidad; trastornos relacionados con la adicción, la dependencia, el abuso y las recaídas; trastornos psiquiátricos y neurológicos; trastornos neurodegenerativos; hepatitis y encefalitis autoinmunitarias; dolor; trastornos de la reproducción; y enfermedades inflamatorias y fibróticas de la piel en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de la invención definido anteriormente o una de sus sales farmacéuticas.

- 15 La divulgación se refiere al uso de un compuesto de la invención definido anteriormente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un estado o trastorno patológico seleccionado del grupo que consiste en trastornos de la vejiga y gastrointestinales; enfermedades inflamatorias; enfermedades cardiovasculares; nefropatías; glaucoma; espasticidad; cáncer; osteoporosis; trastornos metabólicos; obesidad; trastornos relacionados con la adicción, la dependencia, el abuso y las recaídas; trastornos psiquiátricos y neurológicos; trastornos neurodegenerativos; hepatitis y encefalitis autoinmunitarias; dolor; trastornos de la reproducción; y enfermedades inflamatorias y fibróticas de la piel.

Enfermedades gastrointestinales:

- 25 En una realización preferida, el compuesto de la divulgación es para su uso en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales.

En una realización preferida, el uso de un compuesto de la divulgación es para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales.

- 30 En una realización preferida, el método es para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales en a sujeto que lo necesita, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un compuesto.

- 35 De preferencia, el compuesto de la divulgación es para su uso en el tratamiento de una enfermedad del hígado, en particular esteatohepatitis y cirrosis de un hígado no alcohólico (NASH).

Por supuesto que los inventores han demostrado que la pregnenolona y sus derivados inhiben la acumulación de lípidos en un modelo de obesidad y la producción de TNF α .

Obesidad o trastornos metabólicos:

- 40 En una realización preferida, el compuesto de la divulgación es para su uso en el tratamiento de obesidad o trastornos metabólicos.

- 45 En una realización preferida, el uso de un compuesto de la divulgación es para la preparación de un medicamento para el tratamiento de obesidad o trastorno metabólico.

En una realización preferida, el método es para el tratamiento de obesidad o trastornos metabólicos, en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un compuesto.

- 50 De preferencia, el compuesto de la divulgación es para su uso en el tratamiento de diabetes y dislipidemia.

Por supuesto que los inventores han demostrado que la pregnenolona y sus derivados inhiben la ingesta alimentaria aguda, la acumulación de grasa en un modelo de obesidad y la producción de TNF α .

- 55 **Trastornos relacionados con la adicción, la dependencia, el abuso y las recaídas:**

En otra realización preferida, el compuesto de la divulgación es para su uso en el tratamiento de trastornos relacionados con la adicción, la dependencia, el abuso y las recaídas.

- 60 En una realización preferida, el uso de un compuesto de la divulgación es para la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos relacionados con la adicción, la dependencia, el abuso y las recaídas.

- 65 En otra realización preferida, el método es para el tratamiento de trastornos relacionados con la adicción, la dependencia, el abuso y las recaídas de un sujeto que lo necesita, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un compuesto.

Específicamente, el compuesto de la invención es para su uso en el tratamiento de trastornos relacionados con la

adicción, la dependencia, el abuso, la intoxicación y las recaídas del cannabis.

Por supuesto que los inventores han demostrado que, en particular, la pregnenolona y sus derivados inhiben la tétada endocannabinoide inducida por activación del receptor CB1 por THC; ingesta alimentaria inducida por THC; alteraciones de la memoria inducidas por THC; alteración de la transmisión sináptica inducida por THC; autoadministración de agonistas CB1.

De preferencia, el compuesto de la divulgación es también para su uso en el tratamiento de trastornos relacionados con la adicción, la dependencia, el abuso y las recaídas de alcohol.

Trastornos neurodegenerativos y psiquiátricos:

En otra realización preferida, el compuesto de la invención es para su uso en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos y psiquiátricos.

En otra realización preferida, el uso de un compuesto de la invención es para la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos y psiquiátricos.

En otra realización preferida, el método es para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos y psiquiátricos en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un compuesto.

De preferencia, el compuesto de la invención es para su uso en el tratamiento de enfermedad de Parkinson y esquizofrenia.

Así, los inventores han demostrado que la pregnenolona es capaz de modular la actividad del sistema dopaminérgico aumentada por THC o cocaína y los efectos de la activación de CB1 sobre la transmisión sináptica excitadora.

Enfermedades inflamatorias y fibróticas de la piel:

En otra realización preferida, el compuesto de la invención es para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y fibróticas de la piel.

En otra realización preferida, el uso de un compuesto de la invención es para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y fibróticas de la piel.

En otra realización preferida, el método es para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y fibróticas de la piel. Por ello, los inventores han demostrado que compuestos de la invención inhiben la producción TNF α .

De preferencia, el compuesto de la invención es para su uso en el tratamiento de inflamación de la piel, inflamación y cáncer de la piel inducidos por UV, fibrosis de la piel y cicatrización de heridas.

Enfermedades cardiovasculares:

En otra realización preferida, el compuesto de la divulgación es para su uso en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares

En otra realización preferida, el uso de un compuesto de la divulgación es para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. En otra realización preferida, el método es para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

Por lo tanto, los inventores han demostrado que compuestos de la divulgación disminuyen la acumulación de lípidos e inhiben la producción de TNF α .

De preferencia, el compuesto de la divulgación es para su uso en el tratamiento en cardiomiopatía. Con más preferencia, el compuesto de la divulgación es para su uso en el tratamiento de cardiomiopatía seleccionada del grupo que consiste en cardiomiopatía cirrótica y cardiomiopatías inducidas por fármacos antineoplásicos, disfunciones contráctiles, infarto y aterosclerosis.

La invención se ilustrará más mediante las siguientes figuras y ejemplos.

FIGURAS

La Figura 1 muestra diagramas que representan en ratas Wistar: (A) niveles basales de pregnenolona (PREG), alopregnanolona (ALO), epialopregnanolona (EPI), testosterona (T) y dihidrotestosterona (DHT) en el núcleo accumbens; (B) los efectos de la inyección de THC (3 mg/kg, ip), que induce un aumento alto y de larga duración de las concentraciones de pregnenolona en el núcleo accumbens. Los efectos de otras drogas de abuso: cocaína

(20 mg/kg, ip), morfina (2 mg/kg, ip), nicotina (0,4 mg/kg, ip) y etanol (1g/kg, ip), que inducen un aumento mucho más pequeño de pregnenolona en el núcleo accumbens. Los efectos de THC y otras drogas de abuso sobre esteroides aguas abajo derivados de pregnenolona: alopregnanolona (C), epialopregnanolona (D), testosterona (E) y DHT (F), que fueron mucho más bajos que los observados para pregnenolona. Las flechas denotan el tiempo de inyección de todas las drogas. Los datos están expresados como media $\pm$ EEM (n=6-8 por grupo).

La Figura 2 muestra diagramas que representan la regulación negativa de pregnenolona sobre la tetrada conductual inducida por THC en ratones C57Bl/6. Dependiendo de la dosis de THC (grupo de vehículo) disminuyeron (A) la actividad locomotora [F(3,59)=17,7, P<0,001] y (B) la temperatura corporal (delta T comparado con el control) [F(3,59)=39,9, P<0,001] y aumentaron (C) la catalepsia (latencia para iniciar el movimiento) [F(3,59)=47,5, P<0,001] y (D) la analgesia (latencia para iniciar una respuesta nociceptiva en la prueba del plato caliente) [F(3,59)=5,15, P<0,01]. El inhibidor P450scs, aminoglutetimida (AMG, 50 mg/kg, ip), que bloquea la síntesis de pregnenolona, amplificó todos los efectos conductuales de THC: (A) hipolocomoción [F(3,98)=13,8, P<0,001], (B) hipotermia [F(3,98)=4,7, P<0,01], (C) catalepsia [F(3,98)=2,1, P<0,05], y (D) analgesia [F(3,98)=2,2, P<0,05]. La pregnenolona (PREG, 6 mg/kg, sc) redujo los efectos de THC (10 mg/kg, ip) y rescató completamente el efecto de AMG (50 mg/kg, ip) sobre: (E) locomoción, (F) temperatura corporal, (G) catalepsia y (H) analgesia. La pregnenolona no tuvo ningún efecto en animales que no recibieron THC. Los datos están expresados como media $\pm$ EEM (n=6-12 por grupo). * =P<0,05; ** = P<0,01; ***=P<0,001 comparados con ratones tratados con vehículo.

La Figura 3 muestra diagramas que representan la inhibición por pregnenolona de la ingesta alimentaria mediada por CB1. (A) El aumento de la ingesta alimentaria inducido por THC (0,5 mg/kg, ip) en ratas Wistar alimentadas ad-libitum fue inhibida en forma dependiente de la dosis por inyecciones de pregnenolona [F(3,94)=3,65; P<0,02]. (B) El aumento de la ingesta alimentaria inducido por THC (1 mg/kg, ip) en ratas C57Bl/6 privadas de alimentos durante 24 h fue suprimido por pregnenolona (2 mg/kg, sc). (C) La pregnenolona redujo en forma dependiente de la dosis la ingesta alimentaria en ratas C.57Bl/6 privadas de alimento durante 24 h. (D) La disminución de la ingesta alimentaria inducida por pregnenolona (PREG 6 mg/kg) en ratas C.57Bl/6 privadas de alimento durante 24 h fue revertida por un pretratamiento con el antagonista de CB1R, SR141716A (0,05 mg/kg, ip). Los datos están expresados como media $\pm$ EEM (n=6-12 por grupo). * =P<0,05; *** = P<0,01; ***=P<0,001 comparado con animales tratados con vehículo.

La Figura 4 muestra diagramas que representan los efectos de inyecciones de pregnenolona sobre esteroides activos aguas abajo derivados de pregnenolona en el cerebro. (A) La administración de pregnenolona (s.c.) aumentó en forma dependiente de la dosis los niveles de pregnenolona en la corteza frontal y el hipotálamo [F(3,19)=20, P<0,001; F(3,19)=23, P<0,001, respectivamente] en ratones C57Bl/6 privados de alimento 24 h. La pregnenolona no modificó las concentraciones de: (B) alopregnanolona, (C) epialopregnanolona. Los datos están expresados como media $\pm$ EEM (n= 7-8 por grupo). * = P<0,05, *** = P<0,001 comparado con animales tratados con vehículo (PREG 0 mg/kg).

La Figura 5 muestra diagramas que representan la inhibición por pregnenolona de la autoadministración del agonista de CB1 WIN 55,512-2 en ratones CD1. (A) Durante la adquisición de la autoadministración de WIN 55,512-2 (0,0125 mg/kg/infusión) el número de acercamientos de la nariz fue significativamente más alto en el orificio activo que en el orificio inactivo [F(1,18)=38,3, P<0,001]. (B) Después de la adquisición, la inyección de pregnenolona (2 o 4 mg/kg, sc) disminuyó el número de respuestas del orificio activo. (C) La pregnenolona también disminuyó la motivación para WIN 55,512-2 medida por la reducción del punto de quiebre en un esquema de razones progresivo. Los datos están expresados como media $\pm$ EEM (n=5-8 por grupo). ** = P<0,05, *** = P<0,001 comparado con animales tratados con vehículo (PREG 0 mg/kg).

La Figura 6 muestra diagramas que representan la inhibición por la pregnenolona de los efectos adversos de THC en la memoria. Como lo denota el índice de discriminación de la prueba de reconocimiento del objeto, el THC (10 mg/kg, ip) indujo una amnesia importante que fue eliminada por la pregnenolona (PREG, 6 mg/kg, sc) [F(3,23)=24,6, P<0,001]. Los datos están expresados como media $\pm$ EEM (n=6-7 por grupo). ***=P<0,001 comparado con ratones tratados con vehículos.

La Figura 7 muestra diagramas que representan la inhibición por la pregnenolona del aumento de la actividad dopaminérgica inducida por THC. La inyección de pregnenolona (PREG, 2 mg/kg, sc) en ratas disminuyó el aumento inducido por (THC) de Δ 9-tetrahidrocannabinol en (A) la tasa de activaciones de descarga de neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (VTA) [F(4,32)= 7,14, p< 0,001] y (B) el aumento de descarga de dopamina en el núcleo accumbens [F(10,80)= 10,80, p< 0,001]. Se administraron i.v. dosis acumulativas de THC (de 0,15 a 1,2 mg/kg) en el tiempo 0 durante 4 min (registrando 1 min por dosis).

La Figura 8 muestra diagramas que representan la inhibición por pregnenolona de la modificación de la actividad dopaminérgica inducida por cocaína. La inyección de pregnenolona (PREG, 2 mg/kg, sc) en ratas eliminó la disminución inducida por cocaína de (A) el arranque de la actividad en neuronas dopaminérgicas y el aumento de la descarga de dopamina en el núcleo accumbens. Se administraron i.v. dosis acumulativas de cocaína (de 0,0125 a 0,8 mg/kg) en el tiempo de 0 a 4 min (registrando 1 min por dosis). * =P<0,05 ** =P<0,01 ***=P<0,001 comparado

con ratas tratadas con vehículo.

La Figura 9 muestra diagramas que representan los efectos de la administración de pregnenolona sobre peso corporal e ingesta alimentaria. (A) 5 mg/kg de pregnenolona (PREG5) inyectados subcutáneamente una vez al día antes del comienzo de la fase oscura indujeron progresivamente disminución importante del peso corporal [F(1,29)=3,13 ; p<0,001] en animales alimentados con una dieta rica en grasa. (B) Sin embargo, la pregnenolona no modificó la ingesta alimentaria.

La Figura 10 muestra diagramas que representan los efectos de la pregnenolona sobre la acumulación de masas grasa y magra en ratones obesos. La pregnenolona, inyectada subcutáneamente una vez al día antes del comienzo del ciclo oscuro, bloqueó en forma dependiente de la dosis el aumento de la masa grasa (A,C) y mitigó la disminución de la masa magra (B,D) observada durante la alimentación con una dieta rica en grasa. Las masas grasa y magra se calcularon usando resonancia magnética en ratones. PRE=valor obtenido antes del inicio de la administración de pregnenolona. POST= valores obtenidos después de 30 días de tratamiento con pregnenolona o vehículo. *P<0,05 **P<0,01.

La Figura 11 muestra diagramas que representan la inhibición por pregnenolona del aumento de TNF alfa inducido por LPS. Se inyectó intraperitonealmente la toxina bacteriana LPS 30 min después de la inyección de pregnenolona (6 mg/kg subcutáneamente) o solución del vehículo. La pregnenolona dividió por la mitad el aumento de TNF-alfa inducido por la inyección de LPS. *P<0,5

La Figura 12 muestra diagramas que representan la inhibición por pregnenolona de la inhibición inducida por THC de las corrientes sinápticas excitadoras en el núcleo accumbens de ratas. Se registraron corrientes post-sinápticas excitadoras (EPSC, del inglés "excitatory post-synaptic currents") inducidas por axones locales que se estimulan eléctricamente, usando la técnica "patch clamp" en neuronas principales de núcleo accumbens en cortes de cerebro obtenidos de ratas adultas. (A) La aplicación de baño de THC (20 mM) inhibió, de modo fiable, la transmisión sináptica de cortes control (34,3 ± 3,7 % de inhibición, N=8). Se atenuó significativamente el efecto de THC cuando los cortes se pretrataron con Pregnenolona 100 nM (15,1 ± 1,8 % de inhibición, N=9). (B) Trazas de corriente sináptica de experimentos representativos promediados durante la línea basal y después de 40 minutos de exposición a THC. *** prueba T: t=4,820, df=15, p=0,0002.

La Figura 13 muestra diagramas que representan la inhibición por pregnenolona de la inhibición inducida por THC de la transmisión sináptica excitadora de núcleo accumbens de ratón. (A) Se registraron en cortes de cerebro del núcleo accumbens potenciales postsinápticos excitadores de campo (fEPSP, del inglés "field excitatory post-synaptic potentials") inducidos por axones locales que se estimulan eléctricamente obtenidos de ratones adultos. La aplicación de baño de THC indujo una inhibición dependiente de la dosis de la transmisión sináptica de cortes control (N=5-9). Los efectos de THC se redujeron cuando los cortes se pretrataron con pregnenolona 100 nM (N=5-6). (B) Se registraron trazas promedio de fEPSP representativas durante la línea basal y después de 40 minutos de exposición a THC. ANOVA bidireccional: efecto de pregnenolona p<0,002; efecto de THC p<0,0003.

La Figura 14 muestra diagramas que representan que la pregnenolona es un inhibidor de la activación del receptor CB1, que no modifica la unión ortoestérica de agonistas del CB1. La pregnenolona (10-12 a 10-4 M) no modificó la unión del agonista de CB1 [3H]CP55,940 para el receptor CB1 humano expresado por células CHO. Los datos están expresados como media ± EEM (n=2-3 por concentración).

La Figura 15 muestra diagramas que representan la falta de efectos de la pregnenolona sobre comportamientos de tipo ansiedad. Se midieron trastornos de tipo ansiedad mediante el % de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos de un laberinto elevado en cruz. La pregnenolona no indujo comportamiento de tipo ansiedad aún a las dosis más altas (10 mg/kg) bien por encima de sus dosis de comportamiento efectivas entre (1 y 6 mg/kg) correspondientes a sus efectos de comportamiento máximos. El antagonista ortoestérico del CB1 rimonabant a 10 mg/kg indujo un aumento de la ansiedad, como se muestra por la disminución de las entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos. P1, P6, P10 = pregnenolona 1, 6, 10 mg/kg. Rimo10= rimonabant 10mg/kg. V= vehículo. *P<0,05; ***P<0,001.

La Figura 16 representa diagramas que muestran la falta de efecto de la pregnenolona sobre corrientes mediadas por receptores de GABA-A. Se registraron mIPSC de NAc PN de ratón adulto, voltaje fijado a -80 mV. A. Resumen de amplitudes (ANOVA f=5,39, df=4,66, p<0,001) y tiempos de decaimiento (ANOVA f=24,7, df=4,66, p<0,0001) en mIPSC de controles (N=16) y cortes pre-tratados con pregnenolona (100 nM: N=15; 1 µM: N=11) o alopregnanolona (100 nM: N=18; 1 µM N=11). Pruebas posteriores: *p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. B. registro de trazas representativas de mIPSC. C. promedio de trazas de mIPSC normalizadas para el pico. Notar que solo la alopregnanolona 1 µM afectó sustancialmente la fase de decaimiento de mIPSC. cont= controles; preg=pregnenolona; Alo= alopregnanolona.

La Figura 17 representa diagramas que muestran que la pregnenolona no modifica las corrientes mediadas por AMPAR ni por NMDAR. (A) mEPSC registrado de voltaje fijado a -80 mV de neuronas principales de núcleo accumbens de ratón adulto. a) mEPSC registrado de cortes control (N=16) y pretratados (N=15) con pregnenolona

(100 nM) mostraron amplitud similar (prueba T: $t=1,16$, $df=29$, $p=0,25$) y tiempo de decaimiento (prueba T: $t=1,28$, $df=29$, $p=0,21$). b) Trazas de mEPSC promedio normalizadas para el pico que muestran que su cinética no fue afectada por pregnenolona. c) Registro de trazas representativas de mEPSC. B. Corrientes celulares totales registradas de NAc PN inducidas por aplicación de baño de NMDA 25 μ M durante 1 min. a) Las corrientes inducidas por NMDAR fueron comparables entre controles ($N=17$) y cortes pretratados con pregnenolona 100 nM ($N=12$) y 1 μ M ($N=7$) (ANOVA: $f=0,09$, $df=2,33$, $p=0,91$). b) Experimentos representativos que muestran el efecto de NMDA sobre corrientes de retención de voltaje de NA PN fijado a -30 mV. cont= controles; preg=pregnenolona.

