

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 578**

51 Int. Cl.:

A61K 31/366 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2003 E 10000734 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2172246**

54 Título: **Briostatinas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y de la mejora cognitiva**

30 Prioridad:

07.03.2002 US 362080 P

13.06.2002 US 167491

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

27.10.2017

73 Titular/es:

**BLANCHETTE ROCKEFELLER NEUROSCIENCES
INSTITUTE (100.0%)
8 MEDICAL CENTER DRIVE
MORGANTOWN, WV 26505-3409, US**

72 Inventor/es:

**ALKON, DANIEL L. y
ETCHEBERRIGARAY, RENE**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 639 578 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

Briostatinas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y de la mejora cognitiva

5 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION****(i) Sector de la invención**

10 La presente invención se refiere a la modulación de α -secretasa y al aumento cognitivo. La presente invención se refiere, además, a compuestos para el tratamiento de afecciones asociadas con el procesamiento de amiloides, tales como la enfermedad de Alzheimer, y a composiciones para el tratamiento de dichas afecciones.

(ii) Antecedentes de la invención

15 Existen diversos trastornos y enfermedades que afectan a la cognición. La cognición puede describirse, en general, como que incluye, como mínimo, tres componentes diferentes: la atención, el aprendizaje y la memoria. Cada uno de estos componentes y sus respectivos niveles afectan al nivel general de la capacidad cognitiva de un sujeto. Por ejemplo, mientras que los pacientes con enfermedad de Alzheimer sufren una pérdida de cognición general y, de este modo, el deterioro de cada una de estas características, es la pérdida de memoria lo que se asocia más frecuentemente con la enfermedad. En otras enfermedades, los pacientes sufren un deterioro cognitivo que está asociado de forma más predominante con diferentes características de la cognición. Por ejemplo, el trastorno por déficit de atención por hiperactividad (TDAH) se centra en la capacidad del individuo para mantener un estado atento. Entre otras afecciones se incluyen demencias generales asociadas con otras enfermedades neurológicas, el envejecimiento y el tratamiento de afecciones que pueden causar efectos perjudiciales sobre la capacidad mental, tales como tratamientos contra el cáncer, accidente cerebrovascular/isquemia y retraso mental.

20 Los trastornos de la cognición crean una variedad de problemas para la sociedad actual. Por lo tanto, los científicos han realizado esfuerzos para desarrollar potenciadores cognitivos o activadores de la cognición. Los potenciadores o activadores de la cognición que se han desarrollado se clasifican, en general, para incluir nootrópicos, vasodilatadores, potenciadores metabólicos, psicoestimulantes, agentes colinérgicos, fármacos de aminor biogénicas y neuropéptidos. Los vasodilatadores y potenciadores metabólicos (por ejemplo, dihidroergotoxina), son principalmente eficaces en los trastornos de la cognición inducidos por una isquemia unida a vasos cerebrales; sin embargo, son ineficaces en el uso clínico y con otros tipos de trastornos de la cognición. Entre los potenciadores de la cognición desarrollados, habitualmente sólo se utilizan los medicamentos metabólicos para uso clínico, ya que otros todavía están en fase de investigación. Entre los nootrópicos, por ejemplo, el piracetam activa el sistema endocrino periférico, lo que no es apropiado para la enfermedad de Alzheimer debido a la alta concentración de esteroides producidos en pacientes, mientras que la tacrina, un agente colinérgico, tiene una variedad de efectos secundarios, incluyendo vómitos, diarrea y hepatotoxicidad .

30 Las formas de mejorar las capacidades cognitivas de los individuos enfermos han sido objeto de diversos estudios. Recientemente, el estado cognitivo relacionado con la enfermedad de Alzheimer y las diferentes formas de mejorar la memoria del paciente han sido objeto de diversos enfoques y estrategias. Desafortunadamente, estos enfoques y estrategias sólo mejoran la cognición sintomática y transitoria en personas enfermas, pero no abordan la progresión de la enfermedad. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, se han realizado esfuerzos para mejorar la cognición, normalmente a través de las vías colinérgicas o a través de otras vías de transmisores cerebrales. El enfoque principal se basa en la inhibición de las enzimas de acetil colinesterasa a través de la terapia con fármacos. La acetil colinesterasa es una enzima importante del cerebro y la manipulación de sus niveles puede dar lugar a diversos cambios en otras funciones neurológicas y provocar efectos secundarios.

35 Aunque éstos y otros procedimientos pueden mejorar la cognición, como mínimo, de forma transitoria, no modifican la progresión de la enfermedad ni abordan la causa de la enfermedad. Por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer se asocia habitualmente con la formación de placas a través de la acumulación de la proteína precursora de amiloide. Se han realizado intentos por obtener una respuesta inmunológica a través del tratamiento contra el amiloide y la formación de placas en modelos animales, pero no se han ampliado con éxito a los seres humanos.

40 Además, los inhibidores de la colinesterasa sólo producen una cierta mejora sintomática durante poco tiempo y en sólo una fracción de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer con síntomas leves a moderados y, de este modo, son sólo un tratamiento útil para una pequeña parte de la población total de pacientes. Aún más crítico es que los esfuerzos actuales por mejorar la cognición no dan lugar al tratamiento de la patología, sino que son meramente paliativos de los síntomas. Los tratamientos actuales no modifican la progresión de la enfermedad. Estos tratamientos también incluyen la utilización de una "vacuna" para tratar los síntomas de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer que, aunque son teóricamente plausibles y eficaces en las pruebas con ratones, se ha demostrado que causan reacciones adversas graves en los seres humanos.

45 Como resultado, la utilización de la vía colinérgica para el tratamiento del deterioro cognitivo, en particular en la enfermedad de Alzheimer, ha demostrado ser insuficiente. Además, los tratamientos actuales para la mejora

cognitiva se limitan a enfermedades neurodegenerativas específicas y no han demostrado ser eficaces en el tratamiento de otras afecciones cognitivas.

La enfermedad de Alzheimer está asociada con una amplia pérdida de subpoblaciones neuronales específicas en el cerebro, siendo la pérdida de memoria el síntoma más universal. (Katzman, R. (1986)) *New England Journal of Medicine* 314: 964). La enfermedad de Alzheimer está bien caracterizada con respecto a los cambios neuropatológicos. Sin embargo, se han descrito anomalías en el tejido periférico que apoyan la posibilidad de que la enfermedad de Alzheimer sea un trastorno sistémico, siendo la patología del sistema nervioso central el más prominente. (Connolly, G., *Fibroblast models of neurological disorders: fluorescent measurement studies*. ("Modelos de fibroblastos de trastornos neurológicos: estudios de medición de fluorescencia"), *Review, TIPS Volumen 19*, 171-77 (1998)). Para una explicación sobre la relación entre la enfermedad de Alzheimer y un origen genético y los cromosomas 1, 14, y 21, véase St. George-Hyslop, P.H. y otros, *Science* 235: 885 (1987); Tanzi, Rudolph y otros, *The Gene Defects Responsible for Familial Alzheimer's Disease* ("Los defectos genéticos responsables de la enfermedad de Alzheimer familiar"), *Review, Neurobiology of Disease* 3, 159-168 (1996); Hardy, J., *Molecular genetics of Alzheimer's disease* ("Genética molecular de la enfermedad de Alzheimer"), *Acta Neurol Scand: Supplement* 165: 13-17 (1996).

Aunque los cambios celulares que conducen a la pérdida neuronal y la etiología subyacente de la enfermedad siguen siendo objeto de investigación, la importancia del metabolismo de las APP está bien establecida. Las dos proteínas identificadas más consistentemente en los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer que desempeñan un papel en la fisiología o fisiopatología del cerebro son β -amiloide y tau. (Véase Selkoe, D., *Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy*, ("Enfermedad de Alzheimer: genes, proteínas y terapia"), *Physiological Reviews*, Vol 81, No. 2, 2001). Una explicación de los defectos en el metabolismo de la proteína β -amiloide y la homeostasis anormal del calcio y/o quinasas activadas por calcio. (Etcheberrigaray y otros, *Calcium responses are altered in fibroblasts from Alzheimer's patients and pre-symptomatic PS1 carriers: a potential tool for early diagnosis* ("Las respuestas de calcio se alteran en los fibroblastos de los pacientes de Alzheimer y portadores de PS1 presintomáticos: una herramienta potencial para el diagnóstico precoz"), *Alzheimer's reports*, Volumen 3, Nos. 5 y 6, pág. 305-312 (2000); Webb, y otros, *Protein kinase C isozymes: a review of their structure, regulation and role in regulating airways smooth muscle tone and mitogenesis* ("Isoenzimas de proteína quinasa C: una revisión de su estructura, regulación y papel en la regulación del tono del músculo liso de las vías respiratorias y la mitogénesis"), *British Journal of Pharmacology*, 130, pág. 1433-1452 (2000)).

Además, con respecto a la memoria normal y anormal, se ha demostrado que tanto los canales de K^+ como los canales de Ca^{2+} desempeñan un papel clave en el almacenamiento y el recuerdo de la memoria. Por ejemplo, se ha descubierto que los canales de potasio cambian durante el almacenamiento de la memoria. (Etcheberrigaray, R. y otros (1992) *Proceeding of the National Academy of Science* 89: 7184; Sánchez-Andrés, J.V. y Alkon, D.L. (1991) *Journal of Neurobiology* 65: 796; Collin, C. y otros (1988) *Biophysics Journal* 55: 955; Alkon, D.L. y otros (1985) *Behavioral and Neural Biology* 44: 278; Alkon, D.L. (1984) *Science* 226: 1037). Esta observación, junto con el síntoma casi universal de la pérdida de memoria en los pacientes de Alzheimer, condujo a la investigación de la función de los canales de potasio como un posible foco de patología de la enfermedad de Alzheimer y el efecto de la modulación de la PKC sobre la cognición.

