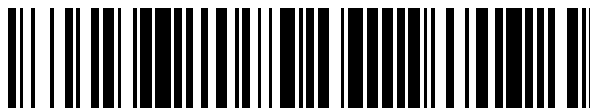


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 427**

21 Número de solicitud: 201500205

51 Int. Cl.:

**A61K 31/505** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**10.03.2015**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**12.09.2016**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (100.0%)  
Vicerrectorado de Transferencia Tecnológica.  
Paseo de las Delicias s/n. Pabellón de Brasil  
41013 Sevilla ES**

72 Inventor/es:

**SALVADOR DE LARA, Manuel;  
GARCÍA VALERO, Rosa;  
ARGANDOÑA BERTRAN , Montserrat;  
VIZUETE CHACÓN , María Luisa;  
VITORICA FERRÁNDEZ, Francisco Javier;  
NIETO GUTIÉRREZ , Joaquín y  
VARGAS MACÍAS, Carmen**

54 Título: **Uso de la ectoína o sus derivados como agentes antiinflamatorios y/o antioxidantes en enfermedades causadas por la formación de agregados proteicos**

57 Resumen:

Uso de la ectoína o sus derivados como agentes antiinflamatorios y/o antioxidantes en enfermedades causadas por la formación de agregados proteicos.

La invención propone el uso de la ectoína y sus derivados como agentes antiagregantes y/o antioxidantes en células, preferiblemente neuronales. La ectoína y sus derivados se proponen así como compuestos de utilidad en la elaboración de medicamentos para la prevención y/o tratamiento de la muerte celular causada por daño oxidativo y/o la formación de agregados proteicos, preferiblemente inflamación en respuesta a dichos agregados, más preferiblemente para la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, tales como Alzheimer. La invención también proporciona las concentraciones óptimas de tales compuestos, así como una posible vía de administración.

ES 2 582 427 A1

**USO DE LA ECTOÍNA O SUS DERIVADOS COMO AGENTES  
ANTIINFLAMATORIOS Y/O ANTIOXIDANTES EN ENFERMEDADES CAUSADAS  
POR LA FORMACIÓN DE AGREGADOS PROTEICOS**

5

**DESCRIPCIÓN**

La presente invención se refiere al uso de la ectoína y sus derivados como agentes antiagregantes y antioxidantes en células. Particularmente estos compuestos se proponen para el tratamiento y/o prevención de enfermedades causadas por la formación de agregados proteicos, preferiblemente enfermedades neurodegenerativas, las cuales cursan con daño oxidativo e inflamación debida a la formación de dichos agregados. Por tanto, la invención se encuadra en el campo de la biomedicina y la neurología.

15

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

Los solutos compatibles son pequeñas moléculas orgánicas que se acumulan en la mayoría de los organismos extremófilos en respuesta a diferentes estreses (estrés osmótico, térmico, etc.). Se postula que el efecto protector *in vivo* de estas moléculas es debido a su capacidad de estabilizar a las proteínas celulares. Entre estas moléculas se encuentra la ectoína y su derivado hidroxilado, la hidroxiectoína. Debido a su naturaleza bioestabilizadora ambas moléculas se comercializan como componentes de cosméticos, fundamentalmente en cremas anti-envejecimiento, cremas solares, champús, etc. Actualmente existen más de 200 productos de cosmética en el mercado que contienen ectoína y algunos de ellos solo se encuentran de venta en farmacias. Además, las ectoínas también se comercializan en soluciones bioestabilizadoras para la protección de enzimas en ensayos de laboratorio, por ejemplo, en kits para PCR, inmunoensayos, soluciones de anticuerpos, soluciones de enzimas como peroxidasa y fosfatasa alcalina, etc., además de presentar potenciales aplicaciones en el campo de la biomedicina (US8765691B2).

El número de enfermedades asociadas a una formación proteica incorrecta, donde el resultado del plegamiento anómalo es una estructura fibrilar diferente llamada "amiloides", es cada vez mayor. Dentro de estas enfermedades un subgrupo importante son las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la de

Huntington, la de Parkinson, las encefalopatías espongiiformes, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la polineuropatía amiloidótica familiar.

5 Durante muchos años se ha estudiado el papel de la inflamación en la enfermedad de Alzheimer (Morales I, Guzmán-Martínez L, Cerda-Troncoso C, Farías GA, Maccioni RB, 2014. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Front Cell Neurosci.*, 22;8:112). Esta inflamación aparece en respuesta a una serie de señales que incluyen lesiones, infección, agentes oxidativos y determinados grados de oligomerización de la proteína Tau y  $\beta$  amiloide. Parece ser que la respuesta neuroinflamatoria se activa en las áreas circundantes a la formación de la placa senil y libera señales proinflamatorias como las citoquinas. Concretamente, dentro del sistema inmune, las células de la microglía por un lado fagocitan y degradan el  $\beta$  amiloide (Lee CY., Landreth GE., 2010, The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J Neural Transm.*, 117: 949-960), actuando como un sistema de reparación, pero por otro lado, pueden ser responsables de la destrucción de tejidos y de la muerte neuronal. Así, en función del balance entre señales activadoras e inhibitorias, la microglía participará más en la inducción de la muerte neuronal (favoreciendo la enfermedad) o en la disminución de los agregados  $\beta$  amiloide (inhibiendo el desarrollo de la enfermedad). Es muy interesante resaltar que la fagocitosis del  $\beta$  amiloide *in vivo* se inhibe cuando están presentes citoquinas proinflamatorias (Koenigsnecht-Talboo J., Landreth GE., 2005, Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid and IgGs are differentially regulated by proinflammatory cytokines, *J, Neurosci.*, 25: 8240–8249). Es más, se ha observado una mejoría en la patología del Alzheimer en ratones cuando, al tratarlos con agentes antiinflamatorios, se observó una mejora de la respuesta fagocitaria al  $\beta$  amiloide (Heneka MT., *et al.*, 2005, Acute treatment with the PPARgamma agonist pioglitazone and ibuprofen reduces glial inflammation and Abeta1–42 levels in APPV717I transgenic mice, *Brain*, 128: 442–453).

10

15

20

25

30 Por otro lado existen numerosas evidencias que relacionan el estrés oxidativo y las enfermedades que cursan con neurodegeneración, como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson (Andersen JK., 2004, Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?, *Nat Med.*, 10 Suppl: S18-25). De hecho, se ha relacionado el estrés oxidativo con la alteración del procesamiento normal de la proteína precursora del  $\beta$ -amiloide (APP) (Multhaup G., *et al.*, 2002, Possible mechanisms of APP-mediated oxidative stress in Alzheimer's disease, *Free Radic.*

35

Biol. Med., 33: 45-51) o la fosforilación de Tau (Melov S., *et al.*, 2007, Mitochondrial oxidative stress causes hyperphosphorylation of tau, PLoS ONE 2: e536), proteínas íntimamente ligadas a la enfermedad de Alzheimer; o la oligomerización de la  $\alpha$ -sinucleína (Esteves AR., *et al.*, 2009, Oxidative Stress involvement in alpha-synuclein oligomerization in Parkinsons disease cybrids Antioxid Redox Signal, 11: 439-448), relacionada con la enfermedad de Parkinson. Otro hecho a tener en cuenta es que el tratamiento clínico del estrés oxidativo reduce la incidencia y la severidad de la enfermedad de Alzheimer (Esteves AR., *et al.*, 2009, Oxidative Stress involvement in alpha-synuclein oligomerization in Parkinsons disease cybrids, Antioxid Redox Signal, 11: 439-448). De hecho, hay trabajos que indican el uso de los antioxidantes como una de las mejores terapias preventivas para esta enfermedad (Zhao B., 2009, Natural antioxidants protect neurons in Alzheimer's disease and Parkinson's disease, Neurochem. Res., 34: 630-638).

