

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 142**

21 Número de solicitud: 201230857

51 Int. Cl.:

A61K 31/192 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

04.06.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

09.12.2013

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN MEDINA, CENTRO DE EXCELENCIA
EN INVESTIGACIÓN DE MEDICAMENTOS
INNOVADORES EN ANDALUCÍA (100.0%)
Parque Tecnológico Ciencias de la Salud
Avda. Conocimiento, 3
18100 Armilla (Granada) ES**

72 Inventor/es:

**CANTIZANI, Juan;
ORTIZ-LÓPEZ, Francisco Javier;
RODRÍGUEZ, Lorena;
DE PEDRO, Nuria;
PÉREZ DEL PALACIO, José;
VICENTE, Francisca;
GONZÁLEZ MENÉNDEZ, Victor;
REYES BENÍTEZ, José Fernando;
TORMO, José Rubén;
EL AOUAD, Noureddine y
GENILLOUD, Olga**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Uso de compuestos orto-dépsidos como agentes neuroprotectores**

57 Resumen:

Uso de compuestos orto-dépsidos como agentes neuroprotectores.

La invención se refiere a uso de derivados del ácido isolecanórico para la elaboración de una composición farmacéutica, más preferiblemente para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad relacionada con la actividad de GSK-3 β / caseín kinasa-1 y las propiedades antioxidantes de la molécula, seleccionada de la lista que comprende enfermedad neurodegenerativa, cáncer, diabetes y obesidad.

ES 2 433 142 A1

DESCRIPCION

Uso de compuestos orto-dépsidos como agentes neuroprotectores.

- 5 La presente invención se refiere a uso de derivados del ácido isolecanórico para la elaboración de una composición farmacéutica, más preferiblemente para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad relacionada con la actividad de GSK-3 β / caseín kinasa-1 y las propiedades antioxidantes de la molécula, seleccionada de la lista que comprende enfermedad neurodegenerativa, cáncer, diabetes y obesidad.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El ácido isolecanórico es un producto natural aislado por primera vez del líquen *Parmelia Tinctorum* (Sakurai, A.; Goto, Y. Bull. Chem. Soc. Jpn. 1987, 60, 1917-1918). Hasta la fecha no se ha reportado actividad biológica alguna asociada al ácido isolecanórico.

- 15 La biosíntesis del ácido isolecanórico está encuadrada dentro de la ruta de los policétidos polifenólicos, formando parte del subgrupo de los llamados orto-dépsidos.

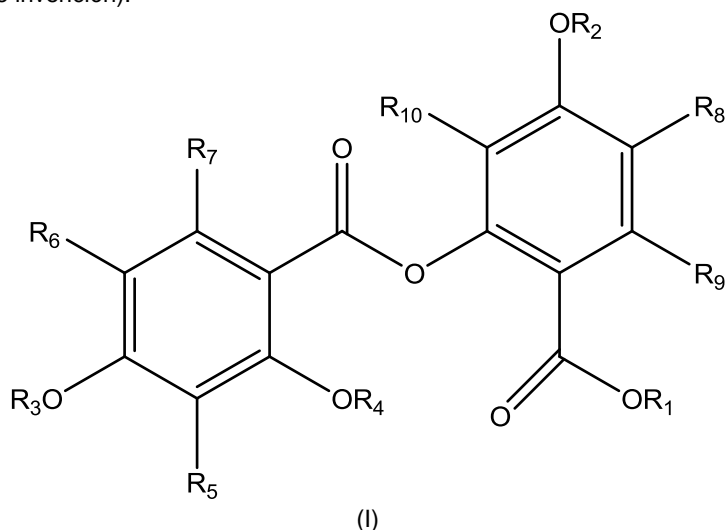
- 20 La estructura básica de un dépsido consiste en dos o más subunidades mono- o poli-fenólicas unidas mediante un enlace éster. En función del modo de unión de dichos monómeros, los dépsidos pueden clasificarse en tres grupos principales: para- y meta-dépsidos, relativamente comunes y aislados de numerosos líquenes y hongos, y los orto-dépsidos, mucho menos frecuentes.

- 25 Por su parte, dentro del subgrupo de los para-dépsidos, el más numeroso de los dépsidos, se encuentran productos naturales con actividad biológica descrita, tales como los ácidos lecanórico, evérnico, barbático, difractaico y girofórico y los ésteres atranorin y su derivado cloroatranorin. Estos productos naturales han sido descritos como potenciales fármacos frente a la enfermedad de Alzheimer y como agentes antineoplásicos de baja citotoxicidad (WO2008109521A2).

30 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- La presente invención se refiere al uso de unos compuestos inhibidores de GSK-3 β y de la caseín-kinasa-1, útiles en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y otras enfermedades relacionadas con la actividad de dichas enzimas, como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington, Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), cáncer, diabetes, obesidad y otras enfermedades relacionadas. Además, estos compuestos se pueden utilizar como agentes antioxidantes.

- 35 Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso del compuesto de formula general (I) (a partir de ahora compuestos de invención):



- 40 donde: R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ se selecciona, de manera independiente, entre hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₃;
 45 R₇ se selecciona entre hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₅;
 R₈ se selecciona entre hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₃ o -COOR₁₁;
 R₉ es un grupo alquilo C₁-C₅;
 R₁₀ se selecciona entre hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₃ o OR₁₂;
 R₁₁ y R₁₂ se selecciona, de manera independiente, entre hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₃;

para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad causada por la generación de radicales libres y estrés oxidativo en la célula y/o relacionada con la actividad de GSK-3 β / caseín kinasa-1.

- 5 Los compuestos de la presente invención, representados por la fórmula (I) descrita anteriormente, pueden incluir cualquiera sus sales farmacéuticamente aceptables.

10 El término "alquilo" se refiere, en la presente invención, a cadenas hidrocarbonadas saturadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 5 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, etc. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 3 átomos de carbono, aún más preferiblemente es metilo. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como alquinilo, alquenilo, halo, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcoxicarbonilo, amino, nitro o mercapto.

- 15 En una realización preferida, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ se seleccionan, de manera independiente, entre hidrógeno o metilo. Más preferiblemente, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ son hidrógeno.

En otra realización preferida, R₇ y/o R₉ son un grupo alquilo C₁-C₃, más preferiblemente R₇ y/o R₉ son metilo.

- 20 En otra realización preferida, R₈ es hidrógeno.

En otra realización preferida R₁₀ se selecciona entre hidrógeno, metilo o OR₁₂ y más preferiblemente R₁₂ se selecciona entre hidrógeno o metilo. Aún más preferiblemente R₁₀ es hidrógeno.

- 25 En una realización más preferida de la invención, el compuesto de fórmula (I) es el ácido isolecanórico.

Entre otras, las enfermedades causadas por la generación de radicales libres y estrés oxidativo en la célula y/o relacionadas con la actividad de GSK-3 β / caseín kinasa-1, se pueden seleccionar de la lista que comprende enfermedades neurodegenerativas, cáncer, diabetes y obesidad.

- 30 En una realización preferida la enfermedad neurodegenerativa se selecciona entre la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington y Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), más preferiblemente la enfermedad neurodegenerativa es ELA.

- 35 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención de pacientes afectados por las enfermedades anteriormente descritas mediante el uso de los compuestos de la invención. Este tratamiento consiste en la administración a los individuos afectados por estas enfermedades de cantidades terapéuticamente efectivas de un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que lo incluya.

- 40 En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a aquella cantidad de un compuesto de la invención que cuando se administra a un mamífero, con preferencia un humano, es suficiente para producir el tratamiento, tal como se define más abajo, de una enfermedad o condición patológica de interés en el mamífero, con preferencia un humano. La cantidad de un compuesto de la invención que constituye una cantidad terapéuticamente efectiva variará, por ejemplo, según la actividad del compuesto específico empleado;
- 45 la estabilidad metabólica y duración de la acción del compuesto; la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del paciente; el modo y el tiempo de administración; la velocidad de excreción, la combinación de fármacos; la gravedad del trastorno o la condición patológica particulares; y el sujeto que se somete a terapia, pero puede ser determinada por un especialista en la técnica según su propio conocimiento y esa descripción.