La Figura 18 muestra diagramas que representan los efectos de la inyección de dosis altas (50 mg/kg, sc) de pregnenolona y de los derivados sintéticos en C3 y C17 de 3-fluoropregnenolona (CP1), 17-metilpregnenolona (CP2) y 3-fluoro-17-metilpregnenolona (CP3) sobre el contenido de esteroides del núcleo accumbens. La pregnenolona, pero no la 3-fluoropregnenolona, la 17-metilpregnenolona ni la 3-fluoro-17-metilpregnenolona, aumentó los niveles de alopregnanolona (A) y epialopregnanolona (B) del núcleo accumbens de ratas Wistar. Los datos están expresados como media $\pm$ EEM ($n=5-7$ por grupo).

La Figura 19 representa diagramas que muestran que los derivados sintéticos en C3 y C17 3-fluoropregnenolona (CP1), 17-metilpregnenolona (CP2) y 3-fluoro-17-metilpregnenolona (CP3) redujeron la ingesta alimentaria. (A) El aumento en ingesta alimentaria inducido por THC (0,5 mg/kg, sc) en ratas Wistar alimentadas ad libitum se redujo significativamente mediante la 17-metilpregnenolona (8 mg/kg, sc), un intento no significativamente importante se observó también después de 3-fluoropregnenolona y 3-fluoro-17-metilpregnenolona. (B) La pregnenolona [(F4,28)=5,5; $P<0,01$], la 3-fluoropregnenolona [(F3,20)=3; $P<0,05$], la 17-metilpregnenolona [(F3,20)=5,3; $P<0,01$] y la 3-fluoro-17-metilpregnenolona [(F3,20)=4; $P<0,02$] disminuyeron, en forma dependiente de la dosis, la ingesta alimentaria en ratones C.57B1/6 privados de alimento 24 h. (C) La pregnenolona, la 3-fluoropregnenolona, la 17-metilpregnenolona y la 3-fluoro-17-metilpregnenolona (2 mg/kg, sc) disminuyeron la hiperfagia inducida por THC en ratones C57B1/6 privados de alimento 24 h. (D) Efectos de respuesta a la dosis total de pregnenolona y 17-metilpregnenolona sobre la hiperfagia inducida por THC en ratones C.57B1/6 privados de alimento 24 h. Para ambos compuestos, la primera dosis eficaz fue 1 mg/kg. Los datos están expresados como media $\pm$ EEM ($n=6-8$ por grupo). * = $P<0,05$, **= $P<0,01$; ***= $P<0,001$ comparados con animales tratados con vehículo. ##= $P<0,01$; ###= $P<0,001$, comparados con animales tratados con THC.

La Figura 20 muestra diagramas que representan los efectos de una administración en estado estacionario de pregnenolona con minibombas Alzet sobre el nivel de pregnenolona y alopregnanolona aguas abajo de metabolitos. La inyección subcutánea de pregnenolona indujo un aumento de niveles de pregnenolona (A) que fue de corta duración (<1 h) y también aumentó los niveles de alopregnanolona sobre al menos durante 1 hora (D). La administración de pregnenolona a través de minibombas Alzet (B,C) aumentó, en forma dependiente de la dosis, los niveles plasmáticos de pregnenolona pero no los de alopregnanolona. (E,F).

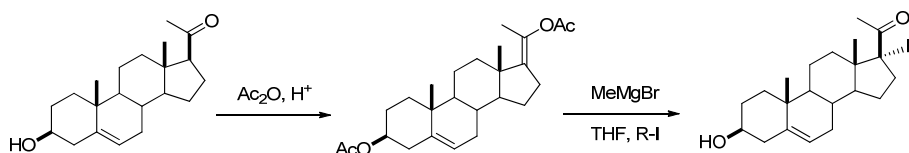
Ejemplos

EJEMPLOS DE SÍNTESIS DE DERIVADOS DE PREGNENOLONA:

La pregnenolona es bien conocida y está disponible comercialmente y se puede usar como precursor para la síntesis de sus derivados.

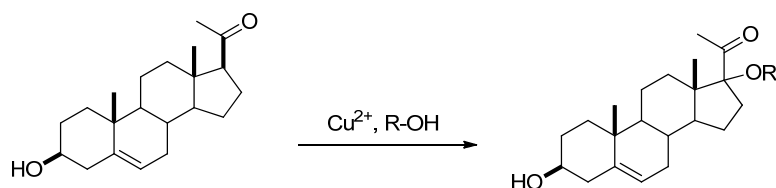
Ejemplo de síntesis de un derivado de pregnenolona que tiene el C17 sustituido con alquilo:

Tal como se muestra más abajo, para sintetizar un compuesto sustituido con alquilo en la posición C17, en una primera etapa, se forma el acetato de enol correspondiente. Luego se trata con un reactivo de Grignard para generar un enolato que se atrapa a continuación con un electrófilo. El electrófilo puede ser preferiblemente un yodo- o bromo-alquilo, -alilo, -bencilo o -arilo.



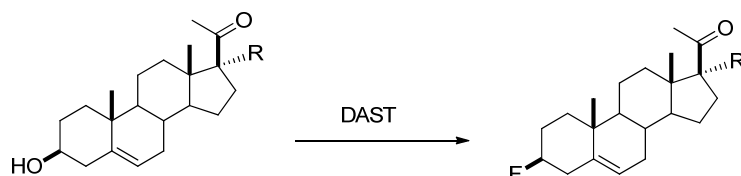
Ejemplo de síntesis de un derivado de pregnenolona que tiene el C17 sustituido con -O

La Figura siguiente muestra cómo obtener un compuesto sustituido en C17 con alcoxi-, benciloxi- y ariloxipregnenolonas gracias a funcionalización mediada por cobre con alcoholes.



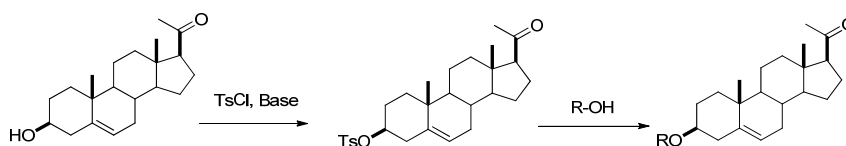
Ejemplo de síntesis de un derivado de pregnenolona que tiene el C3 sustituido con halógeno y el C17 sustituido con R:

Como se muestra más abajo, el derivado de pregnenolona que tiene el C17 sustituido con R se trata con DAST con el fin de cambiar la función alcohol del C3 por un átomo de flúor.



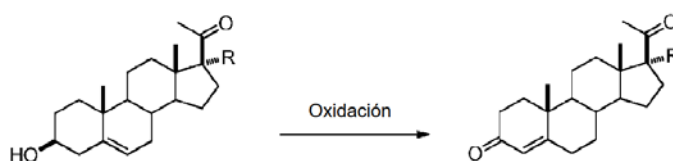
Ejemplo de síntesis de un derivado de pregnenolona que tiene el C3 sustituido con un alcóxido:

Como se muestra más abajo, la formación de una función éter en la posición C3 requiere, en una primera etapa, la transformación del alcohol en el tosilato correspondiente como grupo saliente. Luego, se trata con el alcohol adecuado para llevar a la formación de la C3-alcóxipregnenolona.



Ejemplo de síntesis de un derivado de pregnenolona que tiene el C3 sustituido con =O y el C17 sustituido con R:

Como se muestra más abajo, para obtener un derivado de pregnenolona que tiene el C3 sustituido con =O y el C17 sustituido con R, la pregnenolona sustituida en C17 se trata con oxidantes que llevan a la oxidación de la función alcohol dando la cetona correspondiente seguida por la isomerización espontánea del doble enlace para dar progesteroas modificadas.



EJEMPLOS DEL ROL DE LA PREGNENOLONA Y SUS DERIVADOS EN LA INHIBICIÓN DEL RECEPTOR CB1.

Material y Métodos:

Animales

Se alojaron individualmente animales en un recinto para animales a temperatura (22°C) y humedad (60%) controladas bajo un ciclo constante de luz-oscuridad (luz, 8:00-20:00 h). Excepto para experimentos de ingesta alimentaria y durante las sesiones experimentales de autoadministración de WIN 55,212-2, los alimentos y el agua estuvieron disponibles libremente a lo largo de todos los experimentos. Después de la llegada, los animales se manejaron periódicamente durante dos semanas antes de los experimentos. La mayoría de los experimentos se realizó durante la fase de luz, excepto para los experimentos de ingesta alimentaria en ratas y las pruebas de las sesiones de autoadministración de WIN 55,212-2 en ratones CD1, que se realizaron durante la fase de oscuridad. Todos los experimentos se realizaron en estricta conformidad con las recomendaciones de la Unión Europea (86/609/EEC).

Se adquirieron ratas Wistar macho adultas (3-4 meses), ratones C57Bl/6N (2-3 meses) ratones C57Bl/6j (2-3 meses) y ratones CD1 (que pesaban 25-30 g al principio de los experimentos) en Charles River Laboratories (Francia). Se produjeron ratones deficientes en CB1 (CB1^{-/-}) y mutantes D1-CB1 (D1-CB1^{-/-}) en nuestro laboratorio como se

describe (Marsicano et al., Nature. 2002 418:530-4; Monory et al., PLoS Biol. 2007 5(10):e269).

Fármacos

- 5 Se adquirió Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC, Sigma-Aldrich, Francia) como una solución de 30 mg/ml (p/v) en etanol 100%. Antes de la inyección, se disolvió esta solución en Tween 80 (1 gota/3 ml) y dimetilsulfóxido (DMSO) diluido 1:40 con solución salina (2,5%). La solución de vehículo contenía todos los ingredientes (1 gota / 3 ml de Tween 80, DMSO (2,5%) y etanol diluido con solución salina para obtener una concentración final de 1,8% en etanol). Se disolvieron en solución salina cocaína HCl (Coopération Pharmaceutique Française, Francia), sulfato de morfina
- 10 (Francopia, Francia), bitartrato de nicotina (Sigma-Aldrich, Francia) y alcohol USP (95%, Sigma-Aldrich, Francia). Se adquirieron HU210, JWH133 y AM251 en Tocris, RU y WIN 55,212-2, lipopolisacáridos de aminoglutetimida (AMG) pregnenolona (5-pregnen-3 β -ol-20-ona) de E. Coli 0111:B4 (LPS) en Sigma-Aldrich (France) y rimonabant (SR141716A) en Cayman Chemical (Interchim, Montluçon, Francia).
- 15 Los compuestos sintéticos 3-fluoropregnenolona; 17-metilpregnenolona y 3-fluoro-17-metilpregnenolona fueron sintetizados por AtlanChimPharma (Francia). Se disolvieron las soluciones de las drogas en Tween 80 (1 gota/3 ml) y DMSO (2,5%) o NMP (2,5%) y se diluyeron con solución salina. Se inyectaron THC, cocaína, morfina, nicotina, etanol, HU210, JWH133, AM251, WIN 55,212-2, AMG y SR141716A intraperitonealmente (ip) y pregnenolona o derivados de pregnenolona subcutáneamente (sc). Los volúmenes de inyección fueron 1 ml/kg de peso corporal para ratas y 10
- 20 ml/kg para ratones.

En experimentos SA, se disolvió WIN 55,212-2 (Sigma Chemical Co., Madrid, España) en una gota de Tween 80 y se diluyó con solución salina. Se mezclaron clorhidrato de cetamina (100 mg/kg) (Imalgène 1000; Rhône Mérieux, Lyon, Francia) y clorhidrato de xilazina (20 mg/kg) (Sigma, Madrid, España) y se disolvieron en etanol (5 %) y agua destilada

25 (95 %). Se administró esta mezcla anestésica intraperitonealmente antes de implantación del catéter en un volumen de inyección de 20 ml/kg de peso corporal. Se disolvió tiopental sódico (5 mg/ml) (Braun Medical S.A, Barcelona, España) en agua destilada y se administró por infusión de 0,1 ml a través del catéter intravenoso. Para el ensayo funcional del receptor CB1 humano in vitro, se disolvieron pregnenolona y CP. 55940 en DMSO hasta concentración final de 100 mM y se guardó a -20°C.

30

Cuantificación de neurosteroides

Toma de muestras de sangre y cerebro.

- 35 Los animales se sacrificaron por decapitación y se recogió la sangre troncal en tubos recubiertos de EDTA, se centrifugaron a 2000 x g durante 10 min, y el sobrenadante se guardó a -20°C. Se recogieron rápidamente los cerebros, se disecaron las áreas cerebrales sobre hielo y las muestras se congelaron rápidamente en hielo frío y se guardaron a -80°C.

Medición de niveles de esteroides por CG/EM.

- Se determinaron niveles en plasma, cerebro y medio de cultivo de pregnenolona (5-pregnen-3 β -ol-20-ona), alopregnanolona (3 α -hidroxi-5 α -pregnan-20-ona), epialopregnanolona (3 β -hidroxi-5 α -pregnan-ol-20-ona), testosterona y 5 α dihidrotestosterona por CG/EM de acuerdo al protocolo de extracción, purificación y cuantificación
- 45 descrito previamente (George O, et al., Biol Psychiatry. 2010 68: 956-63, Vallee M, et al., Anal Biochem. 2000, 287:153-66).

Tétrada de comportamiento del THC

Temperatura corporal.

Se midió la temperatura corporal usando una sonda rectal (sonda RET3, instrumentos Physitemp, EE.UU.) en ratones conscientes y se monitoreó mediante un termómetro de monitoreo thermalert (TH-5, Physitemp instruments, EE.UU.).

Actividad locomotora.

- Se midió la locomoción mediante un sistema de campo abierto automatizado (tamaño de la caja 100 × 100 × 30 cm, iluminación de 10 lux, sistema rastreador por video: Viewpoint, Lyon, Francia) o jaulas de Plexiglas (19 cm de largo × 11 cm de ancho × 14 cm de alto) montado con rayos de fotoceldas monitoreados por computador (Imetronic, Francia).
- 60 Se probaron los animales individualmente durante 15 min. Se registró la distancia acumulativa horizontal de los animales que se movían dentro de la caja.

Catalepsia.

- 65 Se midió la catalepsia mediante la prueba de la catalepsia en barra. Se colocaron las patas delanteras de ratones sobre una barra de 1 cm de diámetro fijada horizontalmente a 3,5 cm de la superficie de la mesa de trabajo. Se registró

la latencia para bajar.

Analgesia.

- 5 Se midió la analgesia usando un medidor de analgesia de plato caliente (BIO-HC1.00, Bioseb, Francia). El plato se calentó a $52^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ y se registró el tiempo hasta que los ratones mostraron el primer signo de malestar (lamido o respingo de las patas o salto sobre el plato, definido aquí como latencia de escape). Se estableció un corte de 60 s para evitar daño del tejido.

10 Tarea de reconocimiento de objetos

- Se midió el reconocimiento de objetos en un laberinto L de dos brazos (tamaño de cada brazo: 30 cm de largo x 4,5 cm de ancho) en condiciones de luz débil (50-60 lux). Los animales se probaron individualmente durante tres días consecutivos 9 min por sesión cada día, correspondiendo a sesiones de habituación, entrenamiento y prueba. El día 1 (sesión de habituación), se dejó a los ratones que exploraran el laberinto L sin ningún objeto. El segundo día (sesión de entrenamiento), se presentaron dos objetos idénticos al final de cada brazo del laberinto. Aunque no aparecía ninguna preferencia para el brazo del objeto (no se muestran los datos) el objeto y los brazos se presentaron al azar para cada ratón / condición. El 3er día (sesión de prueba), se reemplazó uno de los objetos familiares por un objeto nuevo y se computó el tiempo total transcurrido para explorar cada uno de los dos objetos (nuevo y familiar). Se registró el tiempo pasado en cada brazo y el tiempo pasado explorando un objeto (familiar o nuevo). Se definió la exploración del objeto como la orientación de la nariz hacia el objeto a una distancia de menos de 2 cm. Durante la sesión de prueba, se calculó un índice de discriminación como la diferencia entre los tiempos transcurridos explorando el objeto nuevo dividido por el tiempo total explorando los dos objetos. Un índice de discriminación más alto se considera que refleja mayor retención por la memoria para el objeto familiar (Puighermanal et al., 2009).

25 Mediciones de la ingesta alimentaria

- Se evaluó la ingesta alimentaria midiendo el consumo de alimentos en las jaulas de alojamiento de los animales. Para cada animal se colocaron 50-100 g de comida para animales de laboratorio estándar (U.A.R., Francia) en la jaula de alojamiento limpia. Se pesó la cantidad de alimento que quedó 1 h más tarde y se calculó la cantidad de alimento consumida.

Autoadministración de WIN 55,212-2

- 35 Se realizaron experimentos de autoadministración intravenosa en donde los animales aprendieron a autoinfundirse WIN 55,212-2 (WIN) en cámaras de operación de ratones (Modelo ENV-307A-CT, Medical Associates, Georgia, VT, EE.UU.) usando procedimientos previamente descritos (Mendizábal V, et al., Neuropsychopharmacology. 2006, 31:1957-66).

40 Microdialisis y electrofisiología *in vivo* acopladas

- Procedimientos generales. Se realizaron procedimientos de cirugía y perfusión para permitir monitoreo electrofisiológico y microdialisis concomitantes. Resumiendo, se anestesiaron las ratas usando una mezcla al 2% de isoflurano/aire, y se insertó un catéter en la vena femoral para administración intravenosa de la droga. Después, se colocaron los animales en un marco estereotáxico (David Kopf Instruments, Phymep, París, Francia) equipado con una máscara para la nariz para la administración constante de anestesia con gas (2% de isoflurano durante la cirugía, 1,5% de isoflurano durante el experimento de electrofisiología y microdialisis), se monitoreó su temperatura rectal y se mantuvieron a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ mediante una almohadilla calefactora (CMA 150, Carnégie Medecin, Phymep). Se implantaron, respectivamente, una sonda de microdialisis (CMA/11, 2 mm de largo, 240 μm de diámetro externo, Cuprophan; Carnegie Medicin, Phymep) y un electrodo registrador (micropipeta de vidrio TW150F-4, 2-3 μm de diámetro externo, WPI-Europe, Aston Stevenage, RU) en la parte medio-ventral del núcleo accumbens derecho correspondiente a la subdivisión de la concha [coordenadas, en mm relativos al vértice: anteroposterior (AP) = +1,7, lateral (L) = 1, ventral (V) -8], y en el área tegmental ventral derecha (VTA) (coordenadas, en mm relativas al vértice: AP = -5,4-5,8, L = 0,4-0,8, V = -7,0-8,5], de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson. Las sondas se perfundieron a una tasa constante de 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ mediante una bomba de microperfusión (CMA 111, Carnegie Medicin, Phymep) con fluido cerebroespinal artificial (aCSF) que contenía (en mM): 154,1 de Cl^- , 147 de Na^+ , 2,7 de K^+ , 1 de Mg^{2+} y 1,2 de Ca^{2+} , ajustado a pH 7,4 con tampón de fosfato de sodio 2 mM. Luego se mantuvo la perfusión durante 2 h hasta la estabilización de los niveles de dopamina (DA) en los perfusados.
- 60 El registro de unidades sencillas del encendido neuronal de DA y el monitoreo de niveles extracelulares de DA se comenzaron 2 h después del inicio de la perfusión con sonda (periodo de estabilización). Se recogieron los dializados (30 μl) en hielo cada 15 min, y se analizaron inmediatamente para determinar los valores de la línea basal de los niveles extracelulares de DA, definidos por tres muestras consecutivas en las cuales el contenido de DA varió en menos de 10% (9). La búsqueda de neuronas con DA para registro electrofisiológico se realizó durante los 30 min que precedieron al tratamiento con administración de droga (THC o cocaína). Se registró durante 3-5 min la tasa de activación de neuronas con DA para obtener la línea basal del encendido, definida por una variación de menos del

10% de la descarga de frecuencia promedio de la neurona con DA. Los tratamientos farmacológicos se realizaron una vez obtenida una línea basal estable para la activación de la neurona con DA y niveles extracelulares de DA en el perfusado.

