



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 363 975**

⑫ Número de solicitud: 201030162

⑮ Int. Cl.:
C07D 313/20 (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **08.02.2010**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **22.08.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
22.08.2011

⑰ Solicitante/s:
Universidad de Santiago de Compostela
Centro de Innovación e Transferencia de
Tecnología
Edificio Emprendia, Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES

⑱ Inventor/es: **Botana López, Luis Miguel;**
Alonso López, Eva y
Vale González, Carmen

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

②④ Título: **Uso de la yesotoxina, análogos y derivados para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades neurodegenerativas relacionadas con tau y β -amiloide.**

②⑤ Resumen:

Uso de la yesotoxina, análogos y derivados para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades neurodegenerativas relacionadas con tau y β -amiloide.

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biomedicina y de la química farmacéutica. Específicamente, se refiere al uso la yesotoxina, sus derivados y análogos para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas relacionados con niveles anormales de proteínas tau y β -amiloide, como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer.

ES 2 363 975 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de la yesotoxina, análogos y derivados para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades neurodegenerativas relacionadas con tau y β -amiloide.

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biomedicina y de la química farmacéutica. Específicamente, se refiere al uso la yesotoxina, sus derivados y análogos para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas relacionados con niveles anormales de proteínas tau y β -amiloide, como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer.

Estado de la técnica anterior

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa de carácter progresivo, de origen todavía desconocido, y frente a la que actualmente no se puede ofrecer ningún tratamiento capaz de curarla o prevenirla. Dicha enfermedad afecta a entre el 5 y el 7% de las personas de más de sesenta y cinco años y es la causa de invalidez y dependencia más frecuente, en la actualidad, entre las personas de edad avanzada. Se estima que 8 millones de europeos están afectados por la enfermedad de Alzheimer y, teniendo en cuenta el envejecimiento de la población, se prevé que el número de enfermos se duplique en 2020 y triplique en 2050.

Esta enfermedad está caracterizada por una progresiva pérdida de memoria y de otras capacidades mentales a medida que las neuronas degeneran y diferentes zonas del cerebro se atrofian. A nivel neuropatológico la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la aparición de dos estructuras anormales que se acumulan en el cerebro. Estas estructuras son los depósitos amiloides y las placas neurofibrilares.

Los depósitos amiloides son fibras insolubles localizadas intra- y extracelularmente formadas por el péptido β -amiloide (β A), más concretamente por las formas β A40 y β A42, el cual es generado por la ruptura proteolítica de la proteína precursora de β -amiloide (APP) de forma secuencial por β -secretasas y γ -secretasas (Shirwany *et al.* 2007 *Neuropsychiatric Disease and Treatment*; 3, 597-612). Este péptido se encuentra de forma normal en el cerebro en cantidades pico o nanomolares. En dichas cantidades este péptido se encuentra en forma soluble. Cuando se da un incremento de β -amiloide por un procesamiento anómalo de la proteína precursora de β -amiloide (APP), este se vuelve insoluble dando lugar a la formación de los depósitos. Diversas mutaciones en la proteína precursora de β -amiloide se encuentran relacionadas con la enfermedad de Alzheimer debido al incremento o alteración de la transformación de APP en β -amiloide. En pacientes con enfermedad de Alzheimer, los agregados de β -amiloide aparecen en regiones cerebrales específicas, desencadenando una respuesta inflamatoria, muerte neuronal y deterioro cognitivo progresivo. Este péptido β -amiloide, también ha sido implicado en defectos neuropatológicos en individuos con síndrome de Down.

Por su parte, las marañas neurofibrilares, en cambio, son filamentos intracelulares formados por la polimerización de la proteína tau, que de forma normal actúa como una proteína asociada a los microtúbulos de los axones neuronales. Estas estructuras, las cuales se acumulan en el citoplasma de las neuronas degeneradas, fueron denominadas "filamentos pareados helicoidales" o PHFs. Estos presentan características diferentes a los neurofilamentos y microtúbulos normales. El constituyente fundamental de los PHFs es la proteína tau fosforilada. La hiperfosforilación de tau es debida, bien a un incremento de la expresión de tau por lo que existe mayor cantidad de sustrato susceptible de ser fosforilado, o bien por una hiperfosforilación por parte de las kinasas. Esta fosforilación proteica aberrante de tau, se encuentra íntimamente relacionada con la agregación anómala de dicha proteína. Dicha hiperfosforilación de tau, en la actualidad, se encuentra implicada en unas 22 patologías entre las cuales destacan la enfermedad de Alzheimer, la demencia del lóbulo frontal (también llamada neurodegeneración frontotemporal), degeneración corticobasal, enfermedad de Pick y la enfermedad de Parkinson con demencia.

Inicialmente se desarrollaron estudios para tratar de dilucidar de forma independiente cual era la implicación tanto de tau como de β -amiloide en la enfermedad de Alzheimer. Además, las primeras aproximaciones al tratamiento de la enfermedad, iban dirigidas a la mejora de los efectos de cada una de estas proteínas también de forma independiente. En la actualidad, los estudios llevados a cabo demuestran que ambas proteínas podrían estar relacionadas, ya que los depósitos amiloides pueden afectar diferentes vías moleculares que facilitan la fosforilación de tau y su posterior agregación (Blurton-Jones *et al.* 2006, *Current Alzheimer Research*, 3(5), 435-448). Además los depósitos amiloides pueden activar diversas quinasas específicas que aumentan la hiperfosforilación de la proteína tau y por ello la formación de marañas neurofibrilares. A pesar de dicha relación, otros estudios llevados a cabo, indican que la mejora de la alteración en una de las proteínas no tiene porque llevar unida la mejora de la otra, llegando en algunos casos incluso a empeorarla (Oddo *et al.*, 2005. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 102(8), 3046-51). Por ello es necesario realizar estudios en modelos que presenten ambas patologías de forma simultánea.

En la actualidad existen varios tratamientos para el Alzheimer que no permiten la curación de la enfermedad sino que actúan retardando el progreso de la misma. El único fármaco o medicamento aprobado para el tratamiento de la enfermedad cuando esta ya se encuentra en un desarrollo moderado o severo, es decir, en estadios avanzados de la misma, es la memantina, un antagonista no competitivo de los receptores NMDA (*N*-metil-*D*-aspartato), que evita el efecto tóxico del glutamato a altas concentraciones, en neuronas. Otros compuestos, en este caso utilizados

para evitar el desarrollo de la misma, son por ejemplo el donepezil o la rivastigmina, que actúan inhibiendo la acetilcolinesterasa, aumentando los niveles del neurotransmisor acetilcolina (A. Fisher 2008, *Neurotherapeutics*; 5:433-442).

- 5 Todo esto encamina el futuro estudio de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas hacia la búsqueda de fármacos que actúen sobre ambas alteraciones y que por tanto lleven a una mejora completa de la enfermedad.

