



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 357 284**

② Número de solicitud: 200930763

⑤ Int. Cl.:
A61K 31/4353 (2006.01)

⑫ PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑫ Fecha de presentación: **30.09.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **25.04.2011**

Fecha de la concesión: **29.08.2011**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **08.09.2011**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
08.09.2011

⑰ Titular/es: **Universidad de Santiago de Compostela
Edificio CACTUS-CITT Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

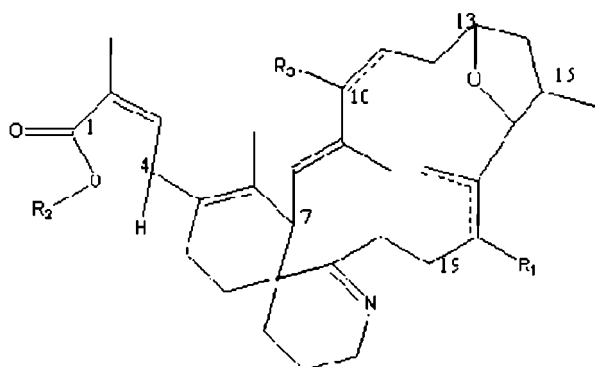
⑱ Inventor/es: **Botana López, Luis Miguel;
Alonso López, Eva y
Vale González, Carmen**

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Utilización de la gimnodimina, análogos y derivados para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades neurodegenerativas relacionadas con tau y β -amiloide.**

㉑ Resumen:

Utilización de la gimnodimina, análogos y derivados para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades neurodegenerativas relacionadas con tau y β -amiloide. La presente invención se refiere al uso de un compuesto de estructura química



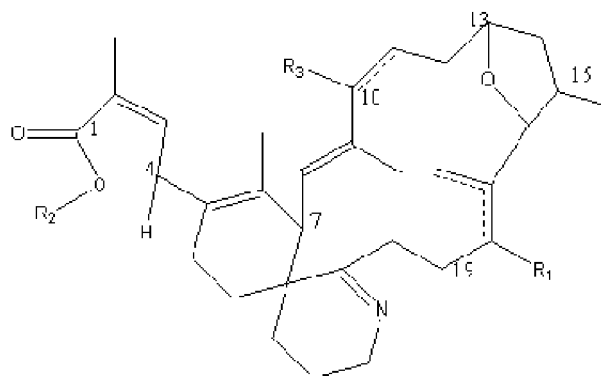
para la elaboración de un medicamento, preferiblemente para la prevención o el tratamiento de procesos patológicos relacionados con las proteínas tau y β -amiloide. Preferiblemente el compuesto utilizado es la gimnodimina.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Utilización de la gimnodimina, análogos y derivados para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades neurodegenerativas relacionadas con tau y β -amiloide.

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biomedicina. Específicamente, se refiere al uso un compuesto de estructura química:



para la elaboración de un medicamento, preferiblemente para la prevención o el tratamiento de procesos patológicos relacionados con las proteínas tau y β -amiloide como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer.

Estado de la técnica anterior

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa de carácter progresivo, de origen todavía desconocido, y frente a la que actualmente no se puede ofrecer ningún tratamiento capaz de curarla o prevenirla. Dicha enfermedad afecta a entre el 5 y el 7% de las personas de más de sesenta y cinco años y es la causa de invalidez y dependencia más frecuente, en la actualidad, entre las personas de edad avanzada. Se estima que 8 millones de europeos están afectados por la enfermedad de Alzheimer y, teniendo en cuenta el envejecimiento de la población, se prevé que el número de enfermos se duplique en 2020 y triplique en 2050.

Esta enfermedad está caracterizada por una progresiva pérdida de memoria y de otras capacidades mentales a medida que las neuronas degeneran y diferentes zonas del cerebro se atrofian. A nivel neuropatológico la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la aparición de dos estructuras anormales que se acumulan en el cerebro. Estas estructuras son los depósitos amiloides y las placas neurofibrilares.

Los depósitos amiloides son fibras insolubles localizadas intra- y extracelularmente formadas por el péptido β -amiloide (β A), más concretamente por las formas β A40 y β A42, el cual es generado por la ruptura proteolítica de la proteína precursora de β -amiloide (APP) de forma secuencial por β -secretasas y γ -secretasas (Shirwany *et al.* 2007 *Neuropsychiatric Disease and Treatment*; 3, 597-612). Este péptido se encuentra de forma normal en el cerebro en cantidades pico o nanomolares. En dichas cantidades este péptido se encuentra en forma soluble. Cuando se da un incremento de β -amiloide por un procesamiento anómalo de la proteína precursora de β -amiloide (APP), este se vuelve insoluble dando lugar a la formación de los depósitos. Diversas mutaciones en la proteína precursora de β -amiloide se encuentran relacionadas con la enfermedad de Alzheimer debido al incremento o alteración de la transformación de APP en β -amiloide. En pacientes con enfermedad de Alzheimer, los agregados de β -amiloide aparecen en regiones cerebrales específicas, desencadenando una respuesta inflamatoria, muerte neuronal y deterioro cognitivo progresivo. Este péptido β -amiloide, también ha sido implicado en defectos neuropatológicos en individuos con síndrome de Down.

Por su parte, las marañas neurofibrilares, en cambio, son filamentos intracelulares formados por la polimerización de la proteína tau, que de forma normal actúa como una proteína asociada a los microtúbulos de los axones neuronales. Estas estructuras, las cuales se acumulan en el citoplasma de las neuronas degeneradas, fueron denominadas "filamentos pareados helicoidales" o PHFs. Estos presentan características diferentes a los neurofilamentos y microtúbulos normales. El constituyente fundamental de los PHFs es la proteína tau fosforilada. La hiperfosforilación de tau es debida, bien a un incremento de la expresión de tau por lo que existe mayor cantidad de sustrato susceptible de ser fosforilado, o bien por una hiperfosforilación por parte de las kinasas. Esta fosforilación proteica aberrante de tau, se encuentra íntimamente relacionada con la agregación anómala de dicha proteína. Dicha hiperfosforilación de tau, en la actualidad, se encuentra implicada en unas 22 patologías entre las cuales destacan la enfermedad de Alzheimer, la demencia del lóbulo frontal (también llamada neurodegeneración frontotemporal), degeneración corticobasal, enfermedad de Pick y la enfermedad de Parkinson con demencia.

