

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 894 744**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4709	(2006.01) A61P 31/18	(2006.01)
A61K 33/26	(2006.01) A61K 45/06	(2006.01)
A61K 33/30	(2006.01)	
A61K 33/32	(2006.01)	
A61K 33/34	(2006.01)	
A61P 25/00	(2006.01)	
A61P 25/28	(2006.01)	
A61P 3/08	(2006.01)	
A61P 3/00	(2006.01)	
A61P 31/14	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.07.2018 PCT/EP2018/068010**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2019 WO19007996**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2018 E 18740141 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.07.2021 EP 3648794**

54 Título: **Uso de complejos metálicos de macroazapiridinofanos en el tratamiento de enfermedades**

30 Prioridad:

04.07.2017 EP 17382429

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.02.2022

73 Titular/es:

**BIONOS BIOTECH, S.L. (100.0%)
Biopolo La Fe - Hospital La Fe (Torre A), Av.
Fernando Abril Martorell, 106
46026 Valencia, ES**

72 Inventor/es:

**MULLOR SANJOSÉ, JOSÉ LUIS;
VÁZQUEZ MANRIQUE, RAFAEL y
GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, DAVID**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 894 744 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de complejos metálicos de macroazapiridinofanos en el tratamiento de enfermedades

5

CAMPO DE LA INVENCIÓN

10

La presente invención se refiere a complejos metálicos de macroazapiridinofanos, y composiciones de los mismos, para uso en el tratamiento y la prevención de enfermedades relacionadas con la acumulación de depósitos intracelulares y/o enfermedades relacionadas con autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa tal como se define en las reivindicaciones.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15

Los lisosomas y los proteasomas son las dos rutas celulares principales para eliminar la acumulación de depósitos intracelulares. Mientras que los lisosomas son cruciales en la descomposición de proteínas, ácidos nucleicos o lípidos en las células a través de la endocitosis, en un proceso conocido como autofagia, los proteasomas son los principales responsables para las proteínas intracelulares en eucariotas.

20

La autofagia es un proceso de degradación lisosómico usado para reciclar constituyentes celulares obsoletos y eliminar orgánulos dañados y agregados de proteínas. El proceso de autofagia comprende múltiples etapas: después de la inducción de la autofagia, partes del citoplasma, que pueden incluir orgánulos completos, son capturados por una membrana doble, formando un autofagosoma. A continuación, los autofagosomas se fusionan con endosomas y lisosomas formando autolisosomas. Es entonces cuando tiene lugar la digestión completa de los orgánulos y las macromoléculas. La elongación de la membrana autofagosómica es controlada principalmente mediante dos sistemas de conjugación de proteínas. Un sistema implica la conjugación de Atg12 y Atg5 y el otro implica la conversión de la forma citosólica de LC3, conocida como LC3-I, en la forma lipídica, conocida como LC3-II, que está asociada con la membrana autofagosómica. Actualmente, el nivel de la proteína LC3-II es el biomarcador más aceptado y usado de actividad de autofagia.

25

30

Por otro lado, varios estudios han demostrado que, durante el envejecimiento, la proteostasis se colapsa dando lugar a la acumulación de proteínas no plegadas, mal plegadas o agregadas, provocando muchas enfermedades relacionadas con la edad. Uno de los principales mecanismos para el mantenimiento del proteoma es el sistema de proteasoma, que asegura la retirada de proteínas dañadas o mal plegadas, y por tanto desempeña un papel central en el retraso del envejecimiento.

35

Finalmente, varias enfermedades presentan defectos en la autofagia y la actividad proteasómica, provocando que las células acumulen proteínas, lípidos u otras moléculas. De hecho, las neuronas son células particularmente vulnerables a la autofagia o la actividad proteasómica deterioradas. Por ejemplo, la huntingtina mutante, proteína responsable de la enfermedad de Huntington, se expresa de manera ubicua en mamíferos. Sin embargo, sólo el sistema nervioso experimenta un deterioro sustancial después de que esta molécula colapse en agregados y se acumule en y alrededor del núcleo de las neuronas. Cada uno de los otros tejidos y tipos de células permanecen aparentemente no afectados. Por tanto, las enfermedades que presentan depósitos o acumulación de proteínas claramente tienen un problema celular para eliminar esos depósitos internos a través de o bien autofagia o bien actividad proteasómica.

40

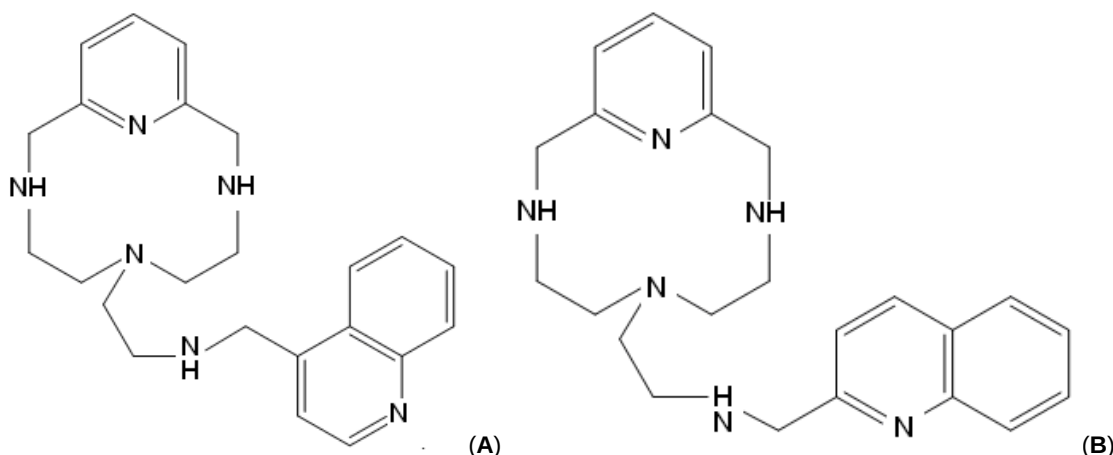
45

Por tanto, existe la necesidad de tratar enfermedades que presentan acumulación de depósitos intracelulares, en las que dicha acumulación es debida a deficiencias metabólicas que dan como resultado una acumulación anómala de esos depósitos y en las que la autofagia celular o la actividad proteasómica normales no es capaz de eliminarlos, o enfermedades en las que dicha acumulación es debida a una autofagia o actividad proteasómica defectuosas.

50

Las patentes concedidas EP2492270 y US9145386 se refieren a complejos metálicos que comprenden un compuesto descrito a continuación como A o B. Dicho compuesto comprende una estructura central de poliazapiridinofano macrocíclico con un heterociclo de quinolona unido a dicha estructura central y en el que dicho heterociclo de quinolona se une a través de la posición 4 a un grupo (o puente) metileno que se une, a su vez, al grupo -NH de una cadena de etilamina unida a dicha estructura central de triazapiridinofano (mostrada como **A** a continuación), o, alternativamente, en la que dicho heterociclo de quinolona se une a través de la posición 2 al grupo metileno que se une, a su vez, al grupo -NH de una cadena de etilamina unida a dicha estructura central de triazapiridinofano (mostrada como **B** a continuación).

55

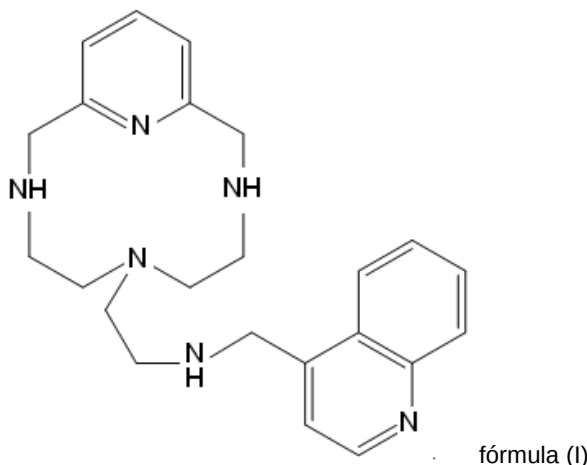


Dicha familia de complejos metálicos, que comprende los compuestos mostrados como A o B anteriores, son útiles, según las patentes citadas, para tratar terapéuticamente enfermedades "cuya etiología se debe a perturbaciones en la actividad de, o una deficiencia de, SOD endógena" (consúltese el documento EP2492270 [0001]).

T. NGUYEN ET AL: "Clioquinol down-regulates mutant huntingtin expression in vitro and mitigates pathology in a Huntington's disease mouse model", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 102, núm. 33, 16 Agosto 2005, páginas 11840-11845, describe clioquinol para el tratamiento de la enfermedad de Huntington, en el que el clioquinol inhibe la acumulación de agregados de proteína huntingtina in vivo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un complejo metálico que comprende un compuesto de fórmula general (I)



y al menos un ion metálico, para uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la acumulación de depósitos intracelulares, y/o enfermedades relacionadas con autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa tal como se define en las reivindicaciones.

Los complejos metálicos descritos en el presente documento presentan, por tanto, un triazapiridinofano central unido por la posición 4 de un grupo quinolona.

Los datos experimentales dados a conocer en la presente descripción se refieren sólo a una selección de dicha familia de complejos metálicos, en la que el heterociclo quinolona que presenta dicha familia de complejos metálicos se une por la posición 4 a la estructura central de triazapiridinofano (mostrada como A).

Una realización dada a conocer se refiere a los complejos metálicos descritos anteriormente en el presente documento para uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la acumulación de depósitos intracelulares y/o enfermedades relacionadas con autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa, tal como se define en las reivindicaciones, en los que dicho ion metálico es un ion metálico divalente.

Otra realización dada a conocer se refiere a los complejos metálicos descritos anteriormente en el presente documento para uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la acumulación de depósitos intracelulares y/o

enfermedades relacionadas con autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa, tal como se define en las reivindicaciones, en los que dicho ion metálico divalente puede seleccionarse independientemente entre Cu(II), Fe(II), Zn(II) o Mn(II).

