



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 357 934**

② Número de solicitud: 200930866

⑤ Int. Cl.:  
**A61K 31/365** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **19.10.2009**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **04.05.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**04.05.2011**

⑦ Solicitante/s:  
**Universidade de Santiago de Compostela  
Edificio CACTUS-CITT - Campus Sur  
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

⑦ Inventor/es: **Botana López, Luis Miguel;  
Alonso López, Eva y  
Vale González, Carmen**

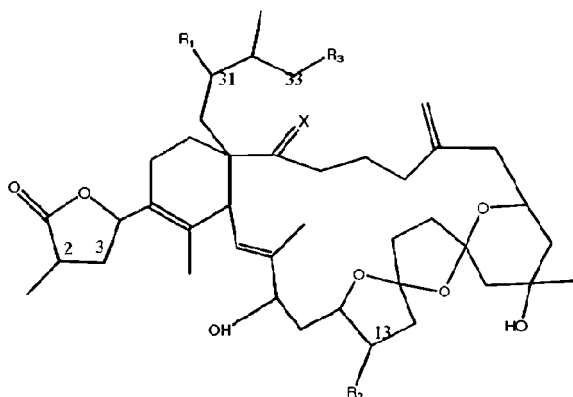
⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Uso de un espirólido, análogos y derivados para el tratamiento y/o la prevención de patologías relacionadas con las proteínas tau y  $\beta$ -amiloide.**

⑦ Resumen:

Uso de un espirólido, análogos y derivados para el tratamiento y/o la prevención de patologías relacionadas con las proteínas tau y  $\beta$ -amiloide.

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



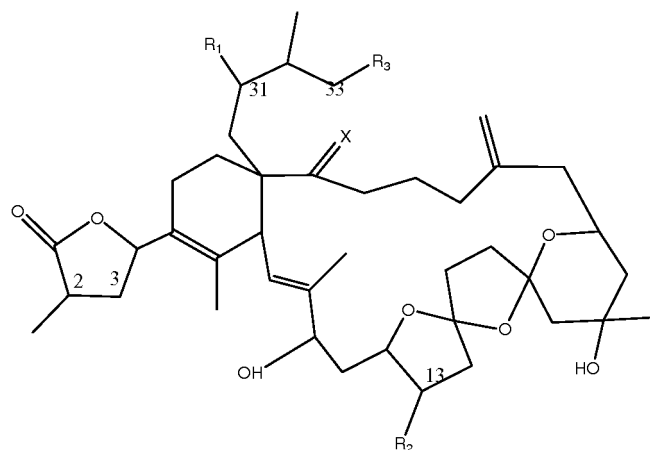
para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una patología relacionada con el incremento de la proteína  $\beta$ -amiloide y/o hiperfosforilación de la proteína tau, respecto de un control, donde dicho compuesto espirólido se administra en una cantidad necesaria para alcanzar una concentración en suero igual o menor de 50 nM. Preferiblemente la cantidad se administra en una cantidad necesaria para alcanzar una concentración en suero de entre 0,5 nM y 50 nM.

ES 2 357 934 A1

## DESCRIPCIÓN

Uso de un espirólido, análogos y derivados para el tratamiento y/o la prevención de patologías relacionadas con las proteínas tau y  $\beta$ -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 para la prevención y/o tratamiento de una patología relacionada con el incremento de la proteína  $\beta$ -amiloide y/o hiperfosforilación de la proteína tau, respecto de un control, donde dicho compuesto espirólido se administra en una cantidad necesaria para alcanzar una concentración en suero igual o menor de 50 nM. Preferiblemente la cantidad se administra en una cantidad necesaria para alcanzar una concentración en suero de entre 0,5 nM y 50 nM.

## 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  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A), más concretamente por las formas  $\beta$ A40 y  $\beta$ A42, el cual es generado por la ruptura proteolítica de la proteína precursora de  $\beta$ -amiloide (APP) de forma secuencial por  $\beta$ -secretasas y  $\gamma$ -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  $\beta$ -amiloide por un procesamiento anómalo de la proteína precursora de  $\beta$ -amiloide (APP), éste se vuelve insoluble dando lugar a la formación de los depósitos. Diversas mutaciones en la proteína precursora de  $\beta$ -amiloide se encuentran relacionadas con la enfermedad de Alzheimer debido al incremento o alteración de la transformación de APP en  $\beta$ -amiloide. En pacientes con enfermedad de Alzheimer, los agregados de  $\beta$ -amiloide aparecen en regiones cerebrales específicas, desencadenando una respuesta inflamatoria, muerte neuronal y deterioro cognitivo progresivo. Este péptido  $\beta$ -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 micro-

túbulos 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  $\beta$ -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.

Los espirólidos fueron descritos por primera vez en 1991 durante una monitorización de toxinas de rutina en bivalvos en Nueva Escocia, Canadá. Estos compuestos macrocíclicos fueron incluidos debido a su estructura dentro del grupo de toxinas de las iminas cíclicas. Estos compuestos se caracterizan por la presencia de un grupo dimetil en el séptimo anillo. *Alexandrium ostenfeldii* (esta especie también se ha denominado *Goniaulax ostenfeldii*, *Gessnerium ostenfeldii*, *Triadinium ostenfeldii* o *Protogonyaulax ostenfeldii*) fue identificado como el microorganismo responsable de la producción de esta toxina, es una especie ampliamente distribuida. Esta toxina se caracteriza por un efecto tóxico letal rápido cuando se administra por inyección intraperitoneal en roedores y un efecto mucho menos tóxico cuando la administración es por vía oral. Hay que destacar que no se conocen casos de toxicidad en humanos provocados por la ingestión de este compuesto. Las investigaciones con este compuesto demuestran que su diana es el sistema nervioso central, principalmente las áreas del hipocampo y el tronco encefálico, apareciendo afectadas las neuronas, astrocitos y células endoteliales. Se ha descrito que las dianas celulares son los receptores muscarínicos y nicotínicos, en concreto los subtipos mAChR1, mAChR4, mAChR5, nAChR $\alpha$ 2 y nAChR $\alpha$ 5.

Es conocido que el uso de espirólidos como el 13-desmetil espirólido produce efectos tóxicos en las células neuronales de ratón o rata a una concentración de 37-40  $\mu$ g por Kg de peso corporal sólo si se administra por vía intraperitoneal, no es así por vía oral (Santokh *et al.*, 2003. *NeuroToxicology*, 24: 593-604). Tampoco se ha relacionado la administración de espirólidos con el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la sobreexpresión de la proteína  $\beta$ -amiloide y/o con la hiperfosforilación de la proteína tau.

