



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 358 661**

② Número de solicitud: 200930924

⑤ Int. Cl.:
A61K 31/357 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑫ Fecha de presentación: **28.10.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.2011**

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:
**Universidade 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**

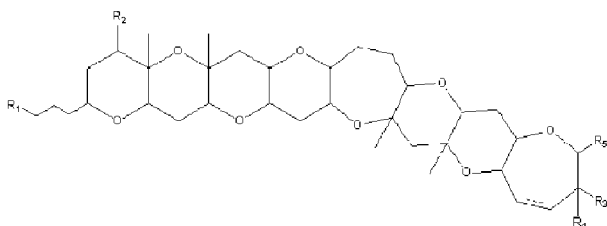
⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤④ Título: **Utilización del gambierol para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades neurodegenerativas relacionadas con tau y β -amiloide.**

⑤⑦ Resumen:

Utilización del gambierol 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 el gambierol.

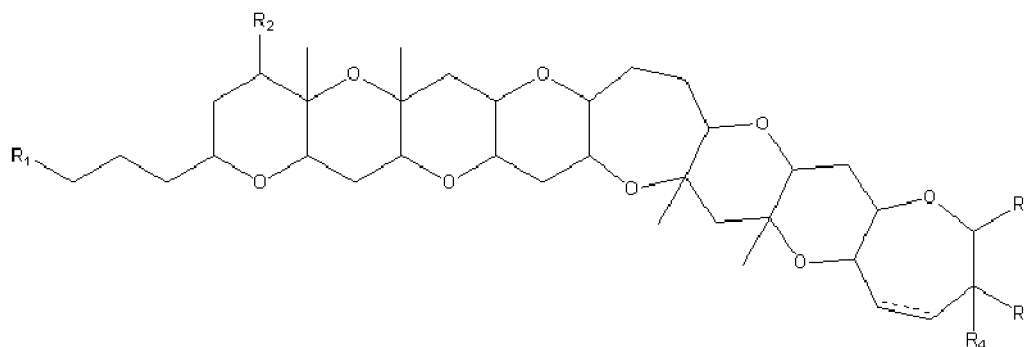
ES 2 358 661 B2

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

DESCRIPCIÓN

Utilización del gambierol 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 de un compuesto de estructura química:



para la elaboración de un medicamento, preferiblemente para la prevención y/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

El tratamiento o prevención de las enfermedades neurodegenerativas es uno de los mayores retos a los que se enfrenta la sociedad hoy en día. Estas enfermedades neurodegenerativas presentan cada vez una mayor prevalencia debido al envejecimiento de la población. Estas patologías presentan diversas etiologías, por lo que es difícil agruparlas en una sola clasificación. A pesar de ello, muchas de ellas presentan elementos comunes entre sí.

Dentro de las enfermedades, la más importante debido a ser la causa de invalidez y dependencia más común entre la gente mayor de 65 años, es la enfermedad de Alzheimer (EA). Esta es una enfermedad neurodegenerativa de carácter progresivo y cuyo origen es todavía desconocido. En la actualidad más de 25 millones de personas se encuentran afectadas por esta enfermedad en todo el mundo, y se prevé que el número se duplique hasta 2020 y triplique hasta 2050.

En la actualidad existe un único tratamiento aprobado para el tratamiento del Alzheimer, la memantina, el cual solo se administra en estadios avanzados de la enfermedad. Este compuesto es un antagonista no competitivo de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), y evita los efectos tóxicos de las elevadas concentraciones de glutamato en neuronas. Aparte de este fármaco, existen otros compuestos para retrasar el desarrollo del Alzheimer como por ejemplo el donepezil o la rivastigmina, que actúan inhibiendo la acetilcolinesterasa (A. Fisher 2008, *Neurotherapeutics*; 5:433-442).

Esta patología conlleva asociada pérdida de la capacidad cognitiva de las personas, fallos en la coordinación motora, y fundamentalmente pérdida de memoria. Esto es debido a que existe una degeneración neuronal, lo que degenera en una atrofia de ciertas regiones cerebrales. A nivel molecular, la enfermedad de Alzheimer viene determinada por la aparición depósitos amiloides, formados por la acumulación de β -amiloide insoluble, y placas neurofibrilares debidas a una asociación anómala de la proteína tau.

Las placas o marañas neurofibrilares son estructuras intracelulares, que se acumulan en el citoplasma de neuronas degeneradas. Estas estructuras presentan forma filamentosa. Su componente fundamental es la proteína tau hiperfosforilada, la cual presenta una agregación anómala. Esta, en situación no patológica, se asocia a los microtúbulos presentes en los axones neuronales. Estas estructuras fueron denominadas inicialmente como "filamentos pareados helicoidales" o PHFs. La hiperfosforilación de tau puede ser debida por un lado a un incremento en la actividad de las quinasas que provocan la fosforilación de tau, y por otro a un incremento en la expresión, ya que de esta forma se aumenta el sustrato disponible para las quinasas y por tanto aumenta el producto de su reacción. La hiperfosforilación de tau, además de en Alzheimer, se encuentra implicada en muchas otras patologías, entre las que se encuentran, por ejemplo, la enfermedad de Pick, la enfermedad de Parkinson con demencia, la demencia del lóbulo frontal (o neurodegeneración frontotemporal) y la degeneración corticobasal.