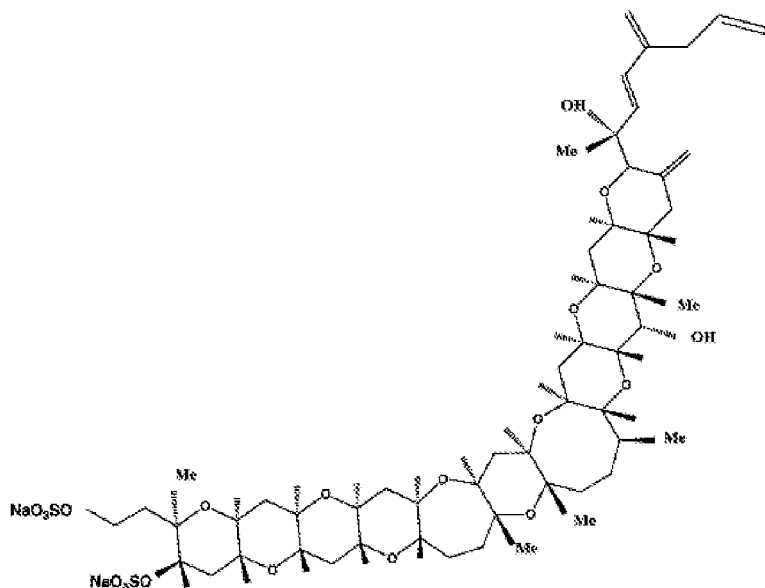
10 Actualmente, una de las fuentes más importantes de compuestos que pueden resultar útiles para la producción de fármacos es el medio marino. Aquí se han encontrado multitud de recursos bioquímicos que han demostrado ser de gran utilidad sanitaria como por ejemplo fármacos con actividad antitumoral. Dentro de estos compuestos, las ficotoxinas marinas pueden tener una gran aplicabilidad clínica debido a su gran diversidad y, por tanto, a los múltiples mecanismos de acción y respuestas celulares que desencadenan.

15 La yesotoxina fue aislada por primera vez en 1986 de la vieira *Patinopecten yessoensis*. Posteriormente se ha descrito que la yesotoxina es producida por los dinoflagelados *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* y *Gonyaulax spinifera*. Esta ficotoxina presenta una estructura de polieter, y se engloba habitualmente dentro de las toxinas diarreas puesto que se extrae de manera simultánea con estas toxinas aunque las yesotoxinas no producen diarrea (Paz *et al.*, Marine Drugs 2008, 73-102). Aunque el mecanismo de acción de las yesotoxinas no está completamente caracterizado se ha descrito que su principal diana farmacológica es la activación de fosfodiesterasas (Alfonso *et al.*, Biochemical Pharmacology, 2003, 193-208. Este compuesto no presenta toxicidad oral ni se han descrito daños en órganos después de la administración de yesotoxina (Paz *et al.*, Marine Drugs 2008, 73-102). En la actualidad se conocen más de 40 análogos de la yesotoxina.

25 Por lo tanto, existe la necesidad de encontrar un tratamiento efectivo que actúe sobre los 2 grandes elementos implicados en la progresión de enfermedades como el Alzheimer como son los depósitos de β -amiloide y la hiperfosforilación de tau.

30 Descripción de la invención

La yesotoxina es un compuesto polieter disulfatado que se extrae junto con las toxinas diarreas, y de estructura química (II). Su fórmula es $C_{55}H_{82}O_{21}S_2Na_2$. Se trata de un compuesto de origen marino, producido por los dinoflagelados denominados *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* y *Gonyaulax spinifera*.

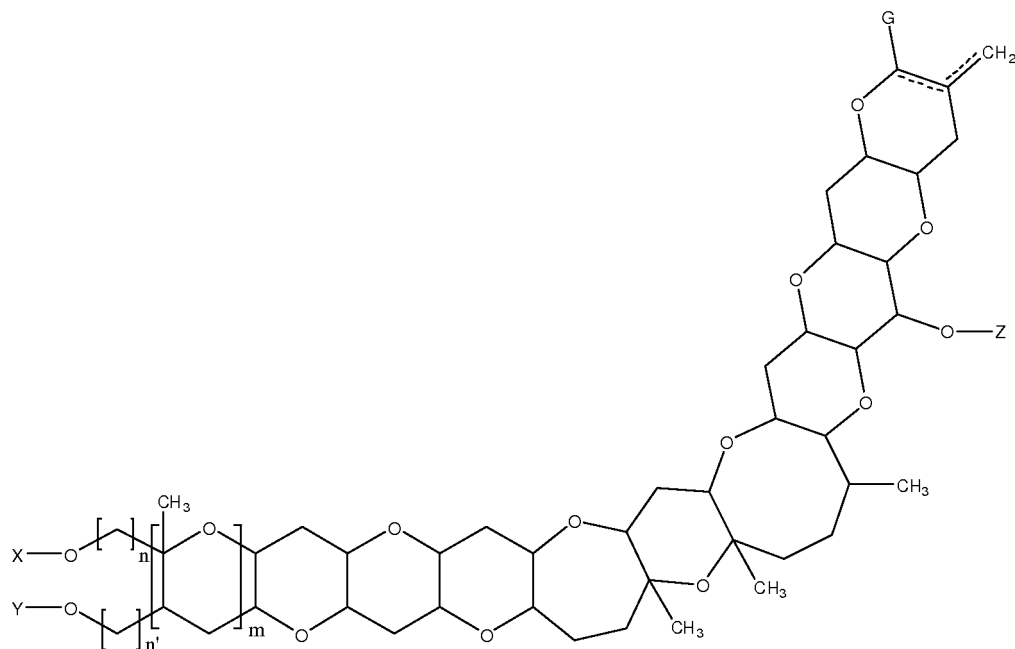


La yesotoxina presenta descritos numerosos análogos, aunque la estructura de algunos de ellos todavía se desconoce. Habitualmente el peso molecular de las yesotoxinas se encuentra entre 955 y 1551 unidades de masa. En la actualidad se han identificado 36 derivados naturales de la yesotoxina. Algunas de las yesotoxinas son producidas directamente por dinoflagelados mientras que otras son producidas durante el metabolismo en el marisco.

ES 2 363 975 A1

Por otro lado, esta molécula puede ser sometida a modificaciones que den lugar a diversos derivados que pueden presentar una funcionalidad similar. Todos estos compuestos, tanto los análogos como los derivados, presentan una estructura química común (I) con la yesotoxina.

De esta forma, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I):



(I)

donde

X e Y se seleccionan independientemente entre H o SO₃H,

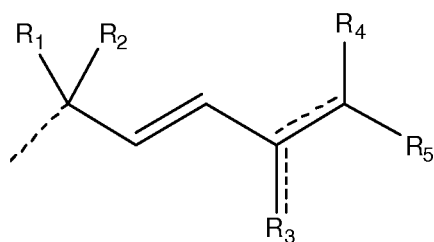
m puede ser 0 ó 1,

n y n' se seleccionan independientemente entre 0 y 5,

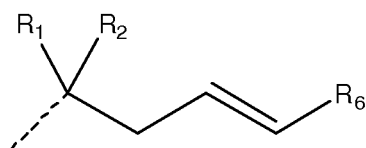
Z se selecciona entre H, un monosacárido u oligosacárido,

el símbolo ----- representa un enlace sencillo o doble,

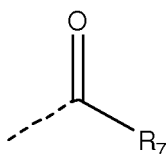
G es un grupo que se selecciona de entre los grupos de fórmula (II) a (IV):



(II)



(III)



(IV)

donde

R₁ y R₂ se seleccionan independientemente entre -OH o alquilo C₁-C₅;

R₃, R₄ y R₅ se seleccionan independientemente entre H, alquilo C₁-C₁₀, alqueno C₁-C₁₀, -OH, COOH, O;

R₆ y R₇ se seleccionan independientemente entre alquilo C₁-C₁₀ o alqueno C₁-C₁₀, amida,

o sus sales, isómeros o solvatos,

para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

El término “alquilo” se refiere, en la presente invención, a radicales de cadenas hidrocarbonadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 5, y que se unen al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *tert*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, etc. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, carbonilo, ciano, acilo, alcoxycarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

El término “alqueno” se refiere a radicales de cadenas hidrocarbonadas que contienen uno o más enlaces carbono-carbono dobles, por ejemplo, vinilo, 1-propenilo, alilo, isoprenilo, 2-butenilo, 1,3-butadienilo etc. Los radicales alquenos pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halo, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcoxycarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

El término “amida” se refiere en la presente invención, a un radical de fórmula RCONR'R” siendo R, R' y R” radicales alquilo, alqueno o átomos de hidrógeno.

