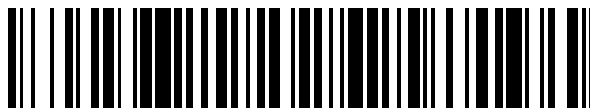


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 752 274**

21 Número de solicitud: 201830955

51 Int. Cl.:

**A61P 25/16** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

**A61K 31/7068** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2008.01)

**G01N 33/15** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**03.10.2018**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**03.04.2020**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE MÁLAGA (60.0%)**

**Avda. Cervantes, 2**

**29071 Málaga ES y**

**UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE (40.0%)**

72 Inventor/es:

**ROYO SÁNCHEZ-PALENCIA, José Luis;**

**SÁNCHEZ IBÁÑEZ, Mireya;**

**VIVAR RÍOS, Carlos;**

**BROKATE LLANOS, Ana María y**

**MUÑOZ RUIZ, Manuel Jesús**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **RRM2B COMO DIANA TERAPÉUTICA EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS**

57 Resumen:

RRM2B como diana terapéutica en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Particularmente, la presente invención hace referencia a la inhibición del gen RRM2B, o de la actividad de la enzima codificada por el mismo, para ser usada en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

ES 2 752 274 A1

## DESCRIPCIÓN

### RRM2B COMO DIANA TERAPÉUTICA EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

#### CAMPO DE LA INVENCION

5

La presente invención está comprendida dentro del campo médico. Particularmente, la presente invención hace referencia a la inhibición del gen RRM2B, o de la actividad de la enzima codificada por el mismo, para ser usada el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

#### ESTADO DE LA TÉCNICA

10

##### Gen RRM2B

El gen RRM2B codifica en humanos para la subunidad M2 B de la ribonucleósido-difosfato reductasa. El gen RRM2B se localiza en el cromosoma 8, posición 8q23.1. El gen RRM2B se describe en detalle en las siguientes bases de datos: Entrez Gene: 50484, Ensembl: ENSG00000048392, OMIM: 604712 o UniProtKB: Q7LG56.

15

##### Análogos de nucleósidos

Un nucleósido es una molécula monomérica orgánica que integra las macromoléculas de ácidos nucleicos que resultan de la unión covalente entre una base nitrogenada con una pentosa, que puede ser ribosa o desoxirribosa. Ejemplos de nucleósidos son la citidina, uridina, adenosina, guanosina, timidina y la inosina. Los análogos de nucleósidos son nucleósidos que contienen un análogo de ácido nucleico y un azúcar.

20

A modo de ejemplo, entre los análogos de nucleósidos se incluyen los siguientes:

- Análogos de desoxiadenosina: didanosina o vidarabina.
- Análogos de adenosina: BCX4430.
- Análogos de desoxicitidina: citarabina, gemcitabina, emtricitabina, lamivudina o zalcitabina.
- Análogos de guanosina y desoxiguanosina: abacavir, aciclovir o entecavir.
- Análogos de timidina y desoxitimidina: estavudina, telbivudina o zidovudina.
- Análogos de desoxiuridina: idoxuridina o trifluridina.

25

- De forma particular, dentro de los análogos de desoxicitidina se encuentra gemcitabina. La gemcitabina (número CAS: 95058-81-4) (fórmula  $C_9H_{11}N_3F_2O_4$ ), es un medicamento que se utiliza como agente quimioterápico para el tratamiento de distintos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga y cáncer de mama. Se está investigando su utilidad para otros tumores como el cáncer de esófago y los linfomas. Ha sido comercializado con el nombre de Gemzar por la empresa Eli Lilly and Company. Se administra por vía intravenosa a una dosis de 1-1,2 g/m<sup>2</sup>. Puede utilizarse asociado al carboplatino con buenos resultados en el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico.
- 10 La gemcitabina es una molécula de pequeño tamaño, aprobada como medicamento por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) en 1996.

### Enfermedades neurodegenerativas

- Las enfermedades neurodegenerativas cubren un tipo de enfermedades que agrupa a un género de desórdenes cognitivos, tales como, enfermedad de Alzheimer, Huntington o Parkinson. Estos trastornos cognitivos se deben a un aumento en los procesos de muerte celular, reduciendo el número de neuronas y generando cambios en la conducta. Actualmente, se revisan diversas hipótesis como posibles causas de estas enfermedades. Dentro de estas ideas, se destacan las enfermedades asociadas al mal plegamiento proteico "missfolding diseases" que originaría la muerte neuronal exacerbada por alteraciones de proteínas claves en la función y arquitectura. Las enfermedades neurodegenerativas afectan varias actividades que el cuerpo realiza, como el equilibrio, movimiento, hablar, respirar y funciones del corazón. Muchas de estas enfermedades tienen un origen genético, aunque se cree que también pueden ser causadas por el alcoholismo, un tumor o un ataque cerebrovascular (ACV). Otras causas incluyen toxinas, químicos y virus. Otras veces, las causas se desconocen.

- Uno de los aspectos más interesantes que vinculan la etiología molecular de las enfermedades neurodegenerativas recae en la afectación de las mitocondrias. Estas son orgánulos presentes en todas las células, las cuales producen aproximadamente el 90% del adenosín-trifostato (ATP) intracelular. Los desequilibrios en el metabolismo mitocondrial se han asociado tanto a la enfermedad de Alzheimer como a las enfermedades de Huntington y Parkinson. El péptido  $\beta A$  (beta-amiloide) por ejemplo, ejerce un efecto deletéreo sobre el complejo IV de la

cadena de transporte de electrones, lo que se traduce en una disminución de los niveles de ATP. De igual forma, existen evidencias de una disfunción de la actividad del complejo I vinculado a la enfermedad de Parkinson. Tanto es así que el uso de inhibidores del complejo I como por ejemplo la Rotenona o el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidrodeopirina (MPTP) causan la degeneración de las células dopaminérgicas de la sustancia nigra lo cual es una forma habitual de generar los modelos animales de Parkinson. En lo que respecta a la enfermedad de Huntington, el modelo mutante de Huntingtina (Htt) genera igualmente un declive de la respiración mitocondrial afectando particularmente el complejo II lo que se traduce en una pérdida de la capacidad de generar ATP [*Correia SC et al. Mitochondrial importance in Alzheimer's, Huntington's and Parkinson's diseases. Adv Exp Med Biol. 2012;724:205-21*].

Particularmente, la enfermedad de Alzheimer es reconocida como uno de los problemas médico-sociales más importantes que afecta a nuestra sociedad y cuyo tratamiento es, hasta la fecha, fundamentalmente sintomático. La enfermedad de Alzheimer causa una demencia progresiva que actualmente se estima afecta a más de 44 millones de personas en todo el mundo, su incidencia se estima se duplique en 2030 y triplique para 2050. Actualmente, se usan dos tipos de medicamentos para tratar los síntomas cognitivos: inhibidores de la colinesterasa (Donepezil, Galantamina y Rivastigmina) y los antagonistas del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) como la Memantina. Los inhibidores de colinesterasa favorecen los niveles de comunicación interneuronal al aumentar los niveles de acetilcolina, la cual se agota en el Sistema Nervioso Central debido a la enfermedad. Estos fármacos mejoran habitualmente los síntomas neuropsiquiátricos, como la agitación o la depresión que aparecen durante la evolución de la enfermedad. Por otro lado, la Memantina ralentiza la progresión de los síntomas. Ésta funciona como antagonista no competitivo de baja afinidad en los receptores NMDA glutamatérgicos. Al unirse al receptor NMDA con una afinidad mayor que los iones  $Mg^{2+}$ , la Memantina puede inhibir el flujo prolongado de iones  $Ca^{2+}$  de los receptores extrasinápticos, que forman la base de la excitotoxicidad neuronal. En ocasiones, también se usan otros medicamentos tales como antidepresivos, para ayudar a controlar los síntomas conductuales. Sin embargo, cabe resaltar que los tratamientos actuales, aunque mejoran la calidad de vida del paciente y su entorno cercano durante un tiempo, no modifican de forma efectiva el deterioro cognitivo que acompaña la evolución de la enfermedad.