Por su parte, los depósitos amiloides son fibras insolubles localizadas tanto intra como extracelularmente. Estas fibras están formadas por las formas β A40 y β A42 del péptido β -amiloide. Estas formas son generadas 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). En situaciones no patológicas, el péptido β -

amiloide se encuentra en el cerebro en cantidades del orden pico o nanomolar, por lo que se encuentra solubilizado. El incremento en la concentración de dicho péptido debido al procesamiento anómalo de la proteína precursora APP lleva a su insolubilización y a la formación de agregados. Es conocido, que ciertas mutaciones en la proteína APP se encuentran relacionadas por ejemplo con la enfermedad de Alzheimer, ya que llevan a su procesamiento anómalo y por tanto a la formación de los agregados de β -amiloide. Los agregados de β -amiloide aparecen en regiones específicas del cerebro, lo que da lugar a una respuesta inflamatoria que conlleva muerte neuronal y por ello un deterioro cognitivo progresivo. El péptido β -amiloide se encuentra también implicado en otras patologías como por ejemplo en defectos neurológicos en individuos con síndrome de Down o demencia vascular.

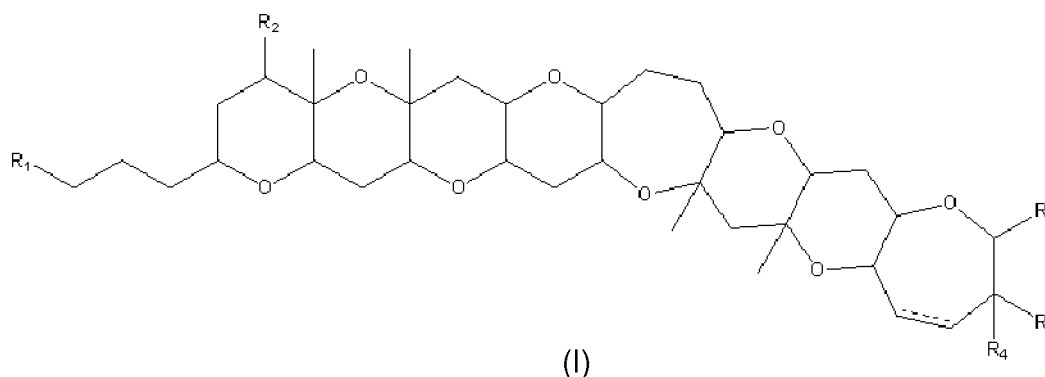
Debido a la importancia tanto de tau como de β -amiloide en procesos neurodegenerativos, inicialmente se llevaron a cabo estudios de cada una de las proteínas de forma independiente, así como de la implicación de cada una de ellas por separado en la enfermedad de Alzheimer. Debido a esto, las primeras aproximaciones que se hicieron para el tratamiento del Alzheimer iban dirigidas a la mejora de los efectos producidos por cada una de estas proteínas de forma independiente. En la actualidad, debido a la implicación de ambas proteínas en Alzheimer, se están estudiando las interacciones o relaciones existentes entre ellas. Estos estudios demuestran la existencia de una relación entre ambas proteínas, aunque su mecanismo no está bien definido. Existen datos que demuestran que la formación de depósitos amiloides puede afectar diferentes vías moleculares que podrían facilitar la fosforilación de tau y por lo tanto su posterior agregación (Blurton-Jones *et al.* 2006, *Current Alzheimer Research*, 3(5), 435-448). Esto se da, por ejemplo, mediante la activación por parte de los depósitos de β -amiloide de diversas quinasas entre las cuales se encuentran por ejemplo la glucógeno sintasa 3 β (GSK-3 β) o la quinasa dependiente de ciclina 5 (CDK5), las cuales presentan la capacidad de fosforilar tau. A pesar de la existencia de dicha relación, esta no es muy clara, ya que existen estudios que 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 consecuencia, se hace necesaria la obtención de fármacos útiles que actúen sobre las alteraciones de ambas proteínas de forma conjunta, para la prevención o tratamiento de enfermedades relacionadas con una o ambas alteraciones, como puede ser el Alzheimer.

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. Uno de estos compuestos es el gambierol, el cual es producido por el dinoflagelado *Gambierdiscus toxicus*. Esta toxina presenta una estructura de éter policíclico, y se encuentra clasificada dentro del grupo de las ciguatoxinas (Yasumoto, 2001. *Chem Rec*, 1(3), 228-242), denominadas así ya que debido a su toxicidad producen ciguatera. En los estudios llevados a cabo para dilucidar sus efectos, se ha determinado que esta toxina actúa sobre los canales dependientes de voltaje tanto de sodio (VGSC), como de potasio (VGPC). Sin embargo, no se ha relacionado la administración de gambierol con la prevención o el tratamiento de enfermedades concretas.

