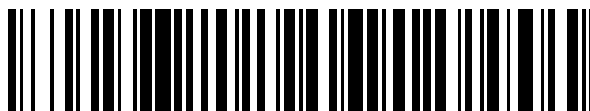


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 461**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/7076 (2006.01)

A61K 38/44 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2009 E 09714406 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015 EP 2249868**

54 Título: **Uso de S-adenosilmetionina (SAM) y superóxido dismutasa (SOD) para la preparación de medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

29.02.2008 EP 08425123

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

10.11.2015

73 Titular/es:

**GNOSIS S.P.A. (100.0%)
Piazza del Carmine 4
20121 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**SCARPA, SIGFRIDO;
FUSO, ANDREA;
DAMIANI, ROSELLINA y
ROSSINI, MAURO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 550 461 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de S-adenosilmetionina (SAM) y superóxido dismutasa (SOD) para la preparación de medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

5 La presente invención se refiere al uso de S-adenosilmetionina (SAM) en combinación con la superóxido dismutasa (SOD) para la preparación de medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Antecedentes de la invención

10 La enfermedad de Alzheimer (EA) es una forma neurodegenerativa muy extendida de demencia que afecta a un alto porcentaje de la población mundial de más de 70 años de edad, con una proporción de 1:2 entre hombres y mujeres. La incidencia de la EA es cada vez mayor, ya que la forma no genética más común comienza en torno a los 70-75 años, y la esperanza de vida es cada vez mayor debido a los mayores niveles de vida combinados con los avances de la medicina y la farmacología. La enfermedad también existe como una forma de transmisión genética asociada con mutaciones en algunos lugares cromosómicos 14, 19 y 21 (típicos de las personas que padecen el síndrome de Down). El inicio temprano de la forma familiar de la EA tiene lugar en torno a los 50 años de edad, y provoca la degeneración cerebral seguida de la muerte en 2-3 años. La forma de aparición tardía de la enfermedad también da lugar a la degeneración del cerebro y a la muerte, pero en un período de 10 o más años.

15 El cerebro presenta un gran número de placas en los espacios interneuronales y los ovillos neurofibrilares típicos de las neuronas, especialmente los de la corteza cerebral, el hipocampo y la amígdala, y en otras partes del cerebro con funciones cognitivas. Las placas amiloides, también conocidas como placas seniles, son polímeros del péptido β -amiloide ($A\beta$), que deriva de una proteína mayor: la proteína precursora de β -amiloide (APP). La APP es un miembro de la superfamilia altamente conservada de glucoproteínas transmembrana.

20 En la última década, los científicos dedicados a la investigación sobre la EA han realizado numerosos estudios con miras a comprender su etiología, sobre todo en lo relativo a los mecanismos moleculares. La investigación sobre los componentes moleculares y su regulación puede aclarar sus perspectivas terapéuticas y de diagnóstico. La atención se ha centrado en las presenilinas, cuyo papel en el procesamiento de la APP y, por lo tanto, en la producción de $A\beta$, parece ser muy significativo. Se ha demostrado que estas proteínas, la presenilina 1 (PS1) y la presenilina 2 (PS2), presentan una actividad enzimática o regulan las actividades de otras enzimas, en concreto, de las secretasas que escinden la APP en catabolitos normalmente degradables (α -secretasa) o en péptido $A\beta$ (β - y γ -secretasa). En la EA familiar, las mutaciones de los genes que codifican PS1 y PS2 conducen a una producción excesiva de $A\beta$ y a la acumulación de la isoforma $A\beta$ -42, en particular, que es altamente amiloidogénica. Recientemente, los experimentos en ratones con PS1 desactivada evidenciaron una gran reducción en la actividad de la γ -secretasa, demostrando que PS1, además de pertenecer al complejo γ -secretasa, también es principalmente responsable de la producción y la acumulación de $A\beta$. En lo que respecta a la β -secretasa, se cree que el producto del gen BACE puede realizar la escisión de la β -secretasa solo.