Inicialmente se desarrollaron estudios para tratar de dilucidar de forma independiente cual era la implicación tanto de tau como de β -amiloide en la enfermedad de Alzheimer. Además, las primeras aproximaciones al tratamiento de la enfermedad, iban dirigidas a la mejora de los efectos de cada una de estas proteínas también de forma independiente. En la actualidad, los estudios llevados a cabo demuestran que ambas proteínas podrían estar relacionadas, ya que

los depósitos amiloides pueden afectar diferentes vías moleculares que facilitan la fosforilación de tau y su posterior agregación (Blurton-Jones *et al.* 2006, *Current Alzheimer Research*, 3(5), 435-448). Además los depósitos amiloides pueden activar diversas quinasas específicas que aumentan la hiperfosforilación de la proteína tau y por ello la formación de marañas neurofibrilares. A pesar de dicha relación, otros estudios llevados a cabo, indican que la mejora de la alteración en una de las proteínas no tiene porque llevar unida la mejora de la otra, llegando en algunos casos incluso a empeorarla (Oddo *et al.*, 2005. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 102(8), 3046-51). Por ello es necesario realizar estudios en modelos que presenten ambas patologías de forma simultánea.

En la actualidad existen varios tratamientos para el Alzheimer que no permiten la curación de la enfermedad sino que actúan retardando el progreso de la misma. El único fármaco o medicamento aprobado para el tratamiento de la enfermedad cuando esta ya se encuentra en un desarrollo moderado o severo, es decir, en estadios avanzados de la misma, es la memantina, un antagonista no competitivo de los receptores NMDA (*N-metil-D-aspartato*), que evita el efecto tóxico del glutamato a altas concentraciones, en neuronas. Otros compuestos, en este caso utilizados para evitar el desarrollo de la misma, son por ejemplo el donepezil o la rivastigmina, que actúan inhibiendo la acetilcolinesterasa, aumentando los niveles del neurotransmisor acetilcolina (A. Fisher 2008, *Neurotherapeutics*; 5:433-442).

Todo esto encamina el futuro estudio de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas hacia la búsqueda de fármacos que actúen sobre ambas alteraciones y que por tanto lleven a una mejora completa de la enfermedad.

Actualmente, una de las fuentes más importantes de compuestos que pueden resultar útiles para la producción de fármacos es el medio marino. Aquí se han encontrado multitud de recursos bioquímicos que han demostrado ser de gran utilidad sanitaria como por ejemplo fármacos con actividad antitumoral. Dentro de estos compuestos, las ficotoxinas marinas pueden tener una gran aplicabilidad clínica debido a su gran diversidad y, por tanto, a los múltiples mecanismos de acción y respuestas celulares que desencadenan.

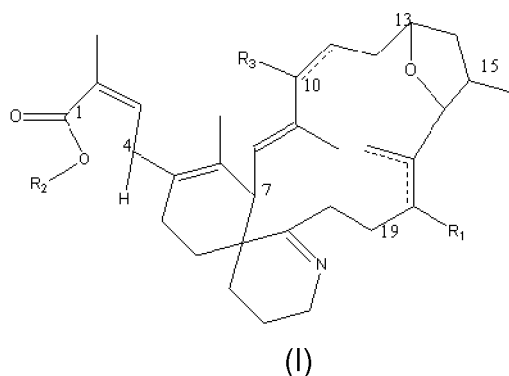
Una ficotoxina marina descubierta recientemente, es la gimnodimina. Esta fue descrita por primera vez en 1994, e inicialmente se creyó que era un compuesto producido por el dinoflagelado *Gymnodinium*. Posteriormente se descubrió que dicha toxina era producida por un complejo formado por dos especies de dinoflagelados, que en la actualidad se ha renombrado como *Kalenia selliformis*.

Esta ficotoxina presenta una estructura con un anillo imina espirocíclico, y se engloba dentro de las iminas cíclicas. Su principal diana farmacológica es el sistema nervioso central, ya que su toxicidad es mucho mayor al ser introducida intracerebralmente que intraperitonealmente. Por otro lado, este compuesto reduce mucho su toxicidad cuando su administración es oral (Munday *et al.* 2004. *Toxicon*, 44: 173-178). La gimnodimina ejerce sus efectos tóxicos mediante la unión con alta afinidad a los receptores nicotínicos de acetilcolina, sobre los cuales ejerce un efecto bloqueante (Kharrat *et al.* 2008. *Journal of Neurochemistry*; 107: 952-963; Dragunow *et al.* 2005, *Environmental Toxicology and Pharmacology*; 20: 305-312).

Por lo tanto, existe la necesidad de encontrar un tratamiento efectivo que actúe sobre los 2 grandes elementos implicados en la progresión de enfermedades como el Alzheimer como son los depósitos de β -amiloide y la hiperfosforilación de tau.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere al uso de un compuesto de estructura química (I):



para la elaboración de un medicamento, preferiblemente para la prevención y/o el tratamiento de procesos patológicos relacionados con tau y/o β -amiloide como por ejemplo el Alzheimer.

