(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 385 276**

(21) Número de solicitud: 201030266

(51) Int. CI.:

A61K 31/415 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación:

25.02.2010

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

20.07.2012

Fecha de la concesión:

25.06.2013

(45) Fecha de publicación de la concesión:

05.07.2013

(73) Titular/es:

UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO
BARRIO SARRIENA S/N
48940 LEIOA (Bizkaia) ES

(72) Inventor/es:

ZUGAZA GURRUCHAGA, José Luis y
MATUTE ALMAU, Carlos

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

(54) Título: **COMPUESTOS PARA EL TRATAMIENTO DE ALZHEIMER.**

(57) Resumen:

Compuestos para el tratamiento de Alzheimer.

Los compuestos inhibidores de PDKI pueden ser utilizados para el tratamiento de enfermedades asociadas a la formación de depósitos amiloideos, entre las que se encuentra la enfermedad de Alzheimer. Los niveles de activación de PDKI en una célula tratada con una proteína amiloidea pueden ser utilizados para identificar compuestos capaces de inhibir la muerte celular inducida por depósitos amiloideos potencialmente útiles en el tratamiento de enfermedades asociadas a la formación de depósitos amiloideos.

ES 2 385 276 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

COMPUESTOS PARA EL TRATAMIENTO DE ALZHEIMER

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se encuadra dentro del campo de las enfermedades ocasionadas por la acumulación de depósitos amiloideos, más concretamente, en el campo de la identificación de nuevas dianas terapéuticas y el desarrollo de nuevas terapias para estas enfermedades.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La amiloidosis es un término genérico, utilizado para hacer referencia a un grupo de enfermedades de etiología diversa y pronóstico y tratamiento variables, con una característica común: todas ellas están causadas por el depósito extracelular de un material, denominado material amiloide, de naturaleza proteica, insoluble y resistente a la proteolisis. Uno de los múltiples péptidos que aparecen en los acúmulos o depósitos amiloideos es el péptido beta-amiloide (β-amiloide, AB o Aβ) que proviene de la proteína precursora amiloidea (APP, del inglés "Amyloid Precursor Protein").

Estudios *in vitro* indican que el procesamiento por la vía no amiloidogénica de la APP (sAPPα) puede actuar como señal autocrina para estimular la proliferación y adhesión celular y apoyar el crecimiento nervioso en células PC12. Sin embargo, si la APP se procesa por la vía amiloidogénica, se genera un péptido de 39-43 aminoácidos, concretamente el péptido beta-amiloide (péptido β-amiloide o péptido Aβ) al que se le ha señalado como el factor neurotóxico primario en la patogenia de procesos neurodegenerativos, e.g., Alzheimer. Dicho péptido, *in vitro*, es tóxico para células endoteliales, células musculares lisas, astrocitos, neuronas y oligodendrocitos. Los mecanismos por los que el péptido Aβ ejerce su acción citotóxica no están definidos aunque todo apunta a que los procesos oxidativos pueden estar implicados en la generación de esta toxicidad induciendo la muerte celular.

Se ha relacionado la presencia de depósitos de péptido Aβ en el cerebro con numerosas enfermedades, tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), pérdida de memoria, síntomas de déficit de atención asociados con la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Alzheimer de tipo cuerpos de Lewy difusos, deterioro cognitivo leve, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés, angiopatía β-amiloide

y hemorragia cerebral tal como hemorragia cerebral debida a angiopatía amiloide cerebral solitaria, infecciones por priones, diabetes tipo II, demencias degenerativas, incluyendo demencias de origen degenerativo y vascular mixto, demencia fronto-temporal, demencia presenil, demencia senil, demencia asociada con el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), trastornos parkinsonianos tales como la enfermedad de Parkinson (EP), parkinsonismo panencefalítico esclerosante subagudo, parkinsonismo posencefalítico, encefalitis pugilística, complejo parkinsonismo-demencia de Guam, la enfermedad de Pick, atrofia sistémica múltiple (ASM), parálisis supranuclear progresiva (PSP), degeneración corticobasal (DCB), síndrome de Down, la enfermedad de cuerpos de Lewy, la enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple y enfermedades neurotraumáticas tales como accidente cerebrovascular agudo, epilepsia, trastornos del estado de ánimo tales como depresión, esquizofrenia y trastornos bipolares, isquemia, lesión cerebral, especialmente lesión cerebral traumática, inflamación y enfermedades inflamatorias crónicas.

En la actualidad, los esfuerzos se centran en descubrir las posibles cascadas de señalización que podrían estar mediadas por el péptido Aβ. Hay varias vías de señalización que podrían estar implicadas en el daño celular y que parecerían activarse por el péptido Aβ. Por ejemplo, parece claro que los efectos del péptido Aβ están asociados con estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, alteración de la homeostasis del Ca^{2+}, generación de NO, activación de la microglía y otras. Sin embargo, aún existe controversia en la explicación de la relación causal o la secuencia exacta de estos eventos.

En cultivos neuronales primarios, los oligómeros de péptido Aβ y los ligandos difusibles derivados del péptido Aβ (ADDL, del inglés "Aβ-derived diffusible ligands") pueden unirse con avidez a receptores de membrana o regiones específicas de membrana plasmática neuronales e inducir muerte celular rápida a través de la ruta apoptótica mitocondrial. Por el contrario, las fibrillas de péptido Aβ parecen inducir una forma más crónica de distrofia neurítica y muerte neuronal. Se han asociado los rápidos efectos tóxicos del péptido Aβ con un efecto pro-oxidante del péptido y pueden mediarse en parte a través de RAGE (del inglés "Receptor for Advanced Glycation End products" o receptor para productos finales de glicosilación avanzada). El péptido Aβ también puede inducir apoptosis a través de la activación de caspasas y calpaína. Otro

mecanismo de toxicidad puede implicar la activación aberrante de la re-entrada del ciclo celular en neuronas, que se ha observado en cultivos neuronales tratados con péptido Aβ y en la EA. Se conoce poco sobre los factores que regulan la generación de agregados de péptido Aβ tóxicos en el cerebro envejecido, aunque estudios recientes sugieren posibles papeles para la señalización del factor 1 de crecimiento similar a la insulina/insulina (IGF-I) y la homeostasis del calcio. Otra clase de rutas de señalización activadas por el péptido Aβ está implicada en la respuesta inflamatoria de la microglía. Los depósitos amiloideos están estrechamente asociados con activación de la microglía en la EA y en ratones transgénicos para APP [para una revisión veáse Yankner B.A. & Lu T. 2009. Journal of Biological Chemistry 284 (8): 4755-4759].

En WO09/087568A se describen composiciones que comprenden compuestos, tales como quercetina, kaemfenol y bipigenina, que reducen la muerte neuronal causada por la exposición al péptido Aβ.

En US5948800A se describe el uso de drogas para prevenir o tratar la EA; dichas drogas contienen el compuesto activo 2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-ona, cuyo efecto se basa en la reducción de la toxicidad neuronal causada por el péptido Aβ.

En US2002102259 se describe un método para inhibir los efectos del péptido Aβ en el cerebro de un animal que comprende la administración de un compuesto que modula de manera efectiva la actividad de CD45.

Por tanto, debido a la participación del péptido Aβ en múltiples enfermedades, existe una necesidad de identificar nuevas dianas así como compuestos que actúen sobre dichas dianas para desarrollar agentes terapéuticos que reduzcan de manera eficaz la muerte celular provocada por la deposición del péptido Aβ.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

Ahora, los inventores han observado usando modelos celulares y organotípicos de la enfermedad de Alzheimer (EA) que el péptido (1-42)Aβ provoca la muerte celular. Los inventores han observado que dicho péptido (1-42)Aβ transduce la señales de muerte celular a través de la ruta PI3Kinasa/PDK1/nuevas PKCs/Rac1/muerte neuronal. Los inventores han propuesto a PDK1, a las nuevas PKCs y a Rac1 como dianas terapéuticas para frenar el proceso de muerte celular y neuronal dirigido por el péptido (1-42)Aβ.

Los inventores también han observado cómo la activación de la GTPasa Rac1 por el péptido (1-42)Aβ se ve inhibida al pre-tratar las células con inhibidores de PDK1, lo que pone de manifiesto que PDK1 forma parte de la cascada de señalización que desencadena el péptido (1-42)Aβ y que conduce a la activación de Rac1, y que su función en esta vía parece ser la de ejercer de puente entre PI3K y PKC.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con el uso de un inhibidor de PDK1, como agente neuroprotector, para producir un medicamento para el tratamiento de enfermedades asociadas a la formación de depósitos amiloideos.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la identificación de un compuesto capaz de inhibir la muerte celular inducida por depósitos amiloideos para el tratamiento de enfermedades asociadas a la formación de depósitos amiloideos que comprende:

a) poner en contacto una célula con una proteína amiloidea;

b) poner las células resultantes de a) en contacto con un compuesto candidato; y

c) determinar en dicha célula los niveles de activación de PDK1,

en donde si los niveles de activación de PDK1 en la célula después de haber sido tratada con un compuesto candidato son menores que antes del tratamiento, el compuesto candidato es capaz de inhibir la muerte neuronal inducida por proteínas amiloideas y útil para el tratamiento de enfermedades asociadas a la formación de depósitos amiloideos.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es un diagrama de barras que muestra la toxicidad celular causada por el péptido (1-42)Aβ en células SN4741 determinada por un ensayo de toxicidad celular mediante MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium); la gráfica muestra la toxicidad celular inducida por concentraciones crecientes del péptido tras 24 horas de tratamiento. En la figura se representan las medias de 3 experimentos independientes y las barras de error se han calculado mediante la desviación estándar de los valores.

La Figura 2 muestra la apoptosis inducida por el péptido (1-42)Aβ en células SN4741. Mediante tinción con ioduro de propidio y anexina V y posterior análisis por citometría de flujo, se puede corroborar que las células SN4741 son sensibles al péptido

(1-42)Aβ, que produce un incremento de las células apoptóticas que son positivas para la tinción con Anexina V. En los paneles superiores se observa un dot plot de las células control (izquierda) y tratadas con el péptido (1-42)Aβ (derecha). El eje de abscisas corresponde a las células marcadas con ioduro de propidio y el eje de ordenadas corresponde a las células marcadas con Anexina V. En los paneles inferiores, se muestran las curvas de la Anexina V, separándose las poblaciones Anexina V negativas o viables (P2) y Anexina V positivas o apoptóticas (P3). Los valores corresponden a la cantidad de eventos registrados en cada una de estas poblaciones, representados como porcentaje del total. Se muestra un resultado representativo de tres experimentos independientes.

La Figura 3 muestra los resultados de la curva dosis-respuesta de activación de Rac1 por el péptido (1-42)Aβ en células SN4741 (A) y en cultivos primarios de neuronas (B); la dosis mínima de péptido (1-42)Aβ a la que se encuentra un efecto sobre la activación de Rac1 es 1,25 μM. La figura que se muestra es representativa de 3 experimentos independientes.

La Figura 4 muestra la cinética de activación de Rac1 por el péptido (1-42)Aβ en 2 líneas celulares neuronales, las células SN4741 (A) e IMR32 (B); en ambos casos la mayor activación de Rac1 se produce tras 30 minutos de exposición al péptido (1-42)Aβ. La figura muestra resultados representativos de 3 experimentos independientes.

La Figura 5 muestra la implicación de PKC en la activación de Rac1 por el péptido (1-42)Aβ; las células SN4741 fueron pretratadas con GF (un inhibidor farmacológico de las PKCs) 1 μM y posteriormente tratadas con péptido (1-42)Aβ 1,25 μM. Se realizaron ensayos de precipitación por afinidad para estudiar la activación de Rac1, seguidos de Western blot anti-Rac1. El resultado mostrado es representativo de tres experimentos independientes.

La Figura 6 muestra la implicación de PKC en la activación de Rac1 por el péptido (1-42)Aβ; los cultivos primarios de neuronas fueron pretratadas con GF 109203X (a partir de ahora lo denominaremos GF) 1 μM y posteriormente tratadas con péptido Aβ 1,25 μM. Se realizaron ensayos de precipitación por afinidad para estudiar la activación de Rac1, seguidos de Western blot anti-Rac1. El resultado mostrado es representativo de tres experimentos independientes.

La Figura 7 muestra la implicación de PKC en la activación de Rac1; las células SN4741 (A) y los cultivos primarios de neuronas (B) fueron pretratadas 1 hora con GF 1 μM, y posteriormente tratadas con PMA 1 μM durante 15 minutos, para inducir la activación de las PKCs. Posteriormente se estudió la activación de Rac1 mediante ensayos de precipitación por afinidad. El resultado mostrado es representativo de tres experimentos independientes.

La Figura 8 muestra la implicación de PI3K en la activación de Rac1 por el péptido (1-42)Aβ; las células neuronales fueron pretratadas con Ly 294002 (un inhibidor farmacológico de PI3K, denominado a partir de ahora "Ly") 20 μM, y posteriormente tratadas con 1,25 μM de péptido (1-42)Aβ. Se realizaron ensayos de precipitación por afinidad para estudiar la activación de Rac1, seguidos de Western blot anti-Rac1 en células SN4741 (panel izquierdo) y en cultivos primarios de neuronas (panel derecho). La figura muestra un resultado representativo de tres experimentos independientes.

La Figura 9 muestra a PDK1 como el vínculo entre PI3K y PKC; al inhibir la kinasa PDK1 con su inhibidor farmacológico OSU 03012 (denominado a partir de ahora OSU), tanto la activación de Rac1 como la fosforilación de PKD mediada por el péptido (1-42)Aβ se ve inhibida - este efecto se puede observar tanto en células SN4741 (panel izquierdo) como en cultivos primarios de neuronas (panel derecho).

La Figura 10 esquematiza la cascada de señalización que emplea el péptido (1-42)Aβ para mediar en la activación de la GTPasa Rac1 en neuronas.

La Figura 11 es un diagrama de barras que muestra la implicación de la vía PI3K/PDK1/AKT en la toxicidad celular inducida por el péptido (1-42)Aβ; las células SN4741 se sembraron en placas de 96 pocillos a razón de 10^5 células por pocillo; al día siguiente se sometieron a ayuno de suero durante 24 horas antes de añadir los diferentes pre-tratamientos de 1 hora con los inhibidores de PI3K, AKT y PDK1; posteriormente se trataron con péptido (1-42)Aβ 1,25 μM durante 24 horas y la toxicidad se analizó mediante ensayos de MTT. Los valores se calcularon como porcentajes sobre el control sin tratar. En la figura se representan las medias de 5 experimentos independientes y las barras de error se han calculado mediante la desviación estándar de los valores.

La Figura 12 es un diagrama de barras que muestra la inhibición de las PKCs en la toxicidad neuronal inducida por el péptido (1-42)Aβ; las células SN4741 se

sembraron en placas de 96 pocillos a razón de 10^5 células por pocillo; al día siguiente se sometieron a ayuno de suero durante 24 horas antes de añadir los diferentes pretratamientos de 1 hora con distintas concentraciones o dosis de GF, un inhibidor de las PKCs; posteriormente se trataron con péptido (1-42)Aβ 1,25 μM durante 24 horas, y la toxicidad se analizó mediante ensayos de MTT. Los valores se calcularon como porcentajes sobre el control sin tratar. En la gráfica se representan las medias de 5 experimentos independientes y las barras de error se han calculado mediante la desviación estándar de los valores.

La Figura 13 es un diagrama de barras que muestra la implicación de la inhibición de Rac1 en la toxicidad neuronal mediada por el péptido (1-42)Aβ; las células SN4741 se sembraron en placas de 96 pocillos a razón de 10^5 células por pocillo; al día siguiente se sometieron a ayuno de suero durante 24 horas antes de añadir los diferentes pretratamientos de 1 hora con distintas dosis de 6-mercaptopurina (6-MP), que inhibe la activación de la GTPasa Rac1; posteriormente se trataron con péptido (1-42)Aβ 1,25 μM durante 24 horas, y la toxicidad se analizó mediante ensayos de MTT. Los valores se calcularon como porcentajes sobre el control sin tratar. En la gráfica se representan las medias de 5 experimentos independientes y las barras de error se han calculado mediante la desviación estándar de los valores.

La Figura 14 es un diagrama de barras que muestra el efecto de los inhibidores de PKC, PDK1 y Rac1 en la apoptosis neuronal inducida por el péptido (1-42)Aβ (A); las células SN4741 fueron pretratadas con GF 1 μM, OSU 1 μM y 6-MP 5 μM, y su efecto sobre la apoptosis inducida por el péptido (1-42)Aβ se estudió mediante tinción con ioduro de propidio y Anexina V y análisis por citometría de flujo. La gráfica presenta la apoptosis y la viabilidad celular como porcentaje; se muestran los valores medios y las desviaciones estándar de 3 experimentos independientes presentadas como barras de error. También se muestra la implicación de las PKCs clásicas en la toxicidad inducida por el péptido (1-42)Aβ (B). Las células SN4741 se sembraron en placas de 96 pocillos a razón de 10^5 células por pocillo; al día siguiente se sometieron a ayuno de suero durante 24 horas antes de añadir los diferentes pretratamientos de 1 hora con distintas dosis de Gö 6967 (en adelante Gö) un inhibidor de las PKCs clásicas; posteriormente se trataron con péptido (1-42)Aβ 1,25 μM durante 24 horas, y la toxicidad se analizó mediante ensayos de MTT. Los valores se calcularon como

porcentajes sobre el control sin tratar. En la gráfica se representan las medias de 5 experimentos independientes y las barras de error se han calculado mediante la desviación estándar de los valores.

La Figura 15 es un diagrama de barras que muestra la implicación de las PKCs nuevas δ y θ en la toxicidad inducida por el péptido (1-42)Aβ; las células SN4741 se sembraron en placas de 96 pocillos a razón de 10^5 células por pocillo, al día siguiente se sometieron a ayuno de suero durante 24 horas antes de añadir los diferentes pretratamientos de 1 hora con distintas dosis de Rottlerin, un inhibidor selectivo de las PKCs nuevas δ y θ; posteriormente se trataron con péptido (1-42)Aβ 1,25 μM durante 24 horas, y la toxicidad se analizó mediante ensayos de MTT. Los valores se calcularon como porcentajes sobre el control sin tratar. En la figura se representan las medias de 5 experimentos independientes y las barras de error se han calculado mediante la desviación estándar de los valores.

La Figura 16 es un diagrama de barras que muestra la implicación de las PKCs nuevas en la apoptosis inducida por el péptido (1-42)Aβ; las células SN4741 fueron pretratadas con Rottlerin 7,5 μM y su efecto sobre la apoptosis inducida por el péptido Aβ se estudió mediante tinción con ioduro de propidio y Anexina V y análisis por citometría de flujo. La gráfica presenta la apoptosis y la viabilidad celular como porcentaje; se muestran los valores medios y las barras de error se han calculado mediante la desviación estándar de los valores de 3 experimentos independientes.

La Figura 17 muestra la implicación de las nuevas PKCs en la activación de Rac1 inducida por el péptido (1-42)Aβ en células SN4741; las células fueron pretratadas con Rottlerin 15 μM y su efecto sobre la activación de Rac1 inducida por el péptido (1-42)Aβ 1,25 μM se estudió mediante ensayos de precipitación por afinidad. Las bandas inmunorreactivas fueron visualizadas utilizando un anticuerpo anti-Rac1. Los resultados que se muestran son representativos de 3 experimentos independientes.

La Figura 18 muestra la implicación de las isoformas nuevas δ y θ de PKC en la toxicidad celular inducida por el péptido (1-42)Aβ en cultivos organotípicos de cerebro. Los cultivos organotípicos de hipocampo (A) y de corteza entorrinal (B) se trataron con péptido (1-42)Aβ 100 nM. En el panel inferior se observa la fluorescencia emitida por unión del ioduro de propidio al ADN en las células que han perdido la integridad de la membrana plasmática en el proceso de muerte celular. C-control sin tratar; D-

tratamiento con péptido (1-42)Aβ 100 nM; E- Rottlerin 2,5 μM; F- Rottlerin 7,5 μM. ECx, corteza cerebral entorrinal; CA1 y CA2-3, regiones hipocampales CA1, CA2 y CA3; DG, giro dentado.

La Figura 19 muestra la caracterización de la ruta de señalización que emplea el péptido (1-42)Aβ para inducir muerte neuronal.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Usos terapéuticos

Los autores de la presente invención, usando líneas celulares de origen neuronal, tales como las células SN4741 (Figura 2), y cultivos organotípicos de cerebro (Figura 18), han observado que el péptido (1-42)Aβ induce muerte celular. Los inventores han observado que, sorprendentemente, dicho péptido (1-42)Aβ transduce las señales de muerte celular a través de la ruta PI3K/PDK1/nuevas PKCs/Rac1/muerte neuronal y han propuesto a dichas PI3A, PDK1, nuevas PKCs, y Rac1 como potenciales dianas terapéuticas para frenar el proceso de muerte neuronal dirigido por el péptido (1-42)Aβ. Asimismo, los inventores han comprobado que la inhibición de PDK1 en neuronas tanto en líneas celulares como en cultivos primarios bloqueaba la activación de Rac1 mediada por el péptido (1-42)Aβ, lo que apunta a que PDK1 está implicada en la ruta de señalización que conduce a la activación de Rac1 y potencialmente actúa como vínculo entre PI3K y PKC en esta vía (Figura 9). Adicionalmente, han observado que el pretratamiento de las monocapas celulares con inhibidores de PDK1, y posterior tratamiento con el péptido (1-42)Aβ, el inhibidor de PDK1 bloquea la fosforilación de PKD, una serin treonin quinasa sustrato de las PKCs, por lo que se pone de manifiesto una vez más que las PKCs están por debajo de la ruta de señalización gobernada por PI3K/PDK1 (Figura 9).

Además, los inventores han demostrado (Figura 11) que un inhibidor de PDK1, tal como el OSU (OSU 03012) previene el efecto tóxico inducido por el péptido (1-42)Aβ, con lo que la viabilidad celular pasa a ser de un 50,28%, en las células tratadas con el péptido (1-42)Aβ (1,25 μM), a un 78,83% en las células pretratadas con OSU (1 μM) $p<0,001$.

Por otro lado, como se puede observar en la Figura 14A, el tratamiento con el péptido (1-42)Aβ a una concentración de 1,25 μM durante 24 horas produjo, un

incremento de la apoptosis en las células SN4741 alcanzándose un 37,88%; sin embargo, cuando las células se pre-trataron con los inhibidores farmacológicos de PDK1, PKC y Rac1 correspondientes, se consiguió proteger al 100% de las células del daño inducido por el péptido (1-42)Aβ, ya que la viabilidad alcanzó unos valores similares a aquellos de las células control (sin tratar). Estos resultados indican que la toxicidad inducida por el péptido (1-42)Aβ en las células SN4741 se puede bloquear *in vitro* bloqueando las actividades de PDK1, PKCs y Rac1.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con el uso de un inhibidor de PDK1 para producir un medicamento para el tratamiento de enfermedades asociadas a la formación de depósitos amiloideos. En una realización particular, dicho inhibidor de PDK1 actúa como agente neuroprotector para el tratamiento de enfermedades asociadas a la formación de depósitos amiloideos de péptido Aβ.

La PDK1 o PDPK1 (proteina kinasa 1 dependiente de 3-fosfoinositido) es una kinasa que participa en diversas vías de señalización. La estructura de la PDK1 se puede dividir en dos dominios: el dominio PH y el dominio kinasa o catalítico. El dominio PH está envuelto mayoritariamente en la interacción de la PDK1 con el fosfatidilinositol (3,4)-bifosfato y con el fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato lo cual es importante para la localización y activación de algunos sustratos de PDK1 asociados a membrana (e.g., AKT). El dominio kinasa presenta tres sitios de unión al ligando: el sitio de unión del sustrato, el sitio de unión al ATP, y el sitio de acoplamiento o bolsillo PIF. Múltiples sustratos de PDK1, incluidos AKT y la proteína kinasa C, requieren la unión a dicho sitio de acoplamiento [Frödin M, et al. 2002. EMBO J. 21 (20): 5396–407].

El gen humano de PDK1 está localizado en el cromosoma 16 en la región 16p13.3; tiene dos variantes de transcripción que dan lugar a dos isoformas: la isoforma 1 (NM_002613.3, SEQ ID NO:1) y la isoforma 2 (NM_031268.4, SEQ ID NO:2).