La PKC se identificó como una de las mayores familias de genes de proteínas quinasas no receptoras de serina-treonina. Desde el descubrimiento de la PKC a principios de los años ochenta por Nishizuka y colaboradores (Kikkawa y otros, *J. Biol. Chem.*, 257, 13341 (1982), y su identificación como receptor principal para ésteres de forbol (Ashendel y otros, *Cancer Res.*, 43, 4333 (1983)), se han atribuido una multitud de mecanismos de señalización fisiológicos a esta enzima. El intenso interés en la PKC se debe a su capacidad única para ser activada *in vitro* por calcio y diacilglicerol (y sus miméticos de éster de forbol), un efector cuya formación está acoplada al recambio de fosfolípidos por la acción de los factores de crecimiento y diferenciación.

La familia de genes de la PKC consiste actualmente en 11 genes que se dividen en cuatro subgrupos: 1) PKC α , β_1 , β_2 clásicas (β_1 y β_2 son formas cortadas y empalmadas alternativamente de un mismo gen) y γ , 2) PKC δ , ϵ , η y θ nuevas, 3) PKC ξ , λ , ι atípicas y 4) PKC μ , PKC ν se asemeja a las isoformas nuevas de la PKC, pero difiere en que tiene un posible dominio transmembrana (revisado por Blohe y otros, *Cancer Metast. Rev.* 13, 411 (1994); Hug y otros, *Biochem j.*, 291, 329 (1993); Kikkawa y otros, *Ann. Rev. Biochem.* 58, 31 (1989)). Las isoformas α , β_1 , β_2 y γ son dependientes de Ca^{2+} , fosfolípido y diacilglicerol y representan las isoformas clásicas de la PKC, mientras que las otras isoformas son activadas por fosfolípido y diacilglicerol, pero no son dependientes de Ca^{2+} . Todas las isoformas abarcan 5 regiones variables (VI-V5) y las isoformas α , β y γ contienen cuatro dominios estructurales (C1-C4) que están altamente conservados. Todas las isoformas, excepto PKC α , β y γ , carecen del dominio C2 y las isoformas λ y η también carecen de nueve dominios de dos dedos de zinc ricos en cisteína en C1 a los que se une diacilglicerol. El dominio C1 también contiene la secuencia de pseudosustrato que está altamente conservada entre todas las isoformas y que produce una función autorreguladora mediante el bloqueo del sitio de unión al sustrato para producir una conformación inactiva de la enzima (House y otros, *Science*, 238, 1726 (1987)).

Debido a estas características estructurales, se cree que las diversas isoformas de la PKC desempeñan papeles

altamente especializados en la transducción de señales en respuesta a estímulos fisiológicos (Nishizuka, *Cancer*, 10, 1892 (1989)), así como en la transformación y diferenciación neoplásica (Glazer, *Protein Kinase C*, J. F. Kuo, ed., Oxford U. Press (1994) en las páginas 171-198). Para una explicación de los moduladores de la PKC conocidos, véanse el documento PCT/US97/08141, las patentes de Estados Unidos No. 5.652.232; 6.043.270; 6.080.784; 5.891.906; 5.962.498; 5.955.501; 5.891.870 y 5.962.504.

En vista del papel central que la PKC desempeña en la transducción de señales, se ha demostrado que la PKC es una diana interesante para la modulación del procesamiento de APP. Está bien establecido que la PKC desempeña un papel en el procesamiento de APP. Se ha demostrado, por ejemplo, que los ésteres de forbol aumentan de forma significativa la cantidad relativa de APP solubles no amiloidogénicas (sAPP) secretadas a través de la activación de la PKC. La activación de la PKC por éster de forbol no parece, sin embargo, dar lugar a una fosforilación directa de la molécula de APP. Independientemente del sitio preciso de acción, la activación de la PKC inducida por forbol da lugar a una vía no amiloidogénica de la α -secretasa mejorada o favorecida. Por lo tanto, la activación de la PKC es un enfoque atractivo para influir en la producción de sAPP no perjudiciales e incluso para producir sAPP beneficiosas y, al mismo tiempo, reducir la cantidad relativa de péptidos A β . Los ésteres de forbol, sin embargo, no son compuestos adecuados para un desarrollo final de fármacos debido a su actividad de inducción de tumores. (Ibarreta y otros, Benzolactam (BL) enhances sAPP secretion in fibroblasts and in PC 12 cells ("La benzolactama (BL) aumenta la secreción de sAPP en fibroblastos y en células PC12"), *NeuroReport*, Volumen 10 No. 5 y 6, pág. 1034-1040 (1999)).

Existe una creciente evidencia de que las isoenzimas de la PKC individuales desempeñan papeles diferentes, a veces opuestos, en los procesos biológicos, proporcionando dos direcciones para la explotación farmacológica. Una de ellas es el diseño de inhibidores específicos (preferentemente, específicos de isoenzima) de la PKC. Este enfoque es complicado por el hecho de que el dominio catalítico no es el dominio principalmente responsable de la especificidad de isotipo de la PKC. El otro enfoque es desarrollar activadores de la PKC dirigidos al sitio de regulación selectivos de isoenzima. Éstos pueden proporcionar una manera de anular el efecto de otras vías de transducción de señales con efectos biológicos opuestos. Alternativamente, mediante la inducción de la regulación por disminución de la PKC después de una activación aguda, los activadores de la PKC pueden causar antagonismo a largo plazo. La briostatina se encuentra actualmente en ensayos clínicos como un agente contra el cáncer. Es conocido que las briostatinas se unen al dominio regulador de la PKC y activan la enzima. La briostatina es un ejemplo de activadores de la PKC selectivos de isoenzima. Se han descubierto compuestos, además de las briostatinas, que modulan la PKC. (Véase, por ejemplo, el documento WO 97/43268).

Existe aún la necesidad de desarrollar procedimientos para el tratamiento para mejorar la cognición global, ya sea a través de una característica específica de la capacidad cognitiva o de la cognición general. Además, aún existe la necesidad de desarrollar procedimientos para la mejora del aumento cognitivo, esté relacionado o no con el estado de la enfermedad o un trastorno cognitivo específicos. Los procedimientos y composiciones de la presente invención satisfacen estas necesidades y mejoran ampliamente el tratamiento clínico de la enfermedad de Alzheimer y de otras enfermedades neurodegenerativas, así como, proporcionan una mejora del aumento cognitivo. Los procedimientos y composiciones también proporcionan el tratamiento y/o la mejora del estado cognitivo a través de la modulación de la α -secretasa.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a compuestos y composiciones para utilizar en aumentar la capacidad cognitiva en enfermedades o trastornos neurológicos, según la reivindicación 1. En una realización preferente, la presente invención se refiere, además, a compuestos y composiciones para utilizar en el tratamiento de afecciones asociadas con el procesamiento de amiloides, tales como la enfermedad de Alzheimer, que proporcionan una capacidad cognitiva mejorada/aumentada. En particular, los compuestos y composiciones de la presente invención se seleccionan entre lactonas macrocíclicas, de briostatina-1 a briostatina-18.

La presente invención se refiere a compuestos y composiciones de briostatina-1 a briostatina-18 que modulan la actividad de α -secretasa. En particular, es de interés la briostatina-1.

La presente invención se refiere a los compuestos de briostatina-1 a briostatina-18 como activadores de la PKC para alterar las afecciones asociadas con el procesamiento de amiloides a efectos de mejorar la vía de α -secretasa para generar proteínas precursoras de α -amiloides (α APP) solubles con el fin de prevenir la agregación de β -amiloides y mejorar/aumentar la capacidad cognitiva. Dicha activación, por ejemplo, se puede utilizar en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. En particular, es de interés la briostatina-1.

La presente invención se refiere a un activador de la PKC para utilizar en el tratamiento de la formación de placas, tal como la asociada con la enfermedad de Alzheimer y la mejora/aumento del estado cognitivo, en el que el activador de la PKC es de briostatina-1 a briostatina-18 utilizado en una cantidad eficaz para activar la PKC. En una realización preferente, el activador de la PKC es briostatina-1.

Otros aspecto de la presente invención se refiere a una composición para utilizar en el tratamiento de la formación de placas y la mejora/aumento de la capacidad cognitiva, que comprende: (i) de una briostatina-1 a una briostatina-18 en una cantidad eficaz para aumentar la β -amiloide soluble, generar α APP solubles y prevenir la agregación de β -amiloides; y (ii) un portador farmacéuticamente eficaz. En una realización preferente, la composición se utiliza para mejorar/aumentar la capacidad cognitiva asociada con la enfermedad de Alzheimer.

La activación de las isoenzimas de la PKC da lugar a una capacidad cognitiva mejorada. En una realización, la capacidad cognitiva mejorada es la memoria. En otra realización, la capacidad cognitiva mejorada es el aprendizaje. En otra realización, la capacidad cognitiva mejorada es la atención. En otra realización, las isoenzimas de la PKC son activadas por de briostatina-1 a briostatina-18. En una realización preferente, se utiliza la briostatina-1.