En los ejemplos de la presente invención, para ver el efecto de la gimnodimina en la sobreexpresión de beta-amiloide y en la hiperfosforilación de tau, se utilizan cultivos *in vitro* de neuronas corticales obtenidas a partir de ratones triple transgénicos, que sobreexpresan de forma simultánea los transgenes humanos para presenilina (PS1_{M146V}), pro-

ES 2 357 284 B2

teína precursora de β -amiloide (APP_{Swe}) y proteína tau (τ_{P301L}). La sobreexpresión simultánea de estos 3 elementos está relacionada con la acumulación de β -amiloide y formación de placas neurofibrilares, y por lo tanto, estas células, resultan útiles para el estudio de la eficacia de compuestos frente a enfermedades relacionadas con incrementos en tau y β -amiloide. En los ejemplos de la presente invención se demuestra que el tratamiento con gimnodimina provoca una

5

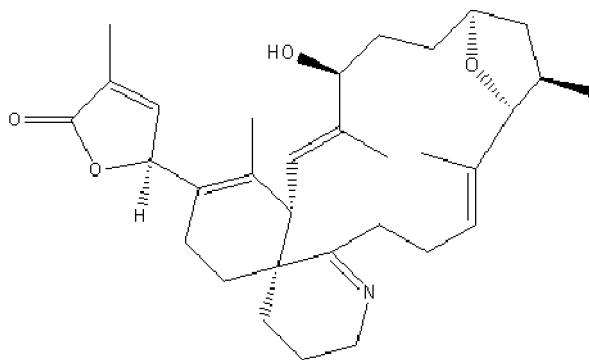
disminución de β -amiloide y de tau fosforilada tanto en el residuo Ser 202, como en los residuos Thr212 y Ser214.

Por otro lado, cabe resaltar que en la presente invención también se demuestra que la gimnodimina, aunque se ha descrito como una toxina, a una concentración máxima de 100 nM, no provoca una reducción en la viabilidad celular en el modelo neuronal utilizado para su estudio.

10

La gimnodimina es un compuesto que pertenece al grupo de iminas cíclicas, y de estructura química (II). Su fórmula es $C_{32}H_{45}NO_4$, y su peso molecular es de aproximadamente 507 Daltons. Se trata de una toxina de origen marino, producido por un complejo de dos especies de dinoflagelados denominado *Kalenia selliformis*.

15



20

25

30

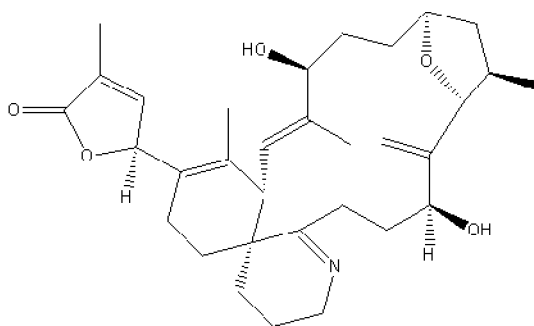
(II)

35

Se ha descrito que la activación de los receptores nicotínicos mediante la administración de nicotina, puede ayudar en la protección frente a la enfermedad. Sorprendentemente, la gimnodimina, se une con alta afinidad a los receptores nicotínicos de acetilcolina, provocando su bloqueo.

La gimnodimina presenta descritos dos análogos denominados gimnodimina B (estructura química III) y gimnodimina C (estructura química IV), y de fórmula $C_{32}H_{45}NO_5$ que presentan una estructura química similar a la gimnodimina, y que difieren entre ellas en su quiralidad.

40

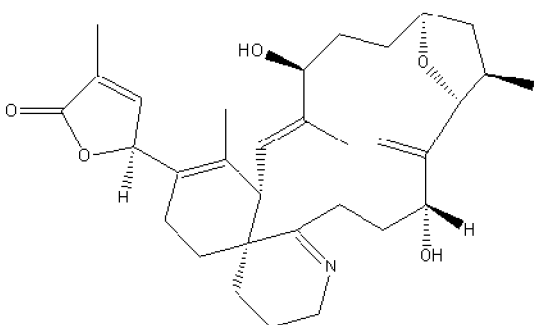


45

50

(III)

55



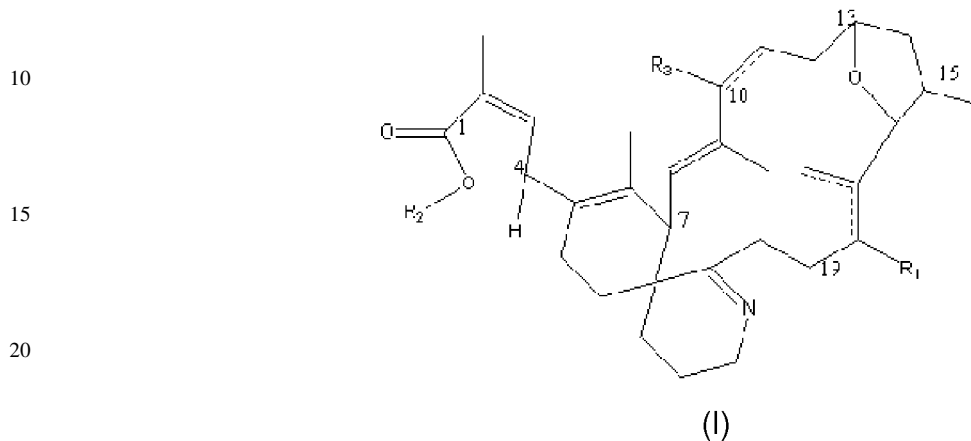
60

65

(IV)

ES 2 357 284 B2

Por otro lado, esta molécula puede ser sometida a modificaciones que den lugar a diversos derivados que pueden presentar una funcionalidad similar. Todos estos compuestos, tanto los análogos como los derivados, presentan una estructura química común (I) con la gimnodimina, en la cual ---- representa un posible doble enlace, R₁ puede ser un hidrógeno, o un grupo hidroxilo (OH) o alcoxilo (OR), R₂ es un hidrógeno o no existe y el oxígeno se une al carbono 4 formando un anillo furanona y R₃ es un hidrógeno, un grupo hidroxilo (OH) o un grupo alcoxilo (OR).



De esta forma, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de estructura química (I) en donde:

---- representa un posible doble enlace,

R₁ puede ser un hidrógeno, o un grupo hidroxilo (OH) o alcoxilo (OR),

R₂ es hidrógeno, o no existe y el oxígeno se une al carbono 4 dando lugar a un anillo furanona, y

R₃ es un hidrógeno, un grupo hidroxilo (OH) o un grupo alcoxilo (OR),

para la elaboración de un medicamento.