En una realización preferida X e Y son SO₃H. En otra realización preferida X es H e Y es SO₃H. En otra realización preferida X es SO₃H e Y es H.

En una realización preferida, m es 1. En otra realización preferida m es 0. En otra realización preferida n es 1, 2 ó 3 y n' es 0. En otra realización preferida n es 0 y n' es 1, 2 ó 3.

En otra realización preferida, R₁ es metilo y R₂ es OH.

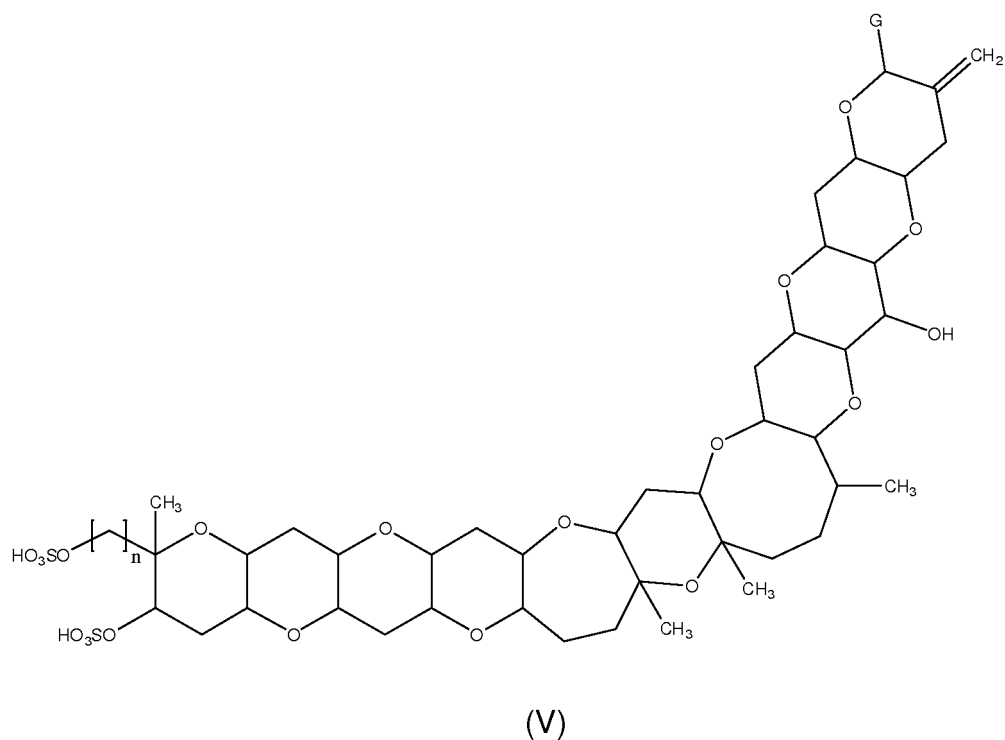
En otra realización preferida R₃ se selecciona entre H, alquilo C₁-C₄ o alqueno C₁-C₄ o COOH.

En otra realización preferida R₄ se selecciona entre H, OH, O.

En otra realización preferida R₅ se selecciona entre H, alquilo C₁-C₄, alqueno C₁-C₄, OH.

ES 2 363 975 A1

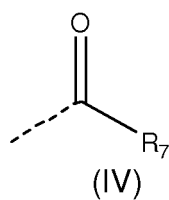
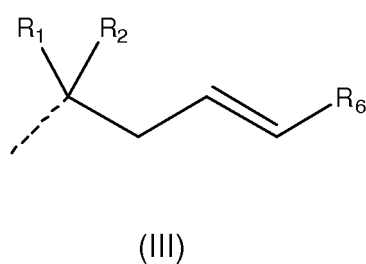
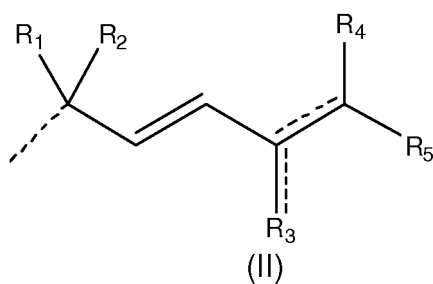
En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (V)



donde

n se selecciona entre 1, 2 ó 3,

G es un grupo que se selecciona de entre los grupos de fórmula (II) a (IV):



donde

R₁ y R₂ se seleccionan independientemente entre -OH o alquilo C₁-C₅;

R₃, R₄ y R₅ se seleccionan independientemente entre H, alquilo C₁-C₁₀, alqueno C₁-C₁₀, -OH, -COOH, =O;

R₆ y R₇ se seleccionan independientemente entre alquilo C₁-C₁₀ o alqueno C₁-C₁₀;

el símbolo ----- representa un enlace sencillo o doble,

o sus sales, isómeros o solvatos,

para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

En una realización aún más preferida, G es el grupo de fórmula (II).

En otra realización aún más preferida R_1 es metilo y R_2 es OH.

En una realización aún más preferida, R_3 se selecciona entre H, alquilo C_1-C_4 , alquenilo C_1-C_4 o COOH.

En una realización aún más preferida, R_4 se selecciona entre H, OH, O.

En una realización aún más preferida, R_5 se selecciona entre H, alquilo C_1-C_4 , alquenilo C_1-C_4 , OH.

En una realización aún más preferida, R_6 se selecciona entre alquilo C_1-C_4 , alquenilo C_1-C_4 o amida.

En una realización aún más preferida, R_7 es un alquilo C_1-C_4 .

En otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso de los análogos y derivados de yesotoxina o sus sales, isómeros o solvatos, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

El término “análogo” tal y como aquí se utiliza, se refiere a una sustancia química similar a otra sustancia química en estructura y/o función. Por ejemplo, pueden considerarse análogos de la yesotoxina (YTX), aunque sin limitarse, la 45-hidroxy-YTX, la 45, 46,47-Trinor-YTX, la 45, 46, 47-Trinorhomo-YTX, la Homo-YTX, la 45OH-Homo-YTX, la Carboxy-YTX, la Carboxyhomo-YTX, la 45OH-Carboxy-YTX, la Noroxo-YTX (41-keto-YTX), la Noroxohomo-YTX (41-ketohomo-YTX), la 40-epi-41-Keto-YTX, la 41-Keto-YTX-1,3-enona, la 41a-Homo-YTX, la 41a-Homo-YTXamida, la 44,45-diOH-YTX, la 44,45-diOH-41a-Homo-YTX, la 45-OH-dinor-YTX, la 44-Oxotrinor-YTX y la 41a-Homo-44-oxotrinor-YTX.

En la presente invención se entiende por “derivado”, aquel compuesto que se produce a partir de otro mediante modificaciones del mismo, y que presenta una funcionalidad similar. Estas modificaciones se pueden realizar por ejemplo, aunque sin limitarse, mediante métodos químicos, físicos, microbiológicos o farmacológicos. Pueden considerarse derivados de la yesotoxina aunque sin limitarse, los siguientes:

- Desulfoderivados: 1-Desulfo-YTX, 1-desulfocarboxylhomo-YTX y 4-Desulfocarboxyhomo-YTX
- Los derivados 9-metilo: 9-metil-41-keto-YTX-1,3-enona, 9-metil-41a-homo-YTX, 9-metil-41 a-homo-YTXamida y 44,45-diOH-9-metil-41^a-homoYTX.
- Los derivados sin anillo A: Nor-ring-A-YTX, nor-ring-A-41-keto-YTX, nor-ring-A-40-epi-41-keto-YTX y nor-ring-A-41-keto-YTX-1,3-enona.
- Los 32-glicosilderivados: glicosiyesotoxina A (GYTX-A), Protoceratina III, Yesosoxina 32-O-[β -L-arabinofuranosyl-(5' $\rightarrow$ 1'')- β -L-arabinofuranosido, Protoceratin II, Tri-glicosilyesotoxina y Protoceratin IV.