El término "PDK1" tal y como se usa en esa descripción no se refiere únicamente al gen y a la proteína humanos sino también a los ortólogos de otras especies, como por ejemplo, ratón (NM_011062), y la isoforma 2 de ratón (NM_001080773), rata (NM_031081), gallina NM_001012529.1, macaco (AB 170104.1), etc.

El término "enfermedades asociadas a la formación de depósitos amiloideos" (o "enfermedades asociadas con amiloidosis" o "enfermedades amiloideas") se refiere a, e

incluye, pero no se limita a, enfermedades asociadas con amiloidosis sistémica, local, crónica y senil. Las amiloidosis se caracterizan por los "depósitos amiloideos" que están constituidos de fibrillas proteicas, conocidas como fibrillas de péptido amiloide, en la región extracelular. La enfermedad de Alzheimer (EA) es uno de los ejemplos de amiloidosis más conocidos. Las fibrillas de amiloide tienen una serie de características en común aunque estén formadas por distintas proteínas; todas presentan una morfología alargada, se tiñen con Rojo Congo y presentan un patrón de difracción de rayos X característico, llamado patrón "cross-beta". Las fibrillas se forman por la unión cooperativa de moléculas con una cinética de formación característica que incluye una fase inicial más lenta de nucleación y una fase posterior más rápida de elongación o crecimiento.

Se pueden encontrar diferentes tipos de depósitos amiloideos; así, se pueden encontrar:

depósitos de fibrillas de amiloide que se asocian a la demencia en la EA, a la demencia asociada a los cuerpos de Lewy, al síndrome de Down, al complejo de la demencia de Guam asociada al parkinsonismo, a la hemorragia cerebral hereditaria del tipo holandés con amiloidosis, y a otros procesos similares (en donde el amiloide específico se refiere a la proteína precursora del amiloide o APP);

amiloidosis asociada a la inflamación crónica, por ejemplo, osteomielitis, tuberculosis, fiebre mediterránea familiar, hemorragia cerebral hereditaria, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, espondilitis anquilosante, enfermedad de Castleman, y similares (en donde el amiloide específico se refiere al amiloide del tipo AA o proteína amiloide A (proteína AA), con una estructura no inmunoglobulínica compuesta por 76 aminoácidos con peso molecular de 8.500 daltons; la proteína AA deriva de un precursor de síntesis hepática denominado "precursor sérico de la proteína amiloide A" (SAP), que circula en plasma unido a la lipoproteína HDL3);

amiloidosis asociada al mieloma múltiple, por ejemplo, a discrasias de la células B, y similares, (en donde el amiloide específico se refiere al amiloide del tipo AL, formado por cadenas ligeras de inmunoglobulinas con predominio de las Lambda (λ) sobre las Kappa (κ), en una proporción 2:1, con tendencia a formar estructuras fibrilares que adoptan una distribución beta plegada);

amiloidosis asociada a la diabetes tipo 2 (en donde el amiloide específico es la amilina del islote pancreático);

amiloidosis asociada a las enfermedades priónicas, por ejemplo, la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, el Kuru, la enfermedad de Gersmann-Straüssler-Scheinker, el "scrapie" animal, y similares (en donde el amiloide específico se refiere al amiloide PrP o proteína prión);

amiloidosis asociada a la hemodiálisis crónica, amiloidosis asociada a la hemodiálisis a largo plazo, al síndrome del túnel carpal, y a otros procesos similares, (en donde el amiloide específico se refiere a la ss2-microglobulina);

amiloidosis cardiaca senil, polineuropatía familiar amiloidótica, y a procesos similares (en donde el amiloide específico se refiere a la transtirretina o prealbúmina); y

amiloidosis asociada a tumores endocrinos como el carcinoma medular del tiroides y a otros procesos similares (en donde el amiloide específico es una variante de la procalcitonina).

El término "formación y/o acumulación u organización molecular del amiloide", en forma de dímeros, oligómeros, protofibrillas, fibrillas, filamentos, ovillos o placas se refiere a, e incluye, pero no se limita, al depósito de varias proteínas insolubles, fibrilares, placas amiloideas de la proteína, proteínas amiloideas, depósitos de amiloide formados por la agregación de "proteínas amiloideas". Por "proteínas amiloideas" se entiende cualquier proteína o péptido insoluble, fibrilar, que resulte en la formación y/o acumulación u organización molecular del amiloide, de placas amiloideas o depósitos de amiloide que incluye, sin estar limitado, las proteínas o fragmentos de: APP, amiloide del tipo AA, amiloide PrP, amiloide del tipo AL, ss2-microglobulina, transtirretina o prealbúmina, o una variante de la procalcitonina. El término "depósito de amiloide" se refiere al depósito (acúmulo) extracelular de depósitos formados por la agregación de proteínas amiloideas seguida de la combinación posterior de agregados y/o de proteínas amiloideas, formación de depósitos amiloides y similares.

El término "enfermedades asociadas al depósito amiloideo" se refiere a, e incluye, pero no se limita, enfermedad de Alzheimer, la demencia asociada a los cuerpos de Lewy, síndrome de Down, complejo de la demencia de Guam asociada al parkinsonismo, hemorragia cerebral hereditaria del tipo holandés con amiloidosis, amiloidosis asociada a la inflamación crónica, por ejemplo, osteomielitis, tuberculosis,

la fiebre mediterránea familiar, hemorragia cerebral hereditaria, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, espondilitis anquilosante, enfermedad de Castleman, amiloidosis asociada al mieloma múltiple, por ejemplo, a discrasias de células B y similares, amiloidosis asociada a la diabetes tipo 2, amiloidosis asociada a las enfermedades priónicas, por ejemplo, la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, el Kuru, la enfermedad de Gersmann-Straüssler-Scheinker, el "scrapie" animal, y similares, amiloidosis asociada a hemodiálisis crónica, amiloidosis asociada a la hemodiálisis a largo plazo, síndrome del túnel carpal, amiloidosis cardiaca senil, polineuropatía familiar amiloidótica, amiloidosis asociada a tumores endocrinos como el carcinoma medular del tiroides, etc.

En una realización particular, los depósitos amiloideos son depósitos extracelulares de péptido beta amiloide; en una realización concreta, el péptido que forma los depósitos amiloideos es el péptido (1-42)Aβ.

La "proteína precursora amiloide" o "APP" es una glicoproteína transmembrana que es sustrato de la familia de proteasas denominadas presilinas. Dependiendo de las proteasas que participen en el procesamiento de la APP se van a generar productos de reacción con diferente actividad a nivel de la fisiología neuronal.

Por "péptido beta amiloide" o "péptido Aβ" se entiende un péptido de 39 a 43 aminoácidos derivado de la APP (APP: SEQ ID NO:3 NM-000484.3 variante 1, NM_201413.2 variante 2, NM_201414.2 variante 3, NM_001136129.2 variante 5, NM_001136130.2 variante 6). En condiciones fisiológicas, este péptido se genera a partir de la APP por medio del procesamiento de la APP por la vía amiloidogénica.

El "péptido (1-42)beta amiloide" o "péptido (1-42)Aβ" se refiere a un péptido Aβ compuesto por los primeros 42 aminoácidos resultantes del procesamiento de la APP por la vía amiloidogénica. [Zain Sb et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988 february; 85(3):929-933].

En una realización particular, las enfermedades asociadas a depósitos amiloideos del péptido Aβ incluyen, pero no se limitan a, EA, pérdida de memoria, síntomas de déficit de atención asociados con la EA, EA de tipo cuerpos de Lewy difusos, deterioro cognitivo leve, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés, angiopatía β-amiloide y hemorragia cerebral tal como hemorragia cerebral debida a angiopatía amiloide cerebral solitaria, infecciones por priones, diabetes tipo II, demencias degenerativas, incluyendo demencias de origen degenerativo y vascular

mixto, demencia frontotemporal, demencia presenil, demencia senil, demencia asociada con SIDA, trastornos parkinsonianos tales como la enfermedad de Parkinson (EP), parkinsonismo panencefalítico esclerosante subagudo, parkinsonismo posencefalítico, encefalitis pugilística, complejo parkinsonismo-demencia de Guam, la enfermedad de Pick, atrofia sistémica múltiple (ASM), parálisis supranuclear progresiva (PSP) y degeneración corticobasal (DCB), síndrome de Down, la enfermedad de cuerpos de Lewy, la enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple y enfermedades neurotraumáticas tales como accidente cerebrovascular agudo, epilepsia, trastornos del estado de ánimo tales como depresión, esquizofrenia y trastornos bipolares, isquemia, lesión cerebral, especialmente lesión cerebral traumática, inflamación y enfermedades inflamatorias crónicas.

En realizaciones preferidas, dicha enfermedad asociada a depósitos amiloideos se selecciona entre la EA, EP, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, accidente cerebrovascular agudo e isquemia.

El término "tratar" o "tratamiento" designa tanto tratamiento terapéutico como profiláctico o medidas preventivas, en el que el objeto es prevenir o frenar (reducir) un cambio fisiológico indeseado o trastorno, tal como la muerte celular asociada a la formación de depósitos amiloideos y más en concreto a la muerte neuronal inducida por el péptido (1-42)Aβ en el sistema nervioso central (SNC). Para el fin de esta invención, resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, sin limitación, alivio de síntomas, reducción de la extensión de la enfermedad, estado patológico estabilizado (concretamente no empeorado), retardo o freno de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado patológico y remisión (tanto parcial como total), tanto detectable como no detectable. "Tratamiento" puede significar también prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos sujetos que necesitan de tratamiento incluyen aquellos sujetos que sufren ya la afección o trastorno, así como aquellos con tendencia a sufrir la afección o trastorno o aquellos en los que ha de prevenirse la afección o trastorno.

Como "método de tratamiento" se entiende la administración a un individuo en necesidad de dicho tratamiento, de una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de PDK1 según la invención.

Por "muerte celular inducida por el péptido Aβ" se entiende la respuesta en forma de muerte de celular por parte de las células que han sido expuestas al péptido Aβ. En una realización particular, la muerte celular inducida por el péptido Aβ es a través de la ruta PI3K/PKD1/nuevas PKCs/Rac1/muerte celular. En una realización preferida, la muerte celular es muerte neuronal y está inducida por el péptido Aβ a través de la ruta PI3K/PKD1/nuevas PKCs/Rac1/muerte neuronal.

En una realización particular, dicho inhibidor de PDK1 actúa como un agente neuroprotector en el tratamiento de enfermedades asociadas a la formación de depósitos amiloideos asociados al péptido Aβ.

El término "neuroprotector", tal como aquí se utiliza, se refiere a la atenuación de los efectos de la degeneración o muerte neuronal mediante cualquier mecanismo conocido o por conocer, por ejemplo, necrosis, apoptosis, autofagia, daño oxidativo, 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, daño oxidativo, deposición de subproductos, pérdida de la arquitectura celular, etc., o a la disminución o desaparición de sus efectos secundarios.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un inhibidor de PDK1 para producir un medicamento para el tratamiento de enfermedades asociadas a la formación de depósitos amiloideos del péptido beta amiloide, especialmente el péptido (1-42)Aβ, en donde el medicamento reduce la muerte neuronal inducida por el péptido (1-42)Aβ en el SNC. En una realización particular, el péptido (1-42)Aβ transduce la señales de muerte celular a través de la ruta PI3Kinasa/PKD1/nuevas PKCs/Rac1/muerte neuronal.

En el contexto de la presente invención se entiende por "inhibidor de PDK1" a un compuesto que disminuye la actividad de PDK1 en contacto con dicha proteína, así como cualquier sustancia o compuesto que sea capaz de impedir o bloquear la transcripción y la traducción del gen que codifica PDK1 (es decir, impedir o bloquear la expresión de dicho gen), o que sea capaz de impedir que la proteína codificada por dicho gen realice su función (actividad).

A modo ilustrativo, no limitativo, entre los agentes inhibidores de la expresión de PDK1 adecuados para su uso en la presente invención se incluyen, por ejemplo,

oligonucleótidos antisentido específicos para el gen que codifica PDK1, microARNs específicos, ARNs catalíticos o ribozimas específicos, ARNs de interferencia (ARNips) específicos, ARN con actividad "decoy", es decir, con capacidad para unirse específicamente a un factor (proteico generalmente) importante para la expresión del gen, de manera que la expresión del gen de interés, en este caso PDK1 sea inhibida, etc. Asimismo, ejemplos ilustrativos, no limitativos, de agentes inhibidores de PDK1 capaces de impedir que la proteína PDK1 realice su función incluyen, péptidos inhibidores de PDK1, anticuerpos dirigidos específicamente contra epítopos de PDK1 esenciales para desempeñar su función, o contra PDK1, como las regiones de unión a ATP, el sitio de acoplamiento o bolsillo PIF, el sitio de unión al sustrato o el dominio PH, etc. Se conocen numerosos compuestos químicos (moléculas pequeñas) que reducen la actividad de PDK1 cuando se ponen en contacto con dicha proteína ["small molecule inhibitors of PDK1], por ejemplo, staurosporine y sus derivados, fenotiacina y sus derivados, derivados de urea, celecoxib y sus derivados, compuestos piridinonílicos, compuestos poliheterocíclicos, etc., los cuales pueden ser utilizados en la presente invención. Adicionalmente, otros compuestos con capacidad de inhibición de la expresión de PDK1 que pueden ser utilizados en la puesta en práctica de la presente invención incluyen aptámeros y espiegélmeros, es decir, ácidos nucleicos D o L de cadena sencilla o doble que se unen específicamente a la proteína diana (PDK1 en este caso), dando como resultado una modificación de la actividad biológica de ésta. Los aptámeros y espiegélmeros tienen una longitud de entre 15 y 80 nucleótidos y, preferiblemente, de entre 20 y 50 nucleótidos.Los compuestos que provocan la reducción de los niveles de ARNm pueden ser identificados usando ensayos estándar para determinar los niveles de expresión de ARNm tales como transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), análisis de protección de ARN, Northern blot, hibridación *in situ*, microarrays, etc.

Los compuestos que provocan la reducción de los niveles proteicos de PDK1 pueden ser identificados usando ensayos estándar para la determinación de niveles de expresión proteica tales como Western-blot o Western transfer, ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assay"), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo de enzima competitivo), DAS-ELISA ("double antibody sandwich ELISA"), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el uso de biochips de

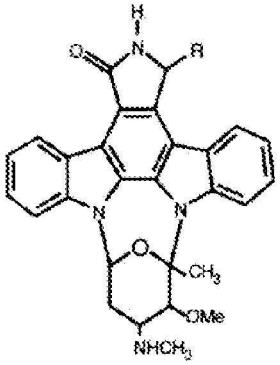
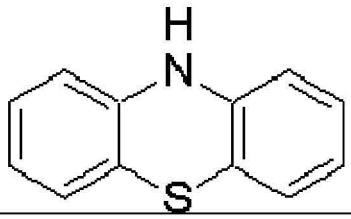
proteínas o microarrays que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en la precipitación coloidal en formatos tales como los "dipsticks".

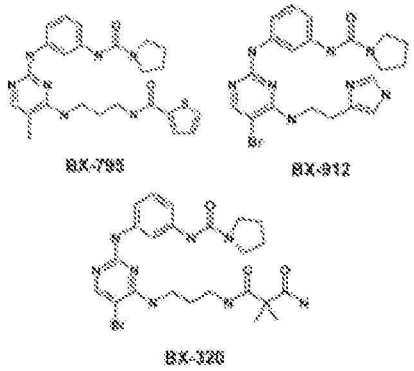
La capacidad inhibidora en la actividad kinasa de PDK1 puede ser determinada utilizando ensayos convencionales para medir la actividad kinasa, por ejemplo, métodos basados en la medición de la activación de otras proteínas conocidas por ser activadas por PDK1, e.g., PKD o Rac1. Así, se pueden realizar ensayos de activación de Rac1 usando experimentos de precipitación por afinidad o de fosforilación de PKD como los mostrados en la Figura 9 y en el ejemplo que acompaña a la presente descripción (apartado "Ensayo de la activación de las GTPasas de la superfamilia Ras").

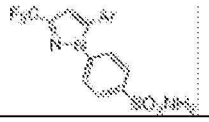
La Tabla 1 recoge ejemplos ilustrativos, no limitativos, de inhibidores de PDK1 que pueden ser usados en la presente invención.

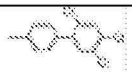
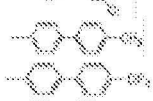
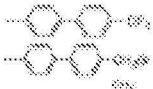
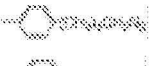
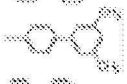
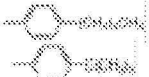
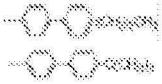
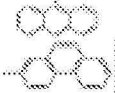
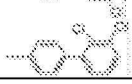
Tabla 1
Inhibidores de PDK1

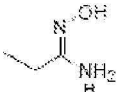
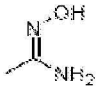
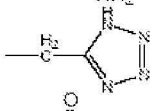
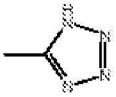
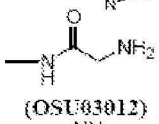
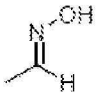
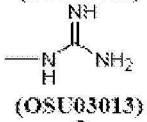
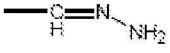
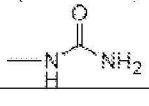
	Tipo de inhibidor
I	Oligonucleótido antisentido específico para la secuencia del gen que codifica PDK1, e.g., 5'-TGAATGATGCCCTTGCCGTG-3' (SEQ ID NO: 4) (Flynn P et Current Biology, Volume 10, Issue 22, 1439-1442, 14 November 2000)
II	Enzima de ADN específica para la secuencia de PDK1
III	Ribozima específica para el gen que codifica PDK1
IV	MicroRNA específico para el gen que codifica PDKl, e.g.: 5'-TGCTGCCCCGCGACGAGCCCCTCGCACAAACCGGACCTGAGCGTTTTGTTCGTTCGGCTCGCGTGAGGC-3' (SEQ ID NO: 5) 5'-CCTGGCCTCACGCGAGCCGAACGAACAAAACGCTCAGGTCCGGTTTGTGCGAGGGGCTCGTCGCGGGGC-3' (SEQ ID NO: 6) (El Quaamari et al.. Diabetes October 2008 vol. 57 no. 10 2708-2717)
V	ARN de interferencia específico para la secuencia del gen que codifica PDK1, e.g.: 5'-GCACATCCAGATCACAGA-3' (SEQ ID NO: 7)

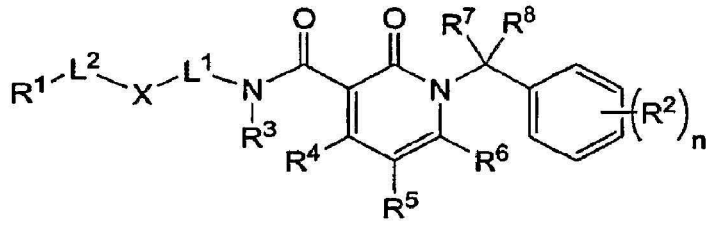
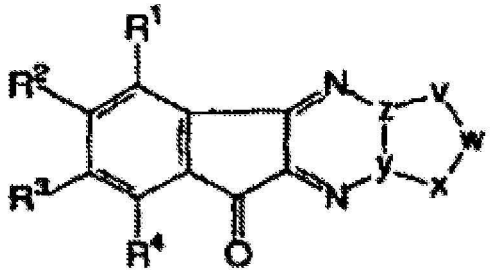
	5'-GGGTTTATTTGCAAGACGA-3' (SEQ ID NO: 8) (Pinner S. & Sahai E Nature Cell Biology **10**, 127 - 137 (2008); Kharebava G et al. 2008. The Journal of Neuroscience. October 29; 28(44):11409-11420)
VI	Péptido con capacidad para unirse específicamente a PDK1 e inhibir su actividad
VII	Anticuerpo con capacidad para unirse específicamente a PDK1 e inhibir la actividad kinasa de dicha enzima (PDK1) (Lawlor, M.A. et al. EMBO J. 2002 July 15; 21(14): 3728–3738; Collins B. J. et al EMBO J. 2003 August 15; 22(16): 4202–4211; Kharebava G. J. Neurosci. 2008 28:11409-11420; Nakamura K. et al. J. Biol. Chem 2008 283:17702-17711)
VIII	Staurosporine o sus derivados, e.g., 7-hidroxistaurosporine (UCN-01)  **Staurosporine (R=H)** **UCN-01 (R=OH)** (Komander D. et al. Biochem. J. 375(2):255 (2003); Sato et al, Oncogene, 2002, 21, 1727-1738)
IX	Fenotiacina y sus derivados, e.g., cloropromacina, proclorperacina, trifluor-peracina o tioridazina 

	(Choi JH, et al. Ann N Y Acad Sci. 2008 Sep;1138:393-403)
X	Derivados de urea de fórmula  (R I Feldman et al. Novel Small Molecule Inhibitors of 3-Phosphoinositide-dependent Kinase-1. J. Biol. Chem., 2005, 280, 20, 19867-19874; J Bain et al. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. Biochem. J. 2007, 408, 297–315; C Peifer, D R. Alessi, Small-Molecule Inhibitors of PDK1. ChemMedChem. 2008, 3 (10), Review; J.Q. Cheng et al. The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery. Oncogene (2005) 24, 7482–7492)
XI	Celecoxib (Celebrex) y sus derivados de fórmula



No.	Ar	IC_{50} (μM) PDK-1	PC-3	No.	Ar	IC_{50} (μM) PDK-1	PC-3
Cele-Coxib		48	30	13		9	5
1		42	18	14		15	8
2		38	17	15		18	8
3		32	17	16		28	11
4		34	18	17		17	9
5		20	9	18		32	15
6		34	18	19		32	15
7		24	11	20		15	8
8		66	31	21		18	9
9		21	11	22		12	7
10		22	9	23		9	5
11		18	10	24		42	23
12		23	10				

No.	R	IC_{50} (μM) PDK-1	PC-3	No.	R	IC_{50} (μM) PDK-1	PC-3
25	$-CONH_2$	12	7	31	$-CH_2CN$	42	25
26	-CN	45	30	32		15	8
27		40	25	33		45	27
28		52	32	34 (OSU03012)		5	5
29		25	14	35 (OSU03013)		2	3
30		16	10	36		40	24

	NOTA: La estructura general de los compuestos 25-36 se muestra en la fórmula situada en la parte superior, en donde Ar es 2-fenantrenilo y R representa la sustitución correspondiente en el lugar del grupo sulfonamida. (Zhu, Jiuxiang. From celebrex to a novel class of phosphoinositde-dependent kinase-1 (PDK-1) inhibitors for androgen-independent prostate cancer; http://etd.ohiolink.edu/search.cgi?q=PDK1+inhibitors&field=&pagesize=30; http://etd.ohiolink.edu/search.cgi?q=accession_number:osu1243948876&mlt=y). (Hsu AL et al. J Biol Chem. 275; 11397-11403, 2000. Song X. et al. J Natl. Cancer Inst, 94:585-591, 2002. Arico S. et al. J Biol. Chem. 277:27613-27621, 2002)
XII	Piridinonil derivados de fórmula  donde n, L^1, L^2, X, R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, y R^8, tienen los significados indicados en WO 2008005457A2 (compuesto de fórmula (I)), cuyo contenido se incorpora aquí como referencia en su totalidad.
XIII	Compuestos heteropolicíclicos de fórmula  donde v, w, x, y, z, R^1, R^2, R^3 y R^4, tienen los significados indicados en EP 1296985, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

I. Oligonucleótidos antisentido

En una realización particular, se utiliza un oligonucleótido antisentido específico para inhibir la expresión del gen que codifica PDK1, por ejemplo, inhibiendo la transcripción y/o traducción del ácido nucleico que codifica PDK1 (cuya actividad se desea inhibir). Los oligonucleótidos antisentido se pueden unir a su diana potencial mediante complementariedad de bases convencional, o, por ejemplo, en el caso de unirse a ADN bicatenario, a través de interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice.

Para su empleo en la presente invención, una construcción que comprende un oligonucleótido antisentido se puede distribuir, por ejemplo, como un plásmido de expresión que, cuando se transcribe en la célula, produce ARN que es complementario a al menos una parte única del ARNm celular que codifica PDK1. Alternativamente, la construcción antisentido es una sonda de oligonucleótidos que se genera *ex vivo* y que, cuando se introduce en la célula, produce inhibición de la expresión génica hibridando con el ARNm y/o secuencias genómicas del ácido nucleico diana. Tales sondas de oligonucleótidos son preferiblemente oligonucleótidos modificados, que son resistentes a las nucleasas endógenas, por ejemplo, exonucleasas y/o endonucleasas, y que son por lo tanto estables *in vivo*. Moléculas de ácidos nucleicos ilustrativas para su uso como oligonucleótidos antisentido incluyen análogos de ADN de fosforamidato, fosfotionato y metilfosfonato (véanse, por ejemplo, US5176996, US5264564 y US5256775). Adicionalmente, para una revisión de las aproximaciones generales para construir oligómeros útiles en terapia antisentido véanse, por ejemplo, Van der Krol et al., BioTechniques 6: 958-976, 1988; y Stein et al., Cancer Res 48: 2659-2668, 1988.