En el caso de la gimnodimina, existe un doble enlace entre los carbonos 17 y 18, R₁ es un hidrógeno, R₂ no existe por lo que el oxígeno se encuentra unido al carbono 4 dando un anillo furanona, y R₃ es un grupo hidroxilo (OH). Por ello, una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de estructura química (I) donde:

hay un doble enlace entre los carbonos 17 y 18,

R₁ es un hidrógeno,

R₂ no existe por lo que el oxígeno se une al carbono 4 formando un anillo furanona, y

R₃ es un grupo hidroxilo (OH),

para la elaboración de un medicamento.

El término “análogo” tal y como aquí se utiliza, se refiere a una sustancia química similar a otra sustancia química en estructura y/o función. Por ejemplo, pueden considerarse análogos de la gimnodimina, aunque sin limitarse, la gimnodimina B y la gimnodimina C.

En la presente invención se entiende por “derivado”, aquel compuesto que se produce a partir de otro mediante modificaciones del mismo, y que presenta una funcionalidad similar. Estas modificaciones se pueden realizar por ejemplo, aunque sin limitarse, mediante métodos químicos, físicos, microbiológicos o farmacológicos.

El incremento tanto en β -amiloide como en la fosforilación de tau por separado o de forma conjunta, suele estar asociado a un proceso patológico. Estos procesos están relacionados fundamentalmente con el sistema nervioso, ya que su acumulación se da básicamente en neuronas, provocando su degeneración. La principal patología relacionada con estos dos elementos de forma conjunta, es la enfermedad de Alzheimer. Esta enfermedad cursa con incremento en los depósitos de β -amiloide, así como con hiperfosforilación de la proteína tau, lo que da lugar a marañas neurofibrilares que provocan la degeneración progresiva de neuronas y por tanto deterioros cognitivos y motores. Como se demuestra

en los ejemplos, la gimnodimina, es capaz de reducir la sobreexpresión de β -amiloide y la hiperfosforilación de tau, pero no presenta efectos sobre ninguno de estas estructuras sino se encuentran alteradas. Esto indica que estos compuestos son útiles para el tratamiento de patologías relacionadas con el incremento en la expresión de β -amiloide o hiperfosforilación de tau tanto de forma independiente como de forma conjunta. Por tanto, una realización preferida de este aspecto de la invención, se refiere al uso de un compuesto de estructura química (I) para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una patología relacionada con el incremento de β -amiloide y/o hiperfosforilación de tau. Una realización más preferida se refiere al uso del compuesto de estructura química (II) para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una patología relacionada con el incremento de β -amiloide y/o hiperfosforilación de tau.

Se entiende por “patología relacionada con el incremento de β -amiloide” en la presente invención todas aquellas patologías que cursan, bien con un incremento en los niveles de la proteína precursora de β -amiloide, o bien con un aumento en el procesamiento anómalo de dicha proteína, aumentando la cantidad insoluble y dando lugar por tanto a un incremento tanto en tamaño como en cantidad, de los depósitos de β -amiloide intra o extracelular. Dentro de estas patologías se encuentran por ejemplo, aunque sin limitarse, esclerosis lateral amiotrófica, síndrome de Down, demencia vascular, angiopatía amiloidea cerebral relacionada con proteínas priónicas y enfermedad de Creutzfeldt-Jacobs. Por esto, una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de estructura química(I) para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una patología relacionada con el incremento de β -amiloide que se selecciona de la lista que comprende: esclerosis lateral amiotrófica, síndrome de Down, demencia vascular, angiopatía amiloidea cerebral relacionada con proteínas priónicas y enfermedad de Creutzfeldt Jacobs. Una realización más preferida se refiere al uso de un compuesto de estructura química (II) para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una patología relacionada con el incremento de β -amiloide que se selecciona de la lista que comprende: esclerosis lateral amiotrófica, síndrome de Down, demencia vascular, angiopatía amiloidea cerebral relacionada con proteínas priónicas y enfermedad de Creutzfeldt-Jacobs.

Se entiende por “patología relacionada con la hiperfosforilación de tau” en la presente invención, todas aquellas patologías que cursan con un aumento en la expresión de tau, lo que conlleva un aumento en la cantidad de proteína fosforilada, o una hiperfosforilación de dicha proteína, aun sin alteración en la expresión, ya que ambas situaciones conllevan un incremento en el tamaño o número de marañas neurofibrilares producidas por la agregación anómala de tau fosforilada. Dentro de las patologías relacionadas con la hiperfosforilación de tau se encuentran por ejemplo, aunque sin limitarse, demencia frontotemporal, parálisis supranuclear progresiva, demencia asociada a tauopatía sistémica múltiple, degeneración corticobasal, y degeneración lobular frontotemporal o enfermedad de Pick. Por ello, otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de estructura química (I) para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una patología relacionada con la hiperfosforilación de tau que se selecciona de la lista que comprende: demencia frontotemporal, parálisis supranuclear progresiva, demencia asociada a tauopatía sistémica múltiple, degeneración corticobasal, y degeneración lobular frontotemporal o enfermedad de Pick. Una realización más preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de estructura química (II) para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una patología relacionada con la hiperfosforilación de tau que se selecciona de la lista que comprende: demencia frontotemporal, parálisis supranuclear progresiva, demencia asociada a tauopatía sistémica múltiple, degeneración corticobasal, y degeneración lobular frontotemporal o enfermedad de Pick.