La enfermedad de Alzheimer tiene un origen multifactorial, aunque con una carga genética significativa. Alrededor del 1% de los casos pertenecen a la forma familiar, la cual sigue un

modelo autosómico dominante. La etiología molecular en la mayoría de estos casos se basa en mutaciones en el gen que codifica para la Proteína Precursora Amiloide (APP) o en los genes presenilinas 1 y 2. Sin embargo, más del 90% de los casos se denominan 'esporádicos' o de aparición tardía, en los que factores genéticos y ambientales interactúan para desencadenar la enfermedad. El factor de riesgo genético más conocido en estos casos es la presencia del alelo  $\epsilon 4$  del gen de la apolipoproteína E (APOE), aunque las redes bioquímicas que afectan a la enfermedad de Alzheimer comprometen un amplio espectro de vías metabólicas. El progreso más relevante sobre los mecanismos y las vías subyacentes de la enfermedad de Alzheimer proviene de estudios masivos y exhaustivos sobre los factores genéticos que condicionan la aparición de la enfermedad. Estos trabajos suelen utilizar técnicas moleculares de alto rendimiento junto con análisis de redes que implican enfoques integrales. Estos requieren técnicas de biología de sistemas y computacionales para revelar nuevos *loci* que finalmente se traduzcan en rutas bioquímicas cuya condición no fisiológica puede desencadenar la enfermedad. Estos trabajos ilustran la existencia de un alto número de actores todos ellos relevantes en el mantenimiento correcto de la función de las células del Sistema Nervioso Central y su conectividad sináptica. Estos incluyen la acumulación anormal de  $\beta A$  y tau como oligómeros, placas neuríticas y marañas neurofibrilares que alteran la función neuronal, con agregados de tau que desestabilizan los microtúbulos y el transporte axonal y comprometen la función sináptica. Los agregados de  $\beta A$  inducen la proliferación y activación de astrocitos y microglia, lo que conduce a la producción de citocinas neurotóxicas y especies reactivas de oxígeno. La endocitosis inducida por  $\beta A$  conlleva un aumento del tráfico de calcio y la reabsorción alterada de glutamato por los astrocitos conduce a la disfunción sináptica. Además, los  $\beta A$  activan caspasas a través de varias vías que incluyen la activación de las calpaínas y un daño mitocondrial que lleva a la apoptosis neuronal.

Los enfoques de biología de sistemas se están desarrollando y refinando continuamente para el análisis de datos complejos, partiendo de datos ómicos y usando herramientas integradoras de análisis de respuestas dinámicas y modulares. Estos abordajes proporcionan nuevos conocimientos sobre los mecanismos y las rutas subyacentes a la enfermedad de Alzheimer, los cuales se espera que catalicen el desarrollo de fármacos que sean auténticos modificadores del curso de la enfermedad. Y es que, durante la última década, la productividad en investigación y desarrollo farmacéutico ha disminuido dramáticamente. En este aspecto, la enfermedad de Alzheimer representa una de las mayores necesidades no satisfechas en medicina. La alta tasa de fracaso para el desarrollo de medicamentos para la

enfermedad de Alzheimer se atribuye principalmente a la falta de predecir la seguridad y eficacia de los fármacos candidatos antes a las pruebas en humanos. Esto ha hecho que algunas empresas farmacéuticas de referencia cierren esta línea de trabajo. Bajo este escenario crítico, las estrategias de reposicionamiento de fármacos se presentan como una solución factible para superar estos desafíos industriales y médicos, debido a sus menores requerimientos de inversión en términos de tiempo y costos.

### Reposicionamiento de fármacos

El reposicionamiento de fármacos se define como la reutilización de medicamentos y compuestos conocidos para una nueva indicación terapéutica. Esta estrategia tiene varias ventajas sobre el enfoque tradicional de descubrimiento de nuevos medicamentos, fundamentalmente por el menor coste en I+D+i preclínico y el menor tiempo para la aprobación por parte de la FDA y la Agencia Europea del Medicamento (EMA) ya que se reducen sustancialmente el riesgo de efectos adversos mediante el uso de los datos farmacocinéticos, toxicológicos y de seguridad existentes de la primera indicación. En lo que respecta a la enfermedad de Alzheimer, algunos autores han insistido especialmente en que el reposicionamiento de fármacos es una estrategia muy atractiva que debe ser activamente perseguida. Si bien los estudios genéticos han proporcionado nuevos conocimientos sobre la etiología molecular de la enfermedad de Alzheimer, el uso práctico de la gran cantidad de los datos de los GWAS (Rastreo Completo del Genoma) es aún escaso. Existen hasta la fecha algunos candidatos en distintos niveles de ensayo, como la Rosiglitazona usada inicialmente en Diabetes tipo II, el antihipertensivo Telmisartán, antiinflamatorios como el ácido cromoglicólico en combinación con ibuprofeno, u otros fármacos como el ácido Valproico (anticonvulsivo) o el azul de metileno (antimicótico). Sin embargo, su efectividad tiene aún que ser demostrada en ensayos clínicos por lo que la búsqueda de más y mejores alternativas farmacológicas para tratar la enfermedad de Alzheimer debe continuar de forma sistemática.

La presente invención se centra en resolver los problemas técnicos arriba explicados, y se dirige al reposicionamiento de fármacos y a la búsqueda de posibles nuevas moléculas que puedan ser eficazmente usadas en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer, Huntington o Parkinson.

En este sentido, cabe destacar que no se ha localizado en el estado de la técnica ningún documento donde se evidencie experimentalmente el uso de análogos de nucleósidos, particularmente gemcitabina, para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas,

particularmente la enfermedad de Alzheimer. Por otro lado, no se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento donde se divulgue el gen RRM2B, y su potencial uso como diana terapéutica en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer. El documento de patente W02017017148 divulga la posibilidad de  
5 tratar trastornos neurodegenerativos, particularmente el Alzheimer, mediante el uso de curcumina o de su combinación con paclitaxel.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

### Breve descripción de la invención

La presente invención hace referencia a la inhibición total o parcial de la expresión del gen  
10 RRM2B, o de la actividad de la enzima codificada por dicho gen (ribonucleósido-difosfato reductasa), para ser usada el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Así, mediante el uso del gen RRM2B o la enzima ribonucleósido-difosfato reductasa como diana terapéutica, la presente invención se centra en la identificación de nuevos compuestos farmacéuticos, o compuestos que ya estén siendo utilizados para el tratamiento de  
15 indicaciones médicas distintas a las enfermedades neurodegenerativas, que sean capaces de inhibir total o parcialmente la expresión del gen RRM2B, o la actividad de la enzima codificada por dicho gen (ribonucleósido-difosfato reductasa), y consecuentemente ejercer un efecto positivo en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas.

De forma preferida, la presente invención hace referencia al reposicionamiento de fármacos  
20 caracterizados por ser análogos de nucleósidos, particularmente gemcitabina, para su aplicación como tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, preferentemente la enfermedad de Alzheimer, Huntington o Parkinson. De forma particular, en la presente invención se ofrecen resultados positivos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer al observarse una reducción en los depósitos  $\beta$ A obtenidos en el modelo animal *Caenorhabditis*  
25 *elegans*.