- 5 Otra realización de los complejos metálicos descritos anteriormente para uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la acumulación de depósitos intracelulares y/o enfermedades relacionadas con autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa, tal como se define en las reivindicaciones, es un complejo metálico (II) que comprende un compuesto de fórmula (I) y Mn(II).
- 10 Los datos experimentales descritos muestran que la activación de autofagia y/o actividad proteasómica está presente solo para una selección específica de la familia de complejos metálicos de triazapiridinofano divulgada en los documentos de patente mencionados anteriormente (EP2492270, US9145386 y WO 2015124824 A1). De hecho, la presente invención se refiere a la selección específica de complejos metálicos, en los que el resto de quinolona se une a la estructura central de triazapiridinofano por la posición 4, para uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la acumulación de depósitos intracelulares y/o enfermedades relacionadas con autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa, tal como se define en las reivindicaciones.

De manera adicional, una realización de la presente invención se refiere a composiciones que comprenden una cantidad eficaz de un complejo metálico que comprende un compuesto de fórmula general (I), tal como se describió anteriormente en el presente documento, y al menos un ion metálico; junto con al menos un excipiente o vehículo, para uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la acumulación de depósitos intracelulares, y/o enfermedades relacionadas con autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa tal como se define en las reivindicaciones. Preferentemente, dicho ion metálico es un ion metálico divalente, más preferentemente, dicho ion metálico divalente puede seleccionarse independientemente entre Cu(II), Fe(II), Zn(II) o Mn(II), e incluso más preferentemente es Mn(II).

La invención se define en las reivindicaciones. Cualquier materia que cae fuera del ámbito de las reivindicaciones se proporciona con propósito informativo solamente. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para uso en un método para el tratamiento del cuerpo animal o humano mediante terapia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1A y 1B: niveles de LC3-II en fibroblastos humanos en presencia o ausencia del complejo metálico (II). La **Figura 1A** muestra el efecto del complejo metálico (II) en los niveles de LC3-II para líneas celulares de control (C1 y C2) y líneas celulares de pacientes con Lafora (L1, L2 y M1) en medios completos y privados de nutrientes (Krebs-Henseleit). La **Figura 1B** muestra el efecto del complejo metálico (II) en los niveles de LC3-II para líneas celulares de control (C1 y C2) y líneas celulares de Lafora L3 y M1 en medios completos y privados de nutrientes. La **Figura 1C** muestra fibroblastos humanos de pacientes con Lafora (mostrados como L-3) y fibroblastos de humanos sanos (mostrados como C-1), transfectados con GFP-LC3 fluorescente, en ausencia o presencia de complejo metálico (II) 5 μ M durante 6 horas. Los puntos visibles muestran las vacuolas autofágicas. La línea blanca en la parte inferior de la figura se usa como referencia y representa 10 μ M.

Figura 2: niveles de LC3-II en fibroblastos humanos (líneas celulares 3349B y 3348D) sanos o con mutaciones en laforina (L1 para mutaciones de laforina en 3349B y L2 para mutaciones de laforina en 3348D) y malina (M1 para mutaciones de malina en 3349B) en ausencia (marcados como 1) o presencia del complejo metálico (II) a concentraciones de 1 μ M, 5 μ M y 10 μ M (marcados como 2, 3 y 4 respectivamente). Se usó rapamicina como control positivo (marcada como 5). La marca 5* es un error de carga.

Figura 3: estudios *in vitro* para mostrar la activación proteasómica similar a quimotripsina con el complejo metálico (II) en fibroblastos dérmicos humanos. Los resultados se miden en unidades relativas de luminiscencia (URL) normalizadas con respecto al control. La **Figura 3B** muestra la prueba llevada a cabo con el complejo metálico (II) a 5 μ M frente al control de células sin tratar, y la **Figura 3A** muestra el ensayo llevado a cabo con Pytren 2Q, también a 5 μ M, frente a un control de células sin tratar. Pytren 2Q es, al igual que el complejo metálico (II), también un complejo de Mn(II) que comprende una estructura central de triazapiridinofano, pero en el que el heterociclo quinolona se une a dicha estructura central de triazapiridinofano por la posición 2. Por tanto, el heterociclo de quinolona en Pytren 2Q se une a la estructura central de triazapiridinofano por la posición 2 y no por la posición 4 como en el caso de los complejos metálicos descritos en el presente documento.

Figura 4: representación gráfica del gusano *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) modelo e instrumento para evaluar la sensibilidad táctil suave (pelo de ceja pegado al extremo de un palillo).

La **Figura 5A** muestra una imagen confocal de la cabeza de un gusano transgénico (*C. elegans*) que muestra la expresión de 110Q::TdTomato en neuronas mecanosensoriales FLP (mostradas en un círculo). El tejido en color gris claro es el marcador para la transgénesis (es decir, proteína fluorescente verde (GFP) expresada en la faringe). La **Figura 5B** muestra una imagen confocal que muestra las neuronas FLP que expresan agregados de 110Q::TdTomato (mostradas en un círculo). La **Figura 5C** muestra ensayos táctiles en tres cepas independientes que expresan 110Q::TdTomato y

muestran deterioro neuronal (mecanosensación más baja que animales de tipo natural). La **Figura 5D** muestra cómo el complejo metálico (II) es capaz de rescatar el deterioro neuronal debido a la expresión de 110Q::TdTomato de una manera dependiente de su dosis. La prueba se llevó a cabo usando animales sin tratar (que expresan 110Q::TdTomato y muestran deterioro neuronal) como control C. Los resultados en la **Figura 5C y 5D** se presentaron como el % de individuos que mostraron respuesta táctil. Se usó metformina (METF) como control positivo.

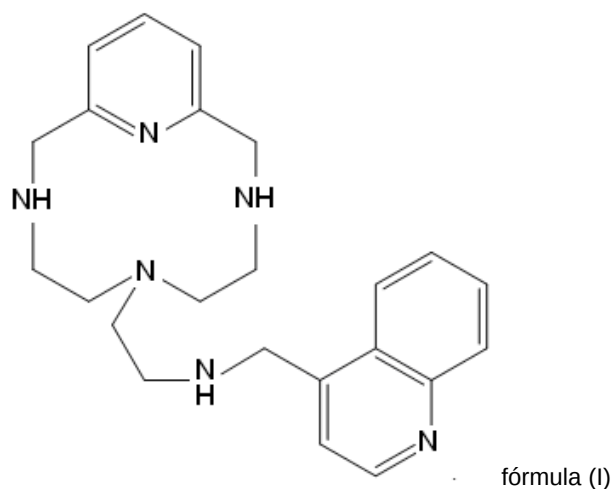
La **Figura 6** muestra los resultados del ensayo con tres replicas representadas en la Figura 5D, en la que el complejo metálico (II) fue evaluado a diferentes concentraciones para determinar la sensibilidad táctil suave en el modelo de enfermedad de Huntington de *C. elegans*. Los ensayos se llevaron a cabo usando animales sin tratar (que expresan 110Q::TdTomato y muestran deterioro neuronal) como control C. Los resultados se presentan como el % de sujetos que muestran una respuesta táctil. Se usó metformina (METF) como control positivo.

La **Figura 7** muestra cómo el complejo metálico (II) es capaz de rescatar el deterioro neuronal debido a la expresión de 110Q::TdTomato de una manera dependiente de su dosis, frente al compuesto 2Q que no produce ningún cambio significativo en las dosis sometidas a prueba. La prueba se llevó a cabo usando animales sin tratar (que expresan 110Q::TdTomato y muestran deterioro neuronal) como control C. Se usó metformina como control positivo. Los resultados se presentan como el % de sujetos que muestran un movimiento de respuesta táctil.

La **Figura 8** muestra cómo el complejo metálico (II) es capaz de rescatar el deterioro neuronal debido a la expresión de 110Q::TdTomato (3ª columna desde la izquierda) en comparación con animales sin tratar (que expresan 110Q::TdTomato y muestran deterioro neuronal) como control (1ª columna desde la izquierda). Los resultados se presentan como el % de sujetos que muestran una respuesta táctil. Sin embargo, cuando se usó un inhibidor específico de la autofagia como la cloroquina en combinación con el complejo metálico (II), no se detectó el rescate (4ª columna desde la izquierda). La cloroquina no induce deterioro adicional en la respuesta táctil (2ª columna desde la izquierda) con respecto al deterioro debido a la expresión de 110Q::TdTomato (1ª columna desde la izquierda).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se refiere, por tanto, a un complejo metálico que comprende un compuesto de fórmula general (I)



y al menos un ion metálico, para uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la acumulación de depósitos intracelulares, y/o enfermedades relacionadas con autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa tal como se define en las reivindicaciones.

Tal como se describe en el presente documento, un complejo metálico se refiere a una asociación molecular de un compuesto con al menos un ion metálico, en particular a una asociación molecular del compuesto de fórmula general (I) con al menos un ion metálico.

Una realización de la presente invención se refiere a complejos metálicos que comprenden un compuesto de fórmula (I) y al menos un ion metálico, para uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la acumulación de depósitos intracelulares y/o enfermedades relacionadas con autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa, tal como se define en las reivindicaciones, en los que dicho ion metálico es un ion metálico divalente.

Otra realización de la presente invención se refiere a complejos metálicos que comprenden un compuesto de fórmula (I) y al menos un ion metálico, para uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la acumulación de depósitos intracelulares y/o enfermedades relacionadas con autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa, tal como

se define en las reivindicaciones, en los que dicho ion metálico divalente se selecciona independientemente de Cu(II), Fe(II), Zn(II) o Mn(II).

5 En otra realización de la presente invención, el complejo metálico es un complejo metálico (II) que comprende un compuesto de fórmula (I) y Mn(II).