15 Todo esto sugiere que una molécula con propiedades antiagregantes que, adicionalmente, disminuya el daño oxidativo, sería una buena candidata como fármaco frente a enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson, en las que tanto el estrés oxidativo como la inflamación derivada de la agregación proteica se han postulado como mecanismos asociados a su patología.

20 La principal manifestación de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas es la muerte neuronal, lo que provoca demencia y otras alteraciones. Se postula que esta neurodegeneración tiene un origen múltiple, en el que participan diferentes procesos como la agregación proteica, el estrés oxidativo, o la respuesta inflamatoria, entre otros, y que, a su vez, pueden estar interconectados. Debido a esta etiología múltiple y compleja, las alternativas farmacológicas de prevención y terapia de este tipo de enfermedades se podrían abordar con más éxito mediante la utilización de fármacos que actúen al nivel de varias de estas disfunciones de forma simultánea. Asimismo, es deseable encontrar la concentración óptima de tales fármacos, la cual permita una prevención y tratamiento efectivos de las enfermedades neurodegenerativas sin llegar a provocar toxicidad celular o tisular. Por último, preferiblemente tales fármacos han de ser capaces de atravesar la barrera hematoencefálica para que, tras su administración, puedan ejercer su efecto en el área afectada.

35

**DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

La presente invención propone el uso de la ectoína y sus derivados como agentes antiagregantes y antioxidantes en células, preferiblemente neuronales. La ectoína y sus derivados se proponen como compuestos de utilidad en la prevención y/o tratamiento de la muerte celular, preferiblemente muerte neuronal, más preferiblemente en enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer, las cuales cursan con procesos de daño oxidativo y de inflamación debida a la formación de agregados proteicos.

5  
10

En la presente invención se demuestra que la ectoína y sus derivados reducen la muerte neuronal causada por estrés oxidativo en un modelo neuronal humano, lo que prueba que poseen actividad antioxidante "in vitro" (ejemplo 1, Fig. 1). Por otro lado, se demuestra, en un modelo inflamatorio de células neuronales de microglía de ratón N13, que la ectoína tiene un efecto preventivo de la inflamación derivada de la agregación proteica. Esto es debido a que la ectoína impide que los monómeros de  $\beta$  amiloide se agreguen en las formas oligoméricas que causan la respuesta inflamatoria (ejemplo 2, Fig. 2 y 3).

15  
20

Además, en la presente invención se demuestra "in vivo", utilizando ratones a los que se les ha inoculado ectoína por vía parenteral en el peritoneo, que esta molécula atraviesa la barrera hematoencefálica (BH), ya que se han detectado mediante HPLC concentraciones de ectoína en diferentes tejidos del cerebro de los ratones inoculados, mientras que no se ha detectado en los ratones control (ejemplo 3, Fig. 4).

25

En resumen, la presente invención demuestra que la ectoína y sus derivados poseen un efecto protector frente al daño oxidativo en células neuronales, y además se ha comprobado que, evitando la formación de los oligómeros proteicos responsables de la inducción de inflamación, producen adicionalmente un efecto preventivo de la inflamación neuronal. Como se ha mencionado anteriormente, en algunas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, encefalopatías espongiiformes o Huntington, la neurodegeneración tiene un origen múltiple, en el que participan diferentes procesos tales como la agregación proteica, el estrés oxidativo o la respuesta inflamatoria, entre otros, y que, a su vez, pueden estar interconectados.

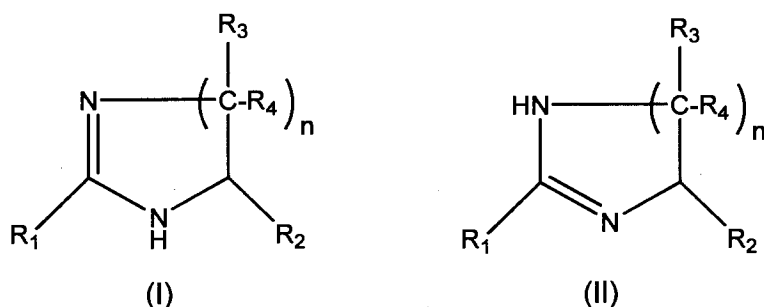
30  
35

El hecho de que la ectoína y sus derivados posean varias propiedades de forma simultánea tales como (i) antioxidante, (ii) antiagregante, llevando así a cabo la (iii)

prevención de la inflamación inducida en respuesta a agregados proteicos, y (iv) que sean capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, consiguiendo llegar así a las regiones cerebrales donde ejercerían su efecto terapéutico, les hacen buenos candidatos para ser utilizados tanto en la profilaxis como en el tratamiento de este tipo de enfermedades u otras también multifactoriales entre cuyas causas se encuentren las anteriormente mencionadas.

La ectoína y sus derivados se proponen, por tanto, en la presente invención como compuestos antiagregantes y antioxidantes útiles para el tratamiento y/o prevención de enfermedades causadas por la agregación proteica en las células o que cursan con la misma como son, por ejemplo aunque sin limitarnos, las enfermedades neurodegenerativas.

Por todo ello, en un primer aspecto la presente invención se refiere al uso de un compuesto seleccionado de entre ectoína o un derivado de ectoína de la fórmula general (I) ó (II):



Donde:  $R_1$  se selecciona de entre H o alquilo ( $C_1-C_4$ );  
 $R_2$  se selecciona de entre H,  $-COOH$ ,  $-COO$ -alquilo ( $C_1-C_4$ ) o  $-CONHR_5$ ; donde  $R_5$  se selecciona de entre H, alquilo ( $C_1-C_4$ ), un aminoácido, un dipéptido o un tripéptido; preferiblemente  $R_2$  es H o  $-COOH$ ;  
 $R_3$  y  $R_4$  son iguales o diferentes y se selecciona de entre H u OH, y  
 $n$  es un valor de 1, 2 ó 3,

o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención del daño oxidativo y la inflamación debida a la agregación proteica en células. O alternativamente, la presente invención se refiere a dicho compuesto para su uso como medicamento para el tratamiento y/o prevención del daño oxidativo y la inflamación debida a la agregación proteica en

células. De ahora en adelante se hará referencia a este medicamento como "medicamento de la invención".

5 Este compuesto seleccionado de entre ectoína o un derivado de ectoína de la fórmula general (I) ó (II) es por tanto el principio activo comprendido en el medicamento de la invención.

10 En una realización preferida, n es 2 y cada R<sub>3</sub> es de manera independiente H u OH. En una realización más preferida, R<sub>4</sub> es H. En una realización aún más preferida, R<sub>1</sub> es H o -CH<sub>3</sub>. En una realización aún más preferida, R<sub>1</sub> es -CH<sub>3</sub>.

En una realización más preferida el compuesto es la ectoína. En otra realización preferida el compuesto es la hidroxiectoína.