Por otro lado, existen multitud de otras enfermedades que cursan con alteraciones simultáneas en ambas proteínas además del Alzheimer, como por ejemplo, aunque sin limitarse, trastornos o déficits cognitivos moderados, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis tipo Dutch, angiopatía amiloidea cerebral, demencia asociada a la enfermedad de Parkinson, enfermedad neurodegenerativa por cuerpos de Lewy difusos, degeneración corticobasal, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia de gránulos argirófilos y enfermedad familiar de Gerstmann-Straussler-Scheinker. Por esto, otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de estructura química (I) para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una patología relacionada con el incremento de β -amiloide y hiperfosforilación de tau que se selecciona de la lista que comprende: Alzheimer, trastornos o déficits cognitivos moderados, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis tipo Dutch, angiopatía amiloidea cerebral, demencia asociada a la enfermedad de Parkinson, enfermedad neurodegenerativa por cuerpos de Lewy difusos, degeneración corticobasal, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia de gránulos argirófilos y enfermedad familiar de Gerstmann-Straussler-Scheinker. Una realización más preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de estructura química (II) para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una patología relacionada con el incremento de β -amiloide y hiperfosforilación de tau que se selecciona de la lista que comprende: Alzheimer, trastornos o déficits cognitivos moderados, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis tipo Dutch, angiopatía amiloidea cerebral, demencia asociada a la enfermedad de Parkinson, enfermedad neurodegenerativa por cuerpos de Lewy difusos, degeneración corticobasal, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia de gránulos argirófilos y enfermedad familiar de Gerstmann-Straussler-Scheinker. Se entiende por “trastornos o déficits cognitivos moderados” en la presente invención, aquellas alteraciones de las facultades intelectuales de la persona, entre las que se encuentran, aunque sin limitarse, el deterioro de la orientación, deterioro de la memoria reciente, deterioro del razonamiento, problemas con el cálculo, problemas de lenguaje, alteración de la capacidad de realizar tareas complejas y alteración de la capacidad de programación, que aparecen en estadios iniciales de diferentes enfermedades como por ejemplo, aunque sin limitarse, Alzheimer, esquizofrenia o demencia senil.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica (de aquí en adelante, composición farmacéutica de la invención) que comprende un compuesto de estructura química (I) o de estructura química(II). En una

realización preferida, la composición farmacéutica comprende, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida la composición farmacéutica comprende además otro principio activo. En una realización más preferida de este aspecto de la invención la composición farmacéutica comprende un compuesto de estructura química (I) o de estructura química (II) y además, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, otro principio activo.

La composición de la presente invención puede formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse, en soluciones acuosas o no acuosas, en emulsiones o en suspensiones. Ejemplos de soluciones no acuosas son, por ejemplo, pero sin limitarse, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, o ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Ejemplos de soluciones acuosas, son por ejemplo, pero sin limitarse, agua, soluciones alcohólicas en agua, o medios salinos. Las soluciones acuosas pueden estar tampoadas o no, y pueden tener componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, o similares, o nutrientes, incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas o minerales. Alternativamente, las composiciones pueden prepararse para su administración en forma sólida. Las composiciones pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a: aglutinantes, tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes, tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes, tales como ácido alginico o almidón de maíz; lubricantes, tales como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes, tales como menta o salicilato de metilo.

Tales composiciones y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse, a parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, epidural, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intracardiaca, intramuscular, intranasal, intracraneal, subcutánea, intraorbital, intracapsular, tópica, mediante parches transdérmicos, vía rectal, vía vaginal o uretral, mediante la administración de un supositorio, percutánea, spray nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna, bomba de infusión o vía catéter.

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo o tolerancia, del mamífero. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de la composición farmacéutica de la invención que produzcan el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dicha composición farmacéutica y el efecto terapéutico a conseguir.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra la disminución en los niveles de expresión de β -amiloide intracelular después del tratamiento con gimnodimina. (A) Bandas de western blot en las que se representa la expresión de β -amiloide en cultivos neocorticales de animales silvestres (NoTg), cultivos neocorticales obtenidos a partir de ratones 3xTg-AD (3xTg) y los niveles de péptido β -amiloide en los cultivos neocorticales de ratones 3xTg-AD tratados con gimnodimina (3xTg + Gym), evaluados con el anticuerpo 6E10. La exposición de los cultivos corticales de ratones triple transgénicos a gimnodimina disminuye la sobreexpresión de β -amiloide en este modelo *in vitro*. (B) La cuantificación de los bandos de western blot muestra una disminución significativa de la sobreexpresión de β -amiloide después del tratamiento con gimnodimina (**p<0.005 respecto a la expresión de β -amiloide en cultivos transgénicos, n=3 obtenida de tres experimentos representativos, cada uno realizado en duplicado).

La figura 2 muestra una disminución de los niveles de tau fosforilada en cultivos de neuronas transgénicas tratadas con gimnodimina. (A) Imágenes de western blot, que muestran los niveles de fosforilación de tau empleando el anticuerpo AT8 (reconoce Tau fosforilada en Ser202) en cultivos silvestres (No Tg), cultivos transgénicos (3xTg) y cultivos transgénicos tratados con gimnodimina (3xTg Gym). Datos obtenidos de un experimento representativo. (B) La cuantificación de la expresión de tau fosforilada (marcada con el Anticuerpo AT8), muestra una disminución significativa de la fosforilación de tau en cultivos transgénicos tratados con gimnodimina (*p<0.05, n=3 obtenida de tres experimentos representativos, cada uno realizado en duplicado).

La figura 3 muestra una inhibición de la expresión de tau fosforilada en los residuos Thr212 y Ser 214 (marcada con el anticuerpo AT100) en cultivos de neuronas transgénicas tratadas con gimnodimina. (A) Bandas de western blot mostrando la inmunoreactividad para el anticuerpo AT100 en cultivos silvestres (No Tg), cultivos transgénicos (3xTg) y cultivos transgénicos tratados con gimnodimina (3xTg Gym). Datos obtenidos de un experimento representativo. (B) La cuantificación de la expresión de tau fosforilada (marcada con el Anticuerpo AT100), muestra una disminución significativa de la fosforilación de tau en cultivos transgénicos tratados con gimnodimina (***p<0.001, n=3 obtenida de tres experimentos representativos, cada uno realizado en duplicado).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1

Determinación de la viabilidad celular del tratamiento con gimnodimina

5 Para la realización de los experimentos de la presente invención se utiliza bien un modelo neuronal cortical *in vitro* con sobreexpresión simultánea de tau y β -amiloide obtenido a partir de un modelo de enfermedad de Alzheimer en ratones triple transgénicos (3xTg-AD o 3xTg) obtenibles mediante el procedimiento detallado en la solicitud internacional WO2003/053136 y proporcionados por los titulares de dicha solicitud, o bien un modelo neuronal cortical *in vitro* obtenido de ratones no transgénicos (no Tg). El modelo neuronal triple transgénico presenta sobreexpresión de presenilina (PS1_{M146V}), proteína precursora de β -amiloide (APP_{Swe}) y proteína tau (tau_{p301L}), lo que da lugar a un modelo de Alzheimer con sobreexpresión de β -amiloide e hiperfosforilación de tau.

