

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
8 de Febrero de 2007 (08.02.2007)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2007/014970 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 33/24 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
A61P 25/18 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2006/000442

(22) Fecha de presentación internacional:
28 de Julio de 2006 (28.07.2006)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200501941 29 de Julio de 2005 (29.07.2005) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo
US): **UNIVERSIDAD DE BARCELONA** [ES/ES];
Centro de Patentes de la UB, Baldiri Reixac, 4, E-08028
Barcelona (ES). **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTI-
GACIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; C/ Serrano 113,
E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **GUINO-
VART CIRERA, Joan Josep** [ES/ES]; C/ Portella, 19,
E-430003 Tarragona (ES). **ÁVILA DE GRADO, Jesús**
[ES/ES]; CBM-SO, Fac. de Ciencias, Módulo CV. Lab
119, E-28049 Madrid (ES). **DOMÍNGUEZ REYES,
Jorge** [ES/ES]; C / Bac de Roda, 6, 2ª, E-08019
Barcelona (ES). **GOMIS DE BARBARÁ, Ramón**
[ES/ES]; C/ L'Avenir, 35, 1º 2ª, E-08021 Barcelona (ES).
GÓMEZ RAMOS, Alberto [ES/ES]; CBM-SO, Fac. de
Ciencias, Módulo CV, Lab 119, E-28049 Barcelona (ES).
ZAFRA LÓPEZ, Delia [ES/ES]; Passeig de Valldaura

158-B 7-3, E-08042 Barcelona (ES). **COROMINOLA
OCAÑA, Helena** [ES/ES]; C /Berruguete 100, 3ª,
E-08035 Barcelona (ES).

(74) Mandatario: **SEGURA CÁMARA, Pascual**; Centro de
Patentes de la UB, C/ Baldiri Reixac, 4, E-08028 Barcelona
(ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,
RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivin-
dicaciones y para ser republicada si se reciben modifica-
ciones

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS COMPRISING A TUNGSTEN SALT (VI) FOR THE TREATMENT OF
NEURODEGENERATIVE DISORDERS, PARTICULARLY ALZHEIMER'S DISEASE AND SCHIZOPHRENIA

(54) Título: COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE COMPRENDEN UNA SAL DE TUNGSTENO (VI) PARA EL TRA-
TAMIENTO DE TRASTORNOS NEURODEGENERATIVOS, EN PARTICULAR ALZHEIMER Y ESQUIZOFRENIA

(57) Abstract: The invention relates to pharmaceutical compositions for the treatment of neurodegenerative disorders, comprising
an effective quantity of a tungsten compound (VI), preferably a tungstate salt and more preferably sodium tungstate (Na₂WO₄). The
inventive pharmaceutical compositions can be used for the prophylactic and/or therapeutic treatment of neurodegenerative disorders
in mammals, including humans, and, in particular, for the prophylactic and/or therapeutic treatment of Alzheimer's disease and
schizophrenia. The effect of sodium tungstate dihydrate in tau phosphorylation was assessed using a model of insulin-resistant mice
and a Type 1 diabetes model. The therapeutic treatment of tauopathies that derive from said invention affords numerous advantages:
GSK3 inhibition, specificity owing to a reduction in abnormal tau hyperphosphorylation caused by a specific neural protein, efficacy,
absence of toxicity, and low price.

(57) Resumen: Composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad efectiva de un compuesto de tungsteno (VI), prefe-
riblemente una sal de tungstato, y más preferiblemente tungstato sódico (Na₂WO₄), son útiles para el tratamiento profiláctico y/o
terapéutico de trastornos neurodegenerativos en un mamífero, incluyendo un humano, en particular, para el tratamiento profiláctico
y/o terapéutico de la enfermedad de Alzheimer o de la esquizofrenia. Se evaluó el efecto del tungstato sódico dihidrato en la fosfo-
rilación de tau en un modelo de ratas resistentes a la insulina y en un modelo de diabetes de Tipo-1. El tratamiento terapéutico de
tauopatías que derivan de esta invención implica varias ventajas: éste inhibe GSK3; especificidad ya que reduce la hiperfosforilación
anormal de tau, una proteína específica neural; eficacia; ausencia de toxicidad; y bajo precio.

WO 2007/014970 A1

Composiciones farmacéuticas que comprenden una sal de tungsteno (VI) para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, en particular Alzheimer y esquizofrenia.

La invención se refiere al uso de composiciones farmacéuticas que
5 comprenden compuestos de tungsteno (VI) para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, en particular, la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías, es decir, trastornos neurodegenerativos que implican deposición anormal de la proteína tau en sus diferentes isoformas, en el cerebro, y también para la esquizofrenia.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

Los trastornos neurodegenerativos se pueden definir como trastornos crónicos y progresivos del sistema nervioso que afectan las funciones
15 neurológicas y de comportamiento, que comienzan con cambios bioquímicos específicos que conducen en última instancia a los diferentes síndromes clínicos e histopatológicos. Entre estos trastornos están la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Parkinson.

20 La enfermedad de Alzheimer es la forma más común de demencia entre la gente anciana, que implica las partes del cerebro que controlan el pensamiento, memoria y lenguaje. Se caracteriza por dos signos patológicos principales: placas amiloides y haces neurofibrilares (neurofibrillary tangles, NFT), además de pérdida de células neuronales en regiones específicas del
25 cerebro. El β -amiloide se origina a partir de la fragmentación de una proteína llamada proteína precursora del amiloide (APP). En un cerebro sano, estos fragmentos de proteína son degradados y eliminados. En la enfermedad de Alzheimer, estos fragmentos se acumulan para formar estructuras insolubles denominadas placas de amiloide. Los NFTs consisten en fibras entrelazadas
30 que se encuentran dentro de las neuronas. Principalmente están compuestas de la proteína específica de neuronas denominada tau, que forma parte de estructuras subcelulares llamadas microtúbulos. Los microtúbulos son uno de los componentes del citoesqueleto celular y están implicados en varias funciones tales como el transporte intracelular y la generación de asimetría.
35 La principal función de la proteína tau es estabilizar los microtúbulos. En la enfermedad de Alzheimer y también en otras tauopatías, la proteína tau muestra algunas aberraciones bioquímicas, de las cuales la hiperfosforilación

es la más sobresaliente. Como consecuencia la proteína tau se agrega, los microtúbulos se desestabilizan y, por consiguiente, la función neuronal se compromete.

