

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 373 598**

(21) Número de solicitud: 201001078

(51) Int. Cl.:
A61K 31/4375 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(12)

SOLICITUD DE PATENTE

A1

(22) Fecha de presentación: **26.07.2010**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **07.02.2012**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
07.02.2012

(71) Solicitante/s: **NEURON BIOPHARMA, S.A.**
Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud
Avda. de la Innovación, 1
18100 Armilla, Granada, ES

(72) Inventor/es: **Burgos Muñoz, Javier Santos;**
Ramos Martín, María del Carmen;
Sierra Ávila, Saleta;
Alfaro Sánchez, Juan María y
Suárez González, Beatriz

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

(54) Título: **Compuesto para tratar enfermedades neurodegenerativas, déficits cognitivos y/o demencias.**

(57) Resumen:

Compuesto para tratar enfermedades neurodegenerativas, déficits cognitivos y/o demencias.

Se describe el uso del compuesto gemifloxacino para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, deterioro cognitivo leve, déficits cognitivos, demencias, enfermedades asociadas con el envejecimiento y procesos patológicos asociados con la edad y la progeria y en especial de la enfermedad de Alzheimer, debido al descubrimiento de nuevas propiedades intrínsecas a este compuesto.

DESCRIPCIÓN

Compuesto para tratar enfermedades neurodegenerativas, déficits cognitivos y/o demencias.

5 **Campo de la invención**

La invención se relaciona con la utilización del compuesto gemifloxacino (7⁴-(Z)-(O-metiloxima) del ácido (±)-7-[3-(aminometil)-4-oxo-1-pirrolidinil]-1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-1,8-naftiridina-3-carboxílico) para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, déficits cognitivos, demencias y en especial de la enfermedad de Alzheimer, debido al descubrimiento de nuevas propiedades intrínsecas a este compuesto.

Antecedentes de la invención

La gran incidencia de las enfermedades neurodegenerativas y de las enfermedades asociadas con el envejecimiento como los déficits cognitivos o las demencias, es un problema de primer orden en todo el mundo. Por ello es necesaria la búsqueda de compuestos neuroprotectores que eviten o palíen dichas enfermedades. De todas ellas, la enfermedad de Alzheimer (EA) es la más prevalente, estimándose que en el año 2040, 81 millones de personas sufrirán esa enfermedad (Blennow *et al.*, Lancet 2006; 368: 387-403). Sólo en España se estima que más de medio millón de personas sufren actualmente la EA. Los costes asociados a esta enfermedad son proporcionalmente altos, y se calcula que el coste total derivado del cuidado de los enfermos de Alzheimer es de 81.000 y 22.000 millones de € en Estados Unidos y en el Reino Unido, respectivamente. Actualmente no existen fármacos eficientes que prevengan o impidan esta enfermedad, con lo que la búsqueda y validación de nuevos compuestos neuroprotectores que eviten el daño neuronal es una necesidad.

Una de las etapas previas asociadas a la EA y a otras demencias es el deterioro cognitivo leve o MCI (del inglés *Mild Cognitive Impairment*), también conocido como *demencia incipiente* o *deterioro aislado de memoria*. El MCI está reconocido como un factor de riesgo de la EA, y afecta a unos 30 millones de personas en todo el mundo. El MCI se considera como un paso previo a la EA, donde entre el 10 y el 15% de los individuos con MCI progresan a EA cada año (Grundman *et al.* Arch. Neurol 2004; 61 [1]: 59-66). A pesar de la significativa prevalencia del MCI y del alto riesgo de los pacientes a progresar a demencias, no existe en la actualidad ningún tratamiento o terapia para esta entidad clínica, con lo que se recomienda el uso de antioxidantes o fármacos contra la EA para el tratamiento del MCI. Las opciones terapéuticas actuales frente a la EA se basan en la inhibición de la acetilcolinesterasa con fármacos como el donepezilo, la galantamina o la rivastigmina, o en la capacidad de la memantina en antagonizar un receptor de glutamato, el NMDA (ácido N-metil-D-aspartico). No obstante, se ha demostrado que el uso de rivastigmina no detiene o enlentece la progresión del MCI o de la EA (Feldman *et al.* Lancet Neurol 2007; 6[6]: 501-12), mientras que el uso del donepezilo sólo muestra beneficios discretos a corto plazo, pero con el inconveniente de presentar efectos secundarios significativos (Birks and Flicker, Cochrane Database Syst Rev 2006; 3: CD006104). Así pues, en la actualidad no existen fármacos para el tratamiento del MCI, y los actuales fármacos contra la EA ofrecen pocos beneficios a los pacientes, los cuales retrasan temporalmente (en el mejor de los casos un año), algunos síntomas de la dolencia, pero no evitan su evolución.

Debido al poco éxito de estos fármacos se han abierto nuevas líneas de investigación, y entre ellas destaca la estrategia de reposicionamiento de fármacos que se basa en el descubrimiento de nuevas indicaciones para medicamentos que, bien se están utilizando en el mercado para otras indicaciones, o bien han superado la Fase I (estudios de primera administración y evaluación de la seguridad en humanos). La estrategia de reposicionamiento presenta ventajas como el conocimiento de la farmacología clínica, la posibilidad de realización de pruebas de concepto rápidas, la reducción del riesgo toxicológico y el conocimiento de la administración y del desarrollo galénico.

Por otra parte, en WO 2009/149149, se describe la utilización de uno o más antibióticos, solos o en combinación con microflora exógena o con uno o más compuestos probióticos, con el fin de modificar la población de la microflora para proporcionar un efecto regulatorio autoinmune y hacer así posible el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

55 **Compendio de la invención**

Los inventores ahora han encontrado sorprendentemente que el gemifloxacino, habitualmente utilizado como antibiótico, tiene propiedades neuroprotectoras. El gemifloxacino es un compuesto de cuarta generación de la familia de las fluoroquinolonas, que son antimicrobianos bactericidas que inhiben la síntesis de ADN bacteriano mediante el bloqueo de la subunidad A de la ADN girasa (topoisomerasa II). Las fluoroquinolonas presentan una alta biodisponibilidad oral, una excreción fundamentalmente por vía renal, y en general son bien toleradas, aunque algunas de ellas han manifestado efectos secundarios en el sistema nervioso central como encefalopatías, convulsiones, confusión o psicosis. Los inventores han puesto de manifiesto la actividad neuroprotectora del gemifloxacino mediante el estudio de la protección de la muerte neuronal causada por estrés de retículo endoplásmico (Ejemplo 1), por desorganización del citoesqueleto (Ejemplo 2) o por daño mitocondrial (como la inhibición de la succinato deshidrogenasa) (modelo de Huntington) en líneas celulares humanas de origen colinérgico (Ejemplo 3). La actividad neuroprotectora ha sido confirmada mediante el estudio de la protección de la muerte neuronal causada por apoptosis en líneas celulares humanas de origen colinérgico (Ejemplo 4). Además se ha demostrado la capacidad del gemifloxacino de inhibir la acetilcolina

nesterasa (AChE) (modelo de Alzheimer) tanto *in vitro* como *in vivo* (Ejemplo 5). Por último se ha determinado que el gemifloxacino atraviesa la barrera hematoencefálica de forma eficiente (Ejemplo 6), convirtiéndolo así en potencialmente útil para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, déficits cognitivos o demencias, y en especial para las enfermedades de Alzheimer y Huntington. Estos ejemplos ponen de manifiesto el potencial empleo del gemifloxacino en la prevención y/o tratamiento de la muerte neuronal asociada a enfermedades neurodegenerativas (e.g., Alzheimer, deterioro cognitivo leve, Huntington, Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, Creutzfeldt-Jakob, déficits cognitivos y/o psicomotores, ataxias, demencias, enfermedades cerebrovasculares, enfermedad de Alexander, etc.), déficits cognitivos, demencias, enfermedades asociadas al envejecimiento, procesos patológicos asociados a la edad y progeria.

Los resultados obtenidos pueden ser extrapolados con fines profilácticos o terapéuticos para su aplicación sobre la población de riesgo. Asimismo, debido a que este compuesto se utiliza habitualmente como antibiótico, los estudios de farmacovigilancia han demostrado que presenta un perfil de toxicidad relativamente bajo, con lo que su uso como fármaco neuroprotector resulta muy adecuado y no requiere de ensayos clínicos complejos como ocurre con otros candidatos a fármacos cuya toxicidad y seguridad se desconocen.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con el empleo del gemifloxacino en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, deterioro cognitivo leve, déficits cognitivos, demencias o enfermedades asociadas al envejecimiento, procesos patológicos asociados a la edad y progeria.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de una composición farmacéutica de gemifloxacino para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, deterioro cognitivo leve, déficits cognitivos, demencias o enfermedades asociadas al envejecimiento, procesos patológicos asociados a la edad y progeria tiene lugar mediante neuroprotección, en particular mediante la inhibición directa de la muerte neuronal.

En un aspecto adicional, la invención se relaciona con el empleo de una composición farmacéutica de gemifloxacino para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, deterioro cognitivo leve, déficits cognitivos, demencias o enfermedades asociadas al envejecimiento, procesos patológicos asociados a la edad y progeria, mediante la modulación del neurotransmisor acetilcolina.

Finalmente, la invención se relaciona con un método para la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, déficits cognitivos, demencias o enfermedades asociadas al envejecimiento, en un sujeto con necesidad de tratamiento, que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente eficiente de gemifloxacino, o una sal, prodroga y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una gráfica de barras que representa el efecto protector del gemifloxacino sobre la muerte neuronal causada por tunicamicina (TM). La figura muestra el porcentaje de la muerte celular (tomando el 100% la producida por TM) de los cultivos tratados con 23 μ M TM y gemifloxacino a diferentes concentraciones, representando las medias $\pm$ SD de 3 experimentos independientes por triplicado. *Diferencia significativa respecto a los tratamientos con TM sola, de acuerdo al test de Student ($p<0.05$).

La Figura 2 es una gráfica de barras que representa el efecto protector del gemifloxacino sobre la muerte neuronal causada por ácido okadaico (AO). La figura muestra el porcentaje de la muerte celular (tomando el 100% la producida por AO) de los cultivos tratados con 20 nM AO y gemifloxacino a diferentes concentraciones, representando las medias $\pm$ SD de 3 experimentos independientes por triplicado. *Diferencia significativa respecto a los tratamientos con AO solo, de acuerdo al test de Student ($p<0.05$).