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I) o (V) pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo, Z, E), incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención, es decir, el término isómero también se refiere a cualquier mezcla de isómeros, como diastereómeros, racémicos, etc., incluso a sus isómeros ópticamente activos o las mezclas en distintas proporciones de los mismos. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

En una realización preferida, la enfermedad neurodegenerativa está relacionada con niveles anormales de proteínas β -amiloide y/o hiperfosforilación de tau.

El incremento tanto en β -amiloide como en la fosforilación de tau por separado o de forma conjunta, suele estar asociado a un proceso patológico. Estos procesos están relacionados fundamentalmente con el sistema nervioso, ya que su acumulación se da básicamente en neuronas, provocando su degeneración. La principal patología relacionada con estos dos elementos de forma conjunta, es la enfermedad de Alzheimer. Esta enfermedad cursa con incremento en los depósitos de β -amiloide, así como con hiperfosforilación de la proteína tau, lo que da lugar a marañas neurofibrilares que provocan la degeneración progresiva de neuronas y por tanto deterioros cognitivos y motores. Como se demuestra en los ejemplos, la yesotoxina, es capaz de reducir la sobreexpresión de β -amiloide y la hiperfosforilación de tau, pero no presenta efectos sobre ninguno de estas estructuras sino se encuentran alteradas. Esto indica que estos compuestos son útiles para el tratamiento de patologías relacionadas con el incremento en la expresión de β -amiloide o hiperfosforilación de tau tanto de forma independiente como de forma conjunta.

Se entiende por “patología relacionada con el incremento de β -amiloide” en la presente invención todas aquellas patologías que cursan, bien con un incremento en los niveles de la proteína precursora de β -amiloide, o bien con un aumento en el procesamiento anómalo de dicha proteína, aumentando la cantidad insoluble y dando lugar por tanto a un incremento tanto en tamaño como en cantidad, de los depósitos de β -amiloide intra o extracelular. Dentro de estas patologías se encuentran por ejemplo, aunque sin limitarse, esclerosis lateral amiotrófica, síndrome de Down, demencia vascular, angiopatía amiloidea cerebral relacionada con proteínas priónicas y enfermedad de Creutzfeldt-Jacobs. Por esto, una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de estructura química(I) para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una patología relacionada con el incremento de β -amiloide que se selecciona de la lista que comprende: esclerosis lateral amiotrófica, síndrome de Down, demencia vascular, angiopatía amiloidea cerebral relacionada con proteínas priónicas y enfermedad de Creutzfeldt Jacobs.

Se entiende por “patología relacionada con la hiperfosforilación de tau” en la presente invención, todas aquellas patologías que cursan con un aumento en la expresión de tau, lo que conlleva un aumento en la cantidad de proteína fosforilada, o una hiperfosforilación de dicha proteína, aun sin alteración en la expresión, ya que ambas situaciones conllevan un incremento en el tamaño o número de marañas neurofibrilares producidas por la agregación anómala de tau fosforilada. Dentro de las patologías relacionadas con la hiperfosforilación de tau se encuentran por ejemplo, aunque sin limitarse, demencia frontotemporal, parálisis supranuclear progresiva, demencia asociada a tauopatía sistémica múltiple, degeneración corticobasal, y degeneración lobular frontotemporal o enfermedad de Pick. Por ello, otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de estructura química (I) para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una patología relacionada con la hiperfosforilación de tau que se selecciona de la lista que comprende: demencia frontotemporal, parálisis supranuclear progresiva, demencia asociada a tauopatía sistémica múltiple, degeneración corticobasal, y degeneración lobular frontotemporal o enfermedad de Pick.

Por otro lado, existen multitud de otras enfermedades que cursan con alteraciones simultáneas en ambas proteínas además del Alzheimer, como por ejemplo, aunque sin limitarse, trastornos o déficits cognitivos moderados, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis tipo Dutch, angiopatía amiloidea cerebral, demencia asociada a la enfermedad de Parkinson, enfermedad neurodegenerativa por cuerpos de Lewy difusos, degeneración corticobasal, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia de gránulos argirófilos y enfermedad familiar de Gerstmann-Straussler-Scheinker. Por esto, otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de estructura química (I) para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una patología relacionada con el incremento de β -amiloide y hiperfosforilación de tau que se selecciona de la lista que comprende: Alzheimer, trastornos o déficits cognitivos moderados, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis tipo Dutch, angiopatía amiloidea cerebral, demencia asociada a la enfermedad de Parkinson, enfermedad neurodegenerativa por cuerpos de Lewy difusos, degeneración corticobasal, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia de gránulos argirófilos y enfermedad familiar de Gerstmann-Straussler-Scheinker. Se entiende por “trastornos o déficits cognitivos moderados” en la presente invención, aquellas alteraciones de las facultades intelectuales de la persona, entre las que se encuentran, aunque sin limitarse, el deterioro de la orientación, deterioro de la memoria reciente, deterioro del razonamiento, problemas con el cálculo, problemas de lenguaje, alteración de la capacidad de realizar tareas complejas y alteración de la capacidad de programación, que aparecen en estadios iniciales de diferentes enfermedades como por ejemplo, aunque sin limitarse, Alzheimer, esquizofrenia o demencia senil.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra la disminución en los niveles de expresión de β -amiloide intracelular después del tratamiento con yesotoxina. (A) Imágenes de microscopia confocal en las que se representa la expresión de β -amiloide en cultivos neocorticales de animales silvestres (NoTg), cultivos neocorticales obtenidos a partir de ratones 3xTg-AD (3xTg) y los niveles de péptido β -amiloide en los cultivos neocorticales de ratones 3xTg-AD tratados con yesotoxina (3xTg + YTX), evaluados con el anticuerpo 6E10. La exposición de los cultivos corticales de ratones triple transgénicos a yesotoxina disminuye la sobreexpresión de β -amiloide en este modelo *in vitro*. (B) La cuantificación de la inmunoreactividad muestra una disminución significativa de la sobreexpresión de β -amiloide después del tratamiento con yesotoxina (**p<0.005 respecto a la expresión de β -amiloide en cultivos transgénicos, n=3 obtenida de tres experimentos representativos, cada uno realizado en duplicado).

La figura 2 muestra una disminución de los niveles de tau fosforilada en cultivos de neuronas transgénicas tratadas con yesotoxina. (A) Imágenes de western blot, que muestran los niveles de fosforilación de tau empleando el anticuerpo AT8 (reconoce Tau fosforilada en Ser202) en cultivos silvestres (No Tg), cultivos transgénicos (3xTg) y cultivos transgénicos tratados con yesotoxina (3xTg YTX). Datos obtenidos de un experimento representativo. (B) La cuantificación de la expresión de tau fosforilada (marcada con el Anticuerpo AT8), muestra una disminución significativa de la fosforilación de tau en cultivos transgénicos tratados con yesotoxina (*p<0.05, n=3 obtenida de tres experimentos representativos, cada uno realizado en duplicado).