- 5 La fosforilación de proteínas es un mecanismo regulatorio post-traducciona
utilizado por las células para modular enzimas y proteínas estructurales. La
fosforilación y de-fosforilación de la proteína tau en los residuos treonina y
serina se controla por varias proteína-quinasas y proteína-fosfatasas. Una de
10 las proteína-quinasas que fosforilan tau es la glucógeno sintasa quinasa-3
(GSK3). GSK3 es el principal enzima implicado en el proceso de
hiperfosforilación anormal de la proteína tau, y se sobreexpresa en los
cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer así como en
pacientes con otras tauopatías. Se ha propuesto que los inhibidores
farmacológicos de la fosforilación de la proteína tau, específicamente los
15 inhibidores de GSK3 selectivos, podrían usarse para tratar la enfermedad de
Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas.

- Se conocen varios inhibidores de GSK3, pero los efectos secundarios
asociados a la toxicidad y los problemas relativos a absorción, distribución,
20 metabolismo y excreción de los inhibidores conocidos, afectan a su potencial
clínico (cfr. "Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3",
Laurent Meijer et al., Trends in Pharmacological Sciences 2004, vol. 25, No.
9, pp. 471-480).

- 25 Algunas de las claves más importantes para el desarrollo de inhibidores de
GSK3 para el tratamiento efectivo de la enfermedad de Alzheimer y otras
tauopatías son la posesión de inhibidores selectivos de esta quinasa que en
primer lugar no interfieran con otros procesos de señalización celular, lo que
significaría que no tendrían efectos adversos, por otro lado deberían ser
30 capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y tener potencia in vivo.

- Los cambios en la regulación de la actividad GSK3 también se han asociado
a la esquizofrenia (cf. E.S: Emamian et al., Nat. Genet., 2004, vol. 36, pp.131-
7). Según J.A. Lieberman, la esquizofrenia claramente satisface muchos de
35 los criterios que definen los trastornos neurodegenerativos (cf. J.A.
Lieberman, Biological Psychiatry, 1999, vol. 46, pp. 729-739). También se
han descrito pruebas directas e indirectas de que el curso progresivo de la

esquizofrenia está asociado a procesos neurodegenerativos en curso (cf. P.C. Ashe y otros., Prog. Neuro-Biol. Psychiat. & Biol. Psychiat 2001, vol.25, pp.691-707).

- 5 A pesar de todos los esfuerzos en investigación invertidos en el pasado, el tratamiento y/o prevención de trastornos neurodegenerativos tales como la enfermedad de Alzheimer o la esquizofrenia están lejos de ser satisfactorios. Por lo tanto, el proporcionar compuestos para el tratamiento de alteraciones patológicas en sistemas neuronales relacionados con la fosforilación de tau, 10 tales como la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías, así como para el tratamiento de la esquizofrenia, en humanos, es de gran importancia.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- 15 Los inventores han encontrado que los compuestos de tungsteno (VI) inhiben GSK3 en células neurales tanto en sistemas de cultivo de células como in vivo. La principal consecuencia de esta inhibición es una reducción significativa en la fosforilación dependiente de GSK3 de la proteína asociada a microtúbulos denominada tau. Así, dado que los compuestos de tungsteno 20 (VI) contribuyen a la inactivación de GSK3, el uso de estos compuestos representa una nueva aproximación terapéutica para tratar la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías, y también para el tratamiento de la esquizofrenia.
- 25 El tungstato sódico es un agente anti-diabético y anti-obesidad en varios modelos de animales. Este compuesto muestra un perfil de toxicidad bajo y en la actualidad han finalizado los ensayos clínicos de Fase I. EP 1.400.246-A describe una composición farmacéutica de un compuesto de tungsteno (VI) para disminuir la glicemia en humanos que sufren de diabetes mellitus de 30 Tipo 1 (IDDM) o de Tipo 2 (NIDDM). EP 755.681-A enseña que los compuestos de tungsteno (VI) también son eficientes para el tratamiento de la obesidad/sobrepeso en humanos no diabéticos. Sin embargo, los compuestos de tungsteno (VI) nunca se han propuesto para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o de cualquier tauopatía, o de la esquizofrenia.
- 35 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de trastornos

neurodegenerativos, en un mamífero, incluyendo un humano, tales como la esquizofrenia o tauopatías tales como la enfermedad de Alzheimer, demencia frontotemporal con parkinsonismo asociado al cromosoma 17, parálisis supranuclear progresiva, esclerosis lateral

- 5 amiotrófica/parkinsonismo-demencia compleja de Guam, enfermedad de Pick, degeneración corticobasal, y argirofilia granulosa. Dicha composición comprende una cantidad efectiva de un compuesto formado por tungsteno (VI) y una parte química aceptable farmacéuticamente, o de un solvato de dicho compuesto, en combinación con excipientes farmacéuticamente
10 aceptables o portadores.

- En el contexto de esta invención, la expresión "un compuesto formado por tungsteno (VI) y una parte química (chemical moiety, en inglés) farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquier entidad química
15 formada por uno o varios átomos de tungsteno en su estado de oxidación 6+, que está unida a una estructura química farmacéuticamente aceptable por sí misma. El catión W^{6+} no ha sido ni observado ni aislado, y siempre se encuentra acompañado de una parte química parcialmente formada por una esfera de coordinación alrededor del átomo de W(VI). La esfera de
20 coordinación puede estar formada por ligandos inorgánicos (óxido, hidróxido, peróxido, fosfato, etc.) como, por ejemplo, en el caso del anión tungstato (con una esfera de coordinación formada por cuatro iones óxido), o en el caso de los peroxitungstatos (con esferas de coordinación formadas por mezclas de iones óxido y peróxido). La esfera de coordinación también puede estar
25 formada por ligandos orgánicos que sean moléculas o iones unidos al átomo de W(VI) a través de átomos de O, S o N pertenecientes a diferentes compuestos orgánicos farmacéuticamente aceptables (p.ej. alcoholes farmacéuticamente aceptables, tioles, ácidos carboxílicos, aminas, aminoácidos, heterociclos nitrogenados, etc.). También son posibles esferas
30 de coordinación mixtas inorgánicas/orgánicas. Cuando la estructura formada por el átomo de W(VI) y su esfera de coordinación no es neutra, el término "parte química" también incluye a cualquier especie iónica farmacéuticamente aceptable que neutralice al compuesto de tungsteno (VI) en su totalidad. Por ejemplo, el anión tungstato está siempre acompañado por un catión (p.ej.
35 sodio, potasio, magnesio, calcio), formando una sal neutra de tungstato. El ión tungstato origina una serie de isopolitungstatos (paratungstatos, metatungstatos, etc.) que difieren en el grado de agregación; su uso también

se contempla en esta invención. Son comunes los solvatos de los compuestos de tungsteno (VI) (p.ej. el dihidrato del tungstato sódico), y su uso también se considera parte de esta invención.