De forma particular, en la presente invención se describe una estrategia para la identificación de nuevos fármacos útiles en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer, utilizando los datos genómicos de un GWAS de 1.034  
30 casos y 1.186 controles sujetos y 450.000 marcadores genéticos previamente publicados. Con el uso de herramientas avanzadas de bioinformática y un ensayo de validación *in vivo*, en la presente invención se ha desarrollado un flujo de trabajo para analizar las rutas bioquímicas

que puedan intervenir farmacológicamente y que estén vinculadas a la aparición de la enfermedad de Alzheimer. Este procedimiento pasó por cruzar la información del GWAS con los datos de eQTL globales para vincular los *loci* asociados a una alteración funcional sobre los niveles de expresión génica en el Sistema Nervioso Central. Esto generó una serie de potenciales genes diana, algunos de los cuales podían intervenir farmacológicamente. Se comprobó la eficacia de los candidatos *in vivo* usando un modelo humanizado de *C. elegans* que sobreexpresa de forma inducible los agregados de  $\beta$ A produciendo la parálisis de los animales debido a la citotoxicidad de los agregados. De forma particular, en la presente invención se demuestra que el fármaco gemcitabina inhibe la actividad de la enzima RRM2B, lo que se traduce en una mejora de la motilidad de los animales de forma significativa (p-valor de Mantel-Cox  $1,37 \times 10^{-29}$ ).

Es importante destacar que este efecto se reproduce al inhibir total o parcialmente la expresión del gen RRM2B, o la actividad de la enzima codificada por dicho gen (ribonucleósido-difosfato reductasa), usando ARN interferente (ARNi), bien sea un ARNip (ARN de interferencia pequeño) o miARN (microARN), por lo que en esta invención se demuestra que el efecto conseguido sobre el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer no sólo se limita a los análogos de nucleósidos como la gemcitabina, o al ARN interferente dirigido a RRM2B, sino que el efecto conseguido puede ser extensible a cualquier fármaco o molécula biológica con capacidad de inhibir la expresión del gen RRM2B, o la actividad de la enzima codificada por dicho gen (ribonucleósido-difosfato reductasa).

La inhibición total o parcial de la expresión del gen RRM2B, o de la actividad de la enzima codificada por dicho gen (ribonucleósido-difosfato reductasa), no es conocida en el estado de la técnica para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, dicha característica, compartida por todos los fármacos o moléculas incluidos en el presente documento, otorga unidad de invención.

Es importante destacar que en la presente invención se ha ensayado de forma particular la molécula gemcitabina, como ejemplo ilustrativo de análogos de nucleósidos. Sin embargo, dada la similitud estructural existente entre la gemcitabina con el resto de los análogos de nucleósidos, sobre todo con el resto de análogos de desoxicitidina, los efectos conseguidos por la gemcitabina en la inhibición total o parcial de la expresión del gen RRM2B, o de la actividad de la enzima codificada por dicho gen, ribonucleósido-difosfato reductasa, serían



extrapolables al resto de los análogos de nucleósidos, preferentemente al resto de los análogos de desoxicitidina.

Del mismo modo, la presente invención se centra en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, usado como modelo animal un modelo humanizado de *C. elegans*. Sin embargo, dada la existencia de una vinculación bioquímica entre la enfermedad de Alzheimer, Huntington o Parkinson, sería esperable que los efectos conseguidos en el tratamiento de Alzheimer a través de la inhibición total o parcial de la expresión del gen RRM2B, o de la actividad de la enzima codificada por dicho gen: ribonucleósido-difosfato reductasa, sean extrapolables a la enfermedad de Huntington o Parkinson. Tal y como se discute en el estado de la técnica, las tres enfermedades conllevan una disminución del ATP disponible, y el uso de análogos de nucleósidos, particularmente gemcitabina, a través de la inhibición total o parcial de la expresión del gen RRM2B, o de la actividad de la enzima codificada por dicho gen ribonucleósido-difosfato reductasa, podría servir no solo para tratar la enfermedad de Alzheimer, sino también Huntington o Parkinson. En este sentido, es importante tener en cuenta el **Ejemplo 4**, donde se postula que la inhibición de RRM2B aumenta las concentraciones de ATP, y por lo tanto podrían servir como tratamiento de aquellas enfermedades que conllevan una disminución del ATP disponible, como son la enfermedad de Alzheimer, Huntington o Parkinson.

Así, el primer aspecto de la presente invención hace referencia a compuestos análogos de nucleósidos, o ARN de interferencia, caracterizados ejercer una inhibición total o parcial de la expresión del gen RRM2B, o de la actividad de la enzima codificada por dicho gen: ribonucleósido-difosfato reductasa, para ser usados en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. En una realización particular, el análogo de nucleósido es un análogo de desoxicitidina seleccionado del grupo que comprende: gemcitabina, citarabina, emtricitabina, lamivudina o zalcitabina. En una realización particular, el análogo de nucleósido es gemcitabina. En una realización particular, la enfermedad neurodegenerativa es Alzheimer, Parkinson o Huntington. En una realización particular, la presente invención hace referencia a la gemcitabina para ser usada en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. En una realización particular, la presente invención hace referencia a un ARN interferente caracterizado ejercer una inhibición total o parcial de la expresión del gen RRM2B, o de la actividad de la enzima codificada por dicho gen: ribonucleósido-difosfato reductasa, para ser usado en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

El segundo aspecto de la presente invención hace referencia a una composición farmacéutica que comprende un análogo de nucleósido o ARN de interferencia caracterizados ejercer una inhibición total o parcial de la expresión del gen RRM2B, o de la actividad de la enzima codificada por dicho gen: ribonucleósido-difosfato reductasa, y opcionalmente excipientes farmacéuticamente aceptables, para ser usada en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

El tercer aspecto de la presente invención hace referencia a un método *in vitro* para la identificación y/o producción de moléculas candidatas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas que comprende: a) medir el nivel de expresión del gen RRM2B o la actividad de la enzima ribonucleósido-difosfato reductasa después de administrar la molécula candidata, b) donde, si después de administrar la molécula candidata, la expresión del gen RRM2B o la actividad de la enzima ribonucleósido-difosfato reductasa son inhibidas total o parcialmente de forma estadísticamente significativa respecto la expresión del gen RRM2B o la actividad de la enzima ribonucleósido-difosfato reductasa antes de administrar la molécula candidata, esto es indicativo de que la molécula candidata es efectiva en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

El cuarto aspecto de la presente invención hace referencia a un método *in vitro* para monitorizar la respuesta a un tratamiento frente a enfermedades neurodegenerativas que comprende: a) medir el nivel de expresión del gen RRM2B o la actividad de la enzima ribonucleósido-difosfato reductasa después de administrar el tratamiento, b) donde, si después de administrar el tratamiento, la expresión del gen RRM2B o la actividad de la enzima ribonucleósido-difosfato reductasa son inhibidas total o parcialmente de forma estadísticamente significativa respecto la expresión del gen RRM2B o la actividad de la enzima ribonucleósido-difosfato reductasa antes de administrar el tratamiento, esto es indicativo de que el tratamiento es efectivo.

El quinto aspecto de la presente invención hace referencia al uso *in vitro* del nivel de expresión del gen RRM2B o del nivel de actividad de la enzima ribonucleósido-difosfato reductasa para la identificación y/o producción de moléculas candidatas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, o para monitorizar la respuesta a un tratamiento frente a enfermedades neurodegenerativas.

