

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 922 677**

21 Número de solicitud: 202230149

51 Int. Cl.:

C07D 307/92 (2006.01)

A61K 31/343 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

23.02.2022

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.09.2022

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (50.0%)
Edificio EMPRENDIA - Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES y
UNIVERSIDADE DA CORUÑA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BOTANA LOPEZ, Luis Miguel;
ALFONSO RANCAÑO, Maria Amparo;
ALVARIÑO ROMERO, Rebeca;
JIMENEZ GONZALEZ, Carlos;
RODRIGUEZ GONZALEZ, Jaime y
PECH PUCH, Darwin Jesus**

74 Agente/Representante:

TORRENTE VILASANCHEZ, Susana

54 Título: **Furanoditerpenos para su uso en la prevención y/o en el tratamiento de enfermedades**

57 Resumen:

Furanoditerpenos para su uso en la prevención y/o en el tratamiento de enfermedades en las que están implicadas las ciclofilinas. La presente invención está incluida en el campo de la biomedicina y química farmacológica. Más concretamente se refiere a compuestos de fórmula (1-5), aislados de *Spongia tubulifera*, para su uso en medicina, en particular, en la prevención y/o tratamiento de enfermedades en las que están implicadas las ciclofilinas.

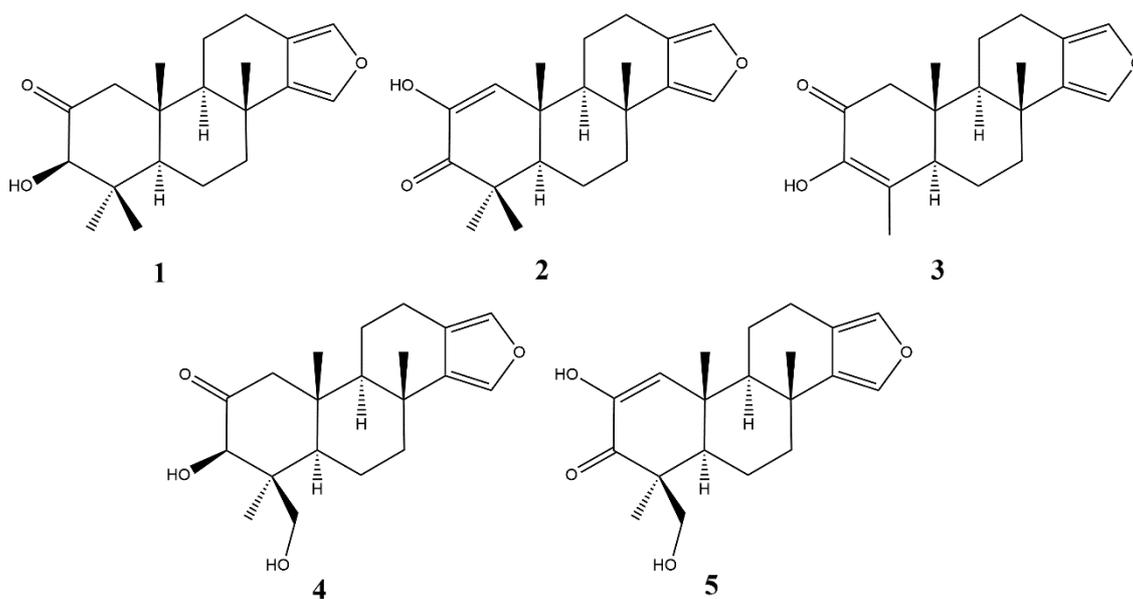
ES 2 922 677 A1

DESCRIPCIÓN

Furanoditerpenos para su uso en la prevención y/o en el tratamiento de enfermedades

5 **SECTOR DE LA TÉCNICA**

La presente invención está incluida en el campo de la biomedicina y química farmacológica. Más concretamente se refiere a compuestos de fórmula (1-5), aislados de *Spongia tubulifera*, para su uso en medicina, en particular, en la prevención y/o tratamiento de enfermedades en las que están implicadas las ciclofilinas.



10

ANTECEDENTES DE LA INVENCÓN

Las patologías asociadas al envejecimiento como las enfermedades cardiovasculares, la diabetes mellitus tipo 2 o las enfermedad de Alzheimer presentan como mecanismos patológicos comunes el aumento crónico de la inflamación y el estrés oxidativo. Estos procesos están interconectados, ya que el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) produce la activación de las células del sistema inmune, que liberan mediadores pro-inflamatorios, así como más ROS, generando círculo vicioso muy dañino (Zuo et al., *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18), 4472).

15

En este sentido, las ciclofilinas (Cyps) juegan un papel clave en ambos mecanismos, y por tanto, en diversas enfermedades en las que en las que están implicados tanto la inflamación como el daño oxidativo. Es el caso de la aterosclerosis, la diabetes mellitus tipo 2, las enfermedades neurodegenerativas o la artritis reumatoide (Daneri-Becerra et al., *Curr Drug Targets*, 2021, 22(14):1596-1617; Rostam et al., *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2015, 42(2):117-124; Nigro P, *Cell Death Dis*, 2013, 4(10):e888). Las Cyps son una subfamilia de proteínas que se engloban dentro de las inmunofilinas, enzimas con

25

actividad peptidil-prolil cis/trans isomerasa (PPlasas) que catalizan la isomerización de uniones peptídicas de la conformación trans a cis acelerando el plegamiento proteico. Dentro de las PPlasas se distinguen tres subfamilias que se dividen, en función de su afinidad por fármacos inmunosupresores, en: Cyps, afines a ciclosporina (CsA);
5 proteínas que se unen al tacrolimus o FK-506 (FKBPs); y parvulinas, que no tienen afinidad por fármacos inmunosupresores (Perrucci et al., *Cardiovasc Res*, 2015, 106 (3):353-364).

La subfamilia de las Cyps incluye 18 isoenzimas altamente conservadas y ubicuas de las cuales la ciclofilina A (CypA) y la ciclofilina D (CypD) han sido las más estudiadas
10 por su papel en múltiples eventos celulares. La CypA se localiza en el citosol y se libera al medio extracelular como respuesta a estímulos inflamatorios o al estrés oxidativo, contribuyendo a la amplificación estos procesos (Bukrinsky, *Biochim Biophys Acta*. 2015, 1850(10):2087-2095). La CypB se localiza en el citosol y en el retículo endoplasmático, se libera al medio extracelular, y juega un papel importante en la
15 homeostasis redox y en la inflamación (Perrucci et al., *Cardiovasc Res*, 2015, 106 (3):353-364). La CypC se localiza principalmente en reservorios intracelulares, aparato de Golgi y retículo endoplasmático, y modula la activación de células inflamatorias (Gegunde et al., *Front Immunol*. 2021, 12:609196). Las Cyps A, B y C también actúan como mediadores inflamatorios cuando son liberadas al espacio extracelular por
20 monocitos, linfocitos o células endoteliales (Gegunde et al., *Exp Cell Res*, 2021, 400(2), 112514; McClements et al., *Curr Mol Pharmacol*, 2015, 9(2), 165-179).

La CypD se localiza en las mitocondrias y regula la apertura del poro de transición mitocondrial (mPTP), por lo que está relacionada con la apoptosis y la muerte celular. El mPTP es un canal no específico que conecta la matriz mitocondrial y el citosol y
25 permite el paso de solutos con un peso molecular menor de 1500 Da, provocando un aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna. La apertura del mPTP se produce en respuesta a distintos estímulos, como el estrés oxidativo o el exceso de calcio, y es reversible, pero si es masiva y persistente, puede producir la muerte celular. La composición molecular del mPTP todavía no está claramente
30 dilucidada, el componente del poro mejor descrito y aceptado es la CypD, que es además la principal reguladora de su apertura (Briston, et al, *Trends Pharmacol Sci*, 2019, 40(1), 50-70). El mPTP se ha relacionado con diversas enfermedades, siendo el daño por isquemia-reperfusión y la enfermedad de Alzheimer dos de las principales dolencias en las que está implicado este canal (Du et al., 2011, *Neurobiol Aging*. 2011,
35 32(3):398-406; Alam et al., *J Mol Cell Cardiol*. 2015, 78:80-89).

Los niveles sanguíneos y la expresión de las Cyps se encuentran aumentados en pacientes con diversas patologías como enfermedades cardiovasculares, metabólicas

o neurodegenerativas, lo que refuerza su importancia en la evolución de estas dolencias (Alfonso et al, *Sci Rep*, 2019, 9(1), 10576; Zhang et al, *Front Endocrinol*, 2017, 8, 360; Du et al., *Neurobiol Aging*, 2011, 32(3), 398-406). En este contexto, la modulación farmacológica de las Cyps ha mostrado resultados muy prometedores en diversos modelos celulares y animales, por lo que se han propuesto como dianas terapéuticas para enfermedades en las que la inflamación, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial son claves (Boyenle et al., *Mitochondrion*, 2022, 63:57-71; Li et al., *Bioengineered*, 2020, 11(1):1047-1057; Satoh, *Circ J.* 2017, 81(11):1557-1563).

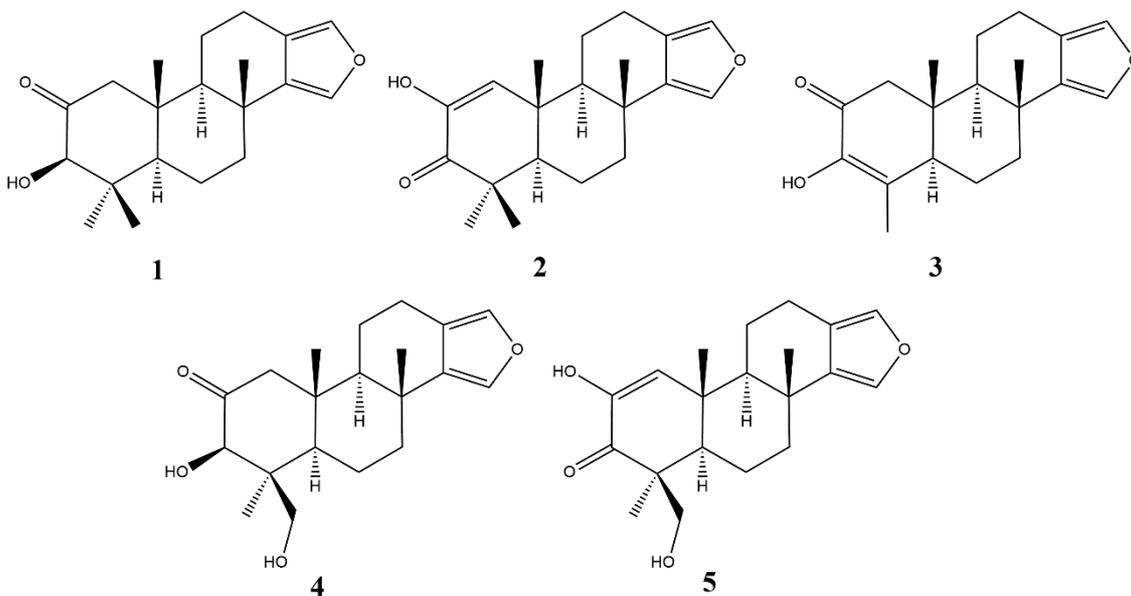
El único fármaco aprobado en uso clínico cuyo mecanismo de acción es la inhibición de las Cyps es el compuesto inmunosupresor CsA, pero su aplicación más allá de trasplantes y enfermedades autoinmunes es limitada. La CsA presenta multitud de efectos secundarios como neurotoxicidad, nefrotoxicidad o hepatotoxicidad que se deben a la generación de estrés oxidativo. La CsA afecta a la función mitocondrial y al retículo endoplásmico, alterando el equilibrio redox y aumentando la liberación de ROS (Wu et al., *Food Chem Toxicol*, 2018, 118, 889-907; Korolczuk et al., *Biomed Res Int*, 2016, 2016, 5823271; Busauschina et al., *Transplant Proc*, 2004, 36(2 Suppl), 229S-233S).

Por tanto, la búsqueda de nuevos compuestos capaces de inhibir las Cyps y que no generen estrés oxidativo, supone un gran reto.

20

BREVE EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se dirige a un compuesto de fórmula 1-5



para su uso en la prevención y/o tratamiento de enfermedades mediadas por una ciclofilina seleccionada del grupo que consiste en ciclofilina A, ciclofilina B, ciclofilina C y ciclofilina D.

- 5 En otro aspecto la invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula 1-5, y un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en la prevención y/o tratamiento de enfermedades mediadas por una ciclofilina seleccionada del grupo que consiste en ciclofilina A, ciclofilina B, ciclofilina C y ciclofilina D.

10

Figuras

Figura 1. Efecto de los compuestos 1, 2 y 3 sobre la viabilidad de las células SH-SY5Y. Resultados de (a) compuesto 1, (b) compuesto 2 y (c) compuesto 3. La vitamina E (Vit E) a 25 μ M se usa como control positivo en los ensayos de estrés oxidativo. Media \pm SEM de tres experimentos realizados en triplicado. Los datos se presentan como porcentaje de las células control (# $p < 0,05$ comparado con las células control, * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ comparado con las células tratadas solo con H_2O_2).

15

Figura 2. Efecto de los compuestos 4 y 5 sobre la viabilidad de las células SH-SY5Y. Resultados de (a) compuesto 4 y (b) compuesto 5. La Vit E a 25 μ M se usa como control positivo en los ensayos de estrés oxidativo. Media \pm SEM de tres experimentos realizados en triplicado. Los datos se presentan como porcentaje de las células control (# $p < 0,05$ comparado con las células control, * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ comparado con las células tratadas solo con H_2O_2).

20

25

Figura 3. Efecto de los furanoditerpenos 1, 2 y 3 en el potencial de membrana mitocondrial de las células de neuroblastoma humano. (a) Compuesto 1, (b) compuesto 2 y (c) compuesto 3. La Vit E a 25 μ M se usa como control positivo en los ensayos de estrés oxidativo. Media \pm SEM de tres experimentos realizados en triplicado. Los datos se presentan como porcentaje de las células control (# $p < 0,05$ comparado con las células control. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ comparado con las células tratadas con H_2O_2).

30

Figura 4. Efecto de los furanoditerpenos 4 y 5 en el potencial de membrana mitocondrial de las células de neuroblastoma humano. (a) Compuesto 4 y (b) compuesto 5. La Vit E a 25 μ M se usa como control positivo en los ensayos de estrés oxidativo. Media \pm SEM de tres experimentos realizados en triplicado. Los datos se presentan como porcentaje

35

de las células control (# $p < 0,05$ comparado con las células control. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ comparado con las células tratadas con H_2O_2).

5 **Figura 5.** Niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) tras el tratamiento con los compuestos 1, 2 y 3. Resultados de los compuestos (a) 1, (b) 2, y (c) 3. La Vit E a $25 \mu M$ se usa como control positivo en los ensayos de estrés oxidativo. Media $\pm SEM$ de tres experimentos realizados en triplicado. Los datos se presentan como porcentaje de las células control (## $p < 0,01$ comparado con las células control, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ comparado con las células tratadas con H_2O_2).

10

Figura 6. Niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) tras el tratamiento con los compuestos 4 y 5. Resultados de los compuestos (a) 4 y (b) 5. La Vit E a $25 \mu M$ se usa como control positivo en los ensayos de estrés oxidativo. Media $\pm SEM$ de tres experimentos realizados en triplicado. Los datos se presentan como porcentaje de las células control (## $p < 0,01$ comparado con las células control, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ comparado con las células tratadas con H_2O_2).

15

Figura 7. Evaluación de la apertura del poro de transición mitocondrial (mPTP) en las células SH-SY5Y tratadas con los furanoditerpenos. Los datos se presentan como porcentaje de las células control. Los valores son la media $\pm SEM$ de tres experimentos independientes. (### $p < 0,001$ comparado con las células control. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ comparado con las células tratadas con hidroperóxido terbutílico (TBHP))

20

Figura 8. Determinación de la expresión de ciclofilina D (CypD) (a) Expresión de la CypD tras el tratamiento con los metabolitos de *S.tubulifera*. (b) Efecto de los compuestos en la expresión de la CypD en condiciones de estrés oxidativo. La ciclosporina A (CsA) a $0.2 \mu M$ se usa como control positivo. La expresión de la proteína se normaliza con los niveles de actina. Los resultados son la media $\pm SEM$ de tres réplicas realizadas por duplicado. Los datos se expresan como porcentaje de las células control y el control de H_2O_2 , respectivamente (# $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$ en comparación con las células control. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ comparado con el control de H_2O_2).

30

Figura 9. Expresión intracelular de ciclofilina A (CypA) tras el tratamiento con los furanoditerpenos. (a) Niveles citosólicos de CypA en condiciones fisiológicas, (b) efecto de los compuestos en la expresión de CypA tras el daño oxidativo. Se utilizó la CsA a $0.2 \mu M$ como control positivo. La expresión de la proteína está normalizada con los niveles de actina. Los resultados se expresan como porcentaje de las células control o

35

del control de H₂O₂ control. Media \pm SEM de tres replicas realizadas por duplicado. (# p<0,05 y ## p<0,01 en comparación con las células control. *p<0,05 y ***p<0,001 comparado con las células tratadas solo con H₂O₂).