10 En el contexto de la presente invención, las enfermedades relacionadas con la acumulación de depósitos intracelulares y/o enfermedades relacionadas con autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa se refieren a: enfermedad de Huntington, enfermedad priónica, glomeruloesclerosis focal y segmentaria, enfermedades relacionadas con una deficiencia de AAT (deficiencia de alfa-1-antitripsina), esfingolipidosis, enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NPC), enfermedad de Wolman y tesaurismosis por ésteres de colesterol (EAEC), glucogenosis, galactosemia, intolerancia hereditaria a la fructosa, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de piruvato, deficiencia de fosfoglicerato cinasa, enfermedad de Lafora, adrenoleucodistrofia, miopatías vacuolares autofágicas, enfermedad de Danon, cavernoma cerebral (CC), distrofia corneal granular tipo 2 (DCG2), insuficiencia renal crónica (IRC), enfermedades musculares hereditarias tales como miopatía de Bethlehem, distrofia muscular congénita de Ullrich y mioesclerosis, miositis por cuerpos de inclusión; infecciones virales como VIH, adenovirus, hepatitis B o VHTL; síndrome de Sjogren; septicemia o acidosis metabólica.

20 En particular, una realización de la presente invención se refiere a un complejo metálico que comprende un compuesto de fórmula (I) y al menos un ion metálico, para uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la acumulación de depósitos intracelulares y/o autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa, según la presente invención, en la que dichas enfermedades se seleccionan independientemente de entre enfermedad de Huntington, enfermedad priónica, cataratas, glomeruloesclerosis focal y segmentaria, enfermedades relacionadas con una deficiencia de AAT, esfingolipidosis, enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NPC), enfermedad de Wolman y tesaurismosis por ésteres de colesterol (EAEC), glucogenosis, galactosemia, intolerancia hereditaria a la fructosa, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de piruvato, deficiencia de fosfoglicerato cinasa, enfermedad de Lafora, adrenoleucodistrofia, miopatías vacuolares autofágicas, enfermedad de Danon, cavernoma cerebral (CC), distrofia corneal granular tipo 2 (DCG2), insuficiencia renal crónica (IRC), miopatía de Bethlehem, distrofia muscular congénita de Ullrich, mioesclerosis, miositis por cuerpos de inclusión, VIH, adenovirus, hepatitis B, VHTL; síndrome de Sjogren, septicemia y acidosis metabólica.

25 Preferiblemente, dichas enfermedades se seleccionan independientemente de entre la enfermedad de Lafora, adrenoleucodistrofia y enfermedad de Huntington. Más preferiblemente, dicha enfermedad es la enfermedad de Lafora o la enfermedad de Huntington.

30 Los complejos metálicos que comprenden un compuesto de fórmula (I) y al menos un ion metálico descritos en el presente documento, estimulan o activan la autofagia y la actividad proteasómica, en células que presentan autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa. Los complejos metálicos descritos en el presente documento también son capaces de reducir los síntomas de enfermedades que presentan autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa.

35 Una realización de la presente invención se refiere a los complejos metálicos que comprenden un compuesto de fórmula (I) y al menos un ion metálico, descritos anteriormente en el presente documento para uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la acumulación de depósitos intracelulares y/o enfermedades relacionadas con autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa, en la que dichas enfermedades son enfermedades relacionadas con la edad.

40 A efectos de la presente descripción, las enfermedades relacionadas con la edad son enfermedades asociadas con la senescencia creciente que, a su vez, está asociada con el envejecimiento celular y la acumulación de daño celular, en particular, la acumulación de depósitos intracelulares que son depósitos de lípidos, hidratos de carbono o proteínas.

45 En el contexto de esta descripción, dichas enfermedades relacionadas con la edad, que a su vez están asociadas con la acumulación de depósitos de lípidos, hidratos de carbono o proteínas, se refieren a: enfermedades relacionadas con una deficiencia de AAT (deficiencia de alfa-1-antitripsina), enfermedad de Huntington, enfermedad priónica, glomeruloesclerosis focal y segmentaria, esfingolipidosis, enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NPC), enfermedad de Wolman y tesaurismosis por ésteres de colesterol (EAEC), glucogenosis, galactosemia, intolerancia hereditaria a la fructosa, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de piruvato y deficiencia de fosfoglicerato cinasa.

50 Otra realización de la presente invención se refiere a los complejos metálicos que comprenden un compuesto de fórmula (I) y al menos un ion metálico, descritos anteriormente en el presente documento, para uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la acumulación de depósitos intracelulares y/o enfermedades relacionadas con autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa, en la que dicha enfermedad se selecciona independientemente entre enfermedad de Lafora y enfermedad de Huntington. Una realización de la presente invención se refiere a los complejos metálicos que comprenden un compuesto de fórmula (I) y al menos un ion metálico, descritos anteriormente en el presente documento, para uso en el tratamiento de enfermedades que presentan acumulación de depósitos intracelulares. En una realización preferida, dichas enfermedades se seleccionan entre enfermedad de Lafora, adrenoleucodistrofia y enfermedad de Huntington, más preferiblemente enfermedad de Lafora o enfermedad de Huntington.

65

La enfermedad de Lafora, también denominada epilepsia mioclónica progresiva de Lafora o MELF (por sus siglas en inglés) es un trastorno genético recesivo autosómico caracterizado por la presencia de cuerpos de inclusión (cuerpos de Lafora), dentro del citoplasma de las células del corazón, el hígado, los músculos y la piel. Los pacientes con Lafora presentan mutaciones en las proteínas laforina o malina.

Los complejos metálicos que comprenden un compuesto de fórmula (I) y al menos un ion metálico, dados a conocer en el presente documento, activan la autofagia en células de pacientes con enfermedad de Lafora, con mutaciones en las proteínas laforina y malina, que presentan autofagia deficiente, tal como se muestra en el EJEMPLO 1 (**Figuras 1 y 2**). De hecho, en el EJEMPLO 1, fueron evaluados fibroblastos de individuos sanos y fibroblastos de pacientes con enfermedad de Lafora. Los resultados muestran que todos los fibroblastos tienen niveles superiores de proteína LC3-II después del tratamiento con el complejo metálico (II), en el que la cantidad de LC3-II indica el nivel de activación de la autofagia (**Figuras 1 y 2**).

Se llevó a cabo un primer ensayo con medios completos y con medios privados de nutrientes. La retirada parcial de los nutrientes de los medios de cultivo emula un estado de privación de nutrientes de las células (medios privados de nutrientes) y provoca que la célula active la autofagia para obtener energía a partir de la degradación de estructuras internas.

La autofagia deficiente presente en pacientes con Lafora se muestra en la Figura **1A**, la Figura **1B**, en las que líneas celulares sin tratar con mutaciones en laforina y malina (L1, L2, L3 o M1) muestran un nivel de LC3-II menor que las líneas celulares de control sin tratar (C1 y C2), en medios, tanto completos, como privados de nutrientes.

Tanto los fibroblastos de control, como los fibroblastos de pacientes con Lafora (**Figura 1A y 1B**), tienen niveles superiores de proteína LC3-II después del tratamiento durante 6 horas con el complejo metálico (II), a una concentración de 5 μ M. En medios privados de nutrientes, y en ausencia de complejo metálico (II), se observa un incremento del nivel de proteína LC3-II cuando se compara con la prueba realizada con las mismas células en medios completos, confirmando que la autofagia aumenta en ausencia de nutrientes. El tratamiento con el complejo metálico (II) aumenta los niveles de LC3-II, incluso más, en comparación con los niveles en células sin tratar, confirmando el aumento de los niveles de autofagia en las células tratadas con complejo metálico (II).

Se llevó a cabo otro estudio evaluando el complejo metálico (II) a concentraciones de 1, 5 y 10 μ M. Se midieron los niveles de LC3-II en fibroblastos humanos sanos o en fibroblastos humanos con mutaciones en laforina y malina en ausencia (marcados como 1) o presencia de complejo metálico (II) a concentraciones de 1 μ M, 5 μ M y 10 μ M (marcados como 2, 3 y 4, respectivamente). Se usó rapamicina como control positivo (marcada como 5). De nuevo, se observa en este ensayo la autofagia deficiente presente en pacientes con Lafora en la **Figura 2** que compara el nivel de LC3-II en células sanas sin tratar con células de Lafora sin tratar. Los resultados del ensayo se muestran en la **Figura 2**, en la que el complejo metálico (II) aumentó la autofagia cuando fue añadido a los medios, mostrando niveles mayores de proteína LC3-II en fibroblastos humanos normales, así como en fibroblastos deficientes en laforina o malina.

Considerando que la cantidad de LC3-II indica el nivel de activación de la autofagia, dichos datos indican que el complejo metálico (II) estimula o activa la autofagia en células sanas y en células con autofagia deficiente.

Usando un experimento diferente para estudiar el efecto en la autofagia de los complejos metálicos descritos en el presente documento, se realizó un experimento de fluorescencia con células transfectadas con GFP-LC3 (**Figura 1C**). En este experimento, se evaluaron fibroblastos humanos sanos (control C-1) y fibroblastos de pacientes con Lafora (L-3) en ausencia o presencia de complejo metálico (II). Los resultados mostrados en la **Figura 1C** indican que la autofagia (medida mediante el aumento de vacuolas autofágicas) aumenta en presencia de complejo metálico (II), lo cual indica de nuevo que el complejo metálico (II) estimula o activa la autofagia.

La enfermedad de Huntington está provocada por una mutación dominante autosómica en cualquiera de las dos copias de un gen denominado Huntingtin (Htt) del individuo. La función de Htt en humanos no está clara. El aumento de las repeticiones triplete CAG (citosina-adenina-guanina) en el gen que codifica para la proteína huntingtina da como resultado una proteína anómala que codifica un grupo largo de glutaminas, y que es propensa a agregarse consigo misma y con otras proteínas. Este estado "pegajoso" de huntingtina mutante (mHtt) interfiere con muchos eventos neuronales importantes (por ejemplo, la transmisión sináptica, el transporte axonal, la transcripción, etc.) y daña de manera gradual las células en el cerebro a través de mecanismos que no son entendidos completamente. Por tanto, esta enfermedad está provocada por una acumulación de proteína mHtt en las neuronas. La degradación de estos depósitos a través de la activación proteasómica y/o de autofagia con los complejos metálicos descritos en el presente documento da como resultado una recesión de los síntomas, tal como se muestra para el modelo de enfermedad de Huntington de *C. elegans* en el EJEMPLO 3.