El sexto aspecto de la presente invención hace referencia al gen RRM2B o enzima ribonucleósido-difosfato reductasa para ser usados en el tratamiento de enfermedades

neurodegenerativas, caracterizado porque la expresión de dicho gen o la actividad de la enzima son inhibidas o interrumpidas. En una realización preferida la enfermedad neurodegenerativa es Alzheimer, Parkinson o Huntington. En una realización preferida la expresión de dicho gen o la expresión de la enzima son inhibidas o interrumpidas mediante el uso de un análogo de nucleósido, preferentemente un análogo de desoxicitidina, preferentemente gemcitabina o, alternativamente, es un ARN interferente dirigido al gen RRM2B.

El séptimo aspecto de la presente invención hace referencia a un método para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo Alzheimer, Parkinson o Huntington, que comprende la administración de una dosis terapéuticamente efectiva de una molécula, compuesto químico o composición farmacéutica de las mencionadas anteriormente, capaz de inhibir la expresión del gen RRM2B o la actividad de la enzima codificada por el mismo.

La molécula, compuesto químico o composición farmacéutica de la invención puede administrarse por cualquier vía: oral, sublingual, bucal, tópica, transdérmica, inhalación, instilación ocular, rectal, parenteral (subcutánea, intramuscular, endovenosa), preferentemente por vía intravenosa.

A los efectos de la presente invención se aportan las siguientes definiciones:

- El término "que comprende" significa que incluye, pero no se limita a, lo que sigue a la palabra "que comprende". Por lo tanto, el uso del término "que comprende" indica que los elementos enumerados son obligatorios u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes.
- Por "que consiste en" se entiende que incluye, y se limita a, lo que sigue a la frase "que consiste en". Por lo tanto, la frase " que consiste en " indica que los elementos enumerados son obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos.
- "Excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a un excipiente que se puede incluir opcionalmente en las composiciones de la invención y que no causa efectos toxicológicos adversos significativos para el paciente.
- Por "dosis o cantidad terapéuticamente efectiva" de la composición de la invención se entiende que es una dosis que cuando se administra provoca una respuesta terapéutica positiva en un sujeto que padece una enfermedad neurodegenerativa. La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, la edad y el

estado general del sujeto, la gravedad de la afección que se está tratando, el modo de administración y similares. La cantidad "efectiva" apropiada puede ser determinada por un experto en la materia usando experimentación de rutina, en base a la información proporcionada en el estado de la técnica.

## 5 Descripción de las figuras

**Figue 1.** Ejemplo de asociación cis-eQTL entre SNP y gen. En la figura, el SNP puede estar más cercano físicamente al gen B pero tras un análisis de eQTLs observando los niveles de expresión de ARNm de los genes A, B y C a través de los tres genotipos posibles del SNP (AA, AB o BB), nosotros concluimos que el efecto debe estar asociado por lo tanto al gen A.

10 **Figura 2.** Análisis microscópico de los agregados  $\beta$ A en la cepa *C. elegans* silvestre (N2) (A, A'), la cepa humanizada GMC101 de *C. elegans* sin tratar (B, B') de después de la inducción de  $\beta$ A (C, C'). Las flechas apuntan los agregados de  $\beta$ A.

**Figura 3.** Efecto de distintas concentraciones de gemcitabina sobre la motilidad de los *C. elegans* expuestos al acumulo de  $\beta$ A, tras normalizar frente a sus respectivos controles no tratados (referencia). El diagrama de cajas muestra la mediana y los cuartiles, así como el rango de cada muestra. Los valores de significación se obtuvieron tras aplicar el test de Kluskal-Wallis en el software *SPSS statistics* versión 22. Eje X (gemcitabina ng por ml). Eje Y (ratio de motilidad normalizado).

20

**Figura 4.** Representación de Kaplan-Meier del número de *c. elegans* móviles tras la inducción del acumulo de  $\beta$ A. La línea rayada muestra la motilidad de la estirpe silvestre, mientras que en la punteada se muestra la estirpe mutante sin tratar. La línea sólida se observa la motilidad de la estirpe mutante monitorizada en presencia de 200 ng/ml de gemcitabina.

25

**Figura 5.** Representación de Kaplan-Meier del número de *c. elegans* móviles tras la inducción del acumulo de  $\beta$ A. La línea punteada corresponde a la estirpe mutante crecida con *E. coli* con el plásmido vacío. Con la línea sólida se observa la motilidad de la estirpe mutante crecida con *E. coli* con el plásmido que produce ARN de doble cadena contra el gen *rnr-2* de *C. elegans*, lo que conlleva el silenciamiento del gen.

30

**Figura 6.** Diagrama de cajas de la medición de ATP para las muestras con/sin 200 ng/ml de

gemcitabina. Los datos de ATP representados corresponden al tiempo 35 minutos en la medida de luminiscencia. Siendo solamente significativas las diferencias entre las condiciones con/sin fármaco de la estirpe control N2 (test de U de Mann-Whitney; valor de  $p = 0,03$ ). El aumento que genera la gemcitabina sobre la estirpe mutante, aunque de menor magnitud, también muestra una tendencia a la asociación (valor de  $p = 0,06$ ). Las cajas representan el primer y tercer cuartil. Las líneas en las cajas corresponden a la mediana y las barras de error representan al valor mínimo y al máximo.

### Descripción detallada de la invención

#### 10 Ejemplo 1. Determinación de genes útiles como diana terapéutica

Se partió de los datos de un análisis de un rastreo completo del genoma con 451.101 marcadores genéticos de un solo nucleótido (SNP) previamente publicados [Hu XI, Pickering E, Liu YC, Hall S, Fournier H, Katz E, Dechairo B, John S, Van Eerdewegh P, Soares H; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. *Meta-analysis for genome-wide association study identifies multiple variants at the BIN1 locus associated with late-onset Alzheimer's disease. PLoS One. 2011 Feb 24;6(2):e16616. doi: 10.1371/journal.pone.0016616.*] Se seleccionaron aquellos SNPs con un nivel de asociación estadístico  $p$ -valor  $< 0,01$ , haciendo de esta forma un cribado de 5.426 SNPs. A su vez el mismo número de SNPs pero elegidos de forma aleatoria fueron tomados como controles aleatorios. Acto seguido, se descargaron los datos públicos de la herramienta GTEx portal [The GTEx Consortium. *The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. Nature Genetics. 2013; 45(6): 580–585. DOI: 10.1038/ng.2653*]. El propósito fue determinar qué genes muestran una tasa de expresión diferencial a nivel de ARNm dependiendo del genotipo para el SNP en estudio (**Figura 1**).