Descripción de la invención

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



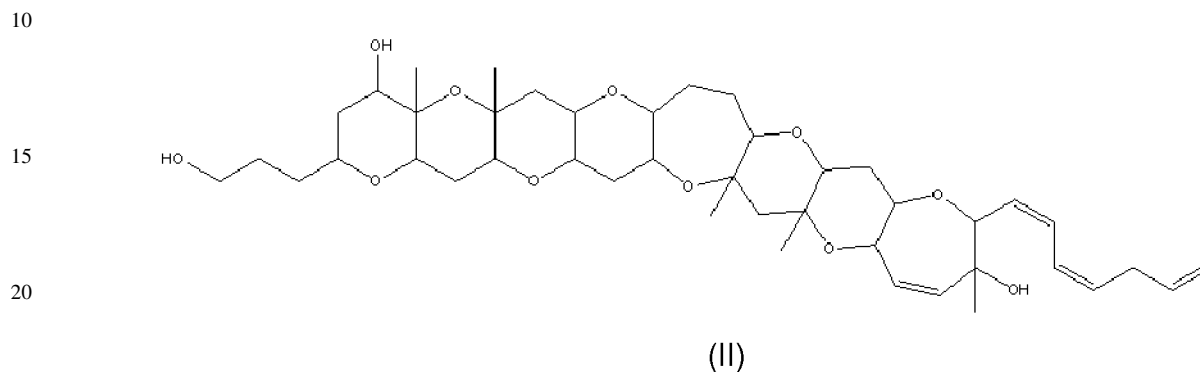
para la elaboración de un medicamento, preferiblemente para la prevención y/o el tratamiento de procesos patológicos relacionados con tau y/o β -amiloide como por ejemplo el Alzheimer.

Para los ejemplos de la presente invención se utilizan cultivos *in vitro* de neuronas corticales obtenidas a partir de ratones triple transgénicos, los cuales sobreexpresan de forma simultánea los transgenes humanos para presenilina (PS1_{M146V}), proteína precursora de β -amiloide (APP_{Swe}) y proteína tau (tau_{P301L}). La sobreexpresión simultánea de estos 3 elementos lleva asociada la acumulación de β -amiloide y la formación de placas neurofibrilares y por lo tanto, los

ES 2 358 661 B2

5 cultivos *in vitro* de las células obtenidas de estos animales transgénicos resultan útiles para el estudio de la eficacia de compuestos frente a enfermedades relacionadas con incrementos en β -amiloide e hiperfosforilación de tau. En los ejemplos de la presente invención se demuestra que el tratamiento con gambierol provoca una disminución de la sobreexpresión de β -amiloide tanto intra como extracelular, y una reducción de tau hiperfosforilada tanto en el residuo Serina (Ser) 202, como en los residuos Treonina (Thr) 212 y Serina 214.

El gambierol es un compuesto que pertenece al grupo de toxinas denominado ciguatoxinas. Su estructura química es (II):



25 Este compuesto lleva a cabo sus efectos tóxicos sobre el sistema nervioso, concretamente mediante la inhibición de los canales dependientes de voltaje tanto de sodio (VGSC) como de potasio (VGPC). Se ha descrito que en la enfermedad de Alzheimer, los canales de potasio, concretamente los canales kv3.1 se encuentran disminuidos. Sorprendentemente el gambierol produce el bloqueo de los mismos, a pesar de ser útil para la reducción tanto de la sobreexpresión de β -amiloide como de la hiperfosforilación de la proteína tau.

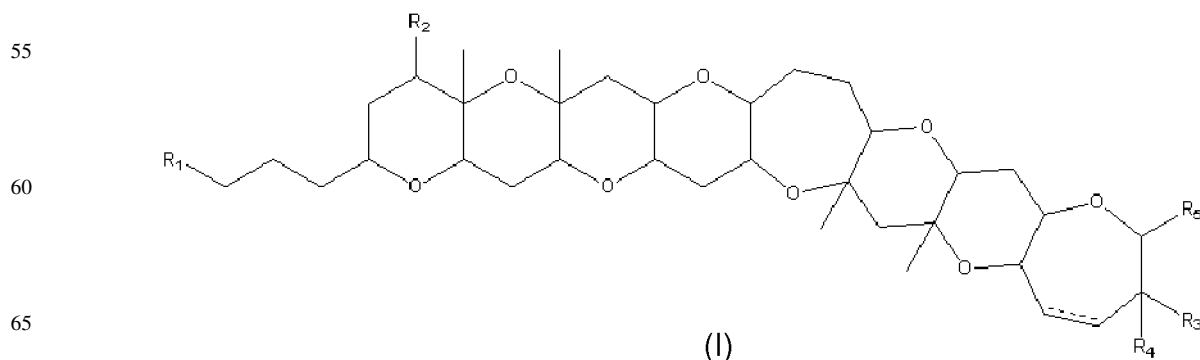
30 Por otro lado cabe resaltar que, en la presente invención, también se demuestra el tratamiento de los cultivos celulares de neuronas corticales con gambierol hasta una concentración 20 μ M, no provoca una reducción en la viabilidad, a pesar de haberse descrito dicho compuesto como una toxina.