- 50 A lo largo de la presente descripción, el término "tratamiento" se refiere a eliminar, reducir o disminuir la causa o efectos de la enfermedad. Para los propósitos de esta invención, tratamiento incluye, aunque sin quedar limitados a los mismos, aliviar, disminuir o eliminar uno o más síntomas de la enfermedad; reducir el grado de enfermedad, estabilizar (es decir, no empeorar) el estado de la enfermedad, retrasar o ralentizar la progresión de la enfermedad,
- 55 aliviar o mejorar el estado de la enfermedad y remitir (ya sea total o parcial).

Los compuestos de la invención tienen un alto poder antioxidante, por lo tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula (I) descrito anteriormente, como antioxidante.

- 60 Debido a este poder antioxidante estos compuestos son útiles como aditivo en alimentos funcionales o complemento alimentarios o dietéticos. De esta forma otro aspecto más de la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula (I) descrito anteriormente, como aditivo en alimentos funcionales o complemento alimentarios o dietéticos.

De esta manera, los compuestos descritos en la presente invención se pueden utilizar, además de en composiciones farmacéuticas, en alimentos (incluidos los etiquetados como funcionales o nutraceuticos) o en complementos alimentarios o dietéticos no sólo para prevenir la aparición de las enfermedades descritas anteriormente sino también para mejorar las defensas del organismo como parte del sistema inmune.

5 En la presente invención se entiende como "alimento funcional" a un alimento o complemento alimenticio incluidos los llamados "nutraceuticos", que posee un efecto beneficioso sobre la salud.

10 Por "complementos alimentarios o dietéticos" se refieren a composiciones no alimenticias, es decir, que no son alimentos, pero que aportan a la dieta un efecto beneficioso sobre la salud, dichos complementos pueden contener otro tipo de suplementos como vitaminas, antioxidantes, entre otros. Estas composiciones pueden ser administradas de la misma forma que lo descrito para las composiciones farmacéuticas.

15 Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a un alimento funcional o un complemento alimentario o dietético que comprende un compuesto de fórmula (I) según se ha descrito en la presente invención.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un hongo de la especie *Glarea lozoyensis* para la obtención de ácido isolecanórico. El procedimiento de obtención de dicho compuesto comprende la fermentación de *Glarea lozoyensis* y posterior extracción mediante un disolvente polar del cultivo obtenido en la fermentación anterior.

En una realización preferida del procedimiento de la invención, el disolvente polar puede entre otros ser un alcohol de bajo peso molecular, tal como metanol o etanol, y acetona. Más preferiblemente el disolvente es acetona.

25 Una vez que se da la etapa de extracción del producto, los pasos posteriores de aislamiento y purificación son los conocidos por cualquier experto en la materia.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del ácido isolecanórico para la elaboración de una composición farmacéutica.

30 Por tanto, un aspecto más de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el ácido isolecanórico, preferiblemente dicha composición farmacéutica además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o otro principio activo.

35 Los "vehículos farmacéuticamente aceptables" que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

40 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

45 **Fig 1:** Representación grafica de la capacidad antioxidante del ácido isolecanórico a diferentes concentraciones a lo largo del tiempo tras la adición del generador de radicales libres APPH. Las diferentes formas de los puntos representan valores decrecientes de concentración del ácido isolecanórico que van desde 5 mM hasta 1 nM. El eje Y representa unidades relativas de fluorescencia y el eje X tiempo en minutos.

50 **Fig 2:** Comparación de la capacidad antioxidante del TROLOX® (cuadrados) frente al ácido isolecanórico (rombos). El eje Y representa el sumatorio de unidades relativas de fluorescencia a lo largo del tiempo mientras el eje X el logaritmo de la concentración mM de los compuestos.

55 **Fig 3:** Representación del porcentaje de inhibición (eje Y) frente al logaritmo de la concentración µM (eje X) del ácido isolecanórico frente a GSK-3 β (cuadrados), CK-1 δ (círculos) y CDK2 (triángulos).

Fig 4: Dobles recíprocos del ácido isolecanórico a diferentes concentraciones y valores crecientes de ATP marcado.

60 **Fig 5:** Dobles recíprocos del ácido isolecanórico a diferentes concentraciones y valores crecientes de sustrato.

Fig 6: Representación gráfica de la muerte celular provocada por el L-BMAA y el efecto protector del ácido isolecanórico.

EJEMPLOS**1.1 Fermentación del microorganismo (*Glarea lozoyensis*)**

5 Se utilizaron 10 discos de micelio de la cepa F-160,870, ATCC-20868, *Glarea lozoyensis*, crecida en placa de malta, extracto de levadura y agar para inocular un matraz de 250 mL que contenía 50 mL de medio SMYA (Difco neopeptona 10 g, maltosa 40 g, Difco extracto de levadura 10 g, agar 4 g, 1 L H₂O destilada). Este matraz fue incubado durante 7 días, a 22°C, con un 70% de humedad relativa y agitación a 220 r.p.m. A partir de éste cultivo se inocularon 20 matraces de 250 mL que contenían 50 mL de medio MV8 (maltosa 75 g, V8 juice 200 mL, harina de soja tipo I (SIGMA) 1 g, L-prolina 3 g, MES 16.2 g, agua destilada 1 L) durante 14 días, a 22°C, con un 70% de humedad relativa y agitación a 220 r.p.m.

1.2. Aislamiento e identificación estructural de ácido isolecanórico.

15 Un litro del cultivo de *Glarea lozoyensis* obtenido en el ejemplo anterior fue extraído por adición de acetona (1 L) mediante agitación durante 1 h y posterior centrifugado a 8500 rpm durante 5 min y filtrado a vacío, descartándose el pellet de micelio.

20 El líquido resultante se concentró hasta un volumen de 1 L por evaporación bajo corriente de nitrógeno y se filtró de nuevo a vacío a través de celita. El filtrado se cargó a presión en una columna de resina de fase reversa SP207ss (65 g / 20% agua; 90 x 38 mm) con continua adición de agua. La elución de la columna se llevó a cabo en gradiente de agua: acetona (8 mL/min; 10-100% acetona en 12.5 min, 100% acetona hasta 27 min).

25 Las fracciones resultantes fueron evaporadas a sequedad y analizadas mediante HPLC-MS y ensayo de su actividad frente a GSK-3 β . Las fracciones bioactivas fueron sometidas a una segunda cromatografía sobre Sephadex LH-20 (22 g / metanol 100%; 120 x 38 mm) eluida con metanol 100% a un flujo de 5 mL/min.

30 Las fracciones resultantes de esta cromatografía fueron nuevamente analizadas mediante HPLC-MS y bioactividad frente a GSK-3 β y repurificadas por HPLC de fase reversa preparativo empleando una columna Agilent Zorbax SB-C8 PrepHT (21.2 x 250 mm) y un gradiente agua: acetonitrilo (20 mL/min, gradiente: 5%-100% acetonitrilo en 40 min), con detección UV a 210 y 280 nm.

35 Una vez evaporadas las fracciones de HPLC que contenían el producto activo frente a GSK-3 β , se obtuvieron 18 mg de un sólido blanquecino amorfo (rt: 13.3 min) que fue identificado como ácido isolecanórico por comparación de sus datos espectroscópicos con los reportados en la bibliografía (Sakurai, A.; Goto, Y. Bull. Chem. Soc. Jpn. 1987, 60, 1917-1918)

HRMS (Masa exacta): Calculada para C₁₆H₁₅O₇, [M+H]⁺: 319.0812. Encontrada: 319.0817.

¹H-RMN (DMSO-*d*₆, 500 MHz): 10.43 (s, 1H, OH), 10.01 (s, 1H, OH), 6.28 (d, 1H, *J*= 2.3 Hz), 6.21 (sa, 2H), 6.19 (d, 1H, *J*= 2.3 Hz), 2.53, (s, 3H, OCH₃), 2.36, (s, 3H, OCH₃)

40 ¹³C-RMN (DMSO-*d*₆, 125 MHz): 171.4, 167.6, 166.2, 161.1, 160.6, 151.1, 142.0, 140.4, 116.5, 112.0, 110.0, 108.1, 107.1, 100.5, 23.0, 21.6.