5 **Figura 10.** Expresión intracelular de ciclofilina B (CypB) tras el tratamiento con los furanoditerpenos. (a) Expresión de CypB en condiciones fisiológicas, (b) niveles intracelulares de CypB bajo condiciones de estrés oxidativo. Se utilizó la CsA a 0.2 μ M como control positivo. La expresión de la proteína está normalizada con los niveles de actina. Los resultados se expresan como porcentaje de las células control o del control de H₂O₂ control. Media \pm SEM de tres replicas realizadas por duplicado. (# p<0,05 en comparación con las células control. *p<0,05 comparado con las células tratadas solo con H₂O₂)

15 **Figura 11.** Expresión intracelular de ciclofilina C (CypC) tras el tratamiento con los compuestos de *S.tubulifera*. (a) Expresión de CypC en condiciones fisiológicas, (b) expresión de CypC después de la adición de los metabolitos y H₂O₂. Se utilizó la CsA a 0.2 μ M como control positivo. La expresión de la proteína está normalizada con los niveles de actina. Los resultados se expresan como porcentaje de las células control o del control de H₂O₂ control. Media \pm SEM de tres replicas realizadas por duplicado. (# p<0,05 y ## p<0,01 en comparación con las células control. *p<0,05 y **p<0,01 comparado con las células tratadas solo con H₂O₂)

25 **Figura 12.** Asociación del control positivo CsA y la CypD. (a) Curvas de asociación y (b) las curvas de ajuste para la unión en el equilibrio. Gráficas representativas de un experimento de un total de tres réplicas independientes.

30 **Figura 13.** Asociación del compuesto 2 y la CypD. (a) Curvas de asociación y (b) las curvas de ajuste para la unión en el equilibrio. Gráficas representativas de un experimento de un total de tres réplicas independientes.

Figura 14. Asociación del compuesto 3 y la CypD. (a) Curvas de asociación y (b) las curvas de ajuste para la unión en el equilibrio. Gráficas representativas de un experimento de un total de tres réplicas independientes.

35 **Figura 15.** Asociación del compuesto 4 y la CypD. (a) Curvas de asociación y (b) las curvas de ajuste para la unión en el equilibrio. Gráficas representativas de un experimento de un total de tres réplicas independientes.

Figura 16. Asociación del compuesto 5 y la CypD. (a) Curvas de asociación y (b) las curvas de ajuste para la unión en el equilibrio. Gráficas representativas de un experimento de un total de tres réplicas independientes.

5 **Figura 17.** Asociación del control positivo CsA y la CypA. (a) Curvas de asociación y (b) las curvas de ajuste para la unión en el equilibrio. Gráficas representativas de un experimento de un total de tres réplicas independientes.

10 **Figura 18.** Asociación del compuesto 1 y la CypA. (a) Curvas de asociación y (b) las curvas de ajuste para la unión en el equilibrio. Gráficas representativas de un experimento de un total de tres réplicas independientes.

15 **Figura 19.** Asociación del compuesto 2 y la CypA. (a) Curvas de asociación y (b) las curvas de ajuste para la unión en el equilibrio. Gráficas representativas de un experimento de un total de tres réplicas independientes.

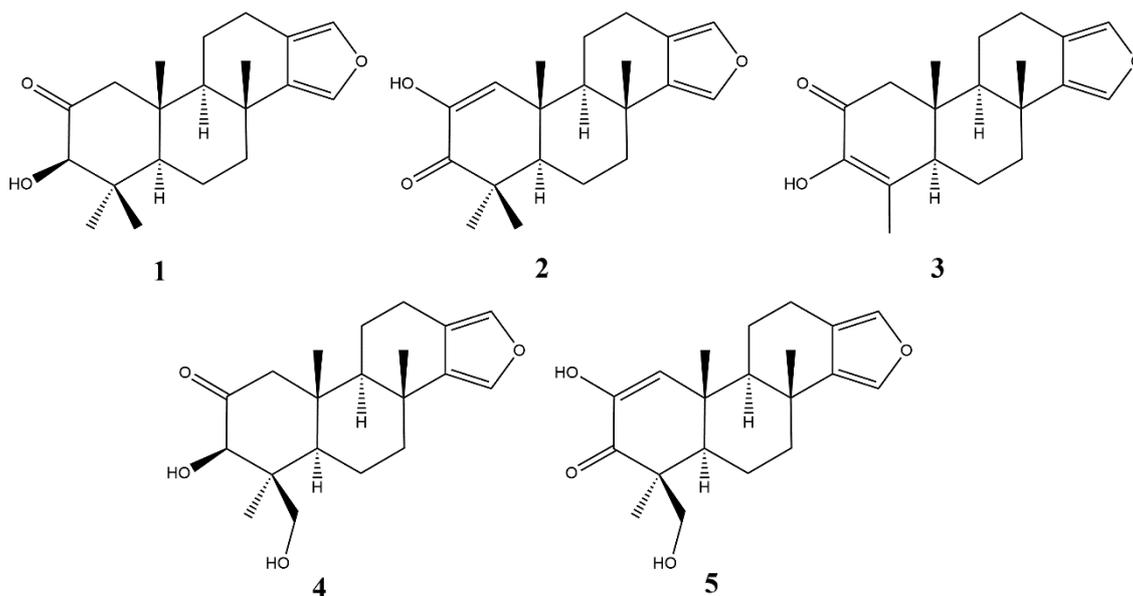
20 **Figura 20.** Asociación del compuesto 3 y la CypA. (a) Curvas de asociación y (b) las curvas de ajuste para la unión en el equilibrio. Gráficas representativas de un experimento de un total de tres réplicas independientes.

Figura 21. Asociación del compuesto 4 y la CypA. (a) Curvas de asociación y (b) las curvas de ajuste para la unión en el equilibrio. Gráficas representativas de un experimento de un total de tres réplicas independientes.

25 **Figura 22.** Asociación del compuesto 5 y la CypA. (a) Curvas de asociación y (b) las curvas de ajuste para la unión en el equilibrio. Gráficas representativas de un experimento de un total de tres réplicas independientes.

EXPLICACIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30 La presente invención se refiere los compuestos furanoditerpenos aislados de *Spongia tubulifera* de fórmula 1-5:



para su uso en la prevención y/o tratamiento de enfermedades mediadas por una ciclofilina seleccionada del grupo que consiste en ciclofilina A, ciclofilina B, ciclofilina C y ciclofilina D.

- 5 El término “enfermedad” incluye cualquiera de sus sinónimos generalmente usado, como por ejemplo “desorden”, “consición médica”, etc., que refleja una condición anormal del cuerpo o de cualquiera de sus partes que impide su funcionamiento normal y se manifiesta a través de síntomas y signos.

Los compuestos 1-5 se aislaron del extracto metanólico de la esponja *Spongia tubulifera* recogida en el Caribe Mejicano y sus estructuras se dilucidaron mediante RMN 1D/2D y espectroscopia infrarroja, espectrometría de masas de alta resolución de ionización por electropray y comparación de sus datos espectrales con compuestos relacionados y recogidos en la bibliografía. La descripción detallada del aislamiento y la elucidación estructural se recoge en el siguiente artículo: Dawrin Pech-Puch, Jaime Rodríguez, Carlos Alfredo Sandoval-Segura, and Carlos Jiménez “Cytotoxic furanoditerpenes isolated from the sponge *Spongia tubulifera* collected in the Mexican Caribbean” *Marine Drugs* 17, 416, 2019.

En el ejemplo 1 de la presente invención se demuestra el efecto neuroprotector de los compuestos 1-5. Las células humanas de neuroblastoma humano SH-SY5Y se tratan con los compuestos 1-5 a varias concentraciones, y se induce estrés oxidativo añadiendo peróxido de hidrógeno. De esta forma, se genera disfunción mitocondrial y se induce la apertura del mPTP, simulando las condiciones patológicas características de las enfermedades en las que las Cyps juegan un papel clave. Los compuestos 1-5 a una o más concentraciones mostraron protección celular frente al peróxido de hidrógeno. Esta protección se observó en: a) experimentos en los que los compuestos

1-5 mostraron un efecto sobre la viabilidad celular frente al daño producido por peróxido de hidrógeno, y en los casos de los compuestos 2, 4 y 5 a bajas concentraciones se observó un efecto comparable al del control positivo; b) experimentos en los que se evaluó el potencial de membrana mitocondrial demostrando que todos los compuestos
5 1-5 son capaces de restablecer el potencial de la membrana tras el tratamiento con peróxido de hidrógeno, y se observó que los compuestos 4 y 5 a bajas concentraciones tienen un efecto superior al del control positivo; c) medidas de niveles de ROS que demostraron que todos los compuestos 1-5 son capaces de reducir la liberación de ROS.

10 Así, la presente invención se refiere a los compuestos 1-5 para su uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa. En particular, la enfermedad neurodegenerativa es Alzheimer.

La presente invención también se dirige a los compuestos 1-5 para su uso como agente neuroprotector.

15 En el ejemplo 2 se demostró que todos los compuestos 1-5 son capaces de inhibir la apertura del poro de transición mitocondrial, mientras que los compuestos 4 y 5 son los que producen una mayor inhibición (Figura 7). Además, se evaluó la expresión intracelular de las Cyps A, B, C y D, indicando que los compuestos 1-5 son capaces de reducir la expresión de una o más ciclofilinas, incluso en condiciones de estrés oxidativo.

20 Así la invención también se refiere a los compuestos 1-5 para su uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad autoinmune.

En el ejemplo 3 se demuestra que los compuestos 1-5 presentan afinidad por las Cyps A y D, siendo el compuesto 1 específico para la CypA y los compuestos 2 y 5 específicos para la CypD especificidad que no presenta la CsA.

25 Así, se puede concluir que los compuestos 1-5 tienen efecto inmunosupresor. La presente invención se refiere también a los compuestos 1-5 para su uso como inmunosupresor.

30 En una realización particular, la invención también se dirige a un compuesto con estructuras similares a los compuestos 1-5, para su uso según se ha descrito anteriormente.

35 En otro aspecto la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto seleccionado de entre 1, 2, 3, 4, y 5, y un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en la prevención y/o tratamiento de enfermedades mediadas por una ciclofilina seleccionada del grupo que consiste en ciclofilina A, ciclofilina B, ciclofilina C y ciclofilina D. La presente invención también se refiere a una composición

farmacéutica como se ha definido anteriormente donde la enfermedad es una enfermedad autoinmune o una enfermedad neurodegenerativa. Y también se refiere a una composición farmacéutica como se ha definido anteriormente para su uso en un método para suprimir una respuesta inmune de un sujeto.

5

En la presente invención, un “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a excipientes comúnmente empleados en el sector farmacéutico, a una formulación usada para estabilizar o solubilizar, para ser administrados a un sujeto, e incluye sistemas de liberación, como por ejemplo, nanosistemas, liposomas, vesículas y micelas.

10 El término “sujeto” se refiere a todos los mamíferos incluyendo humanos. Ejemplos de sujetos incluyen, pero no se limitan a humanos, vacas, perros, gatos, cerdos y conejos.

15 EJEMPLOS

Los ejemplos específicos presentados a continuación en este documento ilustran la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen únicamente con fines ilustrativos y no para interpretarse como limitaciones de la invención que se reclama en este documento. Por tanto, los ejemplos descritos ilustran la invención sin limitar su campo de aplicación.

20

En los ejemplos de la presente invención, las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y se usan para determinar el efecto de los furanoditerpenos de *Spongia tubulifera* sobre la expresión intracelular de las Cyps y marcadores del estrés oxidativo característico de las enfermedades asociadas a dichas proteínas. Además, se utiliza la resonancia de plasmón superficial para analizar la unión directa entre los compuestos y las Cyps A y D. Los ejemplos de la presente invención demuestran que el tratamiento con los compuestos 1-5 protege a las células neuronales frente al estrés oxidativo mediante su capacidad de modular la expresión de las Cyps A, B, C y D. Además, los metabolitos no generan daño celular ni oxidativo y muestran afinidad por las Cyps A y D, presentando constantes de disociación en el equilibrio (K_D) en el rango micromolar.

25

30

Ejemplo 1: Efecto de los compuestos sobre marcadores de estrés oxidativo en células de neuroblastoma humano

35 Para llevar a cabo los experimentos de la presente invención, se utiliza un modelo *in vitro* de estrés oxidativo con las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Las células se siembran en placas de 384 pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células por

pocillo. Tras 24 h, las células se tratan con los compuestos a concentraciones no tóxicas (0.001-1 μM) y H_2O_2 a 150 μM durante 6 h. Después se analizan diversos parámetros relacionados con el daño oxidativo. El efecto de los compuestos sobre la viabilidad celular se evalúa con el test MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-
5 difeniltetrazol) a través de la medida de la absorbancia a 595 nm.

La capacidad de los metabolitos de *S.tubulifera* para recuperar el potencial de membrana mitocondrial se analiza con el indicador fluorescente tetrametilrodamina metil éster (TMRM), cuya señal se lee a 535 nm de excitación y 590 nm de emisión.

En cuanto a los niveles de ROS, se determinan utilizando carboxi- H_2DCFDA (diacetato de 5 (6) -carboxi-2',7'-diclorofluoresceína). Su fluorescencia se lee a 527 nm de excitación, con una longitud de onda de emisión de 495 nm. Las figuras 1 y 2 muestran el efecto de los compuestos sobre la viabilidad celular de las células SH-SY5Y. Se presentan los resultados como media \pm SEM de tres experimentos realizados por triplicado. Los datos están expresados como porcentaje de células control (# $p < 0,05$ en
10 comparación con las células control. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ en comparación con las células tratadas solo con H_2O_2). Se observa que ninguno de los compuestos afecta a la viabilidad celular tras 6 horas de incubación. En condiciones de estrés oxidativo, los metabolitos 2-5 protegen a las células frente al daño producido por el H_2O_2 , especialmente a las concentraciones más bajas (0,01 y 0,001 μM), alcanzando
15 porcentajes entre 95,5% y 101,2%.

Las figuras 3 y 4 presentan la capacidad de los furanoditerpenos para restaurar el potencial de la membrana mitocondrial. Los resultados están expresados como porcentaje de células control. Media \pm SEM de tres experimentos realizados por triplicado. (# $p < 0,05$ en comparación con las células de control no tratadas. * $p < 0,05$,
25 ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,01$ en comparación con las células tratadas solo con H_2O_2). El tratamiento con los furanoditerpenos solos no afecta al potencial de membrana mitocondrial, sin embargo, todos los compuestos son capaces de recuperar la despolarización producida al añadir H_2O_2 . De nuevo las concentraciones más bajas (0,01 y 0,001 μM) son las más efectivas, alcanzando niveles similares a las células control (96,7- 111,3 %). Por tanto, los metabolitos son capaces de prevenir la disfunción
30 mitocondrial producida por la presencia del oxidante.

Las figuras 5 y 6 muestran los niveles intracelulares de ROS después del tratamiento con los compuestos. Los datos se expresan como porcentaje de células de control. Media \pm SEM de tres experimentos realizados por triplicado. (## $p < 0,01$ en comparación
35 con las células de control. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,01$ en comparación con el control de H_2O_2). De nuevo, la adición de los metabolitos de *S.tubulifera* solos no afecta a los

niveles de ROS. En condiciones de estrés oxidativo, los cinco metabolitos reducen la liberación de ROS, por lo que presentan propiedades antioxidantes.

Los resultados demuestran las propiedades neuroprotectoras de 1-5, ya que preservan la viabilidad de las células de neuroblastoma humano frente al daño oxidativo, a través de la reducción de los niveles intracelulares de ROS y la recuperación de la despolarización mitocondrial.

Ejemplo 2: Evaluación de los efectos de los compuestos sobre el poro de transición mitocondrial y la expresión intracelular de ciclofilinas

10

La capacidad de los compuestos para inhibir el mPTP se evalúa mediante citometría de flujo. Las células SH-SY5Y se siembran en placas de 12 pocillos a una densidad de 5×10^5 células por pocillo y se dejan crecer durante 24 h. Luego, las células se despegan, se cargan con Calceína-AM a $0,01 \mu\text{M}$ y se incuban a 37°C durante 15 min. A continuación, se añade CoCl_2 a $0,4 \text{ mM}$ y los compuestos a $0,001 \mu\text{M}$ y las células se incuban durante 15 min a 37°C . Después de esta incubación, las células se centrifugan, se resuspenden en $100 \mu\text{l}$ de tampón fosfato salino (PBS) sin calcio y se mantienen en hielo. Finalmente, se añade TBHP a 1 mM durante 3 min para inducir la apertura del poro. La fluorescencia se mide a 488 nm de excitación y 517 nm de emisión mediante citometría de flujo utilizando el equipo ImageStream MKII (Amnis Corporation, Luminex Corp, Austin, EE. UU.).