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

40 El gambierol puede presentar diversos isómeros con una actividad y funcionalidad similar. Además, el gambierol puede ser modificado dando lugar a múltiples derivados que presenten características físico-químicas similares, y por ello una funcionalidad similar. Todos estos compuestos presentan una estructura común (I) con el gambierol en la cual R_1 , R_2 y R_3 pueden ser iguales o diferentes entre sí de forma independiente, siendo una cadena OR', un grupo hidroxilo, o un acilo, R_4 es un metilo o hidrógeno, R_5 puede ser:

- 45
- $R'-O-Z$ siendo R' un alquilo C1-C6, y Z un alquilo C1-C6 o un acilo
 - alquilo C1-C10,
 - alqueno C1-C10,
- 50

y donde el símbolo ----- representa un enlace que puede ser simple o doble.



ES 2 358 661 B2

Por todo ello, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de estructura química (I) donde:

R₁, R₂ y R₃ pueden ser iguales o diferentes entre sí de forma independiente; siendo una cadena OR', un hidroxilo o un acilo

R₄ es un metilo o un hidrógeno

R₅ puede ser:

- R'-O-Z siendo R' un alquilo C1-C6, y Z un alquilo C1-C6 o un acilo

- alquilo C1-C10

- alqueno C1-C10, y

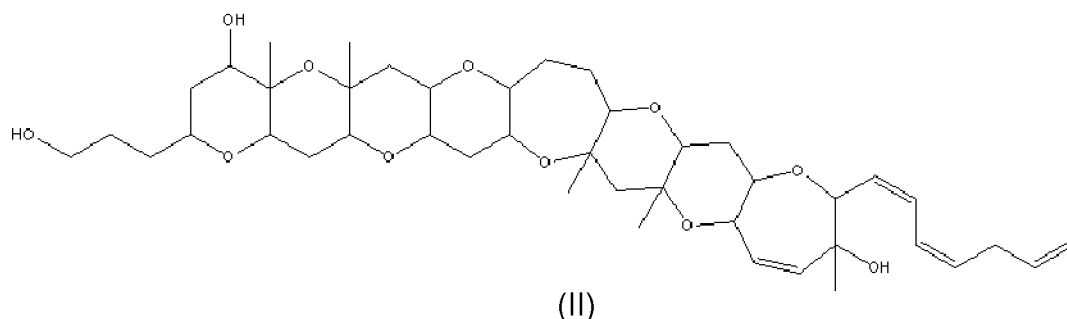
donde el símbolo ----- representa un enlace que puede ser simple o doble,

para la elaboración de un medicamento.

Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de estructura química (I) donde R₅ es R'-O-Z siendo R' un metilo para la elaboración de un medicamento.

Uno de los grupos que se encuentran en mayor número de derivados del gambierol es un alqueno de 7 átomos de carbono en R₅ ya que es uno de los elementos que suele estar implicado en la actividad de estas moléculas. Por ello, otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de estructura química (I) donde R₅ es un alqueno de 7 átomos de carbono, para la elaboración de un medicamento.

En el caso del gambierol, R₁, R₂ y R₃ son grupos hidroxilo, mientras que R₄ es grupo metilo, R₅ es un grupo alqueno de 7 átomos de carbono, y ----- es un doble enlace. Por ello una realización más preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de estructura química (I) donde R₁, R₂ y R₃ son grupos hidroxilo, R₄ es grupo metilo, R₅ es un grupo alqueno de 7 átomos de carbono, y ----- es un doble enlace. Este compuesto corresponde con el gambierol, de estructura química (II).



Por "alquilo" se refiere en la presente invención a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbonos, más preferiblemente tienen de 1 a 6 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, tert-butilo, sec-butilo, n-pentilo, etc.

Por "alqueno" se refiere en la presente invención a un radical alquilo que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono y que tiene uno o más enlaces insaturados. Los radicales alqueno pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como un arilo, halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcocarbonilo, amino, nitro, mercapto, etc.

En la presente invención se entiende por "acilo" aquellos grupos derivados de un oxoácido, por ejemplo, aunque sin limitarse un ácido carboxílico, por eliminación de al menos un grupo hidroxilo.

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.

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, el gambierol, es capaz de reducir la sobreexpresión de β -amiloide y la hiperfosforilación de tau, pero no presenta efectos sobre ninguna 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 ello, una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de estructura química (I) ó (II) para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, se refiere al uso de un compuesto de estructura química (I) ó (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 respecto de un control.

En la presente invención, el término “prevención y/o tratamiento de una patología relacionada con el incremento de la proteína β -amiloide, respecto de un control” se refiere al incremento de la proteína β -amiloide respecto del valor control de concentración de dicha proteína. El valor control de la concentración de la proteína β -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 β -amiloide, conocida en el estado de la técnica. El valor control de la concentración de la proteína β -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 β -amiloide. La determinación de la concentración de la proteína β -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.