¹H-RMN (CD₃OD, 500 MHz): 6.50 (da, 1H, *J*= 2.2 Hz), 6.44 (dd, 1H, *J*= 2.5, 0.7 Hz), 6.29 (dd, 1H, *J*= 2.5, 0.7 Hz), 6.21 (da, 1H, *J*= 2.2 Hz), 2.63 (s, 3H, OCH₃), 2.57 (s, 3H, OCH₃)

45 ¹³C-RMN (CD₃OD, 125 MHz): 175.7, 171.2, 166.6, 164.6, 164.4, 152.9, 144.8, 144.5, 118.0, 115.7, 112.9, 108.3, 105.5, 101.9, 24.3, 23.5.

1.3. Evaluación de la capacidad antioxidante del ácido isolecanórico.

50 Para la evaluación de la actividad antioxidante del ácido isolecanórico se emplea el método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). Se basa en la capacidad del reactivo [2,2'-azobis (2-amidino-propano) dihidrocloruro (AAPH)] de descomponerse a 37°C para generar radicales libres, que son capaces de interferir en la emisión de fluorescencia que produce la fluoresceína (Cao et al. Free Radical Biol. Med. 1993, 14, 303-311).

55 Es un método utilizado tanto para muestras complejas (se utiliza para el análisis de alimentos) así como para compuestos puros.

60 Como estándar de la reacción se utiliza el TROLOX[®], un análogo soluble en agua de la vitamina E muy estable y cuyas curvas se utilizan para referenciar la actividad antioxidante de otros compuestos a la de este mediante el uso de Equivalentes de TROLOX[®] (ET). Para calcular este valor se hace la suma de los valores de fluorescencia a las diferentes concentraciones y tiempos y se calcula la pendiente concentraciones /fluorescencia para cada compuesto. A continuación se dividen la pendiente del compuesto a analizar entre la pendiente del TROLOX[®] obteniéndose así el número de veces que el compuesto a estudiar es más antioxidante que este último compuesto.

65 El ensayo se realiza añadiendo 10 μ L de una disolución de ácido isolecanórico, haciéndose una curva de dosis respuesta de ocho puntos con diluciones 1:2, siendo la concentración del primer punto 50 μ M y 60 μ L de

Fluoresceína 10 nM en PBS, esta mezcla se incuba media hora a 37°C y a continuación se añade AAPH 60 mM (todos de SIGMA-ALDRICH) y se comienza la lectura en modo cinético (una lectura cada 10 minutos durante 4 horas) (Fig. 1).

- 5 Los compuestos capaces de absorber los radicales libres generados hacen que no se vea afectada la emisión de la fluoresceína. Sin embargo, si los extractos carecen de actividad antioxidante, los radicales libres generados consumen rápidamente la señal fluorescente.

El valor de ET para el ácido isolecanórico es de 3, siendo 3 veces más antioxidante que el TROLOX® (Fig. 2).

10

1.4. Determinación de la Inhibición de kinasas por el ácido isolecanórico.

1.4.1. Ensayo de Inhibición GSK-3 β y CK 1, KINASE-GLO®

15 Dado el importante papel que tanto la glicogeno sintetasa kinasa 3 beta (GSK3- β) (Doble and Woodgett J Cell Sci (2003) 116, 1175-1186) como la casein kinasa (CK) (D. I. Perez et al. Medicinal Research Reviews *Medicinal Research Reviews* (2011) 31 (6): 924–954) juegan en las enfermedades neurodegenerativas se realizaron ensayos *in vitro* para evaluar la capacidad de inhibición del ácido isolecanórico sobre estas dos dianas. El kit comercial de PROMEGA KINASE-GLO® es un método basado en la capacidad de la enzima luciferasa de generar oxyluciferina, luminiscente, a partir de ATP (Adenosin Trifosfato) y beetle luciferina. Tras la reacción de fosforilación de la kinasa a estudiar se mide el ATP remanente no utilizado pudiéndose así evaluar la capacidad inhibitoria de los compuestos de interés. Si la kinasa no es inhibida gastará el ATP, y en consecuencia disminuirá la producción de la forma luminiscente de la luciferina y por tanto la señal de luminiscencia medida será baja. En presencia de un inhibidor, al dejar de actuar la enzima, se consumirá muy poco ATP que será utilizado por la luciferasa aumentando la luminiscencia generada.

25

Se utiliza la enzima GSK-3 beta humana (MILLIPORE) a una concentración de 0,1 ng/ μ L disuelta en el buffer de ensayo (HEPES 50 mM-NaOH pH 7,4; EDTA 1 mM, EGTA 1 mM y Acetato Magnésico 15 mM, todos ellos de SIGMA-ALDRICH) al que se añade TWEEN 20 (SIGMA-ALDRICH) 0,0033% volumen final para aumentar la estabilidad de la enzima.

30

Como sustrato se utiliza un péptido (sintetizado por American Peptide) que asemeja el sitio de fosforilación que la enzima glucógeno sintetasa tiene para GSK-3, este sustrato se añade a una concentración final de 25 μ M en el buffer de ensayo previamente descrito, junto con el ATP a una concentración final de 1 μ M (Baki et al. Assay Drug DevTechnol. 2007, 5:75-83).

35

Como control se utiliza bien alsterpaullone (L Behrend et al. Oncogene (2000) 19, 5303 – 5313), un inhibidor conocido, competitivo del sitio de unión del ATP de GSK-3 o el compuesto TDZD-8 (Martinez et al. J. Med. Chem. 2002, 45, 1292-1299), que actúa de manera no competitiva con el ATP, sus IC₅₀ se calculan en cada ensayo.

40

El procedimiento del ensayo consiste en la adición de 10 μ L del ácido isolecanórico, haciéndose curvas de dosis respuesta de 16 puntos con diluciones 1:2 siendo la concentración del primer punto 50 μ M, se añaden 10 μ L de la solución de enzima y 10 μ L de la disolución de sustrato/ATP. La reacción, se incuba a 30°C durante 30 minutos y a continuación se añaden 30 μ L del sistema de revelado, leyendo la luminiscencia generada con el ATP remanente no gastado en la reacción con el lector Victor2™ de PerkinElmer.

45

El cálculo de los valores de IC₅₀ se realiza utilizando el programa Screener™ de Genedata, obteniéndose una IC₅₀ de 1,2 μ M para GSK-3 β (Fig. 3).

50

El estudio de la inhibición de casein kinasa 1 delta utiliza el mismo método KINASE-GLO® (PROMEGA). El ensayo comienza con la adición de 10 μ L del ácido isolecanórico, haciéndose curvas de dosis respuesta de ocho puntos con diluciones 1:2 siendo la concentración del primer punto 50 μ M. Se añaden 10 μ L de la solución de enzima (suministrada por MILLIPORE) a 0,16 ng/ μ L en el siguiente buffer de ensayo (TWEEN 20 0,001%, HEPES 50 mM-NaOH pH 7,4; EGTA 1 mM, MgCl₂ 10 mM, NaN₃ 0,01%, todos suministrados por SIGMA-ALDRICH). A continuación se dispensan 10 μ L de la mezcla de caseína 0,015% y ATP 3 μ M disueltos en buffer de ensayo (suministrados ambos por SIGMA-ALDRICH), se incuba 1 hora a 30°C y se añaden 30 μ L de kit KINASA-GLO®, leyéndose en el lector para placas multipocillo Victor2™ de PerkinElmer.

55

El cálculo de los valores de IC₅₀ se realiza utilizando el programa Screener™ de Genedata, obteniéndose una IC₅₀ de 12 μ M para Casein kinase 1 delta (Fig. 3).

60

1.4.2. Ensayo de inhibición de la kinasa Cdk2/ciclinaA2, ADP-GLO®

65 Dada la relación estructural existente entre los sitios activos de GSK-3 β y esta kinasa se ha puesto a punto un método para medir su actividad con el Kit de PROMEGA ADP-GLO®. Es un método no radiométrico basado en la medida del ADP remanente tras la reacción de fosforilación del sustrato.