C. elegans detectan y responden a diversos estímulos mecánicos usando un circuito neuronal. Estos estímulos incluyen el estímulo táctil suave administrado al cuerpo, tacto áspero al cuerpo medio, tacto áspero a la cabeza o la cola, toque de nariz y textura. El método inicial y más generalmente usado para someter a prueba la sensibilidad táctil suave es acariciar a los animales con un pelo de ceja que se ha pegado al extremo de un palillo (**Figura 4**).

Los animales *C. elegans* usados en el EJEMPLO 3 expresaron 110CAG fusionadas en marco con el gen para la proteína fluorescente roja TdTomato en neuronas mecanosensoriales (110Q::TdTomato), tal como se muestra en la Figura 5A y 5B. Los animales que expresan 110Q::TdTomato presentan un deterioro neuronal en comparación con animales de tipo natural (WT), tal como se muestra en la Figura 5C, en la que el % de animales que muestran una respuesta táctil obtenida en la prueba llevada a cabo con los animales deteriorados neuronalmente que expresan 110Q::TdTomato (tres cepas diferentes) es significativamente menor que el obtenido con animales WT.

La Figura 5D (y las 3 réplicas de dicho ensayo mostrados en la figura 6) muestra una mejora significativa del % de individuos que muestran una respuesta táctil en animales tratados con el complejo metálico (II) cuando se comparan con la de animales sin tratar, de una manera dependiente de la dosis. Por tanto, los resultados indican que los complejos metálicos de la presente invención, ejemplificados por el complejo metálico (II), son capaces de mejorar significativamente los síntomas mostrados en el modelo de enfermedad de Huntington de *C. elegans* que expresa 110Q::TdTomato, de una manera dependiente de la dosis.

A diferencia de esta actividad, en la Figura 7 no se muestra una mejora significativa del % de respuesta táctil en animales tratados con 2Q cuando se compara con la de animales sin tratar, y por tanto, 2Q no mejoró significativamente la respuesta táctil en el modelo de enfermedad de Huntington de *C. elegans* para ninguna de las dosis ensayadas.

Sorprendentemente, las diferencias estructurales entre 2Q y el complejo metálico (II) son responsables de la activación proteasómica y/o de autofagia proporcionadas por la familia específica de complejos metálicos descritos en el presente documento. Tal como se describió anteriormente, los complejos metálicos que comprenden un compuesto de fórmula (I) y al menos un ion metálico descritos en el presente documento, presentan un grupo quinolona unido por la posición 4 a la estructura central de triazapiridofano de la molécula, mientras que 2Q, que es un compuesto que también presenta una estructura central de triazapiridofano, presenta dicho grupo quinolona unido, en cambio, por la posición 2.

Todos los resultados mostrados anteriormente respaldan firmemente que el complejo metálico (II) es capaz de rescatar el efecto tóxico producido por 110Q::TdTomato en neuronas y que aumenta significativamente el % de animales que muestran una respuesta táctil.

También se evaluó si este efecto de rescate neuronal se produce específicamente por autofagia. Esto se llevó a cabo tal como se explica en el EJEMPLO 3, en el que los gusanos de *C. elegans* se incubaron en presencia del complejo metálico (II) y cloroquina, que es un inhibidor de la autofagia bien conocido. Tal como muestra la FIGURA 8, los animales cultivados en presencia de ambos compuestos no muestran rescate, lo que sugiere que el efecto beneficioso del complejo metálico II es debido a la autofagia. Otra realización de la presente invención se refiere a los complejos metálicos que comprenden un compuesto de fórmula (I) y al menos un ion metálico, descritos anteriormente en el presente documento, para uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la actividad proteasómica defectuosa.

El EJEMPLO 2 muestra cómo los compuestos de la presente invención, ejemplificados por el complejo metálico (II) estimulan la actividad proteasómica (Figura 3B). También se sometió a prueba 2Q en las mismas condiciones de prueba. La Figura 3A muestra que, a diferencia de la actividad mostrada por el complejo metálico (II), el compuesto 2Q no estimula la actividad proteasómica.

De nuevo, esos resultados indican que la diferencia estructural entre 2Q y el complejo metálico (II), en el que el heterociclo quinolona se une a una estructura central de triazapiridofano por la posición 2, en lugar de por la posición 4, respectivamente, proporciona sorprendentemente la activación proteasómica y/o de autofagia de la selección de complejos metálicos descritos en el presente documento.

Una realización de la presente invención se refiere a una composición, o una composición farmacéutica, que comprende un complejo metálico que comprende un compuesto de fórmula general (I) y al menos un ion metálico, tal como se describió anteriormente en el presente documento; junto con al menos un excipiente o vehículo, para uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la acumulación de depósitos intracelulares y/o enfermedades relacionadas con autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa, tal como se define en las reivindicaciones.

A efectos de la presente descripción, excipientes o vehículos aceptables son agua, solución salina, alcoholes, polietilenglicoles, aceite de ricino polihidroxietoxilado, aceite de cacahuete, aceite de oliva, lactosa, alabastro, glucosa, fructosa, manitol, ciclodextrina, amilosa, estearato de magnesio, talco, gelatina, agar, pectina, almidón, goma arábiga, ácido esteárico o éteres de alquilo inferior de celulosa, ácido silícico, ácidos grasos, aminas de ácidos grasos, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de pentaeritritol, polioxietileno, hidroximetilcelulosa o polivinilpirrolidona, etc. Otra realización describe una composición que comprende una cantidad eficaz de un complejo metálico que comprende un compuesto de fórmula general (I) y al menos un ion metálico, tal como se describió anteriormente en el presente documento, junto con al menos un excipiente o vehículo, para uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la acumulación de depósitos intracelulares y/o enfermedades relacionadas con autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa, tal como se define en las reivindicaciones.

En general, se emplea una cantidad eficaz del compuesto de interés en el tratamiento. La dosificación de los compuestos usados según la invención varía dependiendo del compuesto y la condición a tratar, por ejemplo, la edad, el peso y la

situación clínica del paciente receptor. Otros factores incluyen: la vía de administración, el paciente, el historial médico del paciente, la gravedad del proceso de enfermedad y la potencia del compuesto particular. La dosis debe ser suficiente para mejorar los síntomas o signos de la enfermedad tratada sin producir una toxicidad inaceptable al paciente. En general, una cantidad eficaz del compuesto es aquella que proporciona, o bien alivio subjetivo de síntomas, o bien una mejora objetivamente identificable tal como identifica un médico u otro observador cualificado.

Otra realización de la presente invención se refiere a una composición para uso, tal como se describió anteriormente en el presente documento, que comprende una cantidad eficaz de un complejo metálico que comprende un compuesto de fórmula general (I) y al menos un ion metálico, tal como se describió anteriormente en el presente documento, junto con al menos un excipiente o vehículo, para uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la acumulación de depósitos intracelulares y/o enfermedades relacionadas con autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa, tal como se define en las reivindicaciones, en la que dicha composición comprende además, opcionalmente, al menos un segundo compuesto activo.

Dicho segundo compuesto activo corresponde a compuestos usados en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la acumulación de depósitos intracelulares y/o enfermedades relacionadas con autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa, tal como se define en las reivindicaciones, que incluye: metformina, ácidos nucleicos, anticuerpos, microARN, antioxidantes, compuestos polifenólicos, inhibidores dopaminérgicos, inhibidores de colinesterasa, riluzol, curcumina y terapias celulares.

Por tanto, una realización de la presente invención se refiere a una composición para su uso, tal como se describió anteriormente en el presente documento, en la que dicho segundo principio activo se selecciona independientemente entre metformina, un ácido nucleico, un anticuerpo, un microARN, un antioxidante, un compuesto polifenólico, un inhibidor dopaminérgico, un inhibidor de colinesterasa, riluzol y curcumina.

En una realización de la presente invención, la composición comprende una cantidad eficaz de un complejo metálico que comprende un compuesto de fórmula general (I) y al menos un ion metálico, tal como se describió anteriormente en el presente documento, junto con al menos un excipiente o vehículo, en la que dicho ion metálico es un ion divalente. Más preferiblemente, dicho ion metálico divalente se selecciona entre Cu(II), Fe(II), Zn(II) y Mn(II).

Otra realización de la presente invención se refiere a una composición que comprende una cantidad eficaz de un complejo metálico que comprende un compuesto de fórmula general (I) y al menos un ion metálico, tal como se describió anteriormente en el presente documento, y al menos un excipiente o vehículo, para uso tal como se describió anteriormente en el presente documento, en la que dicho complejo metálico es el complejo metálico (II).

Otra realización de la presente invención se refiere a una composición tal como se describió anteriormente en el presente documento, para uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la acumulación de depósitos intracelulares y/o enfermedades relacionadas con autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa, en la que dichas enfermedades son enfermedades relacionadas con la edad.

Una realización de la presente invención se refiere a una composición tal como se describió anteriormente en el presente documento, para uso en el tratamiento de enfermedades que presentan acumulación de depósitos intracelulares. En una realización preferida, dichas enfermedades se seleccionan entre enfermedad de Lafora, adrenoleucodistrofia y enfermedad de Huntington, más preferiblemente enfermedad de Lafora o enfermedad de Huntington.

Otra realización de la presente invención se refiere a una composición que comprende una cantidad eficaz de un complejo metálico que comprende un compuesto de fórmula general (I) y al menos un ion metálico, tal como se describió anteriormente en el presente documento, junto con al menos un excipiente o vehículo, para uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la acumulación de depósitos intracelulares y/o enfermedades relacionadas con autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa, en la que dichas enfermedades se seleccionan independientemente entre enfermedad de Lafora y enfermedad de Huntington.