La Figura 3 es una gráfica de barras que representa el efecto protector del gemifloxacino sobre la muerte neuronal causada por ácido 3-nitropropiónico (3-NP). La figura muestra el porcentaje de la muerte celular (tomando el 100% la producida por 3-NP) de los cultivos tratados con 30 μ M 3-NP y gemifloxacino a diferentes concentraciones, representando las medias $\pm$ SD de 3 experimentos independientes por triplicado.

La Figura 4 es una gráfica de barras que representa el efecto protector del gemifloxacino sobre la muerte neuronal causada por camptotecina (CPT). La figura muestra el porcentaje de la muerte celular (tomando el 100% la producida por CPT) de los cultivos tratados con 20 nM CPT y gemifloxacino a diferentes concentraciones, representando las medias $\pm$ SD de 3 experimentos independientes por triplicado. *Diferencia significativa respecto a los tratamientos con CPT sola, de acuerdo al test de Student ($p<0.05$).

La Figura 5 es una gráfica de barras que representa el efecto neuroprotector del gemifloxacino [codificada en la figura como GFX] (en comparación con el inhibidor específico de caspasas Z-VAD-fmk) de la activación de la caspasa 3/7 por camptotecina (CPT). La figura muestra el porcentaje de inhibición de la actividad caspasa 3/7 de los cultivos tratados con 50 μ M CPT y gemifloxacino a diferentes concentraciones y Z-VAD-fmk (en presencia o ausencia de CPT), representando las medias $\pm$ SD de 2 experimentos independientes por triplicado. *Diferencia significativa respecto a los tratamientos con CPT sola, de acuerdo al test de Student ($p<0.05$).

La Figura 6 es una gráfica de barras que representa el efecto neuroprotector del gemifloxacino [codificada en la figura como GFX] (en comparación con el inhibidor específico de caspasas Z-VAD-fmk) de la apoptosis causada por camptotecina (CPT) y determinada por citometría de flujo. La figura muestra el porcentaje de células apoptóticas determinadas por fragmentación de ADN (tomando el 100% de actividad la producida por CPT) de los cultivos tratados con 50 μ M CPT y gemifloxacino a diferentes concentraciones y Z-VAD-fmk (en presencia o ausencia de CPT), representando las medias $\pm$ SD de 2 experimentos independientes por triplicado. *Diferencia significativa respecto a los tratamientos con CPT sola, de acuerdo al test de Student ($p<0.05$).

La Figura 7 es una gráfica de barras que representa el efecto inhibidor *in vitro* sobre la acetilcolinesterasa (AChE) del gemifloxacino (en comparación con el inhibidor específico de BW284c51). La figura muestra el porcentaje de actividad AChE y su modulación por gemifloxacino a diferentes concentraciones y BW284c51, representando las medias $\pm$ SD de 2 experimentos independientes por triplicado. *Diferencia significativa respecto al control (sin tratamiento), de acuerdo al test de Student ($p<0.05$).

La Figura 8 es una gráfica de barras que representa el efecto inhibidor *in vivo* sobre la acetilcolinesterasa (AChE) del gemifloxacino (en comparación con el inhibidor específico de BW284c51). La figura muestra el porcentaje de actividad AChE celular normalizado por la cantidad de proteína y su inhibición por gemifloxacino a diferentes concentraciones y BW284c51, representando las medias $\pm$ SD de 2 experimentos independientes por triplicado. *Diferencia significativa respecto al control (sin tratamiento), de acuerdo al test de Student ($p<0.05$).

La Figura 9 es una gráfica de dispersión XY que representa el paso de barrera hematoencefálica por difusión pasiva del gemifloxacino en comparación con un fármaco que atraviesa la barrera con facilidad (verapamilo) y otro que no atraviesa la barrera (teofilina). En el eje X se representa el porcentaje de paso de barrera hematoencefálica de los compuestos, y en el eje Y se representa el parámetro de permeabilidad efectiva (P_e) de los compuestos.

La Figura 10 es una gráfica de dispersión XY que representa el paso de barrera hematoencefálica del gemifloxacino [codificada en la figura como GFX] en peces cebra adulto (medias $\pm$ SEM). Los peces fueron administrados con 1.000 mg/Kg de gemifloxacino en el agua y la cantidad de compuesto fue determinado en el cerebro de los animales después de 15 min, 30 min, 1 h, 4 h y 24 h post-tratamiento mediante UPLC/MS. En el eje X se representa el tiempo post-tratamiento del gemifloxacino, y en el eje Y se representa la cantidad de gemifloxacino en el cerebro (peso/peso).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Para facilitar la comprensión de la invención objeto de esta solicitud de patente, a continuación se expone el significado de algunos términos y expresiones utilizados en el contexto de la invención.

Una “sustancia neurotóxica” tal como aquí se utiliza son sustancias químicas que producen alteraciones funcionales, estructurales y bioquímicas del sistema nervioso central. Estos efectos adversos implican cambios que producen una desregulación o alteración del sistema nervioso. La naturaleza de dicho cambio puede ser neuroquímica, morfológica, o relacionada con la conducta y puede manifestarse transitoria o permanentemente.

El término “enfermedad neurodegenerativa”, tal como aquí se utiliza, incluye enfermedades que resultan de la degeneración o deterioro del tejido nervioso, en particular de las neuronas, que conduce, a lo largo del tiempo, a una disfunción o a una incapacidad; el término degeneración incluye pérdida de la viabilidad celular, pérdida de la función celular y/o pérdida del número de células (neuronas y otras). Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de enfermedades neurodegenerativas incluyen enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Alexander, déficits cognitivos y/o psicomotores, ataxias, demencias, enfermedades cerebrovasculares, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple (EM), etc. En una realización particular, dicha enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad relacionada con la muerte neuronal causada por una sustancia neurotóxica, por ejemplo, una sustancia que produce estrés de retículo endoplásmico, apoptosis, desorganización del citoesqueleto, degeneración de los ganglios basales o daño mitocondrial.

Los términos “neuroprotección” y “neuroprotector”, tal como aquí se utilizan, se refieren a la atenuación de los efectos de la degeneración o muerte neuronal mediante cualquier mecanismo conocido o por conocer por ejemplo, necrosis, apoptosis, autofagia, excitotoxicidad, daño oxidativo, daño mitocondrial, daño de retículo endoplásmico, deposición de subproductos, pérdida de la arquitectura celular, etc., o a la desaparición de los efectos de la degeneración o muerte neuronal mediante cualquier mecanismo conocido o por conocer por ejemplo, necrosis, apoptosis, autofagia, excitotoxicidad, daño oxidativo, daño mitocondrial, daño de retículo endoplásmico, deposición de subproductos, pérdida de la arquitectura celular, etc., o a la disminución o desaparición de sus efectos secundarios.

El término “sujeto”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un miembro de una especie de mamífero, e incluye, pero no se limita a, animales domésticos, primates y humanos; preferentemente, el sujeto es un ser humano, masculino o femenino, de cualquier edad o raza. En una realización particular, dicho sujeto es un mamífero que padece, o es susceptible de padecer una enfermedad neurodegenerativa, tal como una enfermedad neurodegenerativa crónica o una enfermedad asociada al envejecimiento.

El término “sal” debe entenderse que significa cualquier forma del gemifloxacino en el que el compuesto asume una forma iónica, o está cargado y se acopla con un contraión (un catión o anión) o están en disolución. Por esto debe entenderse también complejos del compuesto activo con otras moléculas e iones, y en particular complejos que se complejan a través de interacciones iónicas.

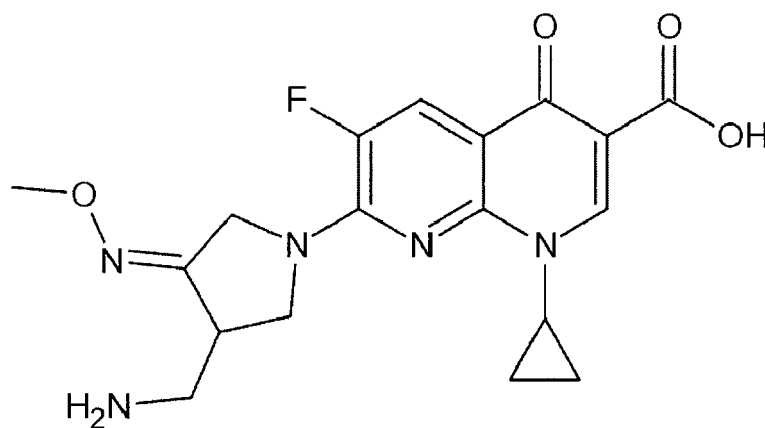
El término “solvato” según esta invención debe entenderse que significa cualquier forma del compuesto gemifloxacino que tenga unido a través de un enlace no covalente otra molécula (más probablemente un disolvente).

El término “profármaco” o “prodroga” se usa en su sentido más amplio y engloba aquellos derivados que se convierten *in vivo* en los compuestos de la invención. Tales derivados se les ocurrirán fácilmente a aquellos expertos en la técnica, e incluyen, dependiendo de los grupos funcionales presentes en la molécula. Ejemplos de métodos bien conocidos para producir un profármaco de un compuesto de actuación dado son conocidos por aquellos expertos en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo, en Krogsgaard-Larsen *et al.*, “Textbook of Drugdesign and Discovery” Taylor & Francis (Abril 2002). Derivados o profármacos particularmente favorables son aquellos que aumentan la biodisponibilidad de los compuestos de esta invención cuando se administran tales compuestos a un paciente (por ejemplo, permitiendo que un compuesto administrado por vía oral se absorba más fácilmente en la sangre) o aquellos que aumentan la administración del compuesto original un compartimiento biológico (por ejemplo, el cerebro o sistema linfático) en relación con la especie original.

El término “farmacéuticamente aceptable” se refiere a composiciones y entidades moleculares que son tolerables fisiológicamente y no producen normalmente reacciones alérgicas o reacciones no favorables similares como trastornos gástricos, mareos, y reacciones del mismo estilo, cuando son administradas en humanos o animales. Preferiblemente, el término “farmacéuticamente aceptable” significa que está aprobado por una agencia regulatoria, o que está incluido en una farmacopea para su uso en animales, y particularmente, en humanos.

Nuevos usos terapéuticos del gemifloxacino

En un aspecto, la invención se relaciona con el empleo del gemifloxacino de fórmula (I), las sales, profármacos y/o solvatos del mismo, en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de la muerte neuronal, en particular la asociada a enfermedades neurodegenerativas, deterioro cognitivo leve, déficits cognitivos, demencias, enfermedades asociadas al envejecimiento y/o procesos patológicos asociados a la edad y progeria.