En primer lugar se añade el reactivo ADP-GLO que finaliza la reacción y provoca la depleción del ATP restante. Posteriormente se añade el reactivo de detección que transforma el ADP generado en ATP que participa en la conversión de la luciferina produciendo luz proporcionalmente a la cantidad de ADP remanente.

Para este ensayo se utilizan placas de 384 pocillos de pequeño volumen añadiendo 5 μL del ácido isolecanórico, haciéndose curvas de dosis respuesta de ocho puntos con diluciones 1:2 siendo la concentración del primer punto 50 μM , 5 μL de CDK2/ciclina A, a una concentración final de 0,5 ng/ μL en un buffer de reacción 1X al que se añade DTT 50 μM , y 5 μL de la mezcla sustrato Histona H1 (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y ATP 50 μM final (todos suministrados por SIGNALCHEM).

Se incuba a temperatura ambiente 30 minutos y se añaden 15 μL del reactivo ADP-GLO[®], se incuba durante otros 40 minutos y se añade el reactivo de detección, leyendo en el VICTOR2[™] de PerkinElmer luminiscencia 0,5 segundos por pocillo, ganancia 1X.

El cálculo del porcentaje de actividad se realiza con el programa Screener[™], modulo Assay Analyzer[™], y el cálculo de las IC₅₀ con el modulo Condoseo[™] ambos de Genedata.

El ácido isolecanórico resulta inactivo para el ensayo de inhibición de CDK2 (Fig. 3). El hecho de que el isolecanórico no actúe como inhibidor de CDK2, le confiere una cierta especificidad dentro de quinasas estructuralmente parecidas a GSK-3 como la familia de las CDKs y que comparten con ella inhibidores comunes del sitio del ATP como alsterpaullone.

1.5 Ensayo de competición de ATP en GSK-3 β

Este es un ensayo radiométrico basado en la competencia creada por el exceso de ATP con el sitio de unión a éste, en la que se evalúa la capacidad de un inhibidor de desplazar al nucleótido trifosfato de su lugar de unión.

Para este ensayo se utiliza GSK-3 β humana 0,1 ng/ μL (MILLIPORE), ATP marcado en el fosfato en posición gamma con ³²P (PerkinElmer), ATP no marcado (SIGMA) y el péptido sustrato GS-1 (American Peptide). Estos componentes se disuelven en un buffer compuesto por HEPES 50 mM-NaOH pH 7,4; Acetato Magnésico 15 mM, EGTA 1mM, EDTA 1 mM y TWEEN 20 0,0033% (SIGMA-ALDRICH) todo ello concentraciones finales en agua MilliQ.

El protocolo general consiste en la adición de 10 μL de DMSO, inhibidor control o inhibidor a testar, 10 μL de enzima más 10 μL de la solución de sustrato que incluye valores constantes de ATP marcado si se introducen concentraciones crecientes de sustrato o concentraciones constantes de este último a la vez que se incorporan concentraciones crecientes del ATP marcado.

Se añaden concentraciones de los diferentes inhibidores según el valor de IC₅₀ obtenido en experimentos previos *in vitro* con el método KINASE-GLO[®]. Para el ácido isolecanórico se emplearon concentraciones de 18, 9 y 2,25 μM , manteniéndose este inhibidor a concentración constante para cada una de las curvas de ATP o sustrato (Martinez et al. J. Med. Chem. 2002, 45, 1292-1299).

Esta mezcla de reacción de 30 μL finales se incuba a diferentes tiempos de reacción a 30°C en un incubador Kuhner y una vez finalizados estos tiempos se pipetea 4 μL sobre filtros previamente cortados en círculos de 0,5 cm de papel de filtro P81 de exclusión iónico de WHATMAN, realizándose este proceso por triplicado y en placas de 96 pocillos. Posteriormente se lava 4 veces con ácido ortofosfórico al 1% dejando 10 minutos entre cada uno de estos lavados. Tras este proceso se pasan los filtros de las placas de ensayo a las placas de lectura de PerkinElmer GF/B que se dejan secar durante toda la noche en un incubador a 40°C.

Se añaden 70 μL de líquido de centelleo y tras el sellado de las placas se leen en el lector TopCount[™] PerkinElmer.

El análisis de los datos generados se realiza mediante una curva de calibrado del ATP marcado adicionando diferentes cantidades del compuesto y se calcula la actividad específica del radioisótopo, midiendo las cuentas generadas por picomol de ATP. Se determina la cantidad de picomoles de fosfato incorporado al sustrato retenido en los filtros, por minuto de reacción.

Una vez que se han obtenido estos datos se representan los inversos de la velocidad en el eje de ordenadas y el inverso de la concentración de sustrato en el eje de abscisas, obteniendo el doble recíproco o representación de Lineweaver-Burk (Fig. 4).

En esta representación un inhibidor competitivo cruzara con el eje Y en el mismo punto sea cual sea su concentración ya que tendrá igual valor de Vmax, mientras que en el eje X cortara en diferentes puntos con distintos

valores de K_m , mientras que para inhibidores no competitivos el corte en eje Y será en puntos distintos con valores diferentes de V_{max} y en el mismo punto del eje X lo que significa igual valor de K_m .

5 Con el objeto de validar el experimento se eligen dos inhibidores cuyo modo de acción es conocido y previamente descrito en la literatura. El alsterpallone como un inhibidor competitivo del sitio de unión del ATP e inhibidor no competitivo del sustrato; y el compuesto TDZD-8 como inhibidor no competitivo del sitio del ATP y de igual comportamiento que el anterior para el sustrato.

10 El procesado de los datos se realizó con Excel 2007 y la representación de los datos y la regresión lineal se hizo con Spotfire Silver™ (TIBCO).

El ácido isolecanónico se comporta como inhibidor no competitivo del sustrato y competitivo del sitio del ATP (Fig. 4 y 5).

15 **1.6 Actividad neuroprotectora en células PC-12 del ácido ISOLECANÓNICO.**

20 La capacidad neuroprotectora del ácido isolecanónico se ha evaluado mediante ensayos celulares. Con este fin se ha utilizado la línea celular de rata PC-12 suministrada por ATCC (CRL-1721, células adrenales de pheocromocitoma) capaz de diferenciarse en neuronas tras el tratamiento con el factor de crecimiento nervioso (NGF).

Una vez diferenciadas las células se tratan con L-BMAA (L-beta-metil-amino alanina) que se usa como modelo de daño neuronal en la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).

25 Para la evaluación de sus propiedades neuroprotectoras se probaron diferentes concentraciones del ácido isolecanónico en combinación con 1 mM de BMAA dejándolo actuar durante 24 horas. Para evaluar la viabilidad de las células se utilizó el ensayo colorimétrico de reducción de MTT, basado en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, MTT (SIGMA-ALDRICH), realizada por el enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, resultando en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar de esta manera la funcionalidad mitocondrial de las células PC-12 tratadas con L-BMAA. La cantidad de formazán producido es proporcional a la cantidad de células vivas (Liu et al. 2010 J Nat Prod 73,1193-1195).

30 Tomando como control la muerte inducida por la acción del L-BMAA se calcula la capacidad de los compuestos de reducir la muerte inducida por éste, siendo el ácido isolecanónico capaz de reducir la muerte neuronal hasta un 90% (Fig 6).

35 Como control para poder asegurar la veracidad de los resultados y de la actividad, se incubaron conjuntamente el ácido isolecanónico y el L-BMAA durante 24 horas, y se verificó por HPLC que no se producían reacciones químicas entre ellos.