- 5 **Registro de neuronas con DA.** Se registró la actividad en unidades sencillas de neuronas localizadas en el VTA extracelularmente con micropipetas de vidrio llenas con 1% de Fast Green disuelto en acetato de sodio 0,5 M (impedancia, 2–5 MΩ). Las señales se filtraron (paso de banda, 0,4–1 kHz) y se amplificaron mediante un amplificador de alta impedancia (Dagan 2400A, Dagan Corporation, EE.UU.) y se aislaron descargas individuales mediante un discriminador de ventana (WD-2, Dagan Corporation, EE.UU.), mostradas en un osciloscopio de almacenamiento análogo-digital (HM507, Hameg, Frankfurt, Alemania). Luego los experimentos se mostraron en línea con software Spike2 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, RU) mediante un computador conectado a la interfaz CED 1401 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, RU). Se identificaron neuronas VTA DA de acuerdo a los criterios ya publicados (12-14). La tasa de activación se definió como el número de descargas/s.
- 10
- 15 **Ensayo de DA.** Se inyectaron dializados en un aparato de HPLC equipado con una columna Equisil BDS de fase inversa (C18; 2 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula; Cluzeau Info Labo, Ste Foy la Grande, Francia), y un detector amperométrico (Antec Leyden DECADE II, Alpha-mos, Toulouse, Francia) con un conjunto de electrodos de carbón vitrificado a +450 mV versus Ag/AgCl, con el fin de cuantificar DA. La composición de la fase móvil fue (en mM) de 70 NaH₂PO₄, 0,1 de Na₂EDTA y 0,1 de ácido octilsulfónico más 10% de metanol, ajustado a pH 4,8 con ácido ortofosfórico. La sensibilidad para DA fue 0,3 pg/20 ml con una relación de señal/ruido de 3:1.
- 20

Histología. Al final de cada experimento, se hizo pasar una corriente continua directa (-20 µA durante 15 min) a través del electrodo para sacar el colorante Fast Green y permitir la identificación del sitio de registro. Después se retiraron los cerebros y se fijaron en solución de NaCl (0,9%)/paraformaldehído (10%). Se determinó la posición de los electrodos en la VTA y las sondas de microdialisis en el núcleo accumbens por examen microscópico en secciones coronarias (60 µm) teñidas con Neutral Red.

25

Obesidad inducida por dieta y evaluación de acumulación de grasa

- 30 Se alimentaron ad libitum ratones C57BL/6J machos de 2 meses con dieta rica en grasa al 60% (HFD; Catalog # D12492, Research Diets, New Brunswick, NJ) durante 8 semanas y, a continuación, se trataron con pregnenolona o vehículo. Se garantizó la distribución homogénea de los animales en grupos de tratamiento de 3 animales emparejando su peso corporal, masa de grasa y glucosa en ayunas antes de empezar los tratamientos farmacológicos.
- 35 **Análisis de la composición del cuerpo.** Se determinaron la masa grasa y la masa magra in vivo usando un analizador EchoMRI (EchoMedical Systems, Houston, TX) antes de colocar los ratones en el HFD, así como inmediatamente antes y al final del tratamiento crónico con pregnenolona o su vehículo.

40 **Mediciones de ácidos grasos libres en plasma.** Se recogió sangre troncal de ratones DIO al final de las 4 semanas de tratamiento y se midieron ácidos grasos libres en plasma (FFA, del inglés "Free Fatty Acids") con un kit de reacción colorimétrica, siguiendo las instrucciones del proveedor (Abcam, catálogo # 65341).

45 **Mediciones de TNFalfa en plasma.** Se recogió sangre troncal y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min a 4°C. Se guardó el plasma a -80°C hasta que se realizaron las mediciones de TNFα. Se determinaron los niveles de TNFα en plasma usando un kit de ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante (Fisher Scientific, Catálogo # E6473C).

Electrofisiología en cortes de cerebro

50 **Preparación de los cortes.** Se anestesiaron profundamente con isoflourano y se perfundieron transcardialmente con una solución fisiológica a base de sacarosa a 4°C (en mM: 23 de NaHCO₃, 70 de Colina Cl, 75 de Sacarosa, 25 de Glucosa, 2,5 de KCl, 1,25 de NaH₂PO₄, 7 de MgCl₂ y 0,5 de CaCl₂). Se extrajo el cerebro y se hicieron cortes (250 – 300 µm) en el plano coronal usando un vibrátomo (Campden Instruments, Loughborough, RU). Durante el proceso de corte, el cerebro se mantuvo en la solución a base de sacarosa. Inmediatamente después de cortados, los cortes se guardaron a 32°C durante 40 minutos en un fluido cerebroespinal artificial con bajo contenido de calcio (ACSF con bajo contenido de Ca²⁺) que contenía (en mM): 23 de NaHCO₃, 120 de NaCl, 11 de Glucosa, 2,5 de KCl, 1,2 de NaH₂PO₄, 2,4 de MgCl₂, 1,2 de CaCl₂. Luego los cortes se guardaron en ACSF con bajo contenido de Ca²⁺ a temperatura ambiente hasta el registro.

55

60 **Electrofisiología.** Los registros se realizaron con un amplificador Axopatch-1D (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Los datos fueron filtrados a 1-2 kHz, digitalizados a 10 kHz en una interfaz Digidata 1332A (Molecular Devices), recogidos en un PC usando Clampex 9 y analizados usando Clampfit 10 (Molecular Devices).

65 Se realizaron registros con la técnica "patch-clamp" de células completas de neuronas principales del núcleo de NAc (PNs). Las células se identificaron usando videomicroscopía infrarroja de contraste de interferencia diferencial (microscopio Leica DM LFSS, Leica Microsystems, Germany; Camera Till Photonics, Alemania).

Para registrar las corrientes mediadas por AMPAR y NMDAR, se llenaron electrodos de vidrio "patch clamp" (resistencia 4-6 MOhms) con la solución a base de cesio siguiente (en mM): 125 de ácido glucónico, 125 de CsOH, 10 de HEPES, 10 de NaCl, 0,3 de EGTA, 0,05 de espermina, 10 de TEA-Cl, 2 de MgCl₂, 0,3 de CaCl₂, 4 de Na₂ATP, 0,3 de NaGTP, 0,2 de cAMP. Para registrar corrientes inhibitoras, se usó una solución similar con la excepción de (en mM): 80 de ácido glucónico, 80 de CsOH, 30 de CsCl, 20 de NaCl. La concentración de cloruro más alta favoreció una fuerza de arrastre más fuerte cuando se registró a potenciales hiperpolarizados. A través de los experimentos se evaluó una resistencia de acceso (R_a) con un pulso hiperpolarizante de 2-mV. La R_a no estaba compensada y las células fueron desechadas si R_a fue $>25M\Omega$ o cambió $>20\%$ durante el experimento. La referencia del potencial del amplificador se ajustó a cero antes de introducirlo en la célula.

Para fEPSPs, se llenaron los electrodos estimulantes y de registro extracelulares de vidrio con ACSF. Se evocaron potenciales sinápticos por medio de dos estímulos eléctricos (0,1 – 0,25 mA, 200 μ s de duración) administrados a 20 Hz cada 10 segundos. Se colocó el electrodo estimulante a una distancia $>150\ \mu$ m de la dirección dorsomedial del electrodo de registro.

Adquisición y análisis de datos. Corrientes sinápticas mediadas por AMPAR: se bloquearon receptores de GABA-A añadiendo picrotoxina 50 μ M al medio de superfusión. La contribución de NMDAR se anuló registrando potenciales hiperpolarizados. Para evocar corrientes sinápticas y mEPSC las células se sometieron a un voltaje de -70 mV y -80 mV, respectivamente. Se registraron mEPSC en presencia de TTX 0,5 μ M.

Corrientes mediadas por NMDAR: se midieron los cambios en las corrientes de retención, inducidos por NMDA, en células sometidas a un voltaje de -30 mV, para liberar NMDAR del bloque de magnesio dependiente de voltaje. Los receptores de AMPAR y GABA-A se bloquearon con DNQX 20 μ M y picrotoxina 50 μ M, respectivamente.

Corrientes mediadas por receptores de GABA-A: se registraron mIPSC en presencia de los antagonistas de AMPAR y NMDAR (DNQX 20 μ M y AP-5 50 μ M, respectivamente).

Análisis de mEPSC-mIPSC: típicamente, después de la interrupción, se dejó que las células se equilibraran durante 20 minutos y se usó para análisis el registro de mEPSC-mIPSC en los 10 minutos siguientes. Se detectaron mEPSC-mIPSC usando un molde generado de promediar varios eventos típicos (Clampfit 10, Molecular Devices). El molde se deslizó a lo largo de la traza de datos punto por punto. En cada posición, el molde se ajustó y se equilibró para calzar con los datos. Se aplicaron después umbrales de amplitud menor de 7 pA y 10 pA para mEPSC y mIPSC, respectivamente, equivalentes a 2,5SD del ruido de la línea basal. Para cada celda, se midió la cinética de mEPSC-mIPSC a partir del evento promedio usando Clampfit 10. Para estimar los tiempos de decaimiento, se ajustó una curva de dos exponenciales entre 5 y 95% de la fase de decaimiento en la corriente dada por la ecuación siguiente: $y(t) = A_1 \cdot e^{-(t/\tau_1)} + A_2 \cdot e^{-(t/\tau_2)}$, donde A es la amplitud, t es el tiempo y τ es la constante del tiempo de decaimiento. Luego se calculó la tau pesada.

Ensayos in vitro del receptor CB1 humano

El ensayo de unión para la unión ortoestérica de pregnenolona ha sido evaluado usando células de ovario de hámster chino (CHO) que expresan el receptor CB1 humano.

La unión a CB1 de pregnenolona se ha evaluado por la afinidad de pregnenolona para el sitio agonista del receptor cannabinoide CB1 expresado en células CHO, determinado en un ensayo de unión de radioligando del agonista de CB1 [³H] CP 55940. Los experimentos fueron realizados por CEREP Francia, usando los procedimientos estándar de este proveedor.

Laberinto plus elevado

El laberinto plus elevado se construyó con una plataforma central (10x10 cm) de la cual salían 4 brazos (45x10 cm) en un ángulo de 90° desde uno al otro. Dos brazos opuestos, llamados brazos cerrados, tenían un muro periférico de 50 cm de alto. Los otros dos brazos, llamados brazos abiertos, no tenían muro. El laberinto se suspendió a 66 cm del suelo de la habitación y se iluminó brillantemente (120 lux). La prueba consistía en colocar al animal en la plataforma central y registrar durante 5 min el número de entradas y el tiempo pasado en cada compartimento del laberinto. El número de entradas y el tiempo pasado en los brazos abiertos se consideran y se clasifican como comportamientos de ansiedad, mientras que el número total de entradas se clasifican como actividad locomotora.

Estudio de metabolismo in vitro

Se usó la línea de células TCHO-K1 (#CCL-61, ATCC-LGC, EE.UU.) derivada como un subclon de la línea de células parentales de CHO iniciada en una biopsia de un ovario de hámster chino adulto. Se sembraron las células CHO-K1 en placas de 24 pocillos (#353047, BD Biosciences, EE.UU.) a la concentración apropiada (25x10⁴ células/pocillo) en medio exento de antibióticos fresco, constituido por 90% de DMEM-Glutamax; (#31966-21, Life technologies, EE.UU.) y 10% de Suero Fetal de Bovino (#10270-106, Life technologies, EE.UU.).

Administración de pregnenolona en estado estacionario

Se llenaron bombas microosmóticas (Alzet Osmotic Pumps, Charles River, Francia), a una velocidad de la bomba de 0,15 µl/hr (modelo 2006), con pregnenolona disuelta en PEG300 (85%) y etanol (15%) a una concentración de 125 o 250 mg/ml (correspondientes, respectivamente, a una dosis diaria de 12 o 24 mg/kg de peso corporal) y se implantaron subcutáneamente después de anestesia ligera. Todas las bombas se cebaron remojándolas con solución salina a 37°C durante 60 h antes de la implantación.

Análisis estadístico

Se realizaron análisis estadísticos usando: análisis de una vía o de dos vías de varianza (ANOVA), Newman-Keuls, pruebas T de Student. Todos los resultados se expresaron como media ± EEM. Se realizaron pruebas estadísticas con GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE.UU.) o Statistica 5.0© (StatSoft Inc, Tulsa, OK, EE.UU.).

Resultados:

I. La activación de CB1 aumenta la síntesis y las concentraciones de pregnenolona.

Ejemplo 1: El THC aumenta las concentraciones de pregnenolona en el cerebro más que otras drogas de abuso.

En este ejemplo los inventores analizaron los efectos de la inyección de las drogas principales de abuso sobre la producción de pregnenolona en ratas Wistar machos. En todos los tejidos, la primera etapa de la síntesis del esteroide es la producción de pregnenolona que ha sido considerada durante mucho tiempo como un precursor inactivo de moléculas activas aguas abajo. Por ejemplo, en el cerebro, empezando por la pregnenolona dos cascadas paralelas permiten producir, por una parte, alopregnanolona y su estereoisómero epialopregnanolona y, por otra, testosterona y su metabolito DHT. Estos esteroides del cerebro se cuantificaron usando GC-MS, la única técnica capaz de distinguir sus diferencias estructurales sutiles. Se inyectaron las clases más importantes de drogas de abuso subcutáneamente o intraperitonealmente en dosis correspondientes al ED50 para la mayoría de sus efectos conductuales no condicionados: la cocaína psicoestimulante (20 mg/kg), la morfina opioide (2 mg/kg), la nicotina (0,4 mg/kg), el alcohol (1g/kg) y el principio activo de Cannabis sativa Δ9 tetrahidrocannabinol (THC) (3 mg/kg). Se analizaron las concentraciones de neuroesteroides 15, 30 y 120 min después de la inyección en varias estructuras del cerebro ascendentes, el cerebro medio ventral, el hipotálamo, el complejo estriatal y la corteza frontal.

Se obtuvieron resultados muy similares en todas las estructuras del cerebro estudiadas (corteza frontal, complejo estriatal, accumbens, cerebro medio ventral). Como se muestra en el ejemplo para el complejo estriatal ventral (el núcleo accumbens) el nivel basal de esteroides (Fig.1A) varió desde aproximadamente 1 ng/g de tejido para pregnenolona y testosterona a 0,2 ng/g para epialopregnanolona. El DHT y la alopregnanolona tenían niveles intermedios alrededor de 0,4 ng/g. Todas las drogas de abuso incrementaron las concentraciones cerebrales de pregnenolona entre 15 y 30 min después de la inyección (Fig.1B). Sorprendentemente, el aumento de pregnenolona inducido por THC fue varias veces más alto que el inducido por las otras drogas de abuso: alrededor de 1500% de aumento para THC comparado con aproximadamente 200% de aumento para las otras drogas de abuso.

Ejemplo 2: El THC aumenta las concentraciones de pregnenolona en el cerebro de ratas de una manera dependiente de la dosis.

En este ejemplo los inventores caracterizaron, además, los efectos de la administración de concentraciones diferentes de THC (0,3, 0,9, 1,5, 3, 6 y 9 mg/kg) o vehículo a ratas Wistar machos en concentraciones corporales de pregnenolona medidas en el pico de los efectos de la droga que, como se muestra en el ejemplo, se observó 30 min después de la inyección. Estos experimentos demostraron que el aumento de pregnenolona observado en el cerebro era dependiente de la dosis, con un ED50 de aproximadamente 3mg/kg. El ejemplo proporciona datos obtenidos en el plasma y en varias estructuras del cerebro: corteza frontal (FCX); núcleo accumbens (ACC); complejo estriatal (STR); hipotálamo (HYP). Después de la administración de THC, la pregnenolona aumentó en todas las estructuras del cerebro estudiadas de una manera comparable. La pregnenolona también aumentó en el plasma pero este aumento fue varias veces inferior al observado en el cerebro.

Ejemplo 3: El THC aumenta las concentraciones de pregnenolona en el cerebro de ratones de manera dependiente de la dosis.

En este ejemplo los inventores caracterizaron, además, los efectos de la administración de THC sobre concentraciones de pregnenolona estudiando los efectos de THC en el ratón. Se midió la pregnenolona en el pico de los efectos de las drogas, 30 min después de la inyección. Estos experimentos demostraron que el THC indujo un aumento dependiente de la dosis de pregnenolona también en ratones. El ejemplo proporciona datos obtenidos de las varias estructuras del cerebro: corteza frontal (FCX); núcleo accumbens (ACC); complejo estriatal (STR). El THC indujo un aumento similar de la concentración de pregnenolona en todas estas estructuras del cerebro.

Ejemplo 4: Agonistas del receptor CB1 inducen un aumento de las concentraciones de pregnenolona similar al del inducido por THC.

Los efectos del THC en el cerebro están mediados por una familia de receptores acoplados a proteínas G con siete dominios transmembrana (GPCR) y principalmente por los receptores CB1 y CB2. El THC aumentó la síntesis de pregnenolona vía la activación del receptor CB1. Por ello, la inyección a grupos independientes de ratas (n=6-12 por grupo) tanto en agonistas de una mezcla sintética CB1/CB2 Win55,212 como en un agonista que tenía una afinidad más alta por el receptor CB1 que por el CB2 (HU210) indujo un aumento importante de pregnenolona. Por el contrario, un agonista con una afinidad más alta por el CB2 que por el receptor CB1 (JWH,133) tuvo efectos mucho más bajos y no importantes sobre las concentraciones de pregnenolona.

Ejemplo 5: El aumento inducido por THC de pregnenolona es suprimido por un antagonista del receptor CB1.

La dependencia de los efectos del THC sobre la activación del CB1 fue demostrada, además, por la observación de que el aumento de concentraciones de pregnenolona inducido en el núcleo accumbens de ratas Wistar por la administración de THC (3 mg/kg, i.p.) fue bloqueado por la administración de un antagonista selectivo de CB1 (AM251, 8 mg/kg, i.p.) que se inyectó 30 min antes de la inyección de THC (n=6 por grupo).

Ejemplo 6: El aumento de pregnenolona inducido por THC es suprimido en animales mutantes carentes del receptor CB1.

En este ejemplo los inventores analizaron, además, la dependencia del receptor CB1 del aumento de pregnenolona inducido por THC. Para este propósito, los inventores estudiaron los efectos del THC sobre la pregnenolona de ratones mutantes (n=6-8 por grupo) en los cuales la expresión del receptor CB1 fue eliminada constitutivamente. Los ejemplos muestran datos obtenidos en el núcleo accumbens. El aumento de pregnenolona inducido por THC fue suprimido completamente en animales mutantes en los cuales se había eliminado el receptor CB1 de todos los tipos de células o selectivamente en la población neuronal que expresa el receptor dopaminérgico D1. En este mutante el receptor CB1 está eliminado en la mayoría de las neuronas GABA del accumbens. El último experimento denota que, en el cerebro, el THC aumenta la pregnenolona actuando sobre el receptor CB1 expresado por neuronas.

Discusión:

Los datos presentados en los ejemplos anteriores convergen en soportar el descubrimiento expuesto aquí: "la activación de los receptores CB1 en mamíferos induce la síntesis de pregnenolona y el aumento de la concentración de este esteroide en el organismo". Los datos presentados en los ejemplos anteriores convergen, entonces, en proporcionar un método generalizado para aumentar las concentraciones de pregnenolona en el organismo.