Respecto al oligonucleótido antisentido, son preferidas las regiones de oligodesoxirribonucleótidos derivadas del sitio de inicio de la traducción, por ejemplo, entre -10 y +10 del gen diana. Las aproximaciones antisentido implican el diseño de oligonucleótidos (bien ADN o bien ARN) complementarios al ARNm que codifica el polipéptido diana. Los oligonucleótidos antisentido se unirán a los transcritos de ARNm y evitarán la traducción.

También se podrían usar oligonucleótidos complementarios bien a las regiones 5' ó 3' no traducidas, no codificantes, de un gen en una aproximación antisentido para

inhibir la traducción de ese ARNm. Los oligonucleótidos complementarios a la región 5' no traducida del ARNm deberían incluir el complemento del codón de iniciación AUG. Los oligonucleótidos complementarios a las regiones codificantes del ARNm son inhibidores de la traducción menos eficaces pero también se podrían usar según la invención. Si están diseñados para hibridar con la región 5', 3' o codificante del ARNm, los ácidos nucleicos antisentido deberían tener al menos 6 nucleótidos de longitud y tener preferiblemente menos de alrededor de 100 y más preferiblemente menos de alrededor de 50, 25, 17 ó 10 nucleótidos de longitud.

Preferentemente, se deben realizar estudios *in vitro* para cuantificar la capacidad de los oligonucleótidos antisentido de inhibir la expresión génica. Ventajosamente, dichos estudios utilizarán controles que distingan entre inhibición génica antisentido y efectos biológicos no específicos de los oligonucleótidos. También se prefiere que esos estudios comparen los niveles del ARN o proteína diana con los de un control interno de ARN o proteína. Los resultados obtenidos usando los oligonucleótidos antisentido se pueden comparar con los obtenidos usando un oligonucleótido control. Se prefiere que el oligonucleótido control sea aproximadamente de la misma longitud que el oligonucleótido a ensayar y que la secuencia del oligonucleótido difiera de la secuencia antisentido no más de lo que sea necesario para prevenir la hibridación específica a la secuencia diana.

Los oligonucleótidos antisentido pueden ser de ADN o ARN o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas de los mismos, de cadena sencilla o de cadena doble. El oligonucleótido se puede modificar en la base, en el azúcar o en el esqueleto de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, su capacidad de hibridación etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos unidos, tales como péptidos (por ejemplo, para dirigirlos a receptores de células huésped) o agentes para facilitar el transporte a través de la membrana celular (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6553-6556, 1989; Lemaitre et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 648-652, 1987; WO88/09810) o la barrera hematoencefálica (WO89/10134), agentes intercalantes (Zon, Pharm. Res. 1988. 5: 539-549). Para este fin, el oligonucleótido puede estar conjugado a otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente transportador, un agente de corte desencadenado por hibridación, etc.

En algunos casos, puede ser difícil alcanzar las concentraciones intracelulares del oligonucleótido antisentido suficientes para suprimir la traducción de los ARNm endógenos. Por tanto, una aproximación preferida usa una construcción de ADN recombinante en la que se coloca el oligonucleótido antisentido bajo el control de un promotor fuerte de pol III o pol II.

Alternativamente, se puede reducir la expresión del gen diana dirigiendo secuencias de desoxirribonucleótidos complementarias a la región reguladora del gen (es decir, el promotor y/o potenciadores) para formar estructuras de triple hélice que previenen la transcripción del gen en las células diana en el cuerpo (Helene et al , Anticancer Drug Des. 6(6): 569-84, 1991).

En ciertas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido son morfolinos antisentido.

En una realización particular, el oligonucleótido antisentido específico tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la Tabla 1 (I).

II. Enzimas de ADN

En otra realización particular, se utiliza una enzima de ADN específica para inhibir la expresión del gen que codifica PDK1. Las enzimas de ADN incorporan algunas de las características mecanísticas tanto de las tecnologías de los oligonucleótidos antisentido como de las tecnologías de los ribozimas. Las enzimas de ADN se diseñan de modo que reconozcan una secuencia diana del ácido nucleico particular (en este caso, la secuencia que codifica a PDK1), parecido al oligonucleótido antisentido; sin embargo, de forma similar a la ribozima, son catalíticas y cortan específicamente el ácido nucleico diana.

III. Ribozimas

En otra realización particular, se utiliza una ribozima específica diseñada para cortar de forma catalítica transcritos de un ARNm diana para prevenir la traducción de los ARNms que codifican PDK1 cuya actividad se desea inhibir. Las ribozimas son moléculas enzimáticas de ARN capaces de catalizar el corte específico de ARN [para una revisión véase Rossi, 1994. Current Biology 4: 469-471]. La secuencia de las moléculas de ribozima preferiblemente incluye una o más secuencias complementarias

al ARNm diana, y la bien conocida secuencia responsable del corte del ARNm o una secuencia funcionalmente equivalente [véase, por ejemplo, US5093246].

Las ribozimas usadas en la presente invención incluyen las ribozimas de cabeza de martillo, las ARN endorribonucleasas, etc. [Zaug et al., 1984. Science 224:574-578].

Las ribozimas pueden estar compuestas de oligonucleótidos modificados (por ejemplo, para mejorar la estabilidad, direccionamiento, etc.) y se deberían distribuir a células que expresan el gen diana *in vivo*. Un método preferido de distribución implica usar una construcción de ADN que "codifica" la ribozima bajo el control de un promotor constitutivo fuerte de pol III ó pol II, de modo que las células transfectadas producirán cantidades suficientes de la ribozima para destruir los mensajeros diana endógenos e inhibir la traducción. Puesto que las ribozimas, contrariamente a otras moléculas antisentido, son catalíticas, se requiere una concentración intracelular menor para su eficacia.

IV. MicroARNs

En otra realización particular, se utiliza un microARN específico para la secuencia que codifica PDK1. Como es conocido, un microARN (miARN o miRNA por sus siglas en inglés) es un ARN monocatenario, de una longitud de entre 21 y 25 nucleótidos, y que tiene la capacidad de regular la expresión de otros genes mediante diversos procesos, utilizando para ello la ruta de ribointerferencia. En una realización particular, el microARN se selecciona del grupo formado por los microARNs específicos mostrados en la Tabla 1 (IV) [SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6].

V. ARNi

En otra realización particular, se utiliza un ARN de interferencia (ARNi), tal como un ARN de interferencia pequeño (ARNip) específico para la secuencia que codifica PDK1 cuya actividad se desea inhibir.

Los ARN de interferencia pequeños o ARNip (siRNA en su denominación en inglés) son agentes capaces de inhibir la expresión de un gen diana mediante interferencia del ARN. Un ARNip se puede sintetizar químicamente, o, alternativamente, se puede obtener mediante transcripción *in vitro* o bien se puede sintetizar *in vivo* en la célula diana. Típicamente, los ARNip consisten en una cadena

doble de ARN de entre 15 y 40 nucleótidos de longitud, que puede contener una región protuberante 3' y/o 5' de 1 a 6 nucleótidos. La longitud de la región protuberante es independiente de la longitud total de la molécula de ARNip. Los ARNip actúan mediante la degradación o el silenciamiento post-transcripcional del mensajero diana.

Los ARNip pueden ser los llamados shRNA (short hairpin RNA), caracterizados porque las cadenas antiparalelas que forman el ARNip están conectadas por una región bucle u horquilla. Los shRNAs pueden estar codificados por plásmidos o virus, particularmente retrovirus, y estar bajo el control de promotores tales como el promotor U6 de la ARN polimerasa III.

En una realización particular, los ARNip que pueden ser utilizados en la presente invención son sustancialmente homólogos al ARNm del gen que codifica PDK1 o a la secuencia genómica que codifica dicha proteína. Por "sustancialmente homólogos" se entiende que tienen una secuencia que es suficientemente complementaria o similar al ARNm diana, de forma que el ARNip sea capaz de provocar la degradación de éste por interferencia de ARN. Los ARNip adecuados para provocar dicha interferencia incluyen ARNip formados por ARN, así como ARNip que contienen distintas modificaciones químicas tales como:

- ARNip en los que los enlaces entre los nucleótidos son distintos a los que aparecen en la naturaleza, tales como enlaces fosforotioato;
- conjugados de la cadena de ARN con un reactivo funcional, tal como un fluoróforo;
- modificaciones de los extremos de las cadenas de ARN, en particular el extremo 3' mediante la modificación con distintos grupos funcionales del hidroxilo en posición 2';
- nucleótidos con azúcares modificados tales como restos O-alquilados en posición 2' tales como 2'-O-metilribosa o 2'-O-fluorosibosa;
- nucleótidos con bases modificadas tales como bases halogenadas (por ejemplo 5-bromouracilo y 5-iodouracilo), bases alquiladas (por ejemplo 7-metilguanosina).

Los ARNip y ARNsh que pueden ser utilizados en la presente invención se pueden obtener usando una serie de técnicas conocidas para el experto en la materia. La región de la secuencia de nucleótidos que codifica PDK1 que se toma como base para

diseñar los ARNip no es limitante y puede contener una región de la secuencia codificante (entre el codón de iniciación y el codón de terminación) o, alternativamente, puede contener secuencias de la región no traducida 5' o 3', preferentemente de entre 25 y 50 nucleótidos de longitud y en cualquier posición en posición sentido 3' con respecto al codón de iniciación. Una forma de diseñar un ARNip implica la identificación de los motivos AA(N19)TT, en donde N puede ser cualquier nucleótido en la secuencia que codifica PDK1, y la selección de aquellos que presenten un alto contenido en G/C. Si no se encuentra dicho motivo, es posible identificar el motivo NA(N21), en donde N puede ser cualquier nucleótido.

En una realización particular, el inhibidor de PDK1 es un ARNi específico para PDK1, tal como un ARNi específico seleccionado del grupo formado por los ARNi específicos mostrados en la Tabla 1 (V) [SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9].

VI. Péptidos inhibidores

En otra realización particular, se utiliza un péptido inhibidor de PDK1 para impedir que dicha proteína ejerza alguna de sus funciones, en particular, una actividad relacionada con su capacidad de fosforilar a otras proteínas.

El término "péptido inhibidor", tal como aquí se utiliza, hace referencia a aquellos péptidos capaces de unirse a PDK1 e inhibir su actividad según se ha explicado anteriormente, es decir, impedir que PDK1 pueda fosforilar a otras proteínas. Seki T et al., han construido una proteína quimérica δAL-PIF, constituida por el loop de activación de la PKCδ y la región de interacción de PDK1, funciona como un péptido inhibidor para PDK1 cuando se expresa en células eucariotas (Seki T. et al 2006 Genes to Cells **11**, 1051–1070)

VII. Anticuerpos inhibidores

En otra realización particular, se utiliza un anticuerpo inhibidor de PDK1 para impedir que dicha proteína ejerza alguna de sus funciones, en particular, una actividad relacionada con su capacidad de fosforilación a otras proteínas.

Por tanto, un anticuerpo "inhibidor" de PDK1 tal como aquí se utiliza se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a PDK1 de manera específica e inhibir una o más de las funciones de PDK1, preferiblemente las relacionadas con la fosforilación de otras

proteínas. Un anticuerpo inhibidor es también todo aquel anticuerpo que es capaz de unirse a PDK1 de manera específica y bloquear los sitios de fosforilación de PDK1 o los sitios de unión de PDK1 con otras proteínas. Los anticuerpos pueden ser preparados usando cualquiera de los métodos que son conocidos para el experto en la materia. Una vez identificados anticuerpos con capacidad de unión a PDK1, se seleccionarán aquellos capaces de inhibir la actividad de esta proteína usando un ensayo de identificación de agentes inhibidores [véase, por ejemplo, Metz; S. et al. 2008. J.Biol.Chem. 283:5985-5995].

En una realización particular, dicho anticuerpo inhibidor de PDK1 es un anticuerpo con capacidad para unirse a PDK1 e inhibir específicamente la actividad kinasa de dicha enzima (PDK1); ejemplos ilustrativos de dichos anticuerpos se describen en las referencias citadas en la Tabla 1 (VII), cuyos contenidos se incorporan a la presente descripción por referencia.

VIII-XIII. Compuestos químicos

En otra realización particular, se utiliza un compuesto químico que disminuye la actividad de PDK1 cuando se pone en contacto con dicha proteína.

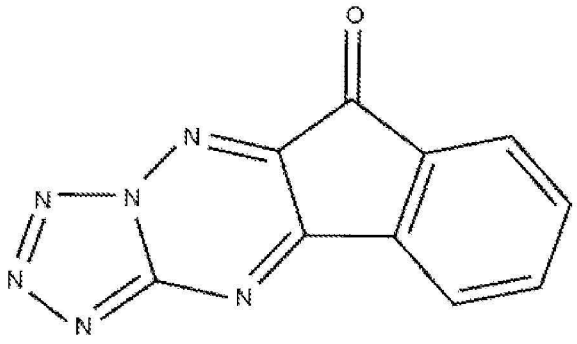
Ejemplos ilustrativos, no limitativos de dichos compuestos químicos incluyen los compuestos mencionados en la Tabla 1 (VIII-XIII) e incluyen staurosporine y sus derivados, fenotiacina y sus derivados, derivados de urea (e.g., BX-320, BX795 y BX-912), celecoxib y sus derivados, compuestos piridinonílicos, compuestos poliheterocíclicos, etc., los cuales pueden ser utilizados en la presente invención.

Entre los derivados de urea útiles como inhibidores de PDK1 se encuentran los compuestos: BX-320; pyrrolidine-1-carboxylic acid [3-(5-iodo-4-{3-[(thiophene-2-carbonyl)-amino]-propylamino}-pyrimidin-2-ylamino)-phenyl]-amide (BX -795); y pyrrolidine-1-carboxylic acid (3-{5-bromo-4-[2-(1H-imidazol-4-yl)-ethylamino]-pyrimidin-2-ylamino}-phenyl)-amide (BX-912) [R I Feldman et al. Novel Small Molecule Inhibitors of 3-Phosphoinositide-dependent Kinase-1. J. Biol. Chem., 2005, 280, 20, 19867-19874; J Bain et al. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. Biochem. J. 2007, 408, 297–315; C Peifer, D R. Alessi, Small-Molecule Inhibitors of PDK1. ChemMedChem. 2008, 3 (10), Review; J.Q. Cheng et al. The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery. Oncogene (2005) 24,

7482–7492].Aunque, en general, los derivados de Celecoxib tienen actividad sobre PDK1, entre los más potentes se encuentran los compuestos identificados como OSU-02067 (4-[5-(2-fenantrenil)-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]bencenosulfonamida, que corresponde al compuesto 23, Tabla 1 (XI); OSU-03012 (2-amino-N-(4-(5-(2-fenantrenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il)fenil)acetamida), que corresponde al compuesto 34, Tabla 1 (XI); y OSU-03013 (4-[5-(2-fenantrenil)-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-1-il]-fenil-guanidina), que corresponde al compuesto 35, Tabla 1 (XI) [Zhu, Jiuxiang. From celebrex to a novel class of phosphoinositde-dependent kinase-1 (PDK-1) inhibitors for androgen-independent prostate cancer; http://etd.ohiolink.edu/search.cgi?q=PDK1+inhibitors&field=&pagesize=30; http://etd.ohiolink.edu/search.cgi?q=accession_number:osu1243948876&mlt=y]

En una realización particular, el inhibidor de PDK1 es el compuesto identificado como OSU-03012 que actúa inhibiendo la vía PI3K/Akt y presenta una IC_{50} de 5 μM para inhibir PDK1, con una inhibición no determinada por encima de 50 μM. Esta molécula ha sido desarrollada por sus efectos antitumorales, bloqueando la actividad PDK-1, la especificidad se ha demostrado *in vitro* realizando ensayos *in vitro* kinasa (ivk) en presencia o ausencia de diferentes inhibidores de kinasas; para ello se inmunoprecipita la PDK-1 que previamente ha sido activada y se determina la fosforilación de un sustrato exógeno, e.g., péptidos sintéticos que se fosforilan por la acción de determinadas kinasas. La mezcla de reacción lleva una batería de inhibidores de kinasas y se establece la especificidad en función de la concentración. A las concentraciones indicadas, el compuesto OSU-03012 actúa como un inhibidor específico de PDK1.

Entre los compuestos poliheterocíclicos inhibidores de PDK1 [Tabla 1 (XIII)] merece la pena destacar al compuesto identificado como KP 372-1 (EP 1296985), de fórmula:



Composiciones farmacéuticas de la invención

El experto en la materia entiende que los inhibidores de PDK1 pueden ser utilizados para preparar un medicamento que será administrado de manera adecuada al sujeto en necesidad de tratamiento.

En una realización particular, dicho medicamento reduce la muerte neuronal inducida por el péptido (1-42)Aβ en el SNC; en una realización concreta, dicho medicamento se administra a un sujeto que padece la enfermedad de Alzheimer (EA).

En una realización particular, el inhibidor de PDK1 es un compuesto mostrado en la Tabla 1. En otra realización particular, el inhibidor de PDK1 se selecciona del grupo formado por:

- un oligonucleótido antisentido específico para el gen que codifica PDK1, e.g., el oligonucleótido cuya secuencia de nucleótidos se muestra en la SEQ ID NO: 4;

- un microARN específico para el gen que codifica PDK1, e.g., un microARN cuya secuencia de nucleótidos se muestra en la SEQ ID NO: 5 o en la SEQ ID NO: 6;

- un ARN de interferencia específico para el gen que codifica PDK1, e.g., un ARN de interferencia cuya secuencia de nucleótidos se muestra en la SEQ ID NO: 7 o en la SEQ ID NO: 8;

- un péptido inhibidor de PDK1;

- un anticuerpo inhibidor de PDK1;

- un compuesto seleccionado del grupo formado por staurosporine y sus derivados, fenotiacina y sus derivados, derivados de urea (e.g., BX-320, BX-795 o BX-912), celecoxib y sus derivados, piridinonil derivados, compuestos poliheterocíclicos, y combinaciones de los mismos.

En una realización particular, el inhibidor de PDK1 es OSU-03012.

Para su administración a un sujeto, los inhibidores de PDK1 se formularán junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable para su administración según la vía de administración elegida.

Como un experto en la materia entiende, en los casos en los que los inhibidores de PDK1 sean ácidos nucleicos, estos pueden estar incluidos en vectores. Los medios para la distribución de genes a una célula o tejido *in vivo* o *ex vivo* incluyen (pero no están limitados a) inyección directa de ADN desnudo, métodos balísticos, transferencia mediada por liposomas, transferencia mediada por receptores (complejo ligando-ADN), electroporación, y precipitación con fosfato cálcico. Ver la patente de EE.UU. Nos. 4970154, WO 96/40958, patente de EE.UU. No. 5679559, patente de EE.UU. No. 5676954, y patente de EE.UU. No. 5593875. También incluyen el uso de vectores virales tales como un retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado, poxvirus, lentivirus, virus del papiloma o el herpes simplex virus, uso de un conjugado ADN-proteína y el uso de un liposoma. El uso de los vectores se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. No. 5672344, patente de EE.UU. No. 5399346, patente de EE.UU. No. 5631236, y patente de EE.UU. No. 5635399.

Cuando se administran solos, los inhibidores de PDK1 pueden administrarse en combinación con vehículos farmacéuticamente aceptables y en las dosificaciones aquí descritas. Dichos inhibidores de PDK1 también pueden usarse en combinación con uno o más compuestos adicionales eficaces contra la patología específica fijada como objetivo para el tratamiento. Los agentes terapéuticos y/o los compuestos adicionales diferentes pueden administrarse simultáneamente con, posteriormente a, o antes de la administración del compuesto descrito en la Tabla 1.

En una realización particular, un inhibidor de PDK1 contenido en la Tabla 1 se usa combinado con otro fármaco útil para el tratamiento de una enfermedad asociada a la formación de depósitos amiloideos, particularmente enfermedades asociadas a

depósitos de un péptido beta amiloide En una realización particular, el péptido beta amiloide es el péptido (1-42)Aβ. En una realización particular, el otro fármaco se selecciona entre un inhibidor de Rac1 o un inhibidor de una PKC, preferentemente, de una PKC nueva.

En una realización particular, dicho medicamento comprende uno o más de los inhibidores de PDK1 mostrados en la Tabla 1. En este sentido, se podrían combinar dichos inhibidores en proporciones iguales o distintas, y podrían formar parte de la misma formulación o podrían formularse en formulaciones diferentes para su administración secuencial o simultánea.

Las composiciones farmacéuticas conteniendo uno o más inhibidores de PDK1 pueden presentarse en cualquier forma farmacéutica de administración que se considere adecuada para la vía de administración elegida, por ejemplo, por vía sistémica, oral, parenteral o tópica, para lo cual incluirán los excipientes farmacéuticamente aceptables necesarios para la formulación de la forma de administración deseada.

La cantidad efectiva de inhibidor de PDK1 puede variar dentro de un amplio intervalo y, en general, variará en función de circunstancias particulares de aplicación, la duración de la exposición y consideraciones de este tipo.

Las formas de dosificación sólidas para administración oral pueden incluir cápsulas convencionales, cápsulas de liberación sostenida, comprimidos convencionales, comprimidos de liberación sostenida, comprimidos masticables, comprimidos sublinguales, comprimidos efervescentes, píldoras, suspensiones, polvos, gránulos y geles. En dichas formas de dosificación sólidas, los compuestos activos pueden mezclarse con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa o almidón. Dichas formas de dosificación también pueden comprender, como en la práctica normal, sustancias adicionales distintas de diluyentes inertes, por ejemplo, agentes lubricantes tales como estearato de magnesio. En el caso de cápsulas, comprimidos, comprimidos efervescentes y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes tamponantes. Los comprimidos y píldoras pueden prepararse con recubrimientos entéricos.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral pueden incluir emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables que contienen diluyentes inertes habitualmente usados en la técnica, tales como agua.

Dichas composiciones también pueden comprender adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, y agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables y estériles pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes adecuados, agentes humectantes y/o agentes de suspensión. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden usarse están agua, solución de Ringer, y solución isotónica de cloruro sódico. Los aceites estériles también se usan convencionalmente como disolventes o medios de suspensión.

Para su administración tópica, los inhibidores de PDK1 pueden formularse en forma de cremas, geles, lociones, líquidos, pomadas, soluciones de pulverización, dispersiones, barras sólidas, emulsiones, microemulsiones y similares, que pueden formularse de acuerdo con los métodos convencionales que usan excipientes adecuados, tales como, por ejemplo, emulsionantes, tensioactivos, agentes espesantes, , colorantes y combinaciones de dos o más de los mismos.

Adicionalmente, los inhibidores de PDK1 pueden administrarse por vía transdérmica en forma de parches transdérmicos o dispositivos de iontoforesis. En una realización, el inhibidor de PDK1 se administra en forma de un parche transdérmico, por ejemplo, en forma de parche transdérmico de liberación sostenida. Se describen parches transdérmicos adecuados con más detalle en, por ejemplo, US5262165, US5948433, US6010715 y US6071531.

Las composiciones conteniendo los inhibidores de PDK1 pueden incluir adicionalmente excipientes convencionales, es decir, vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para la aplicación parenteral que no reaccionan de forma nociva con los compuestos activos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, por ejemplo, agua, soluciones salinas, alcohol, aceites vegetales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, tensioactivos, ácido silícico, parafina viscosa, aceite perfumante, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos petroetrales, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

Se conocen diversos sistemas de suministro de fármacos y pueden usarse para administrar los compuestos o composiciones de la invención, incluyendo, por ejemplo,

encapsulación en liposomas, microburbujas, emulsiones, micropartículas, microcápsulas y similares. La dosificación necesaria puede administrarse en forma de una única unidad o en una forma de liberación sostenida.