15

20

El análisis de la expresión de las Cyps A, B, C y D se realiza mediante western blot. Las células SH-SY5Y se tratan con los compuestos a $0,001 \mu\text{M}$ y se induce el daño oxidativo con H_2O_2 a $150 \mu\text{M}$. Las células se lavan dos veces en frío con PBS y se añade una solución hipotónica (Tris-HCl a 20 mM , pH 7,4; NaCl a 10 mM y MgCl_2 a 3 mM , que contiene un cóctel de inhibidores de fosfatasa y proteasas). Las células se incuban durante 15 min en hielo y se centrifugan a 3000 rpm y 4°C durante 15 min. El sobrenadante se recoge como fracción citosólica y la concentración de proteína se cuantifica con el equipo Direct Detect (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). La electroforesis se realiza en geles al 4-20 % de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio, conteniendo $15 \mu\text{g}$ de proteína citosólica de cada muestra. Las proteínas se transfieren a membranas de PVDF y se incuban con anticuerpos primarios específicos (anti-CypA, 1:1000; anti-CypB, 1:1000; anti-CypC, 1:1000 y anti-CypD, 1:1000), se lavan y luego se incuban con un anticuerpo secundario. La inmunorreactividad de las bandas se detecta por quimioluminiscencia. Las mismas membranas se vuelven a incubar con un anticuerpo primario anti- β -actina para llevar a cabo la corrección del contenido de

25

30

35

proteína de la muestra. La CsA a 0,2 μ M se utiliza como control positivo en estos ensayos.

La figura 7 presenta los resultados obtenidos tras la evaluación del efecto de los compuestos sobre el mPTP en células SH-SY5Y. Los datos son la media \pm SEM de tres experimentos independientes (### $p < 0,001$ en comparación con las células control. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ en comparación con las células tratadas solo con TBHP). La figura 8a muestra los niveles de expresión de CypD después del tratamiento con los metabolitos de *S. tubulifera* y la figura 8b presenta el efecto de los compuestos sobre la expresión de esta misma proteína en condiciones de estrés oxidativo. Los resultados son la media \pm SEM de tres réplicas realizadas por duplicado. Los datos están expresados como porcentaje de células de control y control de H₂O₂, respectivamente (# $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$, en comparación con las células de control. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ en comparación con las células tratadas solo con H₂O₂). Los metabolitos 4 y 5 son capaces de inhibir la apertura del mPTP a 0,001 μ M, alcanzando porcentajes de 78.9 \pm 6.3 % y 90.3 \pm 5.3 %, respectivamente. Además, los compuestos 1, 2, 4, y 5 producen una reducción significativa en la expresión de la CypD, principal reguladora de la apertura del mPTP, tanto en condiciones fisiológicas como de estrés oxidativo.

La figura 9 incluye la expresión de la CypA tras el tratamiento con los furanoditerpenos. (a) Niveles citosólicos de CypA después del tratamiento y (b) efecto de los compuestos sobre la expresión de CypA en condiciones de daño oxidativo. Los efectos sobre la expresión de la CypB se presentan en la figura 10. (a) Expresión de la CypB después del tratamiento con metabolitos, (b) niveles intracelulares de CypB en condiciones de estrés oxidativo. Finalmente, los efectos sobre la expresión de la CypC se muestran en la figura 11 (a) expresión de la CypC después de la adición de los furanoditerpenos de *S. tubulifera*, y (b) expresión de CypC tras del tratamiento conjunto con metabolitos y H₂O₂. En todos los casos la expresión de las proteínas está normalizada por los niveles de actina. Los resultados se expresan como porcentaje de células de control o como porcentaje del control de H₂O₂, respectivamente. Media \pm SEM de tres réplicas realizadas por duplicado. (# $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$ en comparación con las células control. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,01$ en comparación con las células tratadas solo con H₂O₂). En cuanto a la expresión de la CypA, solo el compuesto 1 es capaz de reducirla. Por otro lado, los niveles intracelulares de CypB disminuyen tras el tratamiento con 4, pero en condiciones de estrés oxidativo, todos los metabolitos reducen la expresión de esta proteína. Finalmente, los compuestos 3, 4, y 5 generan una disminución en la expresión de la CypC, tanto al tratar las células con ellos solos como en presencia del oxidante. Además, el compuesto 2 también reduce la expresión de esta proteína en condiciones de estrés oxidativo.

En resumen, los resultados demuestran que 4 y 5 bloquean la apertura del mPTP, y que los compuestos 1, 2, 4 y 5 disminuyen la expresión intracelular de CypD. Además, la expresión de CypA se reduce con el metabolito 1, mientras que el compuesto 4 disminuye los niveles de CypB en condiciones fisiológicas y los metabolitos 1-5 tras el daño oxidativo. Los furanoditerpenos 3-5 reducen la expresión de CypC en condiciones fisiológico, y 2-5 afectan a esta isoforma bajo condiciones de estrés oxidativo.

Ejemplo 3: Análisis de la unión de los compuestos a las ciclofilinas A y D

10

Los experimentos para evaluar la afinidad de los compuestos y las Cyps A y D se realizan mediante resonancia de plasmón superficial. Las mediciones se realizan con el equipo MP-SPR Navi™ 210A VASA y el software SPR Navi Control (BioNavis, Tampere, Finlandia). Todos los análisis se llevan a cabo en sensores recubiertos de hidrogel de carboximetil dextrano (CMD-3DM) (BioNavis). Se utiliza PBS con Tween al 0,05 % (pH 7,2) como tampón para la activación del sensor, la inmovilización de proteínas y la inyección de los analitos. El flujo y la temperatura se establecen en 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ y 24 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Se utiliza un Amine Coupling Kit comercial (Xantec bioanalytics GmbH, Düsseldorf, Alemania) para la activación del sensor y la inmovilización de las Cyps. La superficie del chip se activa mediante la adición de EDC (clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) a 0,2 M y NHS (N-hidroxisuccinimida) a 0,05 M. Después de la activación, se inyectan 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de CypA o CypD disueltos en acetato de sodio a 5 mM (pH 4,5) para su inmovilización en la superficie del sensor. Los ésteres reactivos restantes se desactivan mediante la adición de etanolamina a 1 M (pH 8,5). Para evaluar la afinidad de los compuestos y las proteínas, se agregan los analitos a concentraciones entre 0,001 y 50 μM durante 5 min. Después, se regenera la superficie agregando NaOH a 2,5 mM durante 1 min. Las inyecciones de los compuestos se realizan en serie y la señal de la celda de referencia se sustrae de los sensogramas de los analitos. Las K_D se obtienen utilizando el modelo 1:1 de Langmuir con consideraciones de transporte de masa del software TraceDrawer (RidgeView Instruments Ab, Uppsala, Suecia). La CsA se usa como control positivo en todos los experimentos.

Las figuras 12, 13, 14, 15 y 16 muestran los resultados de la afinidad del control positivo CsA y los compuestos 2-5 con la CypD, respectivamente. Los paneles superiores presentan las curvas de asociación obtenidas después de la adición de compuestos a la CypD y los paneles inferiores muestran las curvas de ajuste para la unión en el

35

equilibrio. Gráficas de un experimento representativo de 3 réplicas independientes. No se detectó unión entre el metabolito 1 y esta proteína

Las figuras 17, 18, 19, 20, 21 y 22 muestran los resultados obtenidos al analizar la asociación entre la CypA y la CsA, así como la asociación de esta proteína y los compuestos 1-5, respectivamente. Se presentan las curvas de asociación (paneles superiores) y las curvas de ajuste para la unión en el equilibrio (paneles inferiores) representativas de un experimento.

La Tabla 1 presenta los valores de las K_D obtenidas para los furanoditerpenos y su unión a las Cyps A y D, calculadas usando el modelo cinético 1:1 de Langmuir a partir de las curvas de asociación.

Tabla 1. Constantes de equilibrio cinético de 1-5 y las proteínas CypD y CypA. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar de tres experimentos

| Compuesto | Peso molecular (Da) | K_D CypD (μ M) | K_D CypA (μ M) |
|-----------|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| CsA | 1202.63 | 0.13 \pm 0.0003 | 0.11 \pm 0.0005 |
| 1 | 316.20 | No unión | 15.2 \pm 1.31 |
| 2 | 314.19 | 2.53 \pm 0.006 | 14.7 \pm 1.08 |
| 3 | 300.17 | 7.00 \pm 0.04 | 6.39 \pm 0.09 |
| 4 | 332.2 | 30.4 \pm 0.7 | 27.4 \pm 3.68 |
| 5 | 330.2 | 2.97 \pm 0.01 | 4.34 \pm 0.17 |

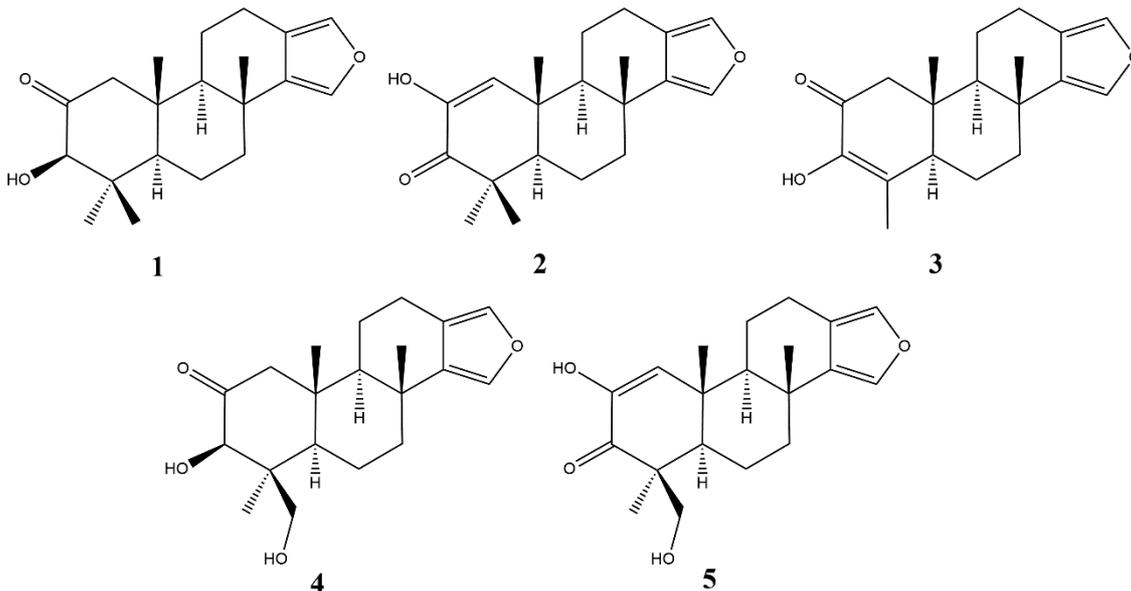
15

Estos resultados demuestran la capacidad de los furanoditerpenos 1-5 para unirse directamente a las Cyps A y D. En concreto, 1 presenta selectividad hacia la CypA, mientras que 2 y 5 muestran afinidad selectiva por la CypD. Los compuestos 3 y 4 muestran constantes de disociación similares para ambas proteínas.

20

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula 1, 2, 3, 4 ó 5



- 5 para su uso en la prevención y/o tratamiento de enfermedades mediadas por una ciclofilina seleccionada del grupo que consiste en ciclofilina A, ciclofilina B, ciclofilina C y ciclofilina D.
2. Un compuesto según la reivindicación 1, donde la enfermedad es una enfermedad autoinmune o una enfermedad neurodegenerativa.
3. Un compuesto según la reivindicación 1, para su uso como inmunosupresor.
- 10 4. Un compuesto según la reivindicación 1, para su uso como agente neuroprotector
5. Composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula 1, 2, 3, 4 ó 5, y un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en la prevención y/o tratamiento de enfermedades mediadas por una ciclofilina seleccionada del grupo que consiste en ciclofilina A, ciclofilina B, ciclofilina C y ciclofilina D.
- 15 6. Una composición farmacéutica según la reivindicación 5, donde la enfermedad es una enfermedad autoinmune o una enfermedad neurodegenerativa.
7. Una composición farmacéutica según la reivindicación 5, para su uso en un método para suprimir una respuesta inmune de un sujeto.
8. Un compuesto con estructuras similares a la reivindicación 1, para su uso según
- 20 las reivindicaciones 2-7.