La evidencia convergente presentada en los ejemplos se puede resumir como sigue: primero, la pregnenolona es aumentada en forma dependiente de la dosis por la administración de tres agonistas diferentes del receptor CB1: THC, HU210 y Win55,212. Por el contrario, la pregnenolona no fue aumentada significativamente por un agonista que tiene una afinidad más elevada por el CB2 que por el receptor CB1. El aumento de las concentraciones de pregnenolona inducido por agonistas de CB1 fue confirmado en dos especies diferentes (el ratón y la rata) y fue encontrado en el cerebro y en el plasma.

Segundo, el aumento de pregnenolona inducido por THC fue suprimido por la administración de un antagonista de CB1 y estaba eliminado en animales mutantes carentes del receptor CB1.

II. La pregnenolona ejerce una retroalimentación negativa sobre el receptor CB1 e inhibe los efectos de la activación del receptor CB1.

Ejemplo 7: El aumento de pregnenolona inducido por THC proporciona una retroalimentación negativa sobre la activación del receptor CB1.

En estos ejemplos los inventores analizaron el papel funcional del aumento de pregnenolona inducido por la activación de THC del receptor CB1. Los inventores encontraron que la pregnenolona ejerce una retroalimentación negativa sobre los efectos que están mediados por la estimulación del receptor CB1.

La activación del receptor CB1 se identifica usualmente por cuatro efectos, generalmente llamados la tetrada cannabinoide, que incluyen: 1. hipolocomoción, 2. hipotermia, 3. catalepsia (capacidad deteriorada para iniciar movimientos) y 4. analgesia. De acuerdo con ello, la inyección de THC (3, 10, 15 mg/kg) a C57Bl/6N (n=7-8 por grupo) indujo, dependiente de la dosis: i) disminución de la actividad locomotora en campo abierto; ii) disminución de la temperatura corporal; iii) aumento de la latencia para iniciar movimientos (catalepsia incrementada); y iv) un aumento del umbral nociceptivo (Fig.2A-D).

Como la dosis de THC a la cual se observa la tetrada (entre 3 y 15 mg/kg de THC) induce un fuerte aumento de concentraciones de pregnenolona, los inventores analizaron los efectos del inhibidor de la síntesis de pregnenolona aminoglutetimida (AMG, 50 mg/kg, ip) inyectado 30 min antes que el THC, se midieron secuencialmente comportamientos 30 min después de la inyección de THC. La AMG aumentó mucho todo el efecto conductual de THC

(Fig.2 A-D) y esta mejora se invirtió completamente por la inyección exógena de pregnenolona (6 mg/kg) (Fig.2 E-H), demostrando la dependencia de pregnenolona de los efectos observados de la administración de AMG. Estos datos demuestran que la secreción de pregnenolona inducida por la activación del receptor CB1 sirve a la función de inhibir con un circuito de retroalimentación negativa, los efectos que resultan de dicha activación del CB1.

Ejemplo 8: La pregnenolona inhibe la tétada endocannabinoide inducida por activación del receptor CB1 por THC.

En estos ejemplos, los inventores analizaron si la administración exógena de la pregnenolona puede inhibir también la tétada cannabinoide inducida por THC. La administración de pregnenolona (6 mg/kg) antes de THC y en ausencia de AMG disminuyó todos los comportamientos de la tétada cannabinoide inducidos por THC: actividad locomotora, temperatura corporal, catalepsia y umbral de dolor (Fig.2 E-H). Sin embargo, la administración de pregnenolona per se, en ausencia de THC, no tuvo ningún efecto sobre actividad locomotora, temperatura corporal, catalepsia y umbral de dolor (Fig.2 E-H).

Ejemplo 9: La pregnenolona inhibe el aumento de ingesta alimentaria inducida por THC.

Para proporcionar más ejemplos de la capacidad de la pregnenolona para inhibir los efectos resultantes de la activación de los receptores CB1, los inventores estudiaron después si la pregnenolona (inyectada 30 min antes que el THC) pueden inhibir también el aumento de ingesta alimentaria inducido por THC.

Se ha demostrado que el THC aumenta la ingesta alimentaria en ratas saciadas (0,5 mg/kg, n=7-8 por grupo) y en ratones privados de alimentos 24 horas (n=7-8 por grupo 1mg/kg). En ratas saciadas (Fig. 3A) la pregnenolona disminuyó, en forma dependiente de la dosis, la ingesta alimentaria inducida por THC con un efecto estadísticamente significativo a 2mg/kg. Esta dosis también suprimió el aumento de ingesta alimentaria inducido por inyección de THC en ratones (Fig. 3B). A esta dosis, la pregnenolona no modificó significativamente la ingesta alimentaria basal (Fig. 3 A, B).

Ejemplo 10: La pregnenolona inhibe el aumento de ingesta alimentaria inducido por privación de alimentos.

La activación de CB1 por endocannabinoide endógeno se ha involucrado en la regulación de ingesta alimentaria fisiológica, es decir, ingesta alimentaria no estimulada por agonistas de CB1 exógeno tales como THC. Los inventores además investigaron después si la administración de pregnenolona era capaz de modificar la ingesta alimentaria en animales privados de alimento que no recibieron THC. Los inventores encontraron que la pregnenolona disminuyó, en forma dependiente de la dosis, la ingesta alimentaria de ratones privados de alimento (Fig. 3C), aunque la primera dosis estadísticamente significativa (6 mg/kg) fue más alta que la capaz de bloquear la ingesta alimentaria inducida por THC (2 mg/kg).

Ejemplo 11: La pregnenolona inhibe el aumento de la ingesta alimentaria inducida por privación de alimentos a través de un mecanismo dependiente de CB1

Muchos sistemas fisiológicos regulan la ingesta alimentaria. Por esta razón, en este ejemplo, los inventores verificaron si la reducción de la ingesta alimentaria inducida por pregnenolona en animales privados de alimentos, que no fueron tratados con THC, era dependiente del receptor CB1. Los inventores estudiaron los efectos de un pretratamiento con el antagonista de CB1 SR141716A (0,05 mg/kg, i.p.) sobre la reducción de ingesta alimentaria inducida por pregnenolona en animales privados de alimentos. Los inventores encontraron que la inhibición inducida por pregnenolona sobre la ingesta alimentaria en animales privados de alimento era dependiente de los receptores CB1. Por ello, el antagonista de CB1 SR141716A administrado a ratones restringidos de alimentos 30 min antes de la administración de pregnenolona suprimió la reducción de ingesta alimentaria inducida por administración de pregnenolona (Fig. 3D).

Ejemplo 12: La pregnenolona inhibe la autoadministración de agonistas de CB1.

Con el fin de analizar los efectos de la administración de pregnenolona sobre el efecto de reforzamiento positivo de la activación de CB1, que está relacionado con la capacidad de THC para adicción, los inventores usaron el modelo de autoadministración intravenosa realizado de acuerdo a protocolos descritos previamente (Soria et al., 2006; Mendizabal et al., 2006). La autoadministración intravenosa se considera el mejor modelo conductual de adicción. En este modelo, los animales aprenden a producir una respuesta operativa, en nuestro caso acercar la nariz a un orificio, con el fin de obtener una infusión intravenosa de droga. Los ratones se autoadministran fácilmente el agonista de CB1 WIN 55,212 (12,5 µg/kg por inyección), mostrando una clara preferencia por el dispositivo que responde a la activación de la infusión de este compuesto (activo) en comparación con un dispositivo inactivo cuya respuesta no tiene consecuencias programadas (inactivo) (Fig.4A). La administración con un diseño de cruz latina de 2 o 4 mg/kg de pregnenolona= antes de la sesión de autoadministración redujo mucho la autoadministración de WIN55,212 (Fig. 4B). Además, la administración de pregnenolona también disminuyó la motivación para autoadministrarse WIN55,212, como se demuestra por la reducción del punto de quiebre de un esquema en razón progresiva (PR) (Fig. 4C). En este esquema, se requiere que los animales produzcan un número creciente de respuestas (relación) para obtener una infusión de droga, siendo el punto de quiebre la última relación completada y se considera una medida confiable de la

motivación para la droga. En la sesión PR el requisito de respuesta para obtener una inyección se calibró de acuerdo a la serie siguiente: 1-2-3-5-12-18-27-40-60-90-135-200-300-450-675-1000.

Ejemplo 13: La pregnenolona inhibe la pérdida de memoria inducida por la administración de THC.

En este ejemplo los inventores analizaron, además, la capacidad de la pregnenolona para inhibir los efectos de la activación de CB1. Un efecto suplementario de la activación de CB1 es la inducción del deterioro de la memoria. Este efecto está relacionado con uno de los efectos adversos del uso de cannabis: un deterioro cognitivo caracterizado por la pérdida de recuerdos recientes. La activación del receptor CB1 por THC (10 mg/kg), inyectado 10 min después de entrenamiento, deteriora mucho la retención por la memoria de una tarea de reconocimiento de objetos en ratones (Fig.6).

El pretratamiento con pregnenolona, (6 mg/kg), inyectada inmediatamente después del entrenamiento, entorpeció mucho el efecto amnésico de 10 mg/kg de THC. Sin embargo, la pregnenolona (6 mg/kg) no indujo ningún cambio en la retención por la memoria cuando se administró en ausencia de THC (Fig.6).

Ejemplo 14: La pregnenolona inhibe el aumento de la actividad dopaminérgica inducida por administración de THC.

En este ejemplo los inventores analizaron, además, la capacidad de la pregnenolona para inhibir los efectos de la activación de CB1. Se cree que el cannabis ejerce sus propiedades aditivas activando el receptor CB1 que, a su vez, aumenta la liberación del neurotransmisor dopamina en el núcleo accumbens, una región del cerebro que regula el cambio de la motivación a la acción. Los efectos de la pregnenolona sobre el aumento de la actividad dopaminérgica producido por THC (Fig.7) se estudiaron registrando dos parámetros en paralelo: 1. la liberación de dopamina en el nivel de los terminales dopaminérgicos del núcleo accumbens; y 2. La actividad eléctrica de las neuronas dopaminérgicas en el nivel de su cuerpo celular en el área tegmental ventral (VTA). La pregnenolona (2 mg/kg inyectada subcutáneamente 30 min antes del THC) mitigó mucho el aumento de la liberación de dopamina y de la actividad de las neuronas dopaminérgicas inducida por THC o se administró intravenosamente cocaína en dosis acumulativas crecientes exponencialmente (0,15 a 1,2 mg/kg). Después de cada dosis, se registró la activación neuronal de DA durante 1 minuto antes de la administración siguiente. (Fig.7).

Ejemplo 15: La pregnenolona inhibe el aumento de la actividad dopaminérgica inducida por la administración de cocaína.

En este ejemplo los inventores analizaron, además, la capacidad de la pregnenolona para inhibir la activación del sistema dopaminérgico. En el ejemplo anterior, la pregnenolona fue capaz de antagonizar la hiperactividad del sistema dopaminérgico inducida por THC. En el ejemplo presente (Fig.8) se demuestra que la pregnenolona (2 mg/kg inyectada subcutáneamente, 30 min antes que la cocaína) también es capaz de antagonizar el aumento de actividad del sistema dopaminérgico inducida por psicoestimulantes tales como cocaína. La cocaína se administró intravenosamente en dosis acumulativas crecientes exponencialmente (0,0125 a 0,8 mg/kg). Después de cada dosis, se registró la activación de descarga neuronal de DA durante 1 minuto antes de la siguiente administración. Estos resultados son importantes para la esquizofrenia porque el aumento de la actividad dopaminérgica inducido por psicoestimulantes se considera uno de los modelos experimentales de la sicosis. Por lo tanto, al aumento de dopamina inducido por psicoestimulantes se atribuye el desarrollo de psicosis aguda que puede ocurrir después del uso de estas drogas en humanos.

Ejemplo 16: La pregnenolona inhibe la ganancia de peso corporal y la acumulación de grasa en animales sometidos a una dieta rica en grasa.

En este ejemplo los inventores analizaron la capacidad de la pregnenolona para inhibir los efectos de la activación de CB1 en el contexto de la obesidad. Los efectos de la pregnenolona sobre trastornos metabólicos se estudiaron usando el modelo de obesidad inducida por la dieta (DIO, del inglés diet induced obesity) en ratones. En este procedimiento, se mantuvieron los animales con una dieta rica en grasa (60% de grasa) que induce progresivamente obesidad. Después de ocho semanas con esta dieta que ya indujo sobrepeso y acumulación excesiva de grasa en estos animales, se comenzó el tratamiento con pregnenolona durante treinta días (una vez al día con 2 mg/kg o 5 mg/kg, n=8). La pregnenolona disminuyó el peso corporal con un efecto retardado que apareció después de 15 días de tratamiento (Fig. 9A) pero no modificó la ingesta alimentaria (Fig. 9B).

Como consecuencia, los efectos de la pregnenolona sobre el peso corporal parecieron no ser debidos a un efecto metabólico primario y tampoco a un efecto conductual sobre la ingesta alimentaria. Esto se confirmó por un análisis de la composición del cuerpo realizado con resonancia magnética que reveló que, bajo el tratamiento con pregnenolona, hubo un efecto diferente sobre la masa grasa y magra en los animales (Fig.10). En animales de control, durante la dieta rica en grasa el porcentaje de masa grasa aumentó progresivamente mientras que la masa magra disminuyó. Cuando los animales fueron tratados con la dosis más alta de pregnenolona (5 mg/kg), el aumento de la masa grasa desapareció, mientras que la disminución de la masa magra se mitigó.

La falta de efecto sobre la ingesta alimentaria de la pregnenolona en el modelo DIO parece en contradicción con el

observado usando el modelo ayuno/realimentación en el cual la pregnenolona disminuyó la ingesta alimentaria (Fig. 3). Esto pudo ser debido a la condición de la alimentación, una dieta rica en grasa en el modelo DIO versus alimento estándar en el modelo ayuno/realimentación o a un potencial efecto específico de la pregnenolona sobre el despliegue de alimentación que se induce en animales en ayuno durante la primera hora de la reexposición a alimentos. Por esta razón, en el modelo ayuno/realimentación, la ingesta alimentaria se evalúa en forma clásica durante una hora, mientras que, en el modelo DIO, la ingesta alimentaria se evalúa durante más de 24 horas. En un experimento posterior, los efectos de la pregnenolona se estudiaron más de 24 horas también en el modelo ayuno/realimentación. Los resultados obtenidos confirmaron los efectos de la pregnenolona durante la primera hora de realimentación pero no se vio ningún efecto importante en más de 24 horas. Estos datos denotan un efecto específico de la pregnenolona sobre el despliegue de ingestión de comida inducido por el ayuno que activa mucho el sistema endocannabinoide y el receptor CB1.

Esta falta de efectos de la pregnenolona sobre la ingesta alimentaria en 24 horas es bastante diferente de la acción conocida con referencia al antagonista del receptor ortoestérico CB1 de referencia rimonabant que se ha demostrado anteriormente que reduce mucho la ingesta alimentaria durante más de 24 horas. De forma similar, durante una dieta rica en grasa, también se ha demostrado que el rimonabant reduce la ingesta alimentaria durante la primera semana de tratamiento, mientras que la pregnenolona no lo hizo (fig. 9A).

Ejemplo 17: La pregnenolona inhibe el aumento de TNF-alfa inducido por LPS.

En este ejemplo los inventores analizaron, además, la capacidad de la pregnenolona para inhibir los efectos de la activación de CB1 en el contexto de inflamación y fibrosis. La activación del receptor CB1 está involucrada en procesos inflamatorios y fibróticos como está demostrado, pero el hecho de que la inhibición por antagonistas ortoestéricos tales como el rimonabant disminuye el aumento de TNF-alfa inducido por estímulos proinflamatorios tales como LPS. El TNF-alfa es una de las respuestas celulares a estímulos inflamatorios más involucrados en promover la fibrosis. La administración de pregnenolona (6 mg/kg, subcutáneamente) a ratones, 30 min antes de la administración de LPS, produjo la mitad del aumento de TNF-alfa medido 90 min después de la administración de LPS (Fig.11).

Ejemplo 18: La pregnenolona inhibe los efectos de la activación de CB1 sobre la transmisión sináptica.

En este ejemplo los inventores analizaron, además, la capacidad de la pregnenolona para inhibir los efectos de la activación de CB1 en el contexto de la transmisión sináptica. Está ampliamente documentado que la activación de receptores CB1 suprime la transmisión sináptica inhibiendo la liberación de neurotransmisores. Esto se ha observado en muchas regiones del cerebro, en sinapsis tanto excitadoras como inhibitorias. Evaluamos si la pregnenolona altera la capacidad de la THC para inhibir la transmisión sináptica excitadora en el núcleo accumbens (NAc). Se realizaron registros de "patch clamp" en células completas en NAc adulto y se indujeron EPSC mediados por AMPAR mediante la estimulación eléctrica de axones locales. La perfusión en baño de THC disminuyó, en forma confiable, la amplitud de EPSC en cortes control ($34,3 \pm 3,7$ % de inhibición). El efecto de THC se atenuó significativamente cuando los cortes se pretrataron con pregnenolona 100 nM ($15,1 \pm 1,8$ % de inhibición, $p < 0,001$) (Figura 12).

Con el fin de probar el efecto de la pregnenolona sobre un rango más amplio de concentraciones de THC, registramos fEPSP en cortes de NAc. Debido a la posibilidad de lograr medidas de fEPSP estables durante varias horas, esta técnica se adapta idealmente para realizar curvas de dosis-respuesta y se ha usado anteriormente para abordar la función del receptor CB1 (Robbe et al., 2001; Mato et al., 2004). Por ello, registramos fEPSP evocado mediado por AMPAR estimulando eléctricamente axones locales. La perfusión en baño de THC para cortes control inhibió los fEPSP de una manera dependiente de la dosis (10 μ M: $23,9 \pm 6,0$ %; 20 μ M: $35,3 \pm 4,7$ %; 40 μ M: $48,6 \pm 3,6$ %). Inversamente, el THC indujo inhibición menor de la transmisión sináptica en cortes preincubados con pregnenolona 100 nM (10 μ M: $11,1 \pm 3,2$ %; 20 μ M: $22,7 \pm 2,7$ %; 40 μ M: $34,6 \pm 3,1$ %; factor neuroesteroide por ANOVA de dos vías $p = 0,001$) (Figura 13).

En conjunto, estos datos demuestran que el neuroesteroide pregnenolona debilita la capacidad del THC para activar una modulación dependiente de receptores CB1 en la transmisión sináptica excitadora.

Discusión:

Los datos presentados en los ejemplos anteriores convergen en demostrar el descubrimiento expuesto aquí: "el aumento de concentraciones de pregnenolona inducido en el organismo por la activación del CB1 proporciona una retroalimentación negativa endógena sobre la actividad del receptor CB1. Esta retroalimentación negativa se materializa por el hecho de que la pregnenolona producida endógenamente o administrada exógenamente antagoniza los efectos de la activación de CB1".

Los datos presentados en los ejemplos anteriores convergen, entonces, en proporcionar un método general para inhibir los efectos de la activación del receptor CB1 por la administración de pregnenolona.

Estas evidencias convergentes se pueden resumir como sigue:

Primero, la acción inhibitoria de la pregnenolona sobre los efectos mediados por CB1 fue de importancia fisiológica, ya que el aumento endógeno de pregnenolona inducido por activación de CB1 proporcionó una retroalimentación negativa endógena que hizo la función de disminuir el efecto de la activación del CB1. Por ello, cuando se bloqueó la producción de pregnenolona inducida por activación de CB1, los efectos conductuales de THC fueron

aumentados. Segundo, la administración exógena de pregnenolona fue capaz de inhibir un gran número de efectos inducidos por la activación de receptores CB1: 1. Hipolocomoción; 2. catalepsia; 3. hipotermia; 4. analgesia; 5. ingesta alimentaria en el modelo de ayuno-realimentación; 7. ingesta alimentaria inducida por THC; 6. autoadministración intravenosa de agonistas de CB1; 7. pérdida de memoria inducida por THC; 8. activación del sistema dopaminérgico por THC o cocaína; 9. acumulación de grasa y ganancia de peso corporal en un modelo de obesidad; 9. la producción de TNF-alfa; 10. La inhibición en transmisión sináptica inducida por THC.