- 5 En una realización preferida, el compuesto de tungsteno (VI) en la composición farmacéutica es una sal de tungstato. Especialmente preferidas son las sales de especies catiónicas seleccionadas del grupo formado por los cationes sodio, potasio, magnesio y calcio. Los compuestos de tungsteno (VI) más preferidos son el tungstato sódico y su dihidrato. Este último es disponible
10 comercialmente. El tungstato sódico dihidrato es una sal blanca, inolora con textura fina y cristalina, y se disuelve fácilmente en agua.

- El producto puede administrarse oralmente en cualquier forma galénica convencional, siendo el comprimido la forma preferida. Este sistema ha sido
15 utilizado en humanos inscritos en ensayos clínicos de Fase I de este compuesto para el tratamiento de la obesidad/sobrepeso en humanos no diabéticos (EP 755.681-A) .

- Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto
20 formado por tungsteno (VI) y una parte química farmacéuticamente aceptable, o de un solvato de dicho compuesto, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de un trastorno neurodegenerativo en un mamífero, incluyendo un humano. En una realización particular el trastorno neurodegenerativo es una tauopatía
25 tal como la enfermedad de Alzheimer, demencia frontotemporal con parkinsonismo asociado al cromosoma 17, parálisis supranuclear progresiva, esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia compleja de Guam, enfermedad de Pick, degeneración corticobasal, y Argirofilia granulosa. En otra realización particular el trastorno neurodegenerativo es la esquizofrenia.

- 30 La invención también se refiere a un método de tratamiento y/o profilaxis de un mamífero, incluyendo un humano, que sufre o es susceptible de sufrir trastornos neurodegenerativos tales como los mencionados previamente, en particular la enfermedad de Alzheimer o la esquizofrenia, dicho método
35 comprende la administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto formado por tungsteno (VI) y una parte química aceptable farmacéuticamente, o un solvato de dicho

compuesto, en combinación con excipientes farmacéuticamente aceptables o portadores.

El tratamiento terapéutico de tauopatías que se deriva de esta invención es una aproximación nueva y, respecto a los tratamientos propuestos previamente en la técnica, éste implica varias ventajas destacables: éste inhibe a GSK3; especificidad, reduce la hiperfosforilación anormal de tau; eficacia, ejerce su acción a corto plazo; falta de toxicidad, se han hecho los ensayos clínicos de Fase I; y bajo precio.

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. El resumen de esta solicitud se incorpora aquí como referencia. 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 se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1 es una ilustración gráfica del efecto de tungstato en GSK3- β y en la fosforilación de tau en células neuroblastoma SH-SY5Y.

FIG. 2 es una ilustración gráfica del efecto de tungstato en la fosforilación de tau en cerebros de ratas sanas y de ratas resistentes a la insulina.

FIG. 3 es una ilustración gráfica del efecto de tungstato en la fosforilación de tau en cerebros de ratas diabéticas por inyección de estreptozotocina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES PARTICULARES

Descripción detallada de las figuras

Los resultados se muestran, en parte de forma gráfica en las figuras adjuntas:

En la FIG. 1 se muestra el efecto del tungstato (W) en la fosforilación de GSK3- β y tau en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y. Los datos corresponden a las medias y las barras de error representan la desviación estandard obtenida a partir de tres experimentos independientes. A) Células de neuroblastoma SH-SY5Y fueron incubadas durante 10 minutos en presencia (+) o ausencia (-) de 1 mM tungstato sodio y sus extractos proteicos fueron ensayados por Western blot con anticuerpos que reconocen GSK3- β cuando está fosforilada en la Ser-9 y contra GSK3- β total. La fosforilación de GSK3- β en Ser-9 causa su inactivación (D. A: Cross et al., Nature, vol. 378, pp.785-789). El diagrama muestra la relación entre la GSK3- β fosforilada en Ser-9 (GSK3 β -pS9) y la cantidad total de GSK3- β . B) Células SH-SY5Y fueron incubadas con concentraciones crecientes de tungstato y el grado de fosforilación de tau fue determinado por Western blot con el anticuerpo tau-1, que reconoce tau cuando las serinas 198, 199 o 202 están desfosforiladas. Los diagramas muestran la relación entre tau desfosforilado (tau1) y total (7.51). C) Células SH-SY5Y fueron incubadas durante 10 minutos en presencia (+) o ausencia (-) de 1 mM tungstato sódico (W) y el grado de fosforilación de tau fue determinado por Western blot con el anticuerpo AT180, que reconoce tau cuando la treonina 231 está fosforilada. El diagrama muestra la relación entre tau fosforilado (AT180) y total (7.51). La cantidad total de tau fue determinada con el anticuerpo 7.51. Los datos corresponden a las medias y las barras de error representan la desviación estándar de 3 a 5 experimentos independientes.