La presente invención comprende una composición de un activador de isoenzimas de la PKC a utilizar, en la que el activador se utiliza en una cantidad eficaz para mejorar la capacidad cognitiva y el activador de isoenzimas de la PKA se selecciona entre de briostatina-1 a briostatina-18. En una realización preferente, el activador de la PKC a utilizar se utiliza en una cantidad eficaz para aumentar la producción de sAPP. En una realización más preferente, la cantidad de la composición no provoca mialgia.

En una realización preferente, las isoenzimas de la PKC se pueden activar en sujetos que padecen o que han padecido enfermedades neurológicas, accidentes cerebrovasculares o hipoxia. En una realización más preferente, la isoenzima de la PKC se puede activar en sujetos o modelos de la enfermedad de Alzheimer.

En otra realización de la presente invención, la activación de la PKC da lugar a la modulación del metabolismo de la proteína precursora de amiloide. Además, la modulación por la activación de la PKC da lugar a un aumento en la vía de la alfa secretasa. La vía de la alfa secretasa da lugar a fragmentos no amiloidogénicos, no tóxicos, relacionados con el deterioro cognitivo. Como resultado, mejora el estado cognitivo del sujeto. En otra realización de la presente invención, la activación de la PKC reduce los fragmentos amiloidogénicos y tóxicos Abeta 40 y Ab42.

La presente invención se refiere a un activador de la PKC para mejorar la capacidad cognitiva a través de la activación de las isoenzimas de la PKC. En otra realización de la presente invención, la activación de la PKC puede tener lugar en sujetos "normales". En otra realización de la presente invención, la activación de la PKC puede tener lugar en sujetos que padecen una enfermedad, que tienen las facultades cognitivas deterioradas o a los que no les funciona la cognición. En una realización preferente, el procedimiento es un procedimiento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

En otra realización de la presente invención, la modulación de la PKC es mediante la utilización de un agente no promotor de tumores que da lugar a la mejora de las capacidades cognitivas, en la que el activador de la PKC se selecciona entre de briostatina-1 a briostatina-18. En una realización más preferente, se utiliza briostatina-1. En otra realización, se utiliza briostatina-1 en combinación con un compuesto de una clase que no es de briostatina para mejorar la capacidad cognitiva y reducir los efectos secundarios.

La modulación de la PKC a través de lactonas macrocíclicas (es decir, de clase briostatina y de clase neristatina) se utiliza *in vitro* para el ensayo de afecciones asociadas con la enfermedad de Alzheimer. La utilización *in vitro* puede incluir, por ejemplo, el ensayo de células de fibroblastos, células sanguíneas o el seguimiento de la conductancia de los canales iónicos en modelos celulares.

Los compuestos y composiciones se administran en formas orales y/o inyectables, incluyendo por vía intravenosa y por vía intraventricular.

De este modo, los compuestos de la presente invención se pueden utilizar en el tratamiento terapéutico de afecciones clínicas en las que tienen lugar defectos de memoria o problemas de aprendizaje. De esta manera, se pueden mejorar la memoria y el aprendizaje. De este modo, puede mejorar el estado del sujeto

Las composiciones son útiles en el tratamiento de afecciones clínicas y trastornos en los que tiene lugar un deterioro de la memoria o un trastorno del aprendizaje, ya sea como una característica central o como un síntoma asociado. Entre los ejemplos de dichas afecciones en las que se pueden utilizar los compuestos de la presente invención, se incluyen la enfermedad de Alzheimer, la demencia multiinfarto y la variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer con o sin asociación con enfermedad de Parkinson; la enfermedad de Creutzfeld-Jakob y el trastorno de Korsakow.

Las composiciones también se pueden utilizar para tratar el deterioro de la memoria o el aprendizaje que está asociado con la edad, que es consecuencia de la terapia electroconvulsiva o que es el resultado de daño cerebral causado, por ejemplo, por un accidente cerebrovascular, un accidente anestésico, un traumatismo craneal, hipoglucemia, envenenamiento por monóxido de carbono, intoxicación por litio o una deficiencia de vitaminas.

Los compuestos tienen la ventaja añadida de no ser promotores tumorales y ya están involucrados en la fase II de ensayos clínicos.

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para aumentar la cognición, prevenir y/o tratar trastornos de la cognición. Más particularmente, se refiere a la composición farmacéutica que comprende de briostatina-1 a briostatina-18 y sus derivados como principio activo para aumentar cognición, prevenir y/o tratar trastornos de la cognición.

Por lo tanto, un objetivo principal de la presente invención es dar a conocer composiciones farmacéuticas para aumentar la cognición, prevenir y/o tratar trastornos de la cognición.

La composición farmacéutica comprende lactonas macrocíclicas, en particular, de la clase briostatina y de la clase neristatina, o una sal farmacéuticamente aceptable o derivado de las mismas, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica, según la presente invención, es útil en el aumento de la cognición, la profilaxis y/o el tratamiento de trastornos de la cognición, en el que los trastornos de la cognición incluyen trastornos de la adquisición de aprendizaje, consolidación y recuperación de la memoria, tal como se describe en el presente documento.

La presente invención se refiere a un activador de la PKC para utilizar en enfermedades neurológicas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, en el que el activador de la PKC se utiliza en una cantidad eficaz que modula o afecta a la fosforilación de proteínas en células de mamífero.

La presente invención también da a conocer un activador de la PKC para utilizar en la enfermedad de Alzheimer, en el que el activador de la PKC es de briostatina-1 a briostatina-18 utilizado en una cantidad eficaz.

En otra realización, la briostatina se puede utilizar en combinación con diferentes ésteres de forbol para prevenir o reducir una respuesta tumorigénica.

La presente invención se define en las reivindicaciones que se adjuntan. La materia que no está abarcada por el alcance de las reivindicaciones no forma parte de la presente invención.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

La figura 1 ilustra el efecto de diferentes inhibidores de la PKC sobre la secreción de sAPP α con briostatina-1, que muestra una mayor eficacia a concentraciones más bajas que los controles y la benzolactama.

La figura 2 ilustra el efecto de diferentes concentraciones de briostatina-1 sobre la isoenzima PKC α .

La figura 3 ilustra el efecto de diferentes concentraciones de briostatina-1 sobre la secreción de sAPP α .

La figura 4 ilustra la cantidad de tiempo requerido para que las ratas tratadas frente a los controles aprendan un laberinto de agua.

La figura 5(a) ilustra la cantidad de tiempo que las ratas de control pasaron nadando en los diferentes cuadrantes.

La figura 5(b) ilustra la cantidad de tiempo que las ratas tratadas pasaron nadando en los diferentes cuadrantes.

La figura 5(c) ilustra la diferencia entre la cantidad de tiempo que las ratas tratadas pasaron en el cuadrante diana en comparación con las ratas de control.

La figura 6 ilustra la secreción de sAPP α en células de fibroblastos humanos después de la administración de briostatina 0,1 nM para los controles y las células de la EA.

La figura 7 ilustra una inmunotransferencia para sAPP después de la administración de briostatina en células de la EA.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERENTES

La pérdida de memoria y el deterioro de la capacidad de aprendizaje son características de una variedad de afecciones clínicas. Por ejemplo, la pérdida de memoria es el síntoma más común de los estados de demencia, que incluye la enfermedad de Alzheimer. También se producen defectos de memoria con otros tipos de demencias, tales como la demencia multiinfarto (DMI), una demencia senil causada por deficiencia cerebrovascular y la variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer con o sin asociación con la enfermedad de Parkinson, o la enfermedad de Creutzfeld-Jakob. La pérdida de memoria es una característica común de los pacientes con daño cerebral. El daño cerebral puede producirse, por ejemplo, después de un accidente cerebrovascular clásico o como resultado de un accidente anestésico, traumatismo craneal, hipoglucemia, envenenamiento por monóxido de carbono, intoxicación por litio, deficiencia de vitaminas (B1, tiamina y B12) o abuso de alcohol o trastorno de Kosakow. El deterioro de la memoria, además, puede estar asociado con la edad; la capacidad para recordar información, tal como nombres, lugares y palabras parece disminuir con el aumento de la edad. La pérdida de memoria transitoria puede producirse también en pacientes que padecen un trastorno depresivo mayor después de terapia electroconvulsiva (ECT). La enfermedad de Alzheimer es, de hecho, la entidad clínica más importante responsable de la demencia progresiva en el envejecimiento de la población, mientras que la hipoxia/accidente cerebrovascular es responsable de los defectos significativos de memoria no relacionados con trastornos neurológicos.

Los individuos con la enfermedad de Alzheimer se caracterizan por un deterioro progresivo de la memoria, pérdida del lenguaje y habilidades y déficits de comportamiento (McKhann y otros, 1986, *Neurology*, 34: 939-944). El deterioro cognitivo de los individuos con la enfermedad de Alzheimer es el resultado de la degeneración de las células neuronales situadas en la corteza cerebral, el hipocampo, el prosencéfalo basal y otras regiones del cerebro. Los análisis histológicos de los cerebros con enfermedad de Alzheimer obtenidos en autopsias demostraron la presencia de ovillos neurofibrilares (NFT) en pericaria y axones de las neuronas en degeneración, placas neuríticas extracelulares (seniles) y placas amiloides en el interior y alrededor de algunos vasos sanguíneos de las regiones afectadas del cerebro. Los ovillos neurofibrilares son estructuras filamentosas anormales que contienen fibras (de aproximadamente 10 nm de diámetro) que están apareadas de forma helicoidal, por lo tanto, también se llaman filamentos helicoidales apareados. Las placas neuríticas están situadas en los terminales nerviosos en degeneración (tanto axonales como dendríticos) y contienen un compuesto núcleo de fibras de proteína amiloide. En resumen, la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por ciertas características neuropatológicas, que incluyen ovillos neurofibrilares intracelulares, compuestos principalmente por proteínas del citoesqueleto y amiloide parenquimal y cerebrovascular extracelular. Además, actualmente existen procedimientos para distinguir entre los pacientes de Alzheimer, las personas de edad avanzada normales y las personas que padecen otras enfermedades neurodegenerativas, tales como el Parkinson, la corea de Huntington, Wernicke-Korsakoff o esquizofrenia, descritas adicionalmente, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 5.580.748 y la patente de Estados Unidos 6.080.582.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno cerebral caracterizado por el catabolismo alterado de proteínas. La fosforilación alterada de proteínas está implicada en la formación de los ovillos neurofibrilares intracelulares que se encuentran en la enfermedad de Alzheimer. También se ha investigado el papel para la fosforilación de proteínas en el catabolismo de la proteína precursora de amiloide (APP), de la que se deriva el componente principal de las placas amiloides que se encuentran en la EA. Una característica central de la patología de la enfermedad de Alzheimer es el depósito de proteína amiloide en las placas.