Tercero, la acción inhibitoria de pregnenolona sobre efectos mediados por CB1 se encontró en dos especies diferentes: la rata y el ratón.

Los efectos convergentes sobre estos parámetros múltiples, demostrados aquí por los inventores, son únicos y no predecibles en base al conocimiento previo de los efectos de otros esteroides conocidos que, totalmente en lo opuesto, se predice que aumentan y no disminuyen los efectos de la activación del receptor CB1. Por ejemplo, se ha descrito que muchos esteroides, tales como pregnenolona, alopregnanolona y sus derivados facilitan la activación del receptor GABA. Estos esteroides deben aumentar, entonces, los efectos de la activación del CB1 ya que se ha demostrado que compuestos que potencian la actividad del receptor GABA aumentan los efectos de la activación del CB1 por THC (Bellocchio L et al., Nature Neurosci 2010, 13:281-3; Pertwee RG y Wickens AP. Neuropharmacology. 1991, 30:237-44 ; Pertwee RG, et al., Neuropharmacology. 1988 27:1265-70). De forma similar, en base al conocimiento corriente, también se ha predicho que la progesterona y compuestos progestínicos, otros esteroides sexuales y glucocorticoides aumentan los efectos de la activación de CB1 (Anaraki DK et al., Europ. J. Pharmacol, 2008, 586, 186-196; Rodríguez de Fonseca F, et al., Life Sci. 1993, 54: 159-170; Becker JB, Rudick CN. Pharmacol Biochem Behav. 1999, 64:53-7; Piazza PV y Le Moal M Cerebro Res Rev 1997, 25:359-72).

III. La pregnenolona es un inhibidor del receptor CB1 con menos efectos secundarios y menos acciones no específicas que antagonistas ortoestéricos del CB1 y otros esteroides neuroactivos.

Ejemplo 19: La pregnenolona no modifica la unión ortoestérica al receptor CB1.

Los ejemplos anteriores denotan que la pregnenolona es capaz de inhibir todos los efectos estudiados de la activación del CB1. En base a estas observaciones, en este ejemplo los inventores estudiaron las interacciones potenciales entre la pregnenolona y el receptor CB1. Los inventores analizaron si la pregnenolona puede actuar como un antagonista ortoestérico del CB1. Este no fue el caso ya que la pregnenolona no desplazó la unión ortoestérica del agonista del CB1 [3H] CP55,940 al receptor CB1 presente en la membrana plasmática de la célula CHO (Fig.14). Aunque la pregnenolona no actúa como un antagonista ortoestérico, evidencia preliminar producida por los inventores denota que puede actuar como un inhibidor aloestérico.

Ejemplo 20: La pregnenolona no induce comportamientos de tipo ansiedad.

Uno de los efectos secundarios importantes de los antagonistas ortoestéricos del CB1 es la inducción de un efecto conductual colateral y, en particular, un estado ansiodepresivo. Estos efectos se han juzgado bastante serios por las autoridades reguladoras como para suprimir la aprobación del mercado del primer antagonista ortoestérico CB1 rimonabant. Para verificar el perfil de seguridad diferente de la pregnenolona, se han comparado sus efectos con los del ortoestérico antagonista/agonista inverso del CB1 rimonabant (ambas drogas administradas subcutáneamente) usando un modelo animal de ansiedad, el laberinto plus elevado. Se ha elegido esta prueba porque un aumento de la ansiedad fue el principal efecto secundario no deseado de este compuesto en humanos. A los ratones se les inyectaron subcutáneamente pregnenolona (1, 6, 10 mg/kg), rimonabant (10 mg/kg) o vehículo (al menos n=7 por grupo) 30 min después de haberlos colocado en la plataforma central del laberinto plus y se registró durante 5 min el tiempo pasado y el número de entradas en los brazos abiertos y cerrados. Este estudio (Fig.15) confirmó los efectos ansiogénicos del rimonabant como se demostró por la disminución del número de entradas y del tiempo pasado en el brazo abierto del laberinto plus. Por el contrario, la pregnenolona no indujo ningún aumento de ansiedad (Fig.15).

Ejemplo 21: La pregnenolona no modifica la actividad de receptores GABA-A.

En este ejemplo, los inventores probaron la especificidad de los efectos de la pregnenolona sobre otros receptores de neurotransmisores y, en particular, los receptores de GABA-A. Por lo tanto, otros esteroides activos tales como alopregnanolona y pregnanolona tienen efectos conductuales profundos que facilitan la activación de los receptores de GABA.

Con el fin de evaluar el efecto de la pregnenolona sobre la función del GABA post-sináptico, registramos mIPSC y comparamos su amplitud y tiempo de decaimiento entre grupos. Observamos que la amplitud y el tiempo de decaimiento de mIPSC fueron similares entre controles (amplitud: $17,9 \pm 0,8$ pA; tiempo de decaimiento: $11,1 \pm 0,3$ ms) y cortes pretratados con pregnenolona (100 nM y 1 μ M, respectivamente; amplitud: $17,3 \pm 0,4$ pA, $15,9 \pm 0,4$ pA;

tiempo de decaimiento: $10,2 \pm 0,4$ ms, $10,8 \pm 0,5$ ms). Como opuesto a la falta de efecto de la pregnenolona, el neuroesteroide alopregnanolona, conocido por ser un modulador de receptores GABA-A, modificó significativamente las propiedades del mIPSC (100 nM y 1 μ M, respectivamente; amplitud: $15,9 \pm 0,5$ pA, $20,2 \pm 1,2$ pA, $p < 0,001$; tiempo de decaimiento: $13,6 \pm 0,7$ ms, $22,7 \pm 2,3$ ms, $p < 0,0001$) (Figura 16).

En conclusión, estos datos sugieren que las corrientes sinápticas mediadas por GABA-A no están moduladas por el neuroesteroide pregnenolona. Estos datos confirman, entonces, como se ha demostrado previamente (Patente US 5.232.917), que la posición beta de C3 en la pregnenolona suprime el efecto sobre el receptor GABA. Los inventores descubrieron aquí que la posición beta de C3 confiere, en cambio, la propiedad de inhibir la activación del receptor CB1.

Ejemplo 22: La pregnenolona no modifica la actividad de los receptores de glutamato.

En este ejemplo los inventores probaron la especificidad de los efectos de la pregnenolona sobre otros receptores del neurotransmisor y, en particular, los receptores NMDA y AMPA. Por lo tanto, se supone que otros esteroides activos, tales como el DHEA y el sulfato de DHEA, inducen el efecto conductual modificando la actividad de los receptores de glutamato.

Para evaluar el efecto de la pregnenolona sobre corrientes de receptores de AMPA, decidimos registrar los potenciales de acción mEPSC independientes. En este caso, corrientes sinápticas surgen de la liberación de cuantos hipotéticos y, asumiendo que los neuroesteroides no cambian el contenido de vesículas sinápticas, la amplitud y la cinética del mEPSC registrado depende de la función de los receptores post-sinápticos.

Hemos encontrado que la pregnenolona no modificó la función de AMPAR en el NAc adulto (Figura 17A). Así, el mEPSC mediado por AMPAR de controles y de cortes tratados con pregnenolona (100 nM) mostró amplitudes similares (controles: $14,4 \pm 0,8$ pA, pregnenolona: $15,7 \pm 0,7$ pA, $p = 0,25$) y tiempos de decaimiento (controles: $4,76 \pm 0,08$ ms, pregnenolona: $4,62 \pm 0,06$ ms, $p = 0,21$).

Para cuantificar corrientes mediadas por receptores de NMDA usamos una estrategia diferente. Debido a su baja cinética y dependencia del voltaje, el aislamiento de mEPSC mediado por NMDAR no es confiable como para corrientes mediadas por AMPAR. Por lo tanto, decidimos registrar las corrientes celulares completas en respuesta a NMDA aplicado exógenamente. En NAc PN el voltaje fijado a -30 mV, perfusión en baño en NMDA 25 μ M durante 1 minuto indujo una corriente interior de magnitud similar en cortes control ($115 \pm 15,5$ pA) y en cortes pretratados con pregnenolona (100 nM: $107 \pm 9,6$ pA; 1 μ M: $108,9 \pm 12,5$ pA; $p = 0,91$) (La Figura 17 B).

En conjunto, estos experimentos demuestran que la pregnenolona no afecta la función de los principales receptores glutamatérgicos ionotrópicos post-sinápticos en el roedor adulto NAc. Estos datos también denotan que la sustitución de la cetona en posición 17 del anillo esteroide por una etanona (metilcetona) suprime la actividad sobre los receptores NMDA y AMPA y confiere la propiedad de inhibir la activación del receptor CB1.

Discusión:

Los datos presentados en los ejemplos anteriores convergen en demostrar el descubrimiento descrito aquí: "la pregnenolona actúa como un inhibidor del receptor CB1 humano con un perfil farmacológico diferente del de los antagonistas ortoestéricos y de otros esteroides neuroactivos que denotan que la pregnenolona tendrá efectos menos inespecíficos y no deseables que los antagonistas ortoestéricos del CB1 y otros esteroides neuroactivos".

Los datos presentados en los ejemplos anteriores convergen, entonces, en proporcionar un método general para inducir una inhibición de la actividad del receptor CB1 por la administración de pregnenolona. En consecuencia, los datos presentados en los ejemplos anteriores convergen en proporcionar un método general para tratar o aliviar todas las patologías que están relacionadas con la activación del receptor CB1 y/o patologías que pueden beneficiarse de la inhibición de los receptores CB1 por administración de pregnenolona sin potenciales efectos secundarios de los antagonistas ortoestéricos del CB1 y otros esteroides activos incluyendo, entre otros, DHEA, alopregnanolona y pregnanolona. Estas evidencias convergentes se pueden resumir como sigue:

Primero, la pregnenolona no modifica la unión de un agonista ortoestérico, mientras que inhibe los efectos resultantes de la activación del receptor CB1. Este perfil puede corresponder al de un inhibidor aloestérico.

Segundo, la pregnenolona, a diferencia de un antagonista ortoestérico, no induce ansiedad (ejemplo 20) ni reduce la ingesta alimentaria en un modelo de obesidad, aunque reduce la acumulación de grasa (ejemplo 18). Los efectos metabólicos puros de la pregnenolona, sin una modificación de la ingesta alimentaria, también predicen menos efectos secundarios para la pregnenolona. El estudio de los efectos de antagonistas ortoestéricos del CB1, tales como el rimonabant, sobre el peso corporal y el metabolismo, ha demostrado que estos compuestos actúan sobre el metabolismo con una doble acción, la primera debida a la pérdida de peso que resulta de una disminución de la ingesta alimentaria (aproximadamente 50% de los efectos) y, la segunda, de un efecto metabólico directo. Los efectos secundarios de antagonistas del receptor ortoestérico CB1 y, en particular, el aumento de la depresión, probablemente involucran sus efectos conductuales sobre la ingesta alimentaria. Así, es bien conocido que, en la

población obesa, todas las manipulaciones farmacológicas, quirúrgicas o de tratamiento conductual, que reducen la ingesta alimentaria, también inducen, en hasta 5% de los sujetos, serias alteraciones conductuales y, en particular, depresión.

Finalmente, la pregnenolona, a diferencia de otros esteroides neuroactivos, está desprovista de efectos sobre los receptores de GABA y glutamato. Esto es importante en la predicción de que la pregnenolona no tendrá los efectos secundarios de algunos de estos esteroides que pueden inducir modificaciones importantes de la vigilia que inducen sedación, deterioro del funcionamiento de la memoria y comportamiento motor.

IV. Los derivados de pregnenolona para los cuales la transformación en otros esteroides activos derivados de pregnenolona está limitada actúan como inhibidores de los efectos de activación del receptor CB1.

Ejemplo 23: Derivados de pregnenolonas para los cuales la transformación en esteroides activos aguas abajo está limitada no producen alopregnanolona ni epi-alopregnanolona in vivo.

Como ejemplos del compuesto descrito en la fórmula general A, los inventores probaron aquí tres compuestos que se pueden obtener por:

1. La sustitución del grupo OH en el C3 por un átomo de flúor, que generó el compuesto denominado 3-fluoropregnenolona (CP1).

2. La cuaternización en C17 con un grupo metilo, que generó el compuesto denominado 17-metilpregnenolona (CP2).

3. La sustitución del grupo OH en C3 por un átomo de flúor y la cuaternización en C17 con un grupo metilo, que generó el compuesto denominado 3-fluoro-17-metilpregnenolona (CP3).

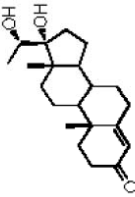
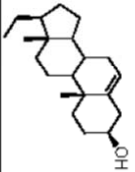
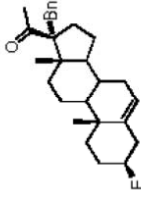
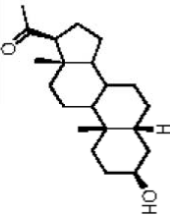
Ninguno de los derivados de pregnenolona modificada (compuestos: CP1, CP2, CP3), inyectado en dosis altas (50 mg/kg, n=6-7 por grupo) a ratas wistar, indujo la producción de alopregnanolona y epialopregnanolona (Fig. 18), mientras que la alopregnanolona y la epialopregnanolona aumentaron después de la inyección de pregnenolona (50 mg/kg) (Fig. 18). Las concentraciones de alopregnanolona y epialopregnanolona se midieron en núcleo accumbens del animal individual por CG/EM 30 min después de las inyecciones.

Ejemplo 24: Derivados de pregnenolonas para los cuales la transformación en esteroides activos aguas abajo in vitro está limitada.

En este ejemplo los inventores analizaron, además, el metabolismo de derivados de pregnenolona usando una prueba in vitro en células CHO. Estas células derivadas del ovario tienen todas las enzimas necesarias para metabolizar la pregnenolona en esteroides aguas abajo. En particular, la administración de pregnenolona (1µM) a estas células durante 48 horas produjo un aumento importante de alopregnanolona, epialopregnanolona y un aumento mucho más pequeño de THDOC en el medio de cultivo (Tabla 1A). Se probaron en total 55 compuestos más la pregnenolona; de estos compuestos solo 25 tuvieron un metabolismo ausente o significativamente reducido en esteroides activos aguas abajo (Tabla 1B-D, Tabla 2A,B). Los compuestos restantes fueron más o menos metabolizados en uno o varios de los esteroides aguas abajo de pregnenolona, tales como alopregnanolona, epialopregnanolona, THDOC, testosterona y DHEA.

Tabla 1. Derivados de pregnenolona con metabolismo reducido en células CHO. Se expresan los resultados como porcentaje de cambios de células CHO tratadas con pregnenolona (tabla 2 A) o como pg/ml (0 = concentraciones por debajo del límite de detección). ALO = alopregnanolona, EPIALO = epialopregnanolona, PREG = pregnenolona, TESTO = testosterona.

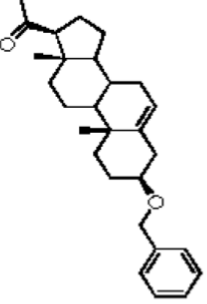
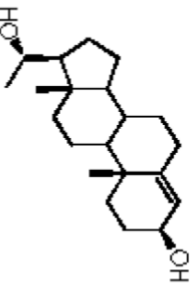
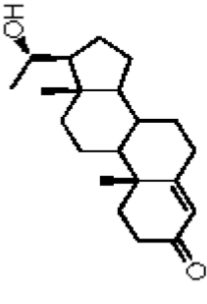
Tabla 1 A: metabolismo de pregnenolona			Cambios de células tratadas con pregnenolona (%)					
Cultivos celulares de control	Células tratadas con pregnenolona (1 µM)	Niveles de esteroide pg/ml	ALO	EPIALO	THDOC	PREG	DHEA	TESTO
			0,00	0,00	27,96	96,92	0,00	0,00
			3529,99	16963,84	77,47	11440,66	0,00	0,00

Tabla 1 B: metabolismo no detectable			Cambios de células tratadas con pregnenolona (%)					
Nº de comp.	Nombre	Estructura	ALO	EPIALO	THDOC	PREG	DHEA	TESTO
14	4-pregnen-17α,20α-diol-3-ona		-100,00	-100,00	-100,00	-100,00	0,00	0,00
24	20-desoxi-pregnenolona		-100,00	-100,00	-100,00	-100,00	0,00	0,00
74	17α-bencil-3β-fluoropregnanolona		-100,00	-100,00	-100,00	-100,00	0,00	0,00
77	5β-pregnan-3β-ol-20-ona (Epipregnanolona)		-100,00	-100,00	-100,00	-100,00	0,00	0,00

(continuación)

Tabla 1 C: reducción de Alo y Epialo >99%		Cambios de células tratadas con pregnenolona (%)					pg/ml	
Nº de comp.	Nombre	Estructura	ALO	EPIALO	THDOC	PREG	DHEA	TESTO
40	17 α -metil-progesterona		-99,70	-99,83	-100,00	-100,00	0,00	0,00
42	3 β -benciloxi-17 α -metil-pregnenolona		-99,87	-99,94	-94,10	-100,00	0,00	0,00
69	17 α -alil-3 β -metoxi-pregnenolona		-99,59	-100,00	-100,00	-100,00	0,00	0,00
73	17 α -bencil-progesterona		-99,28	-99,93	-100,00	-100,00	0,00	0,00
67	20-metilamino-5-pregnen-3 β -ol		-99,20	-99,79	-100,00	-99,79	0,00	0,00

(continuación)

Tabla 1 D: reducción de Alo y Epialo >97%		Cambios de células tratadas con pregnenolona (%)					pg/ml	
Nº de comp.	Nombre	Estructura	ALO	EPI/ALO	THDOC	PREG	DHEA	TESTO
41	3 β -benciloxi-pregnenolona		-98,82	-99,88	-100,00	-99,35	0,00	0,00
12	4-pregnen-3 β ,20 α -diol		-98,64	-97,17	-100,00	-98,80	0,00	0,00
18	4-pregnen-20 α -ol-3-ona		-98,16	-96,80	-100,00	-100,00	0,00	0,00

(continuación)

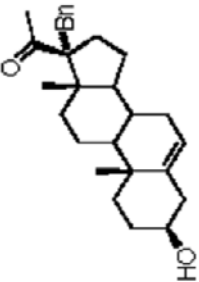
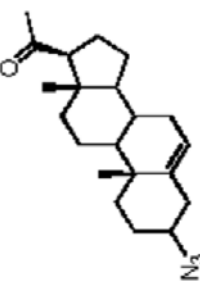
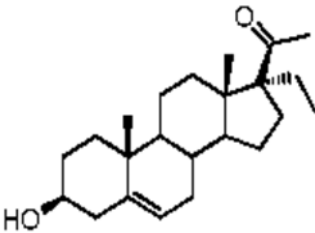
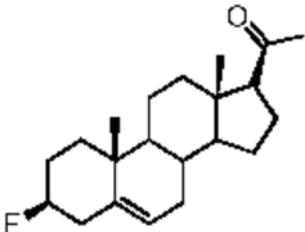
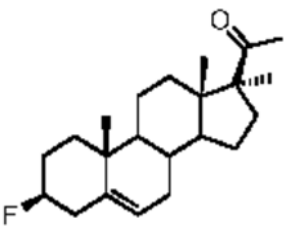
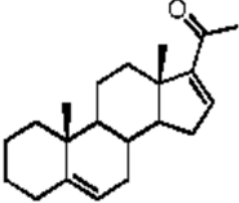
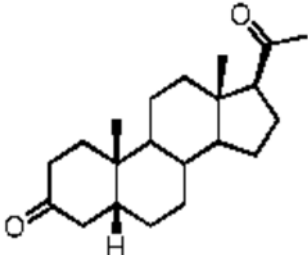
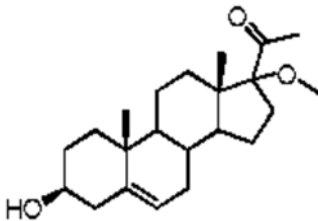
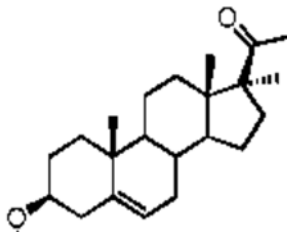
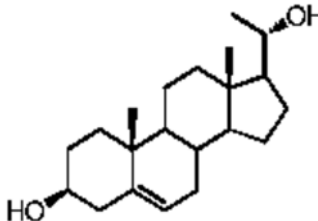
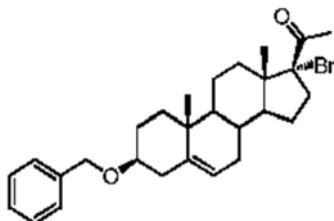
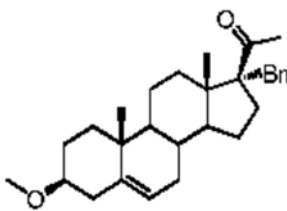
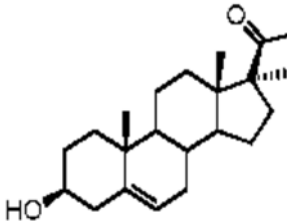
Tabla 1 D: reducción de Alo y Epialo >97%			Cambios de células tratadas con pregnenolona (%)					pg/ml	
Nº de comp.	Nombre	Estructura	ALO	EPIALO	THDOC	PREG	DHEA	TESTO	
65	17 α -bencil-pregnenolona		-97,26	-99,72	-100,00	-100,00	0,00	0,00	
72	3-azido-pregnenolona		-97,76	-99,58	-100,00	-100,00	0,00	0,00	

Tabla 2. Derivados de pregnenolona con metabolismo reducido en células CHO. Se expresan los resultados como porcentaje de cambios de células CHO tratadas con pregnenolona (tabla 2 A) o como pg/ml (0 = concentraciones por debajo del límite de detección). ALO = alopregnanolona, EPIALO = epialopregnanolona, PREG = pregnenolona, TESTO = testosterona.