También se describe el uso de un complejo metálico que comprende un compuesto de fórmula general (I) y al menos un ion metálico, tal como se describió anteriormente en el presente documento, en la elaboración de un fármaco para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la acumulación de depósitos intracelulares y/o enfermedades relacionadas con autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa. Preferiblemente, dicho ion metálico es un ion divalente, más preferiblemente seleccionado independientemente de Cu(II), Fe(II), Zn(II) o Mn(II).

También se describe el uso de un complejo metálico que comprende un compuesto de fórmula general (I) y al menos un ion metálico, tal como se describió anteriormente en el presente documento, en la elaboración de un fármaco para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la acumulación de depósitos intracelulares y/o enfermedades relacionadas con autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa, en el que dicho complejo metálico es complejo metálico (II).

Una realización de la presente invención proporciona un método de tratamiento que comprende administrar una cantidad eficaz de un complejo metálico que comprende un compuesto de fórmula general (I) y al menos un ion metálico, tal como se describió anteriormente en el presente documento, a un individuo que padece una enfermedad que presenta

acumulación de depósitos intracelulares y/o enfermedades relacionadas con autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa. Preferiblemente, dicho ion metálico es un ion divalente, más preferiblemente seleccionado independientemente de Cu(II), Fe(II), Zn(II) o Mn(II).

Una realización descrita proporciona un método de tratamiento que comprende administrar una cantidad eficaz de un complejo metálico que comprende un compuesto de fórmula general (I) y al menos un ion metálico, tal como se describió anteriormente en el presente documento, a un individuo que padece una enfermedad relacionada con la acumulación de depósitos intracelulares y/o una enfermedad relacionada con autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa, en el que dicho complejo metálico es complejo metálico (II).

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Estudio de activación de autofagia en enfermedad de Lafora

Se evaluaron dos líneas de fibroblastos de individuos sanos (controles, C1 y C2) y tres líneas de fibroblastos de pacientes con enfermedad de Lafora (L1 y L2, deficientes en laforina; M1, deficiente en malina).

Todas las líneas celulares se tomaron de la colección del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF). Todas las líneas celulares usadas de pacientes con Lafora, deficientes en laforina [Aguado *et al.*, 2010, Human Molecular Genetics 19, 2867-2876; Knecht *et al.*, 2010, Autophagy, 6, 991-993] o malina [Criado *et al.*, 2012, Hum. Mol. Genetics 21, 1521-1533; Knecht *et al.*, 2012, Autophagy 8, 701-703] tienen una deficiencia en autofagia.

1.1. Estudio de niveles de LC3-II

Tal como se mencionó anteriormente, el nivel de la proteína LC3-II es, a día de hoy, el mejor biomarcador de la actividad de autofagia.

Se evaluaron mediante análisis por inmunotransferencia de tipo Western, tal como se describió previamente [Moruno-Manchon *et al.*, Biochem. J. 449, 497-506], los niveles de LC3-II en las líneas celulares mencionadas anteriormente (C1, C2, L1, L2, M1, A1, A2 y A3) las cuales fueron incubadas en medios completos y medios privados de nutrientes (es decir, retirando parcialmente los nutrientes de los medios de cultivo). Para determinar el flujo de autofagia, se ha inhibido la degradación lisosómica (con leupeptina 0,2 mM y NH₄Cl 20 mM), tal como describen [Fuertes *et al.*, 2003 Biochem. J. 375, 75-86] permitiendo, de ese modo, la acumulación de proteína LC3-II. Se usaron anticuerpos contra LC3 y contra actina (que se usó como control de carga).

Resultados del estudio 1:

El estudio 1 se llevó a cabo en las líneas celulares C1 y C2 (individuos sanos), L1, L2 y M1 (pacientes con Lafora), con y sin tratamiento con 5 μ M de complejo metálico (II).

El estudio se llevó a cabo, en cada caso, usando medios completos y usando medios privados de nutrientes. La retirada parcial de los nutrientes de los medios de cultivo emula un estado de privación de nutrientes de las células (medios privados de nutrientes) y provoca que la célula active la autofagia para obtener energía a partir de la degradación de estructuras internas. Tal como se muestra en la **Figura 1**, los fibroblastos de control (líneas celulares C1, C2), los fibroblastos de pacientes con Lafora (líneas celulares L1, L2 y M1 en la **Figura 1A** y líneas celulares L3 y M1 en la **Figura 1B**) tienen niveles superiores de proteína LC3-II después del tratamiento durante 6 horas con el complejo metálico (II), a una concentración de 5 μ M. Por tanto, los resultados indican un aumento de autofagia en líneas celulares, tanto sanas como de pacientes con Lafora, tratadas con complejo metálico (II).

Resultados del estudio 2:

Se estudiaron los niveles de LC3-II en fibroblastos humanos (3349B y 3348D) sanos o con mutaciones en laforina (L1 y L2) y malina (M1) en ausencia (marcados como 1) o presencia de complejo metálico II a concentraciones de 1 μ M, 5 μ M y 10 μ M (marcados como 2, 3 y 4, respectivamente). Se usó rapamicina como control positivo (marcada como 5).

Tal como se muestra en la **Figura 2**, el complejo metálico (II) a concentraciones de 1, 5 y 10 μ M mejoró los defectos de la autofagia cuando fue añadido a los medios de fibroblastos humanos deficientes en laforina y malina, en la que la cantidad de LC3-II indica el nivel de activación de autofagia.

1.2. Estudio del número de vacuolas autofágicas.

Este ensayo se llevó a cabo con el estudio de células transfectadas fluorescentes GFP-LC3, con el fin de determinar los niveles de autofagia en células tratadas con complejo metálico (II). Se transfectaron de manera transitoria fibroblastos humanos sanos y fibroblastos de pacientes con Lafora con 0,5 μ g de pEGFP-LC3 durante 6 horas. Aproximadamente 24 horas después de la transfección, se trataron parte de las células con el complejo metálico (II) 5 μ M durante 6 horas. Durante los últimos 90 minutos del tratamiento, se añadieron inhibidores lisosómicos (leupeptina 0,2 M + NH_4Cl 20 mM).

Tal como se muestra en la **Figura 1C**, el complejo metálico (II) aumentó el número de vacuolas autofágicas, y, por tanto, aumentó la autofagia, en fibroblastos humanos (tanto en fibroblastos humanos sanos como en fibroblastos humanos que presentan enfermedad de Lafora).

EJEMPLO 2: Estudio de la activación proteasómica similar a quimotripsina

Estudios *in vitro* para mostrar la activación proteasómica similar a quimotripsina con complejo metálico (II) en fibroblastos dérmicos humanos. Los resultados se miden en unidades relativas de luminiscencia (URL) normalizadas con respecto al control. La **Figura 3B** muestra que el tratamiento con complejo metálico (II), a una concentración de 5 μ M, estimula la actividad proteasómica similar a quimotripsina en un $64,0 \pm 16,0\%$ (valor de $p=0,0103$), cuando se compara con un control de fibroblastos dérmicos humanos primarios sin tratar. Este estudio también se llevó a cabo con 2Q (**Figura 3A**), que es un complejo de Mn(II) que también comprende una estructura central de triazapiridinofano, pero en la que el heterociclo quinolona de 2Q se une a la estructura central de triazapiridinofano por la posición 2 y no por la posición 4 tal como en los complejos metálicos descritos en el presente documento. Tal como se muestra en la **Figura 3A**, dicho compuesto no mostró ningún efecto significativo en la actividad proteasómica.

La tabla, a continuación, resume los resultados del ensayo llevada a cabo con el complejo metálico (II):

Gráfico analizado	Comp. Met. II
Columna B	Complejo metálico (II) a 5 μ M
frente a	frente a 5
Columna A	CONTROL
Prueba de la t para datos independientes	
Valor de P	0,0103
Sumario de valor de P	*
¿Significativamente diferente? (P < 0,05)	Sí 10
¿Valor de P de una o dos colas?	Dos colas
t, df	t=4,005 df=5
¿Cómo de grande es la diferencia?	
Media $\pm$ EEM de columna A	1,000 $\pm$ 0,1035 N=3
Media $\pm$ EEM de columna B	1,640 $\pm$ 0,1134 N=4 ¹⁵
Diferencia entre medias	0,6398 $\pm$ 0,1597
Intervalo de confianza del 95%	de 0,2291 a 1,050
R cuadrado	0,7624

Esto confirma que sólo los complejos metálicos descritos en el presente documento, en los que el grupo quinolona se une a la estructura central de triazapiridinofano por la posición 4, son útiles en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la acumulación de depósitos intracelulares y/o enfermedades relacionadas con autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa.

EJEMPLO 3: Activación de respuesta en el modelo de enfermedad de Huntington de *C. elegans*.

El estudio se llevó a cabo para evaluar si la administración de complejo metálico (II) mejora la neurosensibilidad (sensibilidad táctil suave) en el modelo de enfermedad de Huntington de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*).

C. elegans detecta y responde a diversos estímulos mecánicos usando un circuito neuronal. Estos estímulos incluyen estímulo táctil suave administrado al cuerpo, tacto áspero al cuerpo medio, tacto áspero a la cabeza o la cola, toque de nariz y textura.

El método inicial y más generalmente usado para evaluar la sensibilidad táctil suave es acariciar a los animales con un pelo de ceja que se ha pegado al extremo de un palillo (**Figura 4**).

Se usaron *C. elegans* que expresan 110CAG fusionados en marco con TdTomato en agregados de neuronas mecanosensoriales e inducen deterioro neuronal. La **Figura 5A** muestra una imagen confocal de la cabeza de un gusano *C. elegans* transgénico que muestra expresión de 110Q::TdTomato en neuronas mecanosensoriales FLP (mostradas en un círculo). El tejido en color gris claro es el marcador para la transgénesis (es decir, proteína fluorescente verde (GFP) expresada en la faringe). La **Figura 5B** muestra una imagen confocal con detalle que muestra las neuronas FLP que expresan agregados de 110Q::TdTomato (mostrados en un círculo).