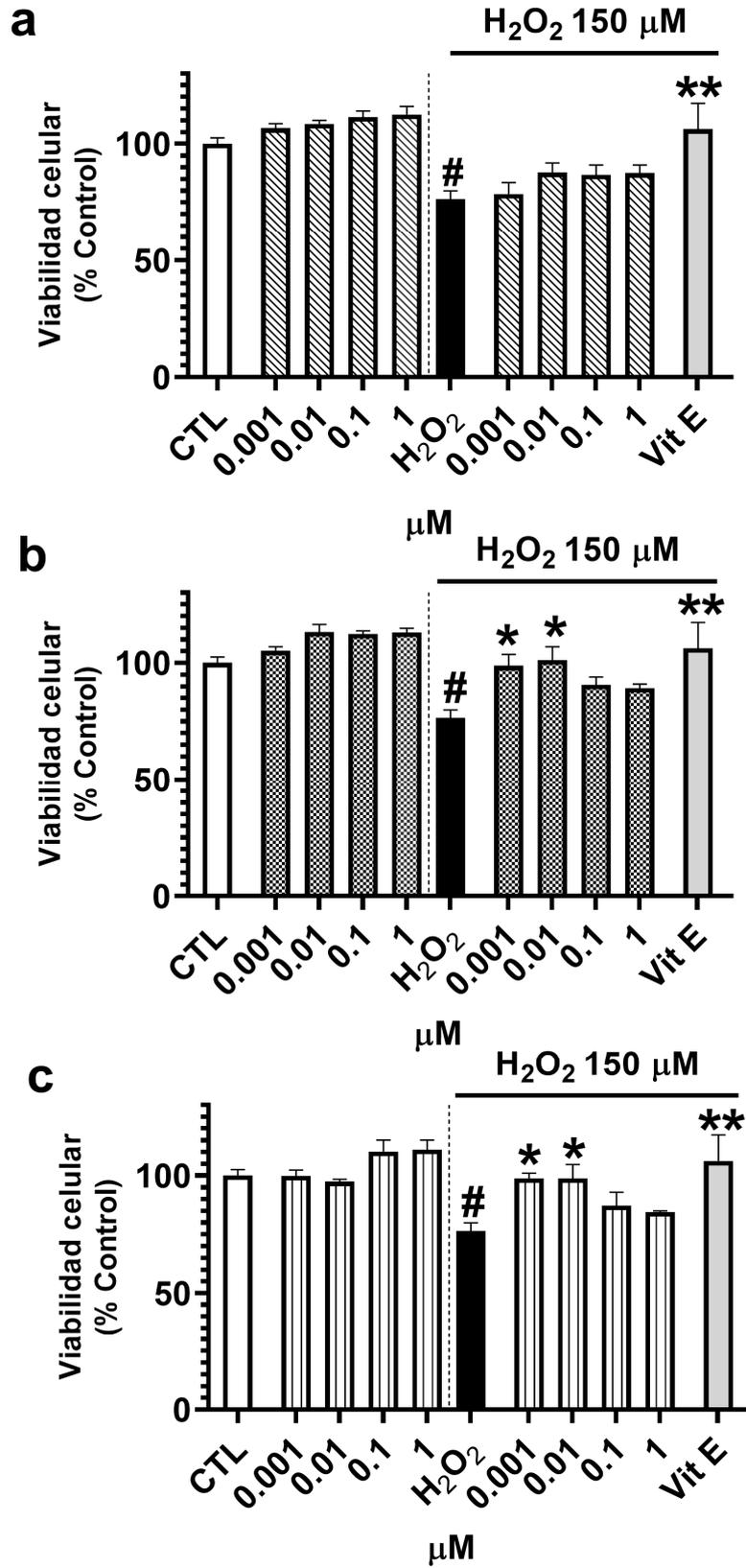


Figura 1

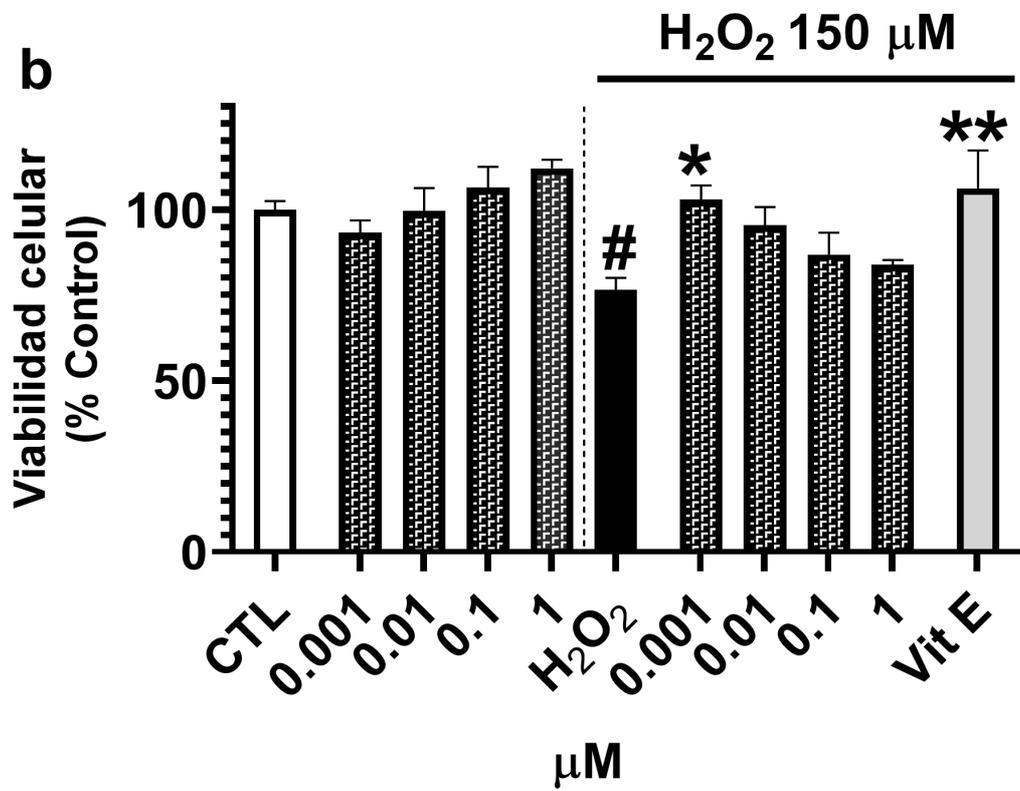
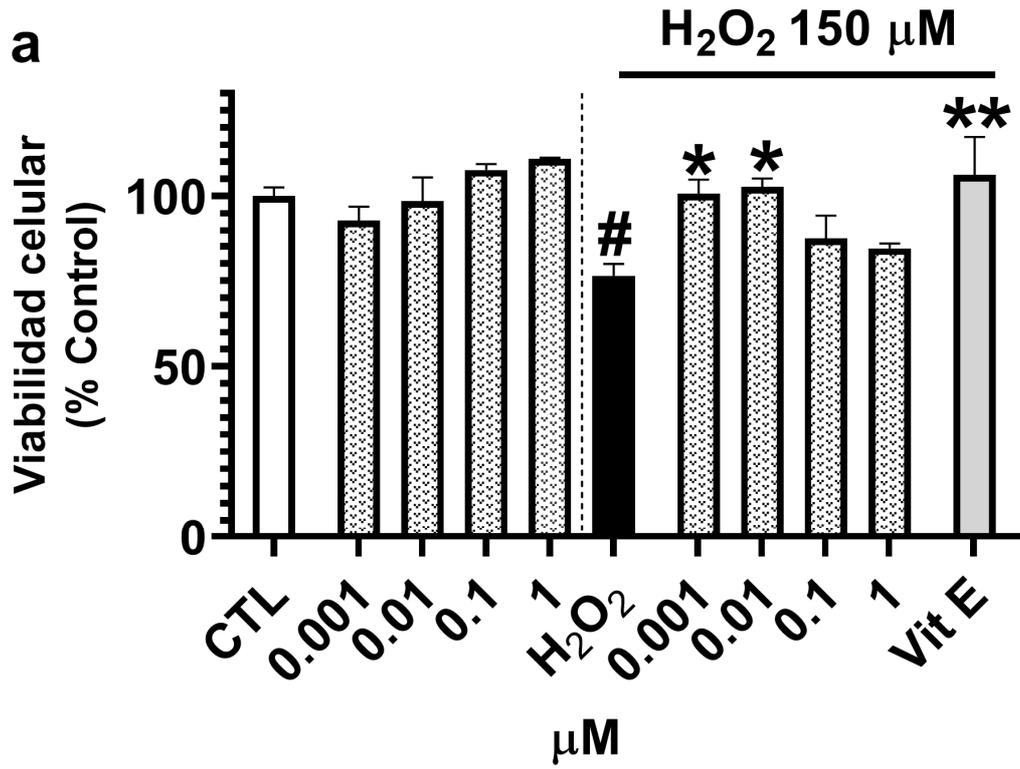


Figura 2

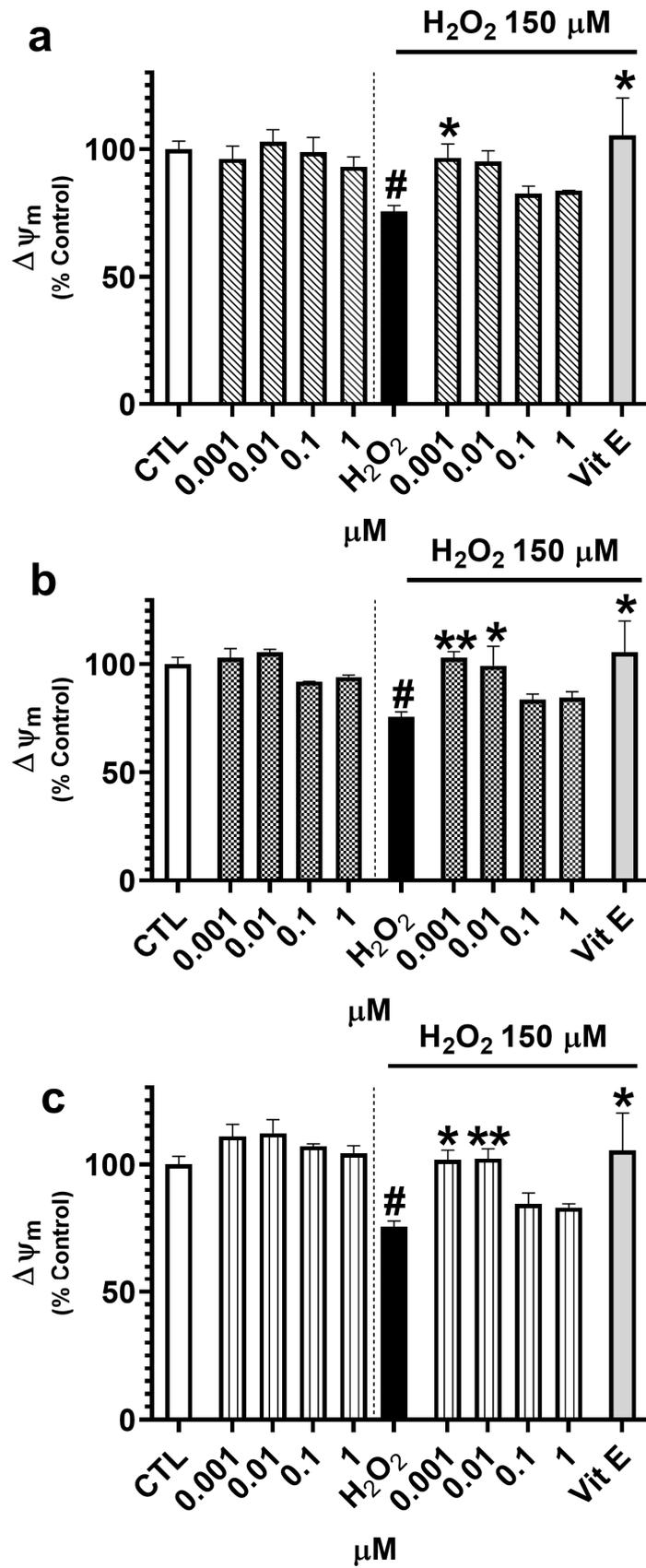


Figura 3

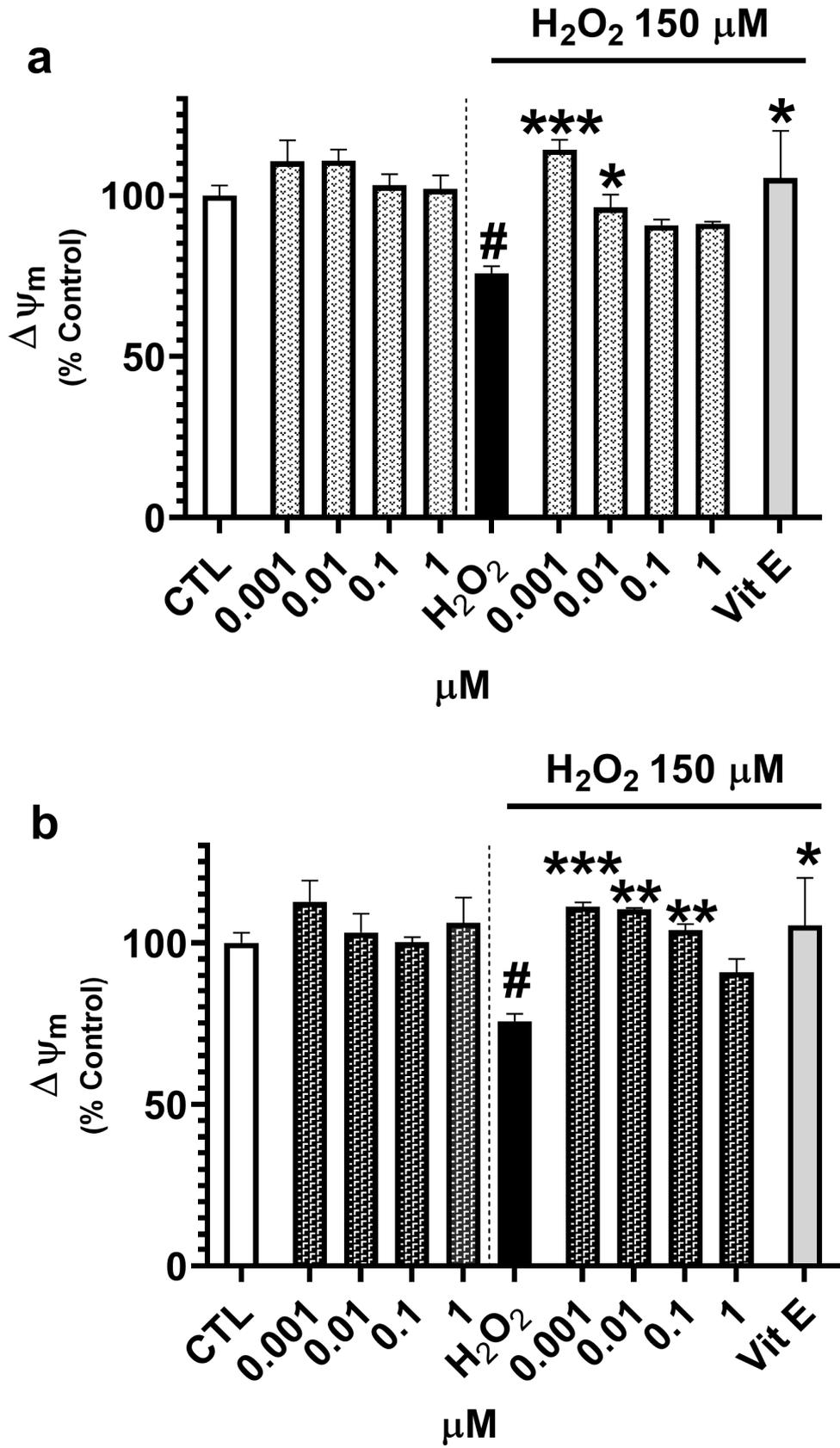


Figura 4

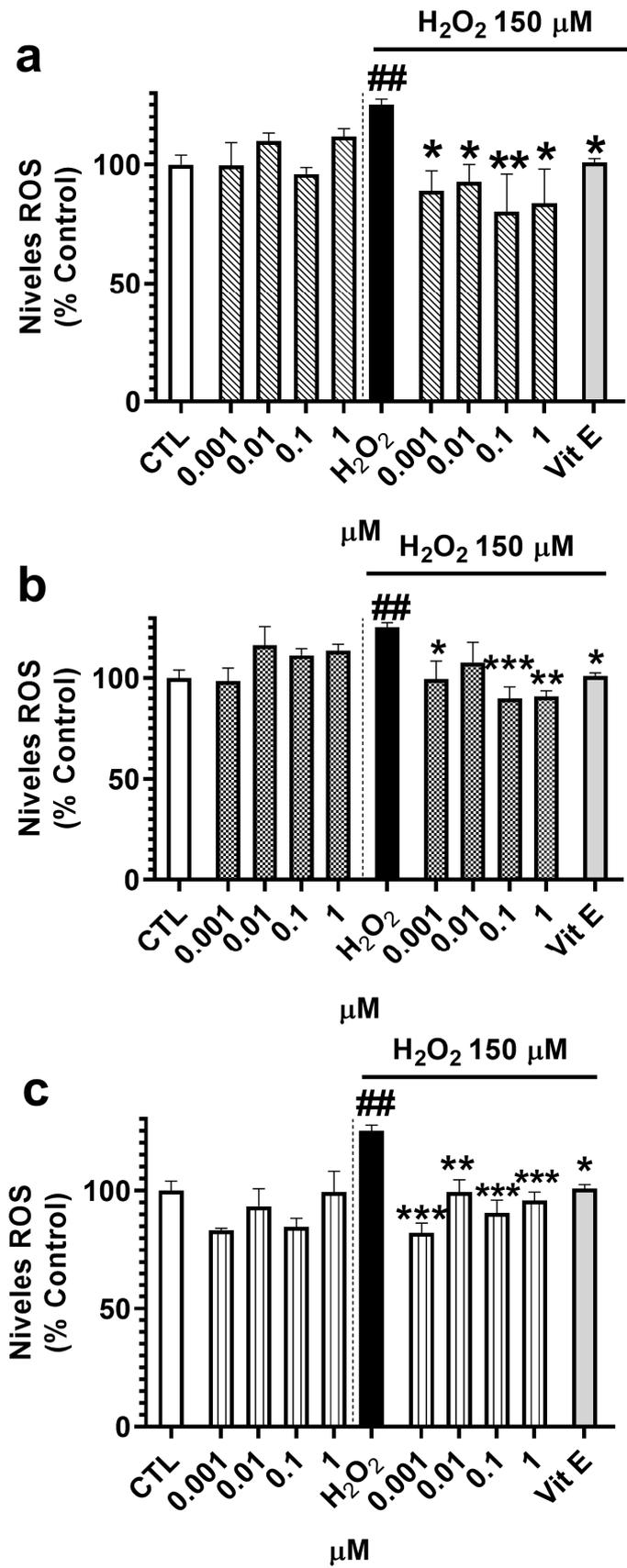


Figura 5

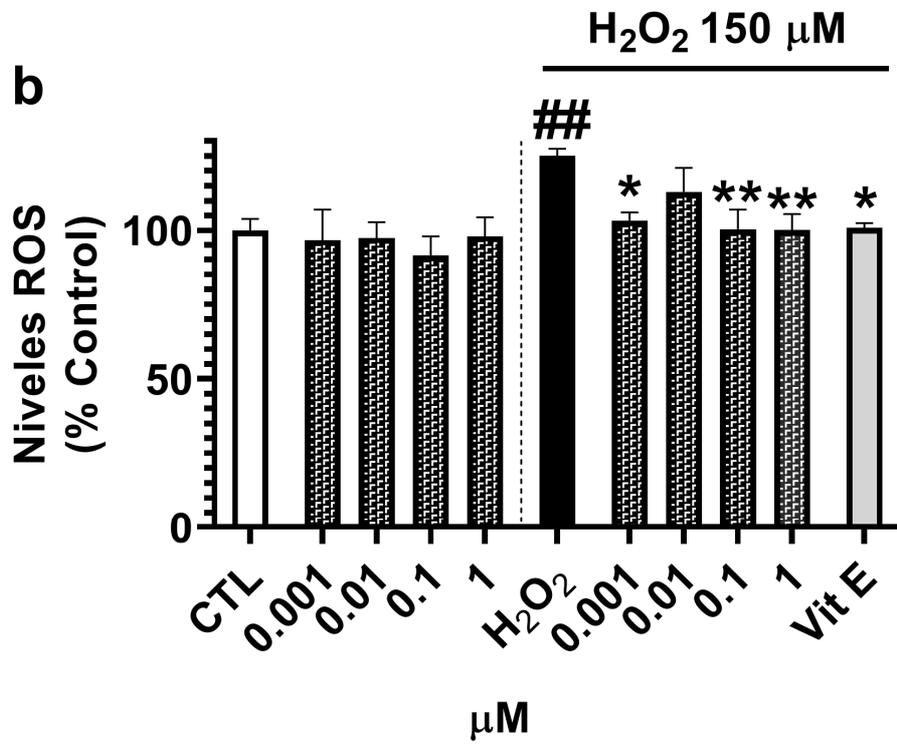
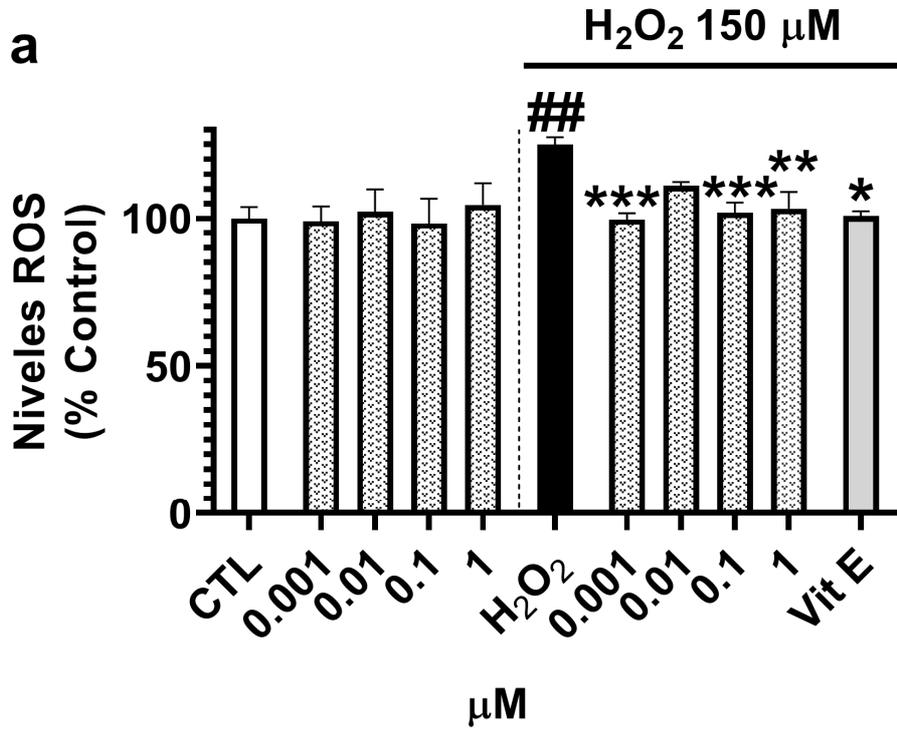