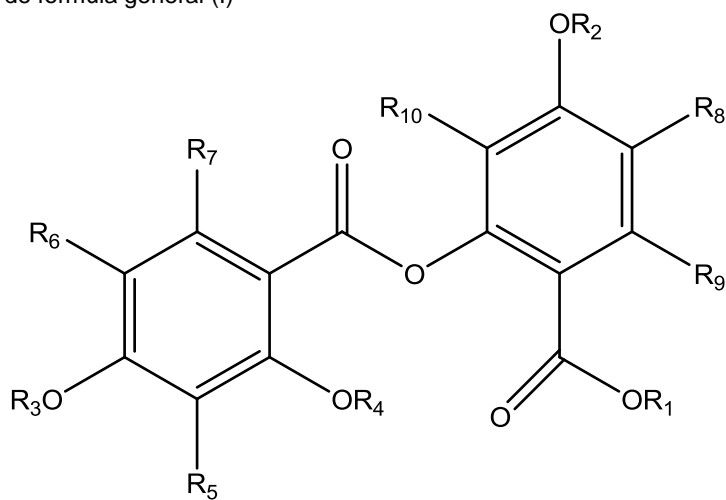
40 **2. Evaluación de algunas características pre-clínicas del ácido ISOLECANÓNICO.**

45 Para poder evaluar las características pre-clínicas del ácido isolecanónico se realizaron ensayos, de citotoxicidad (Corine, et al. 1998 J. Pharmacol. Toxicol 39, 143-146), cardiotoxicidad (Beachamet al. 2010 J Biomol Screen 15, 441-446; Felix et al. 2004 Assay Drug Dev Technol 2, 260-268; Xia et al. 2004 Anal Biochem 327, 74-81.) e inhibición de citocromos (Obach et al. 2006 J Pharmacol Exp Ther, 2006. 316(1): p. 336-48), pruebas generalmente empleadas en la industria farmacéutica para evaluar las moléculas con interés terapéutico.

50 El ácido isolecanónico es una molécula NO citotóxica, NO cardiotóxica y con escasas posibilidades de presentar interacciones medicamentosas *in vivo*.

REIVINDICACIONES

1. Uso del compuesto de fórmula general (I)



(I)

donde: R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ se selecciona, de manera independiente, entre hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₃;

R₇ se selecciona entre hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₅;

R₈ se selecciona entre hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₃ o -COOR₁₁;

R₉ es un grupo alquilo C₁-C₅;

R₁₀ se selecciona entre hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₃ o OR₁₂;

R₁₁ y R₁₂ se selecciona, de manera independiente, entre hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₃;

para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad causada por la generación de radicales libres y estrés oxidativo en la célula y/o relacionada con la actividad de GSK-3 β / caseína quinasa-1.

2. Uso del compuesto según la reivindicación 1, donde la enfermedad se selecciona de la lista que comprende enfermedad neurodegenerativa, cáncer, diabetes y obesidad.

3. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ se selecciona, de manera independiente, entre hidrógeno o metilo.

4. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ son hidrógeno.

5. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R₇ es un grupo alquilo C₁-C₃.

6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R₇ es metilo.

7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R₈ es hidrógeno.

8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R₉ es un grupo alquilo C₁-C₃.

9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R₉ es metilo.

10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R₁₀ se selecciona entre hidrógeno, metilo o OR₁₂ y R₁₂ se selecciona entre hidrógeno o metilo.

11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R₁₀ es hidrógeno.

12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho compuesto es el ácido isolecanórico.

13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, donde la enfermedad neurodegenerativa se selecciona entre la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington y Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).

14. Uso según la reivindicación anterior, donde la enfermedad neurodegenerativa es ELA.

15. Uso del compuesto de fórmula (I) descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, como antioxidante.

16. Uso del compuesto de fórmula (I) descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, como aditivo en alimentos funcionales o complemento alimentarios o dietéticos.
- 5 17. Alimento funcional que comprende un compuesto de fórmula (I) descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
18. Complemento alimentario o dietético que comprende un compuesto de fórmula (I) descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 10 19. Procedimiento de obtención del ácido isolecanórico que comprende:
a. la fermentación de *Glarea lozoyensis* y
b. posterior extracción mediante un disolvente polar del cultivo obtenido en (a).
- 15 20. Procedimiento según la reivindicación anterior, donde el disolvente polar es acetona.
21. Uso de *Glarea lozoyensis* para la obtención de ácido isolecanórico.
22. Uso del ácido isolecanórico para la elaboración de una composición farmacéutica.
- 20 23. Composición farmacéutica que comprende el ácido isolecanórico.
24. Composición farmacéutica que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