Las formas de liberación sostenida adecuadas así como los materiales y métodos para su preparación se describen en, por ejemplo, "Modified-Release Drug Delivery Technology", Rathbone, M. J. Hadgraft, J. and Roberts, M. S. (eds.), Marcel Dekker, Inc., New York (2002); "Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology", Wise, D. L. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, (2000); En una realización de la invención, la forma administrable por vía oral de los inhibidores de PDK1 está en una forma de liberación sostenida que comprende adicionalmente al menos un recubrimiento o matriz. El recubrimiento o matriz de liberación sostenida incluye, pero sin limitación, polímeros naturales, semisintéticos o sintéticos insolubles en agua, modificados, ceras, grasas, alcoholes grasos, ácidos grasos, plastificantes naturales semisintéticos o sintéticos, o una combinación de dos o más de los mismos.

Los recubrimientos entéricos pueden aplicarse usando procesos convencionales conocidos por los especialistas en la técnica, como se describe en, por ejemplo, Johnson, J. L., "Pharmaceutical tablet coating", Coatings Technology Handbook (Segunda Edición), Satas, D. and Tracton, A. A. (eds), Marcel Dekker, Inc. New York, (2001); Carstensen, T., "Coating Tablets in Advanced Pharmaceutical Solids", Swarbrick, J. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York (2001), 455-468;

Aunque las necesidades individuales pueden variar, la determinación de los intervalos óptimos para cantidades eficaces de los inhibidores de PDK1 pertenece a la experiencia habitual de los especialistas en la técnica. En general, la dosificación necesaria para proporcionar una cantidad eficaz de dichos inhibidores de PDK1, que pueda ajustarse por un especialista en la técnica, variará dependiendo de la edad, salud, estado físico, sexo, dieta, peso, grado de la alteración del receptor, frecuencia de tratamiento y la naturaleza y alcance de la alteración o enfermedad, afección médica del paciente, la vía de administración, consideraciones farmacológicas tales como la actividad, eficacia, perfil farmacocinético y de toxicología del compuesto particular usado, si se usa un sistema de suministro del fármaco, y si el compuesto se administra como parte de una combinación de fármacos.

La cantidad de inhibidor de PDK1 que será eficaz en el tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y puede determinarse por técnicas clínicas convencionales, incluyendo la referencia a Goodman and Gilman, supra; The Physician's Desk Reference, Medical Economics Company, Inc., Oradell, N.J., 1995; y Drug Facts and Comparisons, Inc., St. Louis, MO, 1993. La dosis exacta a usar en la formulación también dependerá de la vía de administración, y la gravedad de la enfermedad o trastorno, y debe decidirse a criterio del médico y de las circunstancias del paciente.

Métodos de screening de la invención

Los inventores han observado que en células de origen neuronal y en cultivos organotípicos (Figura 1, 2 y 18) la adición del péptido (1-42)Aβ reproduce las características patológicas de una enfermedad asociada a depósitos amiloideos tal como la EA. En consecuencia, aquellos agentes que provoquen una mejora de los estadios patológicos observados en un cultivo celular o en un cultivo organotípico podrían ser potencialmente útiles en el tratamiento enfermedades asociada a depósitos amiloideos en general, y, en particular, en el tratamiento de la EA.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la identificación de un compuesto capaz de inhibir la muerte celular inducida por depósitos amiloideos para el tratamiento de enfermedades asociadas a la formación de depósitos amiloideos que comprende:

a) poner en contacto una célula con una proteína amiloidea;

b) poner las células resultantes de a) en contacto con un compuesto candidato; y

c) determinar en dicha célula los niveles de activación de PDK1,

en donde si los niveles de activación de PDK1 en la célula después de haber sido tratada con un compuesto candidato son menores que antes del tratamiento, el compuesto candidato es capaz de inhibir la muerte celular neuronal inducida por proteínas amiloideas y útil para el tratamiento de enfermedades asociadas a la formación de depósitos amiloideos.

Los términos "enfermedades asociadas a la formación de depósitos amiloideos", y "proteína amiloidea" han sido descritos anteriormente en el apartado de composiciones de la invención.

El experto en la materia entiende que para determinar si una proteína es una proteína amiloidea, dicha proteína o péptido debe aparecer en los depósitos amiloideos de enfermedades asociadas con los depósitos amiloideos arriba citadas teniendo por tanto una morfología alargada, se tiñen con Rojo Congo, que presenten un patrón de difracción de rayos X característico, llamado patrón "cross-beta". Inouye H. et al Biophys J. 1993 64(2):502-519.

En una realización particular, la proteína amiloidea es un péptido beta amiloide; en consecuencia, el método sería un método para la identificación de compuestos capaces de inhibir la muerte celular inducida por un péptido beta amiloide para el tratamiento de enfermedades asociadas a la formación de depósitos de un péptido beta amiloide que comprende:

a) poner en contacto una célula con un péptido beta amiloide;

b) poner las células resultantes de a) en contacto con un compuesto candidato; y

c) determinar en dicha célula los niveles de activación de PDK1,

en donde si los niveles de activación de PDK1 en la célula después de haber sido tratada con un compuesto candidato son menores que antes del tratamiento, el compuesto candidato es capaz de inhibir la muerte celular neuronal inducida por un péptido beta amiloide y útil para el tratamiento de enfermedades asociadas a la formación de depósitos amiloideos del péptido beta amiloide. En una realización particular, el péptido es el péptido (1-42)Aβ.

Los términos "péptido beta amiloide ", "muerte celular inducida por un péptido beta amiloide" y y "enfermedades asociadas a la formación de depósitos amiloideos asociadas a péptido Aβ" han sido definidos con anterioridad.

Así, en una primera etapa [etapa a)], el método de rastreo de agentes terapéuticos de la invención comprende poner en contacto una célula con una proteína amiloidea. En una realización particular en una primera etapa [etapa a)], el método de rastreo de agentes terapéuticos de la invención comprende poner en contacto una célula con un péptido Aβ, tal como el péptido (1-42)Aβ.

En la presente invención, se entiende por célula a una célula aislada en cultivo así como a una pluralidad de células tanto asiladas (cultivo celular) como formando parte de un cultivo organotípico. Así, en la presente invención, el término "cultivo" incluye todas las posibilidades anteriormente citadas.

Ejemplos de células que pueden ser usadas en la presente invención son tanto cultivos primarios obtenidos de diversos tejidos como la piel, la sangre, corazón, cerebro etc como células inmortalizadas o de cultivos primarios provenientes de osteoblastos, mioblastos, neuroblastos, fibriblastos, glioblastos, células madre, hepatocitos, condrocitos, células de musculo liso y estriado, células de tejido conectivo, células gliales, epiteliales, endoteliales, neuronas, etc. En una realización particular, las células usadas son células de origen neuronal, tanto de cultivos primarios de neuronas como de cultivos inmortalizados de origen neuronal como las células SN4741, IMR32, N-TERA, PC12, GN11, C1300.

En otra realización particular, las células forman parte de una estructura tridimensional denominada cultivo organotípico. En la presente invención, por "cultivo organotípico" se entiende un cultivo tridimensional de tejido que mantiene en gran parte la estructura, conexiones celulares y fisiología similares a las presentes en el órgano del que ha sido extraído en este caso cerebro (Gahwiler, 1981 J. Neurosci. Meth. 4, 329-42; Gahwiler 1984 Neuroscience. 11:751-60; Gahwiler 1988 Trends Neurosc. 11:484-9; Stoppini et al. 1991 J. Neuroscience Methods 37:173-82).

Los cultivos organotípicos pueden ser extraídos de cualquier órgano en donde se pretenda estudiar la influencia de la muerte celular inducida por una proteína amiloidea como el péptido (1-42)Aβ, como, por ejemplo el cerebro, el corazón, los riñones, etc. En una realización particular, el cultivo organotípico es de origen cerebral. El cultivo organotípico puede contener diversas zonas del cerebro y será realizado seleccionando las zonas según los intereses particulares de cada ensayo.

Métodos para generar cultivos organotípicos son conocidos por el experto en la materia (Gahwiler, 1981 J. Neurosci. Meth. 4, 329-42; Gahwiler 1984 Neuroscience. 11:751-60; Gahwiler 1988 Trends Neurosc. 11:484-9; Stoppini et al. 1991 J. Neuroscience Methods 37:173-82). El animal no-humano al que se le disecciona el cerebro u otro órgano, puede ser cualquier animal, preferentemente, un vertebrado, tal como un mamífero, por ejemplo, un roedor, preferiblemente, un ratón o una rata. Dicho

animal no-humano puede ser un animal con un fondo genético modificado genéticamente, es decir, cuyo material genético ha sido manipulado y diseñado o alterado deliberadamente con el fin de otorgarle alguna característica de interés, o puede ser un animal no modificado genéticamente. Dichos animales no humanos genéticamente modificados pueden ser animales transgénicos, es decir, animales que presentan, insertada en su genoma, la secuencia de un gen de interés, e.g., EYFP (Winter SM et al., 2007 Respir Physiol Neurobiol. 159:108-14) o genes-GFP para la expresión de la proteína fluorescente GFP bajo el control del promotor de nestina (Friling et al., 2009 Proc Natl Acad Sci U S A 106(18):7613-8). También puede ser un animal que presenta bloqueada la expresión de un gen específico (e.g., ratones knock-out). Los métodos para la generación de animales de este tipo son bien conocidos por un experto en la materia.

Un ejemplo de cultivo organotípico cerebral sería el cultivo organotípico mostrado en la Figura 18 y descrito en los ejemplos de la presente invención.

Los cultivos usados en el método de la invención, son mantenidos en condiciones que permitan la supervivencia celular. Dichas condiciones adecuadas para la supervivencia de dicho cultivo incluyen las condiciones que garantizan que el cultivo no se necrose y se mantenga vivo. Dichas condiciones incluyen el mantenimiento de los cultivos en condiciones de humedad, temperatura y concentraciones de gases (habitualmente, 37ºC, 5% CO_2 y 95% O_2) adecuadas, condiciones que pueden ser conseguidas manteniendo los cultivos en incubadores especialmente diseñados para dicho fin. El estado de la técnica incluye numerosos ejemplos de incubadores adecuados para mantener vivo un cultivo organotípico. Las condiciones de cultivo varían ampliamente para cada tipo de cultivo organotípico.

Además de la temperatura y la mezcla de gases, el factor más comúnmente variado en los sistemas de cultivo es el medio de crecimiento. Las recetas para los medios de crecimiento pueden variar en pH, concentración de glucosa, factores de crecimiento y la presencia de otros componentes nutritivos. Se conocen diversas recetas de medios utilizados para el mantenimiento de cultivos organotípicos (Vergni et al., 2009 PLoS ONE4(4):e5278, Chechneva et al., 2006 Neurobiol of Dis. 23(2):247-59).

Además, es necesario mantener los cultivos bajo condiciones de esterilidad usando métodos apropiados, por ejemplo, esterilización, etc., así como llevando a cabo

el manejo del cultivo en condiciones de esterilidad. El objetivo de todo ello es evitar la contaminación microbiana (e.g., bacterias, levaduras, micoplasmas, etc.) que competirían con las células de la porción de cerebro por los nutrientes y/o podrían infectar y eliminar dichas células. En una realización particular, toda manipulación se lleva a cabo, típicamente, en una campana de flujo laminar para evitar la entrada de microorganismos contaminantes. También pueden añadirse antibióticos al medio de cultivo.

Asimismo, para la correcta supervivencia del cultivo puede ser necesario, en ocasiones, realizar cambios del medio de cultivo de manera regular; así, en una realización particular, se realizan cambios del medio de cultivo cada 3 ó 4 días.

La expresión "poner en contacto", tal como aquí se usa, se refiere al proceso por el cual una proteína amiloidea como por ejemplo el péptido Aβ entra en contacto con una célula o cultivo organotípico, e incluye cualquier posible forma "*in vitro*" de poner en contacto una proteína amiloidea de manera extracelular así como cualquier método que permita la introducción de una proteína amiloidea a las células aisladas o que forman parte de un cultivo organotípico.

Las proteínas amiloideas pueden ser obtenidas de manera comercial o ser producidas usando síntesis química o biológica.

El péptido Aβ, en especial el péptido (1-42)Aβ puede ser obtenido de manera comercial o ser producido usando síntesis química o biológica tal y como se describe en el ejemplo 1 en el apartado "Preparación del péptido β-Amiloide (Aβ)" de la presente invención. Aunque trabajar con proteínas amiloides siempre implica problemas en la preparación de muestras (baja solubilidad, difícil reproducibilidad, etc.), el péptido β(1-42) es especialmente difícil de manipular, ya que presenta una insolubilidad muy elevada, lo que dificulta también su purificación. En condiciones cromatográficas estándar dicha proteína eluye dando lugar a picos extremadamente anchos, con poca resolución (Zagorski et al (1999) Methods Enzymol 309, 189-2359), por lo que requiere el uso de sistemas cromatográficos no habituales en la química de péptidos, como mezclas de eluyentes de ACN/isopropanol y condiciones básicas (Snyder S:W: et al Biophys J 1994, 67, 1216-1228, http://www. WesternAnalytical.com/vydac/bamyloid, Näslund J et al J. Neurochem. 1996, 67,294-301).

Las concentraciones del péptido Aβ, especialmente del péptido (1-42)Aβ usados en el método de la invención, en el caso de que se utilicen cultivos celulares varían de entre 0,001 μM y 40 μM, 0,05 μM y 30 μM, preferiblemente entre 0,15 μM y 10 μM, 0,3 y 5 μM, 0,1 μM y 2 μM. En una realización preferida, el cultivo es un cultivo celular y la concentración del péptido Aβ es de entre 0,5 μM y 3 μM y preferiblemente de 1,25 μM. En otra realización particular, el cultivo es un cultivo organotípico y la concentración del péptido Aβ es de entre 10 nM y 1 μM, preferentemente 100 nM.

En una segunda etapa [etapa b)], el método de rastreo de agentes terapéuticos de la invención comprende poner las células resultantes de a) con un compuesto candidato.

Los compuestos utilizados en el método de rastreo pueden ser compuestos químicos tanto orgánicos como inorgánicos. Entre los compuestos orgánicos, dicho compuesto puede ser un polímero biológico tal como un ácido nucleico o una proteína.

En una realización particular, el compuesto a ensayar no se encuentra aislado sino que se encuentra formando parte de una mezcla más o menos compleja, bien derivada de una fuente natural o bien formando parte de una biblioteca de compuestos. Ejemplos de bibliotecas de compuestos que pueden ser ensayadas según el método de la presente invención incluyen, sin limitación, bibliotecas de péptidos formadas tanto por péptidos como por análogos peptídicos que comprenden D-aminoácidos o péptidos que comprenden enlaces no peptídicos, bibliotecas de ácidos nucleicos formadas por ácidos nucleicos con enlaces no fosfodiéster del tipo de fosforotioato o ácidos nucleicos peptídicos, bibliotecas de anticuerpos, de carbohidratos, de compuestos de bajo peso molecular, preferiblemente moléculas orgánicas, de peptidomiméticos, y similares. En el caso de que se use una biblioteca de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, la biblioteca puede haber sido preseleccionada para contener compuestos que puedan acceder al interior celular con mayor facilidad. Así, los compuestos se pueden seleccionar en base a determinados parámetros tales como tamaño, lipofilicidad, hidrofilicidad, capacidad de formar puentes de hidrógeno. En caso de que el compuesto candidato se encuentre formando parte de una mezcla de mayor o menor complejidad, la invención comprende adicionalmente una o varias etapas de fraccionamiento de dicha mezcla y la repetición del método de la invención un número variable de veces hasta que el compuesto de la mezcla responsable de la separación de los elementos que forman el primer complejo de la invención se encuentre aislado. Métodos para el

fraccionamiento de compuestos presentes en una mezcla incluyen cromatografía (en capa fina, de gases o de exclusión molecular en gel, de afinidad), cristalización, destilación, filtración, precipitación, sublimación, extracción, evaporación, centrifugación, espectrometría de masas, adsorción y similares.

Alternativamente, los compuestos a ensayar pueden estar formando parte de un extracto obtenido de una fuente natural. La fuente natural puede ser animal o vegetal y estar obtenida de cualquier entorno, incluyendo, sin limitación, extractos de organismos terrestres, aéreos, marinos y similares.

Un experto en la materia entiende que para la realización de un ensayo "*in vitro*", se pueden utilizar péptidos aislados de lisados de fracciones o de células enteras derivados sin limitación de células primarias, transformadas, líneas celulares, recombinantes, bacterias etc.

La incubación con el agente a ensayar se realiza a diferentes concentraciones y tiempos de incubación. Por otro lado, el uso de reacciones control negativas (sin agente) y positivas es recomendable.

En una realización particular de la invención, el agente a ensayar se trata de un péptido. Para la introducción del péptido en las células del cultivo de la invención se pueden usar diversos procedimientos bien descritos en el estado de la técnica. También se puede introducir el fragmento de ADN que codifica dicho péptido. Métodos de clonaje y propagación de dicho fragmento de ADN son bien conocidos en el estado de la técnica. Los medios para la distribución de genes a una célula o tejido in vivo incluyen (pero no están limitados a) inyección directa de ADN desnudo, métodos balísticos, transferencia mediada por liposomas, transferencia mediada por receptores (complejo ligando-ADN), electroporación, y precipitación con fosfato cálcico (véase, por ejemplo, US 4970154, WO 96/40958, US 5679559, US 5676954 y US 5593875). También se incluye el uso de vectores virales tales como un retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado, poxvirus, lentivirus, virus del papiloma o el herpes simplex virus, uso de un conjugado ADN-proteína y el uso de un liposoma.

En una tercera etapa [etapa c)], el método de rastreo de agentes terapéuticos de la invención comprende determinar en dicha célula los niveles de activación de PDK1.

Existen múltiples métodos que pueden ser usados para determinar la activación de kinasas, particularmente de PDK1, conocidos por el experto en la materia. Por

ejemplo, se puede utilizar la habilidad de la kinasa para fosforilar su substrato natural. Dicha fosforilación puede ser detectada usando por ejemplo una unión radio/química/fotoquímica de un fosfato y la detección posterior de su incorporación en el substrato. En el caso particular de PDK1 el substrato serían proteínas como AKT/PKB y otras AGC kinasas como PKC, S6K, SGK etc.

Alternativamente, se pueden usar biosensores que como los biosensores basados en la transmisión de energía de resonancia (FRET – del inglés "Förster resonance energy transfer) para medir la activación de PDK1 en tiempo real. (Jin Zhang & Allen M. D.; 2007. Molecular bioSystems, vol. 3, n11, pp.759-765).

Otros ensayos para medir la modulación de las kinasas son conocidas por el experto en la materia tales como los descritos en WO/2004/035811.

Adicionalmente, la detección de la actividad de PDK1 puede ser medida usando sustratos exógenos como los polipéptido T308tide o PIFtide (Engel M et al 2006 EMBO J November 29(23):5469-5480. Otro sistema que puede ser utilizado para medir la actividad de PDK1 es el determinar la fosforilación de PKCzeta y PKCdelta *in vitro* tal y como se describe en Le Good, JA, et al,; (Science 1998 Sep 25,281(5385):2042-2045).

En una realización particular, el tercer paso del método de la invención comprende de manera adicional, la medición de los niveles de muerte celular o la viabilidad del cultivo. Métodos para medir los niveles de muerte celular o viabilidad de un cultivo o célula son conocidos por el experto en la materia.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de tales métodos incluyen la inspección visual bajo microscopio usando criterios morfológicos tales como la conservación de la estructura, el uso de colorantes vitales, la cuantificación de la expresión de marcadores de viabilidad celular, la determinación de la muerte celular por apoptosis, etc.

La muerte celular puede ser determinada usando métodos bien descritos en el estado de la técnica tales como la incorporación de ioduro de propidio o el marcaje con anexina V. La cuantificación de las células que se están degenerando se puede realizar midiendo la incorporación de dichas sustancias a la célula tal y como se describe en el apartado de métodos en los ejemplos de la presente invención. Otro método que puede ser utilizado es la medida de la actividad mitocondria como el ensayo de la reducción de

MTT tal y como se describe en la invención en el apartado ensayo de la reducción de MTT.

La cuantificación de los niveles de expresión de los marcadores de viabilidad celular, se puede realizar usando diferentes métodos bien conocidos en el estado de la técnica. El término "expresión", tal como aquí se utiliza, se refiere a un proceso mediante el cual se produce una proteína a partir del ADN. Este proceso implica la transcripción del gen a un ARN mensajero (ARNm) y la traducción de este ARNm a proteína. Los términos proteína o polipéptido son utilizados en la presente invención de manera equivalente. En el contexto de la invención "cambios en los niveles de expresión" de los marcadores de viabilidad celular se refiere a cualquier cambio en la producción del ARNm, de la proteína o de ambos, que produce niveles relativos alterados del ARNm, proteína o ambos, en una muestra con respecto a otras moléculas en la misma muestra. Se apreciará que los niveles de expresión de un marcador de viabilidad celular se puede determinar mediante la determinación de los niveles de ARNm en una muestra o mediante la determinación de los niveles del polipéptido correspondiente. De forma alternativa, los marcadores de viabilidad polipeptídicos pueden ser variantes resultantes de modificaciones postraduccionales, incluyendo fragmentos de los mismos.

Los niveles de expresión de los marcadores de viabilidad celular se pueden evaluar mediante cualquiera de una amplia variedad de métodos bien conocidos para detectar la expresión de una molécula transcrita (ARNm) o su proteína correspondiente. Métodos para determinar la molécula transcrita o la proteína son ampliamente conocidos por un experto en la materia, tales como PCR cuantitativa o usando anticuerpos con capacidad de unirse a las proteínas que codifican dichos genes y posterior cuantificación de los complejos formados usando por ejemplo técnicas como el Western-blot o transferencia Western, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA sandwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays de proteínas etc. , Aunque prácticamente cualquier marcador de viabilidad celular puede ser utilizado, en una realización particular, se determinan los niveles de fosfatidil serina en la cara externa de la membrana plasmática. En

condiciones fisiológicas el fosfolípido fosfatidilserina se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática, cuando comienza el proceso de apoptosis este fosfolípido se posiciona en la cara externa de la membrana plasmática y puede ser detectado con la proteína anexina-V. Esta proteína se une específicamente a la fosfatidilserina y como está etiquetada con un fluorocromo, el complejo fosfatidil serina-AnexinaV se puede detectar por citometría de flujo.

En otra realización particular de la invención, la viabilidad celular se puede determinar usando colorantes vitales bien conocidos por un experto en la materia, e.g., el crisol violeta. Para su detección, se pueden utilizar diversas técnicas de inmunoensayo y microscopía descritas anteriormente.

El experto en la materia entiende que dichos métodos para determinar la viabilidad celular del cultivo bajo estudio se pueden utilizar independientemente entre sí o en combinación.

En general, se considerará que un compuesto es potencialmente útil para el tratamiento de enfermedades asociadas a la formación de depósitos amiloideos como por ejemplo enfermedades asociadas a depósitos de Aβ, cuando los niveles de activación de PDK1 en la célula después de haber sido tratada con un compuesto candidato son menores que antes del tratamiento.

Se considera que los niveles de activación de PDK1 en la célula o cultivo después de haber sido tratada con un compuesto candidato son menores que antes del tratamiento cuando se produce una activación menor de 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100 veces y/o una disminución de los niveles de muerte celular.

Un experto en la materia entiende que si el método de medición de la actividad de PDK1 requiere la lisis de la célula (ej extracción de proteínas, ARN etc), entonces sería necesario el uso de una segunda célula o cultivo que no ha sido tratada con el compuesto a estudio en donde será medida la activación de PDK1 (cultivo control naif). Así, se considerará que un compuesto es potencialmente útil para el tratamiento de enfermedades asociadas a la formación de depósitos amiloideos, en particular de enfermedades asociadas a péptidos beta amiloides, más especialmente el péptido (1-42)Aβ cuando los niveles de activación de PDK1y/o los niveles de muerte celular en la

célula o cultivo después de haber sido tratada con un compuesto candidato son menores que antes del tratamiento, el compuesto candidato es capaz de inhibir la muerte celular inducida por el depósitos amiloideo, en particular la muerte celular inducida por péptidos beta amiloides, más especialmente por el péptido (1-42)Aβ.

Se considera que los niveles de activación de PDK1 y/o de muerte celular en la célula o cultivo después de haber sido tratada con un compuesto candidato son menores que antes del tratamiento cuando se produce una activación menor de 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100 veces y/o una disminución de los niveles de muerte celular en la célula o cultivo tratada con el compuesto candidato en referencia a la célula o cultivo control naif (es decir que no ha sido tratado con el compuesto potencialmente útil para el tratamiento de enfermedades asociadas a la formación de depósitos amiloideos pero sí con una proteína amiloidea como por ejemplo el péptido (1-42)Aβ).