La figura 3 muestra una disminución de la expresión de tau fosforilada en los residuos Thr212 y Ser 214 (marcada con el anticuerpo AT100) en cultivos de neuronas transgénicas tratadas con yesotoxina. (A) Bandas de western blot mostrando la inmunoreactividad para el anticuerpo AT100 en cultivos silvestres (No Tg), cultivos transgénicos (3xTg) y cultivos transgénicos tratados con yesotoxina (3xTg YTX). Datos obtenidos de un experimento representativo. (B) La cuantificación de la expresión de tau fosforilada (marcada con el Anticuerpo AT100), muestra una disminución del

12% de la fosforilación de tau en cultivos transgénicos tratados con yesotoxina (n = 3 obtenida de tres experimentos representativos, cada uno realizado en duplicado).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

En los ejemplos de la presente invención, para ver el efecto de la yesotoxina en la sobreexpresión de beta-amiloide y en la hiperfosforilación de tau, se utilizan cultivos *in vitro* de neuronas corticales obtenidas a partir de ratones triple transgénicos, que sobreexpresan de forma simultánea los transgenes humanos para presenilina (PS1_{M146V}), proteína precursora de β -amiloide (APP_{Swe}) y proteína tau (tau_{p301L}). La sobreexpresión simultánea de estos 3 elementos está relacionada con la acumulación de β -amiloide y formación de placas neurofibrilares, y por lo tanto, estas células, resultan útiles para el estudio de la eficacia de compuestos frente a enfermedades relacionadas con incrementos en tau y β -amiloide. En los ejemplos de la presente invención se demuestra que el tratamiento con yesotoxina provoca una disminución de β -amiloide y de tau fosforilada tanto en el residuo Ser 202, como en los residuos Thr212 y Ser214.

Ejemplo 1

Determinación de la viabilidad celular del tratamiento con yesotoxina

Para la realización de los experimentos de la presente invención se utiliza bien un modelo neuronal cortical *in vitro* con sobreexpresión simultánea de tau y β -amiloide obtenido a partir de un modelo de enfermedad de Alzheimer en ratones triple transgénicos (3xTg-AD o 3xTg) obtenibles mediante el procedimiento detallado en la solicitud internacional WO2003/053136 y proporcionados por los titulares de dicha solicitud, o bien un modelo neuronal cortical *in vitro* obtenido de ratones no transgénicos (no Tg). El modelo neuronal triple transgénico presenta sobreexpresión de presenilina (PS1_{M146V}), proteína precursora de β -amiloide (APP_{Swe}) y proteína tau (tau_{p301L}), lo que da lugar a un modelo de Alzheimer con sobreexpresión de β -amiloide e hiperfosforilación de tau.

En la presente invención los cultivos corticales primarios se obtienen a partir de embriones de ratones 3xTg-AD de 15-17 días de gestación y los cultivos silvestres se obtienen de embriones de ratones control no 3xTg de la misma cepa. El efecto de los compuestos empleados en esta invención sobre la viabilidad celular se realiza mediante un ensayo de fluorescencia empleando el indicador de viabilidad Alamar Blue. Para la realización del ensayo se utilizan cultivos corticales primarios sembrados en placas de 96 pocillos. Las células neuronales se incuban con yesotoxina, la cual se añade en el medio de cultivo a diferentes concentraciones y se determina su efecto sobre la viabilidad neuronal a diferentes tiempos de tratamiento *in vitro*. La concentración máxima de yesotoxina evaluada fue de 1 nM y la concentración de alamar blue es del 10%. El volumen de reacción empleado es de 200 μ l. La fluorescencia se mide a longitudes de onda de 530 nm (excitación) y 590 nm (emisión). La yesotoxina hasta concentraciones de 1 nM no modifica la viabilidad celular *in vitro*.

Ejemplo 2

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

Para la determinación del efecto de la yesotoxina en la sobreexpresión de β -amiloide e hiperfosforilación de tau se emplean técnicas de inmunocitoquímica y western blot. Los cultivos neuronales primarios son tratados con yesotoxina 1 nM entre los días 3 y 7 de cultivo. Posteriormente las células se procesan siguiendo los protocolos habituales para inmunocitoquímica y western blot. Para los estudios de inmunocitoquímica y western blot la expresión proteica se evaluó empleando los anticuerpos primarios anti- β -amiloide 6E10 a una dilución 1:500, anti-Tau AT8 (Tau fosforilada en Ser 202, dilución 1:1000), y anti-Tau AT100 (Tau fosforilada en Thr 212 y Ser 214, dilución 1:1000). Para los ensayos de western blot los cultivos neuronales tratados con yesotoxina se lavan con tampón fosfato frío y se lisan en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7.4) que contiene NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 1% Tritón X-100, DTT 2 mM, PMSF 2.5 mM, aprotinina 40 mg/ml, leupeptina 4 mg/ml, NaF 5 mM, Na3VO4 1 mM, 1 mg/ml pepstatina A y 1 mg/ml benzamidina. La concentración proteica total se determina mediante el método de Bradford, empleando albúmina bovina como estándar. Las alícuotas de los lisados celulares conteniendo 20 μ g totales de proteína se cargan en tampón de carga (Tris-HCl 50 mM, ditioneitol 100 mM, 2% SDS, 20% glicerol, 0.05% azul de bromofenol, pH 6.8), las proteínas se separan mediante electroforesis y se transfieren a membranas de PVDF. Las membranas se incuban con los anticuerpos primarios se lavan y posteriormente se incuban con un anticuerpo secundario unido a HRP, la inmunoreactividad se detecta mediante quimioluminiscencia. Las mismas membranas se reincuban con un anticuerpo primario anti β -actina para realizar la corrección de los datos en función del contenido proteico de las muestras.

Para los estudios de inmunocitoquímica los cultivos neuronales se lavan con tampón fosfato, se fijan con paraformaldehído al 4% y se incuban con el anticuerpo primario durante toda la noche. Posteriormente, los cultivos neuronales se lavan de nuevo con tampón fosfato y se incuban con el anticuerpo secundario durante 2 horas. Posteriormente las células se lavan y se montan en líquido de montaje. En los ensayos de inmunocitoquímica la inmunoreactividad se

ES 2 363 975 A1

puede visualizar empleando un anticuerpo secundario fluorescente en microscopio confocal (Nikon, Melville, NY, USA) con una cámara ORCA-ER Hamamatsu (Hamamatsu Photonics KK, Hamamatsu, Japón).

5 En estos ensayos se demuestra que el tratamiento con yesotoxina reduce la sobreexpresión de β -amiloide (fig. 1) y de tau fosforilada en el residuo Ser 202 (fig. 2) o en los residuos Thr 212 y Ser 214 (fig. 3) en neuronas obtenidas a partir de ratones triple transgénicos.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