35 El desarrollo de inhibidores de la γ - y β -secretasa clínicamente útiles podría convertirse en un arma crucial contra la enfermedad de Alzheimer, y actualmente es una de las empresas más emocionantes que se han emprendido en la neurociencia. Se ha demostrado claramente que la actividad de PS1 no se puede suprimir totalmente, porque dicha proteína es necesaria para procesar el factor de transducción Notch-1, un factor crucial para la madurez de muchas células madre, tales como las que participan en la eritropoyesis.

40 La regulación de la expresión génica por medio de la metilación del ADN se puede estudiar satisfactoriamente en un sistema de cultivo celular capaz de expresar los genes implicados en la EA. Como resultado de los estudios de los presentes inventores, se ha encontrado un indicio muy interesante en los mecanismos de regulación implicados en el envejecimiento, que consiste en un aumento gradual, global, de la hipometilación del ADN en los ancianos, y la acumulación de homocisteína observada en los pacientes que padecen demencia senil. La acumulación de homocisteína y la hipometilación del ADN están correlacionados metabólicamente, ya que la no conversión de la homocisteína en metionina invierte el metabolismo hacia la síntesis de S-adenosilhomocisteína, que se sabe que es un potente inhibidor de la ADN-metiltransferasa y, por lo tanto, que induce la hipometilación del ADN. De acuerdo con la teoría bien establecida de que muchos genes se expresan cuando las citosinas de secuencias específicas se desmetilan, este patrón bioquímico puede conducir a la expresión de genes no expresados y a la sobreexpresión de genes que normalmente se expresan. Este puede ser el caso de la EA, debido a la sobreexpresión de PS1, en concreto, la γ -secretasa puede superar de forma discontinua la actividad de la α -secretasa y, por lo tanto, producir el péptido $A\beta$, que se acumula y puede provocar la enfermedad después de muchos años. Otro indicio adicional del posible papel de la metilación del ADN en la EA es el hallazgo de que los pacientes con EA presentan niveles mucho más bajos post mortem de donantes de metilo en el cerebro. La menor disponibilidad de S-adenosilmetionina (SAM) podría conducir fácilmente a la modificación o al aumento de la expresión de los genes implicados en el metabolismo de la APP, produciendo, con el tiempo, una acumulación de péptido $A\beta$ en las placas seniles.

55 Se han realizado experimentos preliminares en una línea de neuroblastoma (SK-N-SH) que expresa APP, PS1, PS2, BACE, α -secretasa, los otros componentes de γ -secretasa y Notch 1. Los cultivos se trataron con un medio de cultivo exento de folato, vitamina B12 y vitamina B6 (con el fin de alterar el metabolismo de la homocisteína), al que

se añadió SAM a diversas concentraciones (para equilibrar los efectos de la privación de vitaminas). Se encontró un aumento en la expresión de PS1 y BACE en el medio exento de vitamina B, y una notable reducción en la expresión de PS1 y BACE tras la administración de SAM. En experimentos realizados con HpaII/PCR en los promotores de APP y PS1, se encontró una gran diferencia en la metilación de uno de los sitios CpG del promotor de PS1. Se llegó a la conclusión de que es posible silenciar parcialmente el gen PS1 mediante la administración exógena de SAM. La administración de SAM puede reducir la expresión de PS1, restableciendo el equilibrio metabólico en favor de la α -secretasa. También se han realizado experimentos con ratones transgénicos de la cepa TgCRND8, y los controles correspondientes; estos ratones se caracterizan por la presencia del gen APP humano mutado y, por lo tanto, pueden desarrollar placas amiloides en un breve período de tiempo. Estos animales se alimentaron con una dieta completa o una dieta carente de las vitaminas del grupo B. Una vez más, como en las células, se observó un aumento de la expresión de PS1 y BACE.

En ambos modelos experimentales, la alteración de la expresión génica tuvo el efecto de aumentar las actividades γ -y β -secretasa, con la consiguiente superproducción de A β , que se acumuló formando placas seniles más rápidamente que en los animales tratados con la dieta de control.

Los datos resumidos anteriormente se han presentado en las siguientes publicaciones:

Fuso A., Nicolai V., Cavallaro R. A., Ricceri L., D'Anselmi F., Coluccia P., Calamandrei G. y Scarpa S. 2008. "B-Vitamin Deprivation Induces Hyper-homocysteinemia and Brain S-adenosylhomocysteine, Depletes Brain S-adenosylmethionine, and Enhances PS1 and BACE Expression and Amyloid- β Deposition in Mice". *Mol. Cell. Neurosci.* 37: 731-746.