5

Tabla 2 A: reducción de Alo y Epialo >97% y/o reducción de THDOC >29%			Cambios de células tratadas con pregnenolona (%)				pg/ml	
Nº de comp.	Nombre	Estructura	ALO	EPIALO	THDOC	PREG	DHEA	TESTO
32	17 α -etil-pregnenolona		-97,54	-98,72	-88,33	-100,00	0,00	0,00
1	3 β -fluoro-pregnenolona		-99,38	-99,93	-81,87	-100,00	0,00	0,00
3	3 β -fluoro-17 α -metil-pregnenolona		-99,56	-100,00	-71,63	-100,00	0,00	0,00
39	5,16-pregnadien-20-ona		-100,00	-100,00	-29,14	-100,00	0,00	0,00
Tabla 2 B: reducción de Alo y Epialo >96% y/sin reducción de THDOC			Cambios de células tratadas con pregnenolona (%)				pg/ml	
Nº de comp.	Nombre	Estructura	ALO	EPIALO	THDOC	PREG	DHEA	TESTO
60	5 β -pregnan-3,20-diona		-100,00	-100,00	78,80	-99,72	0,00	0,00

(continuación)

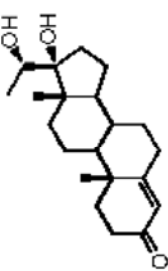
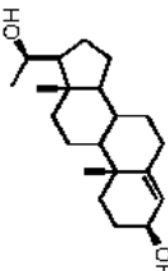
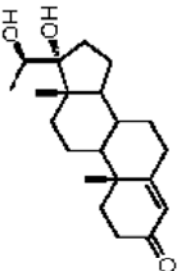
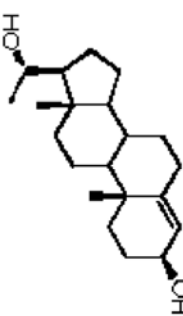
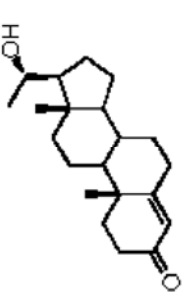
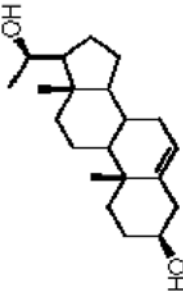
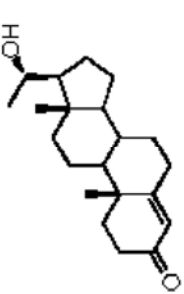
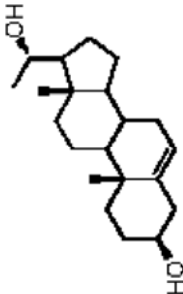
Tabla 2 B: reducción de Alo y Epialo >96% y/sin reducción de THDOC			Cambios de células tratadas con pregnenolona (%)				pg/ml	
Nº de comp.	Nombre	Estructura	ALO	EPIALO	THDOC	PREG	DHEA	TESTO
36	17-metoxi-pregnenolona		-100,00	-100,00	86,37	-100,00	0,00	0,00
35	3β-metoxi-17α-metil-pregnenolona		-99,98	-99,96	14,83	-100,00	0,00	0,00
20	5-pregnen-3β,20α-diol		-97,11	-96,41	35,54	-97,11	0,00	0,00
63	17α-bencil-3β-benciloxi-pregnenolona		-99,01	-99,84	46,63	-99,87	0,00	0,00
70	17α-bencil-3β-metoxi-pregnenolona		-99,75	-100,00	12,76	-99,76	0,00	0,00
2	17α-metil-pregnenolona		-99,26	-98,89	34,17	-95,70	0,00	0,00

Como se puede ver en la Tabla 3, el conocimiento corriente sobre el metabolismo de esteroides no permite predecir completamente qué modificaciones de la pregnenolona reducen notablemente el metabolismo ni cuáles no lo reducen. Por ejemplo, un grupo alfa-hidroxilo en C20 redujo el metabolismo, mientras que un grupo beta-hidroxilo en C20 no lo redujo. De forma similar, compuestos con un hidrógeno beta en C5 tenían un metabolismo reducido, mientras que compuestos con C5 alfa fueron muy metabolizados. También grupos selectivos en C3 y C17 o alguna combinación específica bloquearon el metabolismo.

Tabla 3. Comparación de las modificaciones de los derivados de pregnenolona que redujeron o mantuvieron un metabolismo significativo en los esteroides activos posteriores.

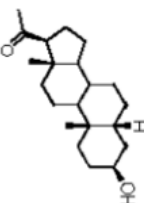
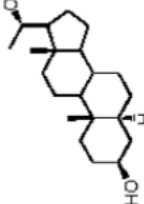
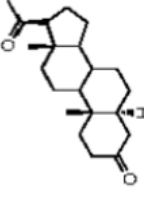
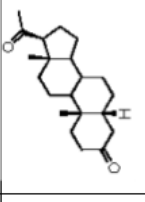
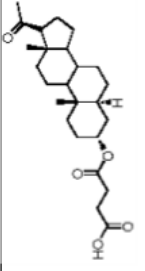
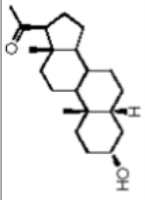
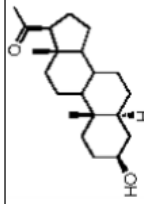
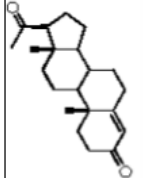
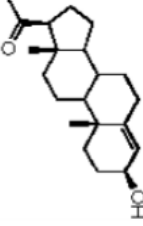
Tabla 3 A Modificaciones en posición C3									
Metabolismo reducido			Metabolizado						
Nº	Nombre	Estructura	Nº	Nombre	Estructura	Nº	Nombre	Estructura	
41	3 β -benciloxi-pregne-nolona		33	3 β -metoxi-pregne-nolona		25	Hemisuccinato de pregne-nolona		
72	3-azido-pregne-nolona		66	3 β -amino-pregne-nolona		37	3-deshidroxi-pregne-nolona		
1	3 β -fluoro-pregne-nolona		34	3 β -etoxi-pregne-nolona		53	Sulfato de pregnenolona sódico		
			55	3 β -acetoxi-pregne-nolona					

(continuación)
 Tabla 3 B Modificaciones en posición C20 alfa o beta

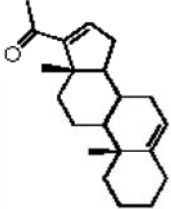
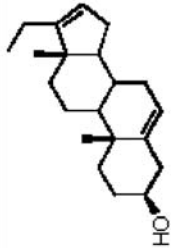
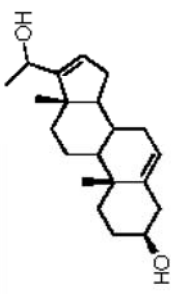
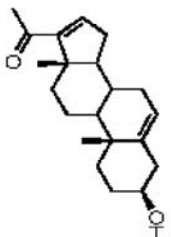
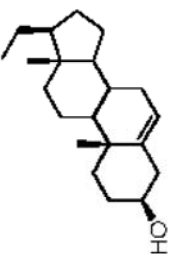
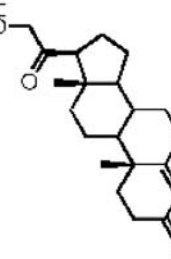
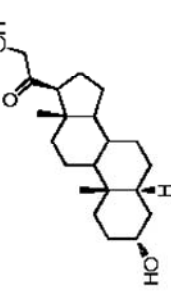
Tabla 3 B Modificaciones en posición C20 alfa o beta									
Metabolismo reducido				Metabolizado					
Nº	Nombre	Estructura	Nº	Nombre	Estructura	Nº	Nombre	Estructura	
14	4-pregnen-17 α ,20 α -diol-3-ona		13	4-pregnen-3 β ,20 β -diol		15	4-pregnen-17 α ,20 β -diol-3-ona		
12	4-pregnen-3 β ,20 α -diol		19	4-pregnen-20 β -ol-3-ona		21	5-pregnen-3 β ,20 β -diol		
18	4-pregnen-20 α -ol-3ona		20	5-pregnen-3 β ,20 α -diol					

(continuación)

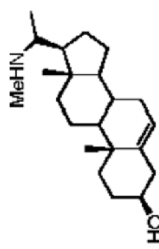
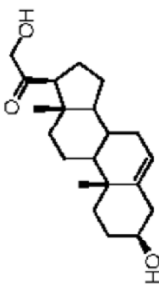
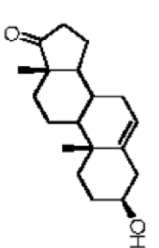
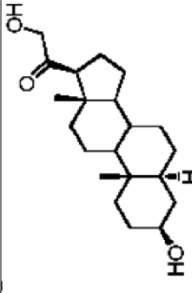
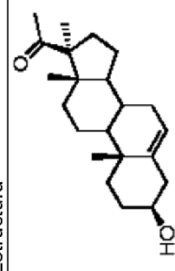
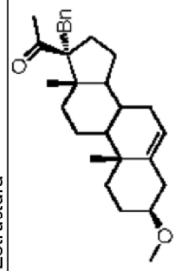
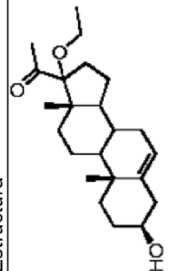
Tabla 3 C Modificaciones en posición C5

Metabolismo reducido			Metabolizado					
Nº	Nombre	Estructura	Nº	Nombre	Estructura	Nº	Nombre	Estructura
77	5β-pregnan-3β-ol-20-ona (Epi-pregnanolona)		8	5α-pregnan-3β,20α-diol		29	5α-pregnan-3,20-diona	
60	5β-pregnan-3,20-diona		10	Hemisuccinato de 5α-pregnan-3α-ol-20-ona (Hemisuccinato de alopregnanolona)		46	5α-pregnan-3α-ol-20-ona (Alopregnanolona)	
			11	5α-pregnan-3β-ol-20-ona (Epialo-pregnanolona)		47	Proges-terona	
			17	4-pregnen-3β-ol-20-ona				

(continuación)

Tabla 3 D Modificaciones del enlace C16-C17 o de la posición C16					
Metabolismo reducido		Metabolizado			
Nº	Nombre	Estructura	Nº	Nombre	Estructura
39	5,16-pregnadien-20-ona		6	5,16-pregnadien-3β-ol	
					
			7	5,16-pregnadien-3β-ol-ona	
Tabla 3 E Modificaciones en posiciones C20 & C21					
Metabolismo reducido		Metabolizado			
Nº	Nombre	Estructura	Nº	Nombre	Estructura
24	20-desoxipregnenolona		52	4-pregnen-21-ol-3,20-diona	
			75	5α-pregn-3α,21-diol-20-ona	

(continuación)

Tabla 3 E Modificaciones en posiciones C20 & C21									
Metabolismo reducido			Metabolizado						
Nº	Nombre	Estructura	Nº	Nombre	Estructura	Nº	Nombre	Estructura	
67	20-metil-amino-5-pregnen-3β-ol		26	5-pregnen-3β,21-diol-20-ona		50	5-Androsten-3β-ol-17-ona (DHEA)		
			76	5α-pregnan-3β,21-diol-20-ona					
Tabla 3 F Modificaciones en posiciones C7 y C3									
Metabolismo reducido			Metabolizado						
Nº	Nombre	Estructura	Nº	Nombre	Estructura	Nº	Nombre	Estructura	
2	17α-metil-pregnenolona		70	17α-bencil-3β-metoxi-pregne-nolona		71	17-etoxi-pregne-nolona		

(continuación)

Tabla 3 F Modificaciones en posiciones C7 y C3					
Metabolismo reducido			Metabolizado		
Nº	Nombre	Estructura	Nº	Nombre	Estructura
65	17 α -bencil-pregne-nolona		42	3 β -benciloxi-17 α -metil-pregne-nolona	
32	17 α -etil-pregne-nolona		40	17 α -metil-progeste-rona	
36	17-metoxi-pregne-nolona		3	3 β -fluoro-17 α -metil-pregne-nolona	
			22	17 α -Hidroxi-pregne-nolona	
			64	17 α -ali-pregne-nolona	
			23	Hemi-succinato de 17 α -hidroxi-pregne-nolona	

(continuación)
 Tabla 3 F Modificaciones en posiciones C7 y C3

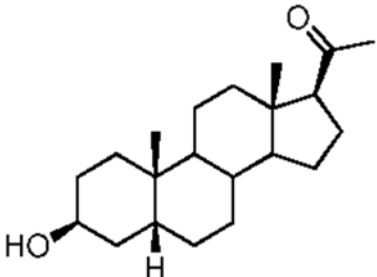
Metabolismo reducido			Metabolizado		
Nº	Nombre	Estructura	Nº	Nombre	Estructura
74	17 α -bencil-3 β -fluoro-pregne-nolona		35	3 β -metoxi-17 α -metil-pregne-nolona	
73	17 α -bencil-progeste-rona		69	17 α -ali-3 β -metoxi-pregne-nolona	
63	17 α -bencil-3 β -benciloxi-pregne-nolona				

Ejemplo 25: Derivados de pregnenolonas, para los cuales la transformación en esteroides activos aguas abajo está limitada, inhiben los efectos de la activación del receptor CB1.

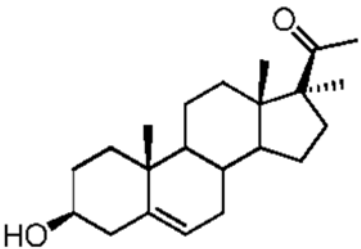
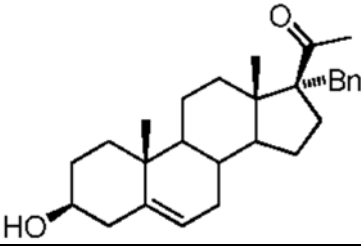
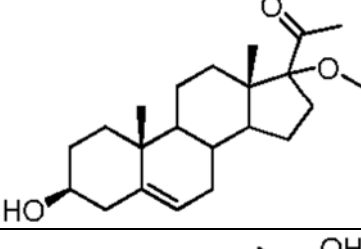
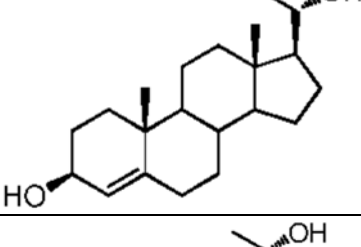
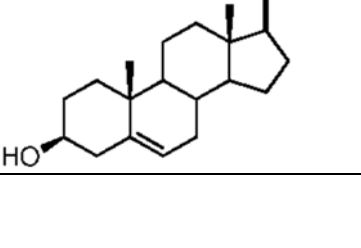
Como ejemplos del compuesto descrito de la fórmula general A, los inventores probaron en los ejemplos presentados aquí el efecto sobre la ingesta alimentaria de los compuestos 3-fluoropregnenolona, 17-metilpregnenolona, 3-fluoro-17-metilpregnenolona en ratas o ratones después de estimulación con THC y/o después de privación de alimentos. Los compuestos 3-fluoropregnenolona, 17-metilpregnenolona, 3-fluoro-17-metilpregnenolona fueron capaces de inhibir los efectos de la activación de CB1 sobre la ingesta alimentaria. El compuesto 17-metilpregnenolona pareció más eficaz que la pregnenolona, la 3-fluoropregnenolona y la 3-fluoro-17-metilpregnenolona para inhibir los efectos de la activación del receptor CB1 (Fig.19). El compuesto 17-metilpregnenolona fue capaz de reducir significativamente el aumento de la ingesta alimentaria inducida por THC en ratas, mientras que solo se observó una tendencia a reducir la ingesta alimentaria para los otros dos compuestos (Fig.19A). En ratones con restricción de alimentos, todos los compuestos redujeron la ingesta alimentaria. Sin embargo, se obtuvieron efectos estadísticamente significativos en la dosis más baja (4 mg/kg) para el compuesto 17-metilpregnenolona, mientras que se necesitaron 6 mg/kg para alcanzar significación estadística con pregnenolona, 3-fluoropregnenolona y 3-fluoro-17-metilpregnenolona (Fig.19B). Finalmente, el aumento inducido por THC de ingesta alimentaria en ratones fue reducido por todos los compuestos con (2 mg/kg) en ratones (Fig.19C). Una función dosis-respuesta para el aumento inducido por THC de ingesta alimentaria mostró que tanto la pregnenolona como la 17-metilpregnenolona inhibieron este comportamiento con 1 mg/kg, mientras que una dosis de 0,5 mg/kg fue ineficaz.