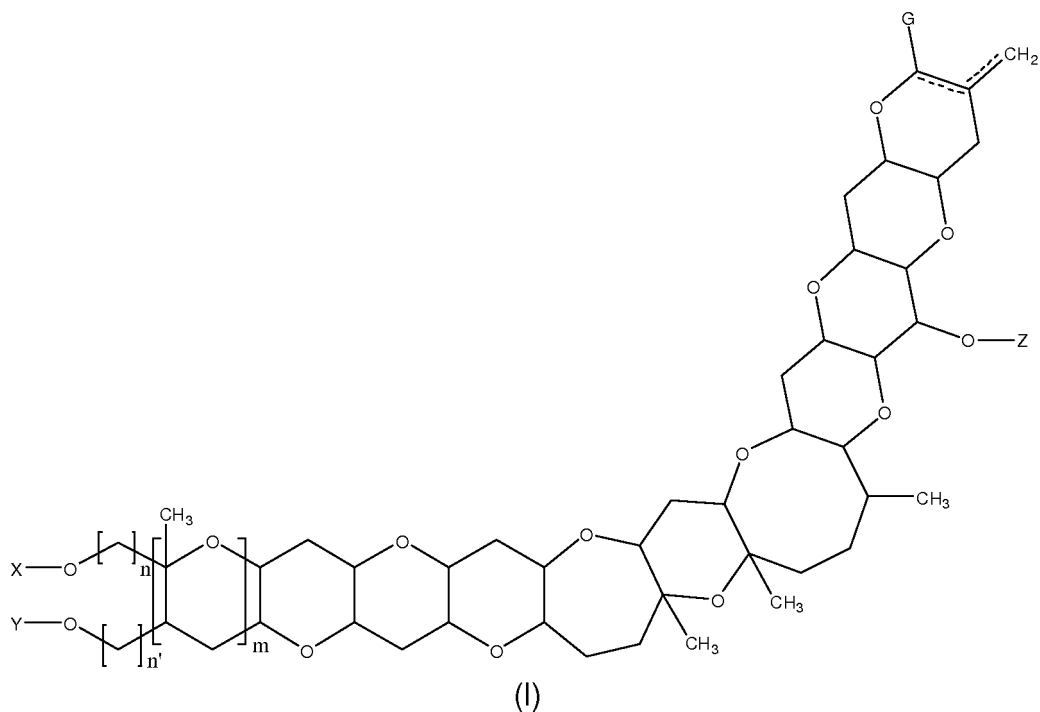
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula (I)



donde

X e Y se seleccionan independientemente entre H o SO_3H ,

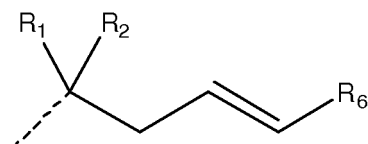
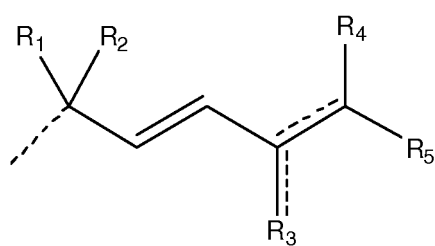
m puede ser 0 ó 1,

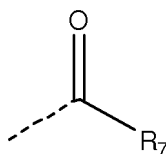
n y n' se seleccionan independientemente entre 0 y 5,

Z se selecciona entre H o un monosacárido u oligosacáridos,

el símbolo ----- representa un enlace sencillo o doble,

G es un grupo que se selecciona de entre los grupos de fórmula (II) a (IV):





(IV)

donde

R_1 y R_2 se seleccionan independientemente entre -OH o alquilo C_1-C_5 ;

R_3 , R_4 y R_5 se seleccionan independientemente entre H, alquilo C_1-C_{10} , alqueno C_1-C_{10} , -OH, COOH, O;

R_6 y R_7 se seleccionan independientemente entre alquilo C_1-C_{10} o alqueno C_1-C_{10} , amida,

o sus sales, isómeros o solvatos,

para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

2. Uso según la reivindicación 1, donde X e Y son SO_3H .

3. Uso según la reivindicación 1, donde X es H e Y es SO_3H .

4. Uso según la reivindicación 1, donde X es SO_3H e Y es H.

5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde m es 1.

6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde m es 0.

7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde n es 1, 2 ó 3 y n' es 0.

8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde n es 0 y n' es 1, 2 ó 3.

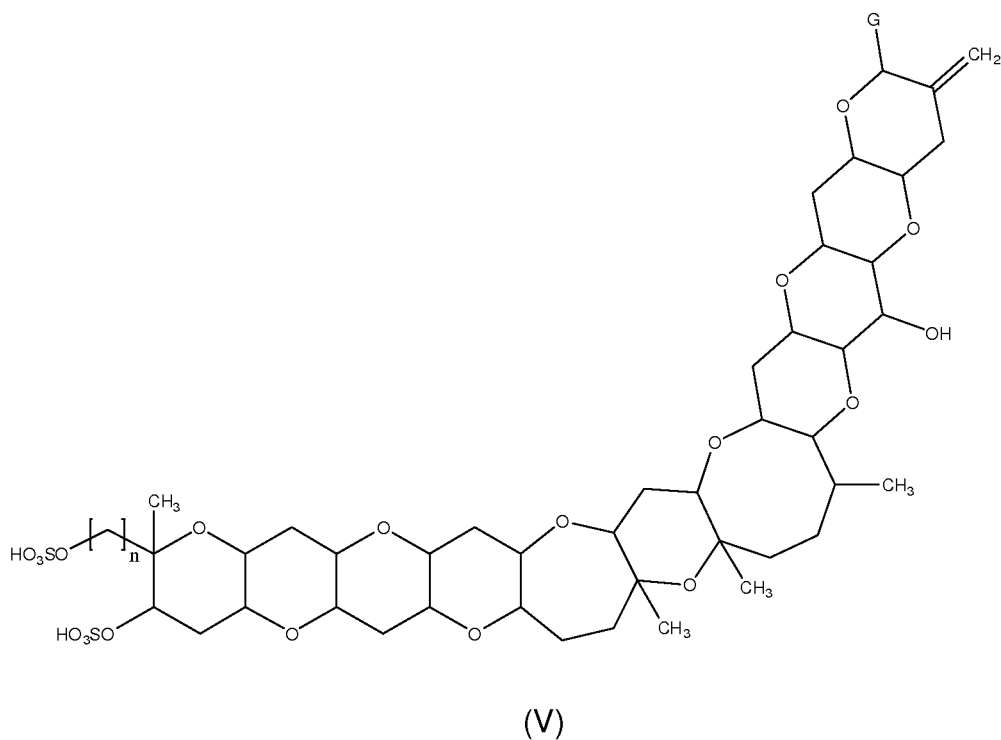
9. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde R_1 es metilo y R_2 es OH.

10. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde R_3 se selecciona entre H, alquilo C_1-C_4 o alqueno C_1-C_4 o COOH.

11. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 donde R_4 se selecciona entre H, OH, O.

12. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 donde R_5 se selecciona entre H, alquilo C_1-C_4 , alqueno C_1-C_4 , OH.

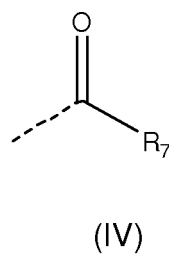
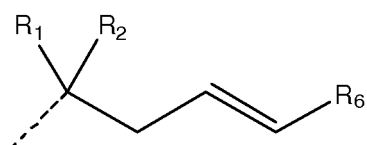
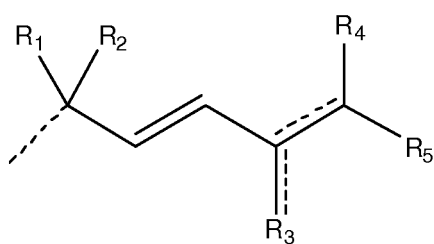
13. Uso de un compuesto de fórmula (V)



donde

n se selecciona entre 1, 2 ó 3,

G es un grupo que se selecciona de entre los grupos de fórmula (II) a (IV):



donde

R₁ y R₂ se seleccionan independientemente entre -OH o alquilo C₁-C₅;

ES 2 363 975 A1

R₃, R₄ y R₅ se seleccionan independientemente entre H, alquilo C₁-C₁₀, alquenilo C₁-C₁₀, -OH, -COOH, =O;

R₆ y R₇ se seleccionan independientemente entre alquilo C₁-C₁₀ o alquenilo C₁-C₁₀;

el símbolo ----- representa un enlace sencillo o doble,

o sus sales, isómeros o solvatos,

para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

14. Uso según la reivindicación 13, donde G es el grupo de fórmula (II).

15. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14 donde R₁ es metilo y R₂ es OH.

16. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 donde R₃ se selecciona entre H, alquilo C₁-C₄, alquenilo C₁-C₄ o COOH.

17. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 donde R₄ se selecciona entre H, OH, O.

18. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 donde R₅ se selecciona entre H, alquilo C₁-C₄, alquenilo C₁-C₄, OH.

19. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 donde R₆ se selecciona entre alquilo C₁-C₄, alquenilo C₁-C₄ o amida.

20. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 donde R₇ es un alquilo C₁-C₄.

21. Uso de un compuesto que se selecciona de la lista que comprende: Yesotoxina (YTX), 45-hidroxi-YTX, 45, 46, 47-trinor-YTX, 45, 46, 47-trinorhormo- YTX, Homo-YTX, 45OH-homo-YTX, Carboxi-YTX, Carboxihomo-YTX, 45OH-carboxi-YTX, noroxo-YTX, noroxohomo-YTX, 40-epi-41-keto-YTX, 41-keto-YTX-1,3-enona, 41a-homo-YTX, 41a-homo-YTXamida, 44, 55-diOH-41 a-homo-YTX, 45-OH-dinor-YTX, 44-oxotrinor-YTX, 41 a-homo-44-oxotrinor-YTX, o sus sales, isómeros o solvatos, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

22. Uso de un compuesto que se selecciona de la lista que comprende: 1-desulfo-YTX, 1-desulfocarboxihomo-YTX, 4-desulfocarboxihomo-YTX, o sus sales, isómeros o solvatos, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

23. Uso de un compuesto que se selecciona de la lista que comprende: 9-metil-41-ceto-YTX-1,3-enona, 9-metil-41a-homo-YTX, 9-metil-41a-homo-YTXamida, 44, 55-diOH-9-metil-41a-homo-YTX, o sus sales, isómeros o solvatos, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

24. Uso de un compuesto que se selecciona de la lista que comprende: Nor-ring-A-YTX, nor-ring-A-41-keto-YTX, nor-ring-A-40-epi-41-keto-YTX y nor-ring-A-41-keto-YTX-1,3-enona, o sus sales, isómeros o solvatos, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

25. Uso de un compuesto que se selecciona de la lista que comprende: glicosiyesotoxina A (GYTX-A), Protoceratina III, Yesosoxina 32-O-[β-L-arabinofuranosyl-(5'→1'')-β-L-arabinofuranosido, Protoceratin II, Tri-glicosilyesotoxina y Protoceratin IV, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

26. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 donde la enfermedad neurodegenerativa está relacionada con niveles anormales de proteínas β-amiloide y/o hiperfosforilación de tau.

27. Uso de un compuesto según la reivindicación 26 donde la enfermedad relacionada con el incremento de β-amiloide se selecciona de la lista que comprende: esclerosis lateral amiotrófica, síndrome de Down, demencia vascular, angiopatía amiloidea cerebral relacionada con proteínas priónicas y enfermedad de Creutzfeldt Jacobs.

28. Uso de un compuesto según la reivindicación 26 donde la enfermedad relacionada con hiperfosforilación de tau se selecciona de la lista que comprende: demencia frontotemporal, parálisis supranuclear progresiva, demencia asociada a tauopatía sistémica múltiple, degeneración corticobasal y degeneración lobular frontotemporal o enfermedad de Pick.

ES 2 363 975 A1

29. Uso de un compuesto según la reivindicación 26 donde la enfermedad relacionada con el incremento de β -amiloide e hiperfosforilación de tau se selecciona de la lista que comprende: Alzheimer, trastornos o déficits cognitivos moderados, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis tipo Dutch, angiopatía amiloidea cerebral, demencia asociada a la enfermedad de Parkinson, enfermedad neurodegenerativa por cuerpos de Lewy difusos, degeneración corticobasal, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia de gránulos argirófilos y enfermedad familiar de Gerstmann-Straussler-Scheinker.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

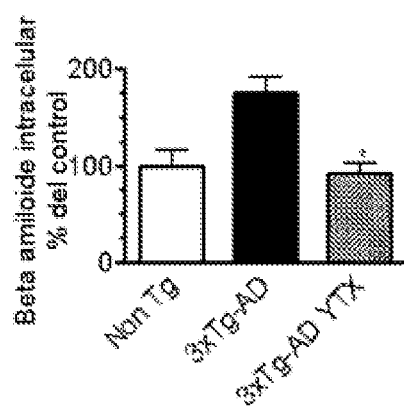
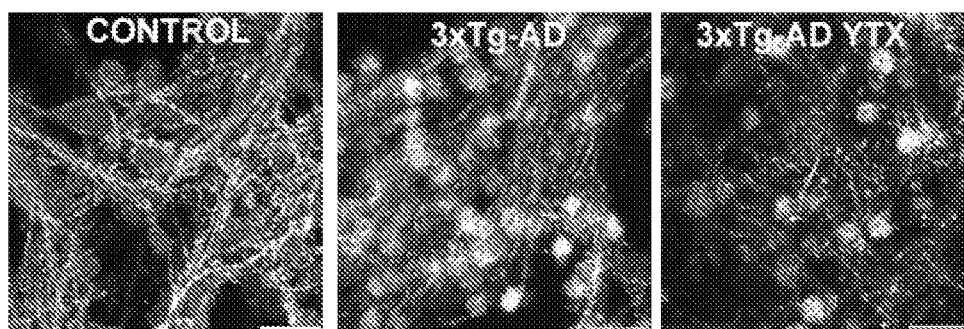