(I)

Los resultados de la investigación realizada por los inventores demuestran que la prevención y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, deterioro cognitivo leve, déficits cognitivos, demencias, enfermedades asociadas al envejecimiento y/o procesos patológicos asociados a la edad y progeria con el compuesto gemifloxacino tiene lugar, al menos parcialmente, mediante neuroprotección, en particular mediante la inhibición directa de la muerte neuronal, esto es, mediante la inhibición de la muerte de las células neuronales del sistema nervioso una vez que dicho compuesto ha atravesado la barrera hematoencefálica (BHE). Por tanto, este mecanismo de acción tendría lugar sin la participación del sistema inmune.

Numerosos ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto tanto el efecto neuroprotector del gemifloxacino frente a la acción de diferentes sustancias neurotóxicas, como su efecto antiapoptótico en neuronas colinérgicas de origen humano.

El efecto neuroprotector del gemifloxacino frente a la acción de una sustancia causante de estrés de retículo endoplásmico (tunicamicina) en células colinérgicas humanas se describe en el Ejemplo 1. En dicho ejemplo, se observó que el gemifloxacino es capaz de reducir, cuantitativamente y de forma significativa la muerte neuronal causada por estrés de retículo endoplásmico, lo que pone de manifiesto la capacidad neuroprotectora de dicho compuesto (Figura 1).

Con el objetivo de definir mejor el efecto neuroprotector del compuesto, los inventores analizaron en el Ejemplo 2 con más detalle el proceso neurodegenerativo mediante el análisis de la muerte neuronal causada por la acción del ácido okadaico (AO), que es una sustancia causante de muerte celular por desorganización del citoesqueleto. El AO se usa para modelizar farmacológicamente una de las marcas histopatológicas observadas en los cerebros de enfermos de Alzheimer, como son los ovillos neurofibrilares o *tangles*, consecuencia de la hiperfosforilación de la proteína Tau. En dicho ejemplo, se observó que el gemifloxacino es capaz de reducir cuantitativamente y de forma significativa la muerte neuronal causada por desorganización del citoesqueleto, lo que pone de manifiesto la capacidad neuroprotectora de dicho compuesto (Figura 2).

Con el objetivo de definir mejor el efecto neuroprotector del compuesto, los inventores analizaron en el Ejemplo 3 con más detalle el proceso neurodegenerativo mediante el análisis de la muerte neuronal causada por el tratamiento con ácido 3-nitropropiónico (3-NP), que es una toxina mitocondrial que interfiere en la síntesis de ATP, inhibiendo la enzima succinato deshidrogenasa, lo que causa estrés oxidativo y muerte celular. El 3-NP se usa para modelizar farmacológicamente la neurodegeneración característica de la enfermedad de Huntington. En dicho ejemplo, se observó que el gemifloxacino es capaz de reducir cuantitativamente la muerte neuronal causada por daño mitocondrial, lo que pone de manifiesto la capacidad neuroprotectora de dicho compuesto (Figura 3).

Con el objetivo de definir mejor el efecto neuroprotector del compuesto, los inventores analizaron en el Ejemplo 4 con más detalle el proceso neurodegenerativo mediante el análisis de la muerte neuronal causada por la acción de una sustancia causante de apoptosis (camptotecina [CPT]), determinando que el gemifloxacino es capaz de reducir cuantitativamente y de forma significativa la muerte neuronal causada por apoptosis, lo que pone de manifiesto la capacidad neuroprotectora de dicho compuesto (Figura 4). Asimismo, con el objetivo de definir mejor el efecto neuroprotector de dicho compuesto, los inventores analizaron con más detalle el proceso neurodegenerativo mediante el análisis de la actividad de la caspasa 3/7 determinando que el gemifloxacino es capaz de reducir cuantitativamente y de forma significativa la activación de la caspasa 3/7, en comparación con un inhibidor específico de la muerte neuronal por apoptosis, el Z-VAD-fmk, lo que pone de manifiesto la capacidad neuroprotectora de dicho compuesto (Figura 5). Asimismo, con el objetivo de definir mejor el efecto neuroprotector de dicho compuesto, los inventores analizaron con más detalle el proceso neurodegenerativo mediante citometría de flujo de la muerte neuronal causada por apoptosis y su inhibición por el gemifloxacino, en comparación con un inhibidor específico de la muerte neuronal por apoptosis, el Z-VAD-fmk, determinando que el gemifloxacino es capaz de inhibir cuantitativamente y de forma significativa la muerte neuronal causada por apoptosis (Figura 6).

Con el objetivo de definir mejor el efecto neuroprotector del compuesto, los inventores analizaron en el Ejemplo 5 la capacidad de inhibir el enzima acetilcolinesterasa (AChE) *in vitro*, ya que este enzima degrada el neurotransmisor acetilcolina (ACh), formando colina y acetato e impidiendo la actividad de la ACh en la sinapsis nerviosa, lo que se ha relacionado con, entre otras, la enfermedad de Alzheimer (EA). En dicho ejemplo, se observó que el gemifloxacino es capaz de inhibir la AChE *in vitro*, en comparación con un inhibidor específico de la AChE, lo que pone de manifiesto la capacidad neuroprotectora de dicho compuesto (Figura 7). Asimismo, con el objetivo de definir mejor el efecto neuroprotector del gemifloxacino sobre la AChE, los inventores analizaron con más detalle la inhibición mediante estudios *in vivo* utilizando neuronas humanas, observándose que el gemifloxacino es capaz de inhibir la AChE *in vivo*, en comparación con un inhibidor específico de la AChE, lo que pone de manifiesto la capacidad neuroprotectora de dicho compuesto (Figura 8). Por lo que en otro aspecto de la invención, se reivindica el gemifloxacino o una formulación farmacéutica del mismo para su uso en la modulación del neurotransmisor acetilcolina y para la prevención y/o tratamiento de enfermedades relacionadas con la modulación del neurotransmisor acetilcolina.

Con el objetivo de definir mejor el efecto neuroprotector del compuesto, los inventores analizaron en el Ejemplo 6 la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) del gemifloxacino. En dicho ejemplo, se observó que el gemifloxacino es capaz de atravesar la BHE por difusión pasiva con una mayor eficiencia que un compuesto conocido (teofilina) que no atraviesa la barrera, y próximo a un compuesto conocido que sí la atraviesa (verapamilo), lo que pone de manifiesto la utilidad terapéutica de dicho compuesto en neuroprotección (Figura 9). Adicionalmente, los investigadores determinaron que el gemifloxacino es capaz de atravesar BHE en un modelo animal vertebrado como es el pez cebra, lo que confirma su utilidad terapéutica (Figura 10).

Se puede dar el caso que enfermedades neurodegenerativas se deban a procesos autoinmunes como el caso de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la esclerosis múltiple (EM). La composición farmacéutica proporcionada por esta invención, que comprende gemifloxacino, se usa para la prevención y/o el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica y la esclerosis múltiple, de tal manera que el principio activo gemifloxacino actúa mediante neuroprotección, en particular mediante la inhibición directa de la muerte neuronal.

Para su administración en la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, déficits cognitivos, demencias o enfermedades asociadas al envejecimiento, el gemifloxacino se formulará en una composición farmacéutica, en una cantidad terapéuticamente efectiva, junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

La composición farmacéutica proporcionada por esta invención puede contener el gemifloxacino o uno o más fármacos diferentes junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. En una realización particular, dicha composición farmacéutica comprende únicamente el gemifloxacino. Dicha composición farmacéutica es útil para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, déficits cognitivos, demencias o enfermedades asociadas al envejecimiento.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden gemifloxacino, proporcionadas por esta invención, pueden formularse en cualquier forma farmacéutica de administración adecuada para su administración por la vía de administración elegida. A modo ilustrativo, no limitativo, las composiciones farmacéuticas proporcionadas por esta invención pueden formularse en una forma farmacéutica sólida de administración por vía oral (e.g., gránulos, comprimidos, cápsulas, etc.), en una forma farmacéutica líquida de administración por vía oral (e.g., soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.), en una forma farmacéutica para su administración por vía parenteral (e.g., soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.). Para ello, en cada caso, se elegirán los vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados para la forma farmacéutica de administración y vía de administración elegida, por ejemplo, aglutinantes, diluyentes, desintegrantes, lubricantes, humectantes, etc., para la formulación de formas farmacéuticas de administración sólidas, y tampones, tensioactivos, etc., para la formulación de formas farmacéuticas de administración líquidas. Dichos vehículos y excipientes deben ser farmacéuticamente aceptables y farmacológicamente tolerables y han de poder ser combinados con otros componentes de la formulación sin ejercer ningún efecto adverso sobre el sujeto tratado. Información sobre dichos vehículos y excipientes, así como sobre dichas formas farmacéuticas de administración de dicho principio activo puede encontrarse en tratados de farmacia galénica. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos, en general, y de sus procedimientos de preparación puede encontrarse en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 1ª Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

La composición farmacéutica proporcionada por esta invención comprende, al menos, el gemifloxacino en una cantidad terapéuticamente eficiente. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente eficiente" se refiere a la cantidad de fármaco calculada para producir el efecto deseado. La dosis de fármaco a administrar a un sujeto puede variar dentro de un amplio intervalo dependiendo de numerosos factores, entre los que se incluyen las características del fármaco utilizada, e.g., su actividad y vida media biológica, la concentración del fármaco en la composición farmacéutica, la situación clínica del sujeto, la severidad de la patología, la forma farmacéutica de administración elegida, etc. La composición farmacéutica proporcionada por esta invención se puede administrar una o más veces al día con fines preventivos o terapéuticos o con otras pautas de administración, no necesariamente diaria sino también de forma puntual, semanal, etc. En una realización particular, la dosis de principio activo administrada a un sujeto que necesita tratamiento para el tratamiento y/o prevención de los estados mencionados anteriormente está en el intervalo de 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal, normalmente entre 0.2 y 15 mg/kg de peso corporal y preferiblemente entre 1 y 13 mg/kg de peso corporal.

En un aspecto la invención se relaciona con un método para la prevención o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, déficits cognitivos, demencias o enfermedades asociadas al envejecimiento, en un sujeto con necesidad de tratamiento, que comprende la administración a dicho sujeto de una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficiente de gemifloxacino, o una sal, prodroga y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto preferido, este método de prevención o tratamiento actúa mediante neuroprotección, en particular mediante la inhibición directa de la muerte neuronal.