El procesamiento de la proteína precursora de amiloide (APP) determina la producción de fragmentos que posteriormente se agregan formando depósitos de amiloide característicos de la enfermedad de Alzheimer (EA), conocidos como placas seniles o de EA. De este modo, el procesamiento de la APP es un acontecimiento fisiopatológico temprano y clave en la EA.

Se han identificado tres vías de procesamiento de APP alternativas. El procesamiento previamente denominado "normal" implica la participación de una enzima que escinde la APP dentro de la secuencia A β en el residuo Lys16 (o entre Lys16 y Leu17; nomenclatura APP770), dando lugar a fragmentos no amiloidogénicos: un gran ectodominio N-terminal y un pequeño fragmento unido a membrana de 9 kDa. Esta enzima, aunque aún está por identificar totalmente, se conoce como α -secretasa. Dos secretasas adicionales participan en el procesamiento de la APP. Una vía alternativa implica la escisión de la APP fuera del dominio A β , entre Met671 y Asp672 (por la β -secretasa) y la participación del sistema endosomal-lisosomal. Un sitio de escisión adicional se produce en el extremo terminal carboxilo de la parte de A β , dentro de la membrana plasmática, después del aminoácido 39 del péptido A β . La acción de la secretasa (γ) produce un extremo terminal de aminoácido extracelular que contiene toda la secuencia de A β y un fragmento asociado a la célula de ~6 kDa. De este modo, el procesamiento por β y γ secretasas genera potenciales fragmentos amiloidogénicos, ya que contienen la secuencia de A β completa. Varias líneas de pruebas han demostrado que todas las vías alternativas se producen en un sistema determinado y que A β soluble puede ser un "producto normal". Sin embargo, también hay pruebas de que la cantidad de A β circulante en CSF y plasma es elevada en los pacientes que contienen la mutación "sueca". Además, las células cultivadas transfectadas con esta mutación o la mutación APP₇₁₇ segregan cantidades más grandes de A β . Más recientemente, se ha demostrado que los portadores de otras mutaciones de la APP y de las mutaciones de PS1 y PS2 secretan cantidades elevadas de una A β larga (42-43 aminoácidos) de forma particular.

Por lo tanto, aunque todas las vías alternativas pueden tener lugar normalmente, se produce un desequilibrio que favorece el procesamiento amiloidogénico en la EA familiar y quizás la EA esporádica. Estas vías amiloidogénicas aumentadas en última instancia conducen a la formación de fibrillas y placas en los cerebros de los pacientes con EA. De este modo, la intervención para favorecer la vía no amiloidogénica de la α -secretase desplaza de manera eficaz el equilibrio del procesamiento de la APP hacia un proceso presumiblemente no patógeno que aumenta la cantidad relativa de sAPP en comparación con los péptidos A β potencialmente tóxicos.

Las isoenzimas de la PKC proporcionan una diana molecular crítica, específica y limitante de la velocidad a través de la cual se puede demostrar una correlación única de eficacia bioquímica, biofísica y conductual y se puede aplicar a sujetos para mejorar la capacidad cognitiva.

Los inventores de la presente invención han estudiado las briostatinas como activadores de la proteína quinasa (PKC). Las alteraciones en la PKC, así como alteraciones en la regulación del calcio y los canales de potasio (K⁺) se incluyen entre las alteraciones en los fibroblastos en la enfermedad de Alzheimer (EA). Se ha observado que la activación de la PKC restaura la función normal de los canales de K⁺, según lo medido mediante el aumento de [Ca²⁺] inducido por TEA. Además, los datos de fijación de membrana ("patch-clamp") corroboran el efecto de los

activadores de la PKC sobre la restauración de la actividad del canal de K^+ 113pS. De este modo, se ha establecido la restauración de los canales de K^+ basada en los activadores de la PKC como un enfoque para la investigación de la fisiopatología de la EA y proporciona un modelo útil para agentes terapéuticos contra la EA. (Véase la solicitud pendiente de tramitación 09/652.656)

5 La utilización de los tejidos periféricos de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (EA) y células neuronales animales permitió la identificación de un conjunto de alteraciones celulares/moleculares que reflejan procesos comparables en el cerebro con EA y, de este modo, de relevancia fisiopatológica (Baker y otros, 1988; Scott, 1993; Huang, 1994; Scheuner y otros, 1996; Etcheberrigaray y Alkon, 1997; Gasparini y otros, 1997). La alteración de la
10 función de los canales de potasio se ha identificado en fibroblastos (Etcheberrigaray y otros, 1993) y en células sanguíneas (Bondy y otros, 1996) obtenidas de pacientes con EA. Además, se observó que la β -amiloide, ampliamente aceptada como un jugador importante en la patofisiología de la EA (Gandy y Greengard, 1994; Selkoe, 1994; Yankner, 1996) era capaz de inducir una alteración de los canales de K^+ similar a la EA en los fibroblastos de control (Etcheberrigaray y otros, 1994). Se han descrito efectos similares o comparables de β -amiloide sobre los
15 canales de K^+ en neuronas de animales de laboratorio (Good y otros, 1996; también para una revisión, véase Fraser y otros, 1997). Una observación anterior de las alteraciones del hipocampo de los canales de K^+ sensibles a apamina en cerebros con EA (medida mediante la unión a apamina) proporciona un apoyo adicional a la sugerencia de que los canales de K^+ pueden ser patofisiológicamente relevantes en la EA (Ikeda y otros, 1991). Además, la proteína quinasa C (PKC) muestra cambios paralelos en los tejidos periféricos y del cerebro de pacientes con EA. Los niveles y/o actividad de esta enzima o enzimas se introdujeron en los cerebros y fibroblastos de pacientes con
20 EA (Cole y otros, 1988; Van Huynh y otros, 1989; Govoni y otros, 1993; Wang y otros, 1994). Los estudios que utilizan análisis de inmunotransferencia han revelado que de las diversas isoenzimas de la PKC, principalmente la isoforma α se redujo significativamente en los fibroblastos (Govoni y otros, 1996), mientras que ambas isoformas α y β se reducen en los cerebros de pacientes con EA (Shimohama y otros, 1993; Masliah y otros, 1990). Estas alteraciones de la PKC del cerebro podrían ser un acontecimiento temprano en el proceso de la enfermedad (Masliah y otros, 1991). También es interesante indicar que la activación de la PKC parece favorecer el procesamiento no amiloidogénico de la proteína precursora de amiloide, APP (Bauxbaum y otros, 1990; Gillespie y otros, 1992; Selkoe, 1994; Gandy y Greengard, 1994; Bergamashi y otros, 1995; Desdoutis y otros, 1996; Efnimiopoulus y otros, 1996). De este modo, coexisten tanto las alteraciones de la PKC como las de los canales de
30 K^+ en la EA, con expresión periférica y en el cerebro en la EA.

La unión entre las alteraciones de la PKC y los canales de K^+ se ha investigado porque es conocido que la PKC regula los canales iónicos, incluyendo los canales de K^+ y que una PKC defectuosa conduce a canales de K^+ defectuosos. Esto es importante no sólo para la modulación de la APP, sino también para el papel que la PKC y los
35 canales de K^+ desempeñan en la creación y el recuerdo de la memoria, (por ejemplo, véase Alkon y otros, 1988; Covarrubias y otros, 1994; Hu y otros, 1996). Se han utilizado fibroblastos de la EA para demostrar los defectos de los canales de K^+ y de la PKC (Etcheberrigaray y otros, 1993; Govoni y otros, 1993, 1996). Los estudios también muestran que los fibroblastos con canales de K^+ disfuncionales conocidos tratados con activadores de la PKC restauran la actividad de los canales, tal como se monitoriza mediante la presencia/ausencia del aumento del calcio inducido por TEA. Además, se han utilizado los ensayos basados en el aumento de la $[Ca^{2+}]$ inducido por cloruro de tetraetilamonio (TEA) para mostrar que los canales de K^+ 113pS funcionales son susceptibles al bloqueo por TEA (Etcheberrigaray y otros, 1993, 1994; Hirashima y otros, 1996). De este modo, el aumento de la $[Ca^{2+}]$ inducido por
40 TEA y la actividad de los canales de K^+ observados en fibroblastos de los individuos de control están prácticamente ausentes en fibroblastos de pacientes con EA (Etcheberrigaray y otros, 1993; Hirashima y otros, 1996). Estos estudios demuestran que la utilización de activadores de la PKC puede restaurar la capacidad de respuesta de las líneas celulares de fibroblastos de la EA a la estimulación por TEA. Además, las pruebas de inmunotransferencia de estos estudios demuestran que esta restauración se relaciona con una participación preferencial de la isoforma α .