El deterioro neuronal de *C. elegans* se muestra en la **Figura 5C**, en la que se evaluaron tres cepas independientes que expresan 110Q::TdTomato usando ensayos táctiles, tal como se describió anteriormente para la **Figura 4**. Las tres cepas evaluadas, que expresan 110Q::TdTomato, mostraron deterioro neuronal (menor mecanosensación mostrada como el % de individuos que muestran respuesta táctil), tal como se observa en la **Figura 5C**, cuando se compara con los resultados de animales naturales (marcados como WT).

La **Figura 5D** muestra cómo el complejo metálico (II) es capaz de rescatar el deterioro neuronal, debido a la expresión de 110Q::TdTomato, de una manera dependiente de la dosis. La prueba se llevó a cabo usando animales sin tratar (que expresan 110Q::TdTomato y, por tanto, muestran deterioro neuronal) como control C, y se usaron animales tratados con metformina a 2 mM como control positivo. Los resultados se basan en tres replicas experimentales mostradas en la **Figura 6**. Cada prueba se llevó a cabo tratando animales (que expresan 110Q::TdTomato y muestran deterioro neuronal) con concentraciones de 5, 10 y 20 μ M de complejo metálico (II), usando animales sin tratar como control y animales tratados con metformina a una concentración de 2 mM como control positivo.

La **Figura 7** muestra cómo el complejo metálico (II) es capaz de rescatar el deterioro neuronal debido a la expresión de 110Q::TdTomato de una manera dependiente de la dosis en comparación con el compuesto 2Q, que no produce ningún cambio significativo para las dosis ensayadas. El ensayo se llevó a cabo usando animales sin tratar (que expresan 110Q::TdTomato y muestran deterioro neuronal) como control C. De nuevo, se usó metformina como control positivo. Una vez más, estos datos indican que solamente la selección de complejos metálicos descritos en el presente documento, en los que el grupo quinolona se une a la estructura central de triazapiridinofano por la posición 4, son útiles en el tratamiento

de enfermedades relacionadas con la acumulación de depósitos intracelulares y/o enfermedades relacionadas con autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa.

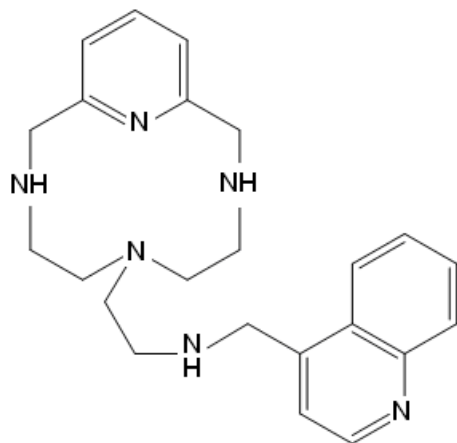
- 5 Finalmente, se evaluó si el rescate del deterioro neuronal debido a la expresión de 110Q::TdTomato mostrada con el tratamiento de complejo metálico (II) está producido por la activación de autofagia. Para este fin, se incubó el gusano *C. elegans* (que expresa 110Q::TdTomato y muestra deterioro neuronal) en presencia de complejo metálico (II) con y sin la presencia de cloroquina, un inhibidor de autofagia bien conocido. Como control, también se incubaron animales (que expresan 110Q::TdTomato y muestran deterioro neuronal) con y sin la presencia de cloroquina pero sin tratamiento con complejo metálico (II). Tal como muestra la **Figura 8**, los animales cultivados en presencia de ambos compuestos no
- 10 presentan un rescate del deterioro neuronal, lo cual sugiere que el efecto beneficioso del complejo metálico II es debido a la autofagia y no a otros posibles mecanismos.

Ejemplo 4: Toxicidad aguda, *in vivo*, de un complejo metálico de fórmula (I)

- 15 Para evaluar la toxicidad aguda, se administró el complejo metálico (II) *in vivo* a un total de 12 ratones divididos en 4 grupos de 3 ratones. El peso corporal de los ratones macho y hembra estaba entre 24 y 30 g y 17 y 22 g, respectivamente. El complejo metálico (II) se administró a los ratones por vía oral junto con un tampón fosfato salino (PBS) o con NaCl al 0,9%.
- 20 Los experimentos de toxicidad aguda no mostraron, ni muerte, ni actividad locomotora reducida, en los ratones sometidos a prueba (machos y hembras) a dosis de hasta 200 mg/kg administrados por vía oral, o bien en PBS o bien en NaCl al 0,9%.

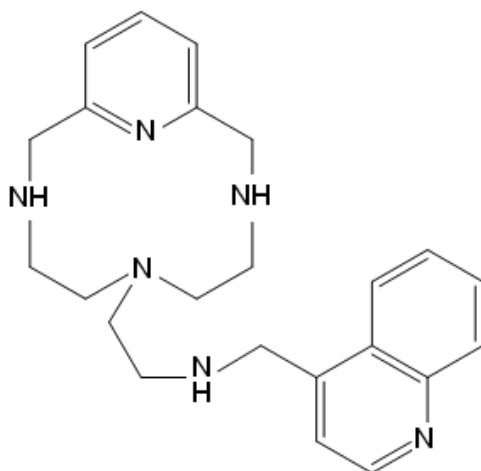
REIVINDICACIONES

1. Complejo metálico que comprende un compuesto de fórmula general (I)



fórmula (I)

- 5 y al menos un ion metálico, para uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la acumulación de depósitos intracelulares, y/o enfermedades relacionadas con autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa, en el que dichas enfermedades se seleccionan independientemente entre: enfermedad de Huntington, enfermedad priónica, enfermedades de amiloidosis, glomeruloesclerosis focal y segmentaria, enfermedades relacionadas con una deficiencia de alfa-1-antitripsina (AAT), esfingolipidosis, enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NPC), enfermedad de Wolman y tesarismosis por ésteres de colesterol (EAEC), glucogenosis, galactosemia, intolerancia hereditaria a la fructosa, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de piruvato, deficiencia de fosfoglicerato cinasa, enfermedad de Lafora, adrenoleucodistrofia, miopatías vacuolares autofágicas, enfermedad de Danon, cavernoma cerebral (CC), distrofia corneal granular tipo 2 (DCG2), insuficiencia renal crónica (IRC), miopatía de Bethlem, distrofia muscular congénita de Ullrich, mioesclerosis, miositis por cuerpos de inclusión, VIH, adenovirus, hepatitis B, síndrome de Sjogren, septicemia y acidosis metabólica.
- 10 2. Complejo metálico para uso, según la reivindicación 1, en el que dicho ion metálico es un ion metálico divalente.
3. Complejo metálico para uso, según la reivindicación 2, en el que dicho ion metálico divalente se selecciona entre Cu(II), Fe(II), Zn (II) y Mn(II).
4. Complejo metálico para uso, según la reivindicación 3, en el que dicho ion metálico divalente es Mn(II).
- 20 5. Complejo metálico para uso, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las enfermedades se seleccionan entre: enfermedad de Lafora, adrenoleucodistrofia y enfermedad de Huntington.
6. Composición que contiene una cantidad eficaz de un complejo metálico que comprende un compuesto de fórmula general (I)



fórmula (I)

- 25 y al menos un ion metálico; junto con al menos un excipiente o vehículo, para uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la acumulación de depósitos intracelulares, y/o enfermedades relacionadas con autofagia defectuosa y/o actividad proteasómica defectuosa, en la que dichas enfermedades se seleccionan

- independientemente entre: enfermedad de Huntington, enfermedad priónica, enfermedades de amiloidosis, glomeruloesclerosis focal y segmentaria, enfermedades relacionadas con una deficiencia de alfa-1-antitripsina (AAT), esfingolipidosis, enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NPC), enfermedad de Wolman y tesaurismosis por ésteres de colesterol (EAEC), glucogenosis, galactosemia, intolerancia hereditaria a la fructosa, mucopolisacaridosis,
- 5 trastornos del metabolismo de piruvato, deficiencia de fosfoglicerato cinasa, enfermedad de Lafora, adrenoleucodistrofia, miopatías vacuolares autofágicas, enfermedad de Danon, cavernoma cerebral (CC), distrofia corneal granular tipo 2 (DCG2), insuficiencia renal crónica (IRC), miopatía de Bethlem, distrofia muscular congénita de Ullrich, mioesclerosis, miositis por cuerpos de inclusión, VIH, adenovirus, hepatitis B, síndrome de Sjogren, septicemia y acidosis metabólica.
- 10 7. Composición para uso, según la reivindicación 6, en la que dicha composición comprende además un segundo principio activo.
8. Composición para uso, según la reivindicación 7, en la que dicho segundo principio activo se selecciona independientemente entre: metformina, un ácido nucleico, un anticuerpo, un microARN, un antioxidante, un compuesto polifenólico, un inhibidor dopaminérgico, un inhibidor de colinesterasa, riluzol y curcumina.
- 15 9 Composición para uso, según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en la que dicho ion metálico es un ion metálico divalente.
10. Composición para uso, según la reivindicación 9, en la que dicho ion metálico divalente se selecciona entre Cu(II), Fe(II), Zn(II) y Mn(II).
- 20 11. Composición para uso, según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en la que las enfermedades se seleccionan entre: enfermedad de Lafora, adrenoleucodistrofia y enfermedad de Huntington.