15 En la presente invención los cultivos corticales primarios se obtienen a partir de embriones de ratones 3xTg-AD de 15-17 días de gestación y los cultivos silvestres se obtienen de embriones de ratones control no 3xTg de la misma cepa. El efecto de los compuestos empleados en esta invención sobre la viabilidad celular se realiza mediante un ensayo de fluorescencia empleando el indicador de viabilidad Alamar Blue. Para la realización del ensayo se utilizan cultivos corticales primarios sembrados en placas de 96 pocillos. Las células neuronales se incuban con gimnodimina, la cual se añade en el medio de cultivo a diferentes concentraciones y se determina su efecto sobre la viabilidad neuronal a diferentes tiempos de tratamiento *in vitro*. La concentración máxima de gimnodimina evaluada fue de 100 nM y la concentración de alamar blue es del 10%. El volumen de reacción empleado es de 200 μ l. La fluorescencia se mide a longitudes de onda de 530 nm (excitación) y 590 nm (emisión). Como se muestra en la tabla 1, los compuestos objeto de la presente invención no modifican la viabilidad celular *in vitro*.

TABLA 1

25 *Viabilidad de las neuronas corticales después del tratamiento con diferentes concentraciones de gimnodimina durante 72 horas en cultivo. Los datos son medias \pm error standard de tres experimentos independientes y se expresan como porcentaje respecto del control*

	% respecto al control
Control	100 \pm 5.9
Gimnodimina 2.5 nM	97.0 \pm 4.9
Gimnodimina 5 nM	102.8 \pm 0.3
Gimnodimina 10 nM	105.6 \pm 5.9
Gimnodimina 25 nM	105.1 \pm 1.09
Gimnodimina 50 nM	102.9 \pm 1.4
Gimnodimina 100 nM	101.8 \pm 1.7

Ejemplo 2

Efecto de la gimnodimina en la sobreexpresión de β -amiloide intracelular y la hiperfosforilación de tau

55 Para la determinación del efecto de la gimnodimina en la sobreexpresión de β -amiloide e hiperfosforilación de tau se emplean técnicas de western blot. Los cultivos neuronales primarios son tratados con gimnodimina 50 nM entre los días 3 y 7 de cultivo. Posteriormente las células se procesan siguiendo los protocolos habituales para western blot. Para los estudios de western blot la expresión proteica se evaluó empleando los anticuerpos primarios anti- β -amiloide 6E10 a una dilución 1:500, anti-Tau AT8 (Tau fosforilada en Ser 202, dilución 1:1000), y anti-Tau AT100 (Tau fosforilada en Thr 212 y Ser 214, dilución 1:1000). Para los ensayos de western blot los cultivos neuronales tratados con gimnodimina se lavan con tampón fosfato frío y se lisan en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7.4) que contiene NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 1% Tritón X-100, DTT 2 mM, PMSF 2.5 mM, aprotinina 40 mg/ml, leupeptina 4 mg/ml, NaF 5 mM, Na₃VO₄ 1 mM, 1 mg/ml pepstatina A y 1 mg/ml benzamidina. La concentración proteica total se determina mediante el método de Bradford, empleando albúmina bovina como estándar. Las alícuotas de los lisados celulares conteniendo 20 μ g totales de proteína se cargan en tampón de carga (Tris-HCl 50 mM, ditioneitol 100 mM, 2% SDS, 20% glicerol, 0.05% azul de bromofenol, pH 6.8), las proteínas se separan mediante electroforesis y se transfieren a membranas de PVDF. Las membranas se incuban con los anticuerpos primarios se lavan y posteriormente

ES 2 357 284 B2

se incuban con un anticuerpo secundario unido a HRP, la inmunoreactividad se detecta mediante quimioluminiscencia. Las mismas membranas se reincuban con un anticuerpo primario anti β -actina para realizar la corrección de los datos en función del contenido proteico de las muestras. En estos ensayos se demuestra que el tratamiento con gimnodimina reduce la sobreexpresión de β -amiloide (fig. 1) y de tau fosforilada en el residuo Ser 202 (fig. 2) o en los residuos Thr 212 y Ser 214 (fig. 3) en neuronas obtenidas a partir de ratones triple transgénicos.

Ejemplo 3

Efecto de los compuestos de la presente invención sobre la fosforilación basal de tau en neuronas control

Para la determinación del efecto de la gimnodimina en la fosforilación basal de tau se emplean técnicas de western blot. Se utiliza un modelo neuronal cortical *in vitro* obtenido de ratones no transgénicos. Los cultivos neuronales, y el procesamiento de muestras se llevan a cabo de la misma forma que en el ejemplo anterior. Los datos obtenidos se corrigen con la cantidad de β -actina en función del contenido proteico de las muestras. En los datos obtenidos se demuestra que el tratamiento de las neuronas control con gimnodimina no afecta a la cantidad basal de tau total (determinada con el anticuerpo Tau46, que reconoce diferentes isoformas tanto de tau fosforilada como tau no fosforilada, tabla 2) ni al nivel basal de de tau fosforilada en el residuo Ser 202 (tabla 3).