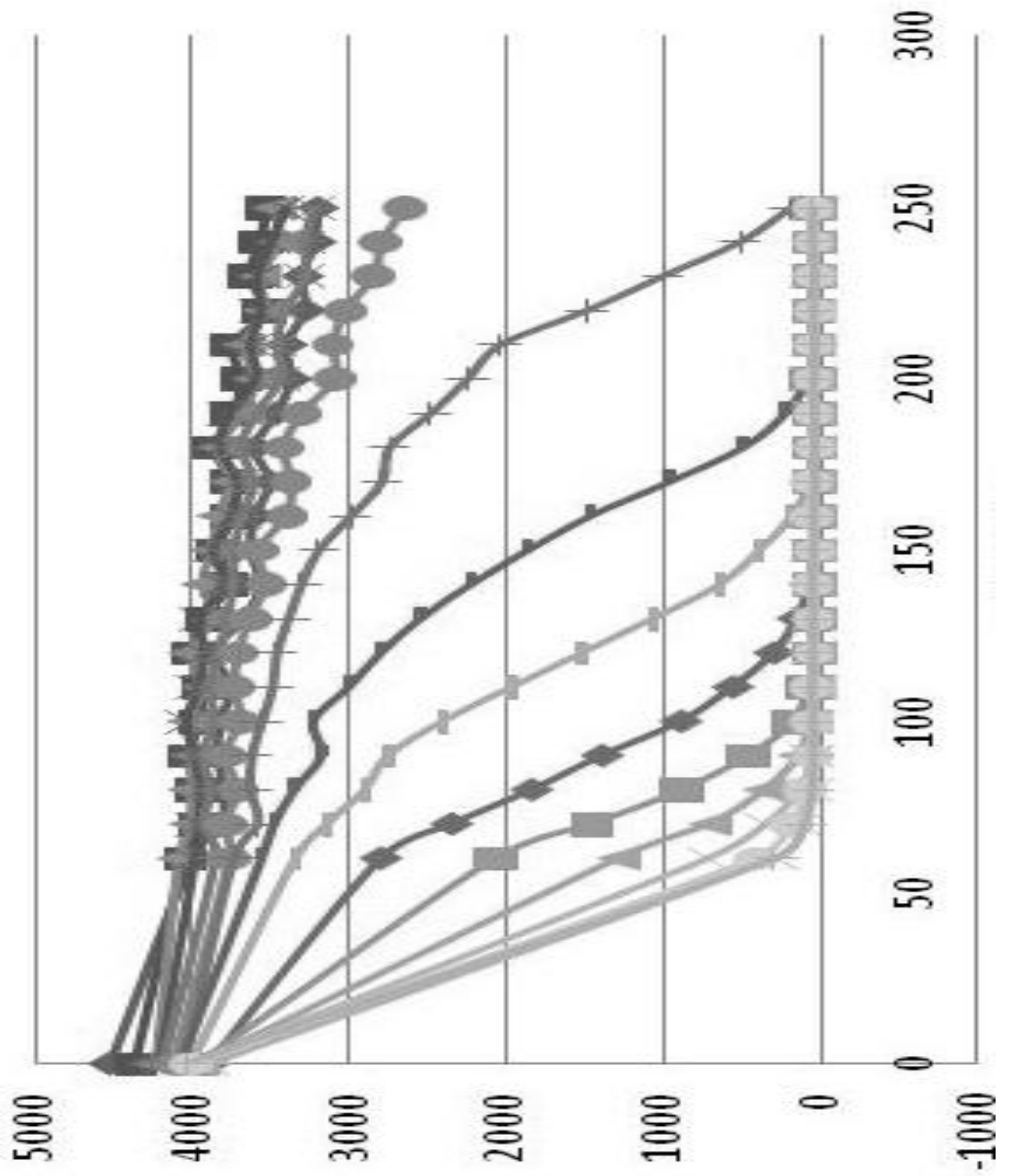


Fig. 1

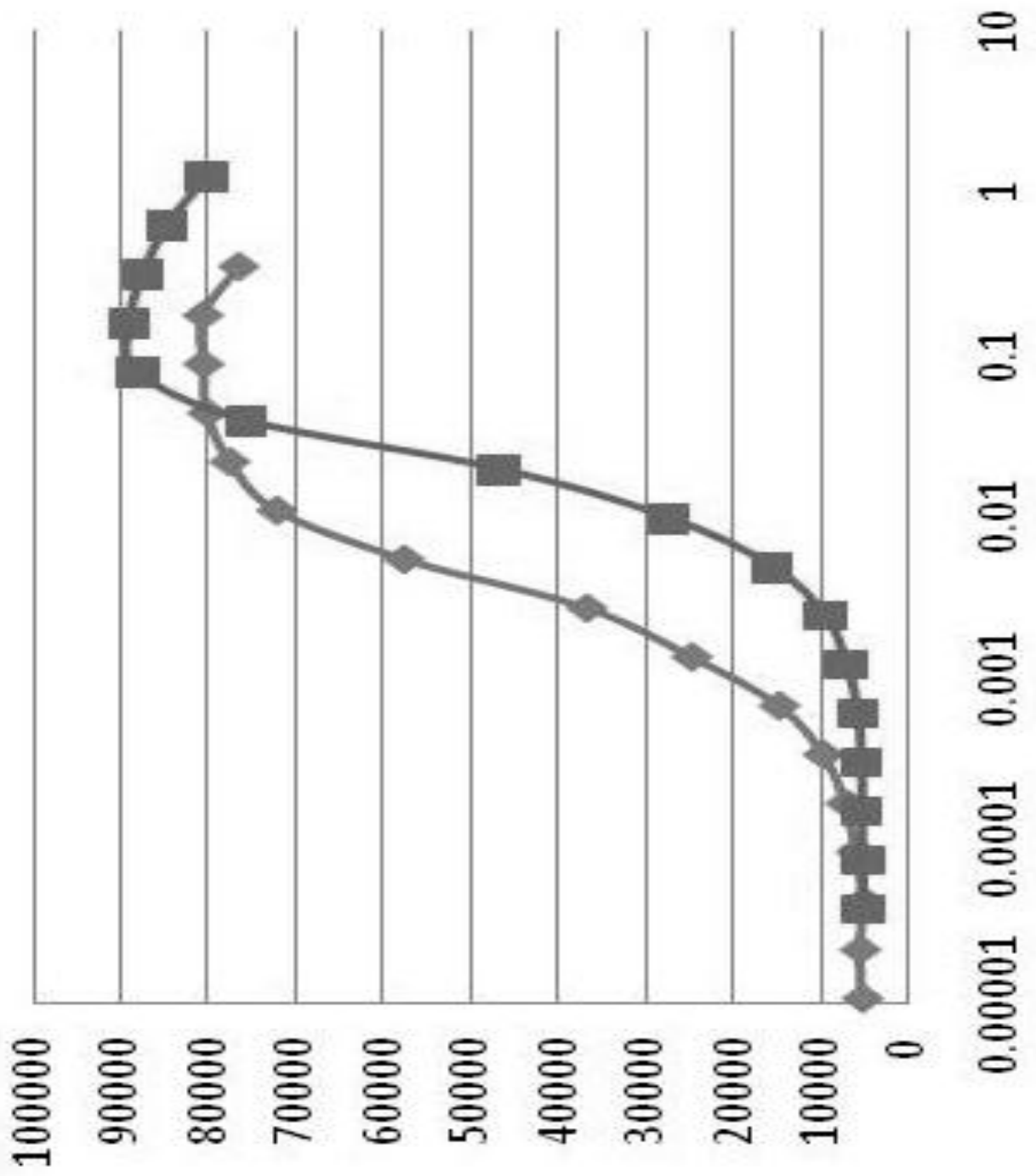


Fig. 2

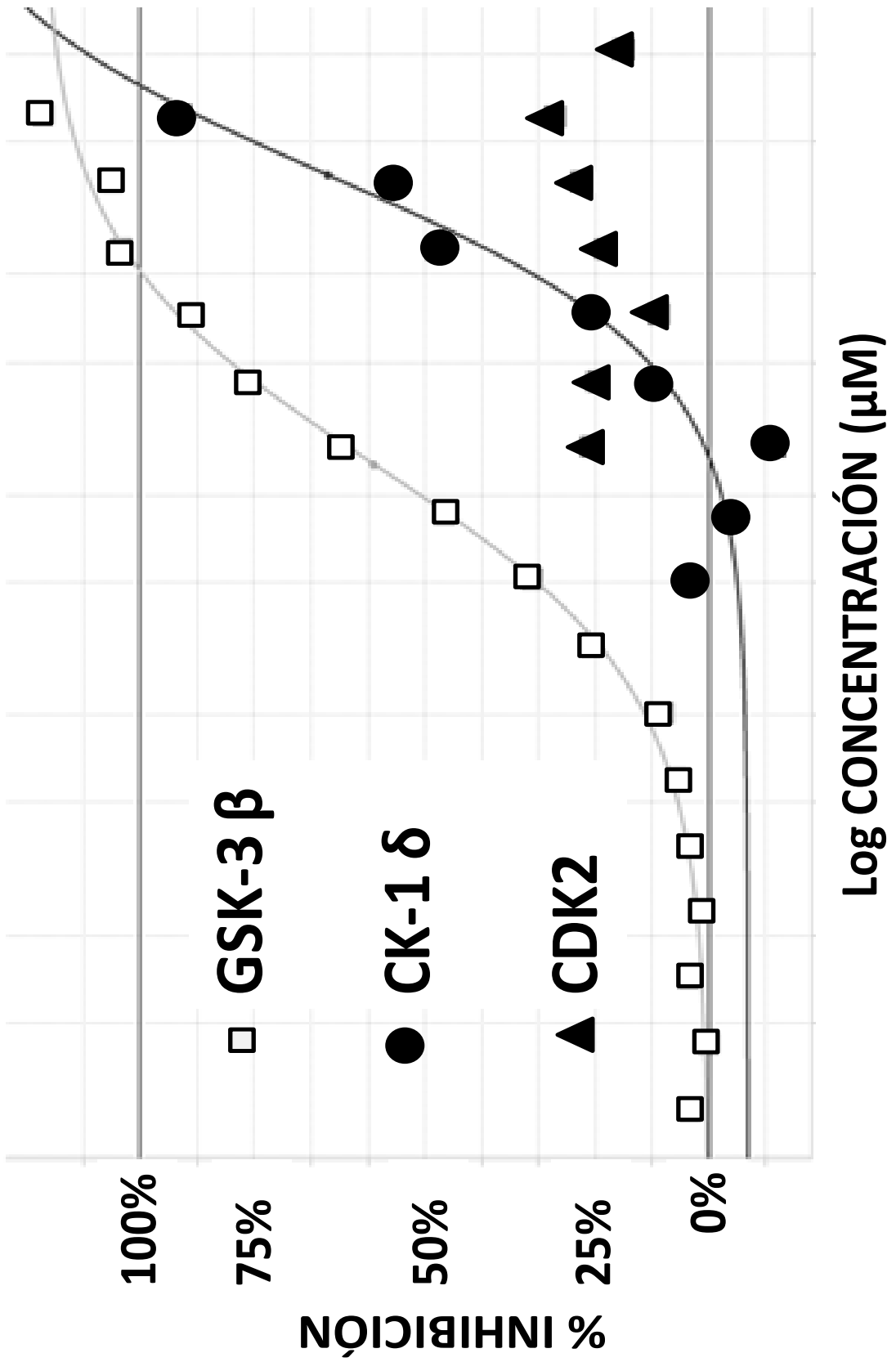


Fig. 3

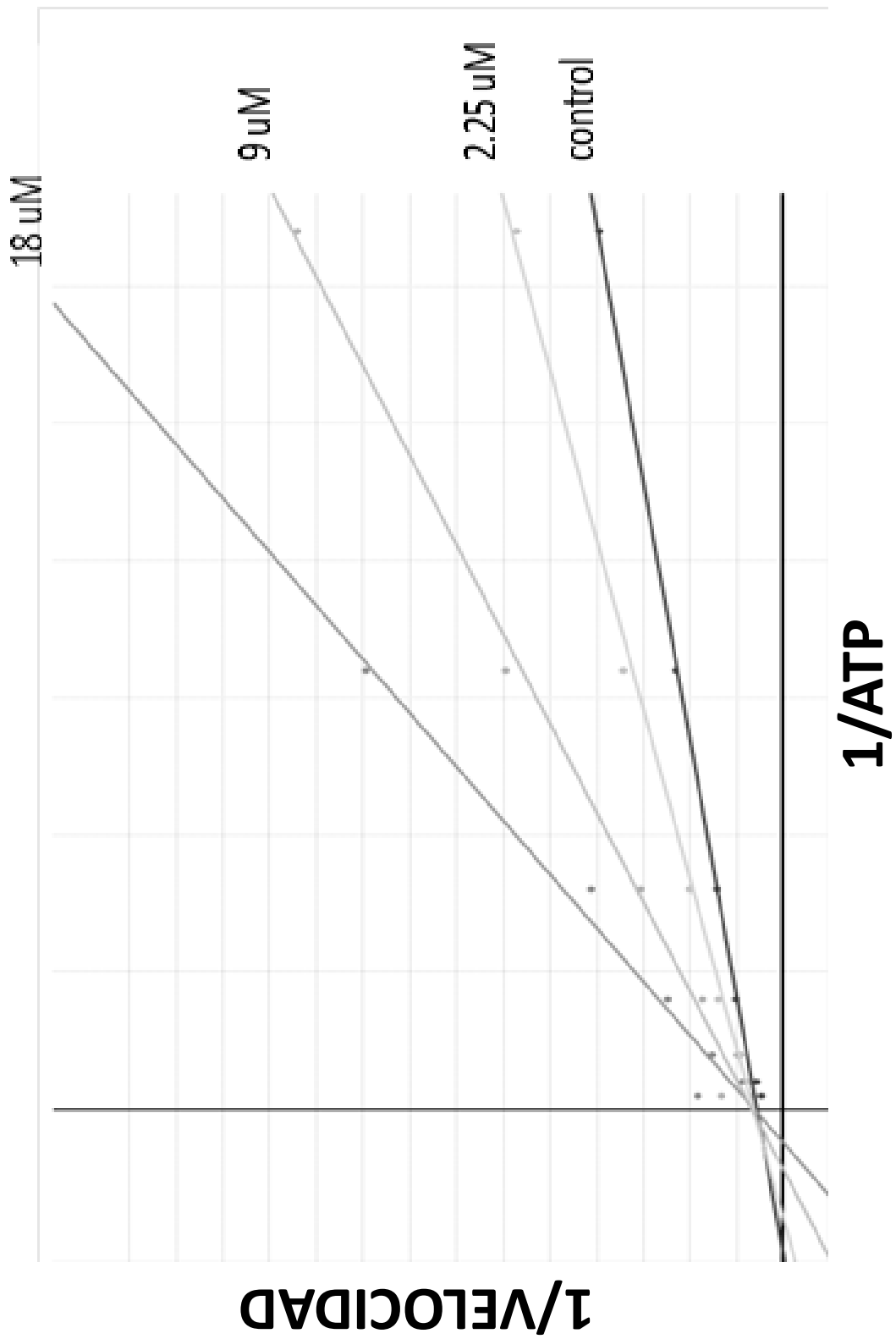


Fig. 4

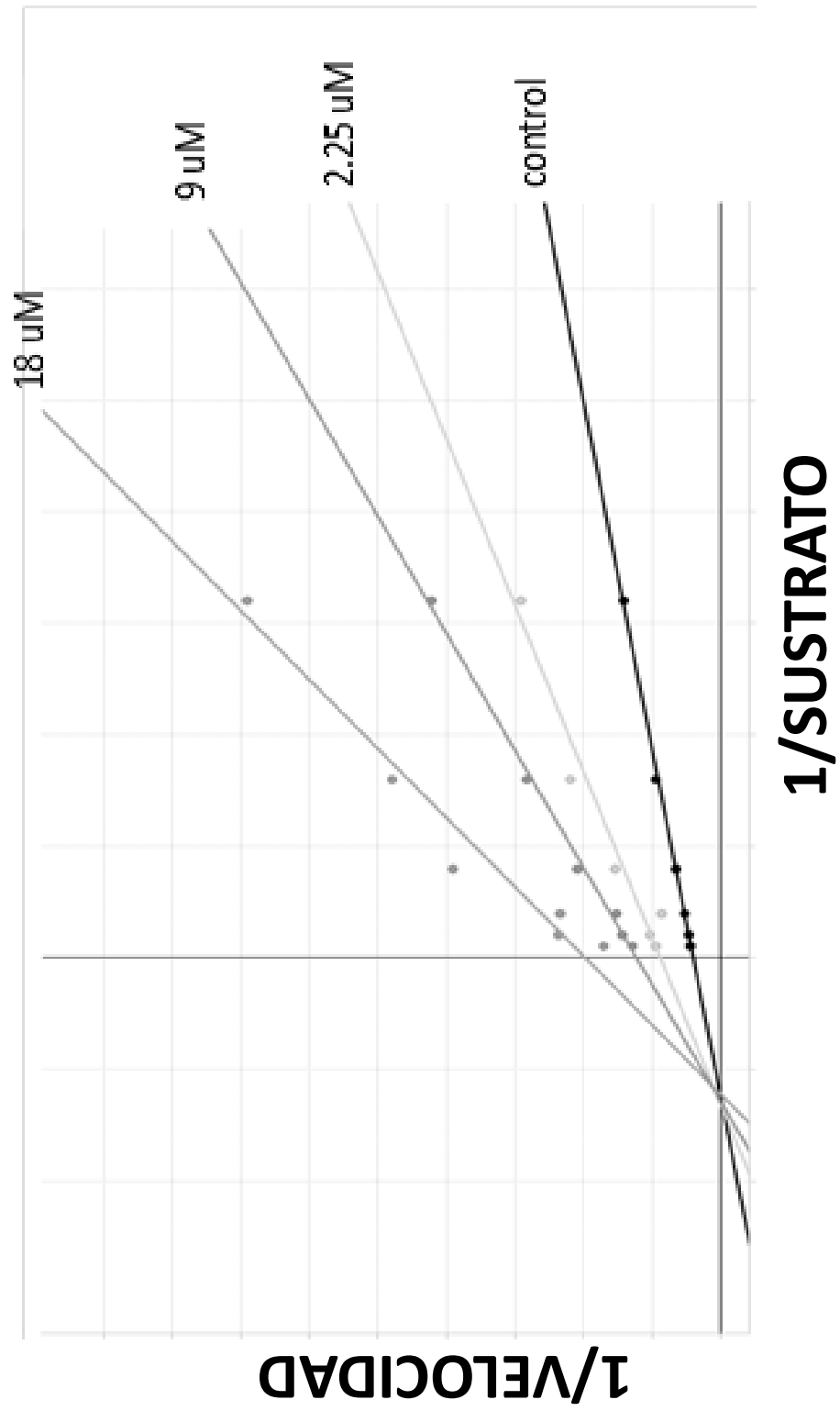


Fig. 5

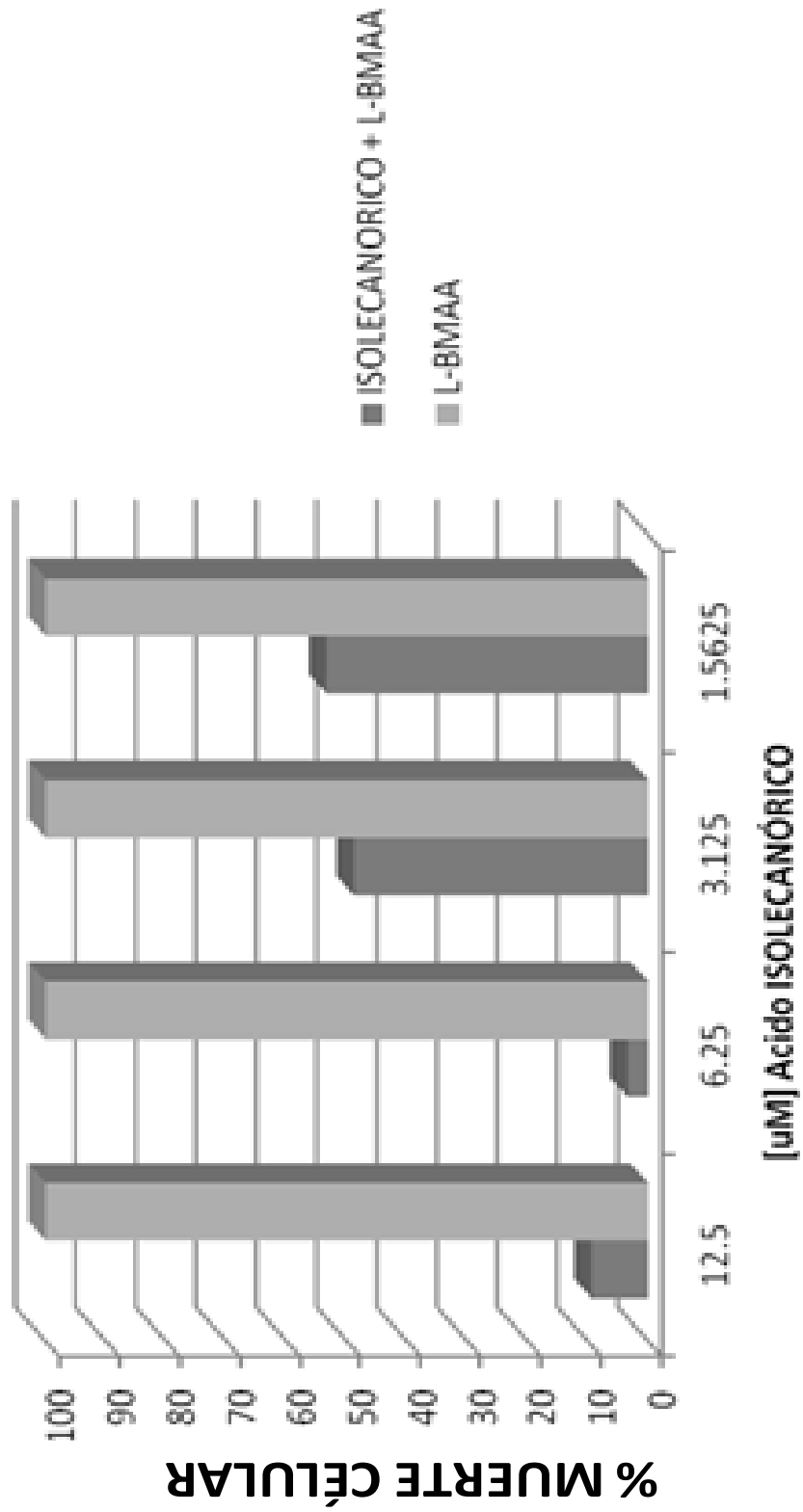


Fig. 6



- ②① N.º solicitud: 201230857
②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.06.2012
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K31/192** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SCHMEDA-HIRSCHMANN GUILLERMO et al. A new antifungal and antiprotozoal depside from the Andean lichen Protousnea poeppigii. Phytotherapy research: PTR England Mar 2008 03/2008 VOL: 22 No: 3 Págs: 349-355 ISSN 1099-1573 (Electronic) Doi: pubmed:18058986, figura 1, tabla 2.	1-24
A	SAKURAI, A y GOTO, Y.: Chemical studies on the Lichen. I. The structure of isolecanoric acid, a new ortho-depside isolated from Parmelia tinctorum Despr. Bull Chem. Soc. Jpn, 1987, vol. 60, páginas 1917-1918, ISSN 0009-2673, todo el documento.	1-24
A	CHILD J J et al. Purification and properties of a phenol carboxylic acid acyl esterase from Aspergillus flavus..Canadian journal of microbiology CANADA Nov 1971 11/1971 VOL: 17 No: 11 Págs: 1455-1463 ISSN 0008-4166 (Print) Doi: pubmed:5003249, figura 1.	1-24
A	TRANCHIMAND S et al. First chemical synthesis of three natural depsides involved in flavonol catabolism and related to quercetinase catalysis. Synthetic Communications 2006 us 2006 VOL: 36 No: 5 Págs: 587-597 ISSN 0039-7911 (print) ISSN 1532-2432 (electronic) Doi: doi:10.1080/00397910500406534, página 589, esquema 4.	1-24
A	US 2009048332 A1 (CHOUDHARY MUHAMMAD IQBAL et al.) 19.02.2009, todo el documento.	1-24