De esta forma se situó como condicionante la información sobre los datos de expresión para obtener genes diana. Se obtuvieron los genes asociados por eQTLs a los SNPs del GWAS a través de un script realizado con el software R-Studio v.3.3.2 [R Core Team. *R: The R Project for Statistical Computing. 2016. Disponible en: <https://www.r-project.org/>*]. Se obtuvieron de esta forma 17 genes candidatos cuya alteración en los niveles de expresión en el sistema nervioso central acarrea una alta probabilidad de estar vinculados a la enfermedad de Alzheimer. Para la realización de los modelos se debe de resaltar que cada vez que un SNP se asocia a un fenotipo, la naturaleza de esta correlación puede ser tanto de protección (*odds ratio*  $< 1$ ) como de riesgo (*odds ratio*  $> 1$ ). En la misma línea, cada vez que un SNP se asocia a

un nivel de expresión (eQTL), esta podría ser de manera positiva ( $\beta > 0$ ) o negativa ( $\beta < 0$ ). En la presente invención, aquellas parejas SNP-gen de riesgo que muestran un aumento de los niveles de ARNm del gen diana requerirían una estrategia farmacológica inhibidora. Por el contrario, si el alelo de riesgo se asocia con niveles más bajos de ARNm, se requería un activador. Finalmente, se realizó un estudio caso a caso para determinar la posibilidad de intervenir farmacológicamente y en sentido necesario nuestros genes diana. Finalmente se eligió el gen candidato *RRM2B* debido su alta conservación evolutiva, su vinculación con los fenómenos inflamatorios y a la posibilidad de inhibir la proteína resultante usando el fármaco conocido como gemcitabina. Los datos que nos llevaron a nuestro candidato diana *RRM2B* están resumidos en la **Tabla 1**.

**TABLA 1**

SNP	<i>Odds ratio</i>	GWAS p-valor	POSICIÓN DENTRO DE <i>RRM2B</i>	TEJIDO	eQTL p-valor	Beta
rs17509019	1,333	0,008	21 Kb del 3'UTR	Hemisferio cerebeloso	0,0028	0,27
			55 Kb del Promotor	Hipocampo	0,0075	0,31

**Ejemplo 2. Ensayos con gemcitabina *in vivo* (*C. elegans*)**

Tal y como se menciona arriba, se procedió a ensayar la actividad de la gemcitabina en la estirpe modelo de *C. elegans* que sobre-expresa la proteína  $\beta A$  humana denominada GMC101 (**Figura 2**), lo que conduce a la parálisis del animal por citotoxicidad debida a la acumulación del péptido tóxico  $A\beta_{1-42}$  [McColl G et al. *Utility of an improved model of amyloid-beta ( $A\beta_{1-42}$ ) toxicity in Caenorhabditis elegans for drug screening for Alzheimer's disease. Mol Neurodegener. 2012;7:57*]. De esta forma, si el tratamiento impide la agregación de  $\beta A$  los animales recuperan la motilidad.

Los experimentos de análisis de motilidad tras 18 horas de incubación en presencia de distintas dosis de gemcitabina mostraron una dosis de rescate entorno a los 200 ng/ml (P-valor<0,001, test Kruskal-Wallis), ya que con esta concentración el porcentaje de motilidad respecto a su

control interno era prácticamente el doble. Estos resultados se pueden observar en la **Figura 3**. Tras estos resultados, se decidió comprobar el efecto de la concentración la gemcitabina a 200 ng/ml de forma exhaustiva realizando una monitorización de los animales a distintos tiempos. El resultado de este experimento se muestra en la **Figura 4**. El análisis de regresión de Cox  
 5 mostró un claro y estadísticamente significativo aumento de la motilidad de los animales que sobreexpresaban la  $\beta$ A en presencia de gemcitabina a 200 ng/ml (**Figura 4**, p-valor  $1,37 \times 10^{-29}$  Mantel-Cox test).

### **Ejemplo 3. Ensayos con ARN interferente *in vivo* (*C. elegans*)**

10 En una serie de experimentos posteriores, se usó la técnica del ARN interferente para impedir la producción de la enzima ribonucleósido-difosfato reductasa endógena del propio animal. Para ello se utilizó un ARNi caracterizado por la SEQ ID NO: 1. Se verificó que la acción del ARNi sobre esta actividad era la responsable de la mejoría en la motilidad de los animales modelo. Los resultados se muestran en la **Figura 5**.

15 Tal y como se observa en la **Figura 5**, la inhibición selectiva del gen endógeno replica los datos obtenidos con el fármaco, lo que confirma que la inhibición de la actividad enzimática de la ribonucleósido-difosfato reductasa a través de su subunidad RRM2B es suficiente para disminuir la citotoxicidad producida por los acúmulos de  $\beta$ A (p-valor de Mantel-Cox  $3,26 \times 10^{-10}$ ).

20

### **Ejemplo 4. Efecto del tratamiento con gemcitabina sobre la cantidad de Adenosín-trifosfato (ATP) biodisponible intracelularmente.**

En este ejemplo se postula que la inhibición de la RRM2B aumenta las concentraciones de ATP, lo que hace disminuir la citotoxicidad producida por el acumulo de  $\beta$ A. Así, en el  
 25 presente ejemplo se plantea si el efecto sobre la motilidad de los animales transgénicos tratados con gemcitabina puede también correlacionar con este aumento de la energía intracelular.

Para ello se recogieron los gusanos tratados con gemcitabina en un tubo *ependorf* con 50  $\mu$ l de tampón S (5,85 g/l de NaCl, 1,123 g/l de  $K_2HPO_4$ , 5,926 g  $KH_2PO_4$  en 1 L de  $H_2O_d$ ), tras  
 30 esto se realizan 2 lavados de esta forma: se centrifugan por 30 segundos a 13.000 rpm y se eliminó el sobrenadante para conservar el pellet de *C. elegans*, finalmente se añadieron 100  $\mu$ l de tampón S. La medición de ATP se ha realizado con el kit comercial “ATP

determination Kit, time stable assay, 10 ml for 200-1000 assays” de proteonkinase.de (*order-no. LBR-T010*). Se trata en un ensayo bioluminiscente basado en el sistema luciferasa-luciferina y está optimizado para aplicaciones en las que se determinan concentraciones de ATP que varían desde 10 nM hasta 10  $\mu$ M.

- 5 Las muestras recogidas se congelaron con nitrógeno líquido antes del proceso de extracción del ATP. Seguidamente, los tubos congelados se sumergieron en agua hirviendo durante 15 min, se transfieren a hielo para enfriarlos y se dejaron así durante 5 min. Finalmente se centrifugaron durante 10 min a 13.000 rpm y se transfirió cada sobrenadante a un tubo limpio. Para la medida se utilizó el luminómetro Centro XS3 LB 960 de la marca Berthold
- 10 Technologies (<https://www.berthold-bio.com>).

La cepa N2 presentaba una cantidad de ATP por animal de 36,06 pg por organismo, la cual aumentaba 4,24 veces al estimularse durante 23-24 horas con gemcitabina 200 ng/ml. Esto correspondía a 16 horas desde el choque térmico. Los valores resultantes mostraron significación estadística (test de U de Mann-Whitney; valor de  $p = 0,03$ ). Por su parte, la

15 estirpe GMC101 mostraba niveles estadísticamente menores de ATP que la N2 en condiciones normales (19,93 pg/gusano) y si bien el aumento observado tras el tratamiento con gemcitabina no tuvo la misma magnitud que con la estirpe N2 (de 19,93 a 36,48 pg/gusano), éste también muestra una evidente tendencia a la significación (test de U de Mann-Whitney; valor de  $p = 0,065$ ) (**Figura 6**).