**Descripción de la invención**

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

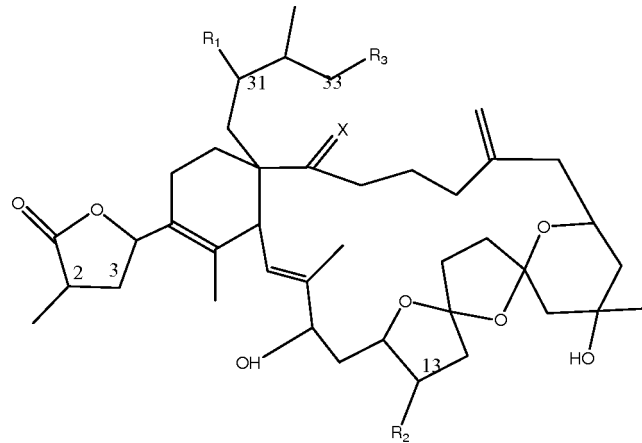
5

10

15

20

25



(I)

30

para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una patología relacionada con el incremento de la proteína  $\beta$ -amiloide y/o hiperfosforilación de la proteína tau, respecto de un control, donde dicho compuesto espirólido se administra en una cantidad necesaria para alcanzar una concentración en suero igual o menor de 50 nM.

35

En los ejemplos de la presente invención, para demostrar el efecto de los espirólidos en la sobreexpresión de la proteína beta-amiloide ( $\beta$ -amiloide) y en la hiperfosforilación de la proteína 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<sub>M146V</sub>), proteína precursora de  $\beta$ -amiloide (APP<sub>Swe</sub>) y proteína tau (tau<sub>P301L</sub>). La sobreexpresión simultánea de estos 3 elementos está relacionada con la acumulación de  $\beta$ -amiloide y con la 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 los niveles de las proteínas tau y  $\beta$ -amiloide. En los ejemplos de la presente invención se demuestra que el tratamiento con espirólidos provoca una disminución de la proteína  $\beta$ -amiloide y de la proteína tau fosforilada tanto en el residuo Ser 202, como en los residuos Thr212 y Ser214.

45

En la presente invención se demuestra cómo la administración de cantidades de espirólidos más bajas que las dosis a las que dicho compuesto es citotóxico, produce el mismo efecto técnico que a dosis tóxicas, demostrando de esta manera que la disminución de los niveles de las proteínas tau y  $\beta$ -amiloide puede llevarse a cabo por medio de la administración de una cantidad de espirólidos que reduce considerablemente los efectos adversos de una administración excesiva. Es decir, en la presente invención se asientan las bases del régimen de administración de los espirólidos para el tratamiento de una patología relacionada simultáneamente con el incremento de la proteína  $\beta$ -amiloide y/o hiperfosforilación de la proteína tau. En este sentido, se demuestra que dicha administración no provoca una reducción en la viabilidad celular en el modelo neuronal utilizado para su estudio.

55

Concretamente los inventores han demostrado (véase en el apartado de ejemplos) que la administración de espirólidos a una concentración de 0,5 nM produce un efecto sorprendente en la reducción de la proteína  $\beta$ -amiloide e hiperfosforilación de la proteína tau, aún siendo 100 veces menor que la concentración límite tóxica, es decir, una concentración de 500 pM es capaz de producir efectos beneficiosos en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la sobreexpresión de la proteína  $\beta$ -amiloide e hiperfosforilación de la proteína tau.

60

Por tanto, en la presente invención se proporciona una solución al tratamiento efectivo de enfermedades neurodegenerativas relacionadas con sobreexpresión de la proteína  $\beta$ -amiloide y/o la hiperfosforilación de la proteína tau, que son los elementos más relevantes implicados en la progresión de enfermedades como el Alzheimer.

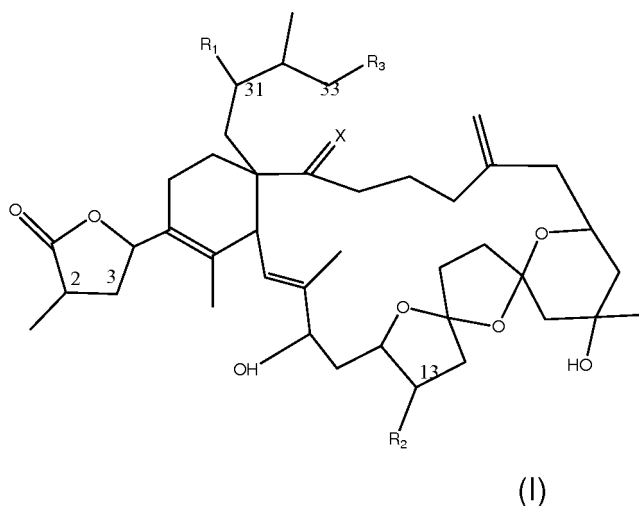
65

Los espirólidos son iminas macrocíclicas farmacológicamente activas que se aislaron y caracterizaron por primera vez en extractos lipofílicos de vieira y vísceras de mejillón. Posteriormente se determinó que el origen biogénico era el microorganismo dinoflagelado *Alexandrium ostenfeldii* (Esta especie también se ha denominado *Goniaulax ostenfeldii*, *Gessnerium ostenfeldii*, *Triadinium ostenfeldii* o *Protogonyaulax ostenfeldii*).

## ES 2 357 934 A1

El espirólido de la presente invención puede ser modificado para producir derivados que pueden presentar características físico-químicas similares. Todos estos compuestos, tanto los análogos como los derivados, presentan una estructura química común (I) con el espirólido.

De esta forma, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto espirólido de estructura química (I) para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una patología relacionada con el incremento de la proteína  $\beta$ -amiloide y/o hiperfosforilación de la proteína tau, respecto de un control, donde dicho compuesto espirólido se administra en una cantidad necesaria para alcanzar una concentración en suero igual o menor de 50 nM.



donde:

- $R_1$  puede ser un hidrógeno, o un grupo alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ),
- $R_2$  puede ser un hidrógeno, o un grupo alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ),
- si el  $C_{33}$  no está unido a X y X es O,  $R_3$  es  $NH_2$  y
- si  $C_{33}$  está unido a X entonces  $R_3$  es H y X es N.