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) ó (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) ó (II) para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una patología relacionada con la hiperfosforilación de tau respecto de un control 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) o (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 respecto de un control 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 neurodege-

nerativa 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.

Cualquiera de los compuestos de estructura química (I) ó (II) puede formularse junto a otros compuestos para formar parte de una composición farmacéutica. La composición farmacéutica comprende, además de este compuesto un vehículo farmacéuticamente aceptable, otro principio activo, o cualquiera de las combinaciones del compuesto de estructura (I) o (II) con el resto de componentes.

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 tamponadas 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, 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 microcristalina, 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.

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, intrasnovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intracardíaca, 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 de un compuesto de fórmula química (I) o (II), donde se administra dicho compuesto por vía oral o intraperitoneal.

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.

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 β -amiloide intracelular después del tratamiento con gambierol.

(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 gambierol (3xTg+Gamb), evaluados con el anticuerpo 6E10. La exposición de los cultivos corticales de ratones triple transgénicos a gambierol disminuye la sobreexpresión de β amiloide en este modelo *in vitro*. (B) La cuantificación de las bandas de *western blot* muestra una disminución significativa de la sobreexpresión de β -amiloide después del tratamiento con gambierol (* $p > 0.05$ respecto a la expresión de β -amiloide en cultivos transgénicos).

ES 2 358 661 B2

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

(A) Imágenes de *western blot*, que muestran los niveles de fosforilación de tau empleando el anticuerpo AT8 (reconoce Tau fosforilada en Ser 202) en cultivos silvestres (NoTg), cultivos transgénicos (3xTg) y cultivos transgénicos tratados con gambierol (3xTg+Gamb). (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 gambierol (* $p < 0.05$, $n=3$ obtenida de tres experimentos representativos, cada uno realizado en duplicado).

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 gambierol.

(A) Bandas de *western blot* mostrando la inmunoreactividad para el anticuerpo AT100 en cultivos obtenidos de ratones no transgénicos (NoTg), cultivos transgénicos (3xTg) y cultivos transgénicos tratados con gambierol (3xTg+Gamb). (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 gambierol (* $p < 0.05$, $n=3$ obtenida de tres experimentos representativos, cada uno realizado en duplicado).

Figura 4. Muestra la recta patrón usada para la determinación de la cantidad de péptido β -amiloide extracelular.

Recta patrón obtenida por cuantificación de diversas concentraciones de β -amiloide obtenidas por medición de la absorbancia a una longitud de onda de 495 nm.

Figura 5. Muestra una disminución de los niveles de péptido β -amiloide extracelular.

Estos niveles son determinados mediante la cuantificación la de β -amiloide secretada al medio de cultivo, en cultivos transgénicos tratados con gambierol. Dicha cuantificación muestra una disminución del péptido β -amiloide extracelular en los cultivos triple transgénicos tratados con gambierol frente a los no tratados. NoTg: cultivos control. 3xTg: cultivos de neuronas corticales obtenidas a partir de animales triple transgénicos. 3xTg+Gamb: cultivos de neuronas corticales obtenidas a partir de animales triple transgénicos tratados con gambierol.

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 gambierol

Para la realización de los experimentos de la presente invención se utilizaron 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 simultánea de los transgenes humanos 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.

Los cultivos corticales primarios se obtuvieron a partir de embriones de ratones 3xTg-AD de 15-17 días de gestación y los cultivos silvestres se obtuvieron de embriones de ratones control no 3xTg-AD de la misma cepa. El efecto del compuesto empleado en esta invención sobre la viabilidad celular se realizó mediante un ensayo de fluorescencia empleando el indicador de viabilidad Alamar Blue. Para la realización del ensayo se utilizaron cultivos corticales primarios sembrados en placas de 96 pocillos. Las células neuronales se incubaron con el compuesto de la presente invención, que se disuelve en dimetilsulfóxido (DMSO), se añade 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 concentración máxima de gambierol evaluada *in vitro* fue de 20 μM y la concentración de alamar blue fue del 10%. El volumen de reacción empleado fue de 200 μl . La fluorescencia se midió a longitudes de onda de 530 nm (excitación) y 590 nm (emisión). El compuesto objeto de la presente invención no modificó la viabilidad celular *in vitro* (Tabla 1).

ES 2 358 661 B2

TABLA 1

Viabilidad de las neuronas corticales después del tratamiento con diferentes concentraciones de gambierol durante 72 horas en cultivo. Los datos son medias \pm error estándar de tres experimentos independientes y se expresan como porcentaje respecto del control no tratado con gambierol

	% respecto al control
Control	100 \pm 5.3
Gambierol 0.25 μM	103 \pm 5.2
Gambierol 0.5 μM	110 \pm 1.4
Gambierol 1 μM	105 \pm 6.3
Gambierol 5 μM	106 \pm 4.7
Gambierol 10 μM	105 \pm 5.8
Gambierol 20 μM	102 \pm 3.8

25 Ejemplo 2

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

30 Para la determinación del efecto del compuesto de la presente invención sobre la expresión de tau y β -amiloide se emplean técnicas de *western blot*. Los cultivos neuronales primarios se incuban con el compuesto de la presente invención añadido en el medio de cultivo durante un tiempo determinado. En el presente ejemplo los cultivos neuronales primarios son tratados con gambierol 10 μ M 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 Thr212 y Ser 214, dilución 1:1000). El anticuerpo anti β -amiloide 6E10 fue obtenido de Covance, y anti-tau AT100 y anti-Tau AT8 fueron suministrados por Thermo Scientific.