Figura 6

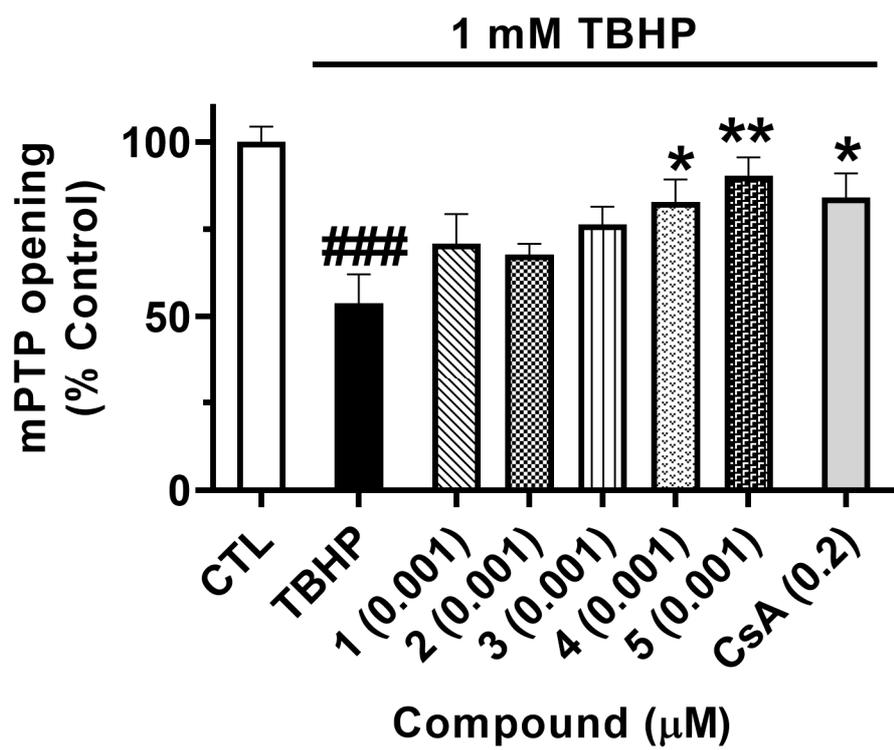


Figura 7

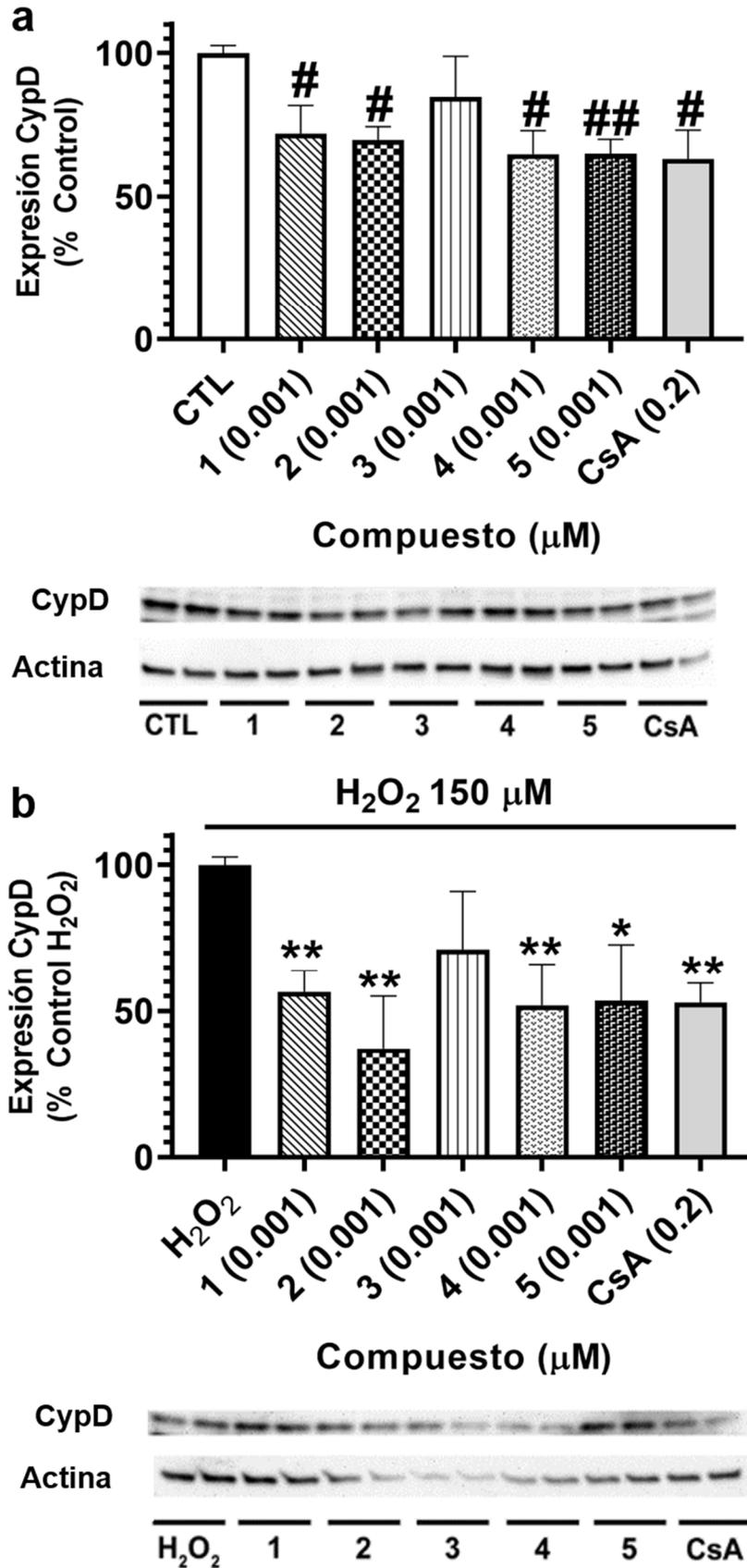


Figura 8

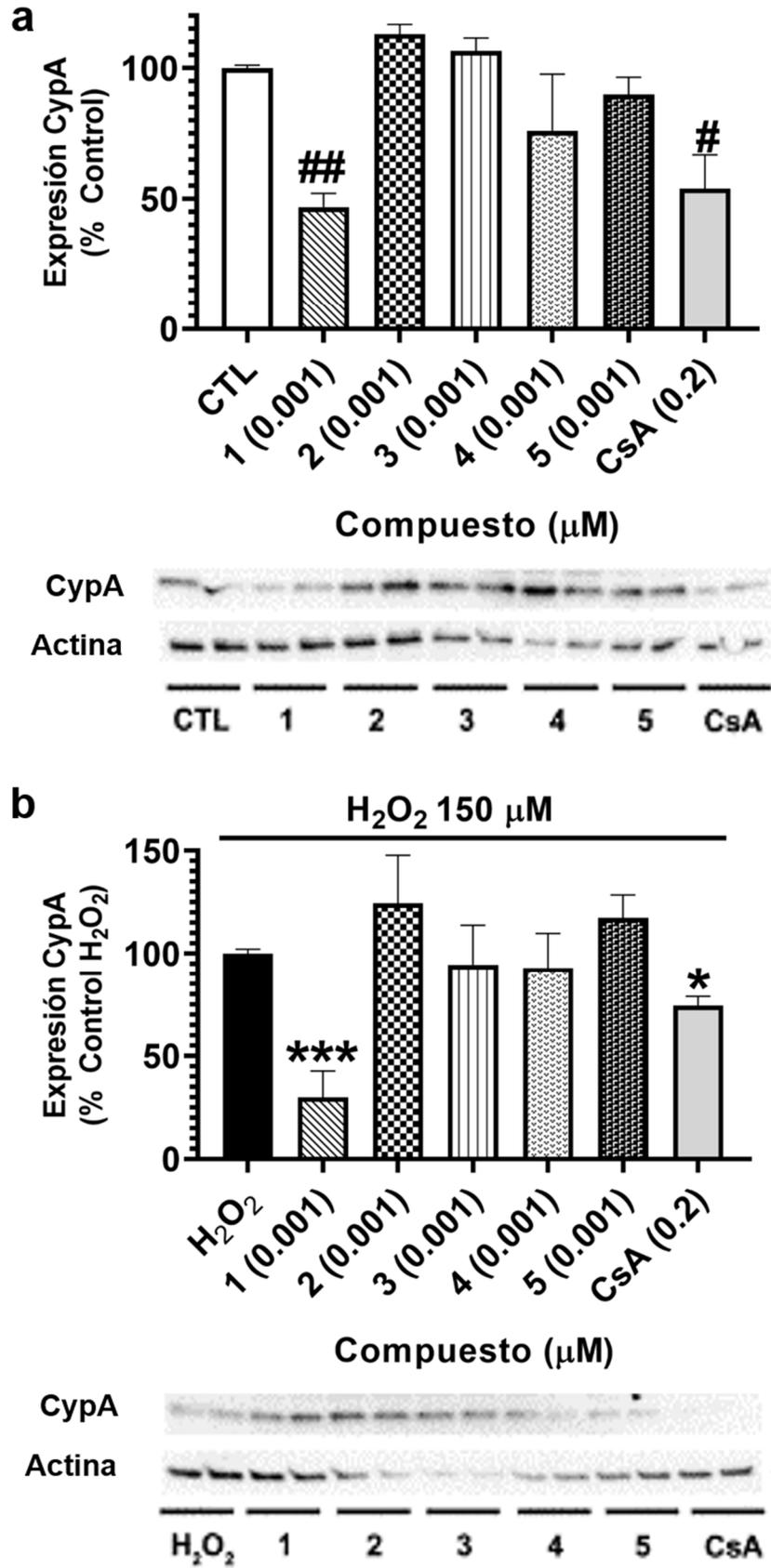


Figura 9

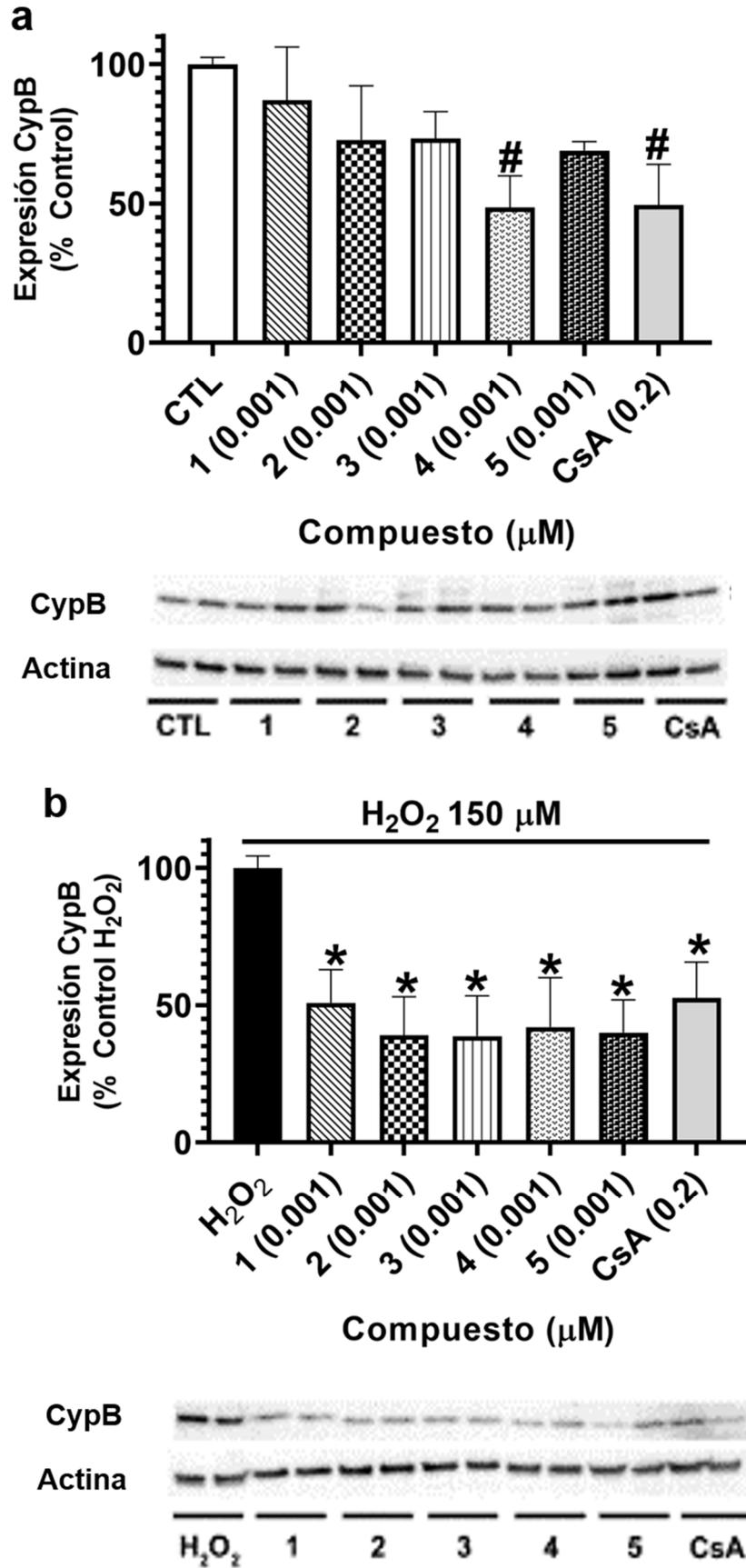


Figura 10

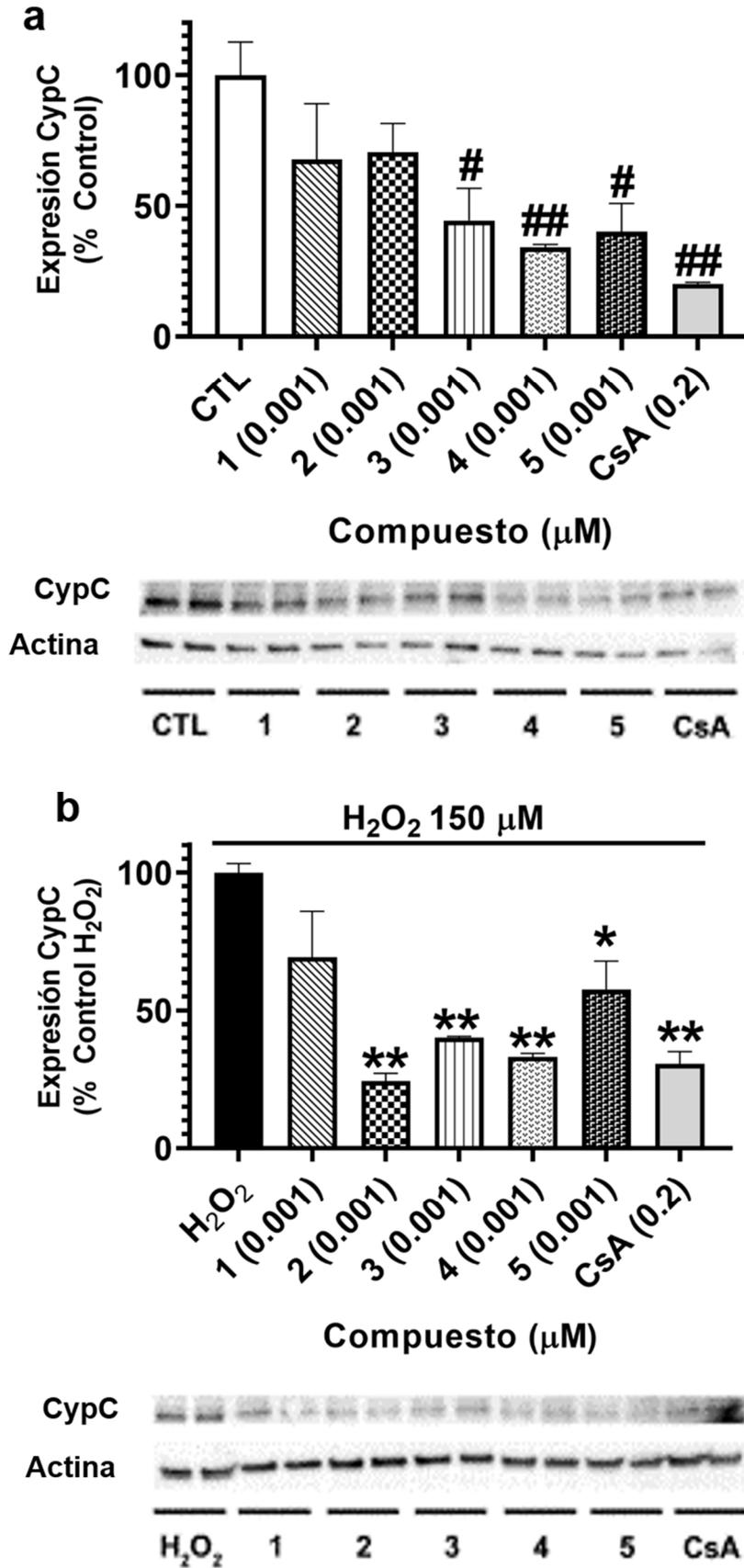


Figura 11

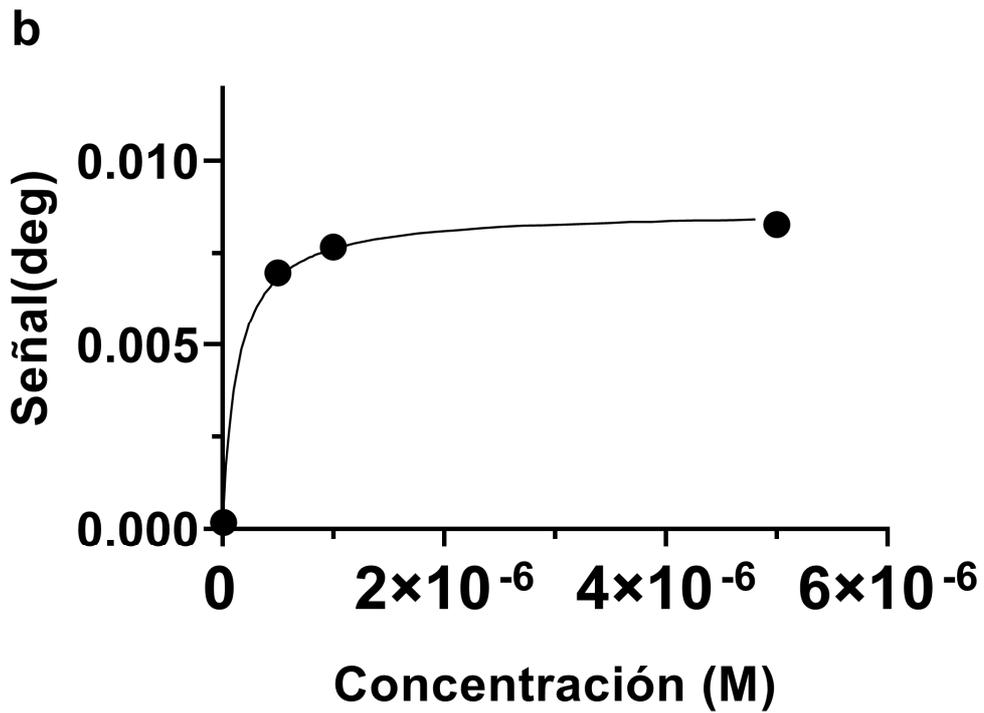