Tal como puede observarse en los ejemplos de la presente invención, los resultados mostrados se han obtenido mediante la administración de espirólidos a cultivos celulares *in vitro*. Por tanto, para la administración del compuesto espirólido de la presente invención en un individuo debe llevarse a cabo la extrapolación del rango de concentraciones terapéuticamente efectivas en cultivo *in vitro* a un rango de concentraciones terapéuticamente efectivas en un individuo. El rango de concentraciones terapéuticamente efectivas se refiere al rango en el que se soluciona el problema técnico planteado en la presente invención, es decir, la prevención y/o tratamiento de una patología relacionada con el incremento de la proteína  $\beta$ -amiloide y/o hiperfosforilación de la proteína tau, respecto de un control. Por tanto, debe producirse el mismo efecto técnico. Dicho rango de concentraciones terapéuticamente efectivas puede ser calculado de acuerdo con modelos de extrapolación de resultados *in vitro* a *in vivo* conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, un modelo de extrapolación considera la distribución de los compuestos químicos entre el agua, lípidos y albúmina del suero de la sangre de un individuo. Más concretamente, para dicha extrapolación puede usarse un algoritmo basado en la distribución equilibrada que requiere datos de la unión de la albúmina, el coeficiente de partición octanol-agua (Kow), y la concentración de albúmina así como la fracción de volumen de lípidos, tanto *in vitro* como en el suero de un individuo (Gülden y Seibert, 2003. Toxicology, 189: 211-222).

Las formas de conseguir concentraciones en un rango concreto del compuesto espirólido en suero son conocidas en el estado de la técnica, como por ejemplo, pero sin limitarse, mediante el empleo de formas farmacéuticas de liberación controlada. El compuesto espirólido de la presente invención no está restringido a ningún tipo particular de formulación. Por esta razón, pueden utilizarse varios tipos de formulaciones de tipo liberación controlada o mantenida, tales como, por ejemplo, comprimidos osmóticos, comprimidos con matriz gelatinosa, bolitas recubiertas, etc.

## ES 2 357 934 A1

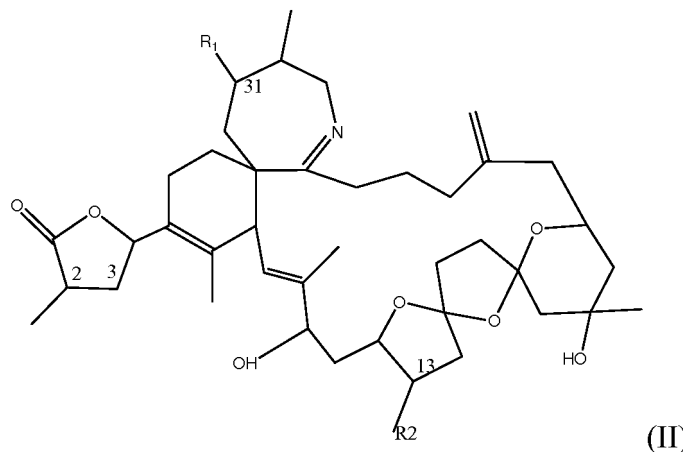
Una realización preferida de la presente invención se refiere al uso de un compuesto espirólido de estructura química (I), donde  $R_1$  puede ser un hidrógeno, o un grupo alquilo ( $C_1$ - $C_4$ );  $R_2$  puede ser un hidrógeno, o un grupo alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ); y el  $C_{33}$  está unido a X, X es N y  $R_3$  es H, es decir, en esta realización preferida, el compuesto espirólido se refiere a un compuesto de estructura química (II):

5

10

15

20



(II)

25

Una realización más preferida se refiere al uso de un compuesto espirólido de estructura química (I), donde  $R_1$  es un grupo metilo,  $R_2$  es un hidrógeno y el  $C_{33}$  está unido a X, X es N y  $R_3$  es H. Este compuesto espirólido se corresponde con el 13-desmetil espirólido.

30

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de un compuesto espirólido de estructura química (I), donde  $R_1$  puede ser un hidrógeno, o un grupo alquilo ( $C_1$ - $C_4$ );  $R_2$  puede ser un hidrógeno, o un grupo alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ); y donde el  $C_{33}$  no está unido a X, X es O y  $R_3$  es  $NH_2$ , es decir en esta realización preferida, el compuesto espirólido se refiere a un compuesto de estructura química (III):

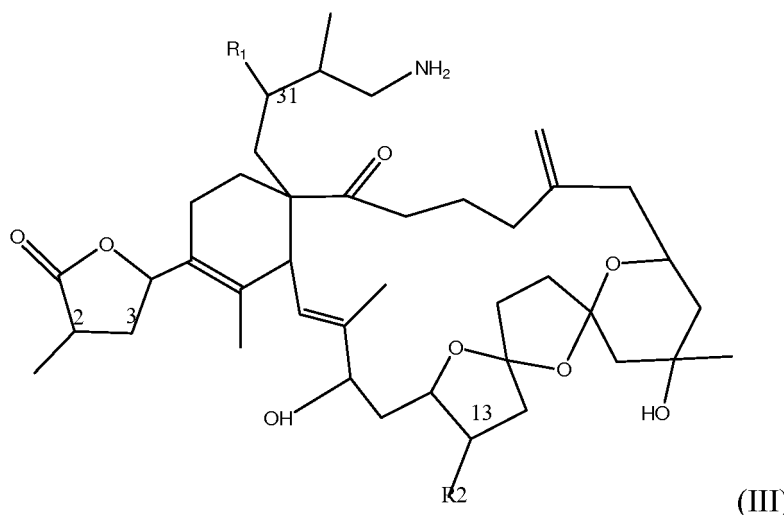
35

40

45

50

55



(III)

60

En adelante, para hacer referencia a cualquiera de los espirólidos descritos anteriormente se puede usar la expresión "espirólidos de la presente invención" o "espirólidos de la invención".

65

El espirólido de la presente invención puede modificarse de forma que se obtengan derivados que presenten una funcionalidad similar. Por otra parte, la presente invención también se refiere a compuestos análogos del espirólido de la invención, donde dichos compuestos tienen una función similar a los espirólidos de la invención.

Tanto los análogos como los derivados, presentan una estructura química común (I) con el espirólido de la invención, en la cual  $R_1$  puede ser un hidrógeno, o un grupo alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ),  $R_2$  puede ser un hidrógeno, o un grupo alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ), si el  $C_{33}$  no está unido a X y X es O,  $R_3$  es  $NH_2$  y si  $C_{33}$  está unido a X entonces  $R_3$  es H y X es N.

## ES 2 357 934 A1

El término “análogo” tal como se emplea en la presente invención, se refiere a una sustancia química similar al espirólido de la invención en estructura y/o función. Por ejemplo, pueden considerarse análogos del espirólido de la presente invención los espirólidos A, B, C, D, E, F, G o el 13-desmetil C.

5 En la presente invención se entiende por “derivado”, aquel compuesto que se produce a partir del espirólido de la invención 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.