Adicionalmente, si se desea, en una realización particular, el método de rastreo de compuestos potencialmente útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades asociadas a la formación de depósitos amiloideos de la invención comprende una etapa adicional [etapa c)] en la que se analiza la activación de PDK1 en un cultivo celular u organotípico control. Diversos tipos de cultivos control (celular u organotípico) pueden ser utilizados: a) cultivo control naif-naif, es decir que no ha sido tratado con el compuesto potencialmente útil para el tratamiento de enfermedades asociadas a la formación de depósitos amiloideos ni con una proteína amiloidea como el péptido (1-42)Aβ , b) cultivo control naif, no ha sido tratado con el compuesto pero si con proteína amiloidea como el péptido (1-42)Aβ, c) un cultivo positivo-naif, es decir, que ha sido tratado con un compuesto bien descrito conocido por activar PDK1 pero no con una proteína amiloidea como el péptido (1-42)Aβ, d) un cultivo positivo, es decir, que ha sido tratado con un compuesto bien descrito conocido por activar PDK1 y con una proteína amiloidea como el péptido (1-42)Aβ, e) un control negativo naif, es decir, que ha sido tratado con un compuesto bien descrito conocido por inhibir PDK1 pero no con una proteína amiloidea como el péptido (1-42)Aβ, f) un control negativo es decir, que ha sido tratado con un compuesto bien descrito conocido por inhibir PDK1 pero no con una proteína amiloidea como el péptido (1-42)Aβ.

Diversos compuestos que activan PDK1 aparecen descritos en Engel M et al 2006 EMBO J 29(23):5469-5480; Hindie V, et al Nat Chem Biol. 2009 ;5(10):758-64.

Stockman B.J. et al. Chemical Biology and Drug Design (2009) 73:2, Pag. 179-188. Compuestos que inhiben a PDK1 son conocidos por el experto en la material. Otros ejemplos de inhibidores específicos de PDK1 aparecen descritos en la Tabla 1.

El siguiente ejemplo ilustra la invención y no debe ser considerado en sentido limitativo de la misma.

EJEMPLO 1

1. Materiales y Métodos

1.1 Cultivos celulares

Se utilizaron células SN4741, que provienen de la Sustancia Nigra de ratón [Son J. H. et al.; 1999 J Neurosci 19(1):10-20; Son J.H. et al. 2005. J. Neurochem 94(4): 1040-53]. Se cultivaron en DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco) modificado con L-glutamina 4 mM, 3,7g/L de bicarbonato de sodio y 4,5g/L de glucosa sin piruvato de sodio (Cambrex) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) (Gibco) y una mezcla de antibióticos constituida por 10.000 u/ml de penicilina y 10 mg/ml de estreptomicina (Gibco) a 37ºC y 5% de CO_2.

Se utilizó también la línea derivada de neuroblastoma IMR32, disponible, por ejemplo, en la Colección Norteamericana de Cultivos Tipo (ATCC) con el número de acceso CCl 127. Estas células se cultivaron en MEM modificado por Earl (Gibco), suplementado con 10% de FBS, y una mezcla de antibióticos constituida por 10.000 U/ml de penicilina y 10 mg/ml de estreptomicina (Gibco) a 37ºC y 5% CO_2.

Las dos líneas celulares utilizadas crecían en monocapa y para su expansión se lavaron 2 veces con DPBS (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco – del inglés "Dulbecco's Phosphate Buffered Saline") sin Ca^{2+} y sin Mg^{2+} (Gibco) precalentado a 37ºC. Se cubrieron con Tripsina-EDTA (ácido etilendiaminotetracético) 1X y se dejó actuar durante unos minutos. Para parar la reacción se añadió el medio de crecimiento completo.

También se utilizaron cultivos primarios de células neuronales obtenidas de cerebros de embriones de rata en la segunda semana de gestación. Se sembraron $1x10^5$ células por pocillo, en medio neurobasal (Gibco) suplementado con 10% de FBS y 1% de gentamicina. Previamente las placas de 6 pocillos se trataron con fibronectina para facilitar la adhesión de las células neuronales. Al cabo de 24 horas se cambió el medio a

uno sin suero para evitar que creciesen y proliferasen otros tipos celulares que no fuesen neuronas propiamente dichas y se le añadió el factor B27 el cual favorece la diferenciación y crecimiento de dendritas y axones. Finalmente, las células se mantuvieron en cultivo 8 días a 37ºC en atmósfera de CO_2 al 5% antes de ser utilizadas para los experimentos.

1.2 Cultivos organotípicos

Se prepararon a partir de cortes coronales de 400 µm de grosor del hipocampo y corteza entorrinal de ratas Sprague-Dawley de 2-3 días de edad [Cavaliere F. et al.; 2005. Neuroscience;136(3):615-23]. Los cortes se adhirieron a membranas Millicell CM (Millipore, Schwalbach, Alemania) y se mantuvieron en medio de cultivo HME al 75% (Cell Concept, Berlin, Alemania), L-glutamina (Biochrom, Berlin, Alemania) 2 mM, 25% de suero de caballo (Gibco) y 25 mg/ml de gentamicina durante 3 días a 37ºC. Posteriormente, los cultivos se cambiaron a medio neurobasal suplementado con B27 al 0,5% (ambos de Gibco). Los ensayos de toxicidad se llevaron a cabo en cultivos de 7 días que se incubaron con oligómeros del péptido (1-42)Aβ durante 72 horas en presencia o ausencia de Rottlerin [3'-[(8-cinamoil-5,7-dihidroxi-2,2-dimetil-2H-1-benzopiran-6-il)metil]-2',4',6'-trihidroxi-5'-metilacetofenona]. La muerte celular se evaluó mediante incubación con ioduro de propidio (10 µM) durante 2 horas a 37ºC. Finalmente, los cultivos se examinaron mediante fluorescencia (luz de excitación a 510-560 nm; emisión a 610 nm) empleando un filtro de rodamina en un microscopio invertido (Cell Observer, Zeiss). Las imágenes se adquirieron con una cámara CCD (ORCA; Hamamatsu, Barcelona) y se analizaron con sofware Axovision (Zeiss).

1.3 Transfección de SN4741 por electroporación

Para conseguir la mayor eficiencia de transfección por este método, se necesita que las células se encuentren en fase de crecimiento exponencial y que el pase no sea muy reciente. Las células se tripsinizaron, se contaron, se lavaron con PBS (solución salina tamponada por fosfatos) y se centrifugaron. Se resuspendieron a razón de $5x10^6$ en 200 µL del medio de crecimiento completo enfriado previamente en hielo y se pusieron en la cubeta de electroporación también enfriada previamente en hielo. Se añadieron a cada cubeta 10 µg del ADN a transfectar, y se colocaron las cubetas en el

hielo. Las células se sometieron a un único pulso eléctrico de 260 V y 950 μF (Electroporator BIORAD) y las cubetas se volvieron a colocar en el hielo. Realizando todo el procedimiento en frío, se consigue que los poros en las membranas celulares permanezcan abiertos y que penetre así el ADN con mayor facilidad. Posteriormente, las células transfectadas se colocaron en placas de 100 mm en las que había 10 ml de medio de crecimiento completo precalentado a 37ºC. Las células permanecieron sin cambiar el medio durante 24 horas, tras las cuales fueron lisadas con buffer de Laemli 2X si lo que se desea es ver la expresión de las proteínas sobreexpresadas, o fueron sometidas a ayuno de suero, si lo que se desea es realizar algún experimento que así lo requiera.

1.4 Ensayos de activación de las GTPasas de la superfamilia Ras

Los experimentos de precipitación por afinidad de Ras, Rho, Rac1 y Cdc42, se llevaron a cabo utilizando proteínas de fusión GST (glutatión-S-transferasa) que tiene el dominio de unión específico para cada una de ellas (RBD); así se utilizó GST-RBD de Raf para Ras, GST-RBD de Rhotekin para RhoA, GST-RBD de PAK1 para Rac1 y GST-RBD de WASP para Cdc42. La determinación del estado de activación de estas GTPasas se llevó a cabo de la siguiente manera: las células transfectadas o no fueron estimuladas o no como se indica en el capítulo de resultados. Tras la estimulación, las células se lavaron con PBS y se lisaron como ya se había descrito anteriormente [Maillet, Robert et al. 2003 Nat Cell Biol. Jul;5(7):633-639]. Los lisados se centrifugaron a 4ºC durante 15 min a 14.500 rpm y se incubaron durante 1 hora a 4ºC con 50 μg de proteína de fusión previamente acoplada a bolas de glutatión sefarosa. Las proteínas precipitadas fueron disociadas de las bolas utilizando un buffer de carga 2X SDS-PAGE y fueron analizadas por inmunoblot. Las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas con ECL (General Electric Healthcare).

1.5 Preparación del péptido (1-42)Aβ

La preparación del péptido se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Klein y col. [Klein W.L. et al.; 2001 Brain Res 24(4):219-24] para formar ADDLs (del inglés "Aβ-Derived Diffusible Ligando"). El péptido (1-42)Aβ (Bachem) se retiró del congelador y se puso en hielo para preparar el stock. Se colocó en hielo HFIP

(1,1,1,3,3,3,-hexafluoro-2-propanol) (Sigma) y se dejó enfriar. Se añadió HFIP al vial que contenía 1 mg del péptido (1-42)Aβ para obtener una concentración de 1 mM. Se incubó a temperatura ambiente hasta su completa disolución manteniendo el vial cerrado, ya que el HFIP es altamente volátil. Cuando el péptido se había solubilizado por completo, se puso en hielo durante 15 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo, se hicieron alícuotas de la solución y se dejaron los tubos sin cerrar en una campana de extracción toda la noche para permitir la evaporación del HFIP. Se secaron los tubos en el Speedvac durante 10 minutos para eliminar los restos de HFIP por completo. El stock se guardó a -80ºC. Se hizo un stock de péptido (1-42)Aβ a 5 mM en dimetilsulfóxido (DMSO) 100% asegurando la completa resuspensión del péptido (este stock se debía preparar cada vez que se necesitase, ya que no se podía guardar el péptido en DMSO porque se formarían protofibrillas). Se diluyó esta mezcla en medio Ham's F12 sin rojo fenol (PromoCell), la concentración máxima en esta disolución fue de 100 µM. Esta solución se incubó a 5ºC durante 24 horas, posteriormente se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos en frío, y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Este sobrenadante era la preparación de ADDLs, que se iba a utilizar para los experimentos.

1.6 Ensayos para la determinación de la toxicidad y muerte celular por el péptido (1-42)Aβ

1.6.1 Ensayo de la reducción del MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]

La muerte neuronal fue cuantitativamente evaluada mediante el ensayo del MTT [Mosmann T. et al.; 1983 J Immunol Methods 65(1-2):55-63]. Para ello, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a razón de 10^4 células por pocillo. Al día siguiente se lavaron y se cambiaron de medio para mantenerlas 24 horas en medio sin FBS. Transcurrido ese tiempo, se sometió a las células a los diferentes tratamientos con los inhibidores y el péptido (1-42)Aβ, y se mantuvo el tratamiento durante 24 horas. Para realizar el ensayo, se utilizó el kit de MTT de Promega (CellTiter 96 Non-Radioactive cell proliferation assay kit) según las recomendaciones del fabricante: La medida espectrofotométrica se realizó en un lector de microplacas. En cada ensayo se realizaron todas las condiciones por triplicado; además, cada estudio se repitió un mínimo de 3 veces. Los valores obtenidos se transformaron en porcentajes dando el valor 100% de

viabilidad a la absorbancia neta de las células control. El resto de valores correspondientes a los distintos tratamientos, se presentan como porcentajes sobre el control.

1.6.2 Ensayos de apoptosis mediante doble marcaje con ioduro de propidio y anexina V para citometría de flujo

Para realizar los ensayos con anexina V se utilizó un kit de BD (FITC Annexin V Apoptosis detection kit) en el que la anexina V estaba combinada con el fluorocromo FITC. Para estos experimentos se cultivaron las células SN4741 en placas de 100 mm de diámetro a una densidad de $3x10^6$ células por placa. Al día siguiente, se sometieron a ayuno de FBS durante 24 horas, y una vez transcurrido este tiempo, se realizaron los distintos tratamientos con los inhibidores, con el péptido (1-42)Aβ o con el vehículo, y se incubaron las células durante 24 horas. Al finalizar la incubación, las células se lavaron 2 veces con PBS, se tripsinizaron, y se recogieron en tubos de 15 mL. Las células se centrifugaron y se lavaron 2 veces con PBS frío para retirar los restos de tripsina, que puede interferir con la marcación con anexina V, se contabilizaron y se resuspendieron en la solución de anexina V a razón de $1x10^6$ células/mL. De esta solución, se cogieron 100 µL y se pasaron a un tubo de citometría tapado con papel aluminio para proteger las células de la luz, y se añadieron 5 µL de anexina V y 5 µL de ioduro de propidio, se agitó suavemente y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos protegido de la luz. La adquisición de los datos en el citómetro debe realizarse dentro de la hora posterior a la realización del marcaje.

La citometría de flujo permitió diferenciar y cuantificar las distintas poblaciones formadas por células vivas (AnV-/PI-), células apoptóticas tempranas (AnV+/PI-) y células apoptóticas avanzadas o necróticas (AnV+/PI+).

2. Resultados

El péptido (1-42)Aβ es uno de los actores principales que intervienen en el proceso de muerte neuronal en los cerebros de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer. Del mismo modo, un gran número de líneas celulares de origen neuronal, también son sensibles al tratamiento con este péptido [Loo D.T. et al. 1993 Proc Natl Acad Sci U S A 90(17):7951-5; Allen J. W. et al.; 1999. Neuropharmacology

38(8):1243-52; Xu J. S. et al.; 2001. J Neurosci 21(1):RC118; Lee J. T. et al. 2004. J Cell Biol 164(1):123-31) y la mayor o menor sensibilidad a la toxicidad del péptido (1-42)Aβ es dependiente del tipo celular [Gschwend M. H. et al.; 1995 J Neurochem 65(1):292-300; Simakova S. B. et al.; 2007. J Neurosci 27(50):13719-29]. Lo primero que se estudió fue si la línea neuronal SN4741, proveniente de la Sustancia Nigra de ratón, era sensible a la toxicidad inducida por el tratamiento con el péptido (1-42)Aβ.

El proceso de muerte en las células SN4741 fue cuantitativamente evaluado mediante el ensayo del MTT, una medida de la actividad mitocondrial [Mosmann T. et al.; 1983 J Immunol Methods 65(1-2):55-63]. El MTT es una sal de tetrazolio hidrosoluble que se reduce a formazán al ser metabolizado por las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables. El formazán solubilizado se puede medir espectrofotométricamente a una longitud de onda de 570 nm, correlacionando la absorbancia obtenida con la viabilidad celular.

El péptido (1-42)Aβ se preparó para formar ADDLs según el procedimiento descrito en el apartado de Materiales y Métodos. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a razón de 104 células por pocillo. Al día siguiente se lavaron y se cambiaron de medio para mantenerlas 24 horas en medio sin FBS. Transcurrido ese tiempo, se sometió a las células a concentraciones crecientes del péptido (1-42)Aβ como se indica en la Figura 1 y se mantuvo el tratamiento durante 24 horas. Para realizar el ensayo, se utilizó el kit de MTT de Promega (CellTiter 96 Non-Radioactive cell proliferation assay kit) según las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se retiró el medio y se añadieron 100 µL de medio fresco sin FBS y 15 µL de la solución de MTT y se incubaron las células durante 5 horas a 37ºC en atmósfera de CO_2 al 5% para permitir que las células viables realizasen la reacción metabólica descrita. Posteriormente, se añadieron 100 µL de la solución de solubilización que lleva DMSO y se dejó toda la noche a 37ºC para disolver los cristales de formazán formados. La determinación espectrofotométrica se realizó en un lector de microplacas y los valores obtenidos se transformaron en porcentajes dando el valor del 100% de viabilidad al control.

Como puede verse en la Figura 1, las células SN4741 son sensibles a la toxicidad inducida por el péptido (1-42)Aβ. La viabilidad celular, medida como actividad mitocondrial, disminuye como consecuencia de la exposición al péptido (1-

42)Aβ durante 24 horas, y la toxicidad aumenta de manera dependiente de la dosis, a concentraciones mayores de péptido, se produce una mayor muerte celular.

La determinación de la toxicidad celular mediante colorimetría permite detectar porcentaje de células viables, sin embargo, no permite discriminar si las células muertas mueren por necrosis o por apoptosis. Por lo tanto, para discriminar entre apoptosis y necrosis, se utilizó la tinción con Anexina V combinada con ioduro de propidio y posterior análisis por citometría de flujo, ya que esta técnica permite la detección de la apoptosis mediante la pérdida de asimetría de la membrana en las células apoptóticas.

Las células viables mantienen una asimetría entre la cara externa e interna de la membrana plasmática, de modo que la fosfatidilserina se observa sólo en la cara interna. Esta asimetría de membrana se mantiene por la acción de los enzimas denominados flipasas. La fosfatidilserina tiene la habilidad de translocar a la cara externa de la membrana plasmática en determinadas condiciones, como sucede al inicio de la apoptosis, sirviendo como diana de reconocimiento específica para los macrófagos que deben fagocitar a las células en degeneración. De este modo, la detección de la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana puede servir como indicador de apoptosis.

Para realizar los ensayos con Anexina V, se utilizó un kit de BD (FITC Annexin V Apoptosis detection kit) en el que la Anexina V estaba combinada con el fluorocromo FITC (isotiocianato de fluoresceína). Para estos experimentos se cultivaron las células SN4741 en placas de 100 mm de diámetro a una densidad de $3x10^6$ células por placa. Al día siguiente, se sometieron a ayuno durante 24 horas, y una vez transcurrido este tiempo, se les trató con el péptido (1-42)Aβ o el vehículo, y se incubaron las células durante 24 horas. Al finalizar la incubación, las células se lavaron 2 veces con PBS, se tripsinizaron, y se recogieron en tubos de 15 mL. Las células se centrifugaron y se lavaron 2 veces con PBS frío para retirar los restos de tripsina, que puede interferir con la marcación con Anexina V, se contabilizaron y se resuspendieron en la solución de Anexina V a razón de $1x10^6$ células/mL. De esta solución, se cogieron 100 µL y se añadieron 5 µL de Anexina V y 5 µL de ioduro de propidio, y se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos protegido de la luz. La adquisición de los datos en el citómetro se realizó dentro de la hora posterior a la realización del marcaje.

El péptido (1-42)Aβ induce la apoptosis en las células SN4741 (Figura 2). En los paneles superiores se observan dot plots de las células control (izquierda) y las células tratadas con el péptido (1-42)Aβ (derecha). El eje de abscisas corresponde a las células marcadas con ioduro de propidio y el eje de ordenadas, las marcadas con Anexina V. Al utilizar a la vez los fluorocromos FITC (AnexinaV-FITC) (AnV/FITC) y el ioduro de propidio (PI) se pueden diferenciar y cuantificar las distintas poblaciones formadas por células vivas (AnV-/PI-) en el cuadrante Q3, células apoptóticas tempranas (AnV+/PI-) en el cuadrante Q4 y células apoptóticas avanzadas o necróticas (AnV+/PI+) en el cuadrante Q2 (Figura 2).

Además, se puede observar que la población celular en las condiciones control (panel superior izquierdo) se encuentra predominantemente en el cuadrante Q3, que corresponde a la población viable, mientras que el tratamiento con el péptido (1-42)Aβ (panel superior derecho), induce la apoptosis temprana y tardía detectada como un aumento de las células Anexina V positivas en los cuadrantes Q2 y Q4. En los paneles inferiores de la Figura 2, se muestran las curvas de la Anexina V, separando las poblaciones Anexina V negativas o viables (P2) y Anexina V positivas o apoptóticas (P3). Los valores corresponden a la cantidad de eventos registrados en cada una de estas poblaciones, representados como porcentaje del total. Se puede observar que el tratamiento de las células SN4741 con el péptido (1-42)Aβ produce un incremento de la apoptosis de más de un 30%.

Una vez comprobado que las células SN4741 eran sensibles a la toxicidad celular inducida por péptido (1-42)Aβ, se concluyó que, por lo tanto, esta línea celular era un buen modelo neuronal por su procedencia de la sustancia negra para el estudio de las vías de señalización que conducen a la muerte celular mediada por el péptido (1-42)Aβ.

Para poder estudiar con más detalle el efecto que el péptido (1-42)Aβ ejercía sobre la activación de Rac1, se determinó tanto la cinética de activación como las concentraciones necesarias para activar a Rac1. Para ello, se trataron las células con concentraciones crecientes del péptido (1-42)Aβ tal como se indica en la Figura 3. La Figura 3A muestra la curva dosis-respuesta realizada en las células SN4741, en la cual, se puede observar que la activación de Rac1 es dependiente de la concentración del péptido (1-42)Aβ. La concentración mínima del péptido que produce la máxima

activación de Rac1 es 1,25 μM. Este resultado se confirmó en cultivos primarios de neuronas, en los que también se pudo observar que la dosis mínima de péptido (1-42)Aβ para inducir la máxima activación de Rac1 es 1,25 μM (Figura 3B).

Por otra parte la activación de Rac 1 mediada por el péptido (1-42)Aβ se inició a los 15 minutos de exposición al péptido, y alcanzó su máxima activación a los 30 minutos para posteriormente ir disminuyendo hasta retornar a los niveles basales a los 60 minutos (Figura 4A). Estos resultados se confirmaron utilizando otro modelo celular como es la línea de neuroblastoma IMR32 y en la que se obtuvieron resultados similares, el péptido (1-42)Aβ activaba Rac1 siendo la máxima activación al cabo de 30 minutos de tratamiento (Figura 4B).

Estos resultados mostraban por primera vez que el tratamiento con el péptido (1-42)Aβ sobre las monocapas de líneas celulares neuronales y cultivos primarios de neuronas inducía la activación de Rac1, y ésta era dependiente tanto del tiempo como de la concentración de péptido. En base a esto, se abordó el estudio de la caracterización de las cascadas de señalización que utiliza el péptido (1-42)Aβ para activar a Rac1 y que probablemente están relacionadas con la muerte celular.

Para caracterizar la potencial vía de señalización que conduce a la activación de Rac1, se empezó por estudiar una de las grandes familias de serintreonin quinasas implicadas en la señalización intracelular temprana como son las PKCs, para lo cual se utilizó un inhibidor farmacológico, concretamente GF109203X (GF) [3-[1-[3-(dimetilamino)propil]-1H-indol-3-il]-4-(lH-indol-3-il)-lH-pirrolil-2,5-diona)].

Las células SN4741 fueron pre-tratadas durante 1 hora con GF 1 μM, posteriormente se realizó el tratamiento con el péptido (1-42)Aβ durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo de tratamiento, las células se lavaron 3 veces con PBS frío y se lisaron con el tampón de lisis para realizar una precipitación por afinidad con el dominio RBD del efector PAK. Las muestras fueron separadas mediante SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Las bandas inmunorreactivas se visualizaron utilizando el anticuerpo anti-Rac1. La Figura 5 muestra que, el tratamiento en las células SN4741 con el GF, bloqueaba la activación de Rac1, lo que sugería que la activación de la GTPasa Rac1 por parte del péptido (1-42)Aβ requería la activación de la familia PKC.

Al igual que ocurría en las células SN4741, el pretratamiento de las monocapas de cultivos primarios con el inhibidor GF, bloqueaba la activación de la GTPasa Rac1 mediada por el péptido (1-42)Aβ (Figura 6). Estos resultados sugieren que la familia PKC podría estar implicada en las vías de señalización que el péptido (1-42)Aβ induce y que conllevan la activación de la GTPasa Rac1.

Para comprobar si se pueden activar las PKCs con ésteres de forbol y ver si Rac1 se activa, las células SN4741 se mantuvieron en ayuno de suero durante 24 horas, y tras el tratamiento con GF durante 1 hora, las células se trataron con Forbol-12-miristato 13-acetato (PMA – del inglés "Phorbol 12-myristate 13-acetate") 1 μM durante 15 minutos. Como se puede observar en la Figura 7, el PMA media en la activación de Rac 1 y al pre-tratar las células SN4741 con el GF, y estimular después con PMA, la activación de Rac1 no se indujo (Figura 7A) [lo que corroboraba los resultados de que la familia de las PKCs podría estar implicada en la vía de señalización iniciada por el péptido (1-42)Aβ y que conduce a la activación de Rac1]. Se realizó la misma aproximación experimental en neuronas primarias de rata y los resultados obtenidos mostraron que la activación de Rac 1 era dependiente de la actividad de las PKCs, ya que utilizando GF se bloqueaba la activación de esta GTPasa (Figura 7B).