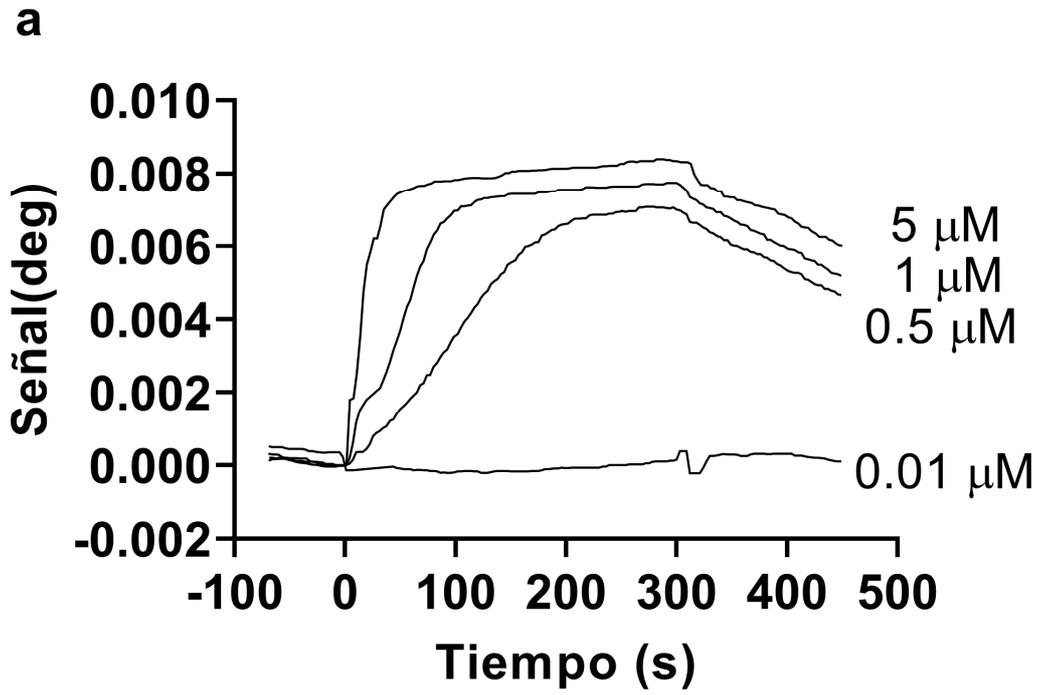


Figura 12

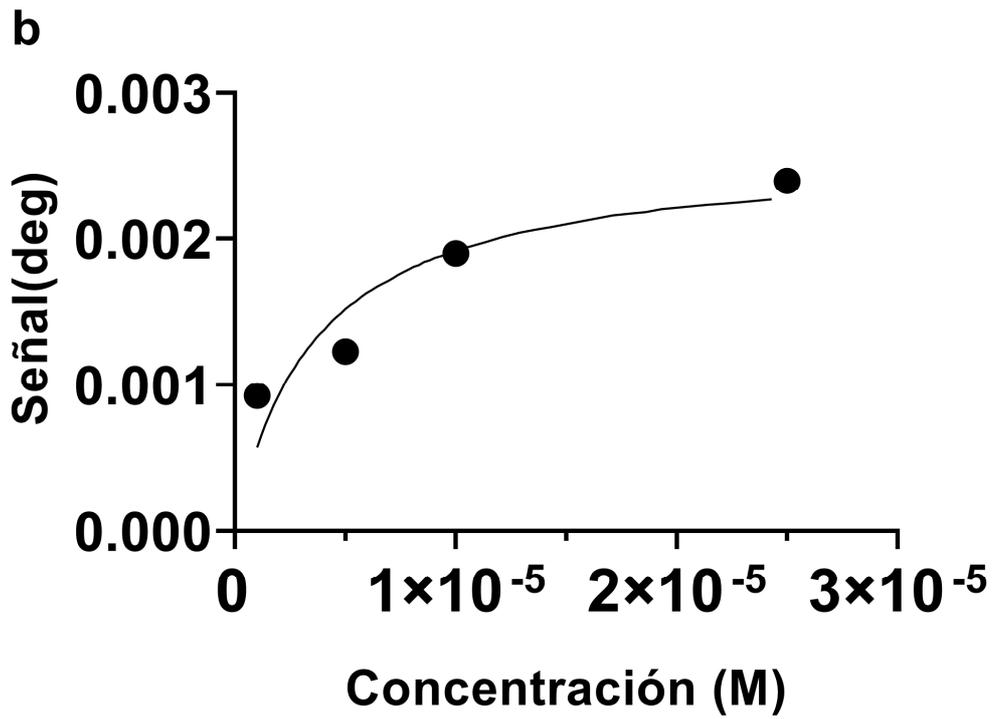
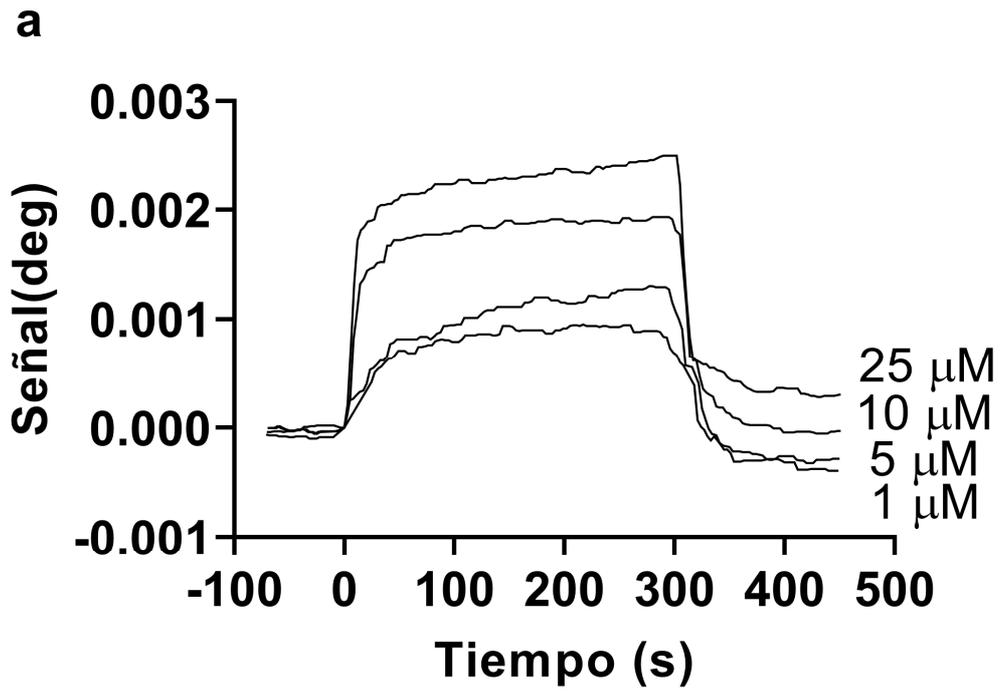


Figura 13

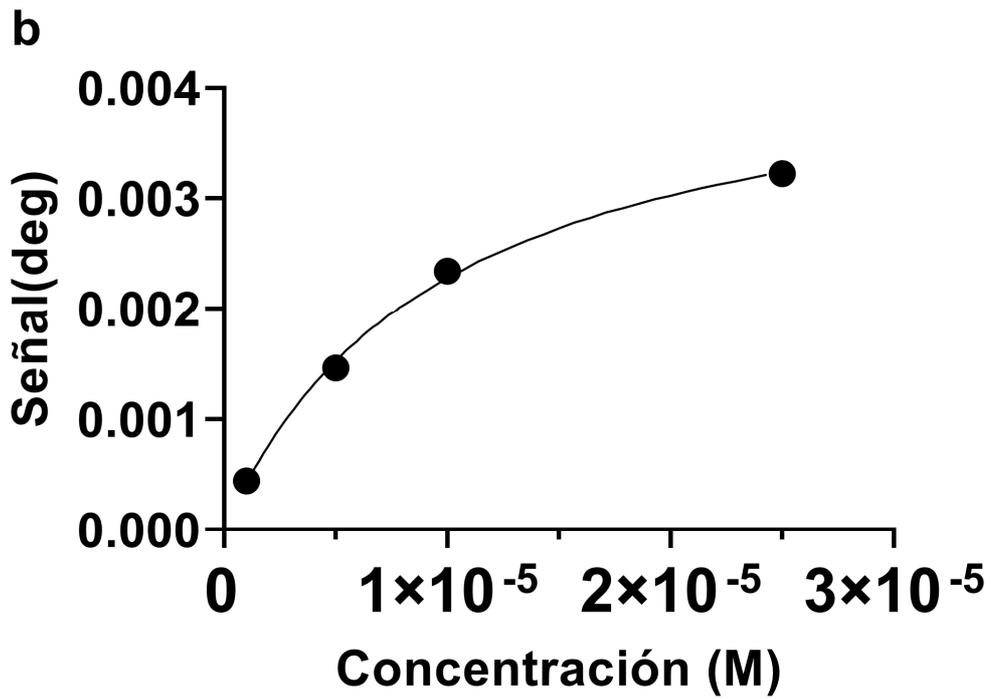
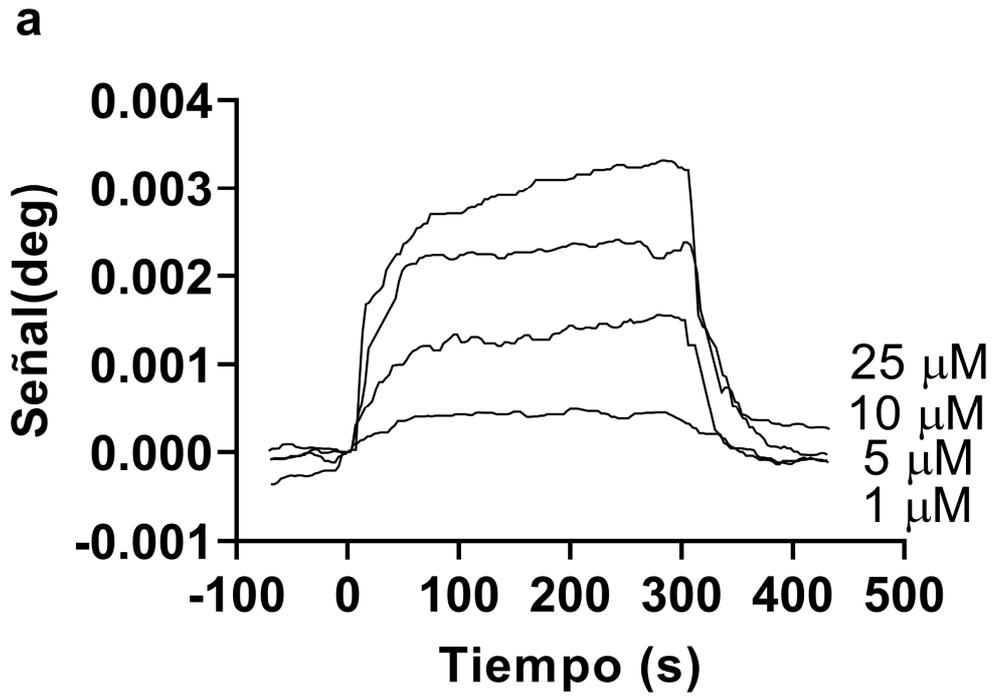


Figura 14

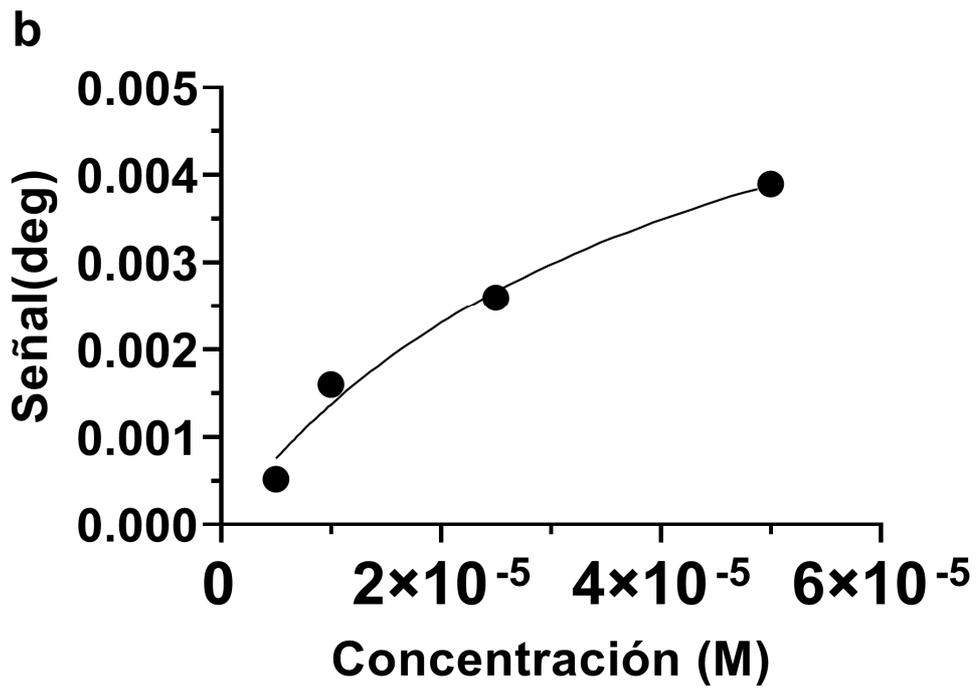
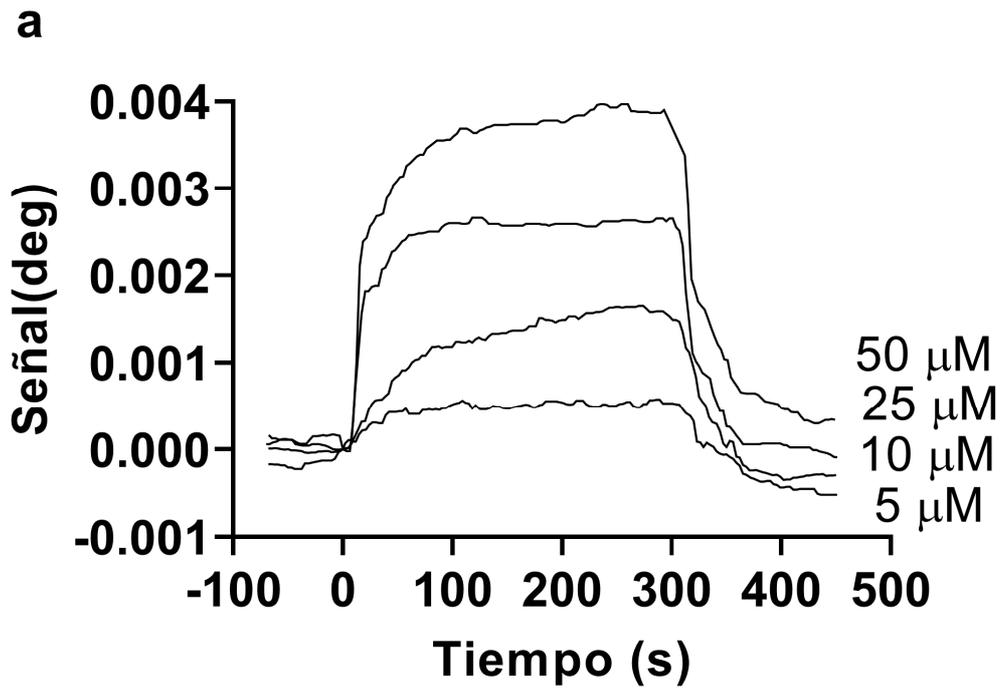