20



## REIVINDICACIONES

1. Análogo de nucleósido, o ARN de interferencia, caracterizados por ejercer una inhibición total o parcial de la expresión del gen RRM2B, o de la actividad de la enzima codificada por dicho gen, ribonucleósido-difosfato reductasa, para ser usados en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.
2. Análogo de nucleósido para ser usado, según la reivindicación 1, caracterizado por ser un análogo de desoxicitidina seleccionado del grupo que comprende: gemcitabina, citarabina, emtricitabina, lamivudina o zalcitabina.
3. Análogo de nucleósido para ser usado, según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el análogo de desoxicitidina es gemcitabina.
4. Análogo de nucleósido o ARN de interferencia para ser usados, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la enfermedad neurodegenerativa es Alzheimer, Parkinson o Huntington.
5. Gemcitabina para ser usada, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
6. ARN de interferencia caracterizado ejercer una inhibición total o parcial de la expresión del gen RRM2B, o de la actividad de la enzima codificada por dicho gen, ribonucleósido-difosfato reductasa, para ser usado, según las reivindicaciones 1 o 4, en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
7. Composición farmacéutica que comprende un análogo de nucleósido, o ARN de interferencia, caracterizados ejercer una inhibición total o parcial de la expresión del gen RRM2B, o de la actividad de la enzima codificada por dicho gen: ribonucleósido-difosfato reductasa, y opcionalmente excipientes farmacéuticamente aceptables, para ser usada en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.
8. Método *in vitro* para la identificación y/o producción de moléculas candidatas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas que comprende: a) medir el nivel de expresión del gen RRM2B o la actividad de la enzima ribonucleósido-difosfato reductasa después de administrar la molécula candidata, b) donde, si después de administrar la molécula candidata, la expresión del gen RRM2B o la actividad de la enzima ribonucleósido-difosfato reductasa son inhibidas total o parcialmente de forma estadísticamente significativa respecto la expresión del gen RRM2B o la actividad de la enzima ribonucleósido-difosfato reductasa antes de administrar la molécula

candidata, esto es indicativo de que la molécula candidata es efectiva en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

9. Método *in vitro* para monitorizar la respuesta a un tratamiento frente a enfermedades neurodegenerativas que comprende: a) medir el nivel de expresión del gen RRM2B o la actividad de la enzima ribonucleósido-difosfato reductasa después de administrar el tratamiento, b) donde, si después de administrar el tratamiento, la expresión del gen RRM2B o la actividad de la enzima ribonucleósido-difosfato reductasa son inhibidas total o parcialmente de forma estadísticamente significativa respecto la expresión del gen RRM2B o la actividad de la enzima ribonucleósido-difosfato reductasa antes de administrar el tratamiento, esto es indicativo de que el tratamiento es efectivo.
10. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, donde la enfermedad neurodegenerativa es Alzheimer, Parkinson o Huntington.
11. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde la molécula candidata es un análogo de nucleósido, preferentemente un análogo de desoxicitidina, preferentemente gemcitabina o, alternativamente, es un ARN interferente, caracterizados ejercer una inhibición total o parcial de la expresión del gen RRM2B, o de la actividad de la enzima codificada por dicho gen, ribonucleósido-difosfato reductasa.
12. Uso *in vitro* del nivel de expresión del gen RRM2B o del nivel de actividad de la enzima ribonucleósido-difosfato reductasa para la identificación y/o producción de moléculas candidatas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.
13. Uso *in vitro* del nivel de expresión del gen RRM2B o del nivel de actividad de la enzima ribonucleósido-difosfato reductasa para monitorizar la respuesta a un tratamiento frente a enfermedades neurodegenerativas.
14. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, donde la enfermedad neurodegenerativa es Alzheimer, Parkinson o Huntington.
15. Gen RRM2B o enzima ribonucleósido-difosfato reductasa para ser usados en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, caracterizado porque la expresión de dicho gen o la actividad de la enzima es inhibida o interrumpida.
16. Gen RRM2B o enzima ribonucleósido-difosfato reductasa, para ser usados, según la reivindicación 15 donde la enfermedad neurodegenerativa es Alzheimer, Parkinson o Huntington.
17. Gen RRM2B o enzima ribonucleósido-difosfato reductasa, para ser usados, según cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16 donde la expresión de dicho gen o la

actividad de la enzima es inhibida o interrumpida mediante el uso de un análogo de nucleósido, preferentemente un análogo de desoxicitidina, preferentemente gemcitabina, o alternativamente es un ARN interferente, caracterizados ejercer una inhibición total o parcial de la expresión del gen RRM2B, o de la actividad de la enzima codificada por dicho gen, ribonucleósido-difosfato reductasa.