Por otro lado, para estudiar la posible implicación de PI3K en la muerte celular causada por el péptido (1-42)Aβ, las células SN4741 se pre-trataron durante 1 hora con 2-morfolin-4-il-8-fenilcromen-4-ona (Ly 294002 o, en ocasiones, "Ly" en esta descripción) 20 μM, un inhibidor de la PI3K, y posteriormente se realizó el tratamiento de 30 minutos con el péptido (1-42)Aβ (1,25 μM). Transcurrido este tiempo, se colocaron las placas sobre hielo, se lavaron las células 3 veces con PBS frío y se lisaron con el tampón de lisis para realizar una precipitación por afinidad con el dominio efector de PAK (Ras binding domain de PAK (RBD)). Las muestras fueron separadas mediante SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa y las bandas inmunorreactivas se visualizaron utilizando el anticuerpo anti-Rac1.

Los resultados obtenidos muestran que el pretratamiento de las monocapas con Ly bloqueaba la activación de Rac1 mediada por el péptido (1-42)Aβ (Figura 8 panel izquierdo).

Al igual que ocurría en la línea celular SN4741, también en los cultivos primarios de neuronas se producía una inhibición de la activación de la GTPasa Rac1

mediada por el péptido (1-42)Aβ tras el pretratamiento de las células con Ly (Figura 8, panel derecho). Estos resultados mostraban que la PI3K se encontraba dentro de la vía de señalización que utiliza el péptido (1-42)Aβ para activar la GTPasa Rac1.

Para establecer cuál era el orden jerárquico entre estas dos kinasas, PI3K y PKC, se analizó el estado de fosforilación de PKD. PKD es una serin treonin kinasa sustrato de la familia de las PKCs, y por lo tanto, se fosforila cuando estas kinasas se activan. En la Figura 8 tercer panel se puede observar que el tratamiento con el péptido (1-42)Aβ de las células SN4741, como en las neuronas primarias, produce una fosforilación de PKD y que esta fosforilación se ve inhibida cuando las monocapas celulares son pretratadas con el inhibidor de PI3K y posteriormente expuestas al péptido (1-42)Aβ. Este resultado significaba, por una parte, que tanto la PI3Kinasa como las PKCs se encontraban en la misma ruta de señalización que conducía a la activación de Rac1 y, por otra parte, que la PI3K se encontraba por encima de PKC en la vía de señalización.

Para explicar la conexión entre PI3K y PKC se estudió una de las moléculas que potencialmente tienen capacidad para unir a estas dos kinasas: otra proteína con actividad enzimática, la kinasa dependiente de fosfoinositoles, PDK1. PDK1 es sustrato de PI3K y que a su vez, es activadora de las PKCs.

Para verificar la hipótesis de que ambas kinasas PI3K y PKC se encontraban conectadas mediante PDK1, se procedió a utilizar OSU-03012 (OSU) un inhibidor farmacológico de esta última kinasa. Para ello, las células SN4741 se mantuvieron en ayuno de suero durante 24 horas, al cabo de las cuales se realizó un pretratamiento con OSU 10 μM, posteriormente se trataron con el péptido (1-42)Aβ (1,25 μM) durante 30 minutos y se realizaron ensayos de precipitación por afinidad para comprobar el estado de activación de la GTPasa Rac1. Como se puede observar en la Figura 9 (panel izquierdo), el inhibidor de PDK1 bloqueaba la activación de Rac1 mediada por el péptido (1-42)Aβ, lo que apuntaba a que PDK1 estaba implicada en la ruta de señalización que conducía a la activación de Rac1 y potencialmente actuaba como vínculo entre PI3K y PKC en esta vía. Estos ensayos se realizaron también en cultivos primarios de neuronas procedentes de cerebros de embriones de rata. Los resultados obtenidos con estos cultivos primarios (Figura 9 – panel derecho), son consistentes con los obtenidos para las células SN4741: la activación de la GTPasa Rac1 por el péptido (1-42)Aβ, se ve inhibida al pretratar las células con OSU; por tanto, se puede concluir

que PDK1 forma parte de la cascada de señalización que desencadena el péptido (1-42)Aβ y que conduce a la activación de Rac1, y que su función en esta vía sería la de ejercer de puente entre PI3K y PKC. Ya que el pretratamiento de las monocapas celulares con OSU y posterior tratamiento con el péptido (1-42)Aβ, el inhibidor de PDK1 bloquea la fosforilación de PKD, se pone una vez más de manifiesto que las PKCs están por debajo de la ruta de señalización gobernada por PI3K/PDK1.

Con estos resultados se propone, tal y como muestra la Figura 10, una novedosa cascada de señalización que descifraría cómo el péptido (1-42)Aβ media en la activación de Rac1 y en esta ruta se verían implicadas las kinasas PI3Kinasa, PDK1 y la familia de proteína kinasa C.

Para tratar de establecer si esta vía de señalización intervenía en la muerte celular causada por el péptido (1-42)Aβ, se decidió estudiar la implicación de PI3K, Akt y PDK1 en este proceso de muerte celular. Para ello, las células SN4741 se sembraron en placas de 96 pocillos a razón de 10^5 células por pocillo y al día siguiente se les sometió a ayuno de suero permaneciendo así 24 horas antes de añadir los diferentes tratamientos. En todos los casos, los pre-tratamientos con los diferentes inhibidores se mantuvieron durante las 24 horas de tratamiento posterior con el péptido (1-42)Aβ.

Como puede observarse en la Figura 11, los inhibidores Ly y AktII, produjeron un descenso de la viabilidad *per se* ya que son por sí mismos tóxicos para las células. Esto se podría deber a que la vía PI3K/AKT es una de las principales vías de regulación de la supervivencia en muchos tipos celulares, entre ellos en las neuronas, si se tratan las células con inhibidores farmacológicos de PI3K y AKT, el bloqueo de la actividad basal de estas kinasas puede ser suficiente para que las células entren en un proceso de muerte. Por el contrario, la inhibición de la actividad de PDK1 no modificó la viabilidad celular por lo que PDK1 parece tener un espectro de acción más reducido que PI3K y/o Akt sobre la supervivencia celular ya que bloqueando su actividad basal no se manifestó toxicidad. Se observó que el inhibidor de PDK1 (OSU) prevenía el efecto tóxico inducido por el péptido (1-42)Aβ, pasando de ser la viabilidad celular de un 50,28% en las células tratadas con el péptido (1-42)Aβ (1,25 μM), a un 78,83% en las células pretratadas con OSU (1 μM). $p<0,001$.

De estos resultados se deduce que PDK1 estaría relacionada con vías implicadas en la muerte celular y PDK1 podría ser una diana con potencial terapéutico ya que

bloqueando su actividad se prevenía la muerte neuronal inducida por el péptido (1-42)Aβ.

Por otro lado, se estudió cuál era el potencial grado de implicación de las PKCs en este proceso de muerte celular regulado por la acumulación del péptido (1-42)Aβ. Para ello, las células se pretrataron con el inhibidor GF durante 1 hora, y posteriormente se realizó el tratamiento con el péptido (1-42)Aβ (1,25 μM) durante 24 horas. Como se muestra en la Figura 12, el pretratamiento de las células SN4741 con GF, fue capaz de proteger de la toxicidad causada por el péptido (1-42)Aβ. La viabilidad celular en las células tratadas con el péptido (1-42)Aβ (1,25 μM) fue del 50,28%, y esta viabilidad aumentó mediante el pretratamiento con GF hasta alcanzar un 77,96% en las células pre-tratadas con GF (5 μM).

Estos datos sugerirían, al igual que para PKD1, que las PKCs estarían interviniendo de manera activa en la cascada de señalización que desembocaba en la muerte celular mediada por el péptido (1-42)Aβ, por lo que se observó, por primera vez, que bloqueando su actividad mediante el uso de inhibidores farmacológicos específicos, se podía revertir el fenotipo de muerte.

También se determinó el papel de Rac1 en este proceso de muerte celular mediado por el péptido (1-42)Aβ. Las monocapas se pretrataron con 6-mercaptopurina (6-MP) durante 1 hora y posteriormente durante 24 horas de tratamiento con el péptido (1-42)Aβ. En la Figura 13, se puede observar que, de la misma manera que ocurría cuando se inhibían PDK 1 y PKCs, la inhibición de Rac1 en estas condiciones hizo que las células SN4741 resistieran a la acción tóxica del péptido (1-42)Aβ. La viabilidad aumentó desde un 50,28% en las células tratadas con el péptido (1-42)Aβ, hasta un 75,51% al pre-tratar las monocapas con 6-MP (5 μM). Estos resultados indican que la GTPasa Rac1 podría ser, al igual que PDK1 y la familia de las PKCs, una potencial diana terapéutica que retrasara o bloqueara los efectos de la acumulación del péptido (1-42)Aβ.

Para verificar estos resultados se procedió a cuantificar la apoptosis mediante tinción combinada con ioduro de propidio y Anexina V y se analizaron las muestras por citometría de flujo, ya que ésta es una metodología más específica y precisa para cuantificar apoptosis.

Como se puede observar en la Figura 14A, el tratamiento con el péptido (1-42)Aβ a una concentración de 1,25 μM durante 24 horas produjo un incremento de la apoptosis en las células SN4741 que alcanzó así un 37,88%. Cuando las células se pretrataron con los inhibidores farmacológicos de PDK1, PKC, y Rac1, se consiguió proteger al 100% a las células del daño inducido por el péptido (1-42)Aβ, ya que la viabilidad alcanzó unos valores similares a aquellos de las células control sin tratar. Estos resultados indican que la toxicidad inducida por el péptido (1-42)Aβ en las células SN4741, se puede bloquear *in vitro* bloqueando las actividades de PDK1, PKCs y Rac1.

Este resultado, es muy importante ya que demuestra que la cascada de señalización descrita en estos experimentos interviene en la toxicidad celular inducida por el péptido (1-42)Aβ y que las moléculas implicadas en esta vía, son potenciales dianas terapéuticas que pueden proteger a las monocapas de la muerte celular inducida por el péptido (1-42)Aβ.

El hecho de que GF fuera capaz tanto de inhibir la activación de Rac1 como de proteger a las células de la toxicidad inducida por el péptido (1-42)Aβ, llevó a los inventores a descartar las PKCs atípicas como las posibles implicadas en esta cascada de señalización, ya que este inhibidor es específico de las PKCs clásicas y nuevas [Toullec D. et al. 1991 J Biol Chem 266(24):15771-81; Martiny-Baron G. et al. 1993 J Biol Chem 268(13):9194-7; Jacobson P. et al. 1995 J Pharmacol Exp Ther 275(2):995-1002; Coultrap S. et al. 1999 J Pharmacol Exp Ther 290(1): 76-82].

Por lo tanto, estos resultados indican que las PKCs implicadas pudieran ser las clásicas o las nuevas y se planteó realizar los ensayos de toxicidad por MTT con distintos inhibidores más específicos para las distintas isoformas. Para ello, se utilizó Gö 6967, un inhibidor de las PKCs clásicas, principalmente α y β; y el inhibidor Rottlerin, que inicialmente se describió como un inhibidor selectivo de la PKC nueva δ [Gschwendt, M. et al. 1994 J Neurochem 65(1):292-300], sin embargo, posteriormente se vio que también tenía efecto sobre PKC θ [Villalba M. et al. 1999 J Immunol 163(11):5813-9; Cordey and Pike 2006 J Neurochem 96(1):204-17].

El pretratamiento de las células SN4741 con concentraciones crecientes de Gö 6967, produjo un aumento en la viabilidad celular del 13% (Figura 14 B). La viabilidad aumentó de un 50,28% en las células tratadas con el péptido (1-42)Aβ hasta un 63,07%

en las células pre-tratadas con Gö 6967 (4,5 nM), sin embargo, este aumento no fue significativo según el análisis estadístico por T de Student.

A continuación, se procedió a tratar las monocapas celulares con diferentes concentraciones de Rottlerin y a determinar su efecto sobre la viabilidad celular mediante ensayos de MTT. Como puede observarse en la Figura 15, con una concentración de 1,5 μM de Rottlerin, no se apreciaba ningún efecto ni positivo, protección, ni negativo, toxicidad. En el otro extremo a una concentración de 30 μM de Rottlerin, esta concentración *per se* resultaba tóxica para las células SN4741. A concentraciones que van desde 7,5 a 15 μM se observó un efecto protector absoluto, llegando a ser la viabilidad celular la misma que las monocapas control, no tratadas. A esas concentraciones, la viabilidad pasó de un 50,28% en las células tratadas con el péptido (1-42)Aβ y a un 90-95% en las células tratadas con Rottlerin.

Para verificar estos resultados se procedió a cuantificar la apoptosis mediante tinción combinada con ioduro de propidio y Anexina V y se analizaron las muestras por citometría de flujo, ya que ésta es una metodología más específica y precisa para cuantificar apoptosis. Las células SN4741 se pre-trataron con Rottlerin 7,5 μM durante 1 hora, y posteriormente se indujo la apoptosis tratando con el péptido (1-42)Aβ (1,25 μM) durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se realizó la tinción mediante ioduro de propidio y Anexina V y la apoptosis se analizó por citometría de flujo. Como puede observarse en la Figura 16, el pre-tratamiento de las células SN4741 con el inhibidor Rottlerin, tuvo un efecto protector total frente a la apoptosis inducida por el péptido (1-42)Aβ, y la viabilidad de las células SN4741 fue completa. La apoptosis inducida por el péptido (1-42)Aβ fue de un 43,52% y mediante el pretratamiento con Rottlerin 7,5μM, esta apoptosis se redujo hasta alcanzar los niveles basales de las células sin tratamiento (15,15%).

Estos resultados confirman la implicación de las PKCs en la cascada de señalización que conduce a la muerte celular inducida por el péptido (1-42)Aβ. Una vez demostrada esta implicación, estos resultados muestran por primera vez que estas moléculas pueden ser potenciales dianas terapéuticas que sirvan para frenar o bloquear la muerte celular inducida por el péptido (1-42)Aβ.

Para consolidar este resultado y ver si Rottlerin tenía también efecto sobre la activación de Rac1 mediada por el péptido (1-42)Aβ, se procedió a realizar ensayos de

precipitación por afinidad. Para ello, se pre-trataron las células SN4741 con Rottlerin 15 μM durante 1 hora, y posteriormente se añadió péptido (1-42)Aβ (1,25 μM) durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, se procedió a realizar los ensayos de precipitación por afinidad con las proteínas de fusión que llevan el dominio CRIB de la proteína efectora Pak. La Figura 17 muestra que el pretratamiento de las células SN4741 con Rottlerin bloqueaba la activación de la GTPasa Rac1 mediada por el péptido (1-42)Aβ sugiriendo la implicación de las nuevas PKCs, en la activación de la GTPasa Rac1 inducida por el péptido (1-42)Aβ, e implicando a Rac1 en la cascada de muerte celular regulada por dicho péptido (1-42)Aβ.

Con objeto de determinar si estos resultados podían reproducirse en condiciones más fisiológicas, se procedió a estudiar los efectos de la inhibición de las nuevas PKCs en cultivos organotípicos de hipocampo y corteza entorrinal. Ambas estructuras cerebrales son vulnerables en los estadíos iniciales de la enfermedad de Alzheimer. Los cultivos organotípicos procedían de ratas de 4 días, se extrajo el cerebro y se realizaron cortes del tejido cerebral que permanecieron 7 días *in vitro*. Transcurrido ese período de tiempo, se añadió el péptido (1-42)Aβ a una concentración de 100 nM y se mantuvo con este tratamiento durante 72 horas. Los cortes de cerebro se tiñeron con ioduro de propidio, que no es permeable para las membranas de células vivas y solamente puede penetrar al interior de las células cuando la membrana celular pierde su integridad en el proceso de muerte celular. El ioduro de propidio que penetra en las células se intercala en el ADN emitiendo fluorescencia roja con un máximo a 610 nm cuando son excitadas a una longitud de onda de 540 nm. Los núcleos de las células que han perdido la integridad de su membrana, se tiñen, por tanto, con el ioduro de propidio y emiten fluorescencia que se puede visualizar, y, consecuentemente, medir y cuantificar la muerte celular. Los cultivos organotípicos de hipocampo y corteza entorrinal se trataron a 2 concentraciones diferentes del inhibidor Rottlerin: 2,5 y 7,5 μM (Figura 18).

Como se muestra en la Figura 18, una concentración de 7,5 μM de Rottlerin protege de la muerte celular inducida por el péptido (1-42)Aβ tanto en cultivos organotípicos de hipocampo como en corteza entorrinal. Estos resultados confirman, de manera más fisiológica la implicación de las nuevas PKCs en la señalización inducida por el péptido (1-42)Aβ que conduce a la muerte neuronal.

Estos resultados describen por primera vez cómo el péptido (1-42)Aβ transduce la señales de muerte celular a través de la ruta PI3Kinasa/PDK1/nuevas PKCs/Rac1/muerte neuronal, esta caracterización ha permitido proponer a PDK1, a las nuevas PKcs y a Rac1 como dianas terapéuticas para frenar el proceso de muerte neuronal dirigido por el péptido (1-42)Aβ (Figura 19).

REIVINDICACIONES

1. Uso de un inhibidor de PDK1 para producir un medicamento para el tratamiento de una enfermedad asociada a la formación de depósitos amiloideos, en donde dicho inhibidor de PDK1 es celecoxib o un derivado de celecoxib mostrado en la Tabla 1 (Grupo XI).

2. Uso según la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad asociada a la formación de depósitos amiloideos es la enfermedad de Alzheimer, la demencia asociada a los cuerpos de Lewy, al síndrome de Down, al complejo de la demencia de Guam asociada al parkinsonismo, a la hemorragia cerebral hereditaria del tipo holandés con amiloidosis, angiopatía β-amiloide y hemorragia cerebral tal como hemorragia cerebral debida a angiopatía amiloide cerebral solitaria osteomielitis, tuberculosis, fiebre mediterránea familiar, hemorragia cerebral hereditaria, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, espondilitis anquilosante, infecciones por priones, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, diabetes tipo II, enfermedad de Castleman, amiloidosis asociada al mieloma múltiple, enfermedad de Parkinson, parkinsonismo panencefalítico esclerosante subagudo, parkinsonismo posencefalítico, encefalitis pugilística, complejo parkinsonismo-demencia de Guam, enfermedad de Pick, atrofia sistémica múltiple (ASM), parálisis supranuclear progresiva (PSP) y degeneración corticobasal (DCB), síndrome de Down, enfermedad de cuerpos de Lewy, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, Kuru, enfermedad de Gersmann-Straüssler-Scheinker, amiloidosis cardiaca senil, polineuropatía familiar amiloidótica, o amiloidosis asociada a tumores endocrinos como el carcinoma medular del tiroides.

3. Uso según la reivindicación 2, en el que dicha enfermedad asociada a la formación de depósitos amiloideos es la enfermedad de Alzheimer.

4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho medicamento reduce la muerte neuronal inducida por el péptido (1-42)Aβ en el sistema nervioso central (SNC).

5. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho inhibidor de PDK1 se usa combinado con otro fármaco útil para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

6. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho inhibidor de PDK1 está presente en un vehículo de administración de fármacos farmacéuticamente aceptable.

7. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el inhibidor de PDK1 es 2-amino-N-(4-(5-(2-fenantrenil)-3-(trifluorometil)-1H- pirazol-1-il)fenil)acetamida (OSU-03012).

8. Un método para la identificación de un compuesto capaz de inhibir la muerte celular inducida por depósitos amiloideos para el tratamiento de enfermedades asociadas a la formación de depósitos amiloideos, que comprende:

a) poner en contacto una célula con una proteína amiloidea;
b) poner las células resultantes de a) con un compuesto candidato; y
c) determinar en dicha célula los niveles de activación de PDK1,

en donde si los niveles de activación de PDK1 en la célula después de haber sido tratada con un compuesto candidato son menores que antes del tratamiento, el compuesto candidato es capaz de inhibir la muerte celular neuronal inducida por proteínas amiloideas y útil para el tratamiento de enfermedades asociadas a la formación de depósitos amiloideos.

9. Método según la reivindicación 8, en el que dichas enfermedades son enfermedades asociadas a la formación de depósitos amiloideos del péptido beta amiloide y la proteína amiloidea es un péptido beta amiloide.

10. Método según la reivindicación 9, en el que el péptido beta amiloide es el péptido (1-42)Aβ.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que, adicionalmente, se determinan los niveles de muerte celular o viabilidad del cultivo.

Figura 1

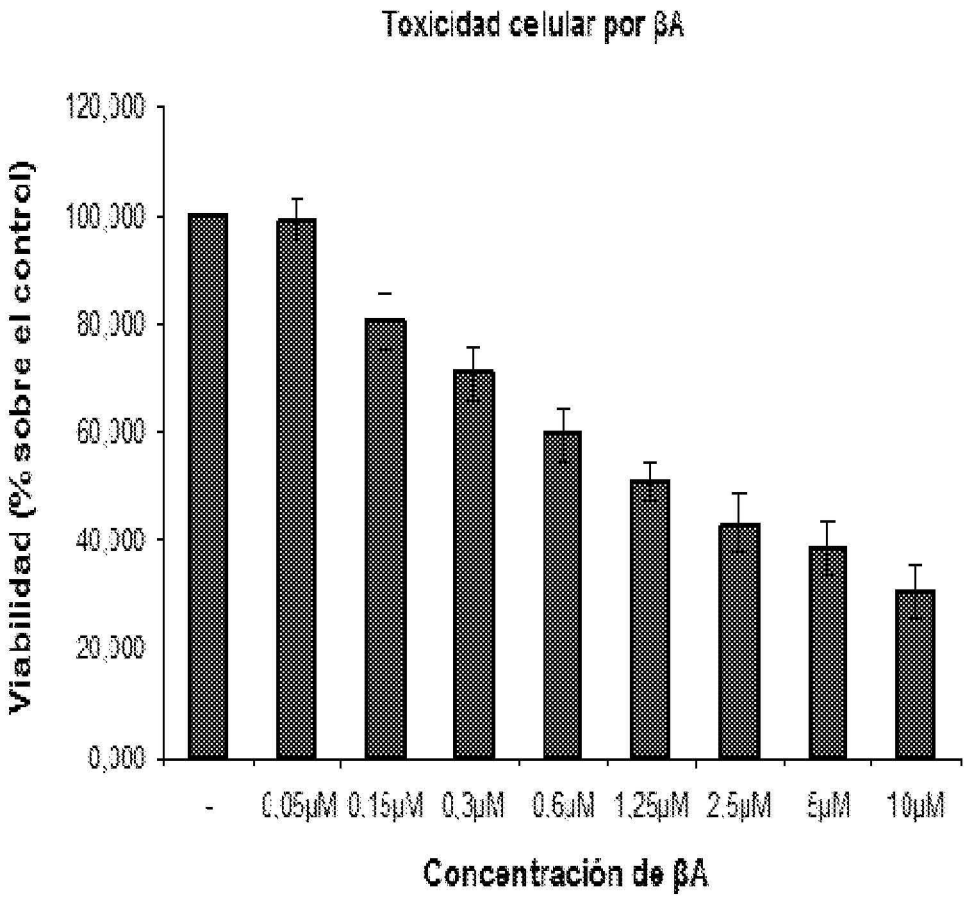

Toxicidad celular por βA
Viabilidad (% sobre el control)
120,000
100,000
80,000
60,000
40,000
20,000
0,000
-
0,05μM
0,15μM
0,3μM
0,6μM
1,25μM
2,5μM
5μM
10μM
Concentración de βA