40 Para los ensayos de *western blot* los cultivos neuronales tratados con el compuesto de la presente invención se lavan con PBS 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, ditiotreitól 100 mM, 2% SDS, 20% glicerol, 45 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 se incuban con un anticuerpo secundario unido a HRP (*horseradish peroxidase* o peroxidase del rábano), 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 gambierol 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.

55 Ejemplo 3

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

60 Para la determinación del efecto del gambierol 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 gambierol 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 tau fosforilada en el residuo Ser 202 (tabla 3).

TABLA 2

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

	% respecto al control
Control	100 \pm 2.3%
Control + gambierol 10 μM	111 \pm 3.9 %

TABLA 3

Efecto del gambierol sobre los niveles de tau fosforilada en el residuo Ser 202 en neuronas control. Los datos son medias \pm error estándar de dos experimentos independientes y se expresan como porcentaje respecto al control no tratado

	% respecto al control
Control	100 \pm 4.4 %
Control + gambierol 10 μM	107 \pm 8.1%

Ejemplo 4

Efecto del gambierol en la sobreexpresión de β -amiloide extracelular

Los niveles de β -amiloide extracelular en el medio de cultivo de neuronas corticales obtenidas de ratones triple transgénicos o control tratados con gambierol, se determinan mediante kits de ELISA comerciales para la detección de β -amiloide 1-42 o β -amiloide 1-40 siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante (Covance). Estos kits constan de placas tratadas con anticuerpos que capturan el péptido β -amiloide por su extremo amino terminal. Los patrones con cantidades conocidas de β -amiloide, y el medio de cultivo recogido de las preparaciones neuronales con cantidades desconocidas de β -amiloide se añaden a los pocillos y se incuban. Las placas se lavan para eliminar el péptido no unido y se incuban durante 2 horas en presencia de un anticuerpo que se une al extremo carboxilo terminal del péptido β -amiloide. A continuación las placas se lavan y se incuban con un anticuerpo secundario unido a peroxidasa. A los 25 minutos de incubación, las placas se lavan y el sustrato orto-fenilendiamina (OPD) se añade para visualizar el péptido unido. La densidad óptica se mide por absorbancia a 495 nm, y se obtiene una recta patrón (fig. 4) con las cantidades de β -amiloide añadidas, de la cual se puede extrapolar la cantidad de β -amiloide en el medio de cultivo recogido de las preparaciones neuronales tratadas con los compuestos de la presente invención (fig. 5).

Todos los procedimientos descritos en la presente invención se puede 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 los compuestos 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 compuesto de la presente invención, solo o en combinación con otros agentes en dianas celulares, moleculares y bioquímicas de relevancia para la enfermedad de Alzheimer y/o otras alteraciones neuropatológicas que cursen con alteraciones en la fosforilación de tau o en la expresión de β -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 β -amiloide, después de que las células hayan sido sometidas al tratamiento en cuestión.

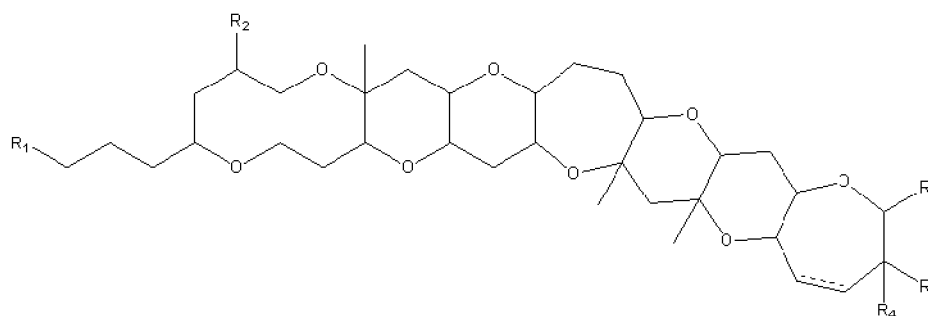
REIVINDICACIONES

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

5

10

15



(I)

20

donde:

25

R₁, R₂ y R₃ pueden ser iguales o diferentes entre sí de forma independiente; siendo una cadena OR', un hidroxilo o un acilo

30

R₄ es un metilo o un hidrógeno

35

R₅ puede ser:

- R'-O-Z siendo R' un alquilo C1-C6, y Z un alquilo C1-C6 o un acilo
- alquilo C1-C10
- alquenilo C1-C10, y

el símbolo ----- representa un enlace que puede ser simple o doble, para la elaboración de un medicamento.