En la FIG. 2 se muestra el efecto del tungstato (W) en la fosforilación de tau en cerebros de ratas sanas y resistentes a insulina A) Análisis por Western blot de la fosforilación de GSK3 (izquierda) y tau (derecha) en extractos de cerebros de ratas inyectadas intracranealmente con solución salina (-) o 0.1 mM tungstato (+). El grado de fosforilación fue determinado mediante anticuerpos contra GSK3- β (pS9) fosforilada en Ser-9, contra tau fosforilado en la treonina 231 (AT180) y contra tau desfosforilado en las serinas 198, 199 o 202 (tau-1). La cantidad total de GSK3 y tau fue determinada mediante la interacción con anticuerpos generados contra GSK3 y tau (7.51), respectivamente. B) Análisis por Western blot de la fosforilación de GSK3- β (izquierda) y tau (derecha) en ratas control (Ctrl) y resistentes a insulina (IR). La fosforilación fue determinada mediante un anticuerpo que reacciona con (GSK3- β fosforilada en Ser-9 (pS9-GSK3- β) o con los anticuerpos tau-1 y

AT180. Las cantidades totales de GSK3 y tau fueron determinadas como en A. C) Ratas resistentes a insulina fueron inyectadas intracranealmente con solución salina (-) o 0.1 mM tungstato (+), sus cerebros fueron extraídos y homogeneizados, y se realizaron Western blots de las proteínas cerebrales con los anticuerpos tau-1 y AT180. La cantidad total de tau fue determinada con el anticuerpo 7.51. Se observó una disminución en la interacción con el anticuerpo AT180 y un incremento con el anticuerpo tau-1.

En la FIG. 3 se muestra el efecto del tungstato (W) en la fosforilación de tau de cerebros de ratas diabéticas STZ. A) Análisis por Western blot de la fosforilación en Ser-9 de GSK3 en extractos cerebrales de ratas sanas inyectadas intraperitonealmente con solución salina (Ctrl) o tungstato (W) (50 mg/kg). El diagrama muestra la relación entre GSK3 fosforilada en Ser-9 y la cantidad total de GSK3 (GSK3-β). B) como en A), ratas diabéticas STZ inyectadas intraperitonealmente con 50 o 75 mg/kg de tungstato. C) Análisis por Western blot de la fosforilación de tau en la secuencia reconocida por el anticuerpo tau-1 en extractos cerebrales de ratas sanas control inyectadas intraperitonealmente con solución salina (Ctrl) o tungstato (W) (50 mg/kg). El diagrama muestra la relación entre tau reconocido por el anticuerpo tau-1 y la cantidad total de tau que es reconocida por el anticuerpo 7.51. D) como en C), ratas diabéticas STZ inyectadas intraperitonealmente con 50 o 75 mg/kg de tungstato. Los datos corresponden a las medias y las barras de error representan la desviación estándar obtenidas a partir de tres a cinco experimentos independientes.

EJEMPLOS

Anticuerpos y reactivos

El tungstato de sodio dihidrato fue adquirido a Carlo Erba (Milan, Italia). Se han utilizado los siguientes anticuerpos contra tau: 7.51 (M. Novack et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991, vol. 88, pp. 5837-5841) (cedido por el Dr. C. Wischik, University of Aberdeen, Aberdeen, Reino Unido), AT-180 (Innogenetics, Gante, Bélgica), y tau-1 (Chemicon, Temecula, CA). El anticuerpo AT-180 reconoce tau cuando está fosforilado en la treonina 231. El anticuerpo tau-1 reconoce tau solamente cuando las serinas 198, 199 y 202 no están fosforiladas y el anticuerpo 7.51 reconoce tau total de forma

independiente a sus modificaciones postraduccionales. La numeración de los epítomos de tau se basa en la isoforma más larga de esta proteína en humanos que contiene 441 aminoácidos. El resto de anticuerpos utilizados han sido: phospho-GSK3- β (Ser-9) y anti-GSK3 de Cell Signaling, (Beverly, MA). Los enzimas y reactivos bioquímicos utilizados son de Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO) salvo que se indique lo contrario. El resto de productos químicos utilizados fueron de grado analítico.

Análisis por Western blot

El análisis del grado de fosforilación de tau y GSK3 se realizó por Western blot con los anticuerpos que se mencionan en el anterior apartado. Las células se homogeneizaron a 4 °C en 50 mM ácido N-2-hidroxietil-piperazin-N'-2-etanosulfónico (HEPES), pH 7.4, 10 mM ácido etilen diamino tetraacético (EDTA), 0.1 % 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil) fenil-polietilen glicol (triton X-100), 20 mM NaF, 0.1 mM ortovanadato sódico, 1 mM fluoruro de fenil metil sulfonilo, 10 μ g/ml ácido isovaleril-Val-Val-4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoil-Ala-4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico (Pepstatina A); y 10 μ g/ml aprotinina. Los lisados celulares se centrifugaron a 10,000 g durante 30 minutos a 4°C y posteriormente fueron calentados a 100 °C durante 5 minutos en tampón de muestra de electroforesis. La concentración proteica se determinó mediante el método del BCA (Pierce, Rockford, IL). Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) del 10% y fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel, Alemania). Después de bloquear los sitios de unión no específica de proteínas en las membranas con tampón fosfato salino (PBS), 0.05% sorbitan monolaurato polioxietileno (Tween 20) y 5% leche en polvo desnatada, las membranas se incubaron durante una noche a 4 °C con los anticuerpos primarios diluidos en el tampón anterior. Las proteínas reconocidas por los anticuerpos fueron visualizadas mediante reacción de quimioluminiscencia (Perkin Elmer Life Sciences Boston, MA) después de su incubación con anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano (Dako A/S Glostrup, Dinamarca). El análisis densitométrico de las proteínas reconocidas por los anticuerpos se realizó con el software GS-710 (Bio-Rad, Hercules, CA) y los niveles de fosfo-proteínas fueron normalizados mediante el cálculo de la relación entre las señales dependientes e independientes de la fosforilación.

EJEMPLO 1: Efectos del tungstato en la fosforilación de GSK3- β en Ser-9 en la línea celular SH-SY5Y

5 Con la finalidad de examinar los efectos del tungstato sobre células neuronales, se analizó la acción inhibidora del tungstato dihidrato sobre GSK3- β mediante el análisis de su fosforilación en la Ser-9, en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y (ref.: 94030304 de la Colección Europea de Cultivos Celulares, Salysbury, Whiltshire, Gran Bretaña). El neuroblastoma
10 humano SH-SY5Y se cultivó en medio de cultivo celular de Dulbecco Modificado por Eagle (DMEM; Invitrogen-Gibco, Carlsbad, CA) suplementado con 10% (v/v) suero bovino fetal (FBS; Invitrogen-Gibco), 2 mM glutamina, y 50 μ g/ml gentamicina. El día previo al experimento, las células fueron sembradas en placas multipocillo y cultivadas en medio NeuroBasal (NB) en
15 ausencia de suero bovino fetal (Invitrogen-Gibco). El tungstato de sodio dihidrato fue disuelto en agua doble destilada y añadido al medio de cultivo a 0.1, 1 ó 5 mM de concentración final. Las células fueron incubadas durante 5 ó 10 minutos en estas condiciones. Las células control fueron incubadas con el mismo volumen de agua doble destilada. La exposición de las células de
20 neuroblastoma humano SH-SY5Y a tungstato sódico incrementó de forma significativa la fosforilación de GSK3- β en la Ser-9 (FIG. 1A), lo que indica que este enzima fue inactivada por el tratamiento.

A continuación se ensayó si la acción inhibidora del tratamiento con tungstato
25 sobre GSK3 se correlacionaba con una disminución en la fosforilación de la proteína tau en los sitios modificados por esta proteína quinasa. En consecuencia, se analizó el estado de fosforilación de tau en células SH-SY5Y tratadas con tungstato. Para ello se utilizó en primer lugar un anticuerpo que reconoce la proteína tau dependiendo de su estado de
30 fosforilación por GSK3 mediante Western blot. El anticuerpo tau-1 interacciona con tau cuando las serinas 198,199 o 202 no se encuentran modificadas pero no lo hace cuando estos residuos se encuentran fosforilados. Se observa un incremento significativo de la inmunoreactividad con el anticuerpo tau-1 (FIG. 1B), lo que sugiere que el tratamiento con
35 tungstato inhibe la fosforilación de las serinas 198, 199 o 202 de tau. Además, se observa en células tratadas con tungstato una disminución en la fosforilación del epítipo reconocido por otro anticuerpo (AT-180) que

reconoce otro epítipo dependiente de la fosforilación de GSK3 en tau (FIG. 1C).

Estos resultados muestran que el tratamiento con tungstato estimula la fosforilación de GSK3- β en la Ser-9 e inhibe la fosforilación de tau en determinadas secuencias de esta proteína que son modificadas por esta proteína quinasa en células de origen neuronal.

EJEMPLO 2: Efectos del tungstato sódico en la fosforilación de tau in vivo.

Con la finalidad de estudiar los efectos del tungstato en la fosforilación de tau in vivo, se analizó en primer lugar el grado de fosforilación de esta proteína y el de GSK3- β en la Ser-9 en cerebros procedentes de ratas Wistar sanas tratadas o no con tungstato.

Las ratas Wistar macho que pesaban 220-240 g (IFFA CREDO, L'Arbresse, Francia) se estabularon individualmente en un ciclo de 12:12-h luz-oscuridad con temperatura y humedad controladas. No se observaron cambios significativos en la fosforilación de tau o GSK3 en presencia o ausencia de tungstato en ambos grupos (FIG. 2A). Estos resultados están de acuerdo con datos previos que indican que el tungstato no es activo cuando se ensaya en animales sanos.

A continuación, se ensayaron los efectos del tungstato en un modelo de resistencia a insulina en el cual este compuesto es farmacológicamente activo: ratas obesas por alimentación con una dieta rica en grasas. Un grupo de ratas fue alimentado con una dieta control (8% de las calorías procedentes de grasa, tipo AO4 de Panlab, Barcelona, España), otro grupo fue alimentado con una dieta rica en grasas, en la que el 65% de las calorías procedía de grasas (cfr. M. Claret et al., Obes Res 2004, vol. 12, pp.16596-1603), con la finalidad de inducir resistencia a insulina. Después de 30 días en estas condiciones de alimentación las ratas fueron anestesiadas y se les inyectó intraventricularmente 5 μ l bien de solución salina o de una solución 110 nM de tungstato sódico disuelto en solución salina ("Tungstate Decreases Weight gain and adiposity in obese rat through increased thermogenesis and lipid oxidation", Claret et al, Endocrinology vol. 146, pp. 4362-4369). Después de 24 horas, se extrajeron los cerebros de las ratas y

se aislaron los cortexes que fueron homogeneizados en tampón fosfato salino. Los extractos proteicos fueron ensayados con anticuerpos contra tau y GSK3- β por Western blot.

5 Los niveles de GSK3- β fosforilados en la Ser-9 se redujeron en los cerebros de las ratas resistentes a insulina cuando se comparaban con los animales sanos no obesos (FIG. 2B izquierda). Este hallazgo indica que esta quinasa es más activa en las ratas resistentes a insulina. Este hecho debería
10 comportar un incremento en la fosforilación de tau en este grupo de animales ya que esta proteína es un excelente sustrato de GSK3. De acuerdo con esto se observó un incremento en la unión del anticuerpo AT180 a tau y un descenso en la asociación del anticuerpo tau-1 en ratas obesas cuando se comparaba con el grupo de animales no obesos (FIG. 2B derecha). El tratamiento con tungstato producía un descenso en la fosforilación en el
15 epítipo reconocido por el anticuerpo AT180 y un incremento en la cantidad de proteína reconocida por el anticuerpo tau-1 (FIG. 2C). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en células de origen neuronal: el tratamiento con tungstato reducía la fosforilación de tau dependiente de GSK3.

20 Por otro lado, se han ensayado los efectos del tungstato en un modelo de diabetes de tipo-1, la rata diabética por inyección de estreptozotocina (STZ) (cfr. A. Junod et al., J. Clin. Invest. 1969, vol. 48, pp. 2129-2139). La diabetes fue confirmada mediante la determinación de la glicemia a partir de
25 sangre extraída la vena caudal (Glucometer Elite, Bayer, Barcelona, Spain). Se utilizaron un total de 3 ratas tratadas y 3 ratas control. Los tratamientos con tungstato se realizaron por inyección intraperitoneal de tungstato (50 o 75 mg/kg) a ratas diabéticas STZ.

30 En este caso de nuevo no se observaron diferencias en la fosforilación de GSK3 en la Ser-9 o en la de tau en el epítipo reconocido por el anticuerpo tau-1, en animales sanos tratados o no con tungstato. (FIGs. 3A y C). Sin embargo, en los animales diabéticos por inyección de STZ, el tratamiento con tungstato incrementó la fosforilación en la Ser-9 de GSK3- β y redujo la
35 fosforilación de tau en el epítipo reconocido por el anticuerpo tau-1 (FIGs. 3 B y D).

- Estos resultados muestran que el tungstato sódico disminuye la fosforilación de tau en ratas resistentes a insulina o diabéticas. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con la normativa establecida para protección de los animales destinados a experimentación (Unión Europea y Directiva del
- 5 Gobierno Autónomo) y los protocolos fueron previamente aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Barcelona.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un
5 compuesto formado por tungsteno (VI) y una parte química
farmacéuticamente aceptable, o de un solvato de dicho compuesto, en
combinación con excipientes farmacéuticamente aceptables o portadores,
para uso como agente profiláctico y/o terapéutico contra un trastorno
neurodegenerativo en un mamífero, incluyendo un humano.
- 10 2. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, donde el trastorno
neurodegenerativo es una tauopatía.
3. La composición farmacéutica según la reivindicación 2, donde la tauopatía
15 se selecciona del grupo formado por la enfermedad de Alzheimer, demencia
frontotemporal con parkinsonismo asociado al cromosoma 17, parálisis
supranuclear progresiva, esclerosis lateral amiotrófica/
parkinsonismo-demencia compleja de Guam, enfermedad de Pick,
degeneración corticobasal, y Argirofilia granulosa.
- 20 4. La composición farmacéutica según la reivindicación 3, donde la tauopatía
es la enfermedad de Alzheimer.
5. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, donde el trastorno
25 neurodegenerativo es la esquizofrenia.
6. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-5,
donde el compuesto de tungsteno (VI) es una sal de tungstato que
comprende una parte catiónica farmacéuticamente aceptable.
- 30 7. La composición farmacéutica según la reivindicación 6, donde la parte
donde la parte catiónica se selecciona entre el grupo formado por los
cationes sodio, potasio, magnesio y calcio.
- 35 8. La composición farmacéutica según la reivindicación 7, donde el
compuesto de tungsteno (VI) es tungstato sódico.

9. La composición farmacéutica según la reivindicación 7, donde el compuesto de tungsteno (VI) es tungstato sódico y dicho solvato es el dihidrato.

5 10. Uso de un compuesto formado por tungsteno (VI) y una parte química farmacéuticamente aceptable, o de un solvato de dicho compuesto, para la preparación de una composición oral, para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de un trastorno neurodegenerativo en un mamífero, incluyendo un humano.

10

11. Uso según la reivindicación 10, donde el trastorno neurodegenerativo es una tauopatía.

15

12. Uso según la reivindicación 11, donde la tauopatía se selecciona del grupo formado por la enfermedad de Alzheimer, demencia frontotemporal con parkinsonismo asociado al cromosoma 17, parálisis supranuclear progresiva, esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia compleja de Guam, enfermedad de Pick, degeneración corticobasal, y Argirofilia granulosa.

20

13. Uso según la reivindicación 12, donde la tauopatía es la enfermedad de Alzheimer.

14. Uso según la reivindicación 10, donde el trastorno neurodegenerativo es la esquizofrenia.

25

15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 10-14, donde el compuesto de tungsteno (VI) es una sal de tungstato que comprende una parte catiónica farmacéuticamente aceptable.

30

16. Uso según la reivindicación 15, donde la parte catiónica se selecciona entre el grupo formado por los cationes sodio, potasio, magnesio y calcio.

17. Uso según la reivindicación 16, donde el compuesto de tungsteno (VI) es tungstato sódico.

35

18. Uso según la reivindicación 16, donde el compuesto de tungsteno (VI) es tungstato sódico y dicho solvato es el dihidrato.

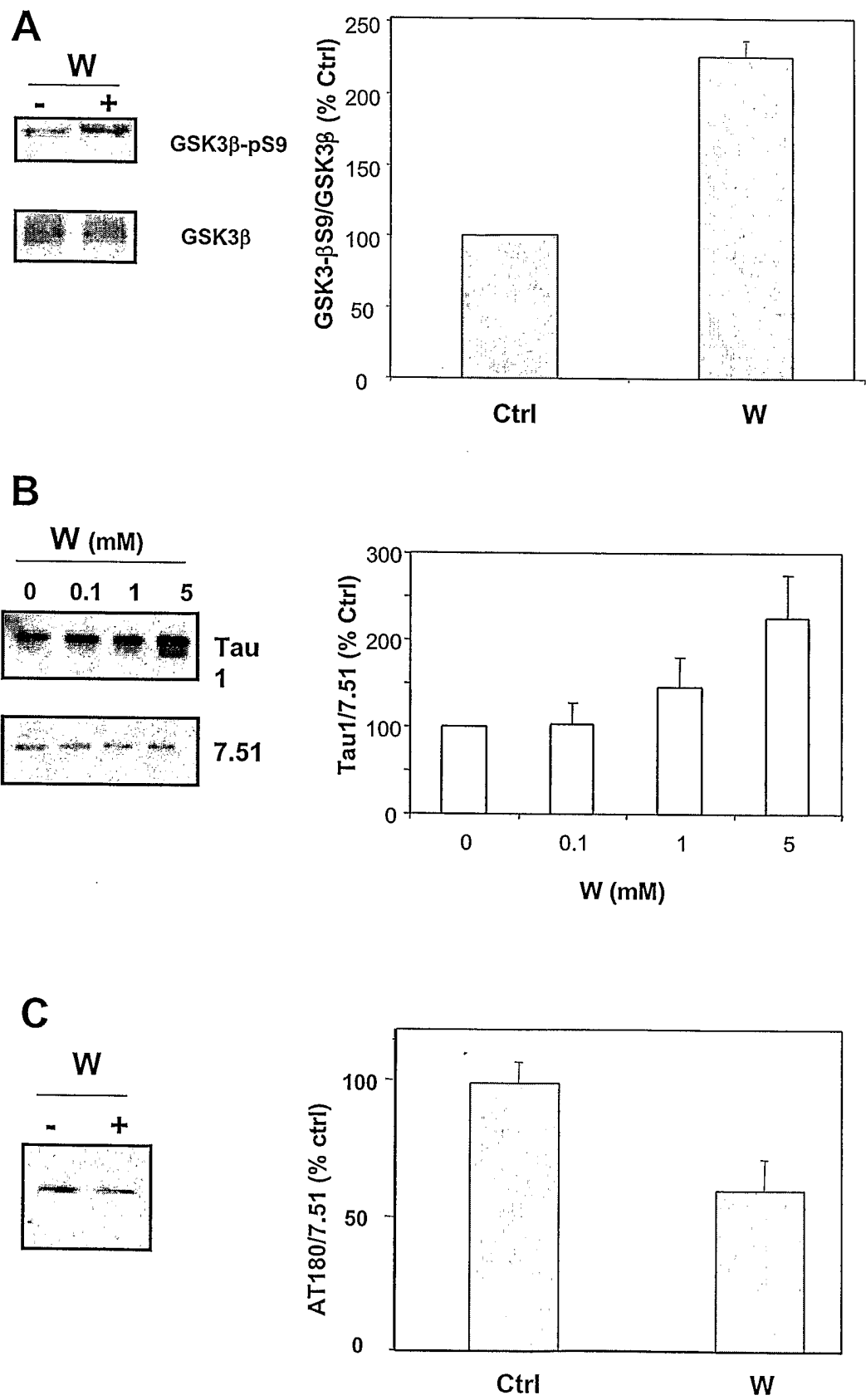


FIG. 1

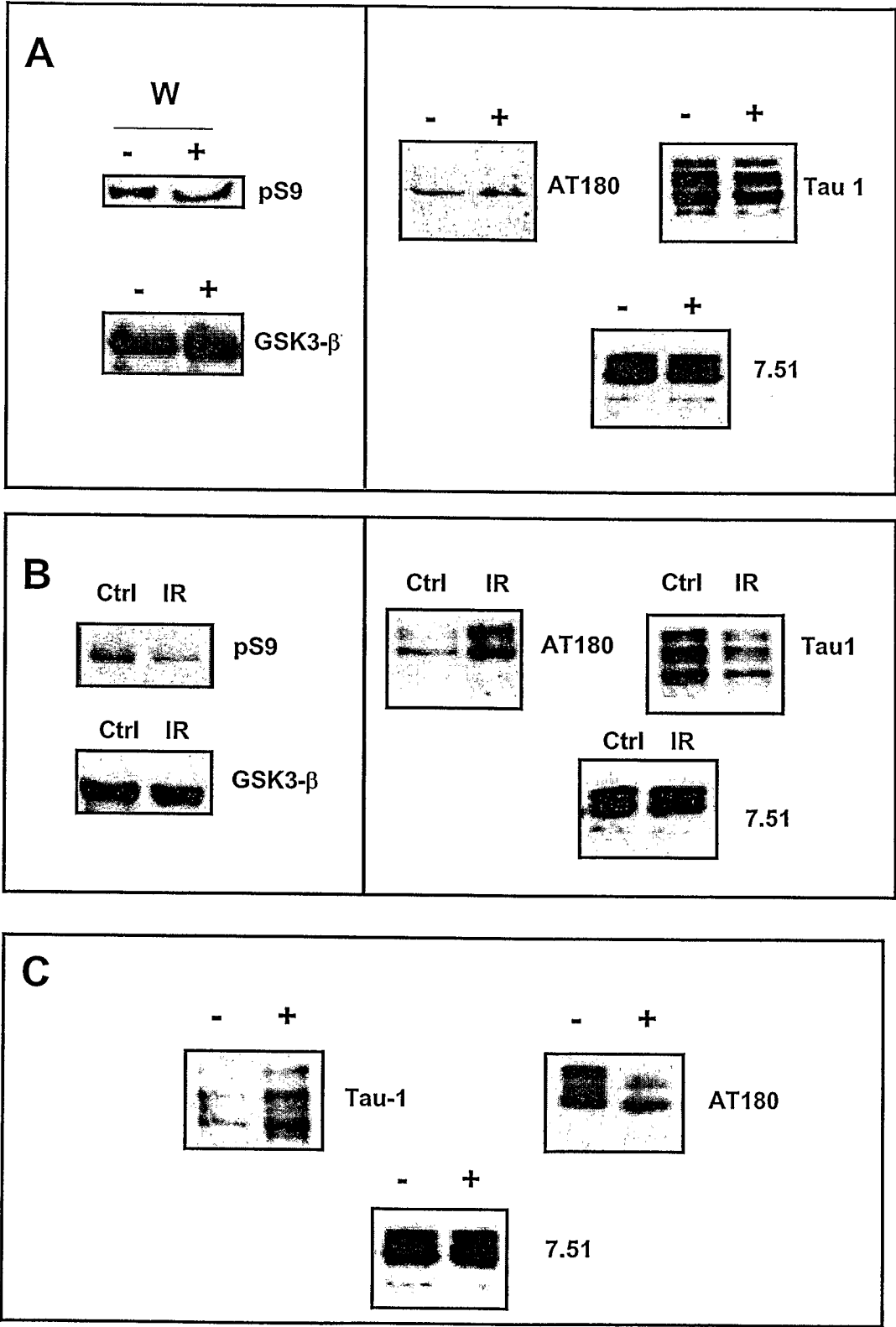


FIG. 2

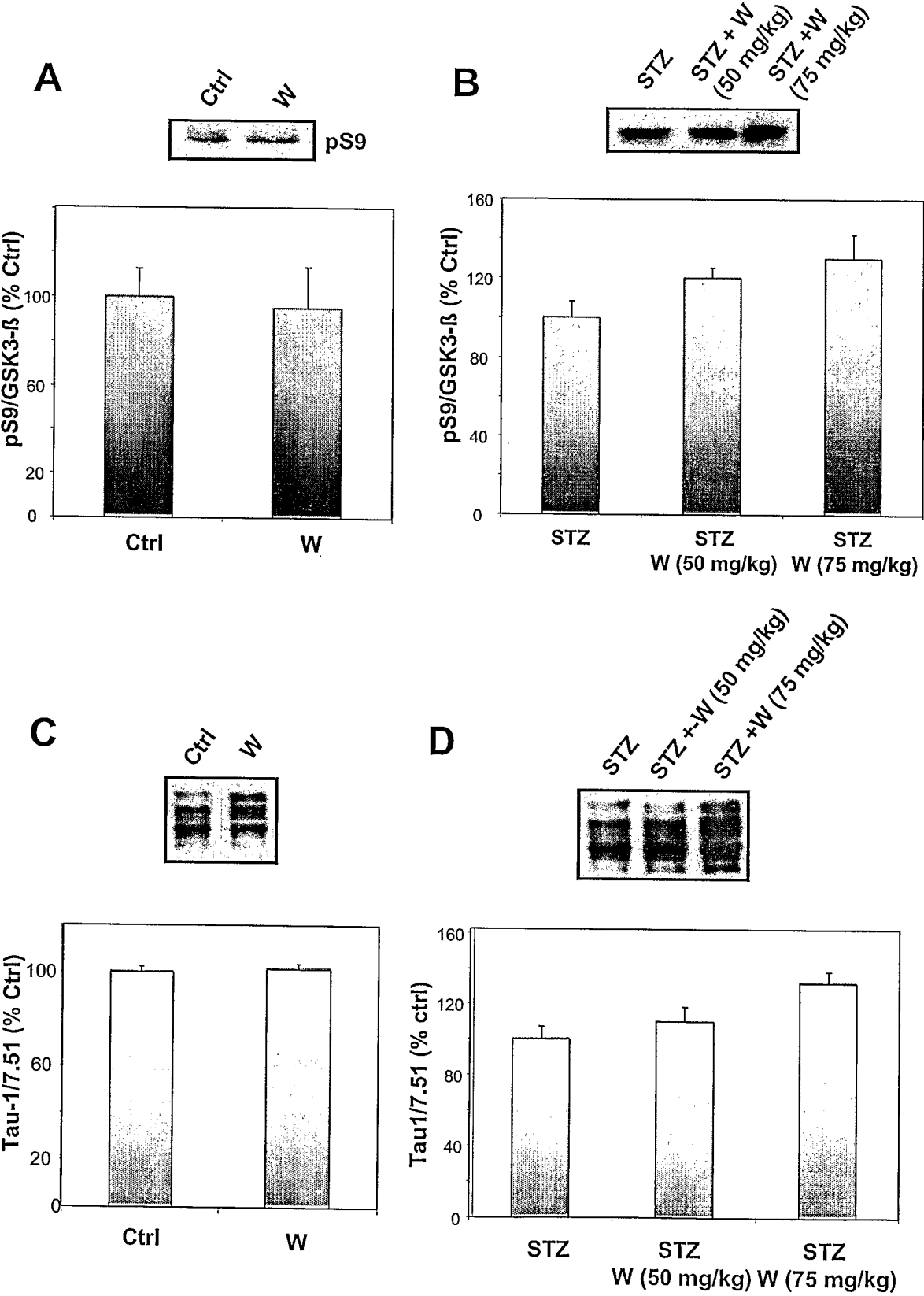


FIG. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2006/000442

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, REGISTRY, HCAPLUS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ES 2108642 A1 (QUIMICA FARMACEUTICA BAYER, S.A.) 16.12.1997. claims 1-5.	1-9
X	WO 02098435 A1 (QUIMICA FARMACEUTICA BAYER, S.A.) 12.12.2002. claims 1-5.	1-9
A	FR 2587214 A1 (PASTEUR INSTITUT) 20.03.1987. Abstract.	1-18
A	US 2003039702 A1 (SHIGETA S. and col.) 27.02.2003. Abstract, claims.	1-18
A	EP 0770391 A2 (L'OREAL) 02.05.1997. Abstract.	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.		
"E" earlier document but published on or after the international filing date		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
	"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 December 2006 (12.12.2006)

Date of mailing of the international search report

(09-01-2007)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

E. Albarrán Gómez

Telephone No. +34 91 349 30 38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2006/000442

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES 2108642 A	16.12.1997	US 5595763 A EP 0755681 A JP 9118624 A	21.01.1997 29.01.1997 06.05.1997
WO 02098435 A	12.12.2002	CA 2447141 A ES 2187276 A EP 1400246 A US 2004131697 A BR 0210975 A AT 344042 T	12.12.2002 16.05.2003 24.03.2004 08.07.2004 05.10.2004 15.11.2006
FR2587214AB A B	20.03.1987	NONE	-----
US 2003039702 A	27.02.2003	JP 2000229864 A US 6565890 B	22.08.2000 20.05.2003
EP 0770391 A	02.05.1997	CA 2188891 A NO 964516 A FR 2740342 A JP 9169656 A AT 173933 T DE 69601061 D ES 2127612 T	27.04.1997 28.04.1997 30.04.1997 30.06.1997 15.12.1998 14.01.1999 16.04.1999

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 33/24 (2006.01)

A61P 25/18 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ ES 2006/000442

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

CIBEPAT, EPODOC, WPI, REGISTRY, HCAPLUS, MEDLINE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	ES 2108642 A1 (QUIMICA FARMACEUTICA BAYER, S.A.) 16.12.1997. Reivindicaciones 1-5.	1-9
X	WO 02098435 A1 (QUIMICA FARMACEUTICA BAYER, S.A.) 12.12.2002. Reivindicaciones 1-5.	1-9
A	FR 2587214 A1 (PASTEUR INSTITUT) 20.03.1987. Resumen.	1-18
A	US 2003039702 A1 (SHIGETA S. y col.) 27.02.2003. Resumen, reivindicaciones.	1-18
A	EP 0770391 A2 (L'OREAL) 02.05.1997. Resumen.	1-18

☐ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

12 Diciembre 2006 (12.12.2006)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

09 enero 2007 (09-01-2007)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Nº de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

E. Albarrán Gómez

Nº de teléfono +34 91 349 30 38

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2006/000442

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
ES 2108642 A	16.12.1997	US 5595763 A EP 0755681 A JP 9118624 A	21.01.1997 29.01.1997 06.05.1997
WO 02098435 A	12.12.2002	CA 2447141 A ES 2187276 A EP 1400246 A US 2004131697 A BR 0210975 A AT 344042 T	12.12.2002 16.05.2003 24.03.2004 08.07.2004 05.10.2004 15.11.2006
FR2587214AB A B	20.03.1987	NINGUNO	-----
US 2003039702 A	27.02.2003	JP 2000229864 A US 6565890 B	22.08.2000 20.05.2003
EP 0770391 A	02.05.1997	CA 2188891 A NO 964516 A FR 2740342 A JP 9169656 A AT 173933 T DE 69601061 D ES 2127612 T	27.04.1997 28.04.1997 30.04.1997 30.06.1997 15.12.1998 14.01.1999 16.04.1999

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 33/24 (2006.01)

A61P 25/18 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)