Otro aspecto la invención trata de un método en el que la composición farmacéutica proporcionada por esta invención, si se desea, puede usarse junto con otros fármacos, por ejemplo, fármacos útiles en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, déficits cognitivos, demencias o enfermedades asociadas con el envejecimiento, con el fin de aumentar la eficiencia de la composición farmacéutica proporcionada por esta invención, generándose de este modo una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden facilitarse como una composición farmacéutica separada para su administración al mismo tiempo (administración simultánea) que la composición farmacéutica proporcionada por esta invención o en momentos diferentes (administración secuencial) respecto a la administración de la composición farmacéutica proporcionada por esta invención. A modo ilustrativo, no limitativo, ejemplos de fármacos adicionales que pueden formar parte de la misma terapia o composición farmacéutica junto con el gemifloxacino son: fármacos para el tratamiento del alzheimer (tacrina, rivastigmina, memantina, donepezilo, galantamina ...), de parkinson (carbidopa, levodopa, bromocriptina, pramipexol, ropinirol, amantadina, rasagilina ...), antipsicóticos como el haloperidol, antidepresivos como la amitriptilina, ansiolíticos como el lorazepam, antiinflamatorios como la aspirina, suplementos dietéticos como las vitaminas E, C, B, el folato o el extracto de *Ginkgo biloba* o fármacos contra el resto de enfermedades neurodegenerativas indicadas en la patente.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el gemifloxacino para el tratamiento y/o prevención de las enfermedades neurodegenerativas, déficits cognitivos, demencias o enfermedades asociadas con el envejecimiento. Las características del fármaco así como las de dichas enfermedades ya han sido mencionadas previamente.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la prevención y/o tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, déficits cognitivos, demencias o enfermedades asociadas con el envejecimiento, que comprende administrar a un sujeto en necesidad de tratamiento una cantidad terapéuticamente eficiente de gemifloxacino o de una composición farmacéutica proporcionada por esta invención que comprende el gemifloxacino. Las características del fármaco así como las de dichas enfermedades y composiciones farmacéuticas que comprenden un fármaco ya han sido mencionadas previamente.

ES 2 373 598 A1

Los siguientes Ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados en sentido limitativo de la misma.

5 Ejemplo 1

Efecto protector del gemifloxacino sobre la muerte neuronal inducida por estrés de retículo endoplásmico

10 El ensayo fue realizado sobre células en cultivo de neuroblastoma humano SK-N-MC procedentes de “American Type Culture Collection (ATCC)”. En todos los casos se siguieron estrictas normas de esterilidad y la manipulación se llevó a cabo en cabinas de seguridad biológica clase II que siguen la norma europea EN 12469. Las células fueron mantenidas en el medio de cultivo “Minimun Essential Medium Eagle” suplementado con piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, gentamicina 0.05 mg/ml y suero fetal bovino 10%.

15 Se analizó la inhibición producida por el mesilato de gemifloxacino de la muerte celular causada por el tratamiento con tunicamicina (TM) que origina estrés de retículo endoplásmico. La TM es un inhibidor de la N-glicosilación de proteínas, lo que produce el plegamiento anormal de las proteínas en el retículo endoplásmico, con lo que dichas proteínas se acumulan y producen estrés de retículo endoplásmico que desemboca en la muerte celular.

20 Estas células, en pase no superior a 15, fueron sembradas sobre placas de 96 pocillos tratadas para células adherentes con una concentración celular de 5×10^4 células/pocillo; para cada condición del ensayo se sembraron 3 pocillos de la placa.

25 Tras 24 h de incubación de las células a 37°C y 5% CO₂ se procedió a los tratamientos celulares con 100 µl de volumen total para las condiciones siguientes:

- *Control*: medio de cultivo (medio).

30 - *Tunicamicina (TM)*: medio con tunicamicina 23 µM, que produce la muerte del 50% de las células.

- *TM más mesilato de gemifloxacino*: medio con TM (23 µM) más mesilato de gemifloxacino a 1, 4, 10, 40 ó 100 µM.

35 Las células fueron incubadas (a 37°C y 5% CO₂) con estos tratamientos durante 22 h, pasadas las cuales se añadió el reactivo WST-1. El test WST-1 se basa en la medida de la actividad metabólica. El daño celular produce la pérdida de la habilidad de las células de obtener la energía necesaria para mantener sus funciones metabólicas y el crecimiento celular, por lo que las células metabólicamente activas (vivas) reducen la sal de tetrazolium a formazán mediante el sistema succinato-tetrazolium reductasa (de la cadena respiratoria mitocondrial). El formazán formado puede ser detectado colorimétricamente, ya que tiene una absorbancia de 440 nm. A las 2 horas de añadido el reactivo se realizó la lectura en un lector de placas a 440 nm.

45 Los resultados obtenidos se muestran, como aparece en la Figura 1, como el porcentaje de muerte celular para cada tratamiento referido a la muerte producida por la TM. Se observó protección de la muerte a 4, 10 y 40 µM de mesilato de gemifloxacino, alcanzando aproximadamente un 50% a 40 µM. De estos resultados se concluye que el gemifloxacino muestra un efecto protector de la muerte de células humanas de origen neuronal causada por estrés de retículo endoplásmico.

50 Ejemplo 2

Efecto protector del gemifloxacino sobre la muerte neuronal inducida por ácido okadaico

55 El ensayo fue realizado sobre células en cultivo de neuroblastoma humano SK-N-MC procedentes de “American Type Culture Collection (ATCC)”. En todos los casos se siguieron estrictas normas de esterilidad y la manipulación se llevó a cabo en cabinas de seguridad biológica clase II que siguen la norma europea EN 12469. Las células fueron mantenidas en el medio de cultivo “Minimun Essential Medium Eagle” suplementado con piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, gentamicina 0.05 mg/ml y suero fetal bovino 10%.

60 Se analizó la inhibición producida por el mesilato de gemifloxacino de la muerte celular causada por el tratamiento con ácido okadaico (AO). El AO es un inhibidor de la protein fosfatasa 1 (PP1) y produce muerte celular por desorganización del citoesqueleto. El AO se usa para modelizar farmacológicamente una de las marcas histopatológicas observadas en los cerebros de enfermos de Alzheimer, como son los ovillos neurofibrilares o *tangles*, consecuencia de la hiperfosforilación de la proteína Tau.

65 Estas células, en pase no superior a 15, fueron sembradas sobre placas de 96 pocillos tratadas para células adherentes con una concentración celular de 5×10^4 células/pocillo; para cada condición del ensayo se sembraron 3 pocillos de la placa.

ES 2 373 598 A1

Tras 24 h de incubación de las células a 37°C y 5% CO₂ se procedió a los tratamientos celulares con 100 µl de volumen total para las condiciones siguientes:

- *Control*: medio de cultivo (medio).
- *Ácido Okadaico (AO)*: medio con AO 20 nM, que produce la muerte del 50% de las células.
- *AO más mesilato de gemifloxacino*: medio con AO (20 nM) más mesilato de gemifloxacino a 1, 4, 10, 40 ó 100 µM.

Las células fueron incubadas (a 37°C y 5% CO₂) con estos tratamientos durante 22 h, pasadas las cuales se añadió el reactivo WST-1. El test WST-1 se basa en la medida de la actividad metabólica. El daño celular produce la pérdida de la habilidad de las células de obtener la energía necesaria para mantener sus funciones metabólicas y el crecimiento celular, por lo que las células metabólicamente activas (vivas) reducen la sal de tetrazolium a formazán mediante el sistema succinato-tetrazolium reductasa (de la cadena respiratoria mitocondrial). El formazán formado puede ser detectado colorimétricamente, ya que tiene una absorbancia de 440 nm. A las 2 horas de añadido el reactivo se realizó la lectura en un lector de placas a 440 nm.

Los resultados obtenidos se muestran, como aparece en la Figura 2, como el porcentaje de muerte celular para cada tratamiento referido a la muerte producida por AO. Se observó protección de la muerte a 4, 10 y 40 µM de mesilato de gemifloxacino, alcanzando un 57% a 10 µM. De estos resultados se concluye que el gemifloxacino muestra un efecto protector de la muerte de células humanas de origen neuronal causada por desorganización del citoesqueleto.

Ejemplo 3

Efecto protector del gemifloxacino sobre la muerte neuronal inducida por 3-nitropropiónico

El ensayo fue realizado sobre células en cultivo de neuroblastoma humano SK-N-MC procedentes de “American Type Culture Collection (ATCC)”. En todos los casos se siguieron estrictas normas de esterilidad y la manipulación se llevó a cabo en cabinas de seguridad biológica clase II que siguen la norma europea EN 12469. Las células fueron mantenidas en el medio de cultivo “Minimun Essential Medium Eagle” (MEM) suplementado con piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, gentamicina 0.05 mg/ml y suero fetal bovino 10%.

Se analizó la inhibición producida por el mesilato de gemifloxacino de la muerte celular causada por el tratamiento con ácido 3-nitropropiónico (3-NP). El 3-NP es una toxina mitocondrial que interfiere en la síntesis de ATP, ya que es inhibidor de la enzima succinato deshidrogenasa, produciendo estrés oxidativo y muerte celular. En los mamíferos el 3-NP produce degeneración de los ganglios basales y disfunciones del movimiento como distonía, corea e hipoquinesia, mimetizando algunos aspectos de la enfermedad de Huntington como los cambios neuroanatómicos, fisiológicos y químicos.

Estas células, en pase no superior a 15, fueron sembradas sobre placas de 96 pocillos tratadas para células adherentes con una concentración celular de 5x10⁴ células/pocillo; para cada condición del ensayo se sembraron 3 pocillos de la placa.

Tras 24 h de incubación de las células a 37°C y 5% CO₂ se procedió a los tratamientos celulares con 100 µl de volumen total para las condiciones siguientes:

- *Control*: medio de cultivo (medio).
- *3-Nitropropiónico (3-NP)*: medio con 3-NP 30 µM, que produce la muerte del 50% de las células.
- *3-NP más mesilato de gemifloxacino*: medio con 3-NP (30 µM) más mesilato de gemifloxacino a 1, 4, 10 ó 40 µM.

Las células fueron incubadas (a 37°C y 5% CO₂) con estos tratamientos durante 22 h, pasadas las cuales se añadió el reactivo WST-1. El test WST-1 se basa en la medida de la actividad metabólica. El daño celular produce la pérdida de la habilidad de las células de obtener la energía necesaria para mantener sus funciones metabólicas y el crecimiento celular, por lo que las células metabólicamente activas (vivas) reducen la sal de tetrazolium a formazán mediante el sistema succinato-tetrazolium reductasa (de la cadena respiratoria mitocondrial). El formazán formado puede ser detectado colorimétricamente, ya que tiene una absorbancia de 440 nm. A las 2 horas de añadido el reactivo se realizó la lectura en un lector de placas a 440 nm.