15 El término "ectoínas" engloba a dos compuestos tetrahidropirimidínicos cíclicos: la ectoína (ácido 1,4,5,6-tetrahidro-2-metil-4-pirimidinocarboxílico) y su derivado hidroxilado, la hidroxiectoína (ácido 1,4,5,6-tetrahidro-5-hidroxi-2-metil-4-pirimidinocarboxílico). Ambas, ectoína e hidroxiectoína, son junto con la betaína, los solutos compatibles mayoritariamente sintetizados por bacterias halófilas Gram  
20 negativas heterótrofas y también por un amplio número de bacterias Gram positivas halófilas moderadas y halotolerantes. La hidroxiectoína suele ser más común en bacterias halófilas Gram positivas como *Brevibacterium linens* o *Marinococcus halophilus*, aunque frecuentemente es sintetizado en cantidades menores junto a la ectoína en microorganismos productores de la misma.

25 El término "alquilo" se refiere, en la presente invención, a cadenas hidrocarbonadas saturadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 4 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, terc-butilo, sec-butilo, etc. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 2 átomos de carbono y más  
30 preferiblemente es metilo.

35 Por "aminoácido" se entienden las formas estereoisómera, por ejemplo formas D y L de los siguientes compuestos: asparagina, arginina, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, β-alanina, γ-aminobutirato, Nε-acetilisina, Nδ-acetilornitina, Nγ-acetildiaminobutirato, Nα-acetildiaminobutirato, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, serina, treonina y tirosina. Son preferentes L-aminoácidos. Los

restos aminoácido se derivan de los correspondientes aminoácidos. Son preferentes los siguientes restos aminoácido: Gly, Ala, Ser, Thr, Val,  $\beta$ -Ala,  $\gamma$ -aminobutirato, Asp, Glu, Asn, Gln, N $\epsilon$ -acetilisina, N $\delta$ -acetilornitina, N $\gamma$ -acetildiaminobutirato, N $\alpha$ -acetildiaminobutirato.

5

Los restos di- o tripéptido son amidas de ácido, según su naturaleza química, y se descomponen en la hidrólisis en dos o tres aminoácidos. Los aminoácidos en el resto di- o tripéptido están enlazados entre sí mediante enlaces de amida.

10

Las sales, compatibles desde el punto de vista fisiológico, del compuesto de la fórmula (I) o (II), son, a modo de ejemplo, sales alcalinas, alcalinotérreas o amónicas, como sales de Na, K, Mg, Ca, trietilamina o tris-(2-hidroxi-etil)-amina. Otras sales, compatibles desde el punto de vista fisiológico, del compuesto de la fórmula (I) o (II) se producen mediante reacción con ácidos inorgánicos, como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, o con ácidos orgánicos carboxílicos o sulfónicos, como ácido acético, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico y ácido p-toluenosulfónico. Los compuestos de la fórmula (I) o (II), en los que se presentan grupos básicos y ácidos, como grupos carboxilo o amino en el mismo número, forman sales internas.

20

Se entiende como "célula" a la unidad morfológica y funcional de todo ser vivo. Dentro del alcance de la presente invención se incluyen las células procedentes de cualquier tejido del organismo, preferiblemente células del sistema nervioso incluyendo células gliales y neuronas, más preferiblemente las células a las que se refiere la presente invención son células neuronales. Las "células neuronales" son aquellas células nerviosas cuya principal función es la excitabilidad eléctrica de su membrana plasmática. Están especializadas en la recepción de estímulos y la conducción del impulso nervioso en forma de potencial de acción, entre ellas o con otros tipos celulares. Estas células conducen señales a través del axón, prolongación que se extiende desde el cuerpo de la neurona hacia fuera, y reciben información a través de las dendritas, ramas de la célula que se dirigen hacia el soma o cuerpo neuronal.

35

Como se puede apreciar en los ejemplos descritos más adelante, la ectoína ejerce un efecto antiagregante, impidiendo progresivamente la oligomerización peptídica responsable de desencadenar una respuesta inflamatoria en las células, preferiblemente neuronas, en patologías asociadas a la formación de agregados



proteicos, como por ejemplo en enfermedades neurodegenerativas. Es decir, la ectoína ejerce como un agente preventivo de la inflamación al evitar la agregación peptídica. Por ello, en una realización preferida, el medicamento al que se refiere la presente invención es para el tratamiento y/o prevención, más preferiblemente prevención, de la inflamación que se produce en las células, preferiblemente neuronales, como consecuencia de la formación de agregados proteicos en dichas células.

Se entiende por “agregados proteicos” o “agregados peptídicos” los depósitos o agrupaciones proteicas que se forman por oligomerización de proteínas o péptidos resultantes de un incorrecto plegamiento o procesamiento proteico, por ejemplo de la proteína precursora del  $\beta$ -amiloide (APP) o de la  $\alpha$ -sinucleína. Tales depósitos o agregados son, por ejemplo aunque sin limitarnos, fibras o placas de amiloide, ovillos neurofibrilares, cuerpos de inclusión, etc. Estos agregados proteicos son tóxicos y están implicados en numerosas enfermedades tales como las enfermedades neurodegenerativas incluyendo Alzheimer, Parkinson, Huntington, encefalopatías espongiiformes, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), polineuropatía amiloidótica familiar y otras no neurodegenerativas tales como las amiloidosis sistémicas y las amiloidosis localizadas como la diabetes tipo II. Métodos para detectar la presencia de dichos agregados proteicos celulares son comúnmente conocidos en el estado de la técnica, tales como técnicas de fluorescencia o láser de multifotones.

Se entiende por “neuroinflamación” o “inflamación en células neuronales” la respuesta inflamatoria originada en el sistema nervioso central tras sufrir una lesión llevando a una acumulación y activación de células gliales, particularmente astrocitos y microglía en la zona afectada.

Asimismo, en los ejemplos descritos más adelante se demuestra que tanto la ectoína como sus derivados, particularmente la hidroxiectoína, protegen de la muerte neuronal provocada por daño oxidativo. Se entiende por “estrés oxidativo” o “daño oxidativo” la condición de citotoxicidad que es consecuencia de un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad de la célula de defenderse contra ellos, por lo que está causada por un incremento en la formación de dichos radicales libres o por una disminución de los agentes que actúan como antioxidantes, o por ambos motivos conjuntamente. Como se ha mencionado anteriormente, se ha relacionado el estrés oxidativo con la alteración del procesamiento normal de la proteína precursora

del  $\beta$ -amiloide (APP) o la fosforilación de Tau, proteínas íntimamente ligadas a la enfermedad de Alzheimer; o la oligomerización de la  $\alpha$ -sinucleína, relacionada con la enfermedad de Parkinson.

5 Por ello, en una realización más preferida el medicamento de la invención es para el tratamiento y/o prevención de la muerte celular, más preferiblemente neuronal, aún más preferiblemente de la muerte celular provocada por daño oxidativo y/o la formación de agregados proteicos, aún más preferiblemente daño oxidativo y/o inflamación neuronal debida a la formación de agregados proteicos.

10

En una realización aún más preferida, el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de enfermedades producidas por la formación de agregados proteicos celulares o que cursan con la presencia de dichos agregados. Este tipo de enfermedades engloban todas aquellas condiciones patológicas en las que se detecta la presencia de dichos agregados en las células, tales como por ejemplo, aunque sin limitarnos, las enfermedades neurodegenerativas, incluyendo Alzheimer, Parkinson, Huntington, encefalopatías espongiformes, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), polineuropatía amiloidótica familiar; y otras no neurodegenerativas tales como las amiloidosis neuropáticas, sistémicas y/o localizadas como la diabetes tipo II.