Figura 15

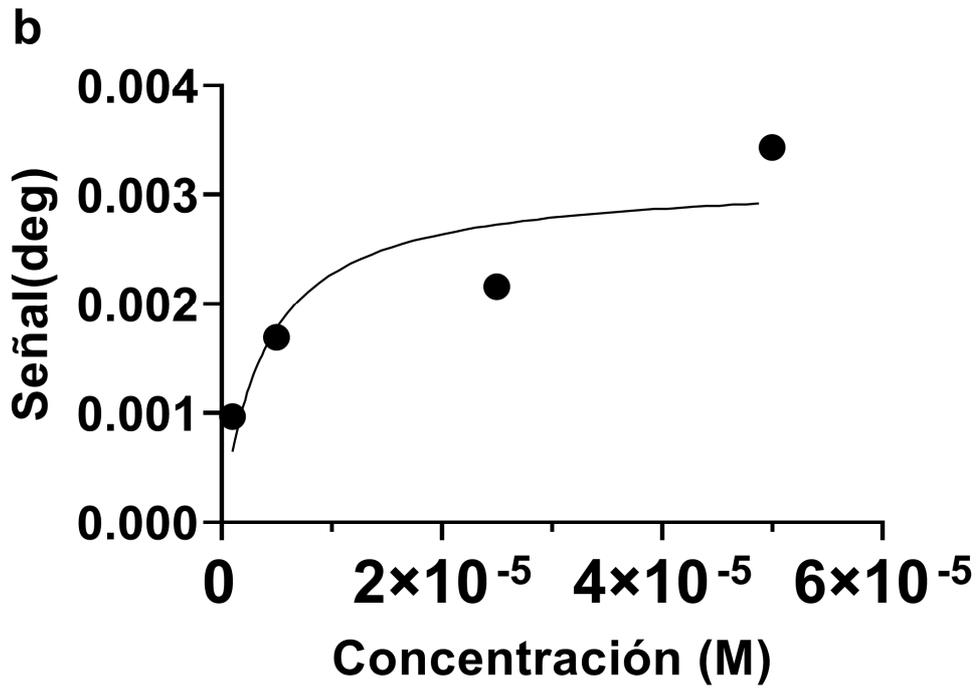
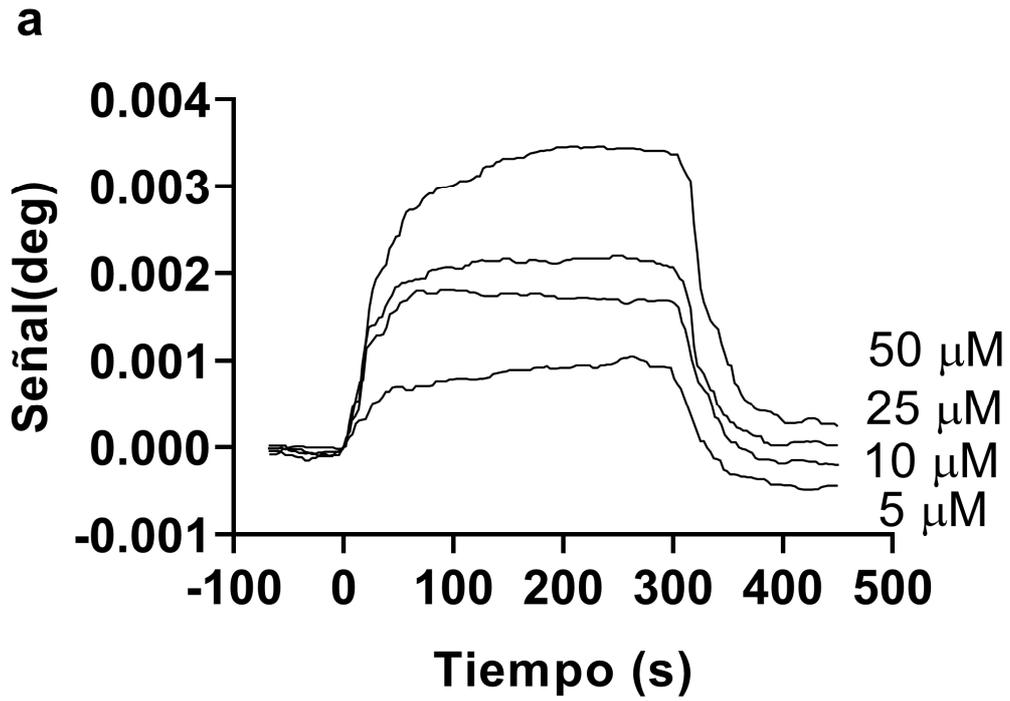


Figura 16

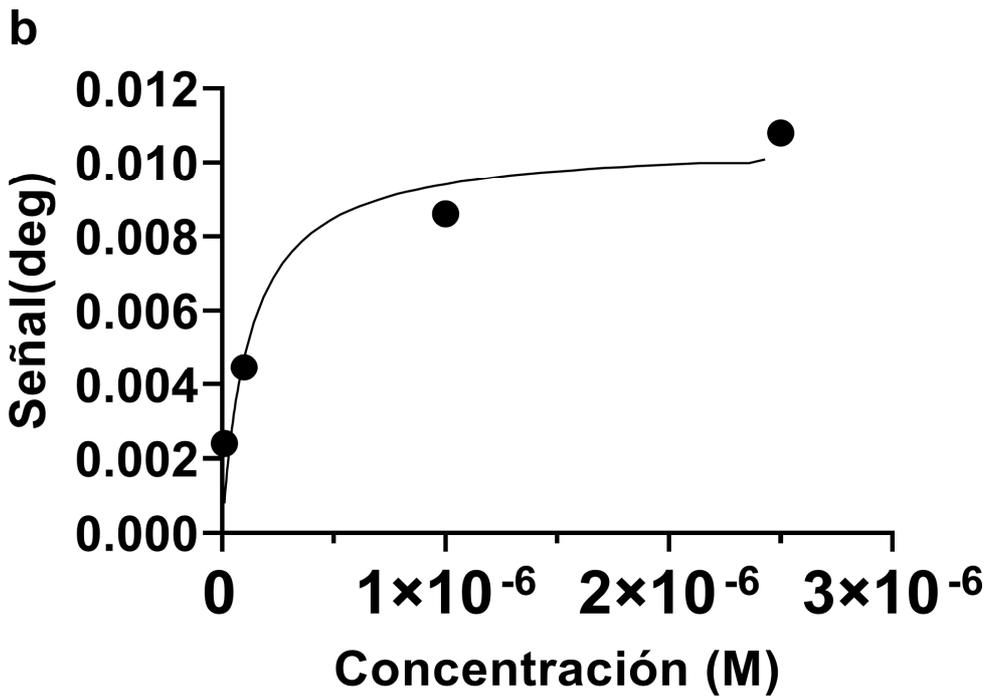
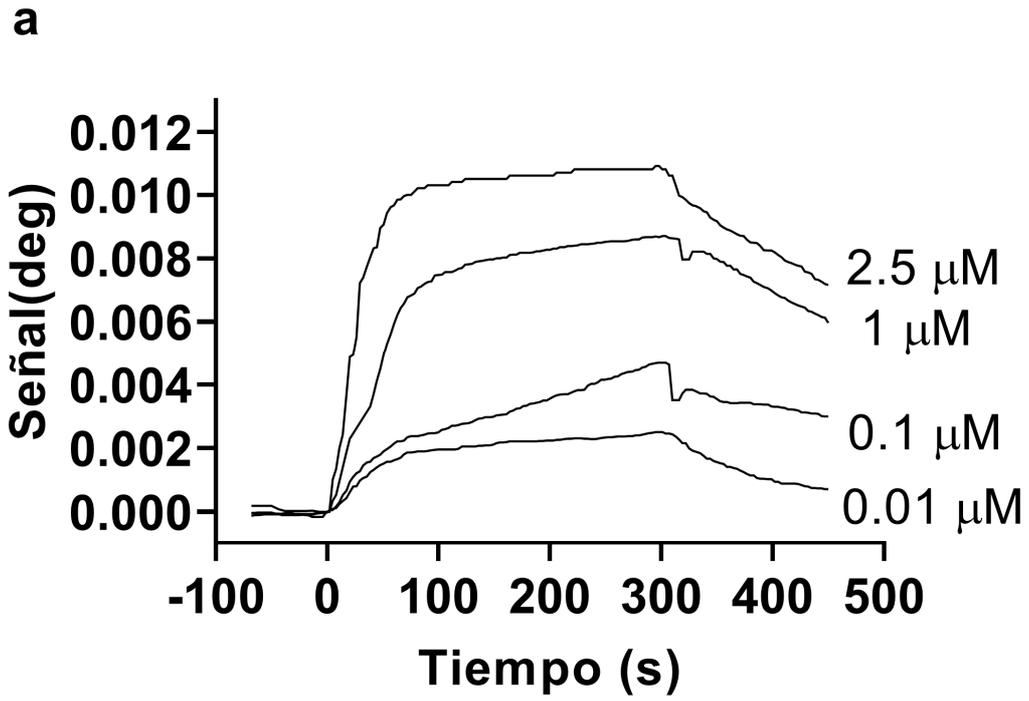


Figura 17

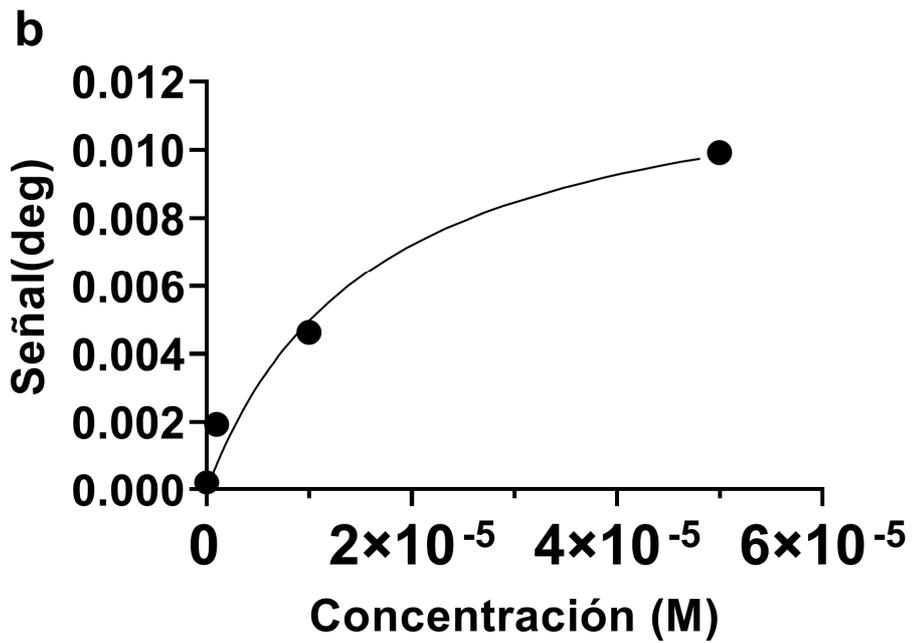
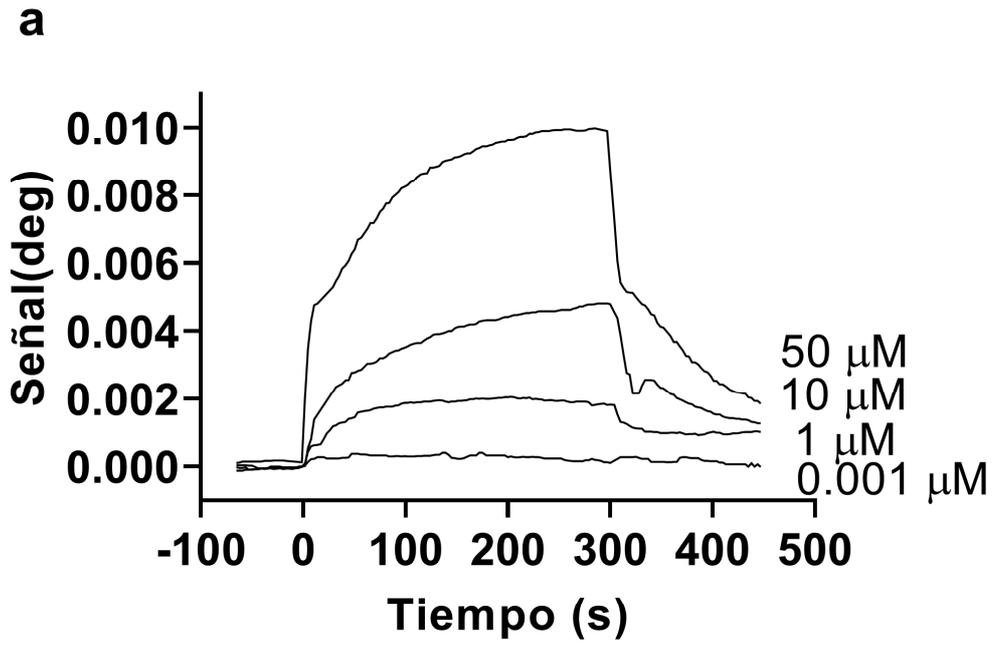


Figura 18

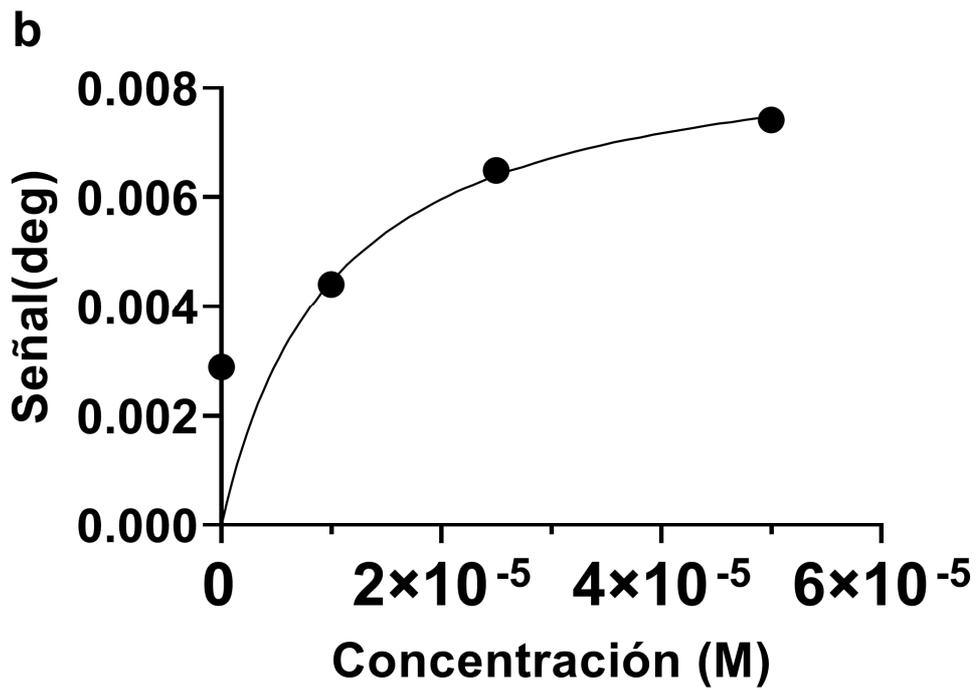
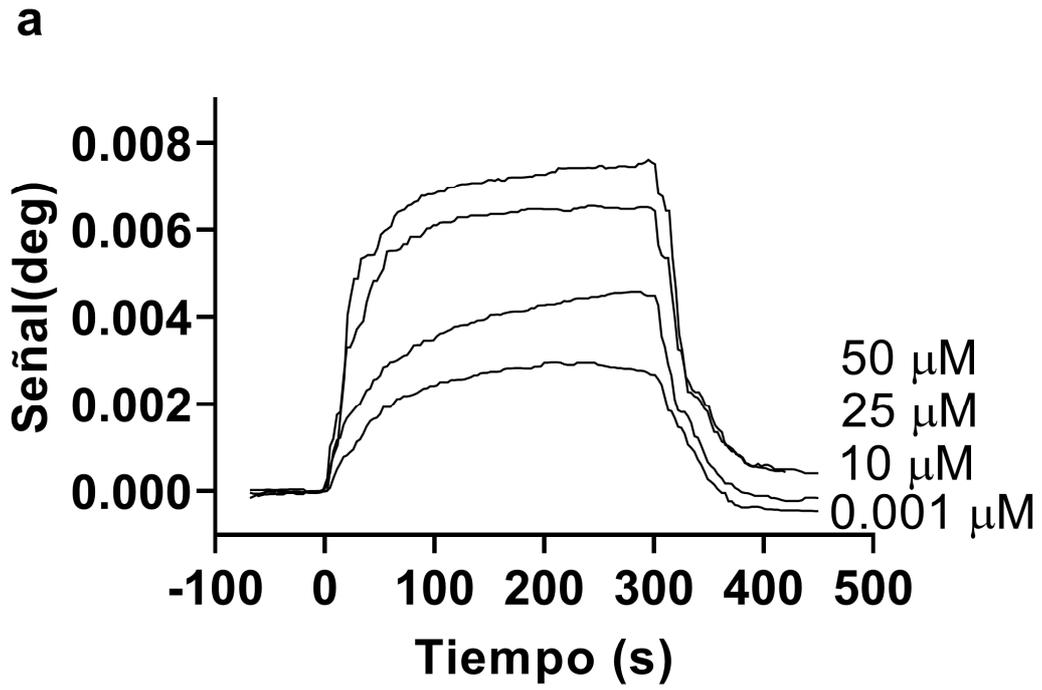