10 En la presente invención se administra el compuesto espirólido en diversas concentraciones finales a un cultivo de células neuronales procedentes de ratones 3xTg-AD para la enfermedad de Alzheimer con sobreexpresión simultánea de PS1 M146V, APP Swe y tau P301L. A dichas concentraciones, el espirólido ejerce la función de disminuir los niveles de las proteínas  $\beta$ -amiloide así como la disminución de la hiperfosforilación de la proteína tau. Una concentración de 50 nM de espirólido equivale a 0,35  $\mu\text{g/ml}$ . Asumiendo que la densidad de un cuerpo humano es,  
15 por ejemplo, de 950  $\text{Kg/m}^3$  (0,95  $\text{g/mL}$ ), para mantener una concentración de 50 nM de espirólido en un Kg de “cuerpo” serían necesarios 37  $\mu\text{g}$  es decir, la administración de una cantidad de 37  $\mu\text{g}$  de espirólido por Kg de peso corporal.

20 Este cálculo aproximado de la extrapolación de la cantidad administrada a células cultivadas *in vitro* se lleva a cabo para justificar la elección de la concentración máxima administrada a un individuo, de forma aproximada, pero en ningún caso se pretende que suponga el único medio para calcular la cantidad que debería ser administrada para alcanzar una concentración en suero igual o menor de 50 nM.

25 La administración intraperitoneal de una cantidad mayor de 37  $\mu\text{g}$  por Kg de peso corporal a un ratón reduce los niveles de dichas proteínas pero produce efectos tóxicos en el animal (Santokh *et al.*, 2003. *NeuroToxicology*, 24: 593-604), si bien por vía oral la toxicidad *in vivo* de los espirólidos es considerablemente menor y se ha estimado en 1 mg por Kg de peso corporal (Richard *et al.*, 2000. *Harmful Algal Blooms*: 383-386). Así pues, la administración de un espirólido por debajo de la dosis tóxica más baja según el estado de la técnica (con administración intraperitoneal, es decir, alrededor de 37  $\mu\text{g}$  por Kg de peso corporal [50 nM]), produce igualmente la  
30 disminución de  $\beta$ -amiloide así como la disminución de la hiperfosforilación de la proteína tau pero sin producir efectos citotóxicos. El espirólido puede administrarse a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre.

35 Una realización preferida de la presente invención se refiere al uso del espirólido de la invención, así como sus análogos o derivados, donde dicho compuesto espirólido se administra en una cantidad necesaria para alcanzar una concentración en suero de entre 0,5 nM y 50 nM. Los inventores han demostrado (véase en el apartado de ejemplos) que la administración de espirólidos a una concentración de 0,5 nM produce un efecto sorprendente en la reducción de la proteína  $\beta$ -amiloide e hiperfosforilación de la proteína tau, aún siendo 100 veces menor que la concentración límite tóxica, es decir, una concentración de 500 pM es capaz de producir efectos beneficiosos en el tratamiento  
40 de enfermedades relacionadas con la sobreexpresión de la proteína  $\beta$ -amiloide e hiperfosforilación de la proteína tau.

45 Una realización más preferida se refiere al uso del espirólido de la invención, donde se administra dicha cantidad diariamente, durante al menos 1 día. La cantidad diaria puede administrarse en varias dosis, preferiblemente en una, dos o tres dosis. Según una realización más preferida, la cantidad diaria se administra en una sola dosis.

50 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.

55 El espirólido de la presente invención puede formularse junto a otros compuestos para formar parte de una composición farmacéutica o un medicamento. La composición farmacéutica comprende, además del espirólido de la presente invención, un vehículo farmacéuticamente aceptable, un vehículo farmacéuticamente aceptable u otro principio activo, o cualquiera de las combinaciones del espirólido con el resto de componentes.

60 Dicha composición farmacéutica 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  
65 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, la composición farmacéutica puede 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 microcris-

talina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes, tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes, tales como ácido algínico 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.

5 Cualquier composición farmacéutica descrita anteriormente y/o sus formulaciones puede administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse, oral, parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, epidural, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinoval, 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. Una realización preferida de la presente invención se refiere al uso del espirólido de la invención, donde se administra dicho compuesto por vía oral o intraperitoneal.

15 El incremento tanto en  $\beta$ -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 produce básicamente en neuronas, provocando su degeneración. Por tanto, las patologías son enfermedades neurodegenerativas. 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  $\beta$ -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, espirólido es capaz de reducir la sobreexpresión de  $\beta$ -amiloide y la hiperfosforilación de tau, pero no presenta efectos sobre ninguno de estas estructuras si no se encuentran alteradas. Esto indica que estos compuestos son útiles para el tratamiento de patologías relacionadas con el incremento en la expresión de  $\beta$ -amiloide o hiperfosforilación de tau tanto de forma independiente como de forma conjunta.

25 En la presente invención, el término “prevención y/o tratamiento de una patología relacionada con el incremento de la proteína  $\beta$ -amiloide, respecto de un control” se refiere al incremento de la proteína  $\beta$ -amiloide respecto del valor control de concentración de dicha proteína. El valor control de la concentración de la proteína  $\beta$ -amiloide es el valor de dicha proteína en un individuo sano, es decir, un individuo que no presente síntomas de una patología relacionada con la sobreproducción de la proteína  $\beta$ -amiloide, conocida en el estado de la técnica. El valor control de la concentración de la proteína  $\beta$ -amiloide puede ser también el valor basal del mismo individuo que sufre la enfermedad pero cuando está sano. Dicho valor puede ser un valor promedio de los niveles de concentración de dicha proteína en un grupo de individuos sanos. Asimismo, “la hiperfosforilación de la proteína tau, respecto de un control” se refiere a una concentración de proteína tau mayor que el valor control de fosforilación de dicha proteína. El valor control de la fosforilación de la proteína tau se determina del mismo modo que se ha descrito para el valor control de la concentración de la proteína  $\beta$ -amiloide. La determinación de la concentración de la proteína  $\beta$ -amiloide y/o la fosforilación de la proteína tau se lleva a cabo en una muestra aislada de un individuo, preferiblemente la muestra es un fluido biológico. Preferiblemente el fluido biológico es líquido cefalorraquídeo.

40 En la presente invención, se entiende por “patología relacionada con el incremento de  $\beta$ -amiloide” aquella patología que cursa, bien con un incremento en los niveles de la proteína precursora de  $\beta$ -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  $\beta$ -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 la presente invención se refiere a cualquier uso descrito en párrafos anteriores del compuesto espirólido de la presente invención, donde la patología relacionada con el incremento de  $\beta$ -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.

55 En la presente invención, se entiende por “patología relacionada con la hiperfosforilación de tau” aquella patología que cursa 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 esto, una realización preferida de la presente invención se refiere a cualquier uso descrito en párrafos anteriores del compuesto espirólido de la presente invención, donde la patología relacionada con la 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.