40

2. Uso de un compuesto según la reivindicación 1 donde R₅ es R'-O-Z, siendo R' un metilo.

3. Uso de un compuesto según la reivindicación 1 donde R₅ es un alquenilo de 7 átomos de carbono.

45

4. Uso de un compuesto cualquiera la reivindicación 3 donde R₁, R₂ y R₃ son grupos hidroxilo, R₄ es grupo metilo, y ----- es un doble enlace.

5. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.

50

6. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 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, respecto de un control.

55

7. Uso de un compuesto según la reivindicación 6 donde la patología relacionada con el incremento de β -amiloide, respecto de un control, 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.

60

8. Uso de un compuesto según la reivindicación 6 donde la patología relacionada con hiperfosforilación de tau, respecto de un control, se selecciona de la lista que comprende: demencia frontotemporal, parálisis supranuclear progresiva, demencia asociada a tauopatía sistémica múltiple, degeneración corticobasal y enfermedad de Pick.

65

9. Uso de un compuesto según la reivindicación 6 donde la patología relacionada con el incremento de β -amiloide e hiperfosforilación de tau, respecto de un control, 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.

ES 2 358 661 B2

10. Uso de un compuesto según la reivindicación 9 donde la patología relacionada con el incremento de β -amiloide e hiperfosforilación de tau, respecto de un control, es Alzheimer.

5 11. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

12. Composición farmacéutica según la reivindicación 11 que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 13. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12 que además comprende otro principio activo.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

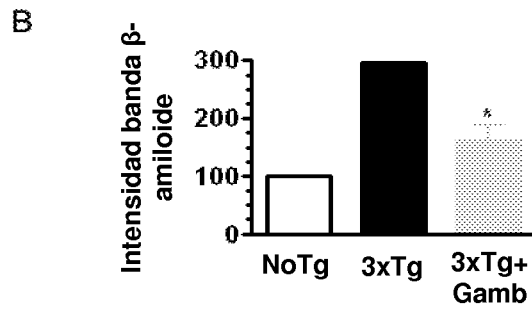
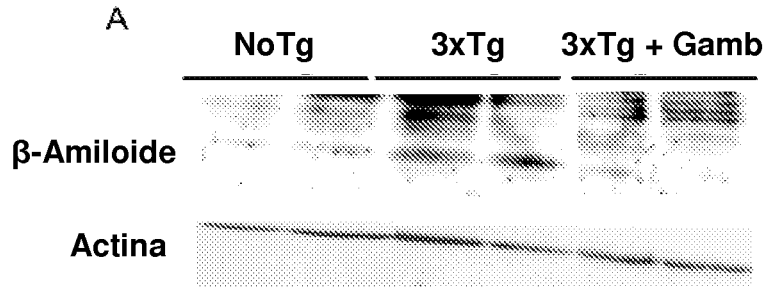


FIG. 2

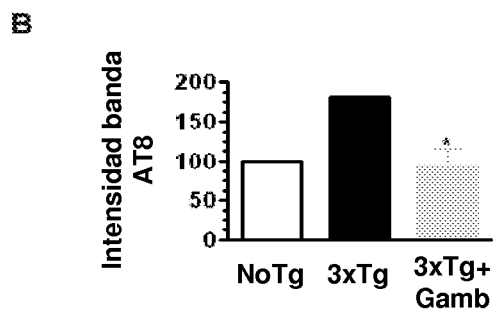
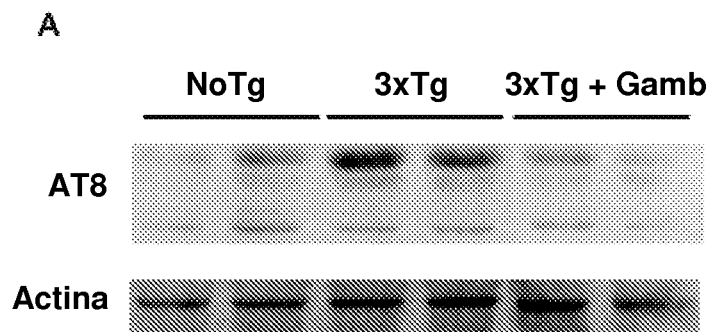
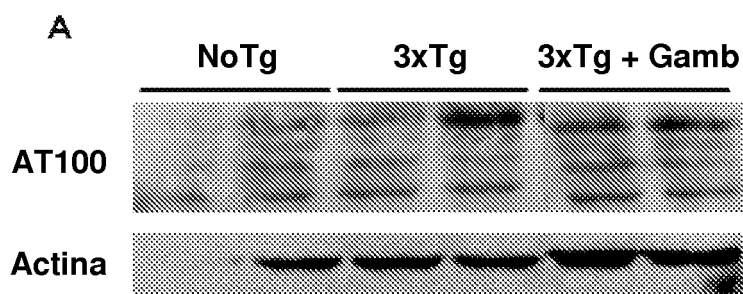