Los resultados obtenidos se muestran, como aparece en la Figura 3, como el porcentaje de muerte celular para cada tratamiento referido a la muerte producida por el 3-NP. Se observó protección de la muerte a 10 µM del mesilato de gemifloxacino, alcanzando un 40% a 10 µM. De estos resultados se concluye que el gemifloxacino muestra un efecto protector de la muerte de células humanas de origen neuronal causada por daño mitocondrial.

Ejemplo 4

Efecto protector del gemifloxacino sobre la muerte neuronal inducida por apoptosis

5 Los ensayos fueron realizados sobre células en cultivo de neuroblastoma humano SK-N-MC procedentes de "American Type Culture Collection (ATCC)". En todos los casos se siguieron estrictas normas de esterilidad y la manipulación se llevó a cabo en cabinas de seguridad biológica clase II que siguen la norma europea EN 12469. Las células fueron mantenidas en el medio de cultivo "Minimum Essential Medium Eagle" (MEM) suplementado con piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, gentamicina 0.05 mg/ml y suero fetal bovino
10 10%.

(i) *Protección de la muerte por camptotecina*

15 Se analizó la inhibición producida por el mesilato de gemifloxacino de la muerte celular causada por el tratamiento con camptotecina (CPT) (Sigma). La CPT es una quinolina alcaloide citotóxica que inhibe la enzima ADN topoisomerasa I, por lo que produce daño en el ADN que conduce a la apoptosis.

20 Las células SK-N-MC, en pase no superior a 15, fueron sembradas sobre placas de 96 pocillos tratadas para células adherentes con una concentración celular de 5×10^4 células/pocillo; para cada condición del ensayo se sembraron 3 pocillos de la placa.

Tras 24 h de incubación de las células a 37°C y 5% CO₂ se procedió a los tratamientos celulares con 100 µl de volumen total para las condiciones siguientes:

- 25 - *Control*: medio de cultivo (medio).
- *Camptotecina (CPT)*: medio con CPT 20 nM, que produce la muerte del 50% de las células.
- 30 - *CPT más mesilato de gemifloxacino*: medio con CPT (20 nM) más mesilato de gemifloxacino a 1, 4, 10, 40 ó 100 µM.

35 Las células fueron incubadas (a 37°C y 5% CO₂) con estos tratamientos durante 22 h, pasadas las cuales se añadió el reactivo WST-1. El test WST-1 se basa en la medida de la actividad metabólica. El daño celular produce la pérdida de la habilidad de las células de obtener la energía necesaria para mantener sus funciones metabólicas y el crecimiento celular, por lo que las células metabólicamente activas (vivas) reducen la sal de tetrazolium a formazán mediante el sistema succinato-tetrazolium reductasa (de la cadena respiratoria mitocondrial). El formazán formado puede ser detectado colorimétricamente, ya que tiene una absorbancia de 440 nm. A las 2 horas de añadido el reactivo se realizó
40 la lectura en un lector de placas a 440 nm.

Los resultados obtenidos se muestran, como aparece en la Figura 4, como el porcentaje de muerte celular para cada tratamiento referido a la muerte producida por la CPT. Se observó protección de la muerte por el mesilato de gemifloxacino alcanzando un 34% a 10 µM. De estos resultados se concluye que el gemifloxacino muestra un efecto
45 protector de la muerte de células humanas de origen neuronal causada por apoptosis.

(ii) *Protección de la apoptosis determinada por actividad de la caspasa 3/7 activa*

50 Se analizó la caspasa 3/7 activa, como método de cuantificación de la apoptosis, mediante el kit Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 (Promega). La caspasa 3 y la caspasa 7 son cisteín proteasas caracterizadas por mediar la ruptura de otras proteínas, siendo caspasas efectoras que desencadenan la señalización apoptótica. Se cuantificó la activación de la caspasa 3/7 por el tratamiento con CPT con un pre-tratamiento previo durante 24 h con mesilato de gemifloxacino (GFX).

55 Las células SK-N-MC, en pase no superior a 15, fueron sembradas sobre placas de 96 pocillos tratadas para células adherentes con una concentración celular de 4×10^4 células/pocillo; para cada condición del ensayo se sembraron 3 pocillos de la placa.

60 Después de 24 h tras la siembra de las células se procedió a los pre-tratamientos celulares (con mesilato de gemifloxacino a 4 ó 10 µM) durante 24 h con 100 µl de volumen total. Tras las 24 h de pre-tratamiento se procedió a los tratamientos celulares durante 6 h con 100 µl de volumen total para las condiciones siguientes:

- 65 - *Control*: medio de cultivo (medio).
- *CPT*: medio con CPT 50 µM.

- *CPT más Z-VAD-fmk (Alexis)*: medio con CPT 50 μ M más Z-VAD-fmk 50 μ M, como control positivo de inhibición.
- *CPT más mesilato de gemifloxacino*: medio con CPT 50 μ M más mesilato de gemifloxacino a 4 ó 10 μ M.

La medida de la caspasa 3/7 activa se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Sobre las células en cultivo se añadió el tampón de lisis, que lisa y permeabiliza las células, y el sustrato Z-DEVD-R110 de las caspasas efectoras 3 y 7. La caspasa 3 ó 7 activa produce la ruptura de los péptidos DEVD del sustrato y emite fluorescencia a 499/521 nm (emisión/excitación), que es determinada mediante el fluorímetro Infinite M200 (Tecan).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5, determinados en unidades de fluorescencia relativa (RFU) de la caspasa 3/7 activa tras cada tratamiento. La protección se determinó mediante la medida de la reducción de la caspasa 3/7 activa respecto al tratamiento con CPT, siendo del 29% y 52% a 4 y 10 μ M de mesilato de gemifloxacino, respectivamente. Estos resultados indican que el gemifloxacino muestra un efecto protector de la apoptosis en células humanas de origen neuronal. El Z-VAD-fmk, inhibidor específico de caspasas, inhibió en un 88% la activación de la caspasa 3/7.

(iii) Protección de la apoptosis mediante determinación de la fragmentación de ADN por citometría de flujo

Una de las características que muestran las células apoptóticas es la fragmentación del ADN. Basado en este proceso es posible marcar el ADN con el intercalante yoduro de propidio y mediante citometría de flujo se puede determinar el porcentaje de células que están en las primeras etapas del ciclo celular (fase G0/G1, carga n), de las que están duplicándose (fase S, carga entre n y 2n), de las que están en la última fase y mitosis (fase G2/M, carga 2n). De esta forma también se determina las células muertas por apoptosis, ya que tendrán una carga menor que n, debida a la fragmentación de ADN que se produce durante la apoptosis.

De esta forma se analizó la fragmentación de ADN producida tras el tratamiento con CPT durante 6 h con un pre-tratamiento previo durante 24 h de mesilato de gemifloxacino (GFX). Las células, en pase no superior a 15, fueron sembradas sobre placas de 6 pocillos tratadas para células adherentes con una concentración celular de 7.5×10^5 células/pocillo; para cada condición del ensayo se sembraron 2 pocillos de la placa.

Después de 24 h tras la siembra de las células se procedió a los pre-tratamientos celulares (con mesilato de gemifloxacino a 4 ó 10 μ M) durante 24 h con 2 ml de volumen total para las condiciones siguientes. Tras las 24 h de pre-tratamiento se procedió a los tratamientos celulares durante 6 h con 2 ml de volumen total para las condiciones siguientes:

- *Control*: medio de cultivo (medio).
- *CPT*: medio con CPT 50 μ M.
- *CPT más Z-VAD-fmk*: medio con CPT 50 μ M más Z-VAD-fmk 50 μ M, como control positivo de inhibición.
- *CPT más mesilato de gemifloxacino*: medio con CPT 50 μ M más mesilato de gemifloxacino a 4 ó 10 μ M.

Pasado el tiempo de tratamiento se recogieron las células junto con su medio de cultivo y se centrifugaron a 300 xg durante 5 min. Se eliminó el medio, se realizó un lavado con PBS y se fijaron durante 2 minutos con 500 μ l de etanol al 70% a -20°C. Una vez fijadas se centrifugaron a 400 xg durante 5 min, se lavaron con PBS y se les añadió yoduro de propidio a 0.05 mg/ml, diluido en tampón de ciclo (citrato sódico 0.1%, nonidet P-40 0.3% y RNAsa 0.02 mg/ml) y se incubaron 1 hora a 37°C. Se analizaron por citometría de flujo, comparando la fluorescencia del yoduro de propidio frente a la cantidad de ADN. El porcentaje de apoptosis se midió sobre la región sub-G1 (ADN fragmentado) de cada una de las condiciones.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6, como el porcentaje de células en apoptosis (con ADN fragmentado) de cada tratamiento referido a la apoptosis producida por la CPT. Se observó una protección del 30% a 4 μ M de mesilato de gemifloxacino. Estos resultados indican que la gemofloxacina, muestra un efecto protector de la apoptosis en células humanas de origen neuronal. El Z-VAD-fmk, inhibidor específico de caspasas, inhibió en un 90% el número de células apoptóticas.

Ejemplo 5

Efecto del gemifloxacino sobre la actividad acetilcolinesterasa (AChE)

5 La acetilcolinesterasa (AChE) es la enzima que degrada el neurotransmisor acetilcolina (ACh), formando colina y acetato e impidiendo la actividad de la ACh en la sinapsis nerviosa. Se ha relacionado la actividad de esta enzima con la enfermedad de Alzheimer (EA), ya que: (i) se detecta menos ACh en los cerebros de enfermos de EA que en los controles sanos, (ii) la ACh es un neurotransmisor fundamental para la creación de recuerdos, el aprendizaje y otras actividades intelectuales que están comprometidas en la EA, y (iii) la AChE degrada la ACh, por lo que la inhibición de la AChE es una diana terapéutica de la EA.

10 Se analizó la inhibición de la enzima AChE *in vitro* producida por el mesilato de gemifloxacino. Esta medida se basa en el método de Ellman (Ellman *et al.* Biochem Pharmacol 1961; 147[393]:406): se usa como sustrato sintético el yoduro de acetilcolina, que en presencia de la enzima AChE de *Electrophorus electricus* se transforma en acetato y tiocolina. La tiocolina reacciona con el DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico o reactivo de Ellman) produciendo un compuesto de color amarillo, 4-nitrotiolato, con absorbancia a 412 nm que es medido en el lector de placas BechmarkPlus (Biorad). Como control de inhibición se utiliza el compuesto BW284c51 que es un inhibidor específico de la AChE.