FIGURA 1

FIG. 1A

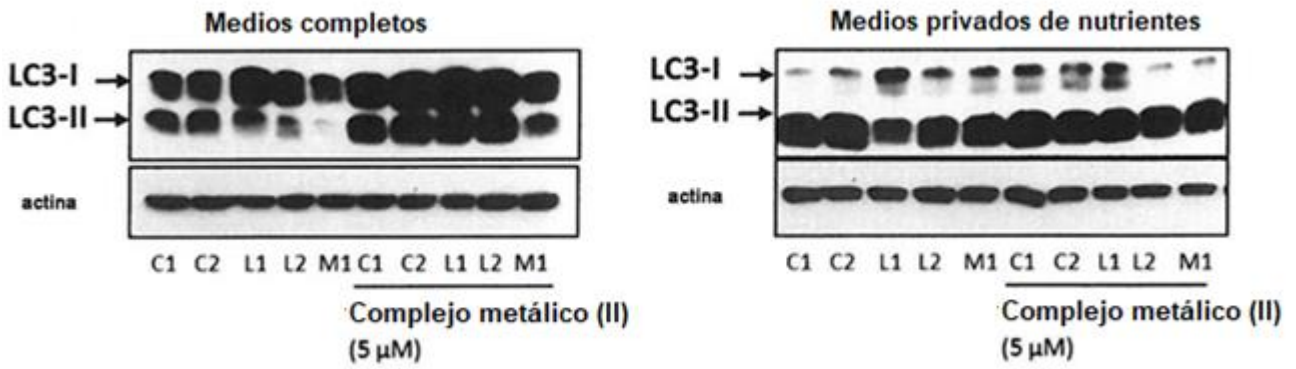


FIG. 1B

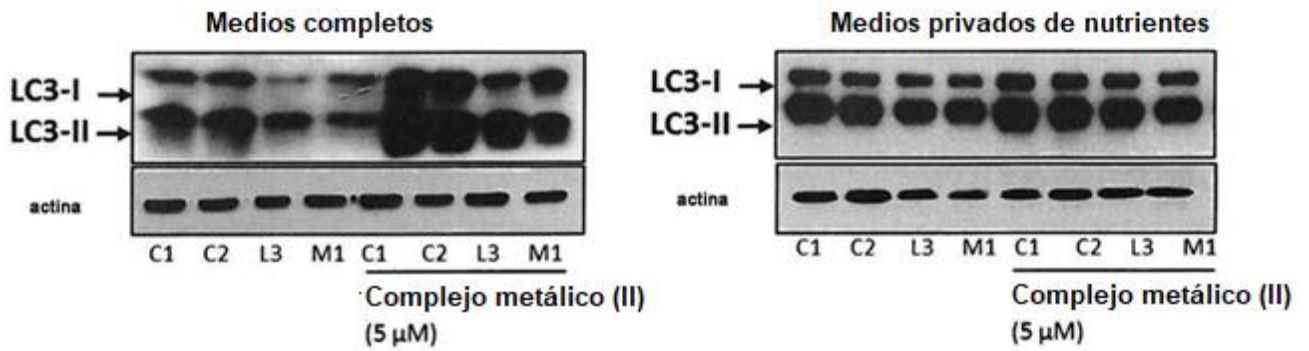


FIGURA 1 (cont.)