Los inventores de la presente invención también han observado que la activación de la proteína quinasa C favorece el procesamiento por la α -secretasa de la proteína precursora de amiloide (APP) de la enfermedad de Alzheimer, lo que da lugar a la generación de APP solubles no amiloidogénicas (sAPP). En consecuencia, se reduce la secreción
50 relativa de A_{1-40} y $A_{1-42(3)}$ amiloidogénicas. Esto es particularmente relevante, ya que los fibroblastos y otras células que expresan APP y mutaciones de presenilina en la EA secretan mayores cantidades de $A\beta$ total y/o mayores proporciones de $A_{1-42(3)}/A_{1-40}$. De manera destacada, se han observado defectos de la PKC en el cerebro con EA (isoformas α y β) y en fibroblastos (isoforma α) de pacientes con EA.

Algunos estudios han demostrado que otros activadores de la PKC (es decir benzolactama) con una mejor selectividad para las isoformas α , β y γ aumentan la secreción de sAPP respecto a los niveles basales. La secreción de sAPP en células de EA tratadas con benzolactama también fue ligeramente mayor en comparación con los
60 fibroblastos de control tratados con benzolactama, que sólo mostraron aumentos significativos de la secreción de sAPP después del tratamiento con BL 10 μ M. Se describió, además, que la estaurosporina (un inhibidor de la PKC) elimina los efectos de la benzolactama en los fibroblastos de control y de la EA, mientras que compuestos relacionados también causan ~3 veces una secreción de sAPP en células PC12. Los inventores de la presente invención han descubierto que la utilización de briostatina como activador de la PKC para favorecer el procesamiento de la APP no amiloidogénica es de particular valor terapéutico, ya que no es un promotor tumoral y
65

ya está en fase II de ensayos clínicos.

Se cree que la memoria se cree que es el resultado de una modificación sináptica duradera en las estructuras cerebrales relacionadas con el procesamiento de la información. Las sinapsis son consideradas un sitio crítico en las dianas finales a través de las cuales los acontecimientos relacionados con la memoria llevan a cabo su expresión funcional, tanto si los eventos implican una expresión de genes y traducción de proteínas variadas, actividades de quinasa alteradas o cascadas de señalización modificadas. Se han implicado algunas proteínas en la memoria asociativa, que incluyen Ca^{2+} /calmodulina II quinasas, proteína quinasa C, calexitina, una proteína de unión a Ca^{2+} asociada al aprendizaje de 22 kDa y receptores de rianodina de tipo II. La modulación de la PKC a través de la administración de lactonas macrocíclicas proporciona un mecanismo para efectuar la modificación sináptica.

El área de deterioro de la memoria y del aprendizaje es rico en modelos animales que son capaces de demostrar las diferentes características de los procesos de memoria y aprendizaje. (Véase, por ejemplo, Hollister, L.E., 1990, *Pharmacopsychiat.*, 23, (Supl II) 33-36). Los modelos animales disponibles de pérdida de memoria y deterioro del aprendizaje implican la medición de la capacidad de los animales para recordar un evento discreto. Estas pruebas incluyen el laberinto de agua de Morris y el procedimiento de evitación pasiva. En el laberinto de agua de Morris, se permite a los animales nadar en un tanque dividido en cuatro cuadrantes, sólo uno de los cuales tiene una plataforma de seguridad bajo el agua. La plataforma se retira y los animales se analizan para determinar durante cuánto tiempo buscan el cuadrante correcto frente a los cuadrantes incorrectos. En el procedimiento de evitación pasiva el animal recuerda el medio distintivo en el que se suministra una descarga eléctrica suave y lo evita en una segunda ocasión. Una variante del procedimiento de evitación pasiva utiliza la preferencia de un roedor por ambientes cerrados oscuros sobre los abiertos con luz. Una explicación adicional se puede encontrar en Crawley, J.N., 1981, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 15, 695-699; Costall, B. y otros, 1987, *Neuropharmacol.*, 26, 195-200; Costall, B. y otros, 1989, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 32, 777-785; Barnes, J.M. y otros, 1989, *Br. J. Pharmacol.*, 98 (Supl) 693P; Barnes, J.M. y otros, 1990, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 35, 955-962.

La utilización de la palabra "normal" pretende incluir a individuos que no han sido diagnosticados o que actualmente muestran una función cognitiva disminuida o, en cualquier caso, deteriorada. Las diferentes capacidades cognitivas se pueden ensayar y evaluar a través de medios conocidos bien establecidos en la técnica, que incluye, pero sin limitarse a éstos, pruebas desde la capacidad motora-espacial básica hasta pruebas de recuperación de memoria más complejas. Entre los ejemplos no limitantes de pruebas utilizadas para la capacidad cognitiva para no primates se incluyen el laberinto de agua de Morris, el laberinto radial, el laberinto en forma de T, el acondicionamiento del parpadeo del ojo, la memoria diferida y la memoria facilitada, mientras que para los sujetos primates, las pruebas pueden incluir el parpadeo del ojo, la memoria diferida, la memoria facilitada, el reconocimiento facial, minimental y ADAS-Cog. Muchas de estas pruebas se utilizan normalmente en la evaluación del estado mental para los pacientes que padecen EA. De manera similar, la evaluación de modelos animales para propósitos similares está bien descrita en la bibliografía.

Son particularmente interesantes las lactonas macrocíclicas (es decir, de clase briostatina y de clase neristatina) que actúan para estimular la PKC. Entre los compuestos de clase briostatina, se ha observado que la briostatina-1 activa la PKC y se ha demostrado que está desprovista de actividad inductora de tumores. La briostatina-1, como activador de la PKC, también es particularmente útil, ya que la curva de dosis-respuesta de la briostatina-1 es bifásica. Además, la briostatina-1 demuestra la regulación diferencial de las isoenzimas de la PKC, incluyendo $\text{PKC}\alpha$, $\text{PKC}\delta$ y $\text{PKC}\epsilon$. La briostatina-1 ha sido objeto de estudios de toxicidad y de seguridad en animales y seres humanos y está siendo investigada activamente como un agente contra el cáncer. La utilización de briostatina-1 en los estudios ha determinado que la reacción adversa principal en los seres humanos es la mialgia, lo que limita la dosis máxima a 40 mg/m^2 . La presente invención ha utilizado concentraciones de 0,1 nM de briostatina-1 para causar un aumento muy grande de la secreción de sAPP. La briostatina-1 se ha comparado con un vehículo solo y con otro activador de la PKC, benzolactama (BL), utilizada a una concentración 10.000 veces mayor. También la briostatina utilizada a 0,01 nM resultó aún ser eficaz para aumentar la secreción de sAPP. (Véase la figura 1). La translocación de la PKC muestra que una medición de la activación es máxima a los 30 min, seguido por una disminución parcial, que permanece más alta que los niveles de translocación basales hasta las seis horas. (Véanse las figuras 2, 3 y 7). La utilización del inhibidor de la PKC, estaurosporina, impide totalmente el efecto de la briostatina sobre la secreción de sAPP. Los datos demuestran, además, que la activación de la PKC media en el efecto de la briostatina sobre la secreción de sAPP, (véanse las figuras 1-3).

Las lactonas macrocíclicas, y particularmente la briostatina-1, se describen en la patente de Estados Unidos 4.560.774. Las lactonas macrocíclicas y sus derivados se describen en otros puntos en la técnica, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 6.187.568, la patente de Estados Unidos 6.043.270, la patente de Estados Unidos 5.393.897, la patente de Estados Unidos 5.072.004, la patente de Estados Unidos 5.196.447, la patente de Estados Unidos 4.833.257 y la patente de Estados Unidos 4.611.066. Las patentes anteriores describen diversos compuestos y diversas utilidades para lactonas macrocíclicas, incluyendo su utilización como agente antiinflamatorio o antitumoral. Otras explicaciones con respecto a compuestos de la clase briostatina se pueden encontrar en: Differential Regulation of Protein Kinase C Isozymes by Briostain 1 and Phorbol 12-Myristate 13-Acetate in NIH 3T3 Fibroblasts, ("Regulación diferencial de las isoenzimas de la proteína quinasa C por briostatina-1 y 12-miristato 13-acetato de forbol en fibroblastos NIH 3T3"), Szallasi y otros, *Journal of Biological*

Chemistry, Volumen. 269, No. 3, pág. 2118-24 (1994); Preclinical Pharmacology of the Natural Product Anticancer Agent Bryostatín 1, an Activator of Protein Kinase C, ("Farmacología preclínica del agente contra el cáncer de producto natural briostatina-1, un activador de la proteína quinasa C"), Zhang y otros, Cancer Research 56, 802-808 (1996); Bryostatín 1, an activator of protein kinase C, inhibits tumor promotion by phorbol esters in SENCAR mouse skin, ("Briostatina-1, un activador de la proteína quinasa C, inhibe la promoción de tumores por ésteres de forbol en piel de ratón SENCAR"), Hennings y otros, Carcinogenesis volumen 8, No. 9, pág. 1343-1346 (1987); Phase II Trial of Bryostatín 1 in Patients with Relapse Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia, ("Ensayo de fase II de briostatina-1 en pacientes con linfoma no Hodgkin de grado bajo de recaída y leucemia linfocítica crónica"), Varterasian y otros, Clinical Cancer Research, volumen 6, pág. 825-28 (2000); y Review Article: Chemistry and Clinical Biology of the Bryostatins, ("Artículo de revisión: química y biología clínica de las briostatinas"), Mutter y otros, Bioorganic & Medicinal Chemistry 8, pág. 1841-1860 (2000).