Fuso A., Cavallaro R. A., Zampelli A., D'Anselmi F., Piscopo P., Confaloni A. y Scarpa S. 2007. " γ -secretase is differentially modulated by alterations of Homocysteine cycle in neuroblastoma and glioblastoma cells". *J. Alz. Dis.* 11: 275-290.

Cavallaro R. A., Fuso A., D'Anselmi F. y Scarpa S. 2006. "The effect of S-adenosylmethionine on CNS gene expression studied by cDNA microarrays analysis". *J. Alz. Disease.* 9: 415-419.

Scarpa S., Cavallaro R. A., D'Anselmi F. y Fuso A. 2006. "Gene silencing through methylation: an epigenetic intervention on Alzheimer Disease". *J. Alz. Disease.* 9: 407-414.

Fuso A., Seminara L., Cavallaro R. A., D'Anselmi F. y Scarpa S. 2004. "Homocysteine/S-adenosylmethionine Cycle Alterations Unbalance DNA Methylation Status with Consequent Up-regulation of Beta-amyloid Production". *Mol. Cell. Neurosci.* 28(1):1195-204.

Scarpa S., Fuso A., D'Anselmi F., Cavallaro R. A. 2003. "Presenilin 1 gene silencing by S-adenosylmethionine: a treatment for Alzheimer disease?" *FEBS Letters* 541 (1-3):145-148.

Fuso A., Cavallaro R. A., Orru L., Buttarelli F. R. y Scarpa S. 2001. "Gene silencing by S-adenosylmethionine in muscle differentiation". *FEBS Letters* 508 (3): 337-340.

El uso de SAM para tratar la EA se propuso en los documentos US 2002/025926 y US 2004/0048827. El segundo documento demostró la capacidad de SAM para interferir con la expresión génica del precursor de la β -secretasa, de la presenilina 1 y 2, y de la proteína β -amiloide. Los estudios se realizaron con SAME marcado (tritiado) una vez que dicha solicitud de patente demostrara la capacidad de la molécula para alcanzar el sistema nervioso central tras la administración oral, como se informa más adelante.

En los documentos US 5519058 y CN 1099224, se sugiere al efecto beneficioso de SOD en el tratamiento de la EA.

En los documentos US 2003/129261 y WO 2005/041996, se desvelan las composiciones farmacéuticas que comprenden SAM y SOD junto con una serie de principios activos, para su uso en afecciones distintas de la EA.

Descripción de la invención

Ahora se ha encontrado que la actividad de S-adenosilmetionina se puede mejorar sorprendentemente cuando se administra en combinación con LA superóxido dismutasa (SOD). Dicha enzima, no solo ha demostrado ser capaz de facilitar el paso de la S-adenosilmetionina a través de la barrera hematoencefálica, sino que también interacciona sinérgicamente con SAM en la reducción de la expresión de los genes de PS1 y BACE sobreexpresados como resultado de la deficiencia de vitamina B.

Por lo tanto, un aspecto de la invención se refiere a productos que contienen S-adenosilmetionina o un derivado de la misma y superóxido dismutasa en forma de una preparación combinada para la administración simultánea, separada o secuencial en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Las dosis pueden variar dentro de un amplio intervalo en vista de la muy baja toxicidad de SAM y SOD, y dependerán de una serie de factores, tales como el peso, el sexo y la edad del paciente. Sin embargo, en términos generales, serán de entre 200 y 2.000 mg/día para SAM y de entre 50 y 1.000 mg/día para SOD.

La SAM se puede administrar preferentemente por vía oral, bien como tal o en forma de una sal estable de la misma tal como tosilato, butanodisulfonato, disulfato tosilato, disulfato ditosilato o disulfato monotosilato. Una forma ventajosa de administración es la de células de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecidas con SAM, descrita en el

documento WO 2006/131382.