Figura 2

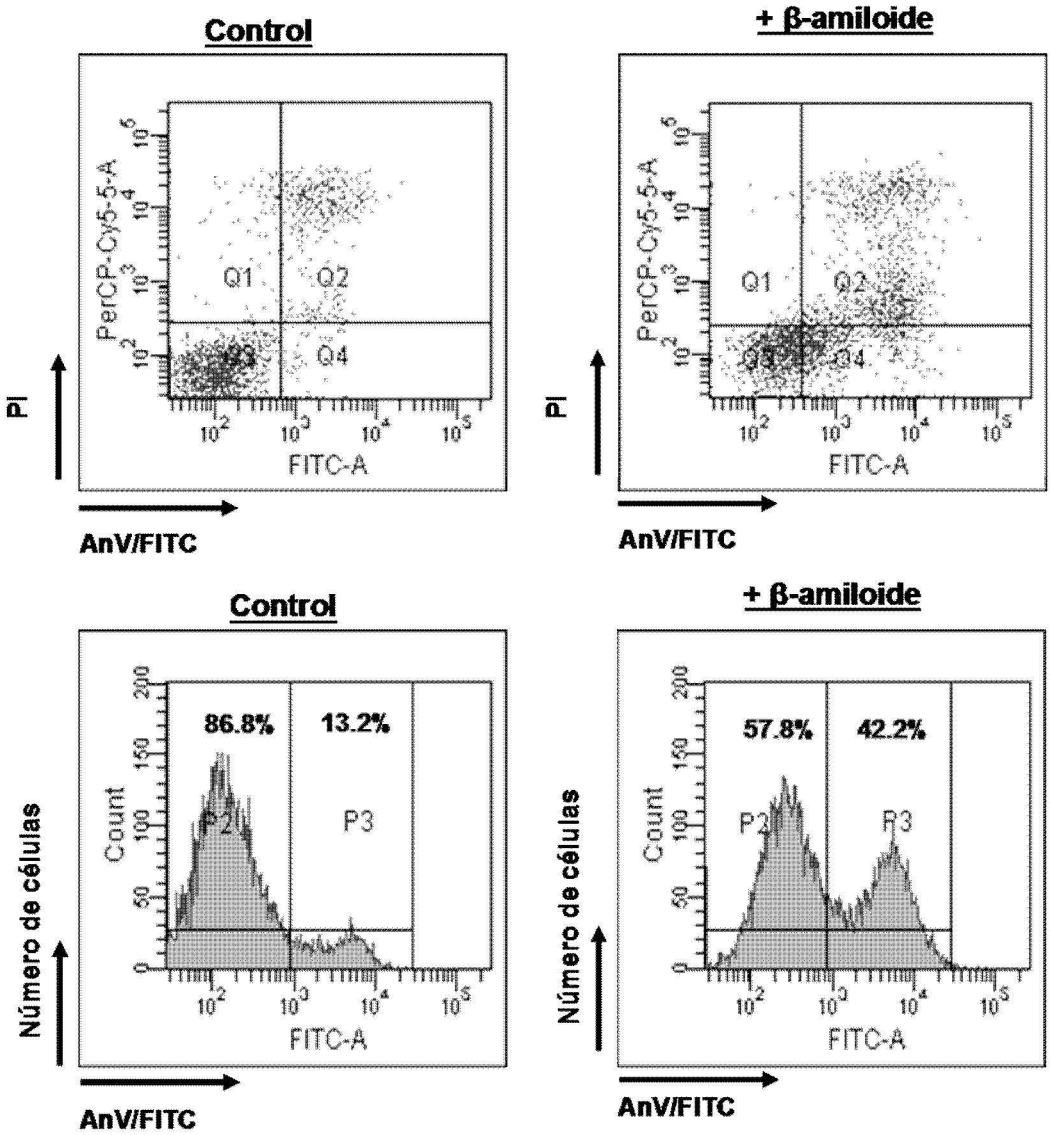

Control
+ β-amiloide
PerCP-Cy5-5-A
FITC-A
PI
AnV/FITC
Q1
Q2
Q3
Q4
Control
+ β-amiloide
Número de células
Count
86.8%
13.2%
57.8%
42.2%
P2
P3
AnV/FITC

Figura 3

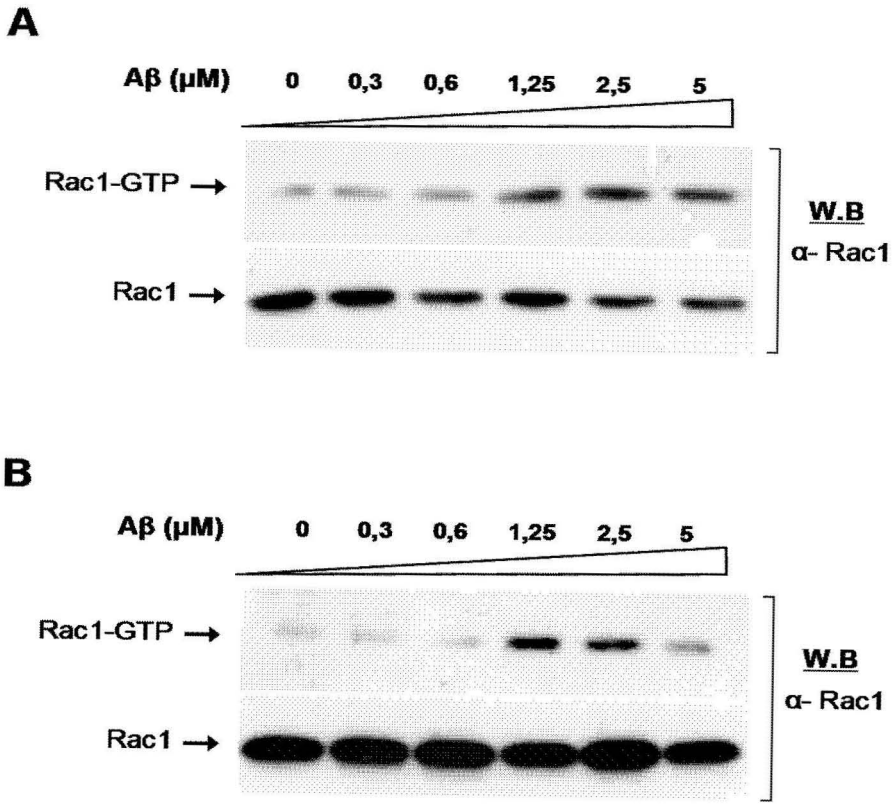

A
Aβ (μM)
0
0,3
0,6
1,25
2,5
5
Rac1-GTP
Rac1
W.B
α- Rac1
B
Aβ (μM)
0
0,3
0,6
1,25
2,5
5
Rac1-GTP
Rac1
W.B
α- Rac1

Figura 4

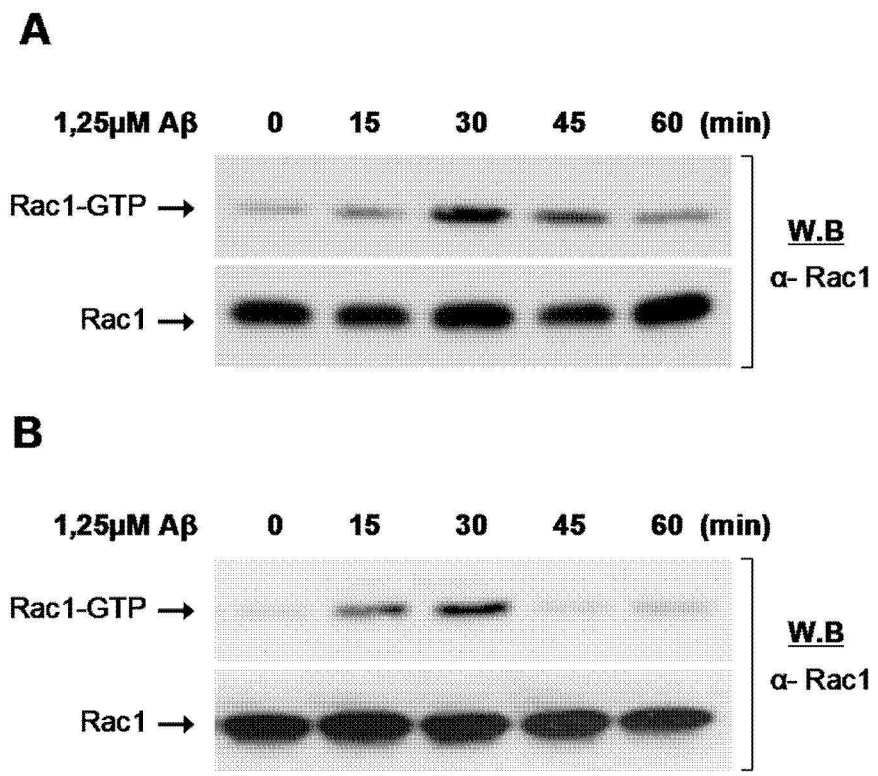

A
1,25μM Aβ
0
15
30
45
60 (min)
Rac1-GTP
Rac1
W.B
α- Rac1
B
1,25μM Aβ
0
15
30
45
60 (min)
Rac1-GTP
Rac1
W.B
α- Rac1

Figura 5

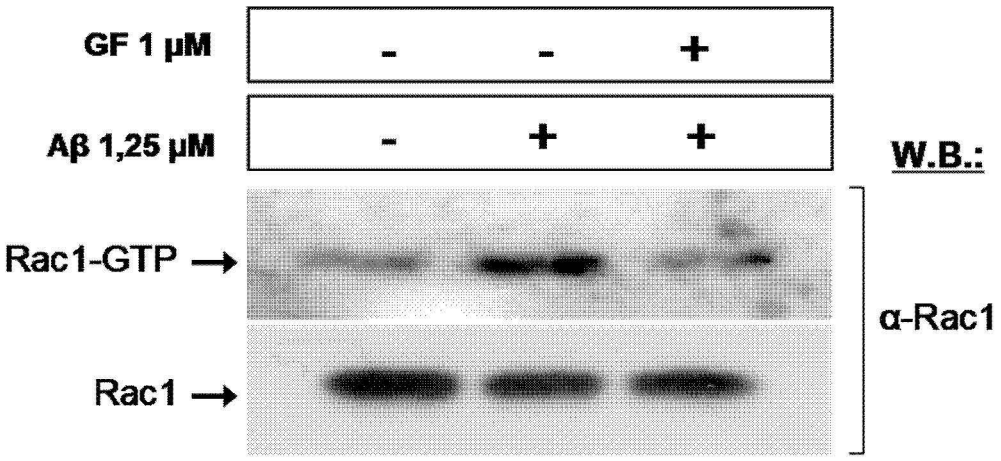


Figura 6

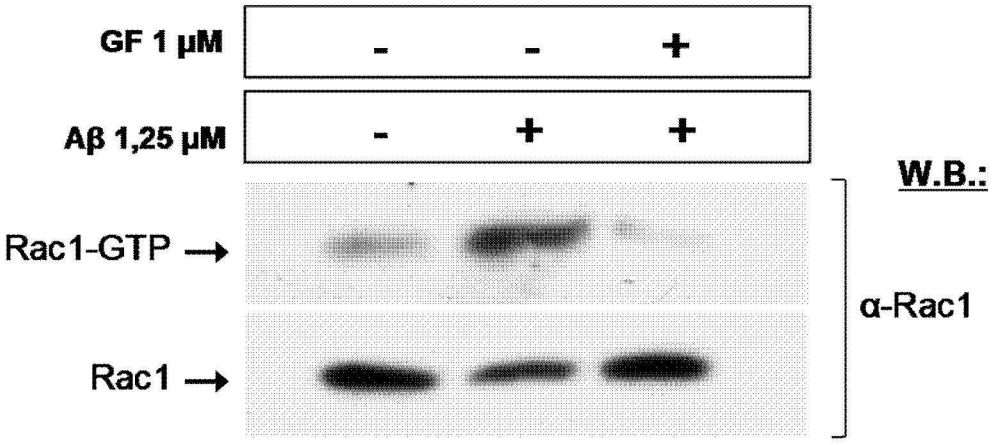


Figura 7

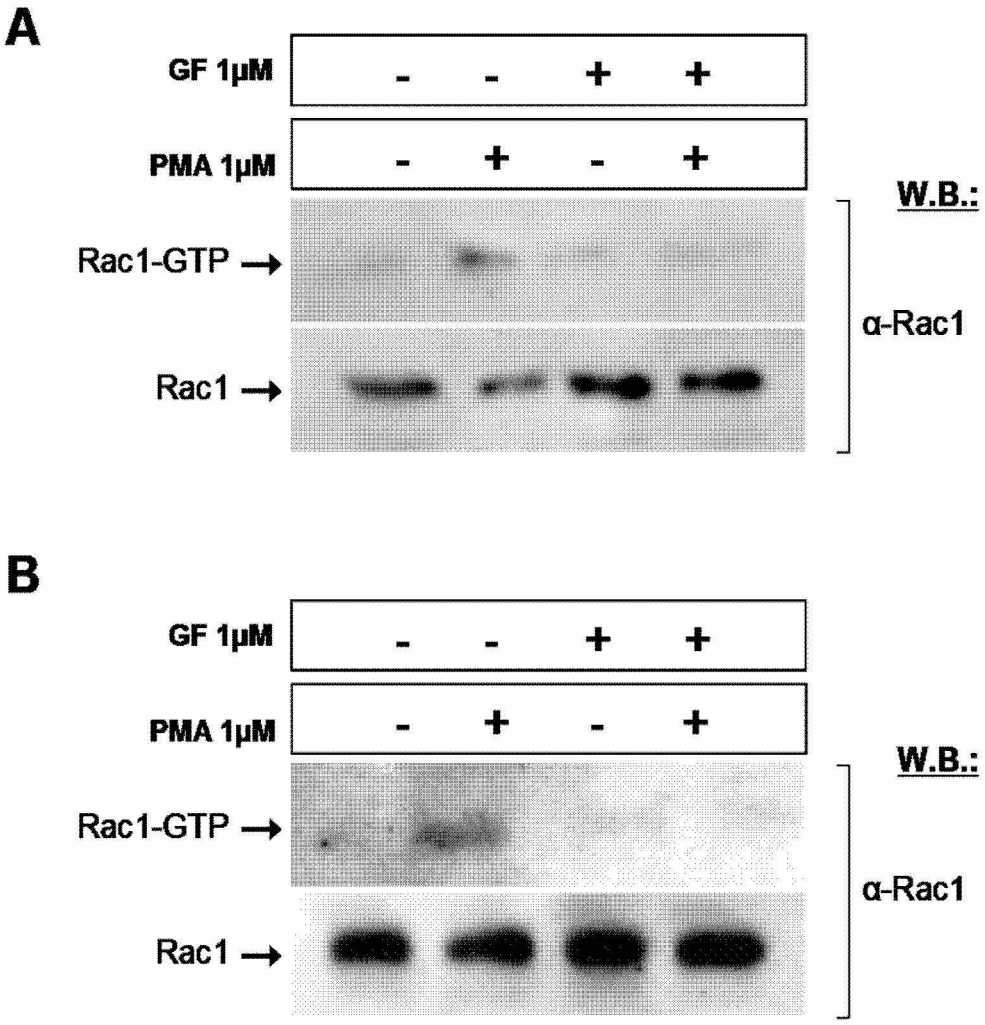

A
GF 1μM
- - + +
PMA 1μM
- + - +
W.B.:
Rac1-GTP
α-Rac1
Rac1
B
GF 1μM
- - + +
PMA 1μM
- + - +
W.B.:
Rac1-GTP
α-Rac1
Rac1