65 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, trastorno o déficit cognitivo moderado, 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 la presente invención se refiere a cualquier uso descrito en párrafos anteriores del compuesto espirólido de la presente invención, donde la patología relacionada con el incremento de  $\beta$ -amiloide e 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, pancefalitis esclerosante subaguda, demencia de gránulos argirófilos y enfermedad familiar de Gerstmann-Straussler-Scheinker. Según una realización más preferida de la presente invención, la patología relacionada con el incremento de la proteína  $\beta$ -amiloide e hiperfosforilación de la proteína tau es Alzheimer.

En la presente invención, se entiende por “trastorno o déficit cognitivo moderado”, la alteración 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.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## Descripción de las figuras

Figura 1. Muestra la disminución en los niveles de expresión de beta-amiloide intracelular después del tratamiento de los cultivos corticales primarios con espirólidos.

(A) Bandas de *western blot* en las que se representa la expresión de  $\beta$ -amiloide en cultivos neocorticales de animales silvestres (No-Tg), cultivos neocorticales obtenidos a partir de ratones 3xTgAD (3xTg) y los niveles de péptido  $\beta$ -amiloide en los cultivos neocorticales de ratones 3xTgAD tratados con 13 desmetilespirólido (3xTg Spx), evaluados con el anticuerpo 6E10. La exposición de los cultivos corticales de ratones triple transgénicos a espirólidos disminuye la sobreexpresión de  $\beta$ -amiloide en este modelo *in vitro*.

(B) La cuantificación de las bandas de *western blot* muestra una disminución significativa de la sobreexpresión de  $\beta$ -amiloide después del tratamiento con 13 desmetil espirólido (\*  $p < 0.005$  respecto a la expresión de  $\beta$ -amiloide en cultivos transgénicos,  $n = 3$  obtenida de tres experimentos representativos, cada uno realizado en duplicado).

Figura 2. Muestra una disminución de los niveles de tau fosforilada en cultivos de neuronas transgénicas tratadas con espirólidos.

(A) Bandas 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 espirólidos (3xTg Spx). 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 13 desmetil espirólido (\*  $p < 0.05$ ,  $n = 3$  obtenida de tres experimentos representativos, cada uno realizado en duplicado).

Figura 3. Muestra la 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 espirólidos.

(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 espirólidos (3xTg Spx). 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 13 desmetil espirólido (\*  $p < 0.005$ ,  $n = 3$  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 espirólido*

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  $\beta$ -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  
10 de presenilina (PS1<sub>M146V</sub>), proteína precursora de  $\beta$ -amiloide (APP<sub>Swe</sub>) y proteína tau (tau<sub>P301L</sub>), lo que da lugar a un modelo de Alzheimer con sobreexpresión de  $\beta$ -amiloide e hiperfosforilación de tau.

Los estudios en ratones son representativos de lo que los efectos que podrían observarse en humanos debido a la similitud de las secuencias aminoacídicas que codifican la tanto para proteína  $\beta$ -amiloide y como para la proteína tau de ratón y humano. La identidad de la secuencia aminoacídica de la proteína  $\beta$ -amiloide de ratón (N° de acceso AAA37139.1 de *Mus musculus*) y de humano (N° de acceso AAC13654.1 de *Homo sapiens*) es de un 93%. Asimismo, la identidad de la secuencia aminoacídica de la proteína tau de ratón (N° de acceso NP\_034968.3 de la proteína *microtubule-associated protein tau isoform b* de *Mus musculus*) y de humano (N° de acceso NP\_058519.2 de la proteína *microtubule-associated protein tau isoform 1* de *Homo sapiens*) es de un 90%. Para el cálculo de los porcentajes de  
15 identidad se ha empleado el programa de alineamiento y análisis de secuencias ClustalW que puede consultarse en la siguiente página web: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>.

En una realización de la 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 incubaron con el espirólido de la presente invención, que se disuelven en dimetilsulfóxido, se añadieron en el medio de cultivo en diferentes concentraciones y se determinó su efecto sobre la viabilidad neuronal a diferentes tiempos de tratamiento *in vitro*. La  
20 concentración máxima de 13 desmetil espirólido evaluada fue 100 nM y la concentración de *Alamar blue* fue del 10%. El volumen de reacción empleado fue de 200  $\mu$ l. La fluorescencia se mide a longitudes de onda de 530 nm (excitación) y 590 nm (emisión). Como se indica en la tabla 1, los compuestos objeto de la presente invención no modifican la viabilidad celular *in vitro*.

TABLA 1

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

	<b>% respecto al control</b>
Control	100 $\pm$ 5.3
Espirólido 2.5 nM	104.3 $\pm$ 1.2
Espirólido 5 nM	104 $\pm$ 1.3
Espirólido 10 nM	104.3 $\pm$ 1.4
Espirólido 25 nM	104.3 $\pm$ 0.7
Espirólido 50 nM	103.4 $\pm$ 0.5
Espirólido 100 nM	102.1 $\pm$ 1.5

La administración de 50 nM de espirólido equivale aproximadamente a unos 37  $\mu$ g de espirólido por Kg de peso corporal. La administración intraperitoneal de una cantidad mayor de 37  $\mu$ g por Kg de peso corporal a un ratón reduce los niveles de dichas proteínas pero produce efectos tóxicos en el animal (Santokh *et al.*, 2003. *NeuroToxicology*, 24: 593-604), sin embargo por vía oral la toxicidad de los espirólidos es de 1 mg por Kg de peso corporal. Los investigadores han evaluado el efecto de espirólidos a cantidades inferiores a 0,5  $\mu$ g por Kg de peso corporal (aprox. 0,67 nM), observando que a 0,017  $\mu$ g por Kg de peso corporal (aprox. 0,023 nM) se sigue reduciendo la hiperfosforilación

## ES 2 357 934 A1

de la proteína tau. La tabla 2 muestra los efectos de diferentes concentraciones de espirólidos sobre los niveles de tau fosforilada, determinado con el anticuerpo AT8 (reconoce Tau fosforilada en Ser202).