Las lactonas macrocíclicas, incluyendo las de clase briostatina, representan compuestos conocidos derivados originalmente de *Bigula neritina* L. Aunque se conocen múltiples usos para las lactonas macrocíclicas, en particular las de la clase briostatina, la relación entre las lactonas macrocíclicas y el aumento de la cognición era previamente desconocida.

Entre los ejemplos de los compuestos que pueden utilizarse en la presente invención se incluyen las lactonas macrocíclicas (de briostatina-1 a briostatina-18).

También se entenderá por un experto en la materia, que los compuestos de lactonas macrocíclicas y sus derivados, en particular de la clase briostatina, son susceptibles de técnicas de síntesis combinatoria y, de este modo, se pueden generar bibliotecas de compuestos para optimizar los parámetros farmacológicos, incluyendo, pero sin limitarse a éstos, la eficacia y la seguridad de las composiciones. Además, estas bibliotecas pueden someterse a ensayos para determinar qué miembros modulan preferentemente la α -secretasa y/o la PKC.

El cribado de alto rendimiento para bibliotecas combinatorias de productos naturales y caldos de fermentación ha dado lugar al descubrimiento de varios nuevos fármacos. En la actualidad, se está utilizando ampliamente la generación y el cribado de diversidad química como una técnica principal para el descubrimiento de compuestos líderes y esto es ciertamente un avance fundamental importante en el área del descubrimiento de fármacos. Además, incluso después de que se haya descubierto un compuesto "líder", las técnicas combinatorias proporcionan una herramienta valiosa para la optimización de la actividad biológica deseada. Tal como se entenderá, las reacciones en cuestión se prestan fácilmente a la creación de bibliotecas combinatorias de compuestos para el cribado de la actividad de tipo farmacéutico u otra actividad de tipo biológico o médico o cualidades relacionadas con materiales farmacéuticos, o de tipo biológico o médico. Una biblioteca combinatoria para los propósitos de la presente invención es una mezcla de compuestos químicamente relacionados, que pueden cribarse juntos para una propiedad deseada; dichas bibliotecas pueden estar en solución o unidas covalentemente a un soporte sólido. La preparación de muchos compuestos relacionados en una única reacción reduce y simplifica ampliamente el número de procesos de cribado que deben llevarse a cabo. El cribado de la propiedad biológica apropiada puede realizarse mediante procedimientos convencionales. De este modo, la presente invención también da a conocer procedimientos para determinar la capacidad de uno o más compuestos de la invención para unirse para modular de manera eficaz la α -secretasa y/o la PKC.

Están disponibles en la técnica una variedad de técnicas para la generación de bibliotecas combinatorias que se describen a continuación. Véase, por ejemplo, Blondelle y otros (1995) Trends Anal. Chem. 14: 83; las patentes de Estados Unidos de Affymax 5.359.115 y 5.362.899; la patente de Estados Unidos de Ellman 5.288.514; la publicación de PCT de Still y otros WO 94/08051; Chen y otros (1994) JACS 116: 266 1; Kerr y otros (1993) JACS 115: 252; publicaciones de PCT W092/10092, W093/09668 y W091/07087; y la publicación de PCT de Lemer y otros W093/20242). Por consiguiente, se pueden sintetizar una variedad de bibliotecas del orden de aproximadamente 16 a 1.000.000 o más diversómeros y se pueden cribar para una actividad o propiedad particular.

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar mediante una variedad de vías y en una variedad de formas de dosificación, que incluyen para administración oral, rectal, parenteral (tal como subcutánea, intramuscular e intravenosa), epidural, intratecal, intraarticular, tópica y bucal. El intervalo de la dosis para seres humanos adultos dependerá de un conjunto de factores, que incluyen la edad, el peso y el estado del paciente y la vía de administración.

Para la administración oral, los polvos finos o gránulos que contienen agentes diluyentes, dispersantes y/o surfactantes se pueden presentar en una dosis sólida, en agua o en un jarabe, en cápsulas o sobrecitos en estado seco, en una suspensión no acuosa, en la que pueden incluirse agentes de suspensión, o en una suspensión en agua o en un jarabe. Cuando sea deseable o necesario, se pueden incluir agentes aromatizantes, conservantes, de suspensión, espesantes o emulsionantes.

Otros compuestos que pueden incluirse mediante mezcla son, por ejemplo, ingredientes médicamente inertes, por ejemplo, un diluyente sólido y líquido, tal como lactosa, dextrosa, sacarosa, celulosa, almidón o fosfato de calcio, para comprimidos o cápsulas, aceite de oliva u oleato de etilo para cápsulas blandas y agua o aceite vegetal para

suspensiones o emulsiones; agentes lubricantes, tales como sílice, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio o calcio y/o polietilenglicoles; agentes de gelificación, tales como arcillas coloidales; agentes espesantes, tales como goma tragacanto o alginato de sodio, agentes aglutinantes, tales como almidones, gomas arábicas, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o polivinilpirrolidona; agentes disgregantes, tales como almidón, ácido algínico, alginatos o glicolato sódico de almidón; mezclas efervescentes; colorante; edulcorantes; agentes humectantes, tales como lecitina, polisorbatos o laurilsulfatos; y otros ingredientes accesorios terapéuticamente aceptables, tales como humectantes, conservantes, tampones y antioxidantes, que son aditivos conocidos para dichas formulaciones.

Las dispersiones líquidas para administración oral pueden ser jarabes, emulsiones o suspensiones. Los jarabes pueden contener como portador, por ejemplo, sacarosa o sacarosa con glicerol y/o manitol y/o sorbitol. En particular, un jarabe para pacientes diabéticos puede contener como portadores sólo productos, por ejemplo, sorbitol, que no metabolizan a glucosa o que metabolizan sólo una cantidad muy pequeña a glucosa. Las suspensiones y las emulsiones pueden contener un portador, por ejemplo, una goma natural, agar, alginato de sodio, pectina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o alcohol polivinílico.

Las suspensiones o soluciones para inyección intramuscular pueden contener, junto con el compuesto activo, un portador farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril, aceite de oliva, oleato de etilo, glicoles, tales como propilenglicol y, si se desea, una cantidad adecuada de clorhidrato de lidocaína. Las soluciones para inyección o infusión intravenosa pueden contener un portador, por ejemplo, agua estéril que, en general, es agua para inyección. De manera preferente, sin embargo, pueden tener la forma de una solución salina estéril, acuosa, isotónica. Alternativamente, los compuestos de la presente invención pueden estar encapsulados dentro de liposomas. Los compuestos de la presente invención también pueden utilizar otros sistemas de liberación de agentes activos conocidos.

Los compuestos de la presente invención también se pueden administrar en forma pura no asociada con otros aditivos, en cuyo caso una cápsula, un sobrecito o un comprimido son la forma de dosificación preferente.

Los comprimidos y otras formas de presentación proporcionadas en unidades discretas contienen, convenientemente, una dosis diaria, o una fracción apropiada de la misma, de uno de los compuestos de la presente invención. Por ejemplo, las unidades pueden contener de 5 mg a 500 mg, pero más normalmente, de 10 mg a 250 mg, de uno de los compuestos de la presente invención.

Se apreciará que la actividad farmacológica de las composiciones de la presente invención puede demostrarse utilizando modelos farmacológicos estándar que son conocidos en la técnica. Además, se entenderá que las composiciones de la invención se pueden incorporar o encapsular en una matriz de polímero adecuado o membrana para la liberación específica de sitio, o se pueden funcionalizar con agentes de reconocimiento específicos capaces de efectuar la liberación específica de sitio. Estas técnicas, así como otras técnicas de liberación de fármacos, son bien conocidas en el sector.

La presente invención se describirá a continuación por medio de ejemplos que pretenden ilustrar el alcance de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo I:

Materiales y procedimientos

Cultivo de células

Se obtuvieron fibroblastos de piel cultivados de Coriell Cell Repositories y se cultivaron utilizando las directrices generales establecidas para su cultivo con ligeras modificaciones (Cristofalo y Carpentier, 1988; Hirashima y otros, 1996). El medio de cultivo en el que se cultivaron las células fue medio de Eagle modificado por Dulbecco (GIBCO) suplementado con suero fetal de ternero al 10% (Biofluids, Inc.). Se utilizaron fibroblastos de líneas celulares de control (AC), casos AG07141 y AG06241, y un caso de EA familiar (EAF) (AG06848).

Activadores de la PKC

Las diferentes distribuciones en los tejidos, las funciones aparentemente distintivas de diferentes isoenzimas y la implicación diferencial en la patología hacen que sea importante utilizar herramientas farmacológicas que son capaces de reconocer, de manera preferente, isoenzimas específicas (Kozikowski y otros, 1997; Hofmann, 1997). Investigaciones recientes en el campo de la química medicinal han dado lugar al desarrollo de varios activadores de la PKC, por ejemplo, diferentes benzolactamas y piroolidinonas. Sin embargo, el activador de la PKC, briostatina, estudiado actualmente no sólo tiene la ventaja de proporcionar una actividad iso-específica, sino que tampoco sufre los problemas de los activadores de la PKC utilizados anteriormente, tales como ser inductores de tumores. La briostatina compite por el dominio regulador de la PKC y se implica en interacciones de puentes de hidrógeno muy

específicas dentro de este sitio. En la bibliografía se puede encontrar Información adicional sobre la química orgánica y el modelado molecular de este compuesto.