La SOD, obtenida por fermentación de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* como se describe en el documento WO 2006/131382, presentada por el solicitante, también se puede administrar por vía oral, con ayuda de una película de gliadina, o usando otras técnicas de gastroprotección. Como alternativa a la vía oral, tanto SAM como SOD se

Los ejemplos de dichas formulaciones incluyen comprimidos recubiertos con película con polímeros acrílicos o metacrílicos, cápsulas gastrorresistentes, microcápsulas y similares.

La SAM y la SOD pueden estar presentes en la misma unidad de dosis o formularse y administrarse por separado, en cuyo caso, se podrían proporcionar kits que comprendieran los dos fármacos en formas de dosificación independientes acompañadas de instrucciones para su uso secuencial, simultáneo o separado.

Descripción de las figuras

Las **Figuras 1a y 1b** muestran el efecto de SAM y SOD en ratones sobre la sobreexpresión de PS1 y BACE inducida por una dieta exenta de vitamina B.

La **Figura 2** muestra el efecto de la SOD y el glutatión (GSH) sobre la sobreexpresión de PS1 y BACE en células de neuroblastoma de la línea SK-N-BE, solos y en combinación con SAM.

La **Figura 3** muestra los niveles de SAM tritada en los cerebros de los ratones tras la administración oral de SAM a 400 µg/día.

La **Figura 4** muestra la medida de la producción de β-amiloide en células de neuroblastoma humanas tras una semana de tratamiento.

La **Figura 5** muestra el efecto de SAM y SOD en estado oxidativo en eritrocitos y el cerebro de los ratones tratados con dieta exenta de vitaminas B.

La invención se describirá ahora con mayor detalle por medio de los ensayos farmacológicos descritos a continuación a modo de ejemplo.

Ejemplo 1 - Expresión génica

En particular, se ensayó el efecto de la SAM a concentraciones farmacológicas (400 µg/día) en ratones TgCRND8 y los correspondientes controles de tipo silvestre.

Canales de expresión génica

Se extrajo ARN de cultivos celulares y cerebros homogeneizados, y se sintetizó ADNc. Se usaron 0,5 µg de ADNc total para cada reacción en tiempo real sobre un motor de ADN Opticon2 (MJ Research) usando reactivos verdes SYBR. La eficiencia de amplificación para cada par de cebadores se determinó previamente mediante la amplificación de una curva lineal patrón. Se compararon las muestras experimentales con una curva patrón de un gen específico para determinar la cantidad de ADNc específico presente en la reacción patrón. Los patrones se obtuvieron de productos de PCR altamente purificados amplificados por controles positivos. Los niveles totales de ADNc se normalizaron con respecto al control de β-actina (genes constitutivos).

Los resultados demuestran que la SAM también invierte la sobreexpresión de PS1 y BACE inducida por una dieta exenta *in vivo* (Fig. 1), e incluso la reduce a niveles inferiores a los de la dieta de control.

Dado que el metabolismo de la homocisteína participa en ambas reacciones de metilación y óxido-reducción, se ensayó el efecto de diversos antioxidantes sobre la expresión de los dos genes. Los primeros datos obtenidos con células de neuroblastoma de la línea SK-N-BE demostraron que tanto la SOD como el glutatión (GSH) inhiben la sobreexpresión de PS1 y BACE inducida por la privación de vitaminas, aunque en menor medida que la SAM. Sin embargo, es interesante destacar que cuando la SOD y la SAM se administran conjuntamente presentan un efecto sinérgico (Fig. 2) que reduce aún más la expresión de los dos genes a niveles inferiores a los observados solo con la SAM (15-20 % inferiores).

Ejemplo 2 - Absorción de SAM

Se realizaron experimentos en células y en ratones para demostrar que la SAM atraviesa la barrera hematoencefálica.

Para los cultivos celulares, se añadieron 100 µM de SAM al medio de cultivo celular F14 (completo o exento de vitamina B, de acuerdo con el diseño del ensayo) y se detuvieron los cultivos tras 96 horas.