TABLA 2

*Efecto de diferentes concentraciones de espirólido en los niveles de tau fosforilada en serina 202. Los cultivos celulares han sido expuestos a diferentes concentraciones de espirólido desde el día 3 hasta el día 10 in vitro. Los datos representan media  $\pm$  esm de dos experimentos*

	<b>% respecto al control</b>
Control	100 $\pm$ 2.1
3xTg	129.1 $\pm$ 1.6
3xTg-Spx 25 nM	89.1 $\pm$ 2.2
3xTg-Spx 10 nM	70.3 $\pm$ 4.7
3xTg-Spx 0.5 nM	61.7 $\pm$ 12.4
3xTg-Spx 0.1 nM	129.8 $\pm$ 1.7

### Ejemplo 2

*Efecto del 13 desmetil espirólido en la sobreexpresión de  $\beta$ -amiloide intracelular y la hiperfosforilación de tau*

Para la determinación del efecto del compuesto espirólido de la presente invención sobre la expresión de tau y beta amiloide se emplearon técnicas de *western blot*. Los cultivos neuronales primarios se incubaron con el compuesto espirólido de la presente invención añadido en el medio de cultivo durante un tiempo determinado. Para la concentración de 50 nM los tiempos de tratamiento fueron entre los 7 y 10 días *in vitro* y para las otras concentraciones (0.1 a 25 nM) entre los 3 y 10 días *in vitro*. 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- $\beta$ -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 el espirólido de la presente invención se lavaron con PBS frío y se lisaron 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, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, 1 mg/ml pepstatina A y 1 mg/ml benzamidina. La concentración proteica total se determinó mediante el método de Bradford, empleando albúmina bovina como estándar. Las alícuotas de los lisados celulares conteniendo 20  $\mu$ g totales de proteína se cargaron 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 separaron mediante electroforesis y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios, se lavaron y posteriormente se incubaron con un anticuerpo secundario unido a HRP. La inmunoreactividad se detectó mediante quimioluminiscencia. Las mismas membranas se reincubaron con un anticuerpo primario anti  $\beta$ -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 13 desmetil espirólido reduce la sobreexpresión de  $\beta$ -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 del espirólido 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 llevaron a cabo de la misma forma que en el ejemplo anterior. Los datos obtenidos se corrigieron con la cantidad de  $\beta$ -actina en función del contenido proteico de las muestras. En los datos obtenidos se demuestra que el tratamiento de las neuronas control con una concentración 100 nm de espirólido no afectó 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 3).

TABLA 3

*Efecto del 13 desmetil espirólido 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*

	<b>% respecto al control</b>
Control	100 %
Control + 13 desmetil espirólido 100 nM	139.9 $\pm$ 27.3

## Ejemplo 4

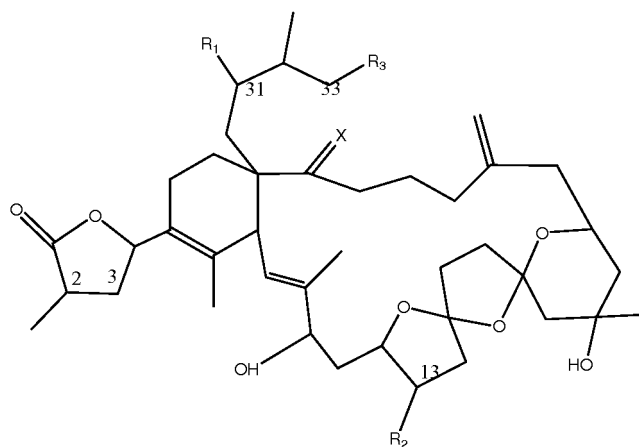
*Efecto del 13 desmetil espirólido en los niveles de  $\beta$ -amiloide extracelular*

Los niveles de  $\beta$ -amiloide extracelular en el medio de cultivo de neuronas corticales transgénicas y control tratadas con el espirólido de la presente invención se determinaron mediante kits de ELISA comerciales para la detección de  $\beta$ -amiloide 1-42 o  $\beta$ -amiloide 1-40 siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. Estos kits constan de placas tratadas con anticuerpos que capturan el péptido  $\beta$ -amiloide por su extremo amino terminal. Los patrones con cantidades conocidas de  $\beta$ -amiloide, y el medio de cultivo recogido de las preparaciones neuronales con cantidades desconocidas de  $\beta$ -amiloide se añadieron a los pocillos y se incubaron. Las placas se lavaron para eliminar el péptido no unido y se incubaron durante 2 horas en presencia de un anticuerpo que se une al extremo carboxilo terminal del péptido  $\beta$ -amiloide. A continuación, las placas se lavaron y se incubaron con un anticuerpo secundario unido a peroxidasa. A los 25 minutos de incubación, las placas se lavaron y el sustrato OPD se añadió para visualizar el péptido unido. La densidad óptica se midió por absorbancia a 495 nm, y se obtuvo una recta patrón con las cantidades de  $\beta$ -amiloide añadidas, de la cual se pudo extrapolar la cantidad de  $\beta$ -amiloide en el medio de cultivo recogido de las preparaciones neuronales tratadas con el espirólido de la presente invención.

Todos los procedimientos descritos en la presente invención se pueden automatizar para HTS (*high throughput screening*) utilizando placas de cultivo a las que previamente se añadieron las células, que fueron cultivadas durante al menos 6 días y sometidas a tratamiento con el espirólido de la presente invención. Estas placas son susceptibles de ser incorporadas a sistemas automáticos de medición de los marcadores que interesen, mediante distintos métodos de medida (absorbancia, luminiscencia, fluorescencia). De la misma forma, el efecto del espirólido de la presente invención, solo o en combinación con otros agentes en dianas celulares, moleculares o bioquímicas, de relevancia para la enfermedad de Alzheimer y/u otras alteraciones neuropatológicas que cursen con alteraciones en la fosforilación de tau o en la expresión de  $\beta$ -amiloide es susceptible de ser investigado mediante métodos de HTS empleando kits comerciales de interés para la evaluación del efecto de estos tratamientos en la evolución de la enfermedad de Alzheimer o enfermedades asociadas a tau y  $\beta$ -amiloide, después de que las células hayan sido sometidas al tratamiento en cuestión.

REIVINDICACIONES

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



(I)

donde:

$R_1$  puede ser un hidrógeno, o un grupo alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ),

$R_2$  puede ser un hidrógeno, o un grupo alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ),

si el  $C_{33}$  no está unido a X y X es O,  $R_3$  es  $NH_2$  y

si  $C_{33}$  está unido a X entonces  $R_3$  es H y X es N,

para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una patología relacionada con el incremento de la proteína  $\beta$ -amiloide y/o hiperfosforilación de la proteína tau, respecto de un control, donde dicho compuesto espirólido se administra en una cantidad necesaria para alcanzar una concentración en suero igual o menor de 50 nM.

2. Uso de un compuesto espirólido según la reivindicación 1, donde el  $C_{33}$  está unido a X, X es N y  $R_3$  es H.

3. Uso de un compuesto espirólido según la reivindicación 2, donde  $R_1$  es un grupo metilo y  $R_2$  es un hidrógeno.

4. Uso de un compuesto espirólido según la reivindicación 1, donde el  $C_{33}$  no está unido a X, X es O y  $R_3$  es  $NH_2$ .