Tratamiento

5 Las células se cultivaron hasta la confluencia en placas de Petri de 6 cm durante 5-7 días. En el día del experimento, el medio se reemplazó por DMEM sin suero y se dejó en reposo durante 2 horas. Tras completar la privación de suero durante 2 horas, se consiguió el tratamiento mediante la aplicación directa al medio de briostatina, BL y DMSO a las concentraciones apropiadas. El DMSO fue inferior al 1% en todos los casos. En la mayoría de los casos, se recogió el medio y se procesó después de 3 horas de tratamiento para la secreción de sAPP. También se utilizaron otros puntos temporales para establecer una evolución temporal de la secreción.

Ensayo de inmunotransferencia

15 Los experimentos de inmunotransferencia se llevaron a cabo utilizando procedimientos bien establecidos (Dunbar, 1994). Las células se cultivaron hasta la confluencia (~90%) en placas de Petri de 6 cm. Se cuantificaron los niveles de isoenzima en respuesta al tratamiento con briostatina-1 0,1 nM durante 5, 30, 60 y 120 minutos utilizando procedimientos ligeramente modificados a partir de los establecidos por Racchi y otros, (1994). Los fibroblastos se lavaron dos veces con PBS enfriado en hielo, se rasparon en PBS y se recogieron mediante centrifugación a baja velocidad. Los residuos se resuspendieron en el siguiente tampón de homogeneización: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, DTT 5 mM, sacarosa 0,32 M y un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma). Se obtuvieron homogeneizados mediante tratamiento con ultrasonidos y se centrifugaron a ~12.000 g durante 20 minutos, y se utilizaron los sobrenadantes como la fracción citosólica. Los residuos se homogeneizaron en el mismo tampón que contenía Triton X-100 al 1,0%, se incubaron en hielo durante 45 minutos y se centrifugaron a ~12.000 g durante 20 minutos. El sobrenadante de este lote se utilizó como la fracción membranosa. Después de la determinación de proteínas, se diluyeron 20 µg de proteína en 2 veces tampón de muestra de electroforesis (Novex), se pusieron a ebullición durante 5 minutos, se desarrollaron sobre un gel de acrilamida al 10% y se transfirieron electroforéticamente a una membrana de PVDF. La membrana se saturó con un bloqueador de la leche al 5% mediante su incubación a temperatura ambiente durante una hora. El anticuerpo primario para la isoforma de la PKC (Transduction Laboratories) se diluyó (1:1000) en solución de bloqueo y se incubó con la membrana durante una noche a 4°C. Después de la incubación con el anticuerpo secundario, IgG antirratón de fosfatasa alcalina (Vector Laboratories), se reveló la membrana utilizando un sustrato quimioluminiscente (Vector Laboratories), según las instrucciones del fabricante. Las intensidades de las bandas se cuantificaron por densitometría utilizando un densitómetro de barrido calibrado BioRad GS-800 y software MultiAnalyst (BioRad).

Determinaciones de sAPP

La concentración de APP secretada se midió utilizando técnicas de inmunotransferencia convencionales, con modificaciones menores del protocolo. Los extractos de proteína precipitada de cada placa/tratamiento se cargaron sobre minigeles de acrilamida Tris HCl al 10% recién preparados y se separaron mediante SDPAGE. El volumen de muestra cargada se corrigió para la proteína celular total por placa. A continuación, las proteínas se transfirieron electroforéticamente a membranas de PVDF. Las membranas se saturaron con leche descremada en polvo al 5% para bloquear la unión no específica. Las membranas bloqueadas se incubaron durante una noche a 4°C con el anticuerpo 6E10 disponible en el mercado (1:500), que reconoce sAPP-alfa en el medio acondicionado (SENETEK). Después del lavado, las membranas se incubaron a temperatura ambiente con anticuerpo secundario IgG antirratón conjugado a peroxidasa de rábano picante (Jackson's Laboratories). A continuación, se detectó la señal utilizando quimioluminiscencia aumentada, seguido de la exposición de Hyperfilm ECL (Amersham). Las intensidades de las bandas se cuantificaron mediante densitometría utilizando un densitómetro de barrido calibrado BioRad GS-800 y el software MultiAnalyst (BioRad).

50 Tal como se muestra en la figura 7, la briostatina-1 provoca una respuesta potente, lo que demuestra la activación de la PKC. Debe indicarse que la activación de la PKC es fácilmente detectable 30 minutos después de la liberación, después de una dosis de tan sólo 0,1 nM de briostatina-1.

55 También es interesante considerar los datos en relación con el metabolismo de la APP y los efectos de sus subproductos. Los estudios han demostrado que la activación de la PKC aumenta la cantidad de la proporción de fragmentos secretados no amiloidogénicos (APP soluble, presumiblemente producto de la secretasa) frente a fragmentos secretados amiloidogénicos (Aβ1-40 y/o Aβ1-42) (Buxbaum y otros, 1990; Gillespie y otros, 1992; Selkoe, 1994). Sin desear estar ligado con esta teoría, se podría especular que las células de la EA con baja PKC tendrían una secreción alterada de sAPP y/o tendrían una mayor proporción de fragmentos amiloidogénicos. De hecho, hay pruebas de que algunas líneas celulares de la EA muestran una PKC defectuosa y una secreción de sAPP alterada (Bergamaschi y otros, 1995; Govoni y otros, 1996). Además, se ha observado que la β-amiloide induce un defecto de los canales de K⁺ como en la EA en los fibroblastos (Etcheberrigaray y otros, 1994) y bloquea las corrientes de K⁺ en neuronas cultivadas (Good y otros, 1996). Por lo tanto, se sugiere una unión mecanicista, de manera que un defecto de la PKC específica de isoenzima puede conducir a un procesamiento anormal de APP que, entre otros posibles efectos perjudiciales, altera la función de los canales de K⁺. Datos preliminares recientes

también sugieren que, quizás a la manera de un círculo vicioso, la β -amiloide provoca a su vez una reducción de la PKC (Favit y otros, 1997).

En resumen, los datos sugieren que la estrategia de regular positivamente la función de la PKC dirigiendo isoenzimas específicas aumenta la producción de sAPP. Estos estudios y dicho modelo de fibroblastos podrían ampliarse y utilizarse como herramientas para controlar el efecto de compuestos (briostatina, por ejemplo) que alteran posibles procesos patológicos subyacentes. Además, un experto en la materia sabría cómo ensayar adicionalmente estas muestras a través de la obtención de imágenes de Ca^{2+} y electrofisiología. Dichos compuestos podrían utilizarse entonces como bases para el diseño racional de agentes farmacológicos para este trastorno.

Ejemplo II

El efecto de los activadores de la PKC sobre la cognición se demostró mediante el paradigma del laberinto de agua de Morris. En el presente ejemplo, a las ratas se les inyectó por vía intraventricular briostatina-1 y se entrenaron durante 4 días (siguiendo protocolos estándar). Se evaluó la retención en el quinto día. El aprendizaje se midió como la reducción de la latencia de escape de ensayo a ensayo, que fue significativamente menor en los animales tratados. La adquisición de memoria se midió como el tiempo empleado en el cuadrante correspondiente (día 54). La memoria o retención aumentó significativamente en los animales tratados en comparación con los animales de inyección simulada (véanse las figura 4 a 5(a)-5(c)). Las ratas tratadas con briostatina-1 mostraron una cognición mejorada respecto a las ratas de control en 2 días de tratamiento (véase la figura 4). La briostatina es capaz de utilizarse en concentraciones para mejorar la cognición que son de 300 a 300.000 veces menores que la concentración utilizada para tratar tumores. El ejemplo anterior muestra, además, que la capacidad cognitiva se puede mejorar en sujetos no enfermos en comparación con otros sujetos no enfermos a través de la administración de briostatina-1.

Debido a los estudios de seguridad, toxicología y estudios clínicos en fase II realizados anteriormente para el cáncer, se puede concluir que la utilización de activadores de la PKC, en particular briostatina-1, sería vista como segura y que los estudios de fase II para el tratamiento de la EA/mejora cognitiva podrían acelerarse. Además, la naturaleza lipófila de la briostatina-1 proporciona un mayor transporte a través de la barrera hematoencefálica. La presente invención permitiría la administración intravenosa, oral, intraventricular y otras vías de administración conocidas.

El ensayo de los experimentos de secreción de sAPP, los experimentos de activación de la PKC y los experimentos de comportamiento en animales han demostrado que se produce el aumento de la secreción de sAPP después del aumento de la activación de la PKC y da lugar a la mejora de la cognición en estudios de comportamiento en animales.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Activador de la PKC (proteína quinasa C) para utilizar en la mejora de la capacidad cognitiva en enfermedades o trastornos neurológicos, en el que el activador de la PKC es de briostatina-1 a briostatina-18 utilizado en una cantidad eficaz para mejorar la capacidad cognitiva y reducir los fragmentos amiloidogénicos y tóxicos A β -40 y A β -42.
- 10 2. Activador de la PKC, briostatina-1 a briostatina-18, para utilizar, según la reivindicación 1, en el que se utiliza, además, un portador farmacéuticamente aceptable.
- 15 3. Activador de la PKC, briostatina-1 a briostatina-18, para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la capacidad cognitiva mejorada es el aprendizaje, la memoria o la atención.
- 20 4. Activador de la PKC, briostatina-1 a briostatina-18, para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enfermedad neurológica, es la enfermedad de Alzheimer, la demencia multiinfarto y la variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer con o sin asociación con la enfermedad de Parkinson; la enfermedad de Creutzfeld-Jakob, el trastorno de Korsakow o el trastorno por déficit de atención por hiperactividad.
5. Activador de la PKC, briostatina-1 a briostatina-18, para utilizar, según la reivindicación 4, en el que la enfermedad neurológica es la enfermedad de Alzheimer.

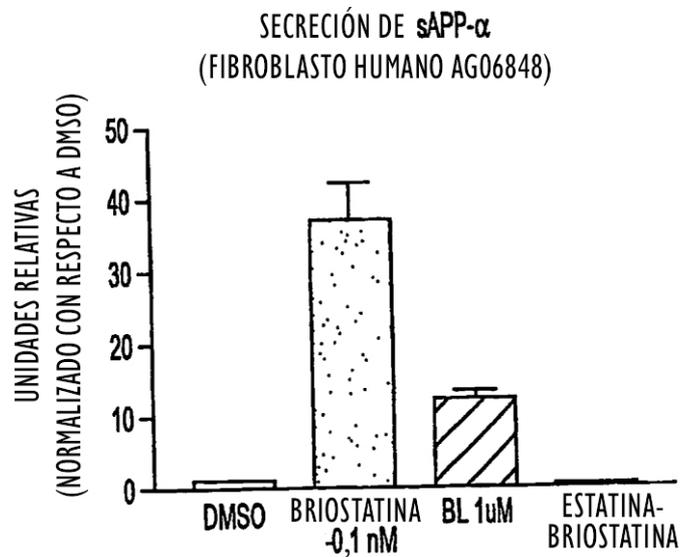


FIG. 1

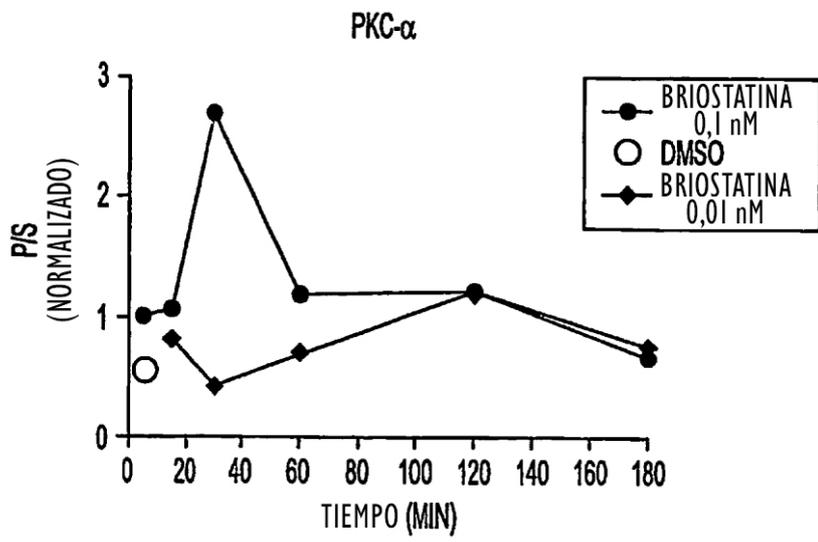


FIG. 2

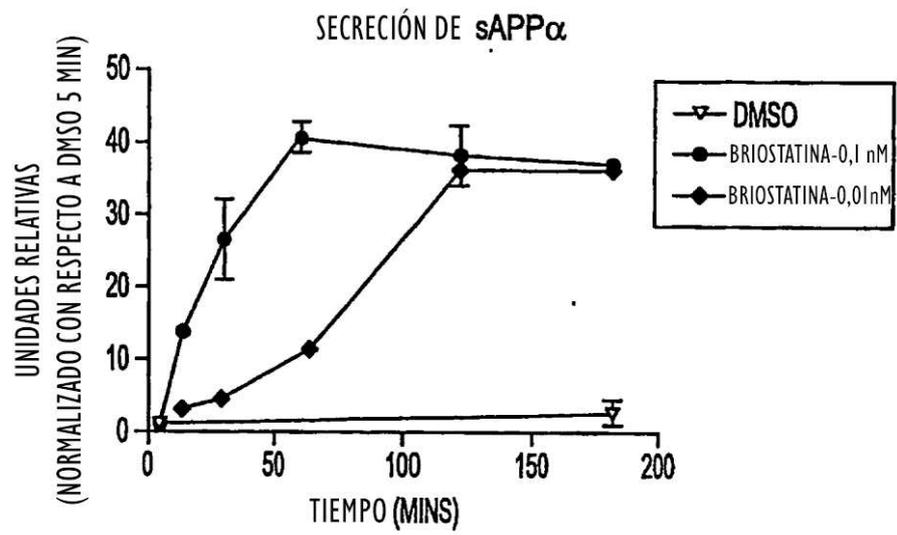
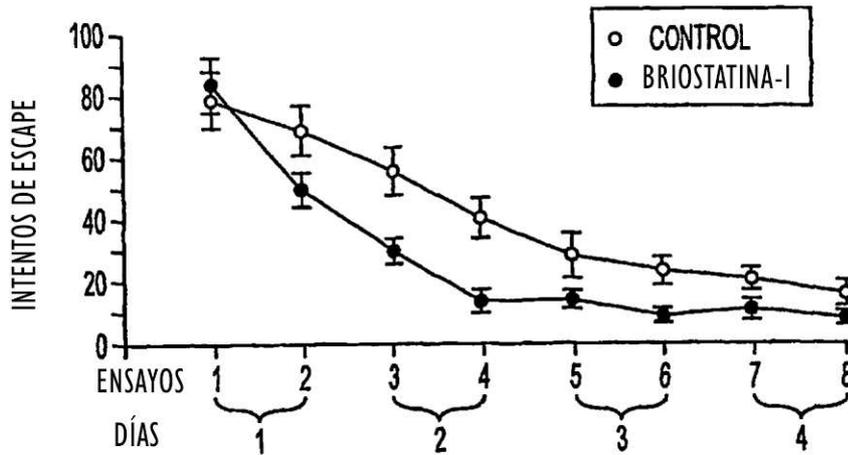


FIG. 3



BRIOSTATINA-1 (i.c.v.; $1 \mu\text{l}$ / SITIO DE SOLUCIÓN $2 \mu\text{M}$; $\sim 0,5\text{H}$ ANTES DE LOS 1º Y 5º ENSAYOS DE ENTRENAMIENTO);
10 RATAS/GRUPO.

FIG. 4

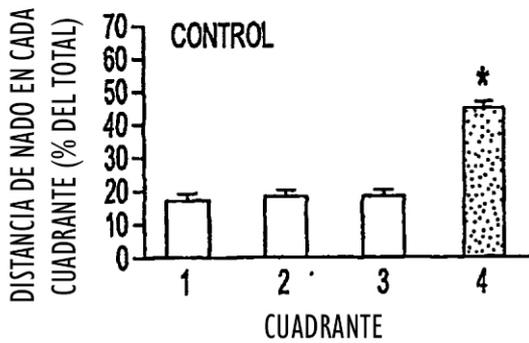


FIG. 5A

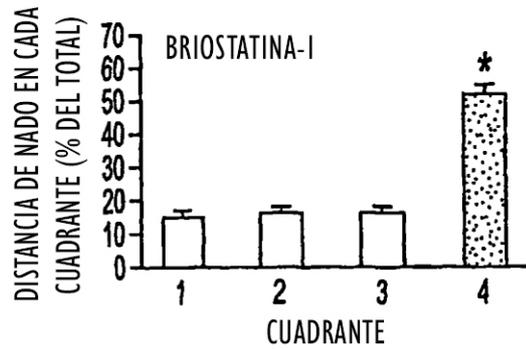


FIG. 5B

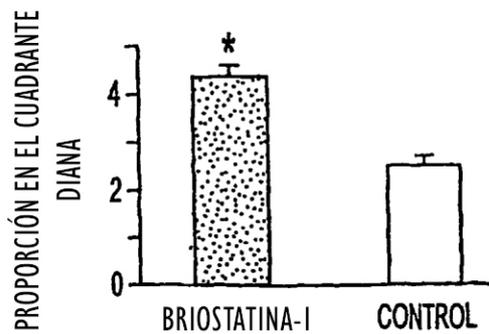


FIG. 5C

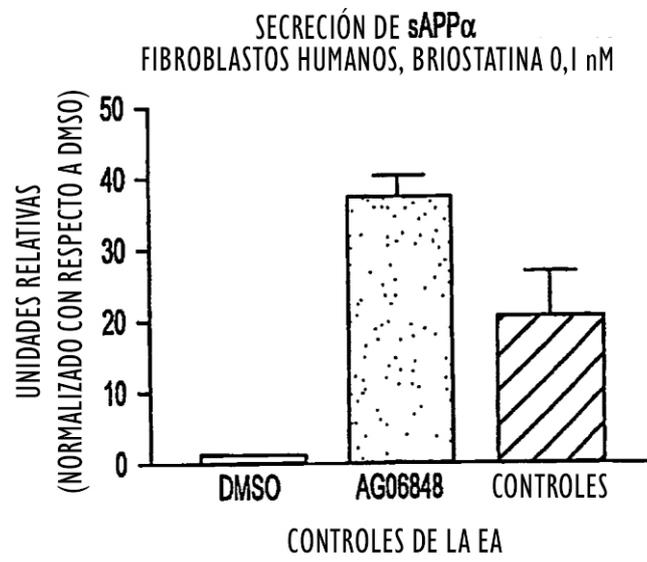


FIG. 6