TABLA 2

Efecto de la gimnodimina sobre los niveles basales de tau total en neuronas control. Los datos son medias \pm error standard de dos experimentos independientes y se expresan como porcentaje respecto al control no tratado

	% respecto al control
Control	100 \pm 2.3%
Control + gimnodimina 50nM	111 \pm 3.9 %

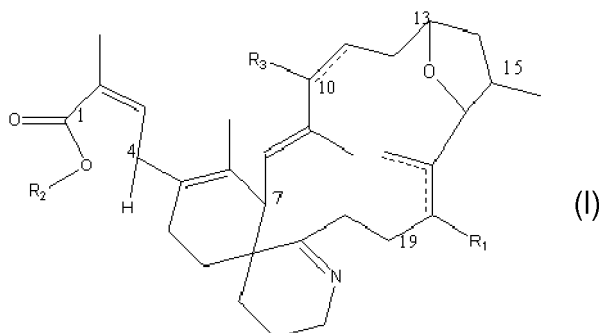
TABLA 3

Efecto de la gimnodimina sobre los niveles de tau fosforilada en el residuo Ser 202 en neuronas control. Los datos se expresan como porcentaje respecto al control no tratado

	% respecto al control
Control	100%
Control + gimnodimina 50nM	95%

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de estructura química (I)



(I)

donde:

----- representa un posible doble enlace,

R₁ puede ser un hidrógeno, o un grupo hidroxilo (OH) o alcoxilo (OR),

R₂ es hidrógeno o no existe y el oxígeno se une al carbono 4 formando un anillo furanona,

R₃ es un hidrógeno, un grupo hidroxilo (OH) o un grupo alcoxilo (OR),

para la elaboración de un medicamento.

2. Uso de un compuesto según la reivindicación 1 donde:

hay un doble enlace entre los carbonos 17 y 18,

R₁ es un hidrógeno,

R₂ no existe por lo que el oxígeno se une al carbono 4 formando un anillo furanona, y

R₃ es un grupo hidroxilo (OH).

3. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una patología relacionada con el incremento de β -amiloide y/o hiperfosforilación de tau.

4. Uso de un compuesto según la reivindicación 3 donde la patología relacionada con el incremento de β -amiloide se selecciona de la lista que comprende: esclerosis lateral amiotrófica, síndrome de Down, demencia vascular, angiopatía amiloidea cerebral relacionada con proteínas priónicas y enfermedad de Creutzfeldt Jacobs.

5. Uso de un compuesto según la reivindicación 3 donde la patología relacionada con hiperfosforilación de tau se selecciona de la lista que comprende: demencia frontotemporal, parálisis supranuclear progresiva, demencia asociada a tauopatía sistémica múltiple, degeneración corticobasal y degeneración lobular frontotemporal o enfermedad de Pick.

6. Uso de un compuesto según la reivindicación 3 donde la patología relacionada con el incremento de β -amiloide y hiperfosforilación de tau se selecciona de la lista que comprende: Alzheimer, trastornos o déficits cognitivos moderados, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis tipo Dutch, angiopatía amiloidea cerebral, demencia asociada a la enfermedad de Parkinson, enfermedad neurodegenerativa por cuerpos de Lewy difusos, degeneración corticobasal, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia de gránulos argirófilos y enfermedad familiar de Gerstmann-Straussler-Scheinker.

7. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.

8. Composición farmacéutica según la reivindicaciones 7 que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

9. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 7 ó 8 que además comprende otro principio activo.