20 Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7 como el porcentaje de la actividad AChE *in vitro* de cada tratamiento referido al control. Se observó una inhibición de la actividad de la enzima con 4, 10 y 40 μM de mesilato de gemifloxacino del 54%, 46% y 29%, respectivamente, mientras que el inhibidor específico BW284c51 inhibió un 85% la actividad de la enzima.

25 Posteriormente se realizó el ensayo sobre la AChE celular utilizando las células neuronales SK-N-MC, que tienen actividad acetilcolinesterasa por lo que son un buen modelo celular. Se realizaron los tratamientos sobre las células y tras 24 h fueron Usadas y se realizó el ensayo de medida de actividad AChE basado en el método de Ellman, de la misma forma que el realizado *in vitro*. En este caso se utilizó para todos los tratamientos el inhibidor de colinesterasas inespecíficas iso-OMPA (tetraisopropil pirofosforamida). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8, como el porcentaje de la actividad AChE celular de cada tratamiento referido al control y normalizado por la cantidad de proteína total. Se observó inhibición de la actividad de la enzima con 10, 40 y 100 μM de mesilato de gemifloxacino de 21%, 36% y 22% respectivamente. El inhibidor BW284c51 inhibió un 24% la actividad de la enzima. Estos resultados en conjunto indican que el gemifloxacino es capaz de inhibir tanto *in vitro* como *in vivo* la enzima AChE.

Ejemplo 6

Paso de barrera hematoencefálica del gemifloxacino

40 (i) *Análisis del paso de barrera hematoencefálica por difusión pasiva analizado por ensayo PAMPA*

Se realizó un ensayo que tuvo por objeto predecir si el gemifloxacino es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) por difusión pasiva. La barrera se mimetizó en un sistema *in vitro* que permitió la evaluación del compuesto sin empleo de células. Para ello, se llevó a cabo el denominado ensayo PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeation Assay*), que emplea un sistema sándwich el cual determina el paso de compuestos por medio de difusión pasiva obviando el transporte activo. Como control positivo se empleó el verapamilo, un compuesto de elevada permeabilidad a la BHE, mientras que como control negativo se empleó teofilina, un compuesto que no atraviesa la BHE.

50 Para mimetizar la BHE se hizo uso de una mezcla de lípidos comercial derivada de cerebro de cerdo con una composición de fosfolípidos muy semejante a la que constituye la barrera humana, y denominada PBL (*Porcine Polar Brain Lipid*). Este compuesto se conservó a -20°C disuelto en dodecano a 100 $\mu\text{g/mL}$ en viales de cristal. Los compuestos mesilato de gemifloxacino, verapamilo y teofilina fueron almacenados a -20°C y utilizados a 100 μM en un tampón fosfato a pH 7.4 que contenía fosfato sódico monobásico (0.41 M) y fosfato potásico dibásico (0.287M) en DMSO al 1%.

55 En una placa con filtro de 96 pocillos con un tamaño de poro de 45 μm (MAIPN4550) se añadieron 5 μL de PBL a 20 $\mu\text{g/mL}$, y transcurridos dos minutos, se añadieron 300 μL del tampón fosfato. Esta placa se consideró la placa aceptora y se situó en la parte superior del sándwich. Sobre otra placa de 96 pocillos que ensamblaba con la anterior (MATRNP550) se añadieron 300 μL de mesilato de gemifloxacino, verapamilo o teofilina, a 100 μM y por triplicado. Además, se incluyó un blanco que incluía únicamente el 1% de DMSO en el tampón fosfato empleado. Esta placa se denominó la placa donadora. La placa aceptora fue situada sobre la placa donadora formando el sistema sándwich. Los compuestos objeto de estudio difundieron desde los pocillos de la placa donadora a los pocillos correspondientes de la placa aceptora durante las 18 h en las que el sistema se mantuvo intacto. El compuesto restante preparado se conservó en las mismas condiciones de humedad, temperatura y oscuridad que el sistema sándwich constituido por las placas. Transcurrido este tiempo, 100 μL de los pocillos de las placas donadoras y de las aceptoras se transvasaron a una placa de 96 pocillos especial para lectura a UV. Además, se trasvasaron 100 μL de los compuestos preparados para la realización del ensayo, conservándose de modo igual a las placas (pocillos basales). La placa UV se introdujo

en un espectrofotómetro en el cual se llevó a cabo un escáner en el UV desde 230 a 498 nm, con lecturas cada 4 nm. A partir de los datos espectrofotométricos se calculó el porcentaje de paso de barrera así como la permeabilidad efectiva (P_e) según lo descrito en la literatura (Wexler *et al.* J. Biomol Screen 2005; 10[4]:383-90). A continuación, se seleccionó en cada caso la longitud de onda adecuada y se tomaron los datos referidos a dicha longitud de onda para los pocillos de la placa aceptora, donadora o los pocillos basales. A partir de estos datos se calculó el porcentaje de paso de BHE, estimando el 100% con la absorbancia de la media de los pocillos basales, de modo que pudiera calcularse el porcentaje de compuesto existente en los pocillos aceptores y donadores tras el tiempo de contacto de las placas. Para calcular la P_e , se aplicó la siguiente fórmula:

$$P_e = C \times \ln \left(1 - \frac{[Droga]_{aceptora}}{[Droga]_{equilibrio}} \right)$$

Donde:

$$C = \frac{V_D \times V_A}{(V_D \times V_A) \times Area \times Tiempo}$$

$[Droga]_{aceptora}$ = Absorbancia del pocillo aceptor.

$[Droga]_{equilibrio}$ = Absorbancia de la media de los pocillos basales/2.

V_A = Volumen del pocillo aceptor = 0.3 cm³.

V_D = Volumen del pocillo donador = 0.3 cm³.

Área = 0.24 cm².

Tiempo = 64.000 s.

Los resultados del paso de BHE se muestran en la Figura 9, donde se representan los dos parámetros relacionados con la difusión a través de la BHE. El gemifloxacino presenta un paso de barrera eficiente de aproximadamente un 37% ($P_e = 4.4 \pm 0.4 \cdot 10^{-6}$ cm/s), y claramente superior al control negativo, teofilina, cuyo paso de barrera es inferior al 5% ($P_e = 0.4 \pm 0.3 \cdot 10^{-6}$ cm/s).

(ii) Análisis del paso de barrera hematoencefálica en peces cebra adultos mediante determinación por UPLC/MS

El ensayo tuvo por objeto determinar si el gemifloxacino (GFX) era capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), determinando la biodisponibilidad del compuesto en cerebro de pez cebra adulto.

En este ensayo se utilizaron peces cebra (*Danio rerio*) adultos de ambos géneros de la cepa salvaje AB. Los animales fueron mantenidos en un ciclo constante de luz/oscuridad de 12/12 h a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ en un sistema automatizado de peceras de recirculación de agua comercial (Aquaneering, US). Las condiciones del agua y medioambiente fueron mantenidas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todos los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo de acuerdo con la Directiva del Consejo de la Comunidad Europea 86/609/EEC, del 24 de noviembre de 1986. Los procedimientos fueron realizados bajo la supervisión de personal veterinario y fue aprobado por el comité ético de NEURON BPh.

Los peces cebra adultos fueron tratados por inmersión del compuesto sin frecuencia de renovación (ensayo estático) a una dosis de 1.000 mg/Kg siguiendo una cinética de tiempos de tratamiento que finalizó con el sacrificio humanitario y extracción de los cerebros de los animales a los 15 min, 30 min, 1 h, 4 h y 24 h post-tratamiento. En los procesos de manipulación se tomaron estrictas precauciones para prevenir contaminaciones. Para cada grupo experimental se utilizaron 4 animales, y el ensayo contó con un total de 24 peces cebra divididos en las siguientes pautas de administración:

- 4 animales control, tratados con agua de recirculación del sistema y sacrificados humanitariamente al final del ensayo (24 horas post-tratamiento).

ES 2 373 598 A1

- 20 animales tratados con el compuesto gemifloxacino (4 animales por condición) diluido en agua de recirculación del sistema a la dosis de 1.000 mg/Kg sin recambio de la sustancia durante el tiempo que duró el ensayo.

5

Después del tiempo de exposición de las sustancias a estudio, se determinó el paso de BHE del gemifloxacino en los cerebros de los peces mediante la técnica de UPLC/MS, tal y como muestra la Figura 10. El equipo empleado para tal efecto fue un Acquity/Quattro Premier XE (Waters) con detector de masas Quattro Premier XE (Waters). La fase móvil consistió en metanol (solvente A) y 0.1% de ácido fórmico (solvente B). El gradiente de elución fue: 0-4 min 90% A y 10% B. La temperatura de la columna fue de 35°C con un flujo de 0.3 mL/min y un volumen de inyección de muestra de 5 µL. Las condiciones de MS fijadas fueron: voltaje del capilar de 4 kV, voltaje de cono de 20 V en modo positivo y una temperatura de 120°C. El rango de medida seleccionado en modo SCAN fue 160-1000 m/z.

10

Los resultados del estudio demuestran que el gemifloxacino, sorprendentemente, atravesó la BHE de los peces cebras adultos ya que se observa su presencia en el cerebro del animal, presentando un pico de detección máximo a 1 h post-tratamiento con gemifloxacino.

15

Por lo tanto, de este ensayo se concluye que el gemifloxacino atraviesa la BHE de peces cebras adultos, y accede al cerebro.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Uso de gemifloxacino, una sal, prodroga y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de:

- a. enfermedades neurodegenerativas,
- b. deterioro cognitivo leve,
- c. déficits cognitivos,
- d. demencias
- e. enfermedades asociadas con el envejecimiento, y
- f. procesos patológicos asociados a la edad y progeria.

2. Uso según la reivindicación 1 en el que la prevención o tratamiento de:

- a. enfermedades neurodegenerativas,
- b. deterioro cognitivo leve,
- c. déficits cognitivos,
- d. demencias
- e. enfermedades asociadas con el envejecimiento, y
- f. procesos patológicos asociados a la edad y progeria tiene lugar mediante neuroprotección.

3. Uso según la reivindicación 2 en el que la neuroprotección se produce mediante la inhibición directa de la muerte neuronal.