A	WO 2008109521 A2 (UNIV SOUTH FLORIDA et al.) 12.09.2008, páginas 2,3,4.	1-24

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
16.08.2013

Examinador
H. Aylagas Cancio

Página
1/4

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

A61K

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

INVENES, EPODOC WPI, NPL, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, XPESP2, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.08.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-24	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-24	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	SCHMEDA-HIRSCHMANN GUILLERMO et al. A new antifungal and antiprotozoal depside from the Andean lichen Protousnea poeppigii. Phytotherapy research: PTR England Mar 2008 03/2008 VOL: 22 No: 3 Págs: 349-355 ISSN 1099-1573 (Electronic) Doi: pubmed:18058986, figura 1, tabla 2.	29.02.2008
D02	SAKURAI, A y GOTO, Y.: Chemical studies on the Lichen. I. The structure of isolecanoric acid, a new ortho-depside isolated from Parmelia tinctorum Despr. Bull Chem. Soc. Jpn, 1987, vol. 60, páginas 1917-1918, ISSN 0009-2673, todo el documento.	
D03	CHILD J J et al. Purification and properties of a phenol carboxylic acid acyl esterase from Aspergillus flavus..Canadian journal of microbiology CANADA Nov 1971 11/1971 VOL: 17 No: 11 Págs: 1455-1463 ISSN 0008-4166 (Print) Doi: pubmed:5003249, figura 1.	31.10.1971
D04	TRANCHIMAND S et al. First chemical synthesis of three natural depsides involved in flavonol catabolism and related to quercetinase catalysis. Synthetic Communications 2006 us 2006 VOL: 36 No: 5 Págs: 587-597 ISSN 0039-7911 (print) ISSN 1532-2432 (electronic) Doi: doi:10.1080/00397910500406534, página 589, esquema 4.	30.11.2005