Se probaron otros derivados de pregnenolona (Tabla 4) para los cuales el metabolismo de esteroides activos aguas abajo se redujo respecto a su capacidad para inhibir: 1. efectos de la tétada cannabinoide inducidos por THC (reducción de la temperatura corporal y de la actividad locomotora, (10 mg/kg de THC, 6 mg/kg de compuestos 15-30 min antes de THC) que se reconoce como un método sólido para evaluar la activación del receptor CB1; 2. aumento de la ingesta alimentaria inducida por THC, un efecto típico de la activación de CB1 (entre 0,5 y 1 mg/kg de THC, entre 2 y 4 mg/kg de compuestos 30 min antes de THC); 3. el aumento de TNF α inducido por LPS, otros efectos típicos de antagonistas CB1 (6 mg/kg de compuestos 15 min antes de LPS). Para cada compuesto y cada prueba, se usaron grupos independientes de animales (al menos n=6 por compuesto/por prueba).

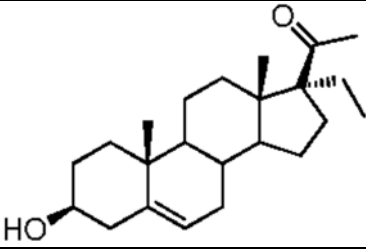
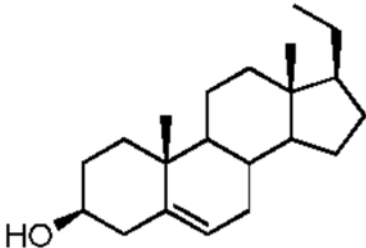
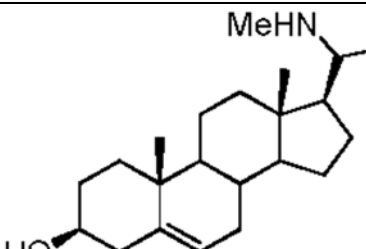
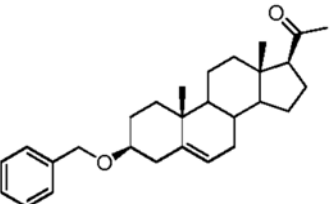
Tabla 4. Inhibición de activación de CB1 por derivados de pregnenolona con metabolismo reducido. Se compararon ratones (al menos n = 6 por grupo) tratados con derivados de pregnenolona (entre 2 y 6 mg/kg) con controles apropiados tratados con vehículo. Se estudiaron cambios de la temperatura corporal y actividad locomotora después de inyección de 10 mg/kg de THC, ingesta de alimentos después de inyección de THC entre 0,5 y 1 mg/kg, TNF α después de inyección sistémica de LPS. nt = no probado. Las estadísticas se realizaron usando la prueba t de Student.

Tabla 4 A Compuestos con un grupo hidroxilo beta en posición C3						
Compuestos con metabolismo reducido			Antagonismo de CB1			
Nº	Nombre	Estructura	Reducción de temperatura de inhibición (%)	Aumento de actividad motora (%)	Inhibición de ingesta de alimentos inducida por THC (%)	Inhibición de TNF- α (%)
77	5 β -pregnan-3 β -ol-20-ona (Epipregnenolona)		70%, P<0,0001	177%, P<0,02	≥100%, P<0,01	76%, P<0,003

(continuación)

Tabla 4 A Compuestos con un grupo hidroxilo beta en posición C3			Antagonismo de CB1			
Compuestos con metabolismo reducido						
2	17 α -metil-pregnenolona		43%, P<0,001	240%, P<0,001	≥100%, P<0,001	60%, P<0,02
65	17 α -bencil-pregnenolona		53%, P<0,003	142%, P<0,03	≥100%, P<0,001	65%, P<0,01
36	17-metoxi-pregnenolona		54%, P<0,001	326%, P<0,001	≥100%, P<0,003	37%, P<0,04
12	4-pregnen-3 β ,20 α -diol		42%, P<0,004	100%, P<0,16	≥100%, P<0,001	81%, P<0,002
20	5-pregnen-3 β ,20 α -diol		34%, P<0,04	123%, P<0,04	85%, P<0,03	65%, P<0,01

(continuación)

Tabla 4 B Modificaciones en posiciones C17, C20 que reducen la actividad						
Compuestos con metabolismo reducido			Antagonismo de CB1			
Nº	Nombre	Estructura	Reducción de temperatura de inhibición (%)	Aumento de actividad motora (%)	Inhibición de ingesta de alimentos inducida por THC (%)	Inhibición de TNF- α (%)
32	17 α -etil-pregnenolona		12%, P>0,25	-2%, P>0,25	nt	64%, P<0,02
24	20-desoxi-pregnenolona		25%, P<0,08	33%, P>0,20	nt	34%, P>0,14
67	20-metilamino-5-pregnen-3 β -ol		28%, P<0,05	-20%, P>0,35	nt	nt
Tabla 4 C Modificaciones en posición C3 que mantienen la actividad						
Compuestos con metabolismo reducido			Antagonismo de CB1			
Nº	Nombre	Estructura	Reducción de temperatura de inhibición (%)	Aumento de actividad motora (%)	Inhibición de ingesta de alimentos inducida por THC (%)	Inhibición de TNF- α (%)
41	3 β -benciloxi-pregnenolona		38%, P<0,001%	106%, P<0,03	nt	62%, P<0,01

(continuación)

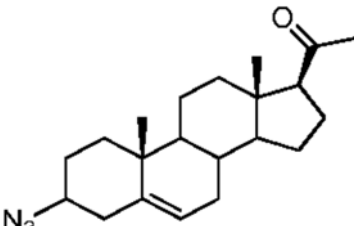
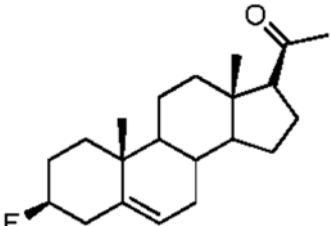
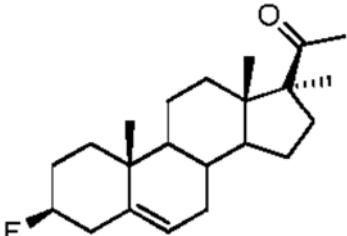
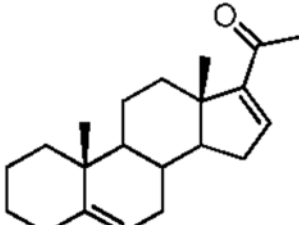
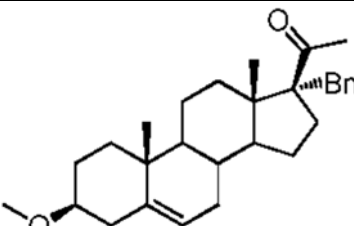
Tabla 4 C Modificaciones en posición C3 que mantienen la actividad						
Compuestos con metabolismo reducido			Antagonismo de CB1			
72	3-azido-pregnenolona		34%, P<0,05	145%, P<0,05	≥100%, P<0,001	61%, P<0,02
1	3β-fluoro-pregnenolona		nt	nt	≥100%, P<0,01	58%, P<0,02
3	3β-fluoro-17α-metil pregnenolona		nt	nt	≥100%, P<0,01	nt
39	5,16-pregna-dien-20-ona		56%, P<0,001	309%, P<0,001	≥100%, P<0,02	46%, P<0,03

Tabla 4 D Modificaciones en posición C3 que reducen la actividad						
Compuestos con metabolismo reducido			Antagonismo de CB1			
Nº	Nombre	Estructura	Reducción de temperatura de inhibición (%)	Aumento de actividad motora (%)	Inhibición de ingesta de alimentos inducida por THC (%)	Inhibición de TNF-α (%)
70	17α-bencil-3β-metoxi-pregnenolona		8%, P>0,49	2%, P>0,48	nt	nt

(continuación)

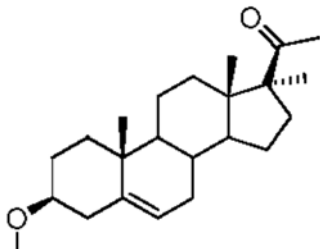
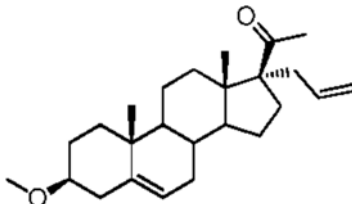
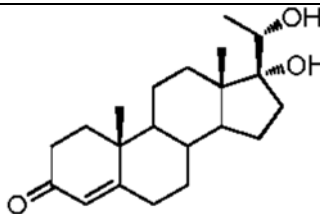
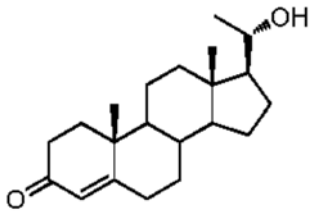
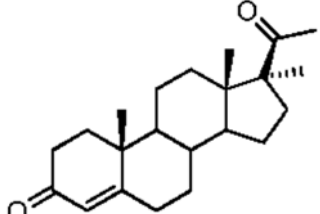
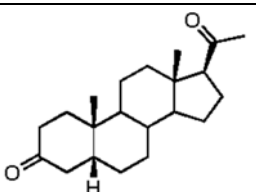
Tabla 4 D Modificaciones en posición C3 que reducen la actividad						
Compuestos con metabolismo reducido			Antagonismo de CB1			
35	3 β -metoxi-17 α -metil-pregnenolona		33%, P<0,01	-32%, P>0,24	nt	57%, P<0,05
69	17 α -alil-3 β -metoxi-pregnenolona		4%, P>0,39	-49%, P>0,1	nt	nt

Tabla 4 E Compuestos con una cetona en posición C3

Compuestos con metabolismo reducido			Antagonismo de CB1			
Nº	Nombre	Estructura	Reducción de temperatura de inhibición (%)	Aumento de actividad motora (%)	Inhibición de ingesta de alimentos inducida por THC (%)	Inhibición de TNF- α (%)
14	4-pregnen-17 α ,20 α -diol-3-ona		45%, P<0,001	277%, P<0,004	70%, P<0,06	65%, P<0,01
18	4-pregnen-20 α -ol-3-ona		25%, P<0,04	146%, P<0,1	30%, P>0,25	65%, P<0,01
40	17 α -metil-progesterona		18%, P<0,02	57%, P<0,21	74%, P<0,07	57%, P<0,02
60	5 β -pregnan-3,20-diona		66%, P<0,0001	70%, P<0,05	≥100%, P<0,002	77%, P<0,003

Para compuestos que mantenían un grupo beta-hidroxilo en posición C3, la sustitución en C17 con un grupo metilo, bencilo o metoxilo generó derivados de pregnenolona que mantenían un buen nivel de antagonismo de la actividad de CB1 (Tabla 4A). También se observó un buen nivel de actividad cuando la posición C20 estaba sustituida con un grupo alfa-hidroxilo y/o el doble enlace C5-C6 estaba desplazado a la posición C5-C4 o estaba sustituido con un hidrógeno beta en C5 (Tabla 4A). Por el contrario, un grupo etilo en posición C17, la supresión de la cetona en posición C20 o su sustitución por un grupo metilamino redujo mucho el antagonismo de la actividad de CB1 (Tabla 4B). La supresión de la función alcohol en posición C3 o su sustitución por un flúor o por un grupo azida o benciloxilo generó compuestos con un buen antagonismo de la actividad de CB1 (Tabla 4C). Por el contrario, la sustitución del alcohol en C3 por un grupo metoxilo indujo una disminución profunda de la actividad de CB1 (Tabla 4D). Cuando el alcohol en C3 estaba sustituido por una cetona, había también una reducción general del antagonismo de la actividad de CB1 (Tabla 4E). Sin embargo, la actividad reducida de los compuestos con una cetona en C3 puede ser mejorada por modificaciones en las posiciones C5, C20 y C17. Un grupo hidroxilo alfa en las posiciones C20 y C17 o el reemplazo del doble enlace C5-C6 por un hidrógeno beta en la posición C5 mejoró los efectos antagonistas de CB1 de los compuestos con cetona (Tabla 4E).

Discusión:

Estos datos convergentes se pueden resumir como sigue:

primero, la fórmula general A permite la producción de derivados de pregnenolona para los cuales la transformación en esteroides activos derivados de pregnenolona está limitada. Esta fórmula es original porque la capacidad de la modificación química de pregnenolona para reducir o no el metabolismo de esteroides activos aguas abajo puede no haber sido prevista por el conocimiento previo o por un experto en la técnica. Segundo, la fórmula general I y/o II permite producir derivados de pregnenolona que son capaces de inhibir los efectos de la activación de CB1 en modelos de sistemas diferentes: 1. la ingesta alimentaria inducida por THC tanto en ratones como en ratas; 2. la ingesta alimentaria inducida por la restricción de alimentos en ratones; 3. comportamientos que pertenecen a la tetrada cannabinoide inducidos por THC; 4. aumento de TNF alfa inducido por LPS.

V. La inhibición de los efectos de la activación de efectos de receptores CB1 es específica de pregnenolona y no involucra metabolitos aguas abajo.

Ejemplo 26: El THC aumentó las concentraciones de pregnenolona en el cerebro de ratas wistar machos más que las de esteroides derivados de pregnenolona activos aguas abajo.

En este ejemplo, los inventores muestran que la administración de THC (3 mg/kg sc) a ratas Wistar machos indujo en el tiempo un aumento importante de algunos de los esteroides derivados de pregnenolona y, en particular, de alopregnanolona y epialopregnanolona. Sin embargo, el efecto de THC sobre pregnenolona fue, en varios órdenes de magnitud, más alto que cualquiera de los efectos observados en el esteroide aguas abajo derivado de pregnenolona (Fig.1C-F).

Cuando se administró THC en varias dosis a ratas Wistar machos, los inventores encontraron que el THC aumentó las concentraciones de los esteroides derivados aguas abajo de la pregnenolona, alopregnanolona y epialopregnanolona, mientras que no hubo aumento significativo de testosterona ni de DHT. Sin embargo aún después de la dosis más alta de THC, el aumento de las concentraciones de los otros esteroides fue mucho más pequeño que el observado para la pregnenolona.

Ejemplo 27: El THC no aumentó esteroides activos aguas abajo derivados de pregnenolona en ratones.

Cuando se administró THC en varias dosis a ratones machos, se observó un fuerte aumento dependiente de la dosis de las concentraciones de pregnenolona. Sin embargo, en ratones, los esteroides activos aguas abajo derivados de pregnenolona, alopregnanolona y epialopregnanolona, testosterona y DHT no aumentaron significativamente en el cerebro.

Ejemplo 28: Dosis de pregnenolona que inhiben la ingesta alimentaria no aumentan las concentraciones de esteroides activos aguas abajo derivados de pregnenolona en el cerebro.

En este ejemplo, los inventores estudiaron los efectos de las dosis de pregnenolona (entre 2 y 8 mg/kg) que fueron capaces de inhibir los efectos de la activación de CB1 en ratones. Inyecciones de pregnenolona entre 2 y 8 mg/kg aumentaron los niveles en el cerebro de pregnenolona; sin embargo, no modificaron las concentraciones de metabolitos aguas abajo, tales como epialopregnanolona y alopregnanolona en el cerebro de ratones (Fig.4).

Discusión

Estos datos convergentes se pueden resumir como sigue:

primero, la activación de CB1 por la administración de THC en ratas induce un aumento mucho más pequeño en alopregnanolona y epialopregnanolona que en pregnenolona. En ratones, la administración de THC no aumentó la alopregnanolona ni la epialopregnanolona significativamente. Por consiguiente, la retroalimentación negativa sobre la actividad del CB1, ejercida por el aumento endógeno de concentraciones de pregnenolona, que se estudió en ratones, no puede ser debido a un aumento posterior de esteroides activos aguas abajo derivados de pregnenolona.

Segundo, la administración exógena de pregnenolona en el rango de dosis a las cuales se observó la inhibición por la pregnenolona del efecto de activación de CB1 (2-8 mg /kg) en ratones no aumentó ni la alopregnanolona ni la epialopregnanolona del cerebro (Fig.2). Por consiguiente, la inhibición de la actividad de CB1 observada después de administración de pregnenolona no puede ser atribuida a un aumento posterior de esteroides activos aguas abajo derivados de pregnenolona.

Finalmente, los derivados de pregnenolona obtenidos según la fórmula I y/o II que no pueden ser transformados en pregnanolona ni alopregnanolona y otros esteroides activos aguas abajo son aún capaces de inhibir los efectos de la activación de CB1. Por consiguiente, la inhibición del receptor CB1 y/o la inhibición de los efectos de CB1, observados después de administración de pregnenolona, no pueden ser atribuidos a esteroides activos aguas abajo derivados de pregnenolona.

VI. Métodos para administrar pregnenolona sin inducción ni aumento de metabolitos neuroactivos aguas abajo.

Ejemplo 39. Administración de pregnenolona con métodos que simulan una formulación de liberación lenta permiten reducir el metabolismo que produce esteroides activos aguas abajo. Aquí los inventores ejemplifican un método para administrar pregnenolona en dosis que son capaces de inhibir la activación de CB1 pero que no aumentan los esteroides neuroactivos.

Los efectos de la administración de pregnenolona sobre niveles plasmáticos de pregnenolona se compararon (n=5 por grupo) cuando se administró pregnenolona subcutáneamente (6 mg/kg) o mediante bombas microosmóticas Alzet (Alzet Osmotic Pumps, Charles River, Francia, modelo 2006) que simulan formulaciones de liberación retardada prolongada de pregnenolona. Así, estas minibombas implantadas subcutáneamente proporcionan liberación constante de pregnenolona. Se usaron dos concentraciones de pregnenolona, 0,6 mg/kg/hora y 1 mg/kg/hora (10 veces y seis veces inferiores a las dosis administradas subcutáneamente). Aunque la administración de 6 mg/kg de pregnenolona subcutáneamente en ratones no aumentó la concentración de alopregnanolona en el cerebro (Fig.4) se observó un aumento importante en este esteroide activo aguas abajo en el plasma (Fig.20). La pregnenolona administrada subcutáneamente como 6 mg/kg aumentó los niveles plasmáticos de pregnenolona (alrededor de 100 ng/ml) pero también indujo un aumento de alopregnanolona. La vida media de la pregnenolona administrada subcutáneamente fue bastante corta (media hora) y el aumento de alopregnanolona se mantuvo más allá de una hora (Fig.20). Por el contrario, cuando se administró la pregnenolona en forma constante a través de una minibomba Alzet como 0,6 mg/kg/hora, la pregnenolona aumentó en el rango del aumento máximo observado después de inyección subcutánea pero no aumentó la alopregnanolona (Fig.20). También los niveles de pregnenolona permanecieron en el rango de dosis terapéuticas eficaces más allá de dos semanas. Aun cuando la pregnenolona se administró como 1 mg/kg/hora, lo que aumentó las concentraciones de pregnenolona plasmática al doble de lo observado después de 6 mg/kg, la alopregnanolona no aumentó (Fig.20).

Discusión

Se ha descrito la pregnenolona en documentos anteriores como un método para tratar enfermedades psiquiátricas, cierto tipo de trastornos de inflamación y metabólicos y cierto tipo de adicción y, en particular, adicción a nicotina y a alcohol. Sin embargo, en todos estos métodos, se usó la pregnenolona en concentraciones altas con el propósito explícito de aumentar esteroides neuroactivos aguas abajo a los que se atribuyeron los efectos terapéuticos de la administración de pregnenolona. Aquí demostramos que la pregnenolona por sí misma, sin la intervención de esteroides neuroactivos aguas abajo en dosis mucho más bajas que las usadas en documentos previos, puede ser útil para tratar las patologías que involucran una activación de los receptores CB1. En este contexto, como la pregnenolona tiene una vida media muy corta, (aproximadamente 30 min), las formulaciones de liberación prolongada pueden ser útiles con el fin de mantener niveles de pregnenolona en el rango terapéutico. Por simulación de tales formulaciones usando la minibomba Alzet, demostramos que una administración constante de pregnenolona en concentraciones bajas, cada hora, logra dos objetivos: 1. inducir concentraciones estables de pregnenolona que están en el rango de las capaces de bloquear todos los efectos de la activación de CB1 (alrededor de 100 ng/ml); y 2. Reducir el aumento de esteroides activos aguas abajo tales como alopregnanolona. Entonces, estos resultados proporcionan, a través del uso de formulaciones de liberación prolongada de pregnenolona, métodos para administrar pregnenolona en dosis bajas para tratar enfermedades que involucran CB1, tomando la ventaja de los efectos farmacológicos de la pregnenolona misma y reduciendo los efectos no deseados de los esteroides aguas abajo.