Figura 8

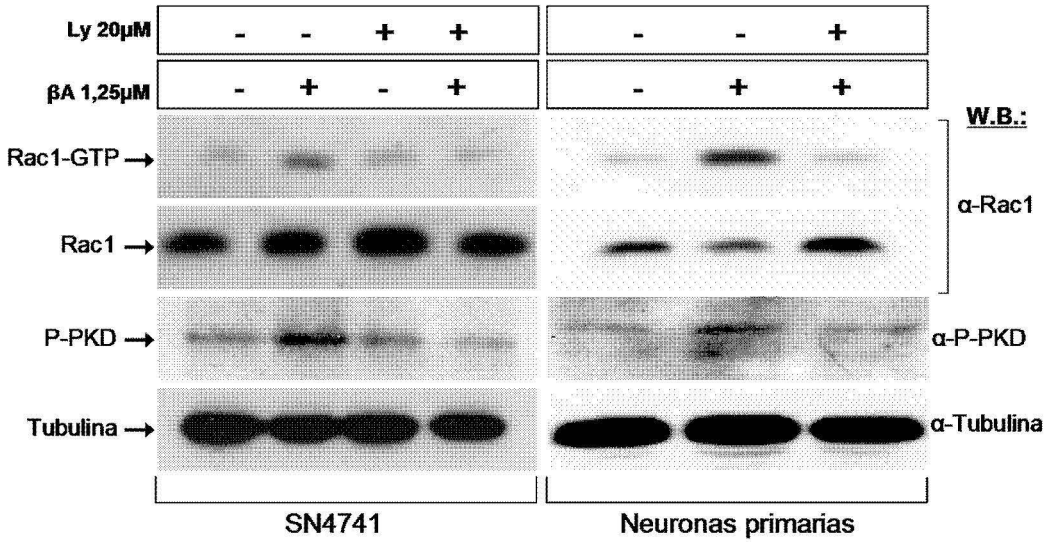


Figura 9

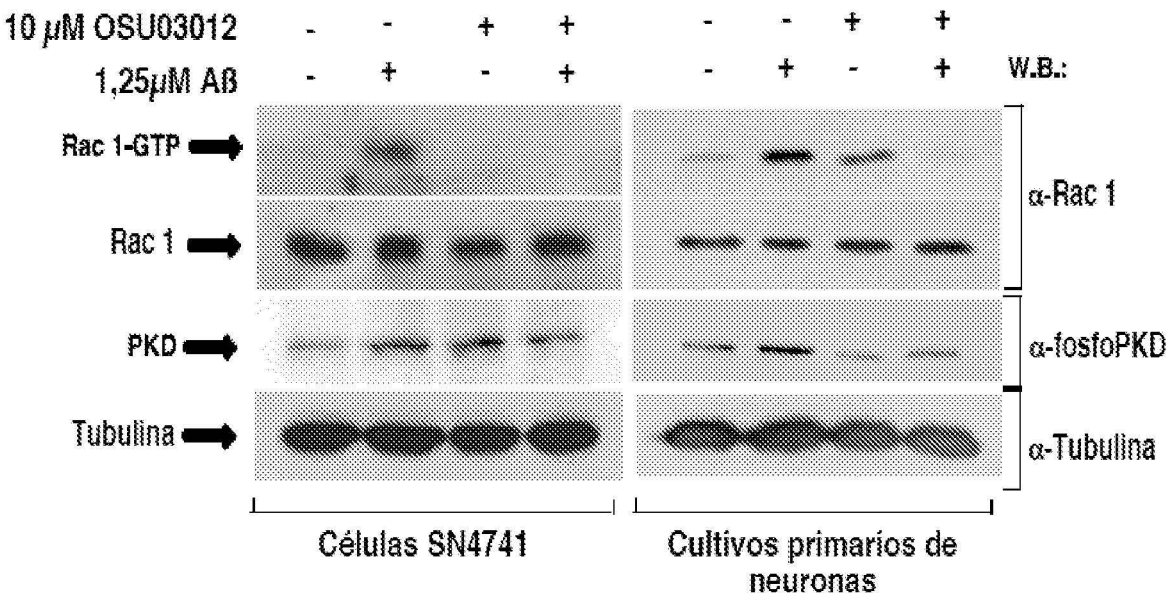


Figura 10

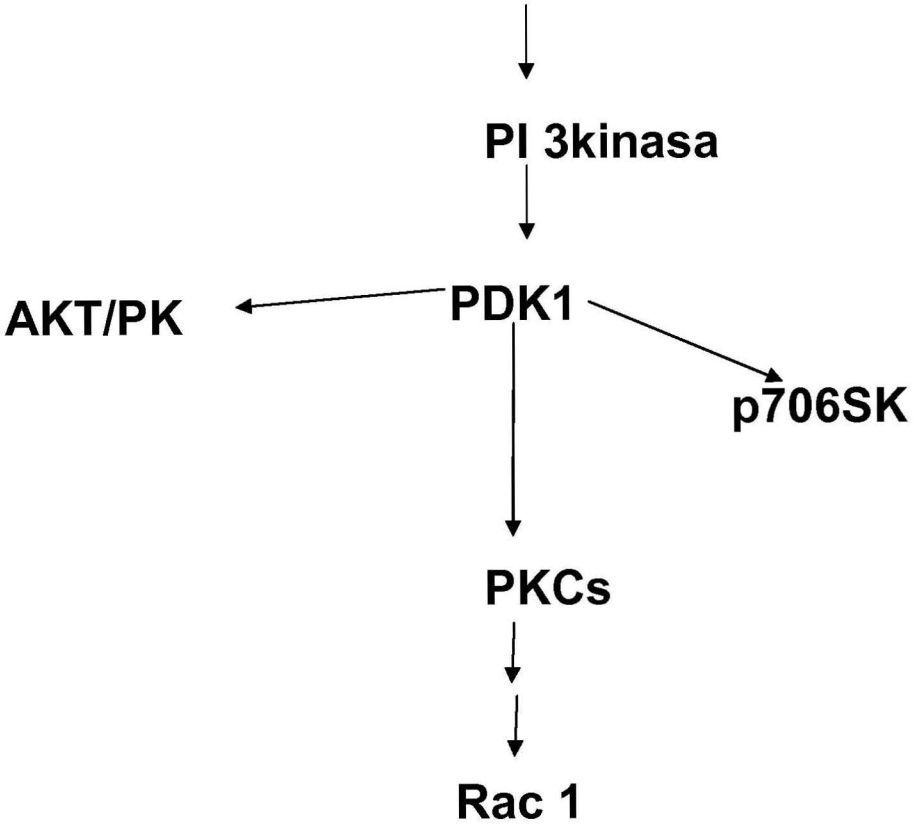


Figura 11

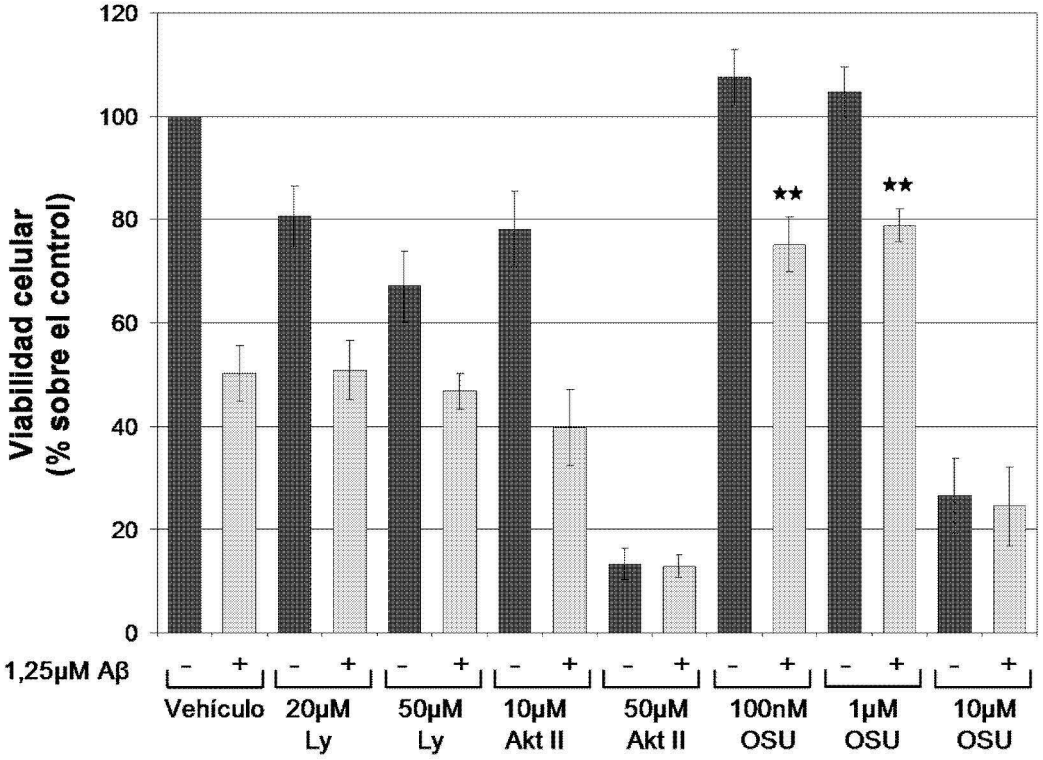


Figura 12

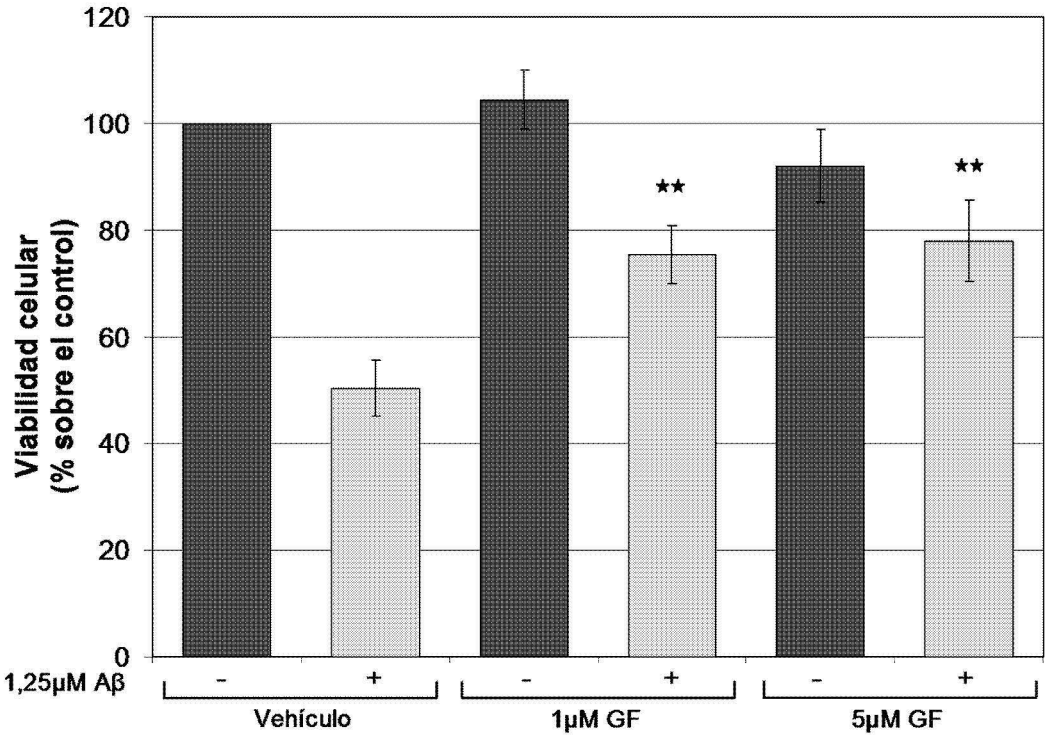


Figura 13

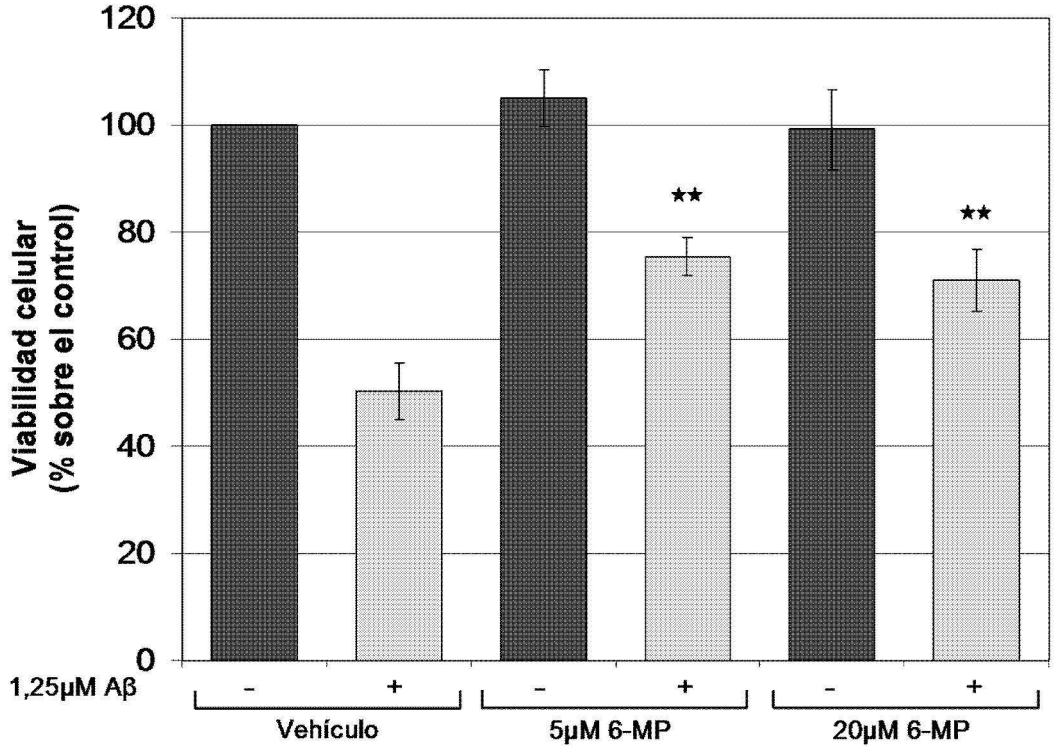
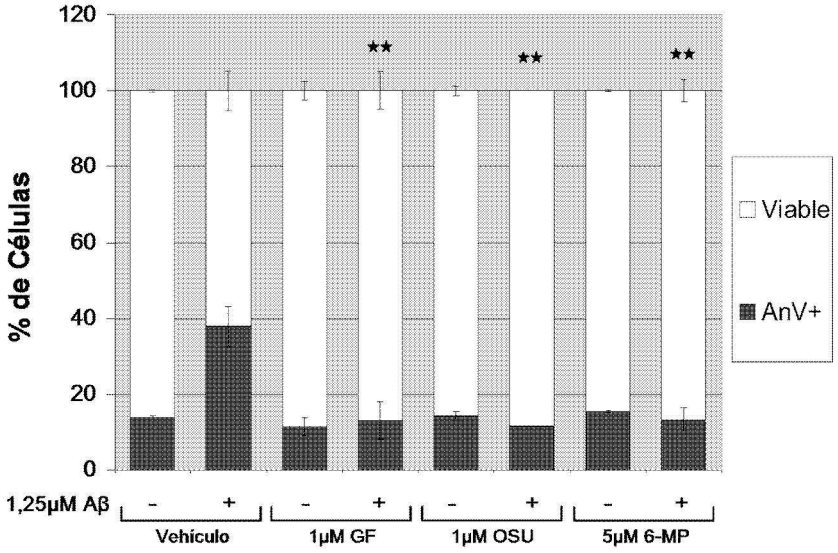

Viabilidad celular
(% sobre el control)
120
100
80
60
40
20
0
**
**
1,25µM Aβ
-
+
-
+
-
+
Vehículo
5µM 6-MP
20µM 6-MP

Figura 14

A


120
100
80
60
40
20
0
% de Células
★★
★★
★★
Viable
AnV+
1,25μM Aβ
-
+
-
+
-
+
-
+
Vehículo
1μM GF
1μM OSU
5μM 6-MP

B

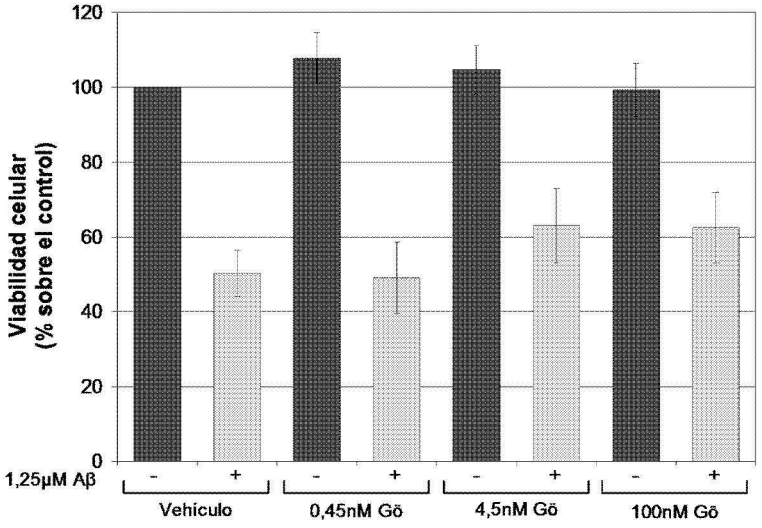

120
100
80
60
40
20
0
Viabilidad celular
(% sobre el control)
1,25μM Aβ
-
+
-
+
-
+
-
+
Vehículo
0,45nM Gö
4,5nM Gö
100nM Gö

Figura 15

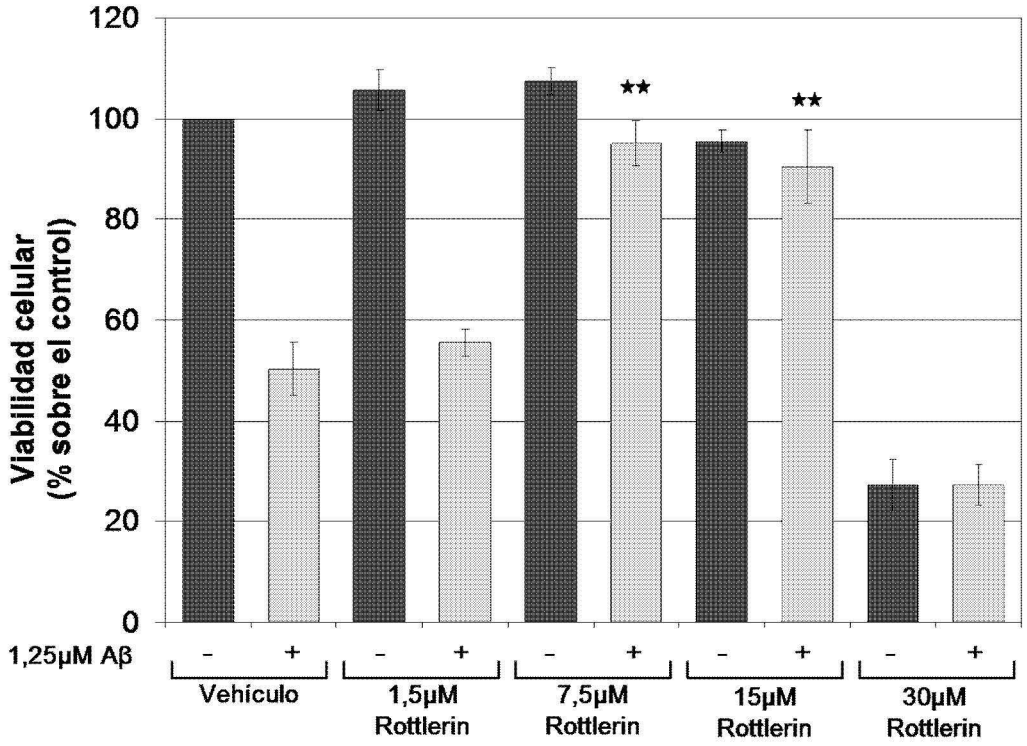


Figura 16

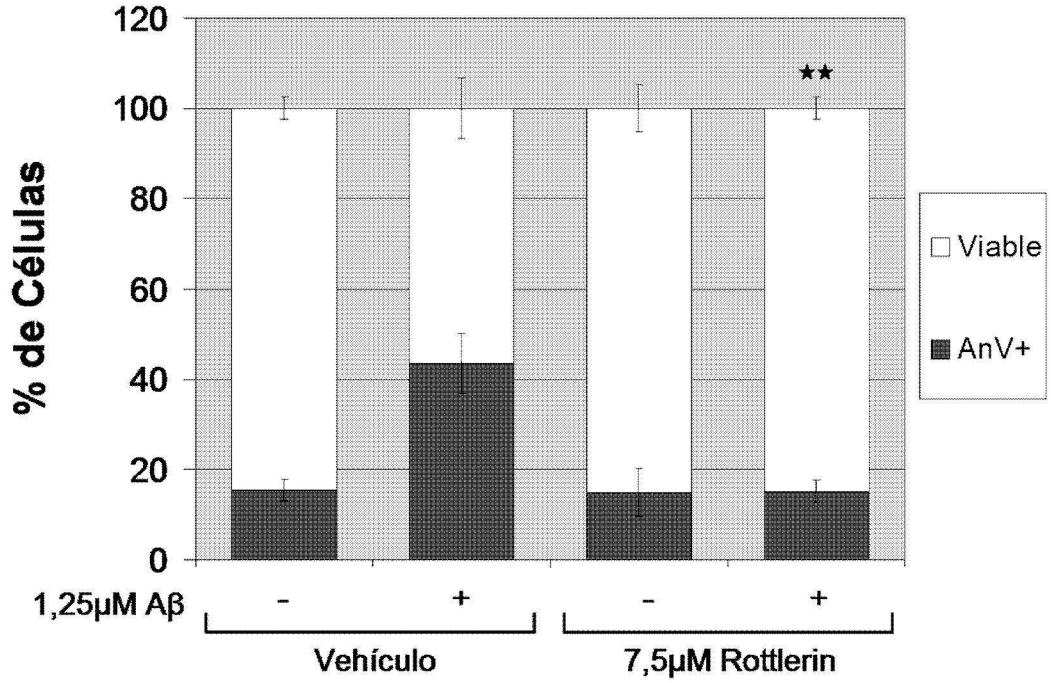


Figura 17

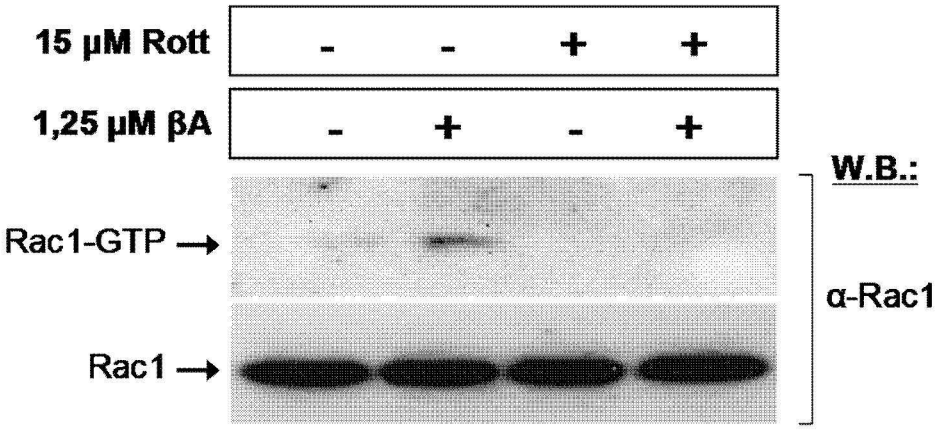


Figura 18

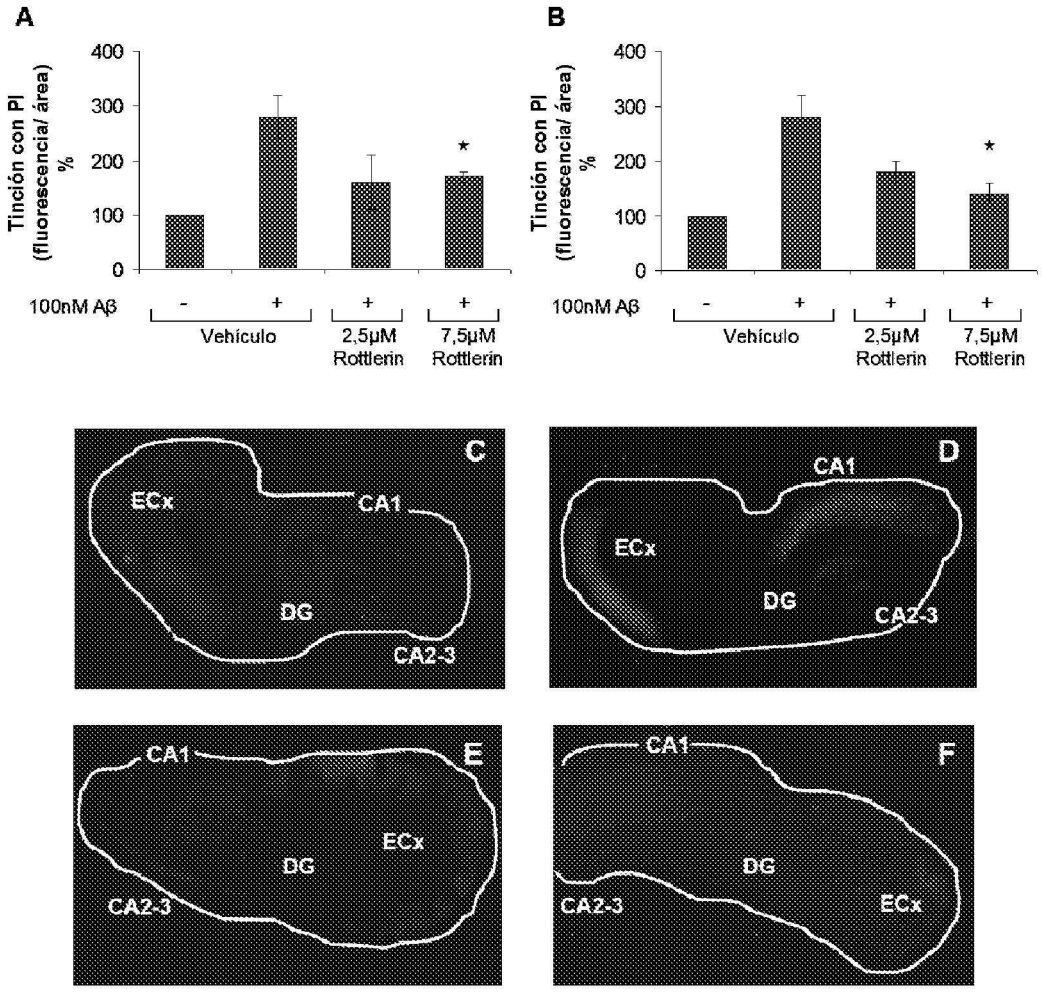
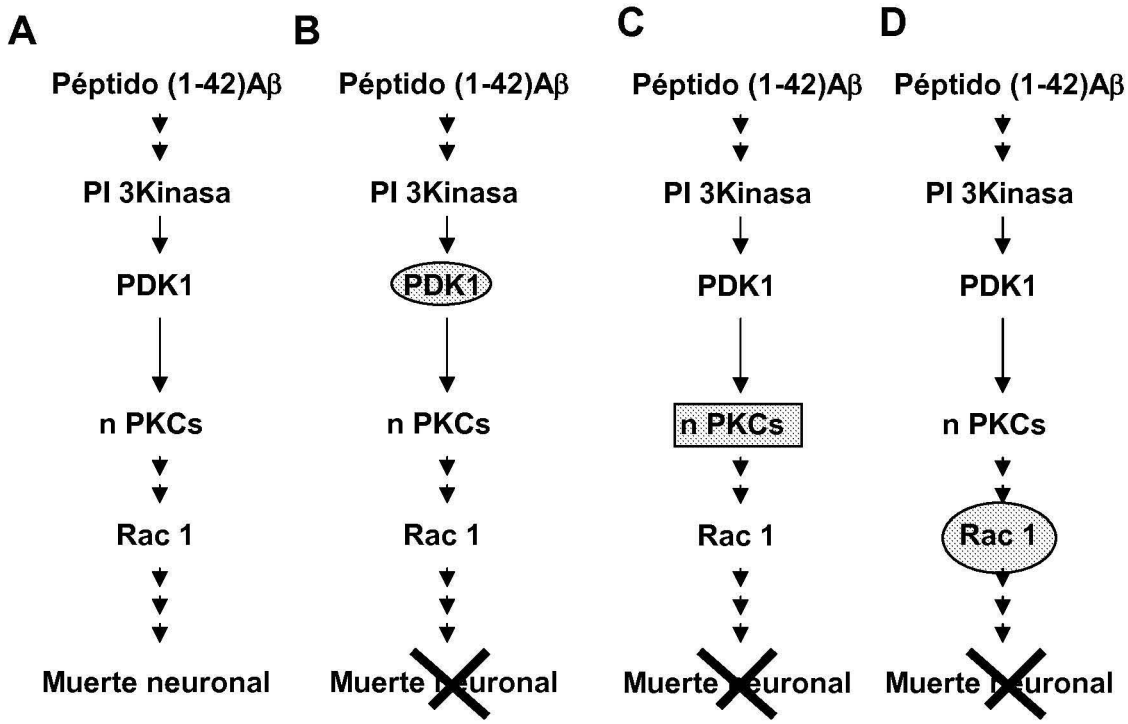


Figura 19


A
Péptido (1-42)Aβ
PI 3Kinasa
PDK1
n PKCs
Rac 1
Muerte neuronal
B
Péptido (1-42)Aβ
PI 3Kinasa
PDK1
n PKCs
Rac 1
C
Péptido (1-42)Aβ
PI 3Kinasa
PDK1
n PKCs
Rac 1
D
Péptido (1-42)Aβ
PI 3Kinasa
PDK1
n PKCs
Rac 1

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201030266

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 25.02.2010

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***A61K31/415*** (2006.01)
A61P25/28 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) **Documentos citados**	**Reivindicaciones afectadas**
X	JANG J-H. et al. β-amyloid-induced apoptosis is associated with cyclooxygenase-2 up-regulation via the mitogen-activated protein kinase-NF-κB signaling pathway. Free Radical Biology & Medicine. 24.03.2005, Vol. 38, páginas 1604-1613, todo el documento.	1-11
A	LEE T. X. et al. Growth inhibitory and anti-tumour activities of OSU-03012, a novel PDK-1 inhibitor, on vestibular schwannoma and malignant schwannoma cells. European Journal of Cancer. 07.04.2009, Vol. 45, páginas 1709-1720, todo el documento.	1-11
A	WO 2008003766 A2 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH) 10.01.2008, todo el documento.	1-11
A	US 20090197889 A1 (WINFIELD) 06.08.2009, todo el documento.	1-11
A	WO 2006125539 A2 (BAYER HEALTHCARE AG) 30.11.2006, todo el documento.	1-11

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	**Examinador**	**Página**
28.06.2012	M. Cumbreño Galindo	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, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.06.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones		**SI**
	Reivindicaciones	1-11	**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones		**SI**
	Reivindicaciones	1-11	**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	JANG J-H. et al. Free Radical Biology & Medicine. Vol. 38, páginas 1604-1613	24.03.2005
D02	LEE T. X. et al. European Journal of Cancer. Vol. 45, páginas 1709-1720	07.04.2009
D03	WO 2008003766 A2	10.01.2008
D04	US 20090197889 A1	06.08.2009
D05	WO 2006125539 A2	30.11.2006

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 invención tiene por objeto el uso de celecoxib y sus derivados para producir un medicamento para el tratamiento de una enfermedad asociada a la formación de depósitos amiloideos, en concreto la enfermedad de Alzheimer, así como un método para identificar compuestos capaces de inhibir la muerte celular inducida por depósitos amiloideos (reivindicaciones de la 1 a la 11).

D01 investiga los mecanismos moleculares de la muerte celular inflamatoria inducida por el péptido β-amiloide (Aβ) el cual se acumula en las placas seniles que se forman en los cerebros de pacientes con Alzheimer (AD).

D02 explica que OSU-03012 es un nuevo derivado del inhibidor de COX-2 denominado celecoxib (Celebrex^{TM}). OSU-03012 induce la apoptosis de diversos tipos de células cancerosas mediante la inhibición de la enzima PDK-1.

D03 divulga nuevos compuestos inhibidores de PDK1 así como su uso para preparar un medicamento para el tratamiento del cáncer, infecciones y enfermedades autoinmunes e inflamatorias como la enfermedad de Alzheimer.

D04 anticipa el uso de inhibidores de PDK1 en el tratamiento de neoplasias y de enfermedades inflamatorias como son las amiloidosis. Entre los compuestos mencionados se encuentra celecoxib y un derivado suyo denominado OSU-03013.

D05 divulga composiciones farmacéuticas para el tratamiento del cáncer y de otras enfermedades como las enfermedades autoinmunes o el Alzheimer que contienen diaril urea y un inhibidor de la ruta PI3K/AKT, pudiéndose emplear entre estos últimos celecoxib, OSO-03012 o OSU-03013.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

D01 investiga los mecanismos moleculares de la muerte celular inflamatoria inducida por el péptido β-amiloide (Aβ) el cual se acumula en las placas seniles que se forman en los cerebros de pacientes con Alzheimer (AD). En dichos cerebros COX-2 está sobreexpresada, hecho que se asocia al depósito de Aβ y posterior estímulo de la respuesta inmune asociada a la neuropatofisiología de AD. Así, en las células PC12 tratadas con Aβ mostraban un incremento en el mRNA y la expresión proteica de COX-2 mientras que el tratamiento con celecoxib, un inhibidor selectivo de COX-2, disminuía la muerte celular inducida por Aβ.

En consecuencia, las características de las reivindicaciones 1 a 11 ya son conocidas por lo que esas reivindicaciones no se pueden considerar nuevas a la vista del estado de la técnica ni, por tanto, presentan actividad inventiva.