Para los ratones, se administraron 400 µg/día de SAM por vía oral mediante alimentación con aguja de sonda, y los animales fueron sacrificados después de 2 meses. Los animales recibieron una dieta completa o una dieta exenta de vitamina B, de acuerdo con el diseño del ensayo. Se analizaron los niveles de SAM por HPLC con un sistema de HPLC de Varian. Se sometieron a lisis las células y los cerebros homogeneizados en agua destilada, y se hicieron

precipitar las macromoléculas con PCA 1,5 M. Se calcularon curvas patrón de la SAM antes y después de las muestras experimentales. Para el análisis de la SAM tritiada, las células se trataron como se describe anteriormente, mientras que los ratones se trataron durante 4 días para minimizar la exposición al fármaco radiactivo. Se sometieron las células y los cerebros homogeneizados a lisis en agua destilada. Se sometió una parte de los cerebros lisados a ultrasonidos y se centrifugó para separar las membranas y los orgánulos celulares. Otra parte se trató con ácido perclórico (PCA) tras el tratamiento de ultrasonidos para separar las macromoléculas. La absorción de SAM radiactiva se midió mediante centelleo con un contador β .

Se encontró que los niveles intracelulares de SAM aumentaron de 1 (control) a 2,5-3 μ M. Para establecer si el aumento se debía a la absorción de SAM exógena en oposición a un aumento de las reservas endógenas en presencia de concentraciones extracelulares elevadas de la molécula, se realizó un ensayo con SAM radiactiva. Se añadieron 100 μ M de SAM tritiada (SAM[3H]) a cultivos de células SK-N-BE, y se evaluó la absorción mediante la lisis de las células y el recuento de la radiactividad. Se encontró un recuento de radiactividad de 1,5 μ M de la SAM en los lisados celulares. Este valor es comparable al aumento de 1 a 2,5 veces encontrado con la SAM no tritiada, e indica claramente que el aumento intracelular se debe a la absorción de la SAM exógena.

Se encontró un aumento similar en los niveles de SAM en lisados cerebrales de ratones tratados oralmente con 400 μ g/día de SAM. Una vez más, se realizó un ensayo adicional con SAM[3H] a una concentración de 400 y 800 μ g/día. El aumento de la radiactividad en los lisados cerebrales totales es comparable a 0,5 ng de SAM por cerebro en los ratones tratados con 400 μ g de SAM, y 1 ng por cerebro en los ratones tratados con 800 μ g de SAM (Fig. 3).

Una parte de los lisados cerebrales totales también se sometió a ultrasonidos y se centrifugó para obtener un lisado aclarado (citoplasma), y una parte adicional de dicho lisado aclarado se hizo precipitar con ácido perclórico (PCA) para eliminar las proteínas (lisado soluble). Es interesante señalar que el lisado soluble de ratones tratados con 800 μ g de SAM muestra un nivel de radiactividad comparable a 0,5 ng de SAM (mientras que el lisado total y el aclarado presentaron niveles más altos), lo que indica que la función de metilo en exceso unida a la SAM exógena se conjugó con otras moléculas celulares.

Ejemplo 3 - Producción de amiloide en líneas celulares de neuroblastoma

Procedimientos: Medios y cultivos celulares

Se mantuvo la línea de células humanas SK-N-BE de neuroblastoma en medio F14 con FCS al 10 % y se cambió a medio de diferenciación completo (medio de control, con FCS al 1 % más ácido retinoico 10 μ M) o a medio de diferenciación deficiente en folato, vitamina B12 y vitamina B6 (deficiente en B). Los cultivos se volvieron a suministrar cada dos días y se detuvieron tras 96 días.

Animales y dietas

Aproximadamente a las 3 semanas de vida, se asignaron los ratones de forma sistemática bien a un grupo de dieta de control o a un grupo de dieta deficiente, recibiendo comida y agua a voluntad. El control (AIN-93M; dieta A: 1,98 mg de folato; 0,025 mg de vitamina B12; 7 mg de vitamina B6) y las dietas experimentales (AIN-93M B; dieta B, deficiente en folato, vitamina B12 y vitamina B6) se adquirieron en Mucedola (Italia). Ambas dietas contenían sulfatiazol al 1 % para inhibir la formación de folato por medio de las bacterias del intestino y asegurarse de que la única fuente de folato fuera la dieta. Por otra parte, otros tres grupos de animales recibieron SAM (800 μ g/día) o SOD (10 U/día) o la combinación de ambos fármacos (SAM 400 μ g/día y SOD 5 U/día). Después de una semana de tratamiento, se anestesiaron los ratones y se sacrificaron para obtener el cerebro y sangre. La sangre se extrajo por punción cardíaca en un tubo de ensayo que contenía 2 g/dl de EDTA y se centrifugó de inmediato para separar el plasma y los eritrocitos, y después se almacenó a -80 °C. Los cerebros se perfundieron con PBS y se extrajeron.