5. Uso de un compuesto espirólido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho compuesto espirólido se administra en una cantidad necesaria para alcanzar una concentración en suero de entre 0,5 nM y 50 nM.

6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde se administra dicha cantidad diariamente, durante al menos 1 día.

7. Uso de un compuesto espirólido según la reivindicación 6, donde la cantidad diaria se administra en una sola dosis.

8. Uso de un compuesto espirólido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde se administra dicho compuesto por vía oral o intraperitoneal.

9. Uso de un compuesto espirólido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la patología relacionada con el incremento de la proteína  $\beta$ -amiloide se selecciona de la lista que comprende: esclerosis lateral amiotrófica, síndrome de Down, demencia vascular, angiopatía amiloidea cerebral relacionada con proteínas priónicas o enfermedad de Creutzfeldt Jacobs.

10. Uso de un compuesto espirólido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la patología relacionada con la hiperfosforilación de la proteína 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.

## ES 2 357 934 A1

11. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la patología relacionada con el incremento de la proteína  $\beta$ -amiloide e hiperfosforilación de la proteína tau se selecciona de la lista que comprende: Alzheimer, trastorno o déficit cognitivo moderado, 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 o enfermedad familiar de Gerstmann-Straussler-Scheinker.

12. Uso de un compuesto espirólido según la reivindicación 11, donde la patología relacionada con el incremento de la proteína  $\beta$ -amiloide e hiperfosforilación de la proteína tau es Alzheimer.