20

En una realización aún más preferida, el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas. En una realización aún más preferida, la enfermedad se selecciona de la lista que consiste en Alzheimer, Parkinson, Huntington (y desórdenes relacionados, como algunas formas de ataxia espino cerebelar), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), encefalopatías espongiformes transmisibles y polineuropatía amiloidótica familiar. En una realización aún más preferida, la enfermedad es Alzheimer. En otra realización preferida el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de amiloidosis neuropática sistémica y/o localizada como la diabetes tipo II.

30

Las "enfermedades neurodegenerativas" son aquellas enfermedades que se caracterizan por la muerte de neuronas en diferentes regiones del sistema nervioso y el consiguiente deterioro funcional de las zonas afectadas. En general provocan alteraciones en muchas actividades y funciones corporales como es el equilibrio, la movilidad, el habla, la respiración y la función cardíaca entre otras. Como ya se ha mencionado, estas enfermedades van acompañadas de daño oxidativo e inflamación

35

neuronal, así como de la formación de agregados proteicos. Ejemplos de estas enfermedades son, aunque sin limitarnos, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), ataxia de Friedreich, Huntington, demencia de cuerpos de Lewy, Parkinson, atrofia muscular espinal, encefalopatías espongiiformes, etc.

5

La "enfermedad de Alzheimer" o "EA" se refiere a una enfermedad neurodegenerativa que se manifiesta con deterioro cognitivo y trastornos conductuales. Se caracteriza en su forma típica por una pérdida progresiva de la memoria y de otras capacidades mentales, a medida que las células nerviosas degeneran y/o mueren y diferentes zonas del cerebro se atrofian. En esta patología se encuentran implicados procesos tales como un incorrecto procesamiento de la proteína precursora de amiloide o APP, la fosforilación de Tau y la formación de placas amiloideas y ovillos neurofibrilares.

10

El medicamento de la invención comprende ectoína o un derivado de la misma de la fórmula general (I) o (II) en una cantidad terapéuticamente efectiva, que es capaz de tratar y/o prevenir el daño oxidativo y la inflamación derivada de la agregación proteica en células, preferiblemente neuronales, en el organismo al que le es administrado. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de ectoína o derivados de la fórmula general (I) o (II) que produzca el efecto deseado.

15

20

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo, tolerancia o patología del individuo al que le va a ser administrado el medicamento de la invención.

25

Como muestran los ejemplos descritos a continuación, las máximas concentraciones de ectoína y derivados con acción protectora ante daño oxidativo, es decir, que inhiben la muerte celular generada por las especies reactivas de oxígeno, se encuentran por debajo de 10 mM, preferiblemente por debajo de 3 mM. Por ello, en otra realización preferida la concentración de compuesto seleccionado de entre ectoína o un derivado de ectoína de fórmula general (I) ó (II) en el medicamento de la invención es inferior a 10 mM, más preferiblemente inferior a 3 mM. En una realización más preferida, dicha concentración se encuentra en un rango de entre 0,0001 y 1 mM. En una realización aún más preferida, dicha concentración se encuentra en un rango de entre 0,001 y 1 mM. En una realización aún más preferida, dicha concentración se encuentra en un rango de entre 0,001 y 0,1 mM. Estos rangos de concentraciones

30

35

también son los preferidos para el tratamiento y/o prevención de la inflamación derivada de la formación de agregados proteicos, como también muestran los ejemplos descritos más adelante.

5 El medicamento de la invención puede formularse para su administración en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Como ejemplos de preparaciones se incluye cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.), semisólida o líquida (soluciones, suspensiones o emulsiones) para administración oral, tópica o parenteral. El medicamento de la  
10 presente invención también puede estar en forma de formulaciones de liberación sostenida de drogas o de cualquier otro sistema convencional de liberación, así puede estar contenido, aunque sin limitarnos, en nanopartículas, liposomas o nanosferas, en un material polimérico, en un implante biodegradable o no biodegradable o en micropartículas biodegradables, como por ejemplo, microesferas biodegradables.

15

Tal medicamento puede administrarse a un animal, preferiblemente humano, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse, oral, sublingual, peritoneal, intravenosa, intradérmica, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intramuscular, intranasal, intracraneal,  
20 subcutánea, intraorbital, intracapsular, tópica, mediante parches transdérmicos o vía rectal, percutánea, espray nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna, bomba de infusión o vía catéter.

25

Como demuestran los ejemplos descritos a continuación, la ectoína y sus derivados son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica una vez se administran al individuo, lo cual permite que estos compuestos puedan ejercer su acción directamente en el área afectada.

30

En otra realización preferida de la invención, el medicamento está formulado para su administración vía parenteral en la cavidad peritoneal. La vía parenteral implica la ruptura de las barreras del organismo, la piel y las mucosas para depositar las sustancias en tejidos o cavidades internas del organismo, como la abdominal. El método más común es la inyección con depósitos de sustancias dentro de la piel (vía intradérmica), o debajo de ella en el tejido subcutáneo (vía subcutánea) en los  
35 músculos (vía intramuscular), en venas (vía intravenosa), o en cavidades como la

pleura (vía intrapleural) o peritoneal (vía intraperitoneal). La inyección intraperitoneal se utiliza para administrar volúmenes relativamente grandes de sustancias solubles.

5 El "medicamento" al que se refiere la presente invención puede ser de uso humano o veterinario, aunque preferiblemente es de uso humano. El "medicamento de uso humano" es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica. El "medicamento de uso veterinario" es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica.

10

15

El término "tratamiento", tal como se entiende en la presente invención, se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de la enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

20

- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- (ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;
- (iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

25 El término "prevención", tal como se entiende en la presente invención, consiste en evitar la aparición de la enfermedad o condición patológica, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica, pero aún no se ha diagnosticado que la tenga.

30

El medicamento de la invención puede utilizarse tanto solo como en combinación con otros medicamentos o composiciones para el tratamiento y/o prevención de enfermedades derivadas del daño oxidativo y de la agregación proteica, preferiblemente de enfermedades neurodegenerativas, aún más preferiblemente,

35

Alzheimer. Así, el medicamento de la invención puede ser empleado junto a otros principios activos o terapias a modo de terapia combinada. Los otros principios activos pueden formar parte de la misma composición o bien pueden ser proporcionados mediante una composición distinta, siendo administrados al mismo tiempo (simultáneamente) o en tiempos diferentes (secuencialmente).

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

15

**FIG. 1. Efecto antioxidante de los compuestos ectoína e hidroxiectoína en células neuronales.** Se realizó un ensayo para comprobar si se producía una reducción de la muerte neuronal causada por daño oxidativo provocado por XXO. Los resultados corresponden al porcentaje de la muerte neuronal (tomando como 100% la muerte celular producida por XXO a concentración igual a su LC50) de los cultivos neuronales tratados con XXO y ectoína (Ect) o hidroxiectoína (EctOH) a diferentes concentraciones. \* Diferencia significativa respecto a los tratamientos con XXO sola, de acuerdo al test de Student ( $p < 0,05$ ). La comparativa de los resultados de los dos compuestos no produce diferencias significativas de acuerdo al test de Student ( $p = 0,92$ ).