4. Uso según la reivindicación 3, en el que la muerte neuronal es causada por una sustancia neurotóxica.

5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enfermedad neurodegenerativa es seleccionada entre enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, epilepsia, déficits cognitivos y/o psicomotores, ataxias, demencias, enfermedades cerebrovasculares y enfermedad de Alexander.

6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enfermedad neurodegenerativa es seleccionada entre enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, epilepsia, déficits cognitivos y/o psicomotores, ataxias, demencias, enfermedades cerebrovasculares y enfermedad de Alexander.

Figura 1

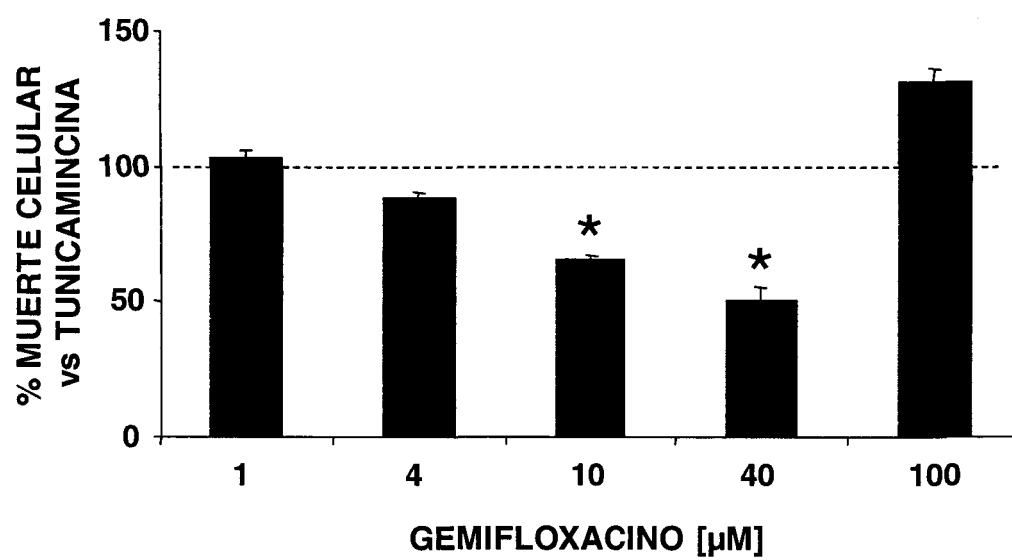


Figura 2

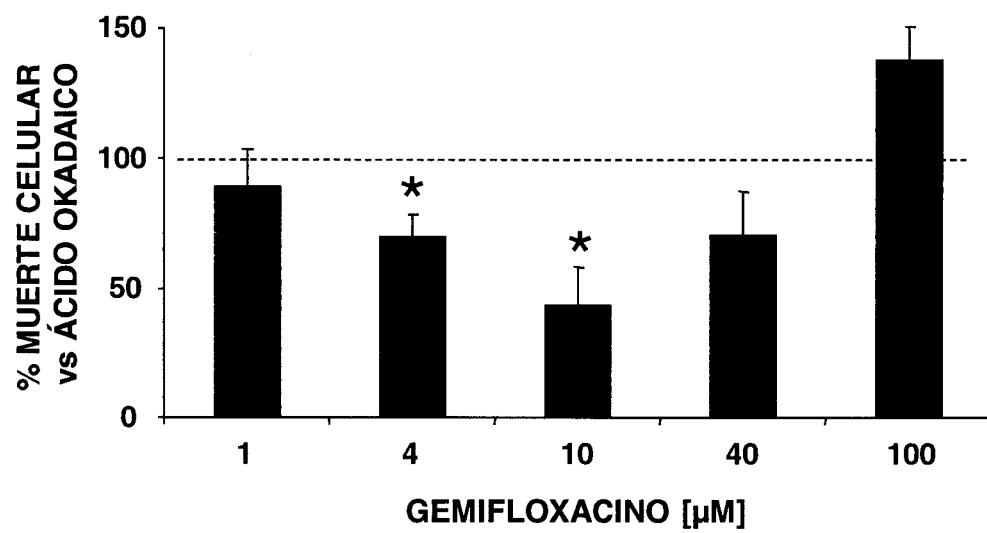


Figura 3

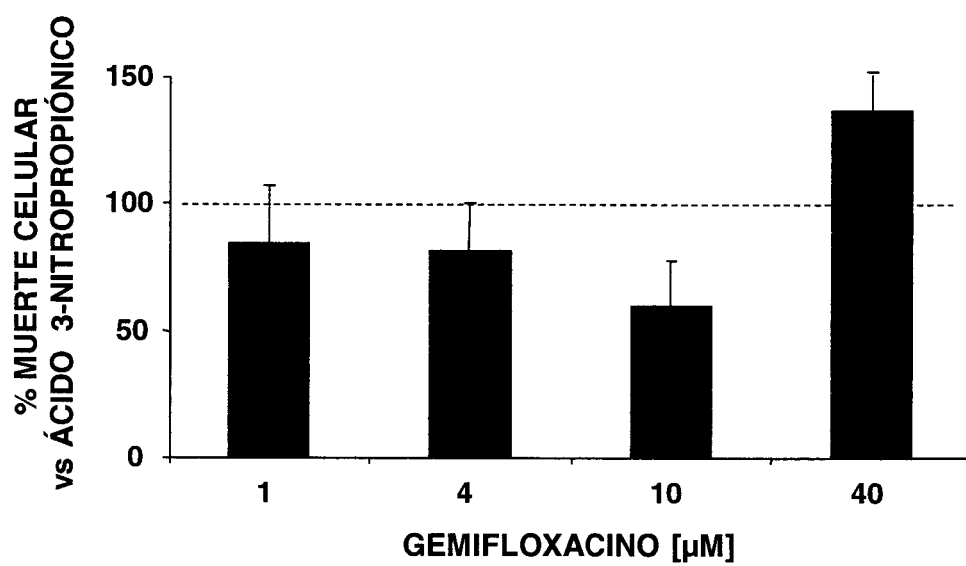


Figura 4

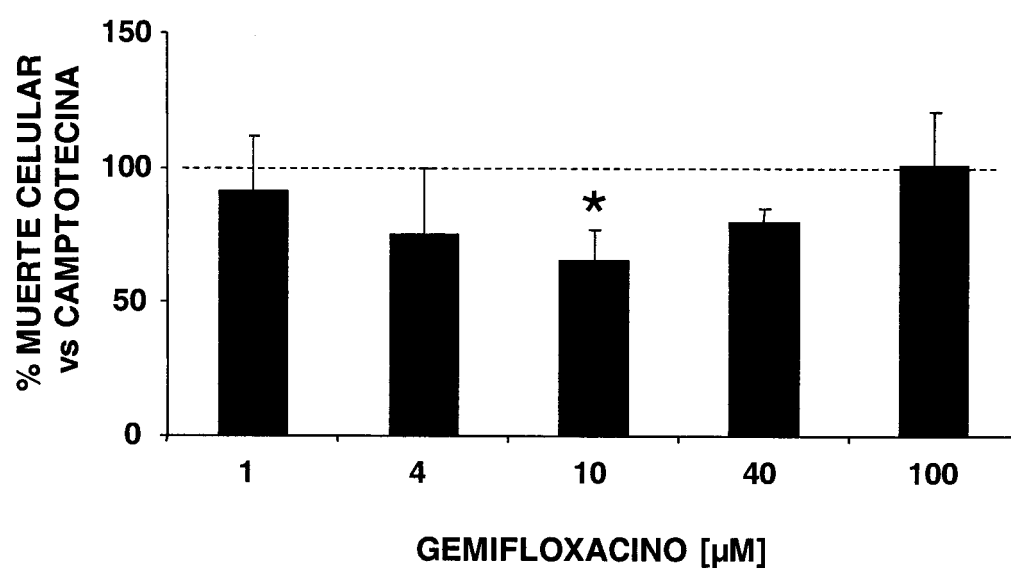


Figura 5

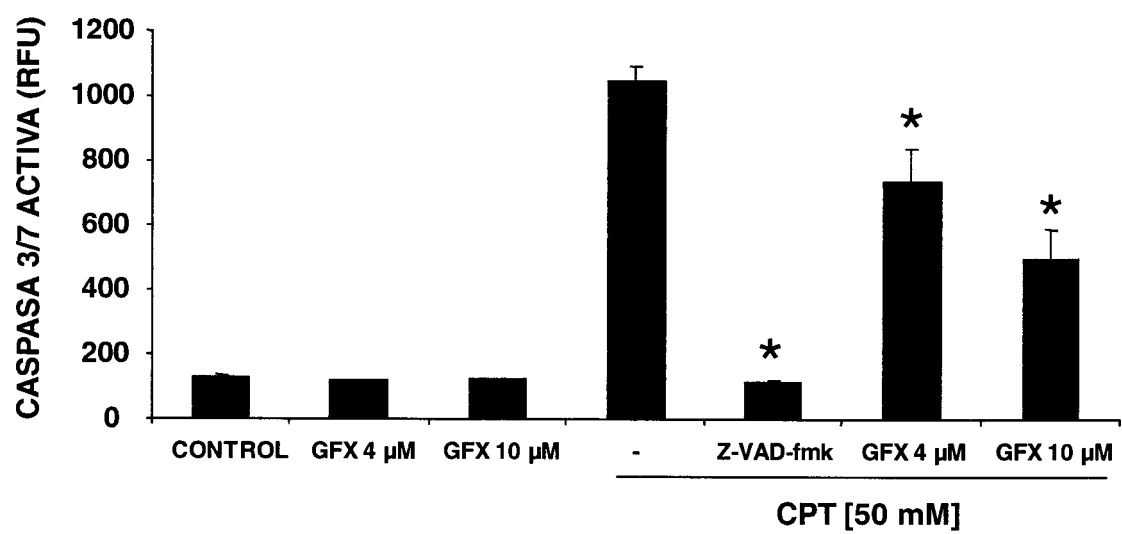


Figura 6

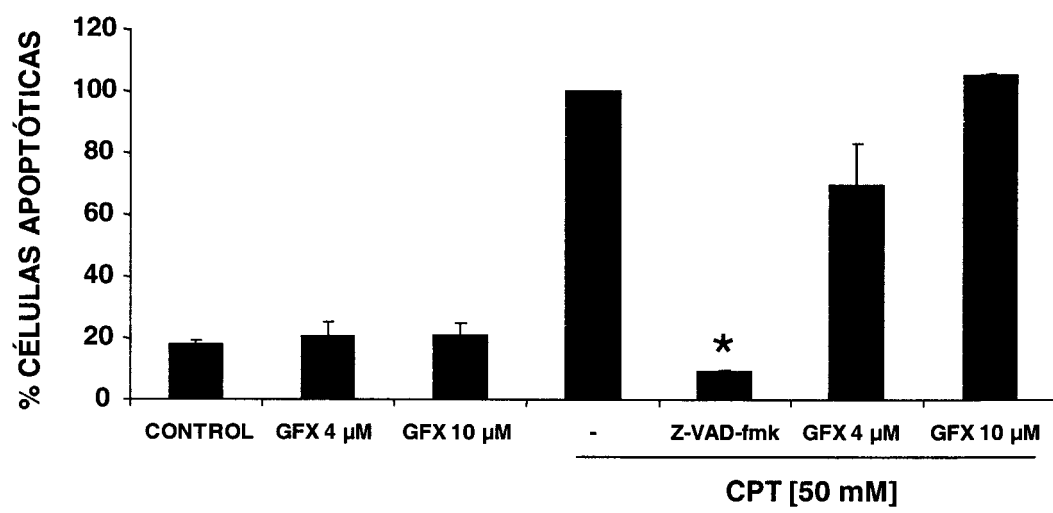


Figura 7

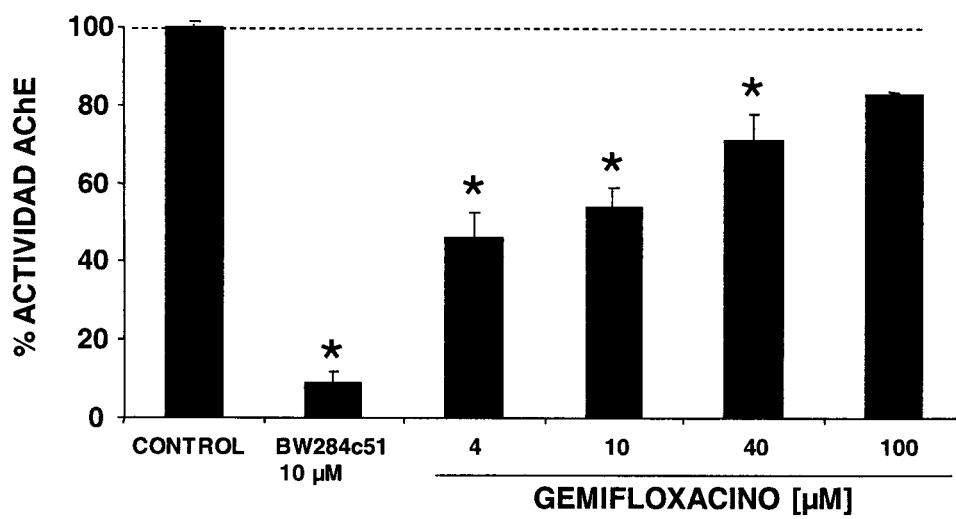


Figura 8

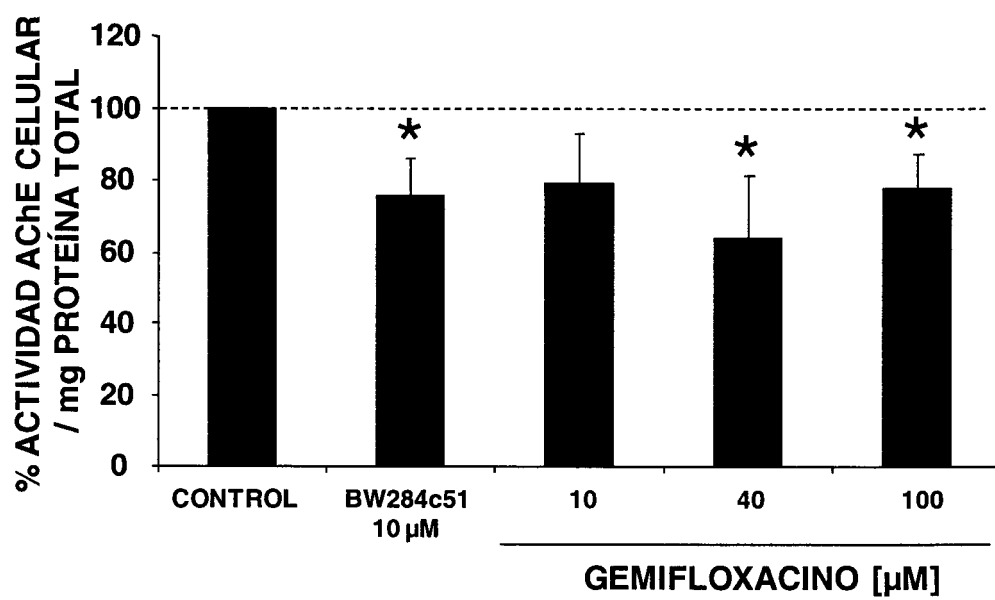


Figura 9

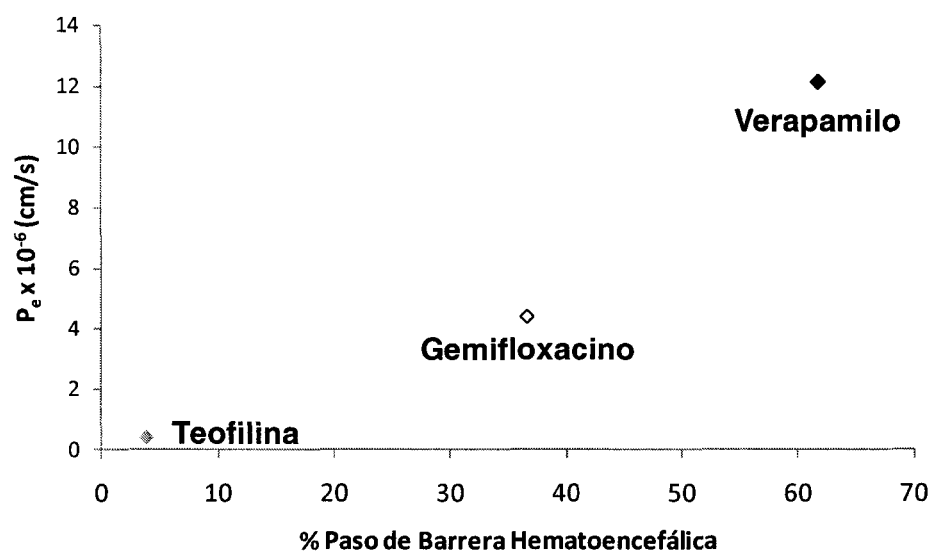
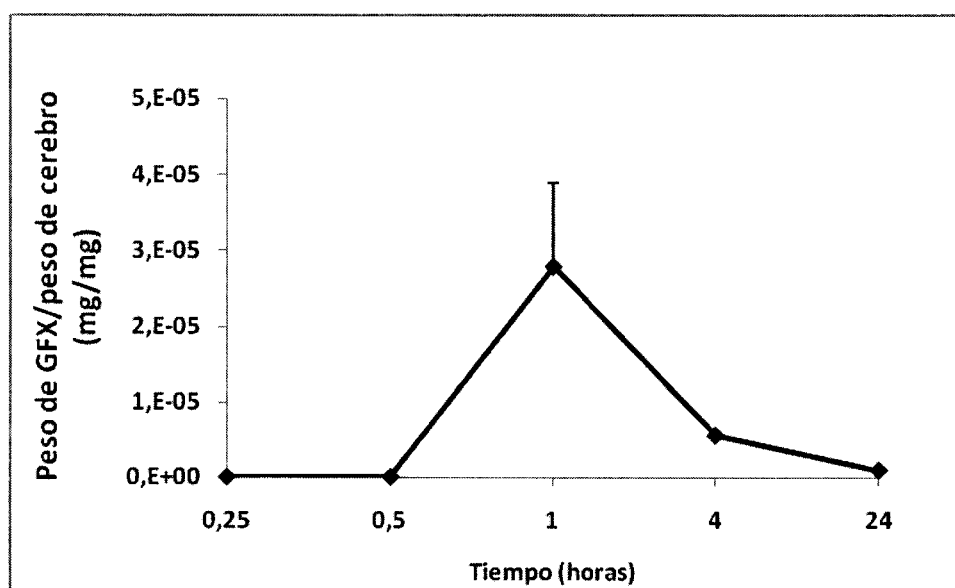


Figura 10





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201001078

②② Fecha de presentación de la solicitud: 26.07.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K31/4375** (2006.01)
A61P25/28 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	AMARANTE, G.W. et al.: "Mechanism and synthesis of pharmacologically active quinolones from Morita-Baylis-Hillman adducts". Tetrahedron, 2010, vol. 66, páginas 4370-4376, página 4370, figura 1, compuesto 7, página 4371, columna 1.	1-6
A	US 2001014670 A1 (BALIN et al.) 16.08.2001, página 2, columna 2.	1-6

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 26.12.2011	Examinador H. Aylagas Cancio	Página 1/4
--	---------------------------------	---------------

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

A61K, A61P