FIG. 1

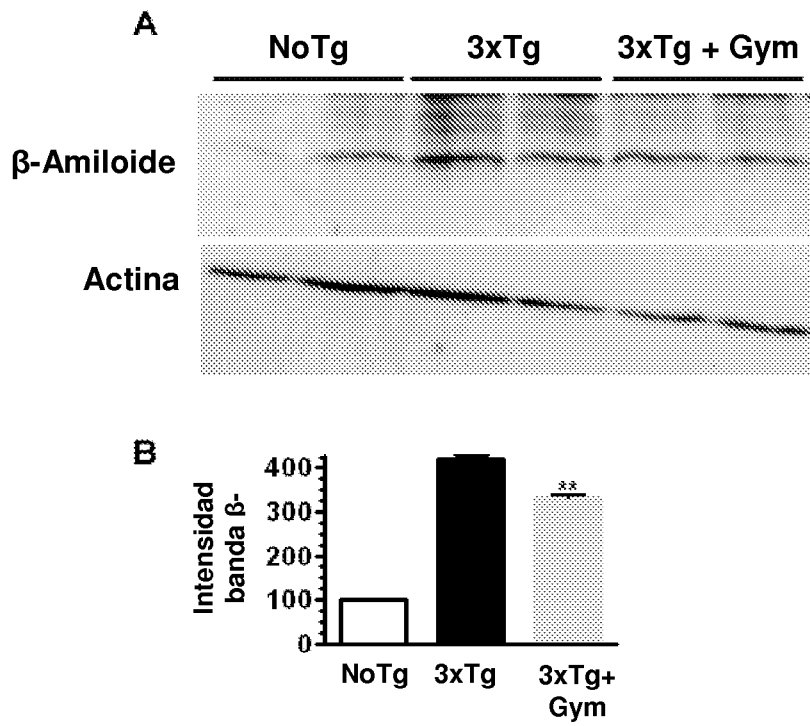


FIG. 2

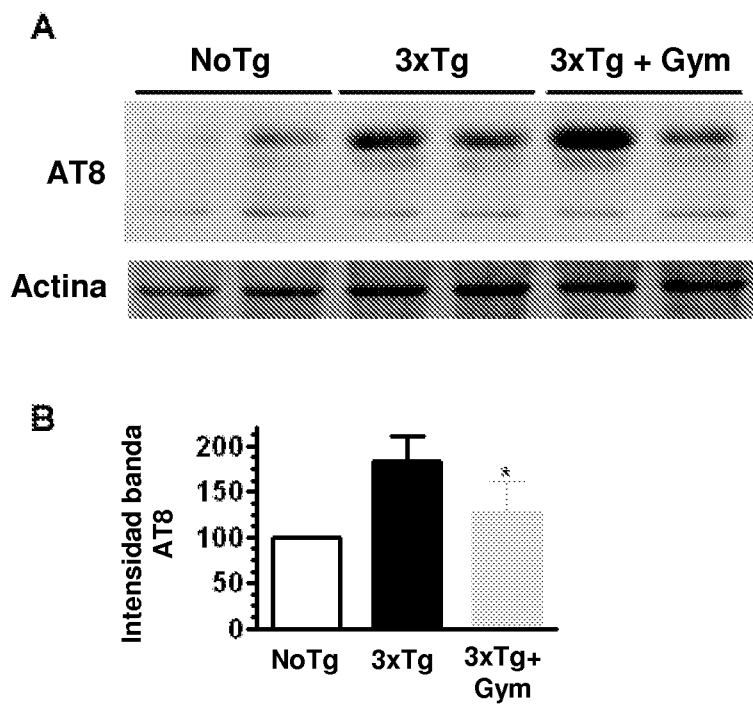
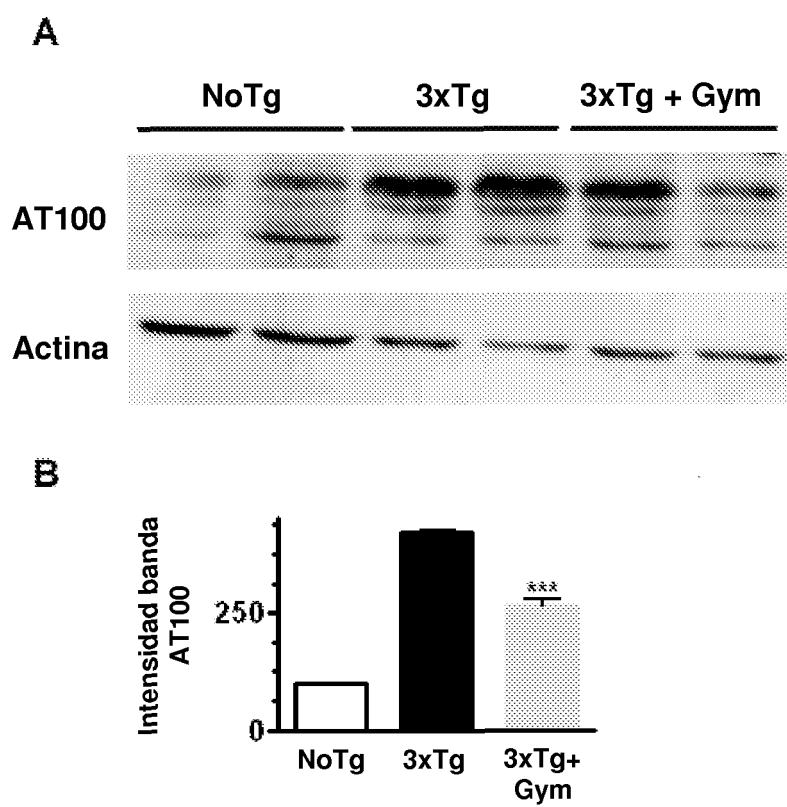


FIG. 3





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 200930763

②² Fecha de presentación de la solicitud: 30.09.2009

③² Fecha de prioridad: **00-00-0000**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: **A61K31/4353** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	TRZOSS, M. et al.: "Synthesis of spirocyclic imines: key phamacophores in the shellfish toxins spiroolidesand gymnodimine", Synlett, 2003, nº 13, páginas 2042-2046, ISSN 0936-5214, figura 1.	1-9
A	SEKI, T. et al.: "Gymnodimine, a new marine toxin of unprecedented structure isolated from new Zealand oysters and the dinoflagellate, Gymnodinium sp." Tetrahedron Letters, 1995, vol. 36, nº 39, páginas 7093-7096, ISSN 0040-4039. Página 7093 y figura 2.	1-9
A	MOUNTFORT, D. et al.: "Enhancement of growth and gymnodimine production by the marine dinoflagellate, karenia selliformis". Harmful Algae, 2006, vol. 5, páginas 658-664, página 658, columna 2, página 659, columna 1.	1-9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº: TODAS

Fecha de realización del informe

22.11.2010

Examinador

H. Aylagas Cancio

Página

1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

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

A61K

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

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

Fecha de Realización de la Opinión Escrita:

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-9	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-9	SI
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	TRZOSS, M. ET AL.: "Synthesis of spirocyclic imines: key pharmacophores in the shellfish toxins spirolides and gymnodimine", Synlett, 2003, nº 13, páginas 2042-2046, ISSN 0936-5214.	
D02	SEKI, T. ET AL.: "Gymnodimine, a new marine toxin of unprecedented structure isolated from New Zealand oysters and the dinoflagellate, <i>Gymnodinium</i> sp." Tetrahedron Letters, 1995, vol. 36, nº 39, páginas 7093-7096, ISSN 0040-4039.	
D03	MOUNTFORT, D. ET AL.: "Enhancement of growth and gymnodimine production by the marine dinoflagellate, <i>Karenia selliformis</i> ". Harmful Algae, 2006, vol. 5, páginas 658-664.	

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

La presente solicitud se refiere al uso de compuestos de estructura química de fórmula I, entre los que se encuentra la gimnodimina, toxina de origen marino, producida por un complejo de dos especies de dinoflagelados denominada *Karenia selliformis*. Se utilizan para la elaboración de un medicamento, preferiblemente para la prevención o el tratamiento de procesos patológicos relacionados con las proteínas tau y β -amiloide como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer.

Los documentos D1-D3 se refieren a la obtención y síntesis de la gimnodimina a partir de dinoflagelados marinos.

Ninguno de los documentos citados, ni ninguna combinación relevante de ellos revela el uso de dichos compuestos en los procesos patológicos relacionados con las proteínas tau y β -amiloide.

En consecuencia, la materia técnica de las reivindicaciones 1-9 de la solicitud es nueva, implica actividad inventiva y tiene aplicación industrial según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.