5

Figura 1

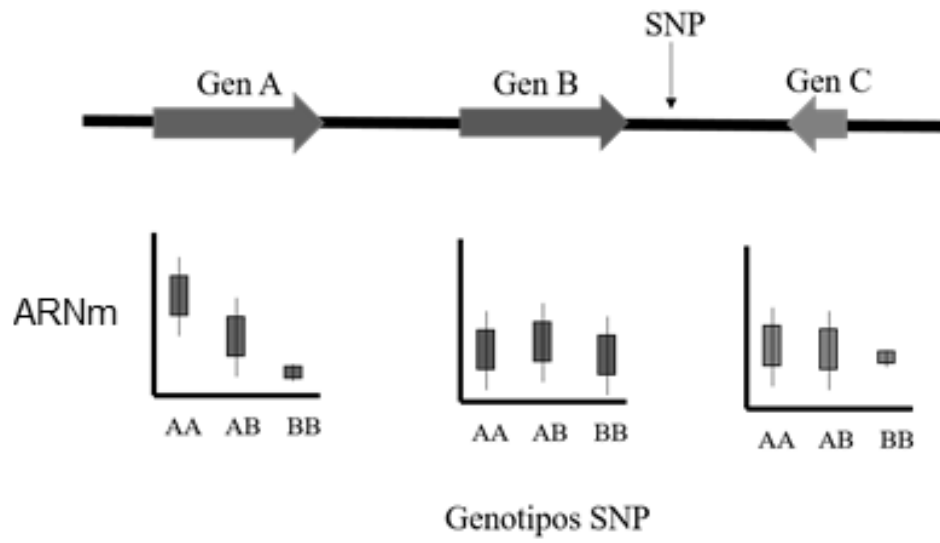


Figura 2

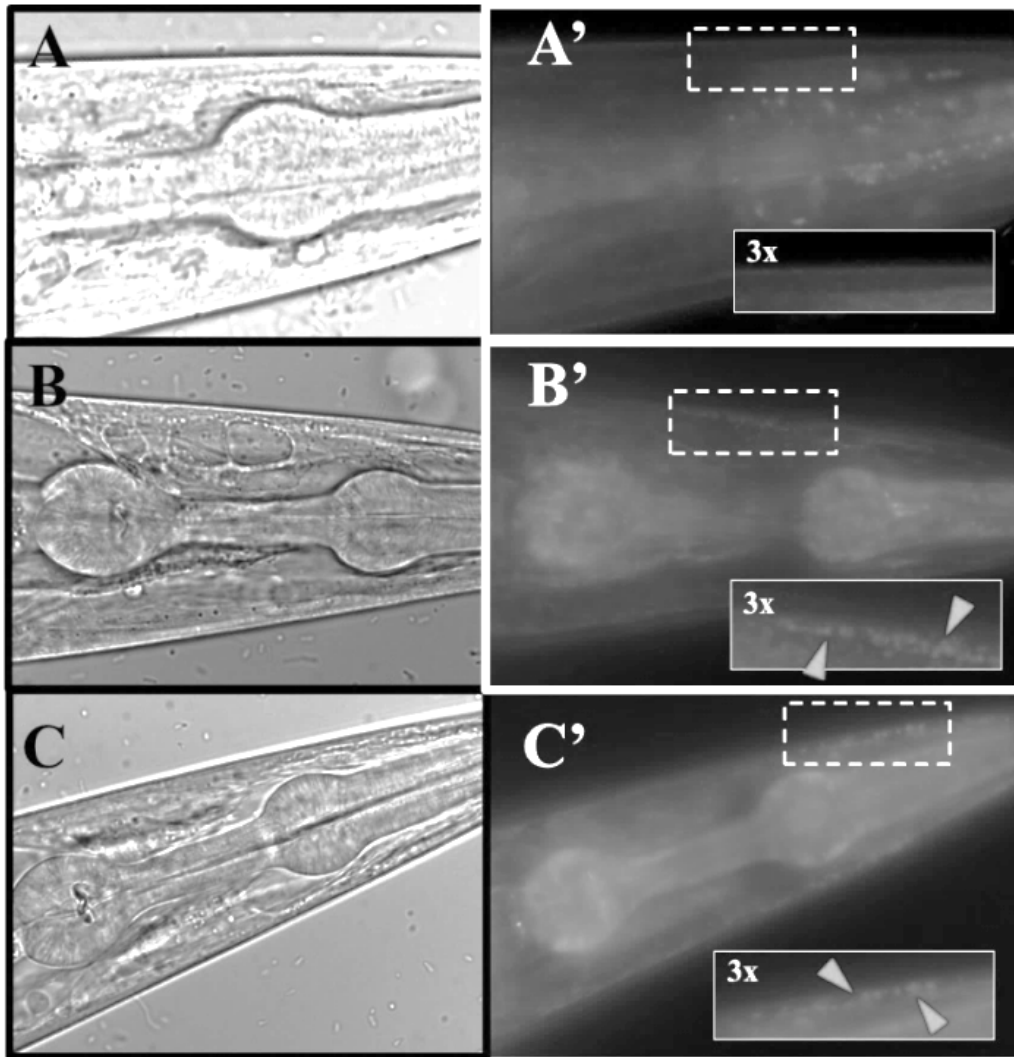


Figura 3

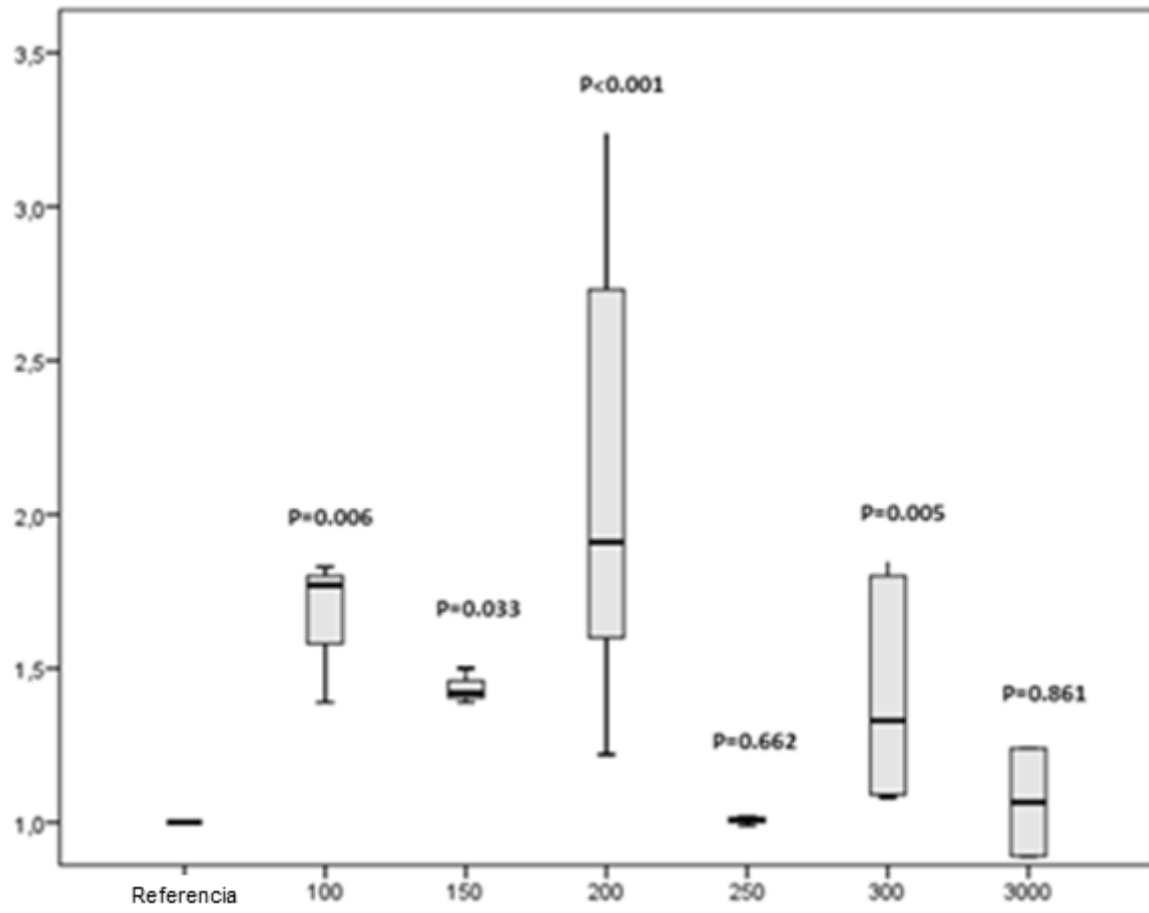


Figura 4

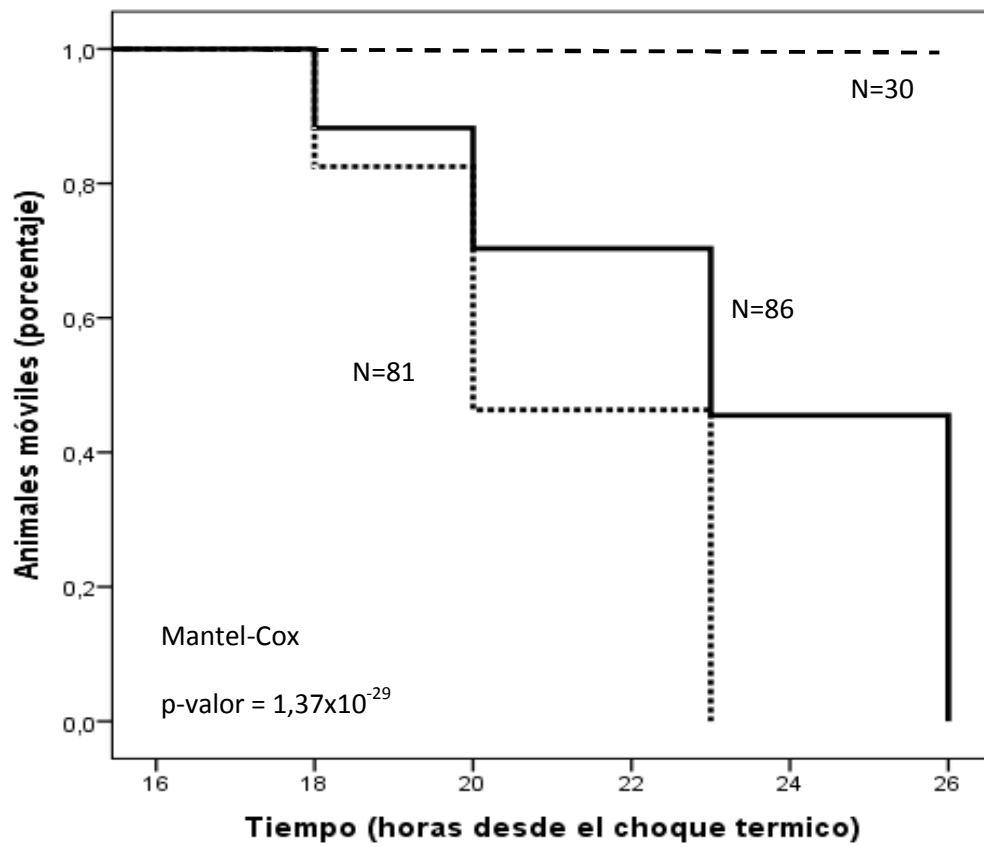


Figura 5

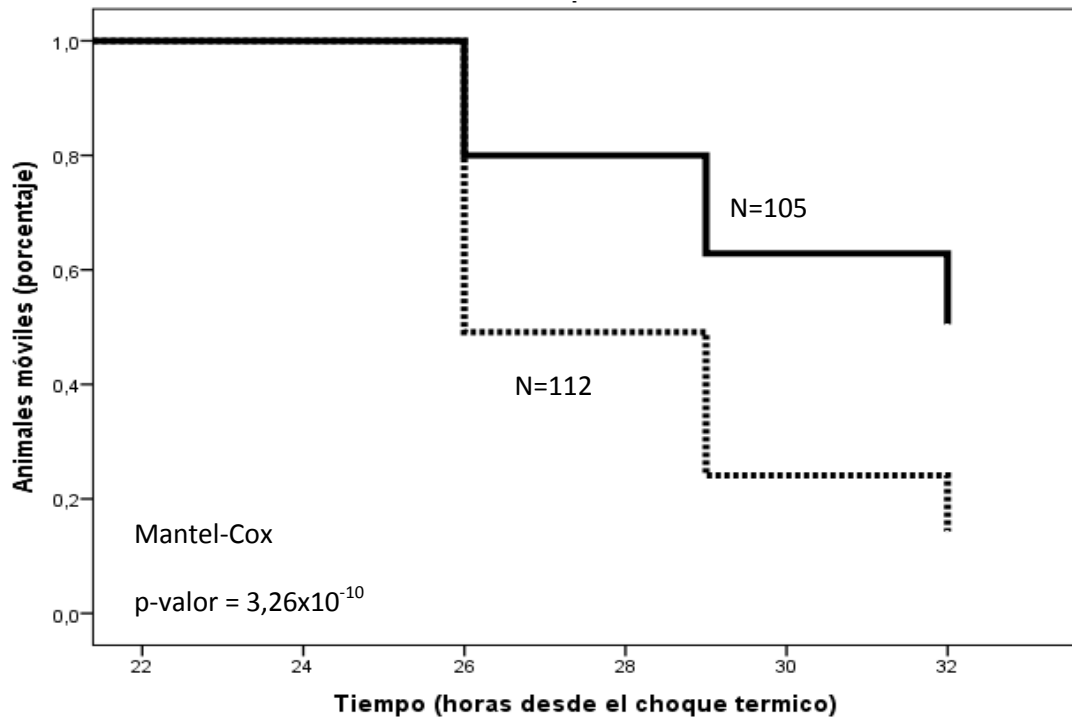
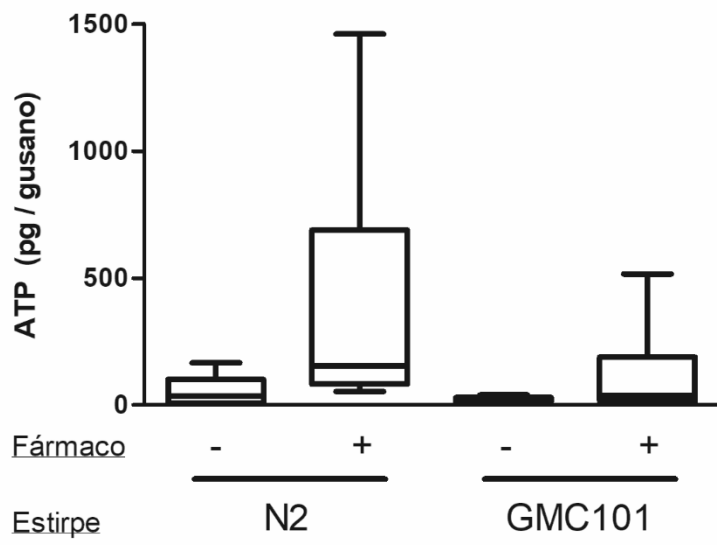




Figura 6





- ②① N.º solicitud: 201830955  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 03.10.2018  
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MICHEL P P et al. "Rescue of mesencephalic dopamine neurons by anticancer drug cytosine arabinoside". Journal of neurochemistry England (1997). 30/09/1997, Vol. 69, Páginas 1499 - 1507, ISSN 0022-3042 (Impreso), <DOI: pubmed: 9326279>. Todo el documento.	1-5, 7
X	NIU JIANYI et al. "2, 3-Dideoxycytidine Protects Dopaminergic Neurons in a Mouse Model of Parkinson's Disease.. Neurochemical research (2017). , 30/09/2017, Vol. 42, Páginas 2996 - 3004, ISSN 1573-6903 (Electrónico), <DOI: doi: 10.1007/s11064-017-2330-9 pubmed: 28631231>. Todo el documento.	1-5, 7
X	ROSENZWEIG N et al. "Transiently breaking immune tolerance by targeting Foxp3 CD4 regulatory T cells mitigates Alzheimer's disease pathology. Brain, Behavior, and Immunity" Academic Press Inc. (2016), Vol. 57, Páginas e4 - e5, ISSN 1090-2139 (impreso), <DOI: doi:10.1016/j.bbi.2016.07.019>. Todo el documento.	3 y 5
X	GLENN JUSTIN D et al. "Gemcitabine directly inhibits effector CD4 T cell activation and prevents experimental autoimmune encephalomyelitis". Journal of neuroimmunology (2018). Vol. 316, Páginas 7 - 16, ISSN 1872-8421 (Electrónico), <DOI: doi:10.1016/j.jneuroim.2017.12.002 pubmed: 29274729>. Todo el documento.	3 y 5