25

**FIG. 2. Efecto de la ectoína en la inducción de la respuesta inflamatoria mediada por ADDL en la línea celular N13 de microglía de ratón.** Niveles de expresión de TNF $\alpha$  en cultivos de la línea celular N13 de microglía de ratón sometidas a distintos tratamientos: LPS 0,01 $\mu$ g/ml (1) u oligómeros de ADDL 5  $\mu$ M (2) como agentes inductores de la inflamación; pre-incubación de 90 minutos con cúrcuma 20  $\mu$ M y posterior tratamiento de 3 horas con LPS 0,01 $\mu$ g/ml (3) u oligómeros de ADDL 5  $\mu$ M (4); incubación de 3 horas con monómeros de  $\beta$  amiloide oligomerizados en presencia de diferentes concentraciones de ectoína 0,01 (5), 0,1 (6), 1 (7), 10 (8) y 100 mM (9). Los niveles de expresión están referidos a los obtenidos en células sin tratar (Control).

35

**FIG. 3. Confirmación del mecanismo de acción de la ectoína en la prevención de la inflamación por qPCR y *Western blot*.** **A)** Niveles de expresión de TNF $\alpha$  en cultivos de la línea celular N13 de microglía de ratón incubadas con oligómeros de ADDL 5  $\mu$ M (como agente inductor de la inflamación) (1), pre-incubación de 90 minutos con cúrcuma 20  $\mu$ M y posterior incubación de 3 horas con oligómeros de ADDL 5  $\mu$ M (2); incubación de 3 horas con monómeros de  $\beta$  amiloide 0,5  $\mu$ M oligomerizados en presencia de diferentes concentraciones de ectoína 0 (3), 0,01 (4), 0,1 (5) mM. Los niveles de expresión están referidos a los obtenidos en células sin tratar (Control). **B)** SDS PAGE-Western-Blot en gel de poliacrilamida en gradiente 10-20% (p/v) transferido a membrana de Polifluoruro de vinilideno (PVDF) e incubado con el anticuerpo primario 6e10. M: Marcador de peso molecular; alícuotas de las soluciones de monómeros de  $\beta$  amiloide 0,5  $\mu$ M oligomerizados en presencia de diferentes concentraciones de ectoína 0 (3), 0,01 (4), 0,1 (5) mM empleadas para el tratamiento de células N13 en el experimento anterior.

15

**FIG. 4. Comprobación del paso de la barrera hematoencefálica de la ectoína por LC-MS.** Mediante LC-MS se detectó la presencia de ectoína en los diferentes extractos de corteza procedentes del cerebro de ratones sin tratar (A) y tratados con ectoína (200 mg/kg) durante 30 minutos (B), 3 horas (C) y 24 horas (D). Como control se utilizó una solución pura de ectoína comercial (BITOP) (E).

20

## EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad de la ectoína y sus derivados como agentes antiagregantes, antioxidantes y antiinflamatorios debido a la inhibición de la agregación proteica en células neuronales humanas, así como su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica en ensayos *in vivo* con ratones.

25

### 30 EJEMPLO 1. EVALUACIÓN EN LÍNEAS NEURONALES HUMANAS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y NEUROPROTECTORA DE LOS COMPUESTOS ECTOINA E HIDROXIECTOINA.

En primer lugar se realizó un estudio de la capacidad neuroprotectora frente a la muerte neuronal causada por daño oxidativo inducido por el sistema xantina/xantina oxidasa (XXO) en presencia de ectoína o hidroxiectoína, y posterior determinación de

35

la viabilidad celular mediante el test WST-1 (Roche). Para ello se realizó una curva de concentraciones crecientes de cada uno de los compuestos y un blanco por triplicado en tres experimentos independientes. Además se determinó la toxicidad intrínseca de la máxima concentración de los compuestos a evaluar.

5

La medida de la actividad neuroprotectora se realizó sobre células neuronales humanas sometidas a estrés oxidativo con el sistema xantina/xantina oxidasa (XXO), ya que la XXO produce aniones superóxido que reaccionan con lípidos, proteínas, carbohidratos y DNA en el interior de las células y con componentes de la matriz extracelular, resultando tóxico para éstas. También produce peróxido de hidrógeno que, en presencia de hierro, forma radicales hidroxilo altamente tóxicos para las células, provocando peroxidación lipídica y mutaciones en el DNA. Todo esto produce daño celular y, en último término, la muerte de las células. De esta forma un compuesto neuroprotector impedirá o reducirá el porcentaje de la muerte celular producida por este agresor.

15

Una vez sometidas las células a estrés oxidativo mediante XXO y cada uno de los compuestos a evaluar, para poder determinar el efecto neuroprotector de cada uno se determinó la viabilidad celular cuantificando la actividad metabólica mediante el test WST-1 (Roche). Este método está basado en la capacidad de las células de obtener la energía necesaria para mantener sus funciones metabólicas y el crecimiento celular. Por este motivo, las células que estén metabólicamente activas (vivas) reducirán las sales de tetrazolium a formazán mediante el sistema succinato-tetrazolium reductasa (de la cadena respiratoria mitocondrial) y el formazán formado puede ser detectado colorimétricamente, mientras que en las células muy dañadas o muertas no se producirá esta reacción.

20

25

Previamente se determinó la concentración de XXO que produce la muerte del 50 % de las células, que corresponde con la concentración letal 50 (LC50), siendo éste el parámetro usado para inducir la muerte celular.

30

Se ensayaron los compuestos Ectoína e Hidroxiectoína a concentraciones de 3, 1, 0,2; 0,1; 0,02; 0,01; 0,002; 0,001 y 0,0001 mM junto con XXO a concentración igual a su LC50 en tres ensayos por triplicado. Además se incluyó un control positivo de neuroprotección validado en este sistema, como control del ensayo.

35



Los resultados de neuroprotección de los compuestos se muestran en la Figura 1, en la que se representa el porcentaje de muerte celular obtenida para cada concentración de los compuestos ectoína e hidroxiectoína referida a la muerte producida por la XXO.

5 Los resultados muestran un comportamiento de protección similar para ambos compuestos, consiguiendo la mayor protección entre 0,001 y 0,01 mM y siendo ésta de 39%+15% (medias+SD), aunque el rango en el que se observó protección era bastante extenso, (0,001 a 1 mM). Para el control positivo de protección se obtuvo una protección del 60%+20% (dato no mostrado).

10

Los compuestos se ensayaron hasta una concentración máxima de 3 mM, concentración a la que se empezó a detectar hasta un 10% más de toxicidad que con XXO, por lo que la máxima dosis tolerada (MTD, concentración a la que no se produce muerte celular) estaba por debajo de 3 mM.

15

Estos resultados indican que tanto la ectoína como la hidroxiectoína protegen de la muerte neuronal causada por daño oxidativo, por lo que se conforman como buenos candidatos como agentes antioxidantes y neuroprotectores.

20

## **EJEMPLO 2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y NEUROPROTECTORA DE LA ECTOÍNA EN LÍNEAS NEURONALES DE RATÓN.**

### **A) Actividad preventiva de la inflamación producida por la agregación proteica.**

25

Los cultivos de células neuronales N13 de microglía de ratón se utilizaron como modelo celular para estudiar la inflamación. En estas células se puede inducir un proceso inflamatorio incubándolas con diferentes agentes inflamatorios y posteriormente cuantificar la expresión del gen que codifica el factor de necrosis tumoral ("tumor necrosis factor", TNF $\alpha$ ), una citoquina multifuncional, cuya expresión suele inducirse en procesos inflamatorios. Dicha citoquina está encargada del control de la proliferación celular (mediante la degeneración celular), jugando un papel crítico en las patogénesis de enfermedades relacionadas con las inflamaciones crónicas. Si estas células inflamadas se incuban en presencia de agentes antiinflamatorios efectivos, se observaría una disminución de la expresión de TNF $\alpha$ , por lo que sirve como indicador de la reducción de la inflamación.

35

En este caso, para analizar el efecto de la ectoína en dicho modelo de inflamación neuronal, se utilizaron dos agentes inductores de la inflamación, LPS o ADDL, con mecanismos de acción diferentes. El LPS es un lipopolisacárido bacteriano y el ADDL ("Amyloid-beta Derived Diffusible Ligands") es un oligómero soluble que se forma a partir de la agregación de monómeros de beta-amiloide. En este caso, el ADDL se sintetizó a partir de la agregación de beta-amiloide artificial, obteniéndose un producto que produce un efecto inflamatorio muy similar al que se produce durante la enfermedad de Alzheimer.

Las células de la línea neuronal N13 de microglía de ratón se incubaron durante 3 horas con LPS (0,01µg/ml) o con oligómeros de β amiloide (ADDL) 5 µM para inducir la inflamación en las mismas. Como control de tratamiento antiinflamatorio se pre-incubaron células en presencia de cúrcuma 20 µM durante 90 minutos y se incubaron posteriormente en presencia de cada uno de los agentes inflamatorios LPS o ADDL durante 3 horas. Por otro lado, también se incubaron células con monómeros de β amiloide artificial 5 µM oligomerizados en presencia de ectoína. En este caso se ensayaron varias concentraciones de ectoína (0,01; 0,1; 1; 10 y 100 mM). Una vez finalizados los diferentes tratamientos, se recogieron las células, se aisló el ARN total y se obtuvo el ADNc mediante retrotranscripción. Posteriormente se midieron los niveles de expresión de TNFα por qPCR para observar el efecto en la inflamación celular de los diferentes tratamientos.

Los resultados obtenidos muestran que a concentraciones bajas de ectoína (entre 0,01-1 mM) comienza a observarse una menor inflamación celular que es prácticamente nula a concentraciones más elevadas (10 y 100 mM) (Figura 2). Es decir, que el proceso de oligomerización de beta-amiloide en presencia de ectoína no se produce o se produce parcialmente, ya que va disminuyendo su capacidad de inducir inflamación cuando la concentración de ectoína va aumentando. Estos resultados sugieren que la ectoína, debido a su efecto antiagregante, impide progresivamente la oligomerización de los monómeros de beta-amiloide. Es decir, la ectoína puede ejercer como agente preventivo de la inflamación al evitar la agregación de los monómeros del beta-amiloide para formar ADDL.

B) Confirmación del mecanismo de acción de la ectoína en la prevención de la inflamación por Western-Blot.

El ensayo anterior se repitió pero utilizando una solución de monómeros de  $\beta$  amiloide artificial de una concentración diez veces menor (0,5  $\mu$ M), ya que la concentración resultante está más próxima a la fisiológica. Esta solución se oligomerizó en presencia o no de ectoína a distintas concentraciones (0,01 y 0,1 mM) y, posteriormente, se  
5 utilizaron alícuotas para incubar las células y (i) medir la expresión de TNF $\alpha$  mediante qPCR (Figura 3A) y también para realizar (ii) un análisis de la formación de oligómeros ADDL mediante Western-Blot. Para ello, alícuotas de 3  $\mu$ l de las soluciones de monómeros de  $\beta$  amiloide oligomerizado o no en presencia de ectoína se corrieron en un gel de poliacrilamida en gradiente 10-20 % (p/v) y posteriormente se transfirieron a  
10 una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF). Posteriormente la membrana fue incubada con el anticuerpo primario 6e10 y el revelado posterior se realizó mediante quimioluminiscencia (Figura 3B). El objetivo del ensayo fue observar si, efectivamente, la menor inflamación observada era debida al efecto antiagregante de la ectoína.

15 Los resultados muestran de nuevo que conforme va aumentando la concentración de ectoína se produce menor inflamación (Figura 3A). Este hecho se correlaciona con una mayor acumulación de oligómeros de bajo peso molecular (monómeros, dímeros, trímeros, etc), y por lo tanto, una menor proporción de oligómeros de elevado peso molecular, que son los causantes de la inflamación (Figura 3B). Esto indica que las  
20 muestras incubadas con mayor concentración de ectoína poseen menor proporción de oligómeros de elevado peso molecular, lo que evita que éstos induzcan inflamación en las células N13 tratadas.

### 25 **EJEMPLO 3. ENSAYOS *IN VIVO*. PASO A TRAVÉS DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA**

Para comprobar si la ectoína era una molécula capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, se realizó un ensayo *in vivo* utilizando ratones C57 wt inoculados con ectoína y diferentes tiempos de exposición para, posteriormente, detectar por  
30 HPLC la presencia o ausencia de ectoína.

Para el ensayo se utilizaron 8 ratones C57 wt (edad: 3 meses) que fueron inyectados en la zona peritoneal con 6 mg ectoína en PBS/ratón (200-250 mg/Kg). Los tiempos ensayados fueron 30 min, 3 horas y 24 horas. Se utilizaron 2 ratones por cada tiempo  
35 ensayado y 2 ratones a los que se les inculó únicamente con PBS, considerados como muestras control. Previamente a la extracción del cerebro, cada ratón se

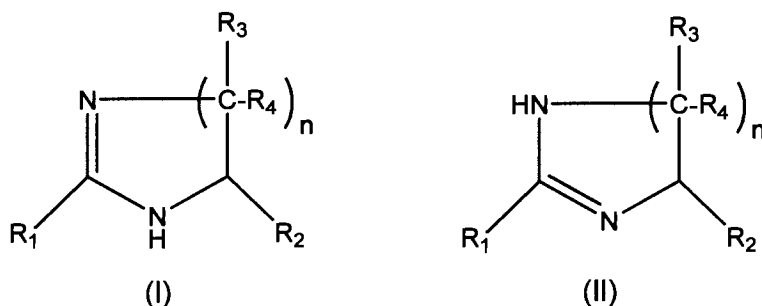
perfundió con PBS para evitar la contaminación del mismo con sangre circulante que contiene ectoína. Posteriormente, se procedió a la extracción del cerebro de cada ratón y a la separación de las diferentes fracciones: corteza, hipocampo y resto. La corteza y el hipocampo son las zonas en las que se localiza la patología producida por el Alzheimer. Cada fracción de cerebro se homogeneizó en un Douce's utilizando una solución de PBS que contenía inhibidores de proteasas y fosfatasas. Posteriormente, la muestra se ultracentrifugó para obtener la fracción de proteínas solubles (S1) y el sobrenadante se extrajo con una solución de metanol:cloroformo:agua (10:5:4) mediante el protocolo modificado de Bligh y Dyer (1959) para la obtención de la fracción que contenía ectoína. Las muestras obtenidas se analizaron mediante HPLC utilizando una solución de ectoína comercial como control.

Los resultados muestran la presencia de ectoína, tanto en corteza e hipocampo como en el resto de cerebro, en aquellos ratones que fueron inoculados tanto a 30 minutos, como a las 3 h y a las 24 h de exposición. Sin embargo, no se detectó ectoína en aquellos ratones que no fueron inoculados con la misma (ratones control). En la figura 4 sólo se muestran los resultados obtenidos en tejido de corteza.

## REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto seleccionado de entre ectoína o un derivado de ectoína de la fórmula general (I) ó (II):

5



donde:  $R_1$  se selecciona de entre H o alquilo ( $C_1-C_4$ );

10

$R_2$  se selecciona de entre H,  $-COOH$ ,  $-COO$ -alquilo ( $C_1-C_4$ ) o  $-CONHR_5$ ; donde  $R_5$  se selecciona de entre H, alquilo ( $C_1-C_4$ ), un aminoácido, un dipéptido o un tripéptido;

$R_3$  y  $R_4$  son iguales o diferentes y se selecciona de entre H u OH, y

$n$  es un valor de 1, 2 ó 3,

15

o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención del daño oxidativo y la inflamación debida a la agregación proteica en células.

20

2. Uso según la reivindicación 1, donde  $n$  es 2 y cada  $R_3$  es de manera independiente H u OH.

3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde  $R_4$  es H.

25

4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde  $R_1$  es H o  $-CH_3$ .

5. Uso según la reivindicación 4, donde  $R_1$  es  $-CH_3$ .

6. Uso según la reivindicación 1, donde el compuesto es la ectoína.

30

7. Uso según la reivindicación 1, donde el compuesto es la hidroxiectoína.

8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para el tratamiento y/o prevención de enfermedades producidas por la formación de agregados proteicos.
- 5 9. Uso según la reivindicación 8 donde la enfermedad es amiloidosis neuropática, sistémica y/o localizada.
10. Uso según la reivindicación 8 donde la enfermedad es una enfermedad neurodegenerativa.
- 10 11. Uso según la reivindicación 10 donde la enfermedad se selecciona de la lista que consiste en Alzheimer, Parkinson, Huntington, encefalopatías espongiiformes, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y polineuropatía amiloidótica familiar.
12. Uso según la reivindicación 11 donde la enfermedad es Alzheimer.
- 15 13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 donde la concentración de compuesto es inferior a 10 mM.
14. Uso según la reivindicación 13, donde la concentración de compuesto es inferior a 3 mM.
- 20 15. Uso según la reivindicación 14 donde la concentración de compuesto se encuentra en un rango de entre 0,0001 y 1 mM.
- 25 16. Uso según la reivindicación 15 donde la concentración de compuesto se encuentra en un rango de entre 0,001 y 1 mM.
17. Uso según la reivindicación 16 donde la concentración de compuesto se encuentra en un rango de entre 0,001 y 0,1 mM.
- 30 18. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 donde el medicamento está formulado para su administración peritoneal.