10

15

20

25

30

35

40

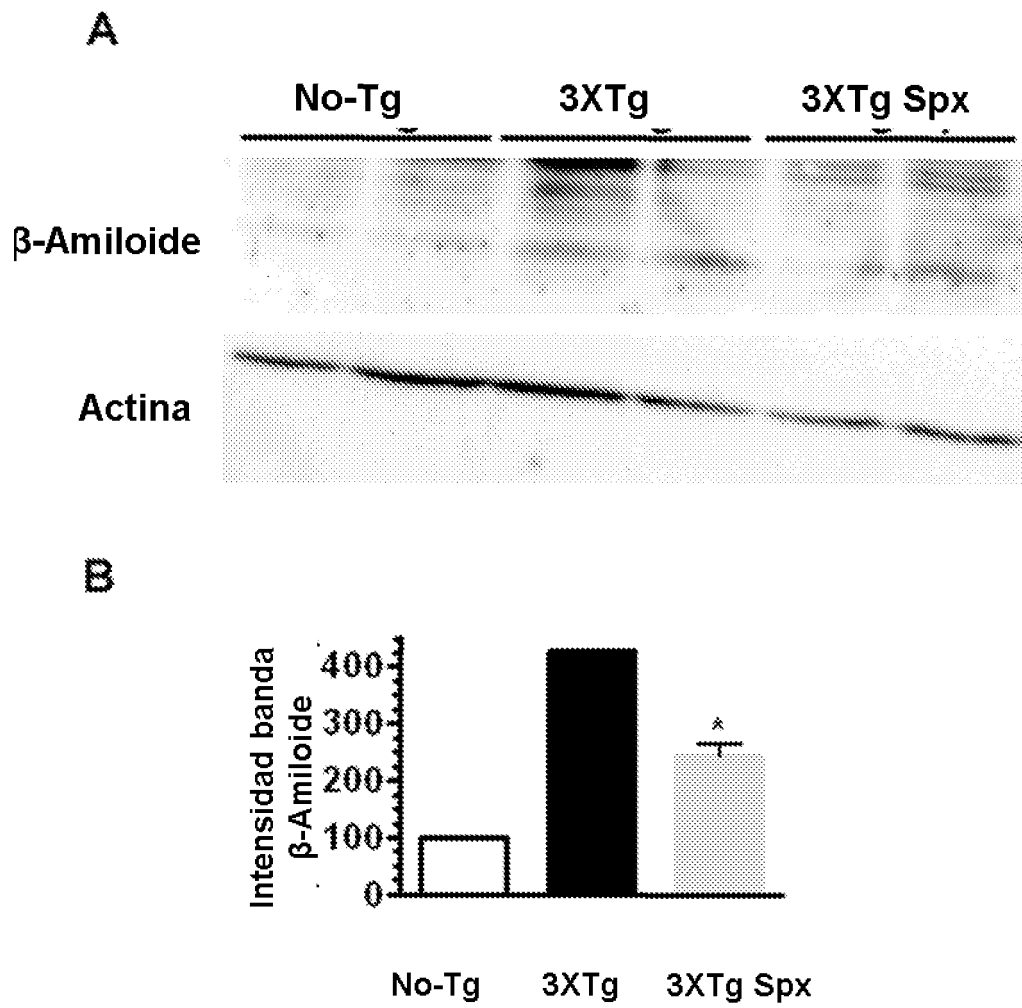
45

50

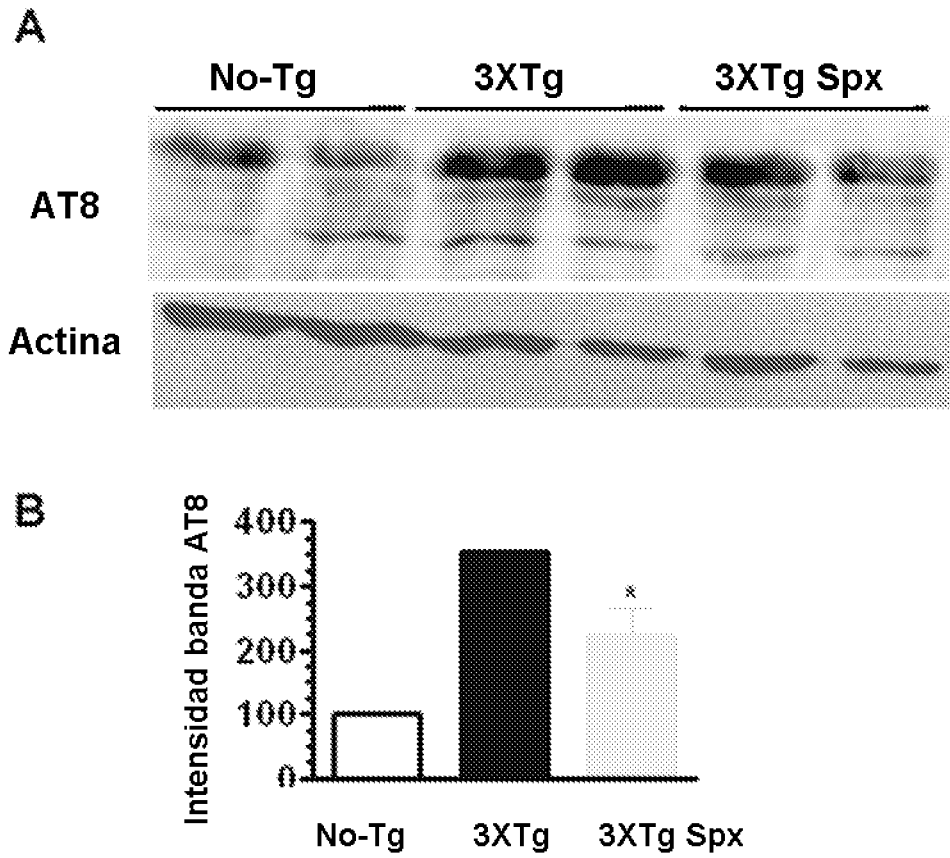
55

60

65

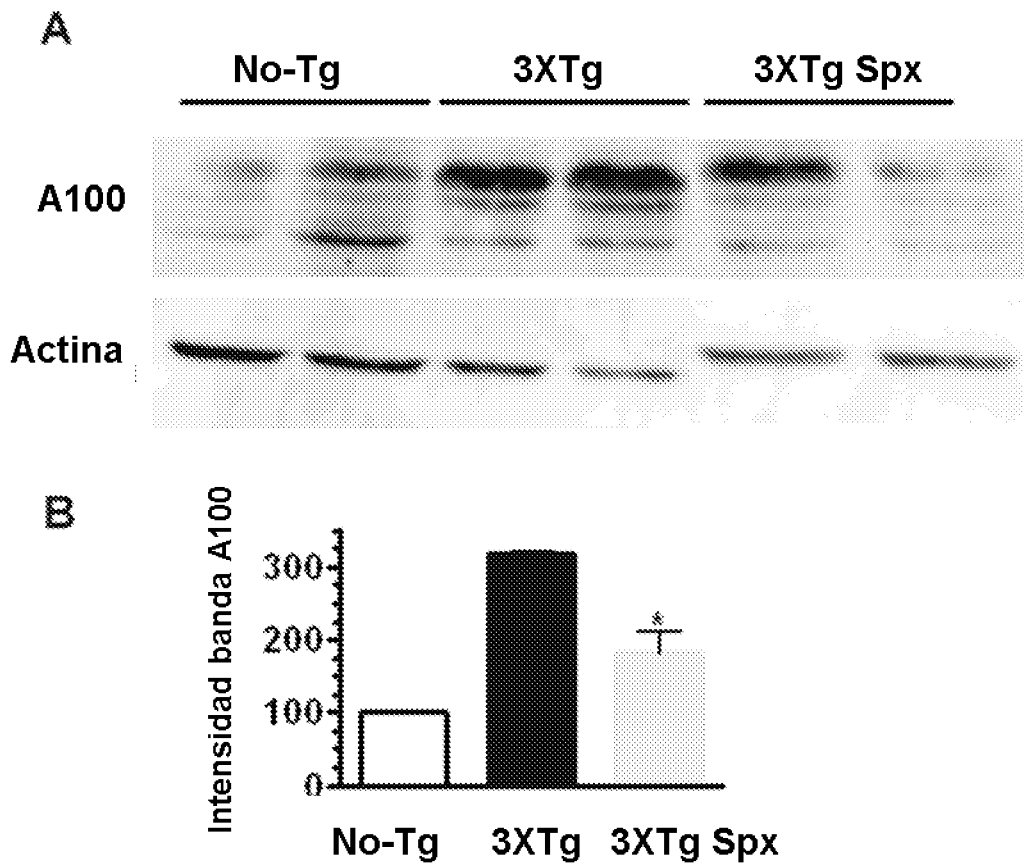


**FIG. 1**



**FIG. 2**





**FIG. 3**



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930866

②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.10.2009

②③ Fecha de prioridad: **00-00-0000**

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K31/365** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	HU, T. et al.: "Characterization of biologically inactive spirolides E and F: Identification of the Spirolide pharmacophore", Tetrahedron Letters, 1996, vol. 37, nº 43, páginas 7671-7674, ISSN 0040-4039, página 7671, compuestos 1-4.	1-12
A	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, página 2042, fórmulas 1-4.	1-12
A	BRIMBLE, M.A.: "Synthesis of pharmaceuticals using molecular chess and automated synthesis". Chemistry in New Zealand, 2004, vol. 68, nº 1, páginas 5-9, ISSN 0110-5566, página 7, figura 4.	1-12
A	GILL, S. et al.: "Neural injury biomarkers of novel shellfish toxins, spirolides : a pilot study using immunochemical and transcriptional analysis", Neurotoxicology, 2003, vol. 24, páginas 593-604, página 595, figura 1.	1-12

#### 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  
16.11.2010

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, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, XPESP, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita:

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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.

**Consideraciones:**

**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	HU, T. ET AL.: "Characterization of biologically inactive spirolides E and F: Identification of the Spirolide pharmacophore", Tetrahedron Letters, 1996, vol. 37, nº 43, páginas 7671-7674, ISSN 0040-4039,	
D02	TRZOSS, M. ET AL.: "Synthesis of spirocyclic imines: key phamacophores in the shellfish toxins spirolides and gymnodimine", Synlett, 2003, nº 13, páginas 2042-2046, ISSN 0936-5214.	
D03	BRIMBLE, M.A.: "Synthesis of pharmaceuticals using molecular chess and automated synthesis". Chemistry in New Zealand, 2004, vo. 68, nº 1, páginas 5-9, ISSN 0110-5566.	
D04	GILL, S. ET AL.: "Neural injury biomarkers of novel shellfish toxins, sipirolides : a pilot study using immunochemical and transcriptional analysis", Neurotoxicology, 2003, vol. 24, páginas 593-604.	

**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 espirolido de estructura química de fórmula I para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una patología relacionada con el incremento de la proteína  $\beta$ -amieloide y/o hiperfosforilación de la proteína tau.

Los documentos D1-D4 se refieren a la síntesis de iminas espirocíclicas, caracterización e identificación de diferentes espirolidos.

Ninguno de los documentos citados ni ninguna combinación relevante de ellos revela el uso de dichos compuestos que si son conocidos en el estado de la técnica en la elaboración de medicamentos para las patologías relacionadas con el incremento de la proteína  $\beta$ -amieloide y/o hiperfosforilación de la proteína tau.

En consecuencia, las reivindicaciones 1-12 tienen novedad y actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.