Análisis amiloide

Se sometieron a lisis cerebros homogeneizados con TRIS-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 al 0,2 %, CHAPS al 1 %, EDTA 2 mM, PMSF (200 μ M), leupeptina (1 μ M), pepstatina A (1 μ M) e inhibidor I de calpaína (5 μ M). Se usaron extractos de proteínas para el ensayo de ELISA con el kit de inmunoensayo de A β 1-42 (BioSource Internacional, Bélgica); el kit de ELISA garantiza una buena sensibilidad lineal hasta 10 pg/ml de (1-42). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico

Se calculó un ANOVA de una vía y se usó el ensayo posterior de Bonferroni para evaluar cualquier diferencia significativa ($p < 0,05$) informada.

Resultados

A partir de los datos presentados en la Figura 4, la sinergia entre SAM y SOD parece evidente y quedó confirmada por el análisis estadístico que se presenta a continuación, siempre con referencia a la Figura 4.

Deficiente en B frente al control: $p < 0,001$;
deficiente en B + SAM y deficiente en B + SOD frente a deficiente en B: $p < 0,001$;
deficiente en B + SAM + SOD frente a deficiente en B: $p < 0,001$;
deficiente en B + SAM + SOD frente a deficiente en B + SAM y deficiente en B + SOD: $p < 0,001$.

REIVINDICACIONES

1. El uso de S-adenosilmetionina (SAM) en combinación con superóxido dismutasa (SOD) para la preparación de medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
- 5 2. El uso según la reivindicación 1, en el que el medicamento inhibe la sobreexpresión de PS1 y BACE.
3. El uso según la reivindicación 1 o 2, en el que los medicamentos se administran por vía oral.
4. Productos que contienen como únicos principios activos (i) S-adenosilmetionina y (ii) superóxido dismutasa, en forma de una preparación combinada para la administración simultánea, separada o secuencial en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
- 10 5. Productos según la reivindicación 4, en los que la SAM adopta la forma de tosilato, butanodisulfonato, disulfato tosilato, disulfato ditosilato o disulfato monotosilato, o está contenida en células de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecidas con SAM.

Fig. 1a

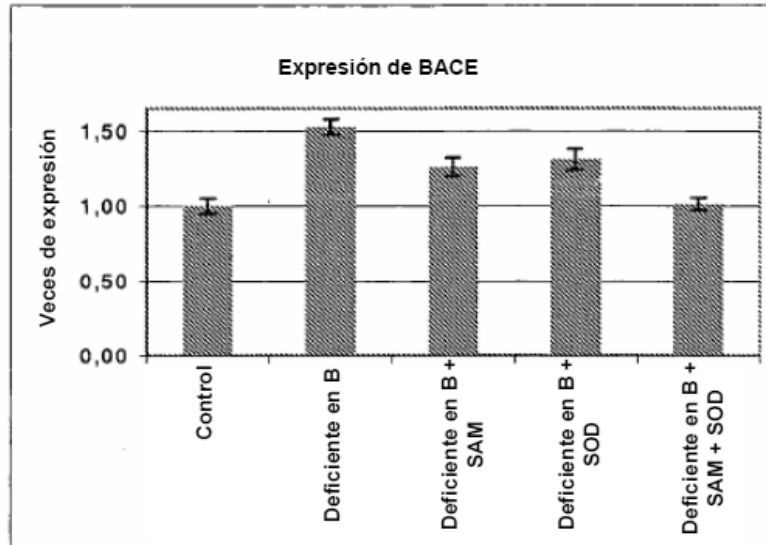
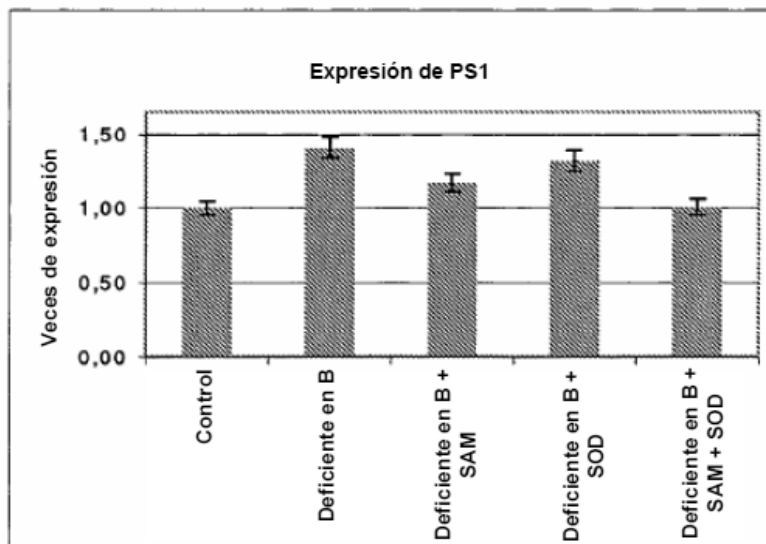