Fig. 1

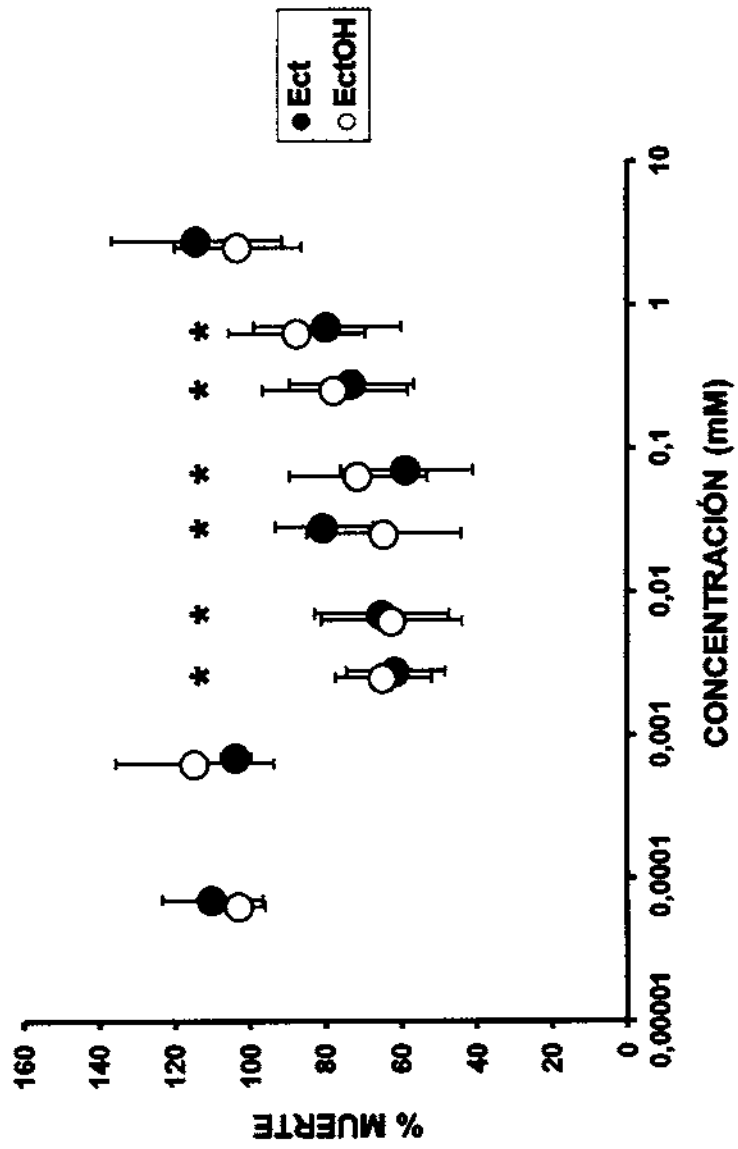


Fig. 2





Fig. 3

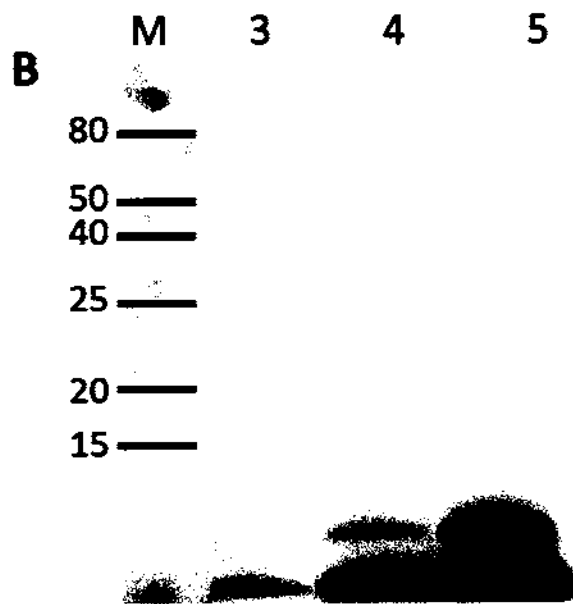
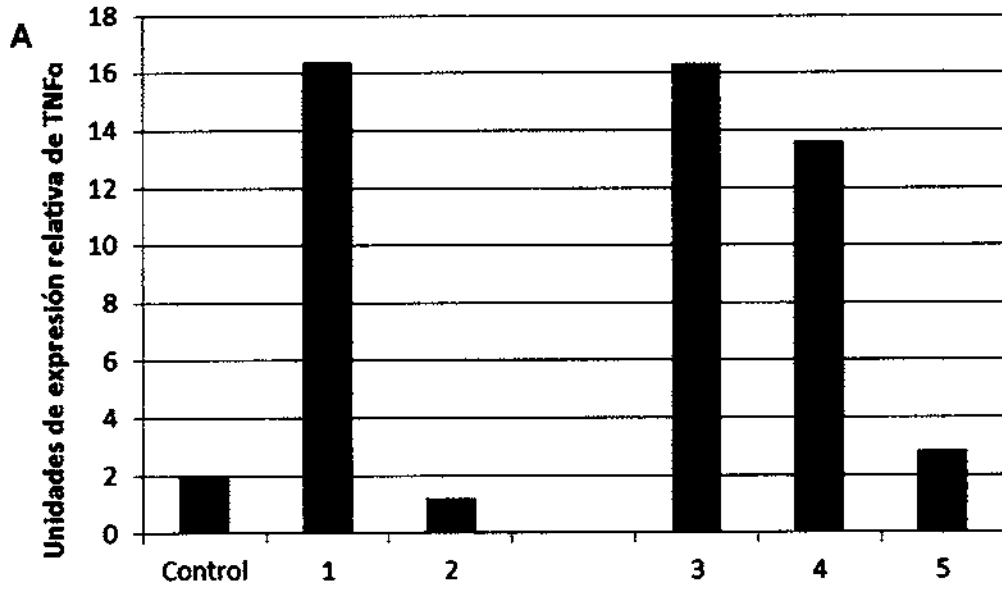
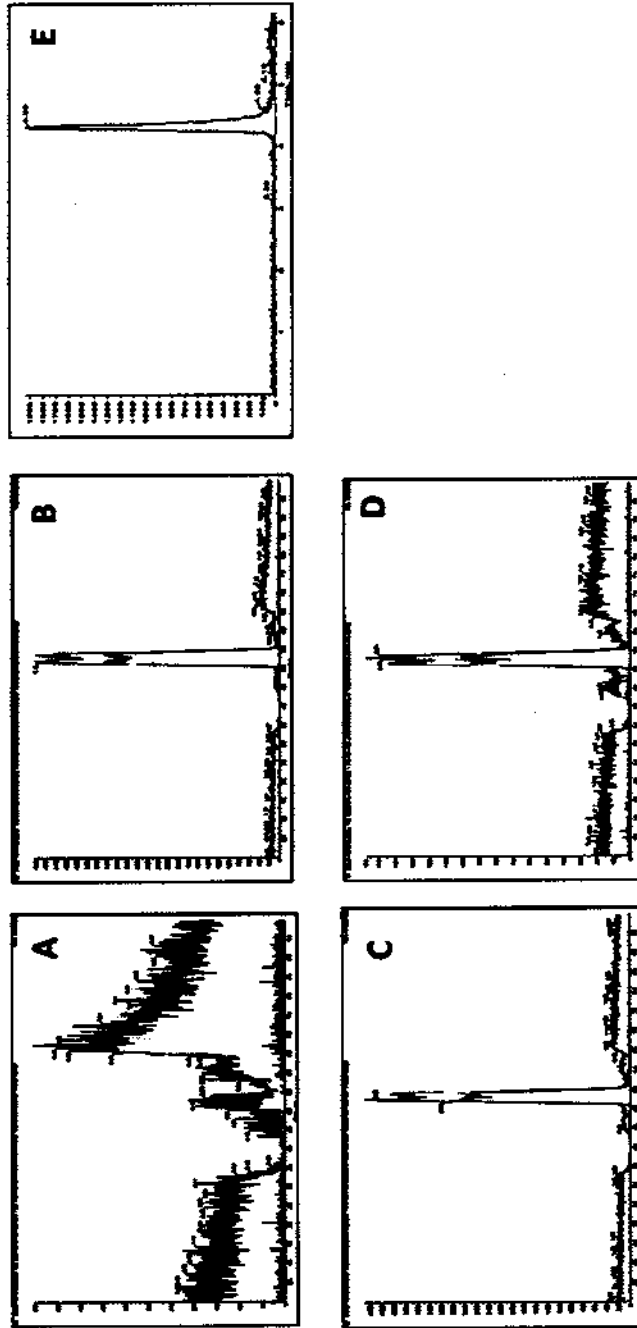


Fig. 4





OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA

- ②① N.º solicitud: 201500205  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 10.03.2015  
③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K31/505** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	KANAPATHIPILLAI MATHUMAI et al. Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's beta-amyloid. FEBS Letters Ago 29 2005 (08.2005) VOL: 579 No: 21 Págs: 4775-4780 ISSN 0014-5793, página 4775, segunda columna y página 4779, columna 1, último párrafo.	1-18
X	KANAPATHIPILLAI et al. Small stress molecules inhibit aggregation and neurotoxicity of prion peptide 106-126. Biochemical and Biophysical Research Communications, 20071126 ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US 26.11.2007 VOL: 365 No: 4 Págs: 808-813 ISSN 0006-291X Doi: doi:10.1016/j.bbrc.2007.11.074, ver página 810 y figura 1.	1-18
X	PASTOR J M et al. Ectoines in cell stress protection: Uses and biotechnological production. BIOTECHNOLOGY ADVANCES, 20101101 ELSEVIER PUBLISHING, BARKING, GB 01.11.2010 VOL: 28 No: 6 Págs: 782-801 ISSN 0734-9750 Zhao Huimin; Tan Tianwei, Tabla 2.	1-18

#### 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  
18.12.2015

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,

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 18.12.2015

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-18	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-18	<b>NO</b>

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	KANAPATHIPILLAI MATHUMAI et al. Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's beta-amyloid. FEBS Letters Ago 29 2005 (08.2005) VOL: 579 No: 21 Págs: 4775-4780 ISSN 0014-5793, página 4775, segunda columna y página 4779, columna 1, último párrafo.	31.07.2005
D02	KANAPATHIPILLAI et al. Small stress molecules inhibit aggregation and neurotoxicity of prion peptide 106-126. Biochemical and Biophysical Research Communications, 20071126 ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US 26.11.2007 VOL: 365 No: 4 Págs: 808-813 ISSN 0006-291X Doi: doi:10.1016/j.bbrc.2007.11.074, ver página 810 y figura 1.	26.11.2007
D03	PASTOR J M et al. Ectoines in cell stress protection: Uses and biotechnological production. BIOTECHNOLOGY ADVANCES, 20101101 ELSEVIER PUBLISHING, BARKING, GB 01.11.2010 VOL: 28 No: 6 Págs: 782-801 ISSN 0734-9750 Zhao Huimin; Tan Tianwei, Tabla 2.	01.11.2010

**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 seleccionado entre ectoína o un derivado de ectoína de fórmula general I o II para la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de enfermedades producidas por la formación de agregados proteicos en células. Las enfermedades pueden ser amiloidosis neuropática, enfermedades neurodegenerativas tales como Alzheimer, Parkinson, Huntington, encefalopatías espongiiformes, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y polineuropatía amiloidótica familiar.

El documento D1 describe la efectividad de ectoína e hidroxiectoína en la inhibición de la agregación de la AB42 amiloide y reduce la toxicidad a las células del neuroblastoma. Estos resultados sugieren que la ectoína y la hidroxiectoína pueden ser candidatos en la terapéutica anti-amiloide para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (ver página 4775, segunda columna y página 4779, columna 1, último párrafo).

El documento D2 se refiere a un estudio sobre el efecto de la ectoína en la inhibición de la agregación y la neurotoxicidad del péptido prion 106-126 partículas infecciosas compuestas principalmente de proteína y que transmiten encefalopatías espongiiformes en animales y humanos (ver página 810 y figura 1).

El documento D3 es un review sobre los diferentes aplicaciones de las ectoínas y entre ellas se recogen en la tabla 2 los efectos citados en la presente solicitud.

Por lo tanto, a la vista de los documentos D1-D3 la utilización de ectoína en los procesos de inhibición de la formación de agregados proteicos es conocida. Y por lo tanto su aplicación en las enfermedades citadas en la presente solicitud tales como las enfermedades neurodegenerativas.

En consecuencia, las reivindicaciones 1-18 de la presente solicitud carecen de novedad y de actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.