FIG. 2

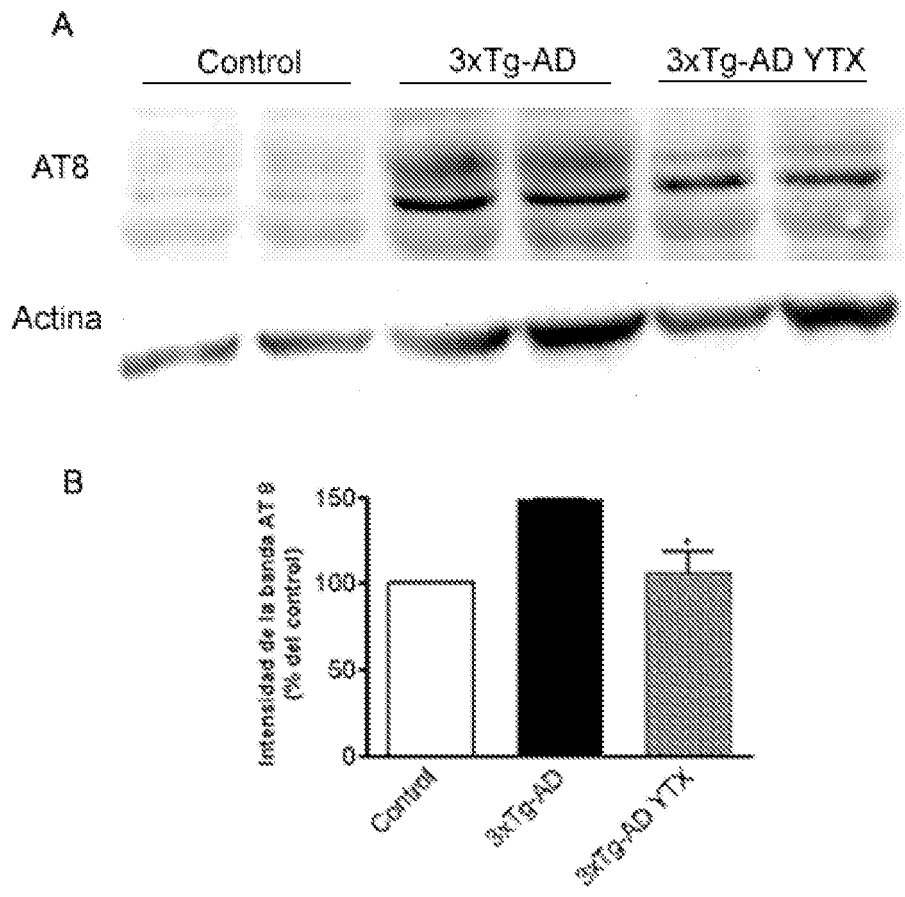
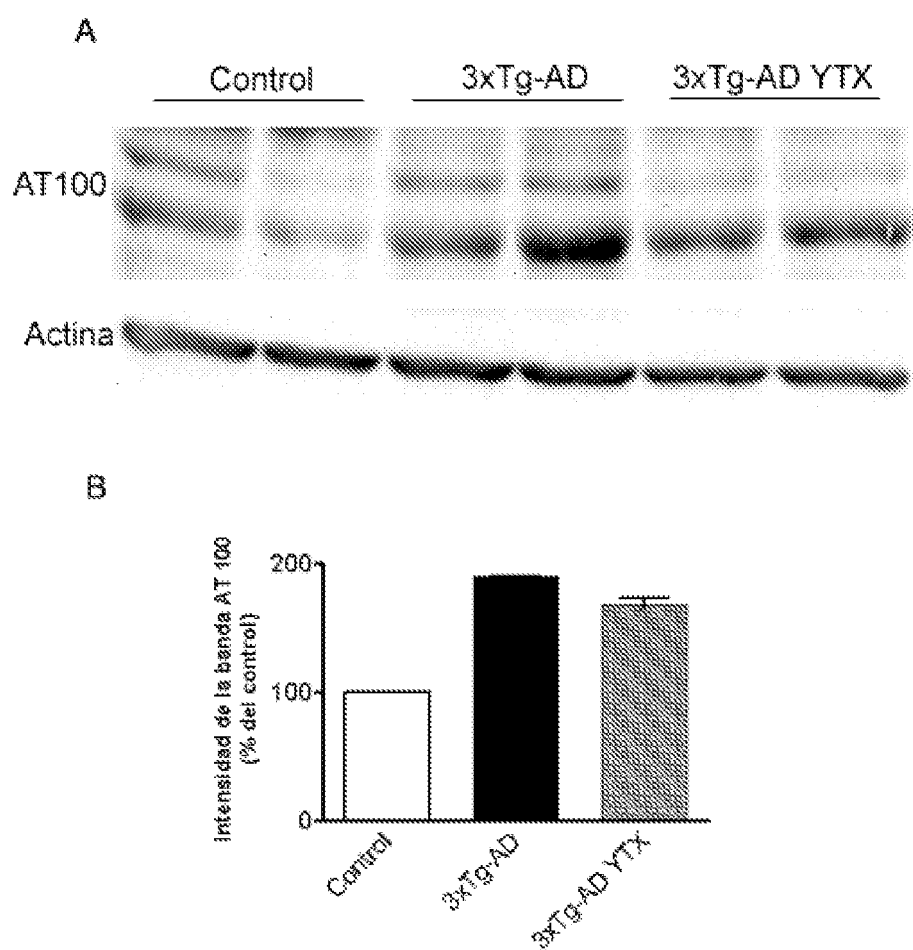


FIG. 3





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030162

②② Fecha de presentación de la solicitud: 08.02.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	TURBARO, A. et al. "Yessotoxins: A toxicological overview". Toxicon 2010, Volumen 56, páginas 163-172. [Disponible en línea el 04.08. 2009]. Ver página 163, resumen; página 164, figura 1.	1-29
A	SASAKI, M. "Development and Application of a Convergent Strategy for the Total Synthesis of Polycyclic Ether Natural Products". Bulletin of the Chemical Society of Japan 2007, Volumen 80, Número 5, páginas 856-871.	1-29
A	MILES, C.O. et al. "Isolation of Yessotoxin 32-O-[β-arabinofuranosyl-(5'-1'')-β-L-arabinofuranoside] from <i>Protocerratium reticulatum</i> ". Toxicon 2006, Volumen 47, páginas 510-516. Ver página 510, resumen; página 513, figura 1; página 516, columna 1, párrafo 3.	1-29
A	RONZINI, G. & ROSSINI, G.P. "Yessotoxin induces the accumulation of altered E-cadherin dimers that are not part of adhesive structures in intact cells". Toxicology 2008, Volumen 244, páginas 145-156. Ver página 145, resumen.	1-29

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
08.04.2011

Examinador
G. Esteban García

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D313/20 (2006.01)**A61K31/352** (2006.01)**A61P25/28** (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,MEDLINE,BIOSIS,XPESP,EMBASE,NPL,PUBMED

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 08.04.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-29	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-29	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	TURBARO, A. et al. Toxicon 2010, Vol. 56, pp. 163-172.	04.08.2009
D02	SASAKI, M. Bulletin of the Chemical Society of Japan 2007, Vol. 80, Nº 5, pp. 856-871.	2007
D03	MILES, C.O. et al. Toxicon 2006, Vol. 47, pp. 510-516.	2006
D04	RONZINI, G. & ROSSINI, G.P. Toxicology 2008, Vol. 244, pp. 145-156.	2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención es el uso de un compuesto de fórmula (I), derivado de yesotoxina, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas

El documento D01 divulga una revisión sobre las yesotoxinas, producidas por dinoflagelados presentes en el fitoplancton, y su actividad biológica. Así, la yesotoxina, homoyesotoxina y 45-hidroxiyesotoxina parecen afectar a las células del músculo cardíaco en ratones, provocando cambios microscópicos ultraestructurales, mientras que la didesulfoyesotoxina afecta al hígado y al páncreas, donde induce degeneración en las grasas. Los mecanismos de actuación de estos poliéteres no se conocen totalmente, aunque parecen estar relacionados con cambios en los niveles de calcio intracelular y de AMP cíclico, alteración de moléculas citoesqueléticas y de adhesión, activación de caspasas y apertura de los poros de transición permeable de mitocondrias (ver página 163, resumen; página 164, figura 1).

El documento D02 divulga diversos éteres policíclicos de origen marino, entre los que se encuentra la yesotoxina (7), con actividades biológicas potentes, como neurotoxicidad, citotoxicidad y actividad antifúngica, y un procedimiento para su obtención (ver página 856, columna 1; página 857, figura 1).

El documento D03 divulga derivados sacáridos de yesotoxina, obtenidos durante el procedimiento de aislamiento de yesotoxina a partir de extractos de *Protoceratium reticulatum* (ver página 510, resumen; página 513, figura 1). Los glicósidos de yesotoxinas son citotóxicos para células humanas tumorales *in vitro* (página 516, columna 1, párrafo 3).

El documento D04 divulga la alteración que la yesotoxina provoca en el sistema E-caderina-catenina de las células epiteliales debido a la estabilización de las interacciones proteína-proteína en oligómeros, a través de la introducción de enlaces covalentes entre subunidades *in vitro* e *in vivo* (ver página 145, resumen).

Los documentos citados muestran sólo el estado de la técnica del campo al que pertenece la invención. Ninguno de ellos, tomado solo o en combinación con los otros, podría dirigir al experto en la materia hacia el uso de los compuestos de la invención, derivados de yesotoxina, para la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-29 reúne los requisitos de novedad y actividad inventiva recogidos en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes.