

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 680 418**

21 Número de solicitud: 201730249

51 Int. Cl.:

A61K 31/52 (2006.01)

A61K 31/4192 (2006.01)

A61K 31/05 (2006.01)

A61K 31/53 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

24.02.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

06.09.2018

88 Fecha de publicación diferida del informe sobre el estado de la técnica:

17.01.2019

Fecha de concesión:

18.10.2019

45 Fecha de publicación de la concesión:

25.10.2019

73 Titular/es:

FUNDACIÓN RIOJA SALUD (60.0%)
C/ Piqueras, 98 Edificio Cibir
26006 LOGROÑO (La Rioja) ES;
FUNDACIÓN UNIVERSITARIA SAN PABLO CEU
(25.0%);
FABIÁN LOIDL, César (7.5%) y
REY FUNES, Manuel Eduardo (7.5%)

72 Inventor/es:

FABIÁN LOIDL, César;
REY FUNES, Manuel Eduardo;
MARTINEZ RAMIREZ, Alfredo;
LARRÁYOZ ROLDÁN, Ignacio;
PELÁEZ CRISTÓBAL, Rafael;
DE PASCUAL TERESA, Beatriz;
RAMOS GONZÁLEZ, Ana María;
CODERCH BOUÉ, Claire y
ZAPICO RODRÍGUEZ, Jose María

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

54 Título: **Uso de un compuesto en la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento por activación de la expresión de la proteína CIRP de una enfermedad y composición**

57 Resumen:

Uso de un compuesto en la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento por activación de la expresión de la proteína CIRP de una enfermedad y composición. Uso de un compuesto en la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento por activación de la expresión de la proteína CIRP (ribonucleoproteína heterogénea A18 [hnRNP A18]) de una enfermedad de un animal homeotermo. Composición que comprende el compuesto y uso de la composición.

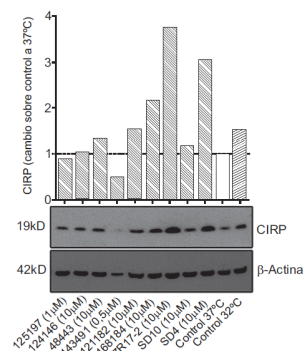


Fig. 1

ES 2 680 418 B1

DESCRIPCIÓN

Uso de un compuesto en la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento por activación de la expresión de la proteína CIRP de una enfermedad y composición

5

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención está relacionada con compuestos útiles en el tratamiento de enfermedades por activación de la expresión de la proteína CIRP (ribonucleoproteína heterogénea A18 [hnRNP A18]), entre ellas, infartos de miocardio, resucitación cardiopulmonar, ictus hemorrágico, encefalopatía isquémica neonatal, asfixia perinatal, pérdida de audición residual en implantes cocleares, isquemia aguda, lesiones de la médula espinal, retraso del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas crónicas, traumatismos cerebrales y oculares, obesidad, diabetes y síndrome metabólico.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La hipotermia consiste en la reducción de la temperatura corporal por debajo de los 36°C en humanos y en otros animales homeotermos. Numerosas investigaciones recientes han demostrado que la hipotermia es una herramienta terapéutica potencialmente muy útil frente a los daños ocasionados por complicaciones cardíacas o neurológicas, tales como infarto, resucitación cardiopulmonar (Arrich et al. 2016), encefalopatía isquémica neonatal (Papile et al. 2014;Thoresen 2015) e incluso para evitar la pérdida de audición residual en implantes cocleares (Tamames et al. 2016). Además, algunos estudios recientes han demostrado que la hipotermia terapéutica no solo puede reducir y prevenir daños en la isquemia aguda (Yenari y Han 2012) y en lesiones de la médula espinal (Alkabie y Boileau 2016) sino que, además, parece retrasar el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas crónicas (Salerian y Saleri 2008). Todos estos casos ponen de manifiesto el elevado potencial de aplicación terapéutica de la hipotermia.

30

Además, un mecanismo fisiológico de adaptación al frío lo constituye la hibernación, que es la capacidad que tienen ciertos animales para adaptarse a condiciones climáticas extremadamente frías (Ruf y Geiser 2015). La hibernación puede asemejarse a un estado de hipotermia regulada durante algunos días, semanas o meses, lo cual permite a estos animales conservar su energía durante el invierno minimizando para ello su gasto energético. Durante este proceso tiene lugar una disminución de la actividad metabólica, de

35

la frecuencia cardiaca y respiratoria, así como de su propia temperatura corporal. Este estado facilita y maximiza las posibilidades de supervivencia del animal hasta que las condiciones ambientales mejoren. Un caso concreto que merece atención es la regulación del metabolismo de carbohidratos en animales que hibernan. Para prepararse a la hibernación estos animales aumentan el consumo de alimentos hasta que experimentan una obesidad “saludable” ya que viene acompañada por una resistencia a la insulina totalmente reversible (Logan y Storey 2016). Por otra parte, se ha demostrado que los ratones que reciben una dieta hipercalórica en condiciones ambientales de baja temperatura no engordan ya que el exceso de grasa se utiliza para mantener la temperatura corporal (Luo et al. 2016;Kiefer 2016). Si fuéramos capaces de regular este proceso en pacientes humanos tendríamos una puerta abierta al control de la obesidad, la diabetes y el síndrome metabólico.

Desde el punto de vista molecular, la disminución de la temperatura corporal produce una disminución del metabolismo en general incluyendo una gran reducción en los niveles de síntesis de proteínas dentro de la célula. Sin embargo, un pequeño grupo de proteínas (cold-shock proteins) (Al-Fageeh y Smales 2006), entre las que se encuentran las proteínas de unión al RNA inducibles por frío (CIRP) o las proteínas con motivo de unión al RNA (RBM3), ve su síntesis estimulada por la baja temperatura (Al-Fageeh y Smales 2013). CIRP, también conocido como CIRBP o ribonucleoproteína heterogénea A18 [hnRNP A18]), es una proteína de 18 kDa compuesta por 172 aminoácidos, cuyo gen en humanos se encuentra en el cromosoma 19 región p13.3. Al igual que otros miembros de la familia de las hnRNP, CIRP se une al RNA mensajero y ribosomal presente en la célula y regula su vida media, la expresión potencial de múltiples genes y, por tanto, su función (Chip et al. 2011).

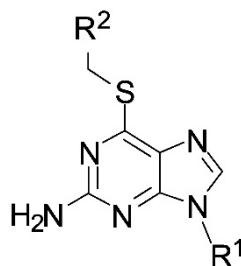
Al igual que sucede en el caso de otras proteínas de unión a RNA, se ha visto que CIRP es capaz de modular la apoptosis jugando un papel anti-apoptótico en situaciones de hipotermia (Wu et al. 2016;Zhang et al. 2015). Por ejemplo, en células neuronales de rata este efecto parece darse a través de la ruta de apoptosis de la mitocondria ya que, en estudios al respecto, muestran una disminución de la expresión de moléculas pro-apoptóticas (Bax, Bad, Bak, Cycs, Apaf-1, Caspasa-9 y Caspasa-3) (Zhang et al. 2015). Algo similar se puede observar en modelos de rata al aplicar hipotermia tras un paro cardiaco, donde disminuye la expresión de Bax, Caspasa-3 y -9 y estabiliza la expresión de Bcl-2, que tiene papel anti-apoptótico (Wu et al. 2016). Este puede ser el origen de los efectos positivos de la hipotermia terapéutica en este tipo de patologías.

Algunos estudios de medicina reproductiva han revelado además que, en ovocitos, la expresión de CIRP durante la criopreservación supone la protección frente a la cristalización y el estrés por frío en la congelación rápida (Jo et al. 2015).

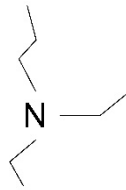
- 5 Recientemente se ha visto que CIRP interacciona con la ruta de señalización AKT (Liu et al. 2015), que entre otros procesos regula la resistencia a insulina transitoria de animales en hibernación y cuyo mal funcionamiento es responsable de la resistencia a insulina en la diabetes mellitus tipo II (Wu et al. 2013).
- 10 A pesar de las grandes aplicaciones potenciales de la hipotermia hay un problema inherente, que es la dificultad de aplicar frío a algunos órganos o regiones concretas del organismo debido a su capacidad de modular la temperatura corporal (Morrison 2016). Esta regulación es menor o está ausente en recién nacidos y en pacientes de edad avanzada (Lyden et al. 2012). Para aplicar hipotermia en órganos internos, tales como el cerebro, es necesario enfriar la sangre con un sistema de circulación externo (Andrews et al. 2015), mientras que para la correcta aplicación de la hipotermia en recién nacidos es necesario un dispositivo bastante elaborado y que no es asequible para hospitales de países en vías de desarrollo o para dispensarios situados en lugares remotos (Dingley et al. 2015).
- 15
- 20 Además la hipotermia puede generar posibles efectos secundarios adversos tales como la disminución de la respuesta inmune o el fallo renal (Choi et al. 2012).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

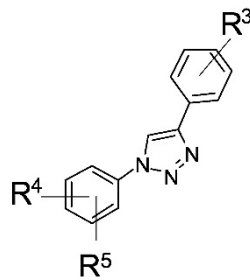
- 25 En un primer aspecto, la presente invención proporciona el uso de un compuesto seleccionado del grupo compuesto por un compuesto de fórmula (I)



donde R¹ está seleccionado del grupo compuesto por -CH₂-fenilo y CH₂-fenilo-OMe,



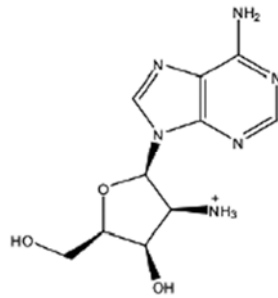
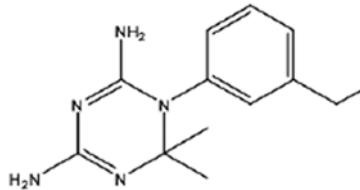
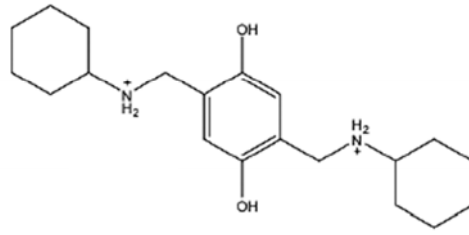
y R^2 es $-\text{COOH}$ o $-\text{COOMe}$,
un compuesto de fórmula (II)



5

donde R^3 es hidroxilo,
 R^4 y R^5 están independientemente seleccionados del grupo compuesto por halógeno,
alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ y CF_3
y compuestos de fórmula

10



5 en la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento por activación de la expresión de la proteína CIRP (ribonucleoproteína heterogénea A18 [hnRNP A18]) de una enfermedad de un animal homeotermo, donde la enfermedad está seleccionada del grupo compuesto por infartos de miocardio, resucitación cardiopulmonar, ictus hemorrágico, encefalopatía isquémica neonatal, asfixia perinatal, pérdida de audición residual en implantes cocleares, isquemia aguda, lesiones de la médula espinal, retraso del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas crónicas, traumatismos cerebrales y oculares, obesidad, diabetes y 10 síndrome metabólico.

En la presente memoria, Me significa metilo.

15 En una línea celular, los compuestos según el primer aspecto de la invención activan la expresión de CIRP a temperatura normal (Ejemplos 2 y 3).

Uno de los compuestos según el primer aspecto de la invención aumenta la expresión de CIRP *in vivo* en ratas (Ejemplo 4).

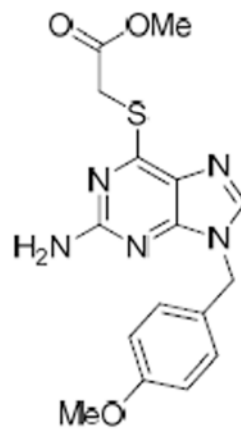
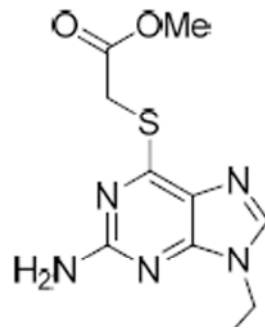
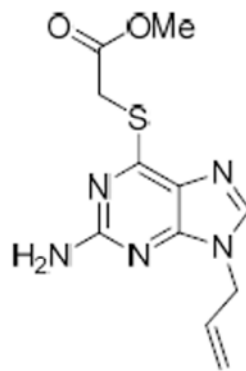
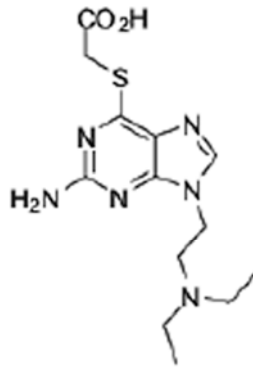
Uno de los compuestos según el primer aspecto de la invención produjo una inducción en ratones del gen UCP1, que aumentó unas 1000 veces sobre los valores basales (Ejemplo 5). UCP1 es la proteína más importante en la cascada de la termogénesis en la grasa parda y el mejor marcador del “oscurecimiento” de la grasa blanca.

Los resultados obtenidos en los Ejemplos 2-5 demuestran que los compuestos según el primer aspecto de la invención inducen el aumento en la expresión de CIRP en ausencia de frío. Estos compuestos tienen aplicación en todos los campos donde se ha comprobado el beneficio de la hipotermia terapéutica. En particular, estos compuestos tienen aplicación en el tratamiento por activación de la expresión de la proteína CIRP (ribonucleoproteína heterogénea A18 [hnRNP A18]) de una enfermedad de un animal homeotermo, donde la enfermedad está seleccionada del grupo compuesto por infartos de miocardio, resucitación cardiopulmonar, ictus hemorrágico, encefalopatía isquémica neonatal, asfixia perinatal, pérdida de audición residual en implantes cocleares, isquemia aguda, lesiones de la médula espinal, retraso del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas crónicas, traumatismos cerebrales y oculares, obesidad, diabetes y síndrome metabólico.

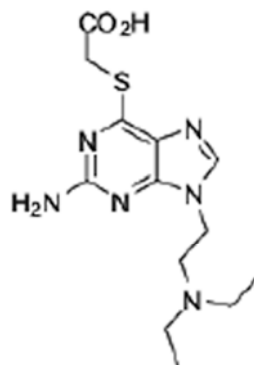
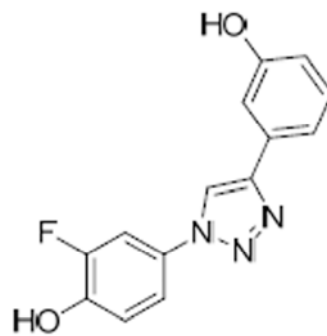
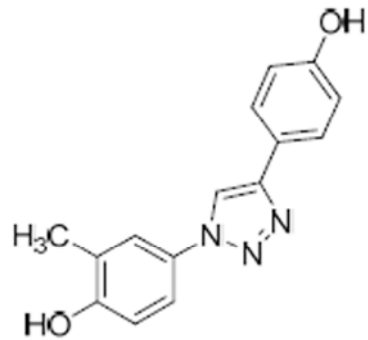
Este primer aspecto se puede formular de forma alternativa como el compuesto según el primer aspecto de la invención para su uso en el tratamiento por activación de la expresión de la proteína CIRP (ribonucleoproteína heterogénea A18 [hnRNP A18]) de una enfermedad de un animal homeotermo, donde la enfermedad está seleccionada del grupo compuesto por infartos de miocardio, resucitación cardiopulmonar, ictus hemorrágico, encefalopatía isquémica neonatal, asfixia perinatal, pérdida de audición residual en implantes cocleares, isquemia aguda, lesiones de la médula espinal, retraso del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas crónicas, traumatismos cerebrales y oculares, obesidad, diabetes y síndrome metabólico.

Este primer aspecto también se puede formular de forma alternativa como un método para el tratamiento por activación de la expresión de la proteína CIRP (ribonucleoproteína heterogénea A18 [hnRNP A18]) de una enfermedad de un animal homeotermo, donde la enfermedad está seleccionada del grupo compuesto por infartos de miocardio, resucitación cardiopulmonar, ictus hemorrágico, encefalopatía isquémica neonatal, asfixia perinatal, pérdida de audición residual en implantes cocleares, isquemia aguda, lesiones de la médula espinal, retraso del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas crónicas, traumatismos

cerebrales y oculares, obesidad, diabetes y síndrome metabólico, que comprende administrar un compuesto según el primer aspecto de la invención a un animal homeotermo. En otro aspecto, la invención es el uso según el primer aspecto, donde el compuesto de fórmula (I) está seleccionado del grupo compuesto por



En otro aspecto, la invención es el uso según el primer aspecto, donde el compuesto de fórmula (II) está seleccionado del grupo compuesto por



- 5 En otro aspecto, la invención es el uso según el primer aspecto, donde el animal homeotermo es un humano.

En otro aspecto, dicho el animal homeotermo es un animal doméstico o animal de granja.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende un compuesto según el primer aspecto de la invención, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables.

- 5 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que consiste en un compuesto según el primer aspecto de la invención, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables.

10 El término “excipientes” hace referencia a compuestos que estabilizan y favorecen la absorción de los principios activos, colorantes, endulzantes, saborizantes, protectores frente al aire y/o humedad, aglutinantes, etc.

15 La composición puede ser formulada con excipientes farmacéuticamente aceptables, así como con cualquier otro tipo de portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, de acuerdo con técnicas convencionales en la práctica farmacéutica.

La composición puede ser administrada por sí sola o en combinación con otros principios activos.

- 20 La composición puede ser administrada en dosis simples o múltiples.

25 La composición según el segundo aspecto de la invención puede ser administrada por cualquier vía de administración (por ejemplo, oral, sublingual, perioral, parenteral, intraperitoneal, intramuscular, intranasal, intravenosa, intraarterial, transdérmica, subcutánea, tópica, etc.) para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida.

30 La composición puede ser formulada para proporcionar la liberación controlada del ingrediente activo como por ejemplo liberación sostenida o prolongada de acuerdo con métodos que son bien conocidos en la técnica.

35 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona el uso de la composición según el segundo aspecto en la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento por activación de la expresión de la proteína CIRP (ribonucleoproteína heterogénea A18 [hnRNP A18]) de una enfermedad de un animal homeotermo, donde la enfermedad está seleccionada del grupo compuesto por infartos de miocardio, resucitación cardiopulmonar, ictus hemorrágico,

encefalopatía isquémica neonatal, asfixia perinatal, pérdida de audición residual en implantes cocleares, isquemia aguda, lesiones de la médula espinal, retraso del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas crónicas, traumatismos cerebrales y oculares, obesidad, diabetes y síndrome metabólico.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Modificación de los niveles de CIRP en la línea celular R28 por el tratamiento con algunas moléculas identificadas en el cribado inicial (barras grises) a 37°C. Como controles se incluyen células sin tratar a 37°C (barra blanca) y a 32°C (barra negra). La β -actina se utilizó como control de carga.

Figura 2. Expresión relativa de la proteína CIRP en células tratadas con los compuestos de fórmula (II) comparados con el control sin tratamiento (barra blanca). Las barras representan la media y la desviación estándar de 8 muestras independientes. Todos estos tratamientos se hicieron a 37°C.

Figura 3. Expresión relativa de la proteína CIRP en células tratadas con los compuestos de fórmula (I) comparados con el control sin tratamiento (barras gris pálido y blanca). Las barras representan la media y la desviación estándar de 8 muestras independientes. Todos estos tratamientos se hicieron a 37°C.

Figura 4. Western blot para CIRP (19 kDa) en extractos proteicos de distintos órganos de la rata, obtenidos 4 días después de la inyección intraperitoneal de ZR17-2 o vehículo (control). La β -actina o la β -tubulina se utilizaron como controles de carga.

Figura 5. Western blot para CIRP de extractos proteicos de la retina de la rata obtenidos 2 y 4 días después de la inyección intravítrea de la molécula ZR17-2 (T) o de vehículo (V). Se aprecia un claro aumento de la expresión de CIRP en las retinas de las ratas tratadas con la molécula ZR17-2 (T) en comparación con las retinas inyectadas con vehículo (V). La actina se utilizó como control de carga.

Figura 6. Expresión relativa, medida mediante qRT-PCR, de 5 genes marcadores del proceso de “oscurecimiento” de la grasa blanca en ratones tratados con vehículo (control) o con la molécula ZR17-2, 3 días después del tratamiento. Todos los datos fueron relativizados con los valores de expresión de 18S.

DESCRIPCIÓN DE MODOS DE REALIZACIÓNEjemplo 1. Identificación de compuestos que se unen a CIRP utilizando un sistema computacional *in silico*.

5

La estructura tridimensional de la forma apo de la proteína CIRP ha sido establecida mediante resonancia magnética y está depositada en el PDB (Protein Data Bank) con el código 1X5S (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1X5S>). Dado que CIRP necesita estar unido a un RNA mensajero para realizar su función, se estudió la estructura de otra proteína similar, CUGBP1, unida a RNA y se extrapolaron los datos para construir un modelo tridimensional de CIRP unido a una cadena de RNA. Este modelo se utilizó para realizar un cribado virtual de alto rendimiento (high throughput virtual screening) usando como ligandos 1621 compuestos. Se eligieron distintos compuestos que fueron ensayados en el resto de ejemplos.

15

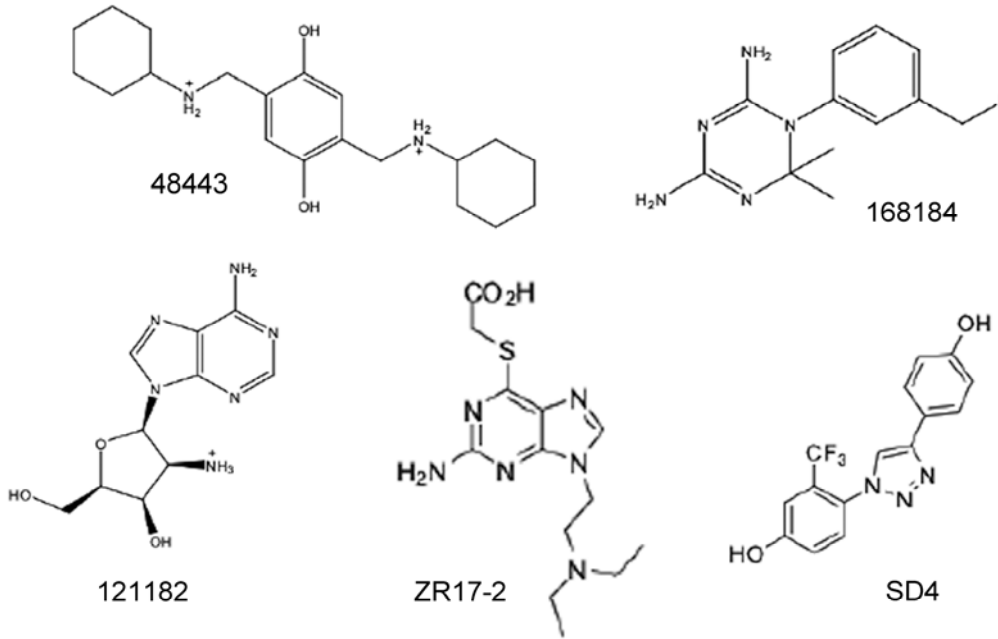
Ejemplo 2. Los compuestos activan la expresión de CIRP a temperatura normal en una línea celular.

Se utilizaron células inmortalizadas de retina de rata, R28. En estas células la expresión de CIRP se regula exponiéndolas a temperaturas más bajas (Larrayoz et al. 2016). Las células fueron tratadas con varias moléculas e incubadas durante 4 días a 37°C. Al final de este periodo, se extrajeron las proteínas y se cuantificaron mediante la técnica de Western blot, de manera idéntica a como se ha publicado (Larrayoz et al. 2016). Como controles se utilizaron células sin tratar cultivadas a 37°C (normotermia) ó a 32°C (hipotermia). Como control de carga se utilizó un anticuerpo que reconoce la β -actina. La Figura 1 recoge los resultados obtenidos para 9 compuestos. Se puede ver claramente cómo la expresión de CIRP aumenta alrededor de un 50% cuando las células se exponen a temperaturas más bajas. Por otro lado, hay una serie de moléculas que aumentan la expresión de CIRP por encima de los valores control a 37°C e incluso por encima de los valores conseguidos a 32°C (Figura 1). Estas moléculas son las moléculas representadas abajo, denominadas moléculas 48443, 121182, 168184, ZR17-2 y SD4.

20

25

30



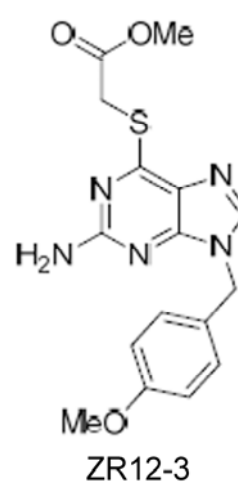
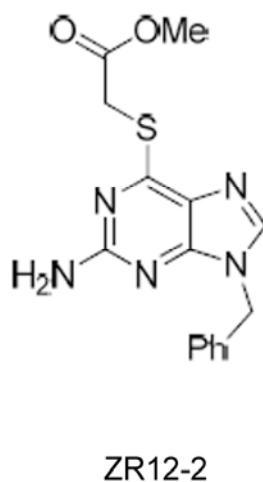
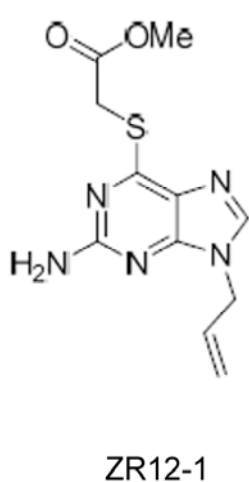
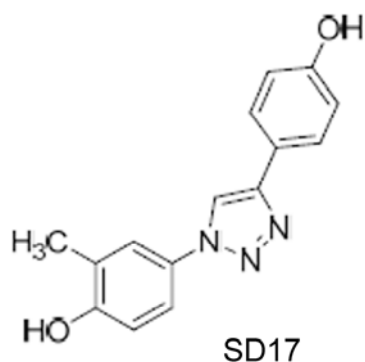
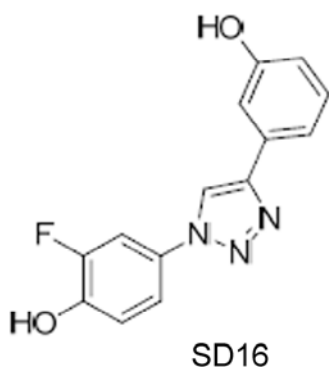
Ejemplo 3. Estudio de la actividad de compuestos específicos

5 Se realizó el mismo ensayo que el descrito en el experimento 2 con compuestos de fórmula (I) y compuestos de fórmula (II). Los resultados obtenidos para varios compuestos de fórmula (I) se muestran en la Figura 3 y para compuestos de fórmula (II) en la Figura 2. Los compuestos representados más abajo han elevado significativamente la expresión de CIRP.

10

15

20



Ejemplo 4. Aumento de expresión de CIRP *in vivo*.

Se obtuvieron permisos éticos y de manejo de animales. Se inyectó la molécula ZR17-2 en ratas a una concentración de 20 nmols/Kg. En un primer momento se inyectó la molécula por vía intraperitoneal y se analizaron los distintos tejidos 2 y 4 días después de la inyección. Mediante la técnica de Western blot, descrita en el ejemplo 2, se comprobó la elevación de la expresión de CIRP en un número de tejidos tales como el ovario, el testículo, el útero, el corazón, el páncreas y la grasa (Figura 4). Otros órganos, sin embargo, no presentan elevaciones de CIRP sugiriendo una preferencia de estas moléculas por órganos concretos o una biodistribución compleja. La imagen proporcionada por el corazón nos permite ahondar en el posible mecanismo de acción por el que las moléculas identificadas en este estudio hacen que se eleve la expresión de CIRP. En este órgano se ve como el tejido sin tratar presenta una banda positiva para CIRP de tamaño inferior al esperado para esta molécula (19 kDa) que puede representar productos de degradación de CIRP. Sin embargo, en el corazón tratado con ZR17-2 se ve cómo esta banda disminuye en intensidad mientras que aparece la banda esperada de 19 kDa, sugiriendo que la molécula de pequeño tamaño, al unirse a CIRP, bloquea un sitio de corte por proteasas y, por lo tanto, prolonga la vida media de CIRP.

En los tejidos que están protegidos por una barrera fisiológica tales como el sistema nervioso central (corteza, cerebelo) y la retina, no se vieron aumentos en la expresión de CIRP (Figura 4). Para comprobar si se trataba de un efecto de barrera, se inyectaron 4 µl de la molécula ZR17-2 en el humor vítreo de la rata y se estudió la expresión de CIRP después de 2 o 4 días de tratamiento. Como se puede ver en la Figura 5 la retina experimentó un aumento muy intenso de expresión para CIRP.

Ejemplo 5. Cambio del fenotipo de la grasa blanca hacia el de la grasa beige.

10

La grasa blanca es la principal causante de la obesidad ya que no es fácil movilizar los lípidos almacenados en sus células, mientras que la grasa parda tiene la función de generar calor a partir de los lípidos acumulados. Además, un aumento considerable de la grasa blanca puede generar resistencia a la insulina debido a un estado de inflamación subclínica crónica (Kuryszko et al. 2016). Se ha comprobado que, en ciertas condiciones o en respuesta a ciertos tratamientos, algunas células de la grasa blanca pueden pasar a comportarse como la grasa parda originando lo que se ha dado en conocer como grasa beige (Wang y Yang 2016). Existe una serie de marcadores moleculares que son indicativos de esta transformación (Garcia et al. 2016). Por otro lado se ha comprobado que la activación de la grasa beige es beneficiosa para reducir la resistencia a la insulina y mejorar el metabolismo glucídico (Luo et al. 2016). Hoy en día los esfuerzos de toda la comunidad científica que estudia el metabolismo se centran en descubrir nuevas y eficaces técnicas capaces de “oscurecer” los adipocitos, ya que esta transformación llevaría a la pérdida de peso y la prevención de las consecuencias de la obesidad (Aldiss et al. 2017; Marzetti et al. 2016).

15

20

El compuesto ZR17-2 ha aumentado la expresión de CIRP en la grasa blanca (Figura 4). Se evaluaron los efectos del tratamiento sobre los marcadores de “oscurecimiento” de la grasa. Para ello, se inyectaron 3 ratones con vehículo y otros 3 con la molécula ZR17-2 (a 20 nanomoles/Kg) y 3 días después se extrajo RNA a partir de la grasa epididimal. El RNA se retrotranscribió a cDNA y se realizaron análisis de PCR a tiempo real con cebadores específicos para los genes: Tbx1, cidea, UCP1, PRDM16 y Cox8b. Todos los valores fueron relativizados dividiendo por la expresión del gen de referencia 18S. La Figura 6 recoge la expresión relativa de estos genes en los ratones control y en los que fueron tratados con ZR17-2. La mayor inducción se produjo para el gen UCP1, que aumentó unas 1000 veces sobre los valores basales. UCP1 es la proteína más importante en la cascada de la

25

30

35

termogénesis en la grasa parda y el mejor marcador del “oscurecimiento” de la grasa blanca (Bonet et al. 2017).

LISTA DE REFERENCIAS

- 5
Al-Fageeh MB, Smales CM (2006) Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems. *Biochem J* 397:247-259
- Al-Fageeh MB, Smales CM (2013) Alternative promoters regulate cold inducible RNA-binding (CIRP) gene expression and enhance transgene expression in mammalian cells. *Mol Biotechnol* 54:238-249
- 10
Aldiss P, Davies G, Woods R, Budge H, Sacks HS, Symonds ME (2017) 'Browning' the cardiac and peri-vascular adipose tissues to modulate cardiovascular risk. *Int J Cardiol* 228:265-274
- 15
Alkabie S, Boileau AJ (2016) The Role of Therapeutic Hypothermia After Traumatic Spinal Cord Injury--A Systematic Review. *World Neurosurg* 86:432-449
- 20
Andrews PJ, Sinclair HL, Rodriguez A, Harris BA, Battison CG, Rhodes JK, Murray GD (2015) Hypothermia for Intracranial Hypertension after Traumatic Brain Injury. *N Engl J Med* 373:2403-2412
- Arrich J, Holzer M, Havel C, Mullner M, Herkner H (2016) Hypothermia for neuroprotection in adults after cardiopulmonary resuscitation. *Cochrane Database Syst Rev* 2:CD004128
- 25
Bonet ML, Mercader J, Palou A (2017) A nutritional perspective on UCP1-dependent thermogenesis. *Biochimie* 134:99-117
- Chip S, Zelmer A, Ogunshola OO, Felderhoff-Mueser U, Nitsch C, Buhner C, Wellmann S (2011) The RNA-binding protein RBM3 is involved in hypothermia induced neuroprotection. *Neurobiol Dis* 43:388-396
- 30
Choi HA, Badjatia N, Mayer SA (2012) Hypothermia for acute brain injury--mechanisms and practical aspects. *Nat Rev Neurol* 8:214-222
- 35

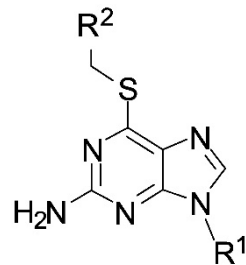
- Dingley J, Liu X, Gill H, Smit E, Sabir H, Tooley J, Chakkarapani E, Windsor D, Thoresen M (2015) The feasibility of using a portable xenon delivery device to permit earlier xenon ventilation with therapeutic cooling of neonates during ambulance retrieval. *Anesth Analg* 120:1331-1336
- 5
- Garcia RA, Roemmich JN, Claycombe KJ (2016) Evaluation of markers of beige adipocytes in white adipose tissue of the mouse. *Nutr Metab (Lond)* 13:24
- Jo JW, Lee JR, Jee BC, Suh CS, Kim SH (2015) Exposing mouse oocytes to necrostatin 1 during in vitro maturation improves maturation, survival after vitrification, mitochondrial preservation, and developmental competence. *Reprod Sci* 22:615-625
- 10
- Kiefer FW (2016) Browning and thermogenic programming of adipose tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 30:479-485
- 15
- Kuryszko J, Slawuta P, Sapikowski G (2016) Secretory function of adipose tissue. *Pol J Vet Sci* 19:441-446
- Larrayoz IM, Rey-Funes M, Contartese DS, Rolon F, Sarotto A, Dorfman VB, Loidl CF, Martinez A (2016) Cold Shock Proteins Are Expressed in the Retina Following Exposure to Low Temperatures. *PLoS One* 11:e0161458
- 20
- Liu J, Xue J, Zhang H, Li S, Liu Y, Xu D, Zou M, Zhang Z, Diao J (2015) Cloning, expression, and purification of cold inducible RNA-binding protein and its neuroprotective mechanism of action. *Brain Res* 1597:189-195
- 25
- Logan SM, Storey KB (2016) Tissue-specific response of carbohydrate-responsive element binding protein (ChREBP) to mammalian hibernation in 13-lined ground squirrels. *Cryobiology* 73:103-111
- 30
- Luo X, Jia R, Zhang Q, Sun B, Yan J (2016) Cold-Induced Browning Dynamically Alters the Expression Profiles of Inflammatory Adipokines with Tissue Specificity in Mice. *Int J Mol Sci* 17:
- 35
- Lyden P, Ernstrom K, Cruz-Flores S, Gomes J, Grotta J, Mullin A, Rapp K, Raman R, Wijman C, Hemmen T (2012) Determinants of effective cooling during endovascular hypothermia. *Neurocrit Care* 16:413-420

- Marzetti E, D'Angelo E, Savera G, Leeuwenburgh C, Calvani R (2016) Integrated control of brown adipose tissue. *Heart Metab* 69:9-14
- 5 Morrison SF (2016) Central neural control of thermoregulation and brown adipose tissue. *Auton Neurosci* 196:14-24
- Papile LA, Baley JE, Benitz W, Cummings J, Carlo WA, Eichenwald E, Kumar P, Polin RA, Tan RC, Wang KS (2014) Hypothermia and neonatal encephalopathy. *Pediatrics* 133:1146-
10 1150
- Ruf T, Geiser F (2015) Daily torpor and hibernation in birds and mammals. *Biol Rev Camb Philos Soc* 90:891-926
- 15 Salerian AJ, Saleri NG (2008) Cooling core body temperature may slow down neurodegeneration. *CNS Spectr* 13:227-229
- Tamames I, King C, Bas E, Dietrich WD, Telischi F, Rajguru SM (2016) A cool approach to reducing electrode-induced trauma: Localized therapeutic hypothermia conserves residual
20 hearing in cochlear implantation. *Hear Res* 339:32-39
- Thoresen M (2015) Who should we cool after perinatal asphyxia? *Semin Fetal Neonatal Med* 20:66-71
- 25 Wang S, Yang X (2016) Inter-organ regulation of adipose tissue browning. *Cell Mol Life Sci*
Wu CW, Biggar KK, Storey KB (2013) Biochemical adaptations of mammalian hibernation: exploring squirrels as a perspective model for naturally induced reversible insulin resistance. *Braz J Med Biol Res* 46:1-13
- 30 Wu L, Sun HL, Gao Y, Hui KL, Xu MM, Zhong H, Duan ML (2016) Therapeutic Hypothermia Enhances Cold-Inducible RNA-Binding Protein Expression and Inhibits Mitochondrial Apoptosis in a Rat Model of Cardiac Arrest. *Mol Neurobiol*
- Yenari MA, Han HS (2012) Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia.
35 *Nat Rev Neurosci* 13:267-278

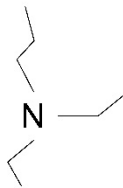
Zhang HT, Xue JH, Zhang ZW, Kong HB, Liu AJ, Li SC, Xu DG (2015) Cold-inducible RNA-binding protein inhibits neuron apoptosis through the suppression of mitochondrial apoptosis. *Brain Res* 1622:474-483

REIVINDICACIONES

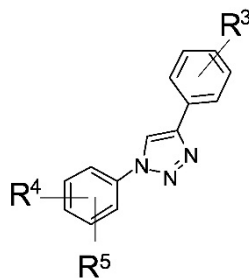
1. Uso de un compuesto seleccionado del grupo compuesto por un compuesto de fórmula (I)



- 5 donde R¹ está seleccionado del grupo compuesto por -CH₂-fenilo y CH₂-fenilo-OMe,



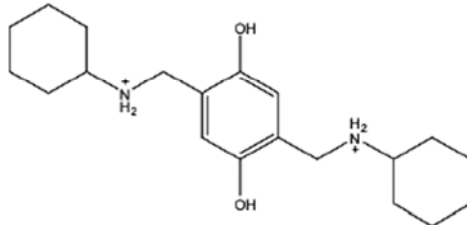
y R² es -COOH o -COOMe,
un compuesto de fórmula (II)



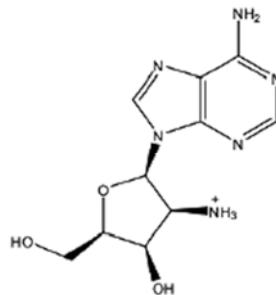
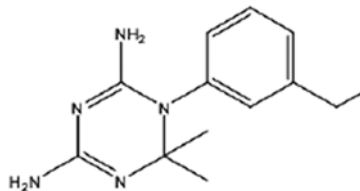
10

donde R³ es hidroxilo,

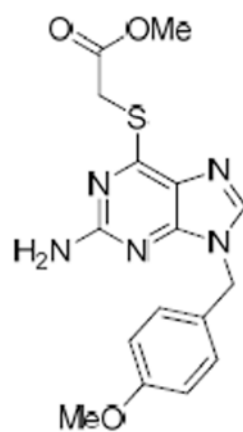
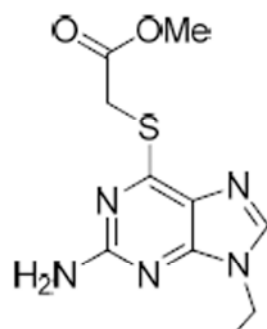
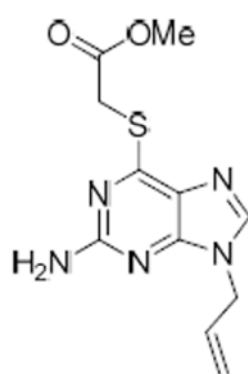
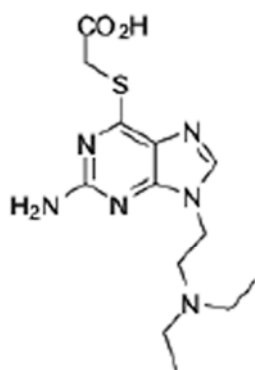
R⁴ y R⁵ están independientemente seleccionados del grupo compuesto por halógeno, alquilo C₁-C₆ y CF₃ y compuestos de fórmula



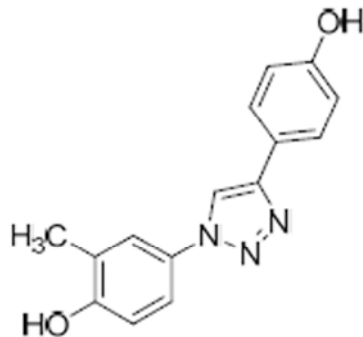
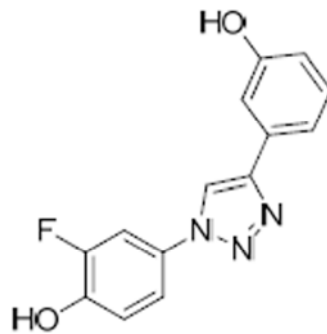
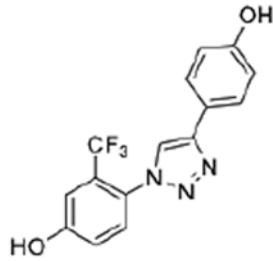
5



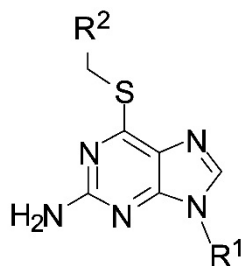
- en la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento por activación de la expresión de la proteína CIRP (ribonucleoproteína heterogénea A18 [hnRNP A18]) de una enfermedad de un animal homeotermo, donde la enfermedad está seleccionada del grupo compuesto por infartos de miocardio, resucitación cardiopulmonar, ictus hemorrágico, encefalopatía isquémica neonatal, asfixia perinatal, pérdida de audición residual en implantes cocleares, isquemia aguda, lesiones de la médula espinal, retraso del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas crónicas, traumatismos cerebrales y oculares, obesidad, diabetes y síndrome metabólico.
- 10
- 15 2. Uso según la reivindicación 1, caracterizado por que el compuesto de fórmula (I) está seleccionado del grupo compuesto por



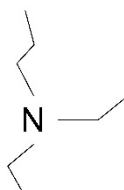
3. Uso según la reivindicación 1, caracterizado por que el compuesto de fórmula (II) está seleccionado del grupo compuesto por



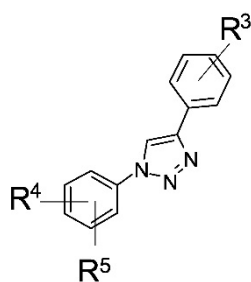
- 5 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el animal homeotermo es un humano.
5. Uso según la reivindicación 4, caracterizado por que el animal homeotermo es un animal doméstico o animal de granja.
6. Una composición que comprende un compuesto seleccionado del grupo compuesto por
- 10 un compuesto de fórmula (I)



donde R¹ está seleccionado del grupo compuesto por -CH₂-fenilo y CH₂-fenilo-OMe,



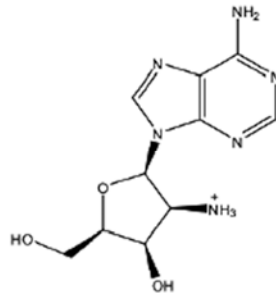
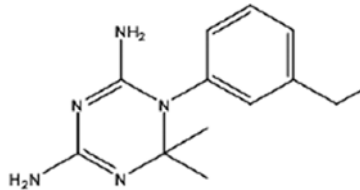
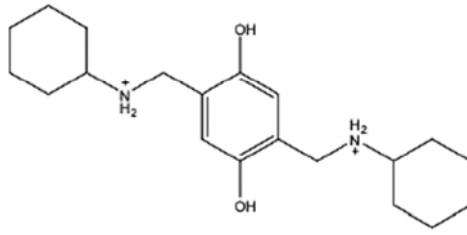
5 y R² es -COOH o -COOMe,
un compuesto de fórmula (II)



donde R³ es hidroxilo,

R⁴ y R⁵ están independientemente seleccionados del grupo compuesto por halógeno,
alquilo C₁-C₆ y CF₃

10 y compuestos de fórmula



- 5 junto con excipientes farmacéuticamente aceptables.
7. Uso de la composición según la reivindicación 6 en la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento por activación de la expresión de la proteína CIRP (ribonucleoproteína heterogénea A18 [hnRNP A18]) de una enfermedad de un animal homeotermo, donde la enfermedad está seleccionada del grupo compuesto por infartos de miocardio, resucitación cardiopulmonar, ictus hemorrágico, encefalopatía isquémica neonatal, asfixia perinatal, pérdida de audición residual en implantes cocleares, isquemia aguda, lesiones de la médula espinal, retraso del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas crónicas, traumatismos cerebrales y oculares, obesidad, diabetes y síndrome metabólico.
- 10

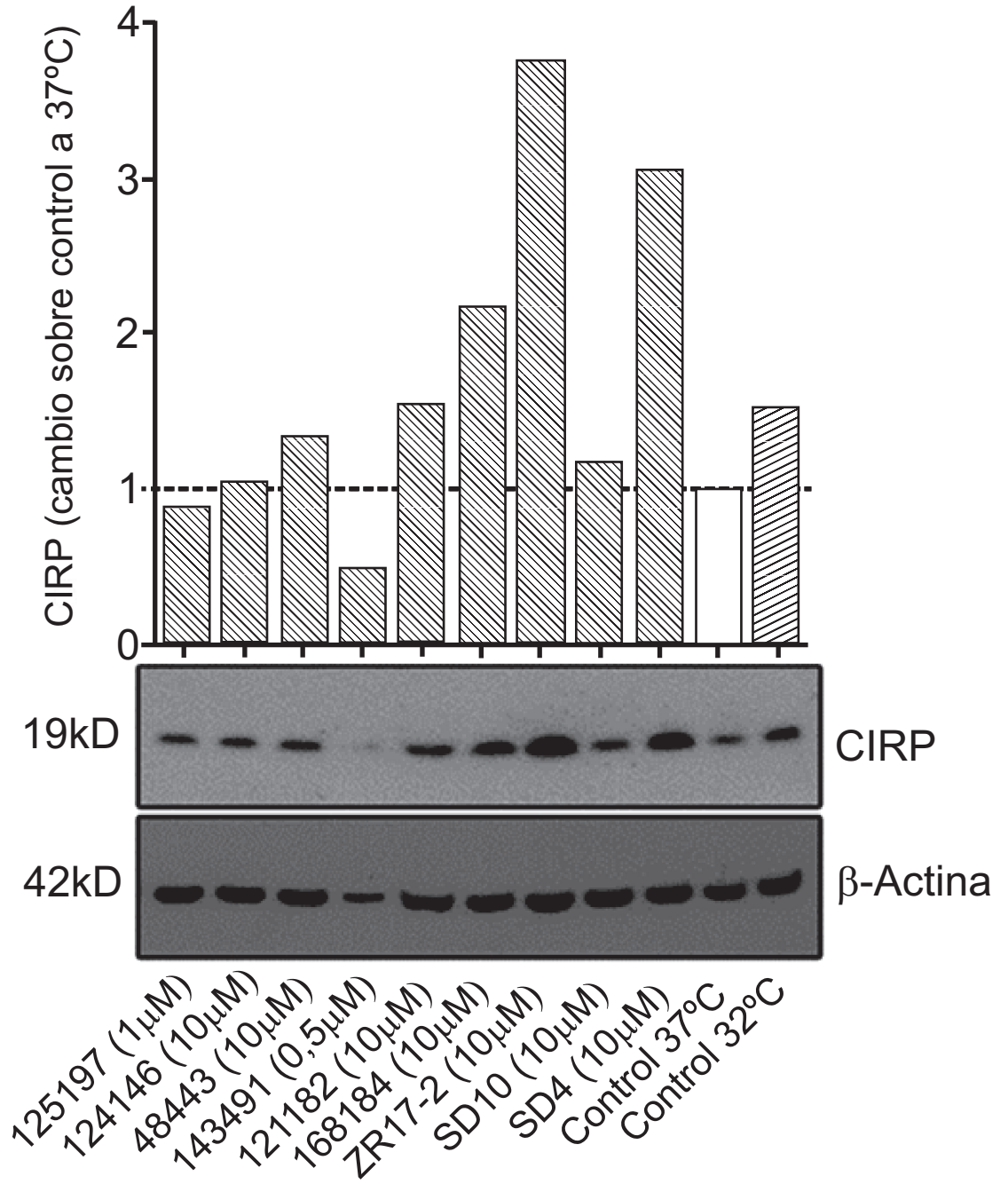


Fig. 1

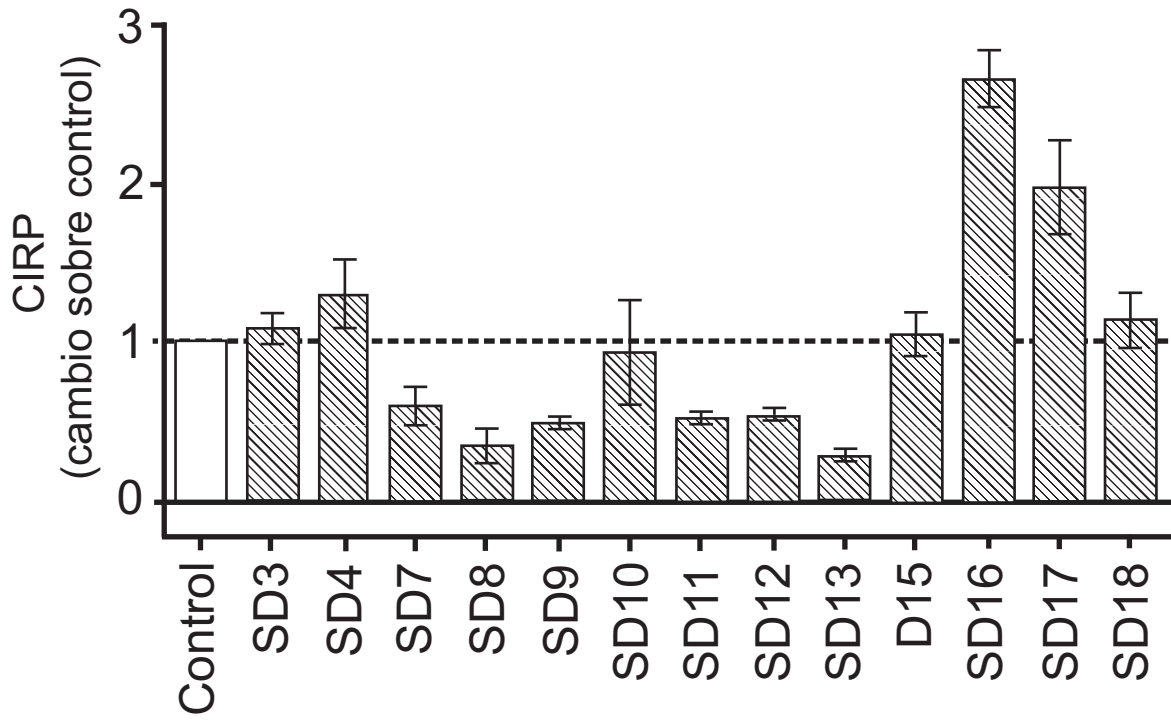


Fig. 2

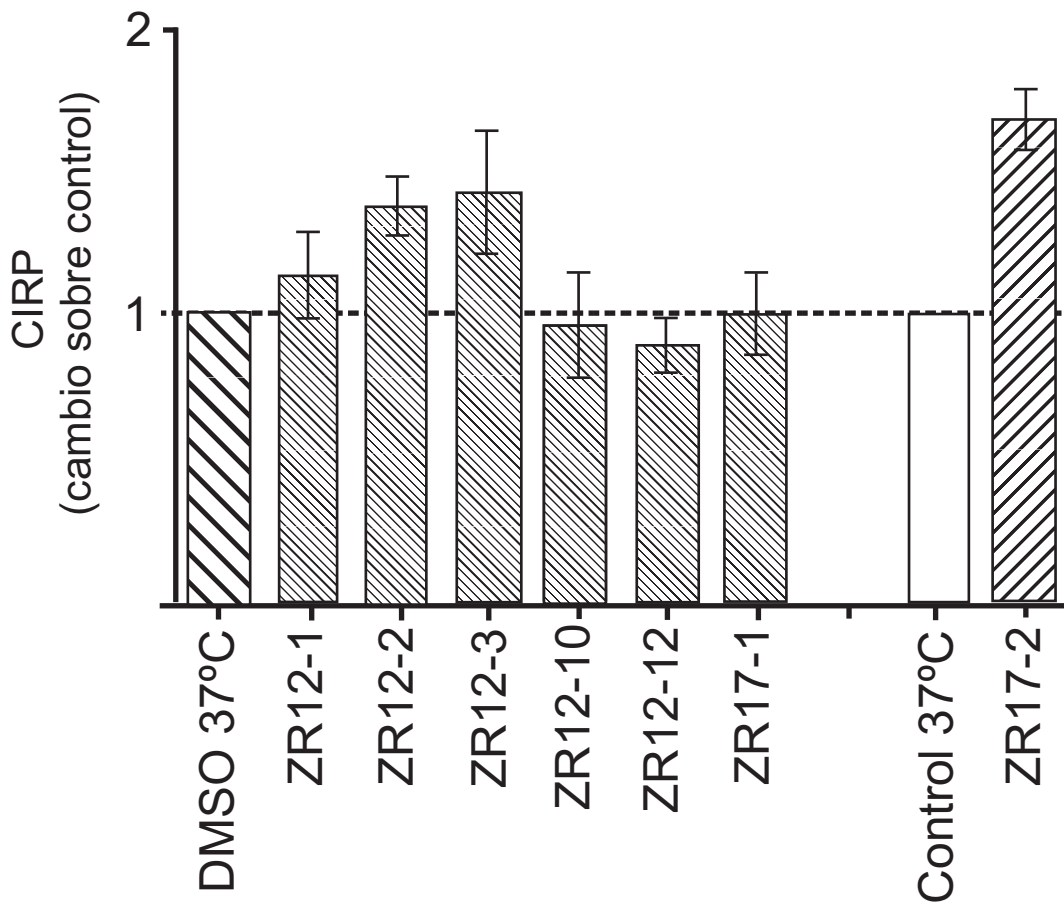


Fig. 3

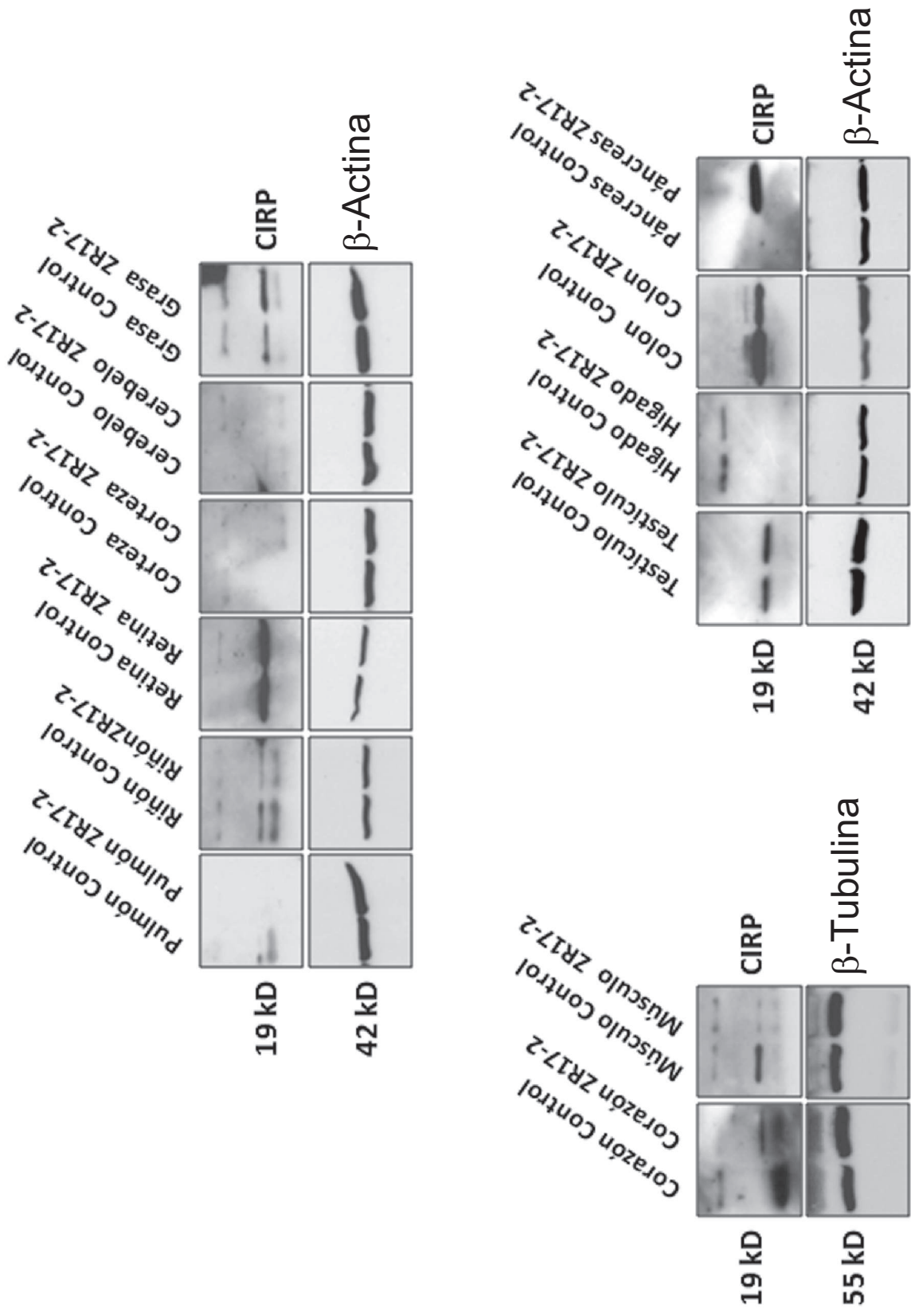


Fig. 4

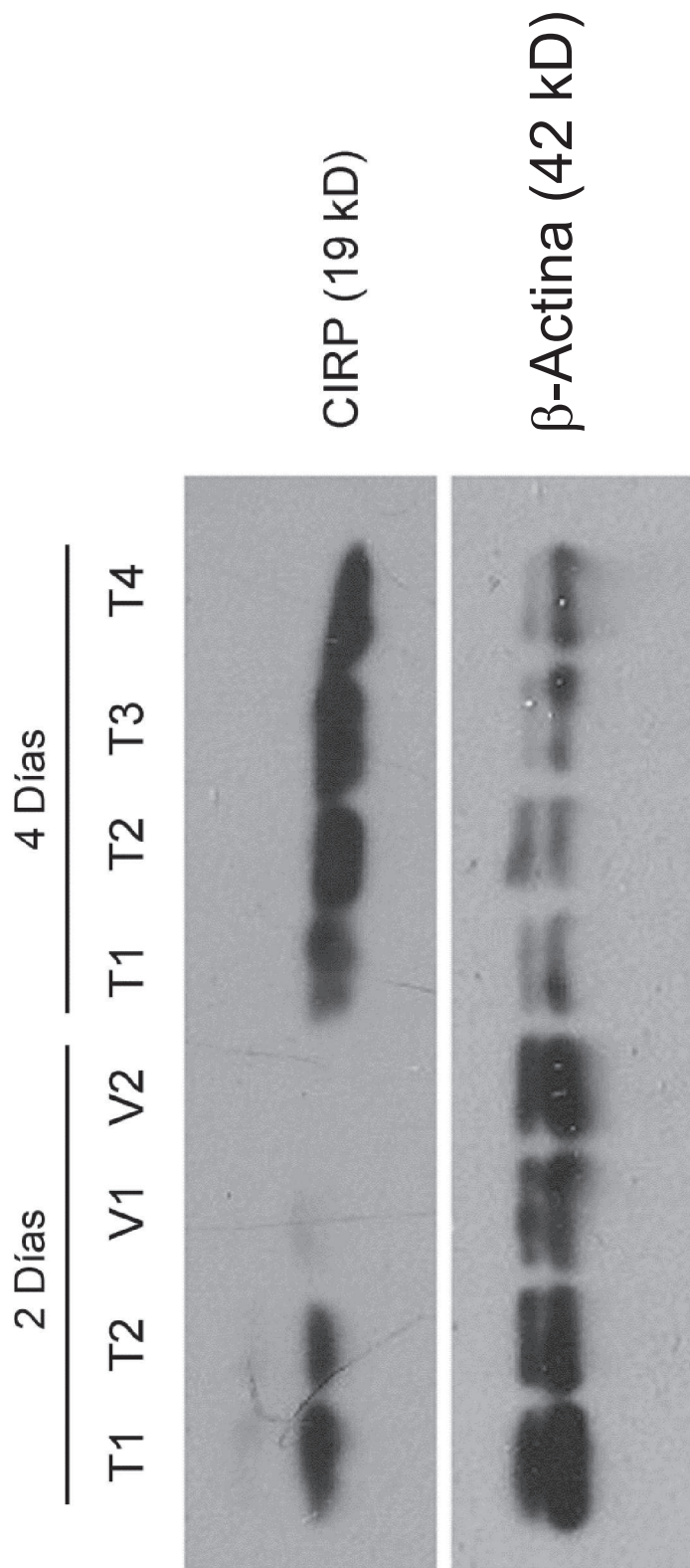


Fig. 5

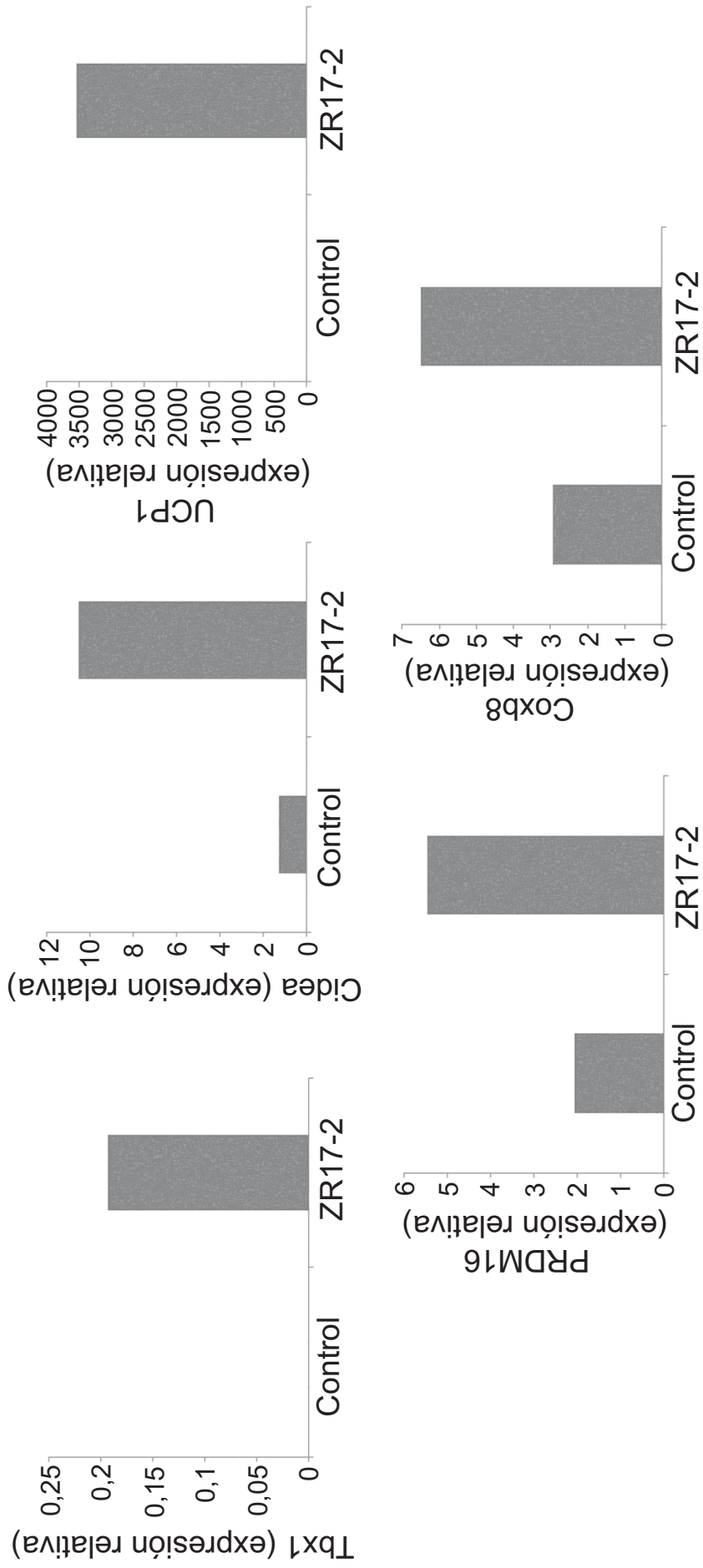


Fig. 6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201730249

②² Fecha de presentación de la solicitud: 24.02.2017

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MASLYK, MACIEJ et al. In search of a new prototype in ck2 inhibitors design. ARKIVOC, 2010, Vol. iii, Páginas 54-71, <DOI: http://dx.doi.org/10.3998/ark.5550190.0012.306 >. Esquema 1, compuestos 8 y 9	1-7
A	NOELL C W et al. Potential purine antagonists. xxxi. the preparation of certain 9-alkyl-2-amino-6-purinethiols and related derivatives as antitumor agents.. Journal of medicinal and pharmaceutical chemistry United States May 1962. 30/04/1962, Vol. 91, Páginas 558 - 588, ISSN 0095-9065 (Print), <DOI: pubmed: 14056392 >. Página 563, fórmula X, Tabla V.	1-7
A	DEMKOWICZ, Sebastian et al. New clicked full agonists of the estrogen receptor beta. The Royal Society of Chemistry, 2013, Vol. 3, Páginas 3697-3706, <DOI: 10.1039/c3ra00122a >. Figura 2	1-7
A	Pagliai Francesca et al. Rapid synthesis of triazole-modified resveratrol analogues via click chemistry. Journal of Medicinal Chemistry JAN 26 2006. 26/01/2006, Vol. 49, N° 2, Páginas 467-470, ISSN 0022-2623(print) ISSN 1520-4804(electronic), <DOI: doi: 10.1021/jm051118z >. Figura 1	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

08.01.2019

Examinador

H. Aylagas Cancio

Página

1/6



- ②① N.º solicitud: 201730249
②② Fecha de presentación de la solicitud: 24.02.2017
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	Koehler M G et al. A molecular shape analysis and quantitative structure-activity relationship investigation of some triazine-antifolate inhibitors of leishmania dihydrofolate reductase. archives of biochemistry and biophysics, 19881001 Academic Press, US. 01/10/1988, Vol.266, N° 1, Páginas 152 - 161, ISSN 0003-9861, <DOI: doi:10.1016/0003-9861(88)90245-7>. Tabla I, compuesto a7.	1-7
A	BOOTH R G et al. Quantitative structure-activity relationship of triazine-antifolate inhibition of leishmania dihydrofolate reductase and cell growth. Journal of Medicinal Chemistry 1987. 30/11/1986, Vol. 30, N° 7, Páginas 1218-1224, ISSN 0022-2623. Tabla I, compuesto 10	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
08.01.2019

Examinador
H. Aylagas Cancio

Página
2/6

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/52 (2006.01)

A61K31/4192 (2006.01)

A61K31/05 (2006.01)

A61K31/53 (2006.01)

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

A61K

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

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, REGISTRY, CAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 08.01.2019

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-7	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-7	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MASLYK, MACIEJ et al .ARKIVOC, Vol. iii, Páginas 54-71, <DOI: http://dx.doi.org/10.3998/ark.5550190.0012.306 >	2010
D02	NOELL, C. W et al. Journal of medicinal and pharmaceutical chemistry United States May 1962. Vol. 91, Páginas 558 - 588, ISSN 0095-9065 (Print), <DOI: pubmed:14056392>	30.04.1962
D03	DEMKOWICZ, Sebastian et al. The Royal Society of Chemistry, Vol.3, Páginas 3697-3706, <DOI:10.1039/c3ra00122a>	2013
D04	PAGLIAI FRANCESCA et al. Journal of Medicinal Chemistry Vol. 49, Nº 2, Páginas 467-470, ISSN 0022-2623(print) ISSN:1520-4804(electronic), <DOI:doi:10.1021/jm051118z>	26.01.2006
D05	KOEHLER M G et al..Archives of biochemistry and biophysics, 19881001 Academic Press, US. Vol. 266, Nº 1, Páginas 152 - 161, ISSN 0003-9861, <DOI: doi:10.1016/0003-9861(88)90245-7>	01.10.1988
D06	BOOTH R G et al.Journal of Medicinal Chemistry 1987. Vol. 30, Nº 7, Páginas 1218-1224, ISSN 0022-2623	30.11.1986

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

La presente solicitud se refiere al uso de compuestos de fórmulas I, II, III, IV y V en la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento por activación de la expresión de la proteína CIRP (ribonucleoproteína heterogénea A18) de una enfermedad de un animal homeotermo. Así mismo se reivindica la composición farmacéutica que comprende dichos compuestos.

Los documentos D1 y D2 se refieren a la síntesis de compuestos derivados de purinas, todos ellos con estructuras semejantes a las del compuesto de fórmula I de la reivindicación 1 (ver compuestos 7 y 8 del esquema 1 del documento D1 y ver compuesto X, página 563 y tabla V del documento D2). Los compuestos del documento D1 tienen actividad como inhibidores de CK2 y los del documento D2 como inhibidores de adenocarcinoma in vivo.

El documento D3 se refiere a la síntesis de compuestos 1,2,3 triazoles sustituidos por 1,4 difenilos y su uso como agonistas del receptor estrógeno beta. En la figura 2 el compuesto 2a y el compuesto 3b son exactamente los mismos compuestos de fórmula II de la reivindicación 3 cuando los radicales R4 y R5 son CF3 y OH o F y OH. Asimismo los compuestos 2c, 2d, 3c y 3d de la figura 2 entran dentro de la definición de la fórmula II de la reivindicación 1.

El documento D4 se refiere a compuestos derivados del resveratrol y modificados con la introducción de un grupo triazol (ver figura 1). Estos compuestos entran dentro del ámbito del compuesto de fórmula II de la reivindicación 1 mejorando las propiedades citotóxicas y antiproliferativas del resveratrol.

Los documentos D5 y D6 se refieren al compuesto derivado de triazina que se reivindica en las reivindicaciones 1 y 6 de la solicitud. El compuesto 17 de la tabla I (documento D6) y el compuesto 10 de la tabla I (documento D7) son exactamente el compuesto reivindicado. Se cita su actividad como inhibidores de la Leishmania dihidrofolato reductasa.

Por lo tanto, si bien algunos de los compuestos incluidos en las reivindicaciones de la solicitud son conocidos en el estado de la técnica, la actividad farmacológica reivindicada no se encuentra recogida en ninguno de los documentos citados ni deriva de ninguna combinación relevante de los mismos.

Por lo tanto, a la vista de los documentos citados, las reivindicaciones 1-7 de la presente solicitud tienen novedad y actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.