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, EMBASE, MEDLINE, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.12.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-6	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-6	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	AMARANTE, G.W. et al.: "Mechanism and synthesis of pharmacologically active quinolones from Morita-Baylis-Hillman adducts". Tetrahedron, 2010, vol. 66, páginas 4370-4376, página 4370, figura 1, compuesto 7, página 4371, columna 1.	
D02	US 2001014670 A1 (BALIN et al.)	16.08.2001

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 a compuesto gemifloxacino y su uso en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, deterioro cognitivo leve, déficits cognitivos, demencias, enfermedades asociadas con el envejecimiento y procesos patológicos asociados a la edad y progeria. Entre las enfermedades citadas se encuentran la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, epilepsia, etc.

El documento D1 se refiere a la síntesis de quinolonas activas farmacológicamente, entre ellas se cita el gemifloxacino (figura 1, compuesto 7). En la página 4371 primera columna se describe un compuesto que es una bencil quinolona carboxílico (figura 2, compuesto 12) que ha sido sintetizado y que se considera un principio activo útil en la enfermedad de Alzheimer.

El documento D2 se refiere al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer con la administración de agentes antimicrobianos, siendo estos antibióticos pertenecientes al grupo de fluoroquinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas y antibióticos macrólidos.

En ninguno de los documentos anteriores se cita la utilización del gemifloxacino en las enfermedades que se reivindican en la presente solicitud.

Por lo tanto, a la vista de los documentos citados, la materia correspondiente a las reivindicaciones 1-6 tiene novedad y actividad inventiva de acuerdo con los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.