FIG. 1C

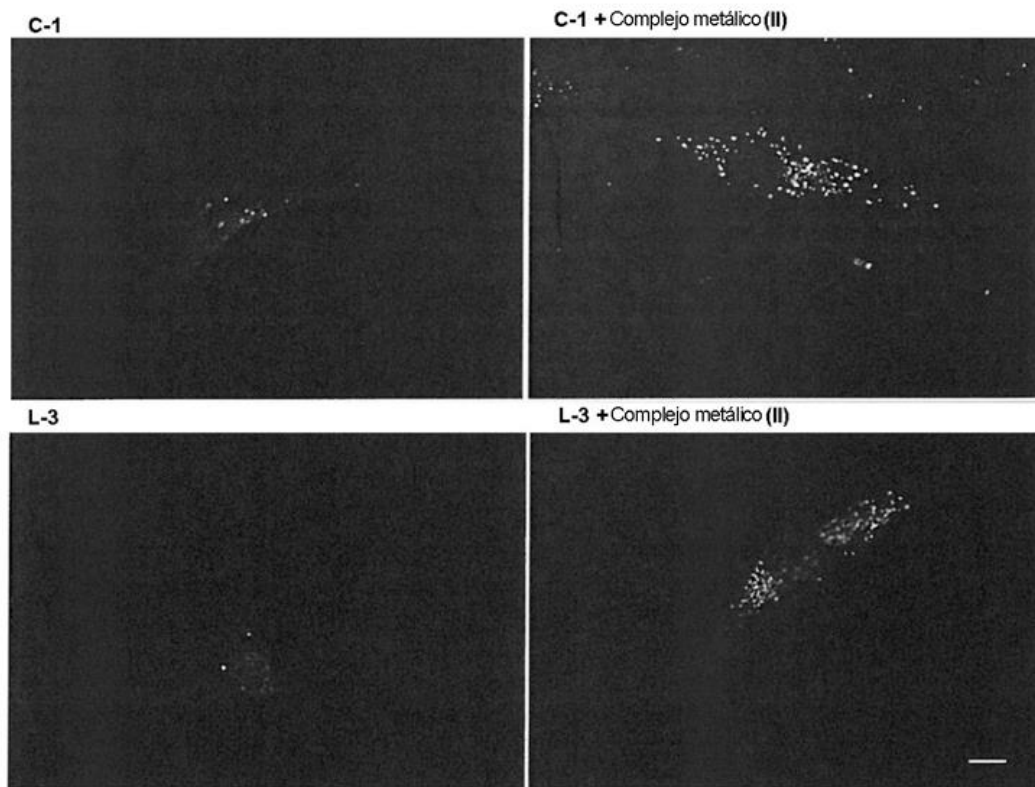


FIGURA 2

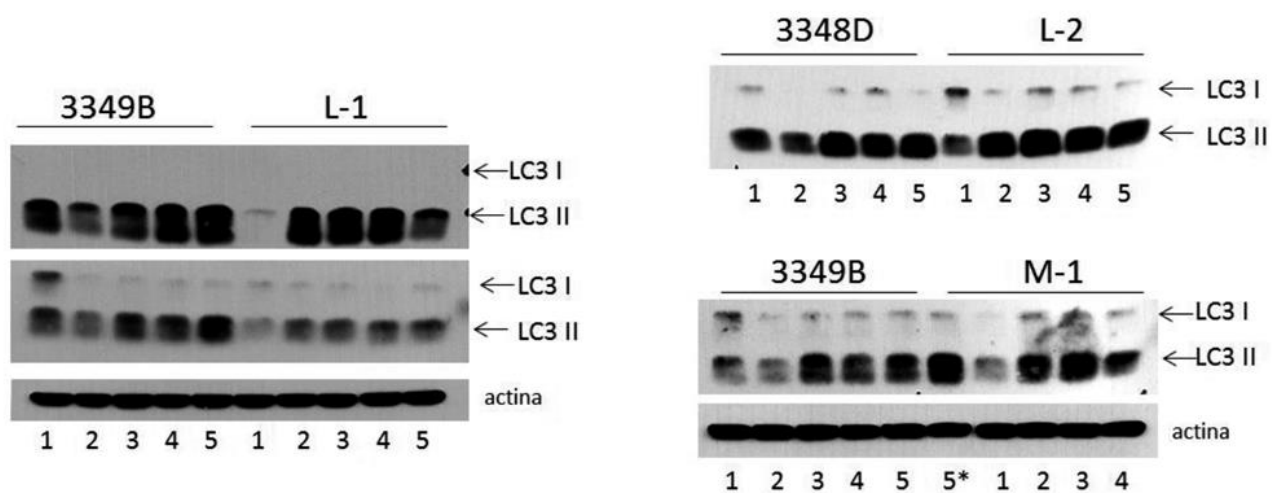


FIGURA 3

FIG. 3A

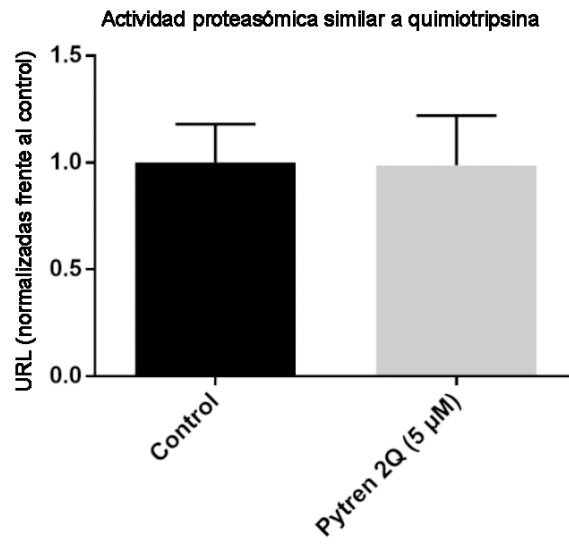


FIG. 3B

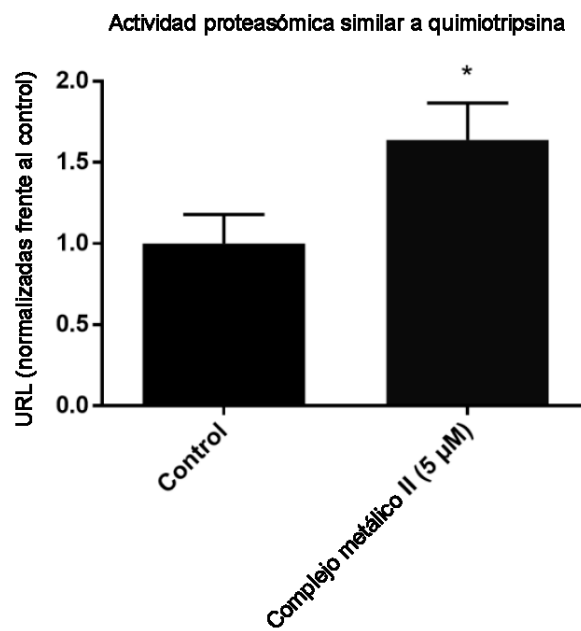


FIGURA 4

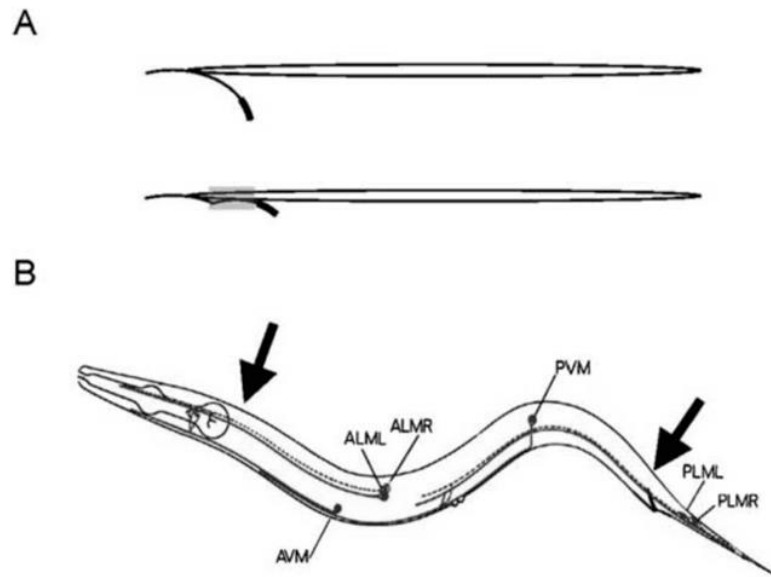


FIGURA 5

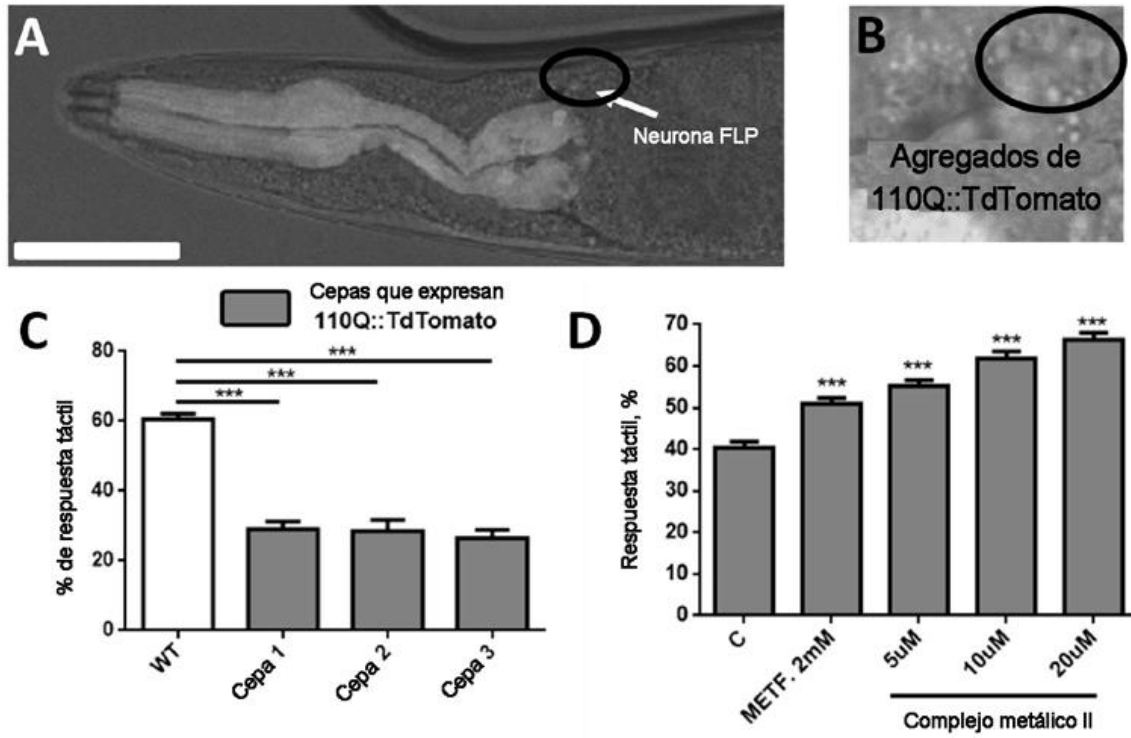


FIGURA 6

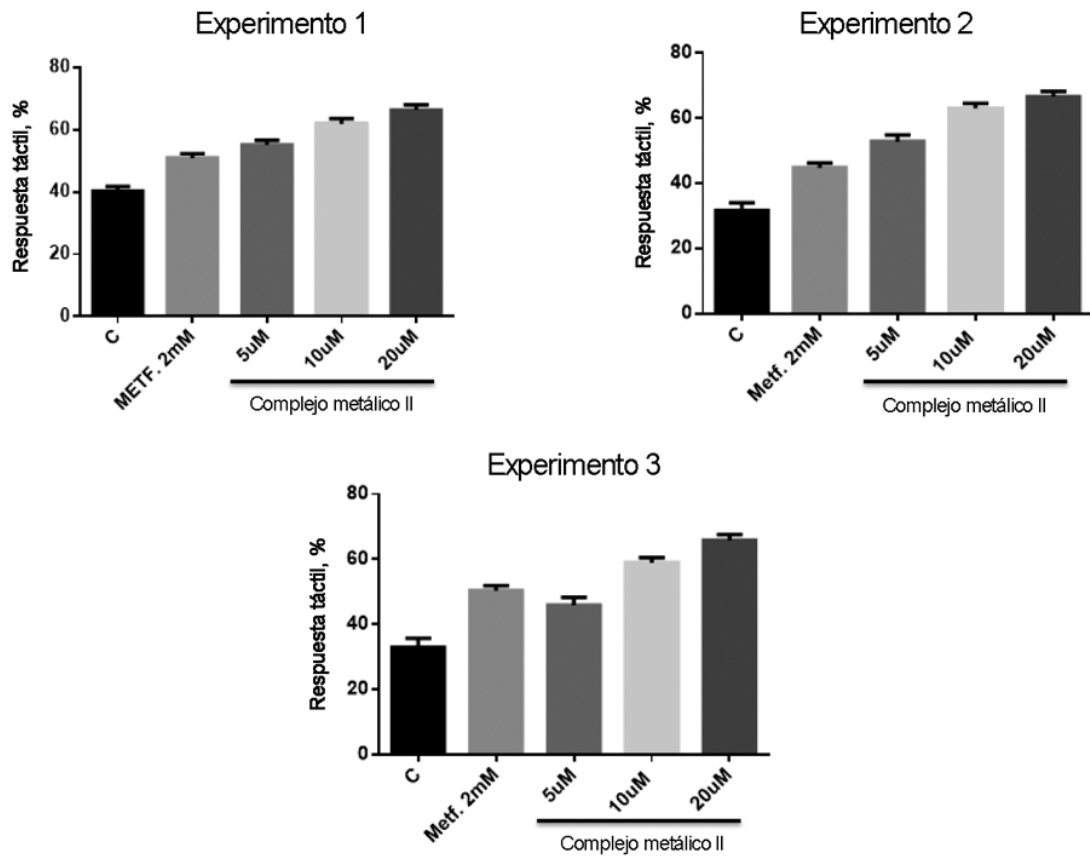


FIGURA 7

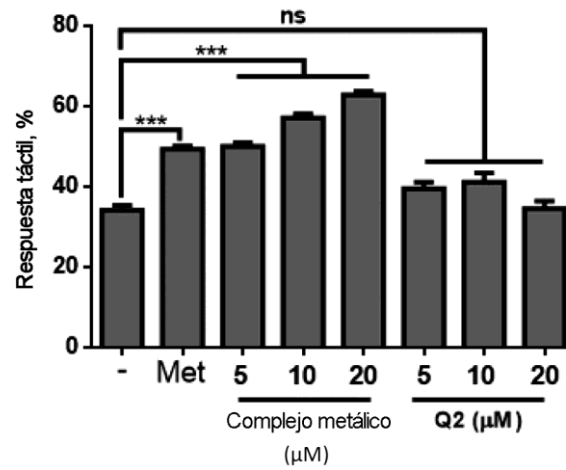
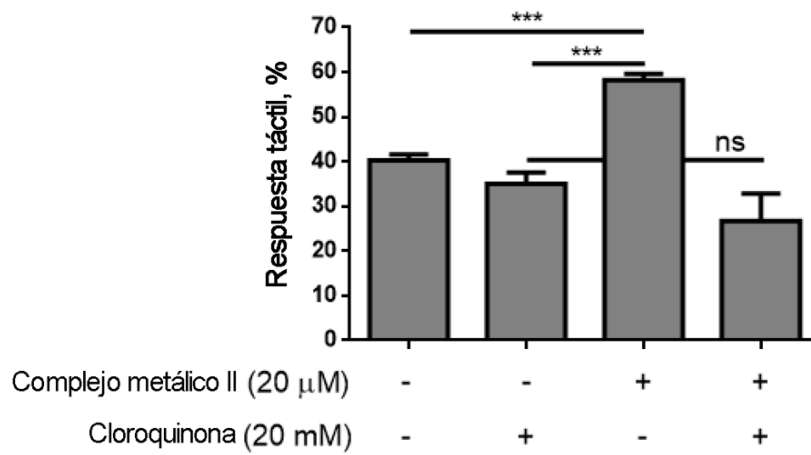


FIGURA 8



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al recopilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- EP 2492270 A [0007] [0008] [0016]
- US 9145386 B [0007] [0016]
- WO 2015124824 A1 [0016]

Literatura no patentable citada en la descripción

- **T. NGUYEN et al.** Clioquinol down-regulates mutant huntingtin expression in vitro and mitigates pathology in a Huntington's disease mouse model. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, 16 August 2005, vol. 102 (33), 11840-11845 [0009]
- **AGUADO et al.** *Human Molecular Genetics*, 2010, vol. 19, 2867-2876 [0066]
- **KNECHT et al.** *Autophagy*, 2010, vol. 6, 991-993 [0066]
- **CRIADO et al.** *Hum. Mol. Genetics*, 2012, vol. 21, 1521-1533 [0066]
- **KNECHT et al.** *autophagy*, 2012, vol. 8, 701-703 [0066]
- **MORUNO-MANCHON et al.** *Biochem. J.*, vol. 449, 497-506 [0068]
- **FUERTE et al.** *Biochem. J.*, 2003, vol. 375, 75-86 [0068]