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

La presente solicitud se refiere al uso de un compuesto de fórmula general I y específicamente al ácido isolecanórico para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad causada por la generación de radicales libres y estrés oxidativo en la célula y/o relacionada con la actividad de GSK-3 beta/casein kinasa-1. Estas enfermedades se seleccionan de la lista que comprende enfermedades neurodegenerativas (tales como Alzheimer, Parkinson, Huntington y ELA), cáncer, diabetes y obesidad. Se reivindica asimismo un alimento funcional que comprende dicho compuesto y el procedimiento de obtención del ácido isolecanórico mediante la fermentación de la Glarea Lozoyensis.

Los documentos D1-D4 se refieren a compuestos de estructura de fórmula I es decir orto-dépsidos, El documento D1 se refiere a dichos compuestos orto-dépsidos (ver figura 1) y su uso como antifúngicos y antiprotozoos. El documento D2 se refiere al procedimiento de obtención del ácido isolecanórico (compuesto específicamente reivindicado en la presente solicitud) a partir de la Parmelia tinctorum. Y los documentos D3 y D4 tratan también de compuestos orto-dépsidos y su preparación.

Por lo tanto, a la vista de los documentos citados, se demuestra que los compuestos utilizados son conocidos pero no su uso en las enfermedades reivindicadas, ni tampoco es conocido el procedimiento de obtención utilizado.

En consecuencia, la materia correspondiente a las reivindicaciones 1-24 tienen novedad y actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.