REFERENCIAS

A lo largo de esta solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención. Las divulgaciones de estas referencias se incorporan en el presente documento como referencia en la presente

divulgación.

Aloyo VJ, Berg KA, Clarke WP, Spampinato U, Harvey JA. Inverse agonism at serotonin and cannabinoid receptors. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2010;91:1-40. Revisión.

Bab I, Zimmer A. Cannabinoid receptors and the regulation of bone mass. *Br J Pharmacol*. 2008 Jan;153(2):182-8. Epub 2007 Dec 10. Revisión.

Baker D *et al* "Endocannabinoids control spasticity in a multiple sclerosis model" *FASEB Journal* Vol. 15 páginas 300-302 Feb 2001

Barutta F, Corbelli A, Mastrocola R, Gambino R, Di Marzo V, Pinach S, Rastaldi MP, Perin PC, Gruden G. Cannabinoid receptor 1 blockade ameliorates albuminuria in experimental diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2010 Apr;59(4):1046-54. Epub 2010 Jan 12.

Bátkai S, Mukhopadhyay P, Harvey-White J, Kechrid R, Pacher P, Kunos G. Endocannabinoids acting at CB1 Receptors mediate the cardiac contractile dysfunction *in vivo* in cirrhotic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Sep;293(3):H1689-95. Epub 2007 Jun 8.

Beardsley PM, Thomas BF, McMahon LR. Cannabinoid CB1 receptor antagonists as potential pharmacotherapies for drug abuse disorders. *Int Rev Psychiatry*. 2009 Apr;21(2):134-42. Revisión.

Bell-Anderson KS, Aouad L, Williams H, Sanz FR, Phuyal J, Larter CZ, Farrell GC, Caterson ID. Coordinated improvement in glucose tolerance, liver steatosis and obesity-associated inflammation by cannabinoid 1 receptor antagonism in fat Aussie mice. *Int J Obes (Lond)*. 2011 Mar 8. [Epub anticipada]

Bermudez-Silva FJ, Viveros MP, McPartland JM, Rodriguez de Fonseca F. The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: the end or a new beginning? *Pharmacol Biochem Behav*. 2010 Jun;95(4):375-82. Epub 2010 Mar 27. Revisión. PubMed PMID: 20347862.

Bifulco M, Grimaldi C, Gazerro P, Pisanti S, Santoro A. Rimonabant: just an antiobesity drug? Current evidence on its pleiotropic effects. *Mol Pharmacol*. 2007 Jun;71(6):1445-56. Epub 2007 Feb 27. Revisión.

Caraceni P, Pertosa AM, Giannone F, Domenicali M, Grattagliano I, Principe A, Mastroleo C, Perrelli MG, Cutrin J, Trevisani F, Croci T, Bernardi M. Antagonism of the cannabinoid CB-1 receptor protects rat liver against ischaemia-reperfusion injury complicated by endotoxaemia. *Gut*. 2009 Agosto;58(8):1135-43. Epub 2009 Mar 11.

Chien FY, Wang RF, Mittag TW, Podos SM. "Effect of WIN 55212-2, a cannabinoid receptor agonist, on aqueous humor dynamics in monkey". *Arch Ophthalmol*. 2003 Jan;121(1):87-90.

Comelli F, Bettoni I, Colombo A, Fumagalli P, Giagnoni G, Costa B. Rimonabant, a cannabinoid CB1 receptor antagonist, attenuates mechanical allodynia and counteracts oxidative stress and nerve growth factor deficit in diabetic mice. *Eur J Pharmacol*. 2010 Jul 10;637(1-3):62-9. Epub 2010 Apr 14.

Cosenza-Nashat MA, Bauman A, Zhao ML, Morgello S, Suh HS, Lee SC. Cannabinoid Receptor Expression in HIV Encephalitis and HIV-associated Neuropathologic Comorbidities. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2011 Mar 31. doi: 10.1111/j.1365-2990.2011.01177.x. [Epub anticipada]

Domenicali M, Caraceni P, Giannone F, Pertosa AM, Principe A, Zambruni A, Trevisani F, Croci T, Bernardi M. Cannabinoid type 1 receptor antagonism delays ascites formation in rats with cirrhosis. *Gastroenterology*. 2009 Jul;137(1):341-9. Epub 2009 Jan 14

Gary-Bobo M, Elachouri G, Gallas JF, Janiak P, Marini P, Ravinet-Trillou C, Chabbert M, Cruccioli N, Pfersdorff C, Roque C, Arnona M, Croci T, Soubrié P, Oury-Donat F, Maffrand JP, Scatton B, Lacheretz F, Le Fur G, Herbert JM, Bensaid M. Rimonabant reduces obesity-associated hepatic steatosis and features of metabolic syndrome in obese Zucker fa/fa rats. *Hepatology*. 2007 Jul;46(1):122-9.

Gaskari SA, Liu H, Moezi L, Li Y, Baik SK, Lee SS. Role of endocannabinoids in the pathogenesis of cirrhotic cardiomyopathy in bile duct-ligated rats. *Br J Pharmacol*. 2005 Oct;146(3):315-23.

Gazerro P, Malfitano AM, Proto MC, Santoro A, Pisanti S, Caruso MG, Notarnicola M, Messa C, Laezza C, Misso G, Caraglia M, Bifulco M. Synergistic inhibition of human colon cancer cell growth by the cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant and oxaliplatin. *Oncol Rep*. 2010 Jan;23(1):171-5.

George, O., Vallee, M., Vitiello, S., Le Moal, M., Piazza, P. V., and Mayo, W. (2010). Low brain allopregnanolone levels mediate flattened circadian activity associated with memory impairments in aged rats. *Biol. Psychiatry*. 68, 956-963.

Hamamoto DT, Giridharagopalan S, Simone DA. Acute and chronic administration of the cannabinoid receptor agonist CP 55,940 attenuates tumor-evoked hyperalgesia. *Eur J Pharmacol*. 2007 Mar 8;558(1-3):73-87. Epub 2006 Dec 9.

Heller JE, Baty DE, Zhang M, Li H, Adler M, Ganea D, Gaughan J, Loftus CM, Jallo JI, Tuma RF. The combination of selective inhibition of the cannabinoid CB1 receptor and activation of the cannabinoid CB2 receptor yields improved attenuation of motor and autonomic deficits in a mouse model of spinal cord injury. *Clin Neurosurg*. 2009;56:84-92.

Idris AI. Cannabinoid receptors as target for treatment of osteoporosis: a tale of two therapies. *Curr Neuropharmacol*. 2010 Sep;8(3):243-53. Revisión.

Idris AI, van 't Hof RJ, Greig IR, Ridge SA, Baker D, Ross RA, Ralston SH. Regulation of bone mass, bone loss and osteoclast activity by cannabinoid receptors. *Nat Med*. 2005 Jul;11(7):774-9. Epub 2005 May 22.

Jack D. A bright future for osteoporosis treatment. *Drug News Perspect*. 2005 Jun;18(5):341-4.

Janiak P, Poirier B, Bidouard JP, Cadrouvele C, Pierre F, Gouraud L, Barbosa I, Dedio J, Maffrand JP, Le Fur G, O'Connor S, Herbert JM. Blockade of cannabinoid CB1 receptors improves renal function, metabolic profile, and increased survival of obese Zucker rats. *Kidney Int*. 2007 Dec;72(11):1345-57. Epub 2007 Sep 19.

Jourdan T, Djaouti L, Demizieux L, Gresti J, Vergès B, Degraze P. CB1 antagonism exerts specific molecular effects on visceral and subcutaneous fat and reverses liver steatosis in diet-induced obese mice. *Diabetes*.

2010Apr;59(4):926-34. Epub 2010 Jan 28.

Lee HK, Choi EB, Pak CS. The current status and future perspectives of studies of cannabinoid receptor 1 antagonists as anti-obesity agents. *Curr Top Med Chem*. 2009;9(6):482-503. Revisión.

Lim SY, Davidson SM, Yellon DM, Smith CC. The cannabinoid CB1 receptor antagonist, rimonabant, protects against acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2009 Nov;104(6):781-92. Epub 2009 May 22.

Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgansberger W, Di M V, and Lutz B. (2002). The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature*. 418, 530-534.

Matsuda K, Mikami Y, Takeda K, Fukuyama S, Egawa S, Sunamura M, Maruyama I, Matsuno S. The cannabinoid 1 receptor antagonist, AM251, prolongs the survival in rats with severe acute pancreatitis. *Tohoku J Exp Med*. 2005 Oct;207(2):99-107.

Martín-García E, Burokas A, Martín M, Berrendero F, Rubí B, Kiesselbach C, Heyne A, Gispert JD, Millán O, Maldonado R. Central and peripheral consequences of the chronic blockade of CB1 cannabinoid receptor with rimonabant o taranabant. *J Neurochem*. 2010 Mar;112(5):1338-13351. Epub 2009 Dec 17.

Mallat A, Lotersztajn S. Endocannabinoids and their role in fatty liver disease. *Dig Dis*. 2010;28(1):261-6. Epub 2010 May 7. Revisión.

Mendizabal V, Zimmer A, and Maldonado R. (2006). Involvement of kappa/dynorphin system in WIN 55,212-2 self-administration in mice. *Neuropsychopharmacology*. 31, 1957-1966.

Milligan G, Smith NJ. Allosteric modulation of heterodimeric G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2007 Dec;28(12):615-20. Epub 2007 Nov 19. Revisión.

Mingorance C, de Sotomayor MA, Marhuenda E, Herrera MD. Chronic treatment with the cannabinoid 1 antagonist rimonabant altered vasoactive cyclo-oxygenase-derived products on arteries from obese Zucker rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2010 Nov;56(5):560-9.

Monory K, Blanduzun H, Massa F, Kaiser N, Lemberger T, Schutz G, Wotjak CT, Lutz B, and Marsicano G. (2007). Genetic dissection of behavioural and autonomic effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice. *PLoS Biol*. 5, e269.

Mukerji G, Yiangou Y, Agarwal SK, Anand P. Increased cannabinoid receptor 1-immunoreactive nerve fibers in overactive and painful bladder disorders and their correlation with symptoms. *Urology*. 2010 Jun;75(6):1514.e15-20. Epub 2010 Mar 25.

Mukhopadhyay P, Bátkai S, Rajesh M, Czifra N, Harvey-White J, Haskó G, Zsengeller Z, Gerard NP, Liaudet L, Kunos G, Pacher P. Pharmacological inhibition of CB1 cannabinoid receptor protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Aug 7;50(6):528-36. Epub 2007 Jul 23.

Mukhopadhyay P, Pan H, Rajesh M, Bátkai S, Patel V, Harvey-White J, Mukhopadhyay B, Haskó G, Gao B, Mackie K, Pacher P. CB1 cannabinoid receptors promote oxidative/nitrosative stress, inflammation and cell death in a murine nephropathy model. *Br J Pharmacol*. 2010 Jun;160(3):657-68.

Mukhopadhyay P, Rajesh M, Bátkai S, Patel V, Kashiwaya Y, Liaudet L, Evgenov OV, Mackie K, Haskó G, Pacher P. CB1 cannabinoid receptors promote oxidative stress and cell death in murine models of doxorubicin-induced cardiomyopathy and in human cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2010 Mar 1;85(4):773-84. Epub 2009 Nov 26.

Nissen SE, Nicholls SJ, Wolski K, Rodés-Cabau J, Cannon CP, Deanfield JE, Després JP, Kastelein JJ, Steinhilb SR, Kapadia S, Yasin M, Rucillo W, Gaudin C, Job B, Hu B, Bhatt DL, Lincoff AM, Tuzcu EM; STRADIVARIUS Investigators. Effect of rimonabant on progression of atherosclerosis in patients with abdominal obesity and coronary artery disease: the STRADIVARIUS randomized controlled trial. *JAMA*. 2008 Apr 2;299(13):1547-60.

Pandey R, Hegde VL, Singh NP, Hofseth L, Singh U, Ray S, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Use of cannabinoids as a novel therapeutic modality against autoimmune hepatitis. *Vitam Horm*. 2009;81:487-504. Revisión.

Pertwee RG. Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci*. 2005 Feb 4;76(12):1307-24. Epub 2004 Dec 8. Revisión.

Pisanti S, Picardi P, Prota L, Proto MC, Laezza C, McGuire PG, Morbidelli L, Gazzerri P, Ziche M, Das A, Bifulco M. Genetic and pharmacological inactivation of cannabinoid CB1 receptor inhibits angiogenesis. *Blood*. 2011 Apr 1.

Pryce G, Baker D " Control of Spasticity in a Multiple Sclerosis Model is mediated by CB1, not CB2, Cannabinoid Receptors" *British Journal of Pharmacology* Volume 150, Issue 4, páginas 519–525, February 2007

Puighermanal E, Marsicano G, Busquets-García A, Lutz B, Maldonado R, and Ozaita A. (2009). Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. *Nat. Neurosci*. 12, 1152-1158.

Rinaldi-Carmona M, Calandra B, Shire D, Bouaboula M, Oustric D, Barth F, Casellas P, Ferrara P, and Le Fur G. (1996). Characterization of two cloned human CB1 cannabinoid receptor isoforms. *J Pharmacol Exp. Ther*. 278, 871-878.

Rossi B, Zenaro E, Angiari S, Ottoboni L, Bach S, Piccio L, Pietronigro EC, Scarpini E, Fusco M, Leon A, Constantin G. Inverse agonism of cannabinoid CB1 receptor blocks the adhesion of encephalitogenic T cells i inflamed brain venules by a protein kinase A-dependent mechanism. *J Neuroimmunol*. 2011 Apr;233(1-2):97-105. Epub 2011 Jan 7.

Santoro A, Pisanti S, Grimaldi C, Izzo AA, Borrelli F, Proto MC, Malfitano AM, Gazzerri P, Laezza C, Bifulco M. Rimonabant inhibits human colon cancer cell growth and reduces the formation of precancerous lesions in the mouse colon. *Int J Cáncer*. 2009 Sep 1;125(5):996-1003.

Sarnataro D, Pisanti S, Santoro A, Gazzerri P, Malfitano AM, Laezza C, Bifulco M. The cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant (SR141716) inhibits human breast cancer cell proliferation through a lipid raft-mediated

mechanism. *Mol Pharmacol*. 2006 Oct;70(4):1298-306. Epub 2006 Jul 5.

Soria,G., Castane,A., Ledent,C., Parmentier,M., Maldonado,R., and Valverde,O. (2006). The lack of A2A adenosine receptors diminishes the reinforcing efficacy of cocaine. *Neuropsychopharmacology*. 31, 978-987.

Soria,G., Mendizabal,V., Tourino,C., Robledo,P., Ledent,C., Parmentier,M., Maldonado,R., and Valverde,O. (2005). Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology*. 30, 1670-1680.

Sugamura K, Sugiyama S, Fujiwara Y, Matsubara J, Akiyama E, Maeda H, Ohba K, Matsuzawa Y, Konishi M, Nozaki T, Horibata Y, Kaikita K, Sumida H, Takeya M, Ogawa H. Cannabinoid 1 receptor blockade reduces atherosclerosis with enhances reverse cholesterol transport. *J Atheroscler Thromb*. 2010 Feb 26;17(2):141-7.

Sugamura K, Sugiyama S, Nozaki T, Matsuzawa Y, Izumiya Y, Miyata K, Nakayama M, Kaikita K, Obata T, Takeya M, Ogawa H. Activated endocannabinoid system in coronary artery disease and antiinflammatory effects of cannabinoid 1 receptor blockade on macrophages. *Circulation*. 2009 Jan 6;119(1):28-36. Epub 2008 Dec 22.

Tam J, Vemuri VK, Liu J, Bátkai S, Mukhopadhyay B, Godlewski G, Osei-Hyiaman D, Ohnuma S, Ambudkar SV, Pickel J, Makriyannis A, Kunos G. Peripheral CB1 cannabinoid receptor blockade improves cardiometabolic risk in mouse models of obesity. *J Clin Invest*. 2010 Aug 2;120(8):2953-66. doi: 10.1172/JCI42551. Epub 2010 Jul 26. Errata en: *J Clin Invest*. 2010 Oct 1;120(10):3735.

Tam J, Liu J, Mukhopadhyay B, Cinar R, Godlewski G, Kunos G. Endocannabinoids in liver disease. *Hepatology*. 2011 Jan;53(1):346-55. doi: 10.1002/hep.24077. Revisión.

Vallee,M., Rivera,J.D., Koob,G.F., Purdy,R.H., and Fitzgerald,R.L. (2000). Quantification of neurosteroids in rat plasma and brain following swim stress and allopregnanolona administration using negative chemical ionization gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Biochem*. 287, 153-166.

Van Diepen H, Schlicker E, Michel MC. Prejunctional and peripheral effects of the cannabinoid CB(1) receptor inverse agonist rimonabant (SR 141716). *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 2008 Oct;378(4):345-69. Epub 2008 Jul 25. Revisión.

Wang X, Horswill JG, Whalley BJ, Stephens GJ. Effects of the Allosteric Antagonist 1-(4-Chlorophenyl)-3-[3-(6-pyrrolidin-1-ylpyridin-2-yl)phenyl]urea (PSNCBAM-1) on CB1 Receptor Modulation in the Cerebellum. *Mol Pharmacol*. 2011 Apr;79(4):758-67. Epub 2010 Dec 28.

Xie S, Furjanic MA, Ferrara JJ, McAndrew NR, Ardino EL, Ngondara A, Bernstein Y, Thomas KJ, Kim E, Walker JM, Nagar S, Ward SJ, Raffa RB. The endocannabinoid system and rimonabant: a new drug with a novel mechanism of action involving cannabinoid CB1 receptor antagonism--or inverse agonism--as potential obesity treatment and other therapeutic use. *J Clin Pharm Ther*. 2007 Jun;32(3):209-31. Revisión.

Zheng D, Bode AM, Zhao Q, Cho YY, Zhu F, Ma WY, Dong Z. The cannabinoid receptors are required for ultraviolet-induced inflammation and skin cancer development. *Cancer Res*. 2008 May 15;68(10):3992-8.

Zyromski NJ, Mathur A, Pitt HA, Wade TE, Wang S, Swartz-Basile DA, Prather AD, Lillemoe KD. Cannabinoid receptor-1 blockade attenuates acute pancreatitis in obesity by an adiponectin mediated mechanism. *J Gastrointest Surg*. 2009 May;13(5):831-8. Epub 2009 Feb 19.

REIVINDICACIONES

1. Pregnenolona para su uso en el tratamiento de una afección o trastorno patológico seleccionado del grupo que
consiste en adicción al cannabis, dependencia, abuso, intoxicación y trastornos relacionados con recaídas; consumo
5 de cannabis y productos derivados, abuso de cannabis y productos derivados, toxicidad del cannabis y productos
derivados y psicosis inducida por cannabis y productos derivados.
2. Pregnenolona para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la afección o trastorno patológico es
cannabis y consumo de productos, abuso de cannabis y productos derivados, toxicidad del cannabis y productos
10 derivados y psicosis inducida por cannabis y productos derivados.
3. Pregnenolona para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la afección o trastorno patológico se
selecciona del grupo que consiste en adicción al cannabis, dependencia, intoxicación por abuso y trastornos
15 relacionados con recaídas.