Fig. 1b



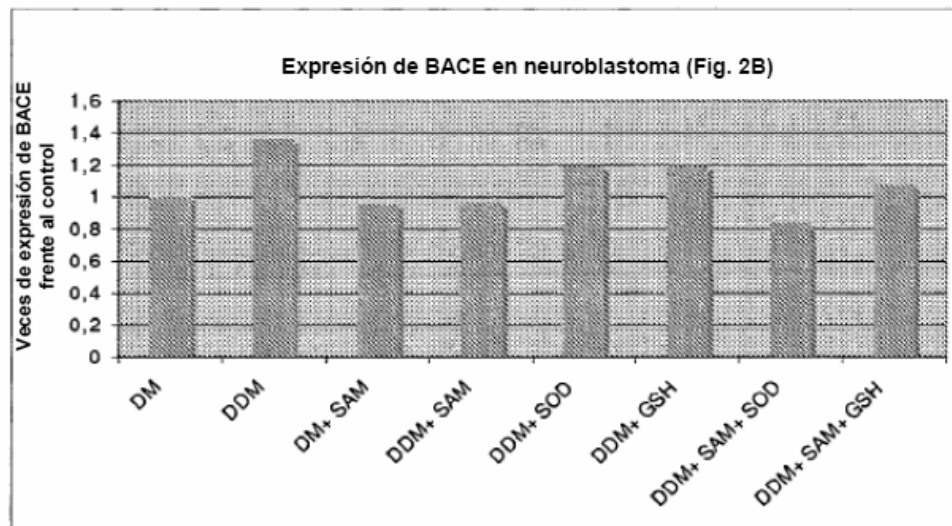
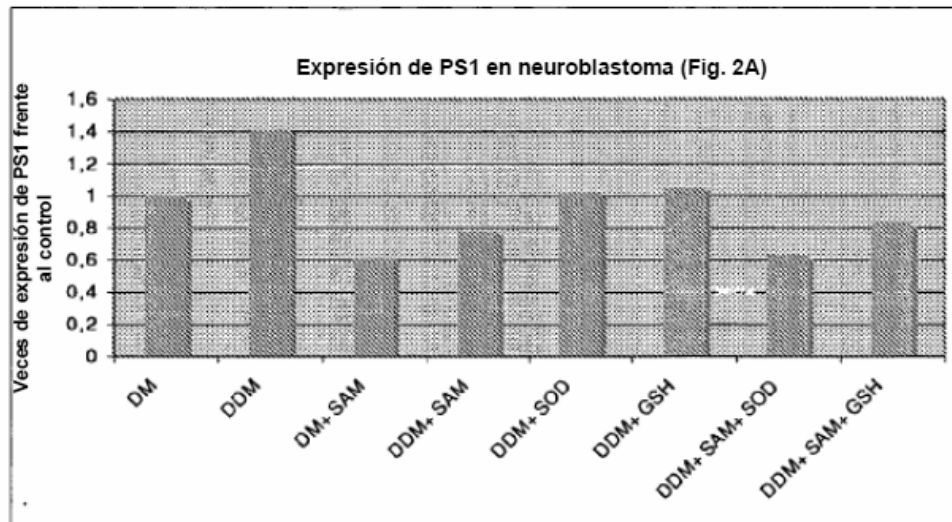