Figura 19

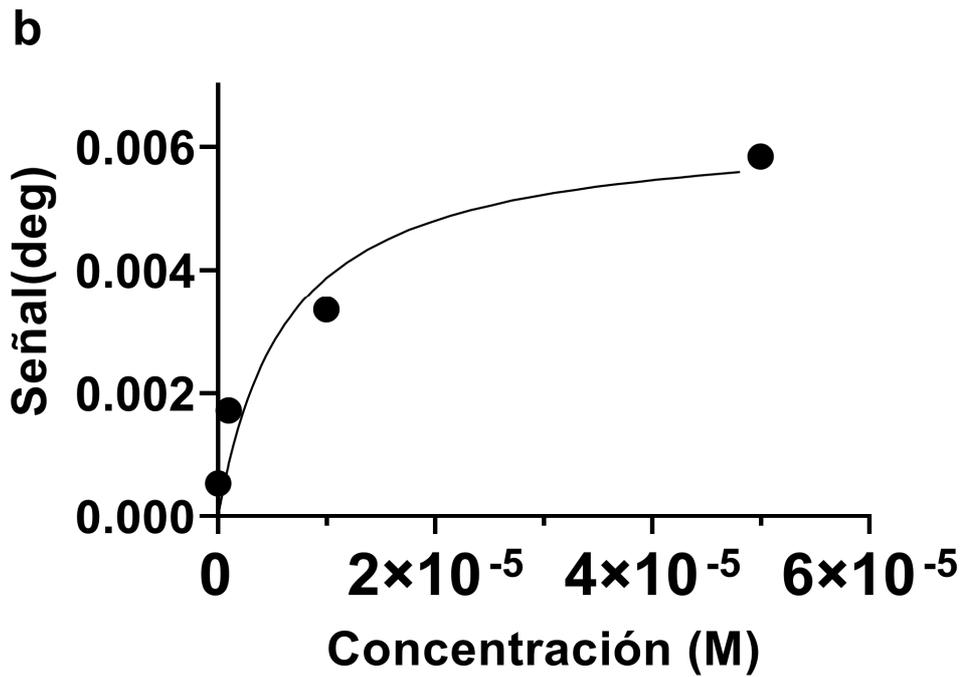
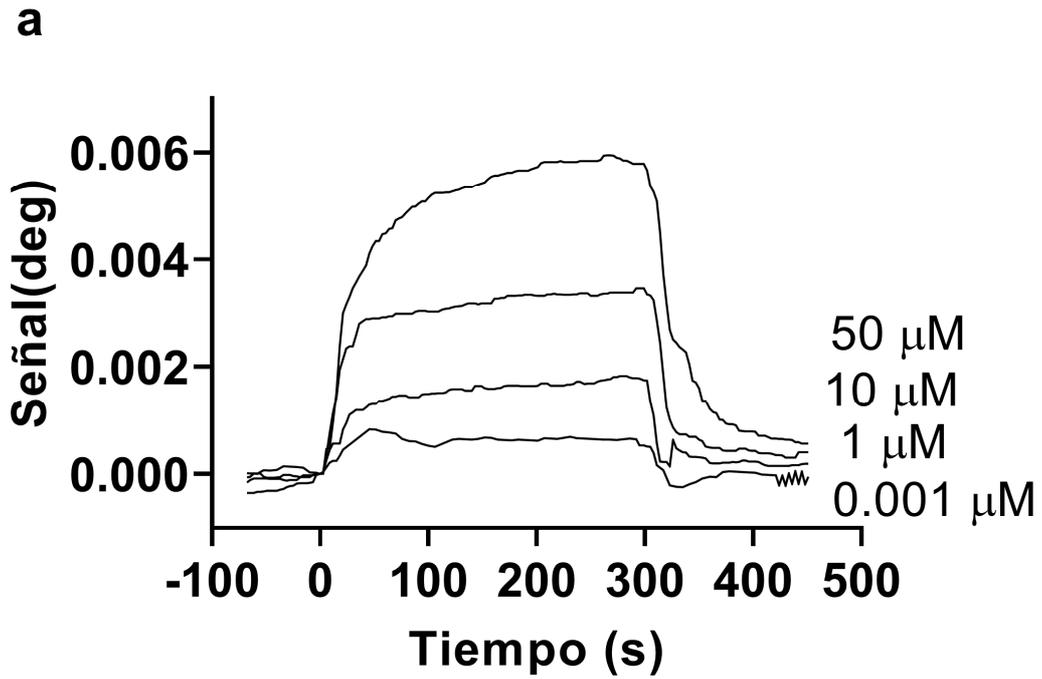


Figura 20

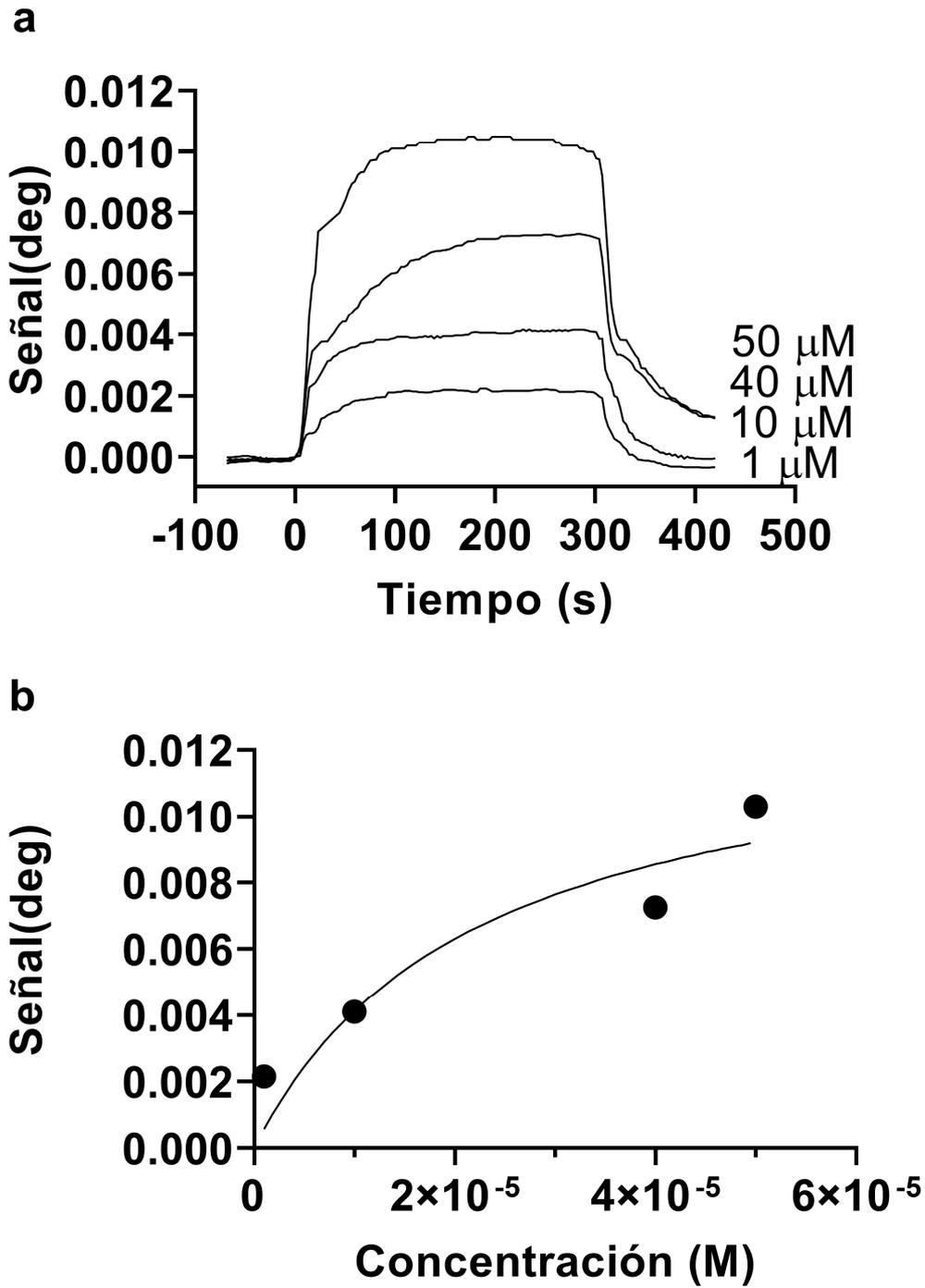
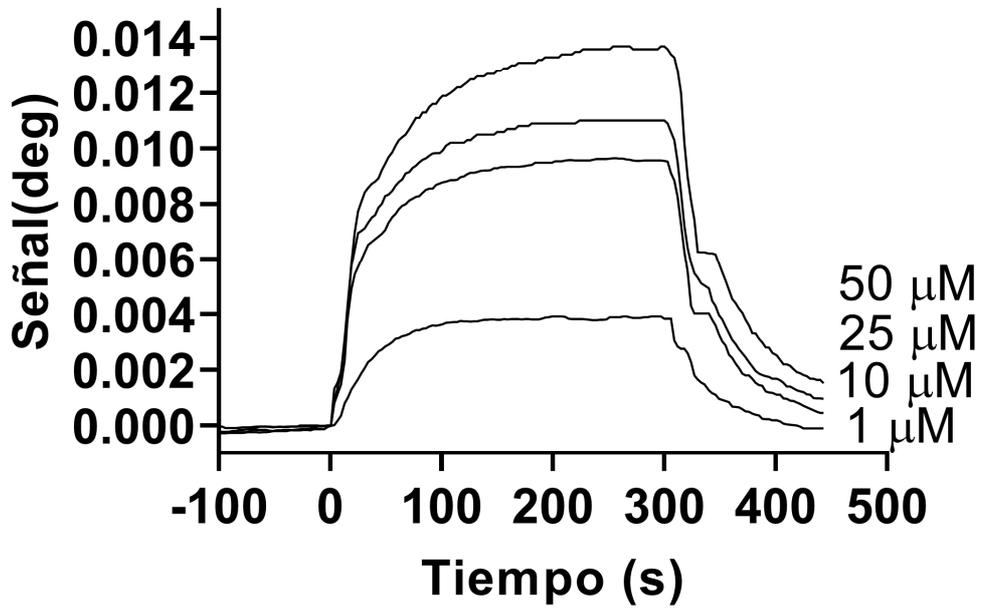


Figura 21

a



b

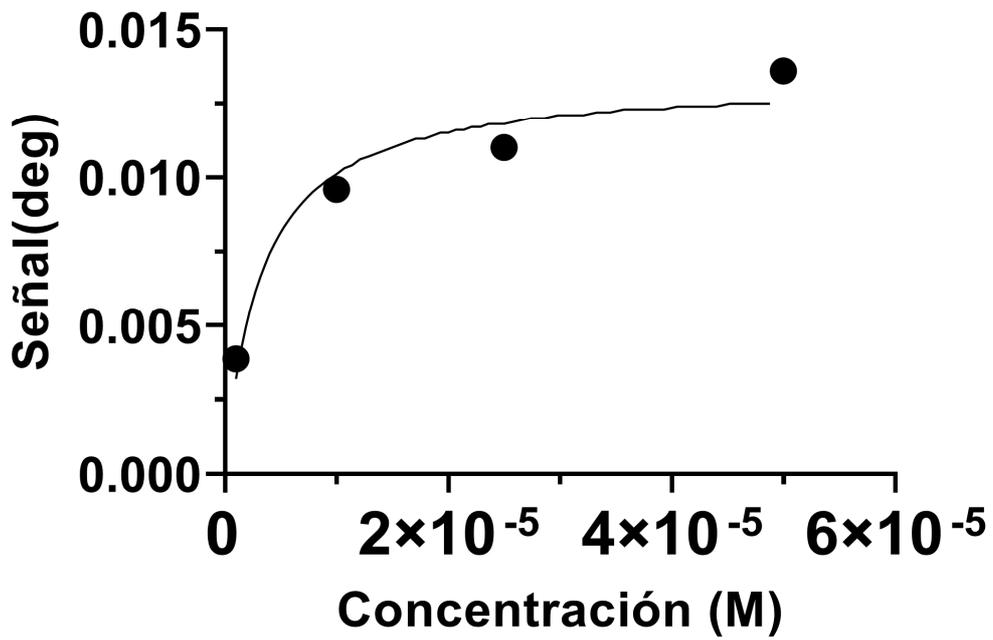


Figura 22



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 202230149

②² Fecha de presentación de la solicitud: 23.02.2022

②³ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. ci.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤ ⁶ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| A | PECH-PUCH, D. et al. "Cytotoxic Furanoditerpenes from the Sponge <i>Spongia tubulifera</i> Collected in the Mexican Caribbean". <i>Marine Drugs</i> 2019, Volumen 17, Número 7, artículo 416. DOI: 10.3390/md17070416. ISSN: 1660-3397. [Disponible en línea el 16.07.2019]. [Recuperado el 05.09.2022]. Recuperado de: < https://www.mdpi.com/1660-3397/17/7/416 >. Ver página 1, resumen; página 2, esquema 1; página 6; tabla 2. | 1-7 |
| A | AHMADI, P. et al. "Spongian Diterpenes from the Sponge <i>Hyattella aff. intestinalis</i> ". <i>Chemical and Pharmaceutical Bulletin</i> 2017, Volumen 65, Número 9, páginas 874-877. DOI: 10.1248/cpb.c17-00297. ISSN: 0009-2363. [Disponible en línea el 23.06.2017]. [Recuperado el 02.09.2022]. Recuperado de: < https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/65/9/65_c17-00300/_article/-char/en >. Ver página 874, resumen; página 876, figura 1. | 1-7 |
| A | EP 0285301 A2 (HARBOR BRANCH OCEANOGRAPHIC INSTITUTION, INC.) 05.10.1988, página 2, líneas 39-42; página 3, fórmula I; página 6, fórmula 3; página 11, tablas 1 y 2. | 1-7 |
| A | WARNE, J. et al. "Selective Inhibition of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Protects against Neurodegeneration in Experimental Multiple Sclerosis". <i>The Journal of Biological Chemistry</i> 2016, Volumen 291, Número 9, páginas 4356-4373. DOI: 10.1074/jbc.M115.700385. ISSN: 0021-9258; 1083-351X (en línea). [Disponible en línea el 17.12.2015]. [Recuperado el 05.09.2022]. Recuperado de: < https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)43584-7/fulltext >. Ver página 4356, resumen; página 4362, figura 1. | 1-7 |
| A | NIGRO, P. et al. "Cyclophilin A: a key player for human disease". <i>Cell Death and Disease</i> 2013, Volumen 4, Número 10, artículo e888. DOI: 10.1038/cddis.2013.410. ISSN: 2041-4889. [Disponible en línea el 31.10.2013]. [Recuperado el 05.09.2022]. Recuperado de: < https://www.nature.com/articles/cddis2013410 >. Ver página 1, resumen; página 2, tabla 1. | 1-7 |

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: 1-7

Fecha de realización del informe
07.09.2022

Examinador
G. Esteban García

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D307/92 (2006.01)

A61K31/343 (2006.01)

A61P25/28 (2006.01)

A61P37/06 (2006.01)

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

C07D, 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, REGISTRY, CAPLUS, NPL, XPESP, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, NCBI (PUBMED), GOOGLE SCHOLAR