FIG. 3



B

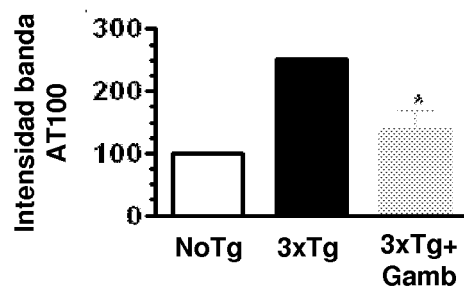


FIG. 4

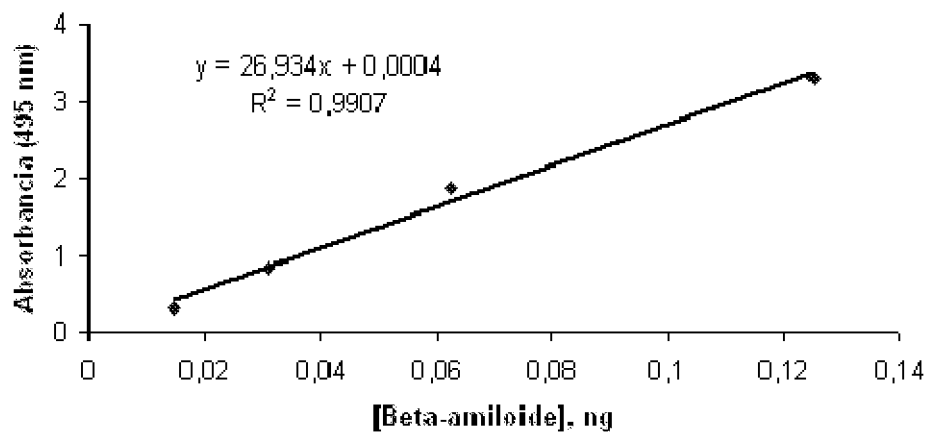
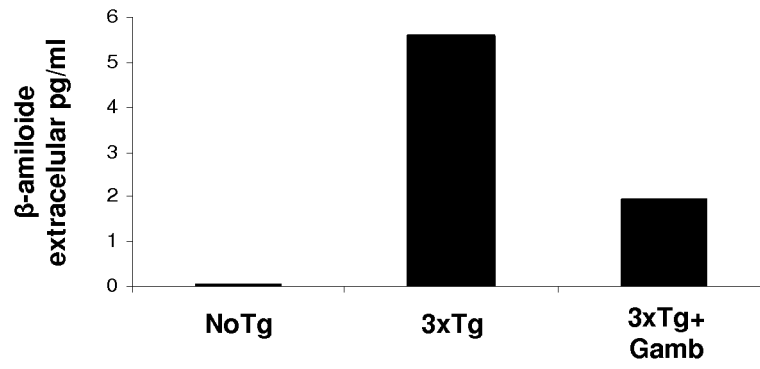


FIG. 5





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930924

②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.10.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K31/357** (01.01.2006)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CUYPERS, E. et al.: "Gambierol, a toxin produced by the dinoflagellate Gambierdiscus toxicus, is a potent blocker of voltage-gated potassium channels". Toxicon, 2008, vol. 51, páginas 974-983, todo el documento.	1-13
A	CUYPERS, E. et al.: "TRPV1 as a key determinant in ciguatera and neurotoxic shellfish poisoning". Biochemical and biophysical Research communications, 2007, vol. 361, páginas 214-217, página 216.	1-13

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
26.01.2011

Examinador
H. Aylagas Cancio

Página
1/4

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, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, NPL, REGISTRY,HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.01.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-13	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-13	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	CUYPERS, E. et al.: "Gambierol, a toxin produced by the dinoflagellate Gambierdiscus toxicus, is a potent blocker of voltage-gated potassium channels". Toxicon, 2008, vol. 51, páginas 974-983.	
D02	CUYPERS, E. et al.: "TRPV1 as a key determinant in ciguatera and neurotoxic shellfish poisoning". Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, vol. 361, páginas 214-217.	

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 un compuesto de estructura química I y de sus composiciones farmacéuticas en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, relacionada con el incremento de beta-amiloide y/o hiperfosforilación de Tau, se especifica como patología la enfermedad de Alzheimer.

El documento D1 se refiere al gambierol, toxina producida por un dinoflagelado gambierdiscus toxicus, que se utiliza como un potente bloqueante de los canales de potasio.

El documento D2 describe el efecto del gambierol y de brevetoxina sobre los canales TRPV1 (Receptor de potencial transitorio V1). Estos receptores se encuentran en el sistema nervioso central y en sistema nervioso periférico y están involucrados en la transmisión y modulación del dolor, así como de la integración de diversos estímulos dolorosos.

Por lo tanto, ninguno de los documentos citados, ni ninguna combinación relevante de ellos revela una composición farmacéutica con gambierol como principio activo ni tampoco su uso en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

En consecuencia, a la vista de los documentos citados D1 y D2 la materia correspondiente a las reivindicaciones 1-13 de la presente solicitud tiene novedad, actividad inventiva y aplicación industrial de acuerdo con los artículos 6.1 y 8.1 L.P,