Fig. 3

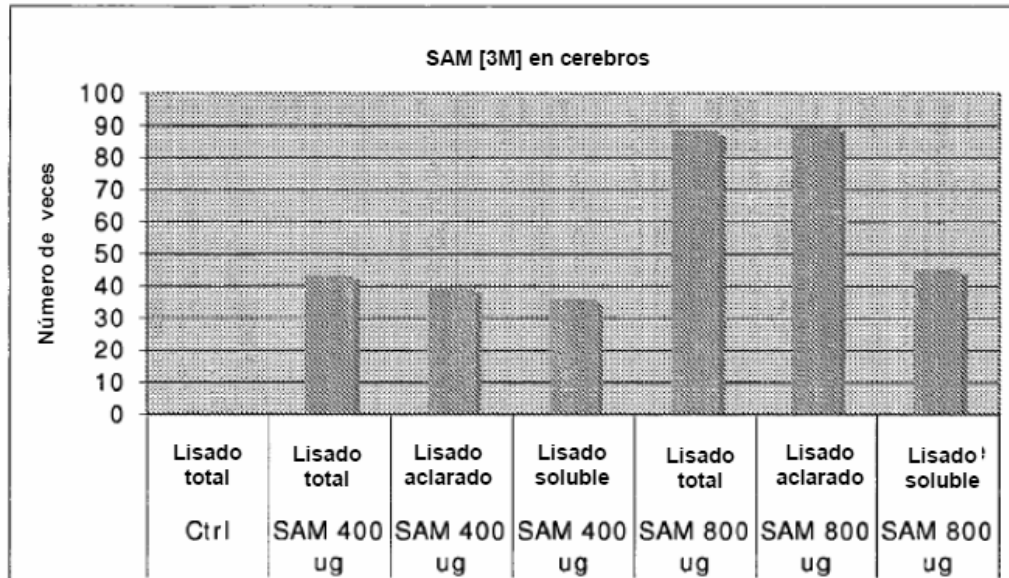


Fig. 4

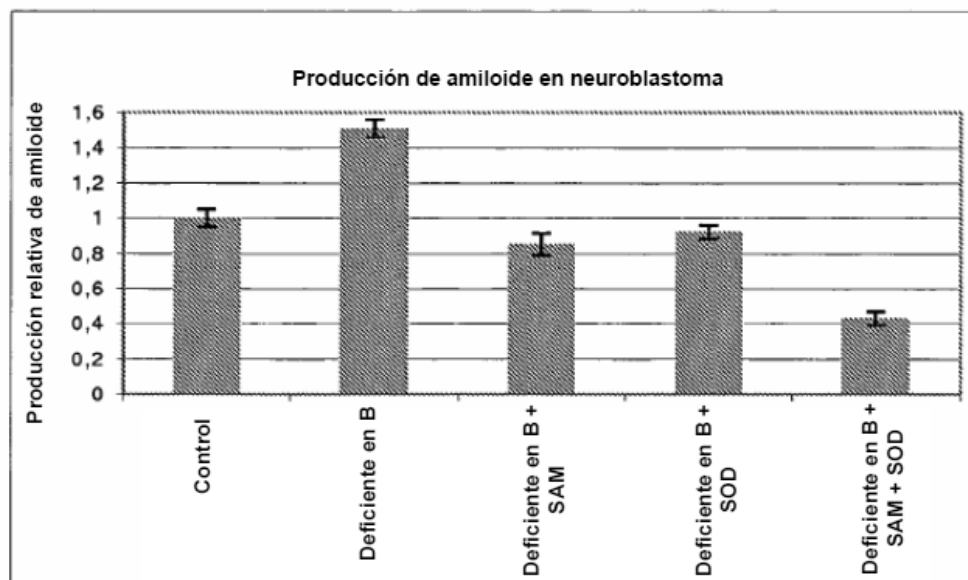


Fig. 5