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: 1,2,4 7-11,17 (parcialmente), 3,5,12-16 (completamente)

Fecha de realización del informe 16.04.2019	Examinador M. Hernandez Cuellar	Página 1/3
--	------------------------------------	---------------



- ① N.º solicitud: 201830955  
 ② Fecha de presentación de la solicitud: 03.10.2018  
 ③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	LONG JEFFREY D et al. "Genetic Modification of Huntington Disease Acts Early in the Prediagnosis Phase" American journal of human genetics (2018), Vol. 103, Páginas 349 - 357, ISSN 1537-6605 (Electrónico), <DOI: doi:10.1016/j.ajhg.2018.07.017 pubmed:30122542>. Todo el documento.	8-17
X	EL-HATTAB AYMAN W et al. "Mitochondrial DNA depletion syndromes: review and updates of genetic basis, manifestations, and therapeutic options". Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics (2013), Vol. 10, Páginas 186 - 198, ISSN 1878-7479 (Electrónico), <DOI: doi:10.1007/s13311-013-0177-6 pubmed:23385875>. Todo el documento.	8-17

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: 1,2,4 7-11,17 (parcialmente), 3,5,12-16 (completamente)

<p><b>Fecha de realización del informe</b> 16.04.2019</p>	<p><b>Examinador</b> M. Hernandez Cuellar</p>	<p><b>Página</b> 2/3</p>
---	---	------------------------------

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61P25/16** (2006.01)

**A61P25/28** (2006.01)

**A61K31/7068** (2006.01)

**C12Q1/68** (2018.01)

**G01N33/15** (2006.01)

**G01N33/50** (2006.01)

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

A61P, A61K, C12Q, G01N

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

EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE