



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 332 687**

(21) Número de solicitud: **200800736**

(51) Int. Cl.:

**A61K 31/192** (2006.01)

**A61K 31/47** (2006.01)

**A61K 38/43** (2006.01)

**A61K 38/16** (2006.01)

**A61K 31/06** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

(12)

## PATENTE DE INVENCIÓN

B1

(22) Fecha de presentación: **13.03.2008**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **10.02.2010**

Fecha de la concesión: **27.12.2010**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **10.01.2011**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**10.01.2011**

(73) Titular/es:

**PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L.**  
Etxesakan, 28 - Oficina 5  
Planta Baja - Edificio Azysa  
31180 Zizur Mayor, Navarra, ES

(72) Inventor/es: **García Osta, Ana María;**  
**Pérez Mediavilla, Luis Alberto;**  
**Frechilla Manso, Diana Sara y**  
**Ricobaraza Abarquero, Ana Lourdes**

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

(54) Título: **Nuevos usos de 4PBA y sus sales farmacéuticamente aceptables.**

(57) Resumen:

Nuevos usos de 4PBA y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Se describe el uso de 4PBA en la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento de trastornos cognitivos en demencias que cursan con taupatías.

El tratamiento con 4PBA mejora el déficit cognitivo de un modelo murino clásico de Enfermedad de Alzheimer (EA) (Tg 2576), que se acompaña con la disminución de un marcador característico de patología EA, como es la Tau fosforilada, y en el incremento de la síntesis de algunas proteínas marcadoras de la plasticidad sináptica, como GluR1 y PSD95. Como mecanismo mediador del efecto terapéutico proponemos la disminución del estrés en el retículo endoplásmico manifestada en forma de incremento de la proteína GRP78. Por otro lado su efecto como inhibidor de la desacetilación de histonas y su implicación en la remodelización de la cromatina facilita los procesos de síntesis proteica, lo que mejora la plasticidad sináptica.

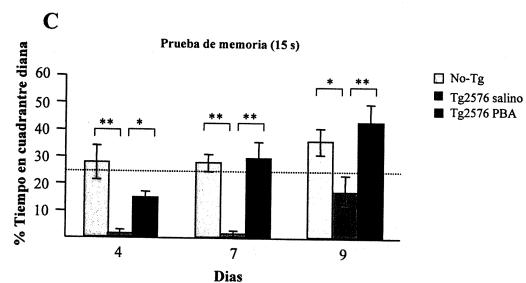


Figura 1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Nuevos usos de 4PBA y sus sales farmacéuticamente aceptables.

### 5 Campo técnico de la invención

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología aplicada al sector médico-farmacéutico para el tratamiento de trastornos cognitivos en demencias que cursan con taupatías, y en especial del Alzheimer.

10 Más específicamente, la presente invención proporciona un nuevo tratamiento para dichas enfermedades basado en el uso de 4PBA.

### Estado de la técnica anterior a la invención

15 La enfermedad de Alzheimer (EA) es la enfermedad neurodegenerativa más común y la primera causa de demencia (Cummings y Cole, 2002). Las características fisiopatológicas de la enfermedad de Alzheimer (EA) están relacionadas con depósitos de proteínas agregadas: agregados intracelulares de tau fosforilado en los ovillos neurofibrilares y agregados extracelulares de  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) en las placas seniles. Por lo tanto la enfermedad de Alzheimer es un ejemplo muy representativo de enfermedades relacionadas con el plegamiento anómalo de proteínas (Selkoe 2004).

20 El retículo endoplásmico (RE) es un sitio de particular importancia en el proceso de control de calidad de procesos relacionados con las proteínas, ya que regula la síntesis, el plegamiento y el tráfico de proteínas en el organismo. La producción continua de proteínas requiere de un estricto mantenimiento del control de calidad, que se lleva a cabo en el RE. El RE no siempre funciona con la adecuada exactitud y las proteínas mal dobladas pueden acumularse en su interior. Esta situación puede llegar a producirse porque existen proteínas difíciles de doblar, como son las responsables de la enfermedad de Alzheimer, y también porque las proteínas se sintetizan con mayor rapidez de lo que el RE pueden doblarlas. Se llega así a una situación de "estrés" del RE. Si ello sucede, se activan los sensores y comienzan a entregar una serie de señales dirigidas a detener la síntesis de la mayor parte de las proteínas, y por otro lado a regular la velocidad de doblaje, de modo que sea posible doblar correctamente todas las proteínas y en definitiva recuperar al RE de su estrés.

35 El estrés del RE es un evento clave a la hora de desencadenar y mediar la muerte neuronal en la enfermedad de Alzheimer. Varios tipos de estrés celular pueden causar la acumulación de proteínas plegadas de forma anómala en el lumen del RE, desencadenando esta situación de estrés la activación de los mecanismos de control de calidad proteínicos para prevenir sus acciones tóxicas (o la respuesta a proteínas sin plegar conocida por sus siglas en inglés UPR "Unfolded Protein Response"). La activación del mecanismo de control UPR produce una reducción general de la síntesis de proteínas, mayor degradación proteínica y aumentando la transcripción de genes que codifican a acompañantes moleculares que residen en el RE, como pueden ser las proteínas reguladas por la glucosa (GRPs) GRP78/Bip y GRP94, junto con la proteína disulfido isomerasa (PDI), para facilitar el plegamiento de proteínas (Kozutsumi *et al.*, 1998). Así, Katayama *et al.* (1999) demostró que la cantidad de acompañantes moleculares residentes en el retículo endoplásmico, como GRP78 y GRP94, era menor en los cerebros de pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer en comparación con la cantidad hallada en cerebros de individuos de la misma edad del grupo de control, lo que puede llevar a vulnerabilidad frente al estrés del retículo endoplásmico. Estos investigadores sugirieron que la expresión de GRP78 actúa como protección contra la muerte neuronal causada por el estrés del retículo endoplásmico. 40 En consecuencia, un aumento de la expresión de GRP78 puede permitir el desarrollo de estrategias terapéuticas para la Enfermedad de Alzheimer (AD).

50 Si el UPR no es capaz de resolver el estrés del ER que están experimentando las células neuronales, es muy posible que se llegue a una progresión de la enfermedad, gatillando la apoptosis de las neuronas. Tal sería la situación de las enfermedades neurodegenerativas más comunes y devastadoras, incluyendo el Alzheimer, el Parkinson y la enfermedad de Huntington, que se caracterizan por la acumulación y agregación de proteínas no dobladas. Por ello no sorprende que numerosos investigadores hayan encontrado evidencias de que en estas condiciones extremas también se activa el UPR. En este caso esta activación termina haciendo más daño que beneficio; la respuesta inicial es protectora, pero la respuesta final es destructiva.

55 Hay varias situaciones que favorecen la acumulación de proteínas en el cerebro. El envejecimiento representa el mayor factor de riesgo en el desarrollo de la EA. La capacidad de inducción de la expresión de chaperonas antes de una situación de estrés celular disminuye con la edad. También se ha demostrado que la UPR no se activa de forma correcta en animales de edad avanzada. Así, con la edad se aumenta la susceptibilidad del RE al estrés del retículo y al efecto tóxico de acumulación de proteínas. El estrés del retículo puede ser inducido por episodios de hipoxia y/o hipoglicemia, que son situación comunes que ocurren en el proceso normal de envejecimiento. Además, si la actividad del proteosoma disminuye con la edad, se está más susceptible al efecto tóxico de la formación de agregados proteicos anómalos.

65 Con la edad, se puede generar en el cerebro un escenario en el que las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la acumulación anómala de proteínas tienen alta probabilidad de desarrollarse.

La interrupción del sistema proteínico del RE es un factor que se ha incluido en varias enfermedades humanas; además del Alzheimer, las enfermedades de Huntington y de Parkinson (Katayama *et al.*, 2001; Nishitoh *et al.*, 2002; Ryu *et al.*, 2002). Existe una serie de compuestos llamados “acompañantes químicos” (o también conocidos en su acepción inglesa como “chaperones químicos”) como el glicerol, el dimetilsulfóxido (DMSO) y el 4-fenilbutirato de sodio o 4-4PBA que han demostrado mejorar los procesos anómalos durante el plegamiento y localización proteínicos (Sato *et al.*, 1996; Chaudhuri and Paul, 2006; Kubota *et al.*, 2006), y cuya administración ha inhibido la muerte neuronal en modelos murinos de Parkinson (Masatoshi I, y col., 2007).

El 4PBA es un ácido graso de bajo peso molecular cuyo uso ha sido aprobado en la práctica clínica como secuestrador de amoníaco en niños que padecen trastornos del ciclo de la urea (Maestri *et al.*, 1996) y en el tratamiento de anemia falciforme y talasemia debido a su capacidad de activar la transcripción de hemoglobulina fetal (Dover *et al.*, 1994; Collins *et al.*, 1995). También se ha documentado su efecto beneficioso en pacientes con Atrofia Muscular Espinal (Mercuri E, *et al.* 2004; Mercuri E, *et al.* 2007). Se ha demostrado que el 4PBA puede actuar como acompañante químico revirtiendo los procesos de localización anómala y/o agregación de proteínas asociadas a enfermedades humanas (Rubenstein y Zeitlin, 2000; Kubota *et al.*, 2006). Asimismo, el 4PBA puede jugar un papel protector en ciertas enfermedades asociadas a la respuesta neuroinflamatoria como la esclerosis múltiple y la isquemia (Dasgupta *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2004). La literatura médica también cita sus efectos beneficiosos sobre la toxicidad poliglutámica (Steffan *et al.*, 2001). Estos hallazgos sugieren que el 4PBA puede ser un candidato potencial a usar en terapias crioprotectoras para combatir trastornos mediados por la sobrecarga del retículo endoplásmico, incluida la EA.

Potencialmente beneficioso para el tratamiento de la EA y de otras enfermedades con un componente inflamatorio, la patente WO99/026657 protege el uso de compuestos inhibidores de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). La referencia al PBA se hace de manera marginal en el contexto de una relación de compuestos inhibidores de la iNOS (lovastatina, forscolina, mevastatina, etc). Sin embargo, en su descripción no aparece ningún experimento dirigido a demostrar el efecto beneficioso del PBA en un modelo contrastado de EA.

En los efectos de señalización corriente debajo de la sobrecarga o estrés de RE se ha demostrado además que la fosforilación aberrante de tau juega un papel decisivo, y común a muchas enfermedades degenerativas (Hernández y Ávila, 2007). La tau fosforilada está libre, tiene una afinidad reducida por los microtúbulos y poca capacidad por tanto para promover el ensamblaje de éstos. Responsable de esta fosforilación aberrante de tau es la glicógeno-sintasa kinasa sobreactivada 3 $\alpha/\beta$  (GSK) (Kim *et al.*, 2007). Los agregados de fosfo-tau son una de las características identificadoras de la EA y de otras taupatías. Las estrategias para la protección celular contra la sobrecarga del RE pueden inhibir directamente la actividad de GSK3 y consecuentemente reducir la fosforilación de tau y su toxicidad. Es posible que la fosforilación de tau sea un componente integral de la maquinaria neural, de forma que una falta de regulación de dicha función conduzca a un deterioro de la memoria en el desarrollo de enfermedades como la de Alzheimer (Arendt *et al.*, 2003; Ikeda *et al.*, 2007).

Otra reacción relacionada con los comportamientos de procesos de aprendizaje es la acetilación de histonas. La acetilación de histonas media la regulación de la transcripción génica vía modificación de la cromatina, y por lo tanto se ha implicado recientemente en la plasticidad sináptica. Se ha comprobado que la administración de 4PBA aumenta la acetilación de histonas en un modelo murino que expresa Esclerosis lateral Amiotrófica (Petri S, *et al.*, 2006). Consecuentemente, se especuló que 4PBA, mediante la inhibición de la histona deacetilasa, puede inducir una modificación transcripcional que conduzca a la activación de genes de plasticidad neuronal. Andreassi y col. (2004) relacionaron de forma directa la administración de 4PBA con el aumento de la expresión completa de los genes cuya pérdida es responsable de la Atrofia Muscular Espinal.

Por lo tanto, es probable que un aumento de la acetilación de la histona H4 regule programas de transcripción que son relativamente específicos. El tráfico de los receptores AMPA en la membrana postsináptica es una indicación de transmisión rápida y de plasticidad sináptica.

La transcripción génica requiere la activación de factores de transcripción, pero también la inducción de cambios dinámicos en la organización de la cromatina que dirige la expresión génica. La hiperacetilación de las histonas libera a las histonas de su unión con la cromatina, lo que tiene efectos subsiguientes en los procesos de transcripción génica (Lea y Randolph, 1998) y de síntesis de proteínas. Se ha demostrado que la síntesis de RNA y de proteínas “de novo” son necesarios para el proceso de formación de la memoria de largo plazo en varias especies de animales vertebrados e invertebrados, y que va a mediar, probablemente la formación de nuevas conexiones sinápticas (Tully *et al.*, 2003). Se cree que la formación de memoria de largo plazo conlleva cambios duraderos en la expresión génica, y existe cada vez más evidencia de la probable participación en este proceso de la modificación de las histonas y de la metilación del ADN (Bailey *et al.*, 2004; Levenson y Sweatt 2005). El trabajo de Fischer *et al.* (2007) demostró que el aumento de la acetilación de las histonas mediante inyección de un inhibidor de la histona deacetilasa (HDAC), o mediante enriquecimiento ambiental, facilitaba la función de la memoria en un modelo experimental con ratones a los que se les había provocado una enfermedad neurodegenerativa. La mejora del proceso de aprendizaje y en la consolidación de la memoria se correlacionó con un aumento de la transcripción y más directamente con un aumento de la regulación de los marcadores de plasticidad sináptica y marcadores dendríticos, lo que sugiere un nuevo mecanismo que puede mejorar la función de la memoria.

El proceso de acetilación de las histonas controla la transcripción de los genes necesarios para la consolidación de la memoria y de la potenciación sináptica de largo plazo (LTP) (Bailey *et al.*, 2004, Levenson y Sweatt 2005; Fischer

*et al.*, 2007). La actividad aberrante de la histona acetiltransferasa (HAT) y de la histona deacetilasa (HDAC) puede ser también un mecanismo común en enfermedades neurológicas que contribuye a la neurodegeneración, como el infarto, la enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, ataxia de Friedreich, y la enfermedad de Alzheimer (según la revisión de Langley *et al.*, 2005). Algunos estudios han demostrado que la transcripción génica se ha desregulado en 5 algunas regiones cerebrales en asociación con la progresión de la enfermedad y apoyan la noción de la existencia de un mecanismo de disrupción de la transcripción del ARN en algunos trastornos degenerativos (Anderson *et al.*, 2007).

La subunidad GluR1 del receptor AMPA y PSD95 son marcadores postsinápticos de crucial importancia en la 10 formación y función de sinapsis. Los déficits postsinápticos de PSD95 y GluR1 hallados en los cerebros de pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer y en los cerebros de ratones transgénicos Tg2576 pueden contribuir a la 15 disfunción sináptica y a déficits de la función cognitiva (Almeida *et al.*, 2005). En concordancia con dicha noción, los investigadores observaron que los marcadores de la reducción en la expresión de la subunidad GluR1 del receptor AMPA y de PSD95 en los hipocampos de ratones transgénicos Tg2576 tratados con 4PBA experimentó una mejoría 20 (o restauración) que podría contribuir a la mejoría de las funciones cognitivas. Varios estudios ya han perfilado el espectro de genes alterados por 4PBA que previenen la neurotoxicidad en diferentes modelos de experimentación (Chang y Min, 2002; Kang *et al.*, 2002; Ryu *et al.*, 2005).

La patofisiología de muchos trastornos degenerativos, como la enfermedad de Alzheimer, y también la neuroprotección, comprenden probablemente numerosos mecanismos. Dado que no existe un tratamiento efectivo para la 25 enfermedad de Alzheimer, esta invención describe la capacidad del 4PBA, mediante sus múltiples mecanismos, para revertir el deterioro en el proceso de aprendizaje y la función de la memoria característicos de la enfermedad de Alzheimer en un modelo murino.

Se calcula que a lo largo de los próximos 50 años se triplicará el número de enfermos de la EA, llegando a los 13,2 30 millones de afectados en 2050. Este incremento se debe al crecimiento continuo de los grupos de edad avanzada. Cada cuatro años, la esperanza de vida se incrementa en uno. Para los enfermos de Alzheimer, también. Esto quiere decir que las personas afectadas van a vivir más tiempo (actualmente la esperanza de vida de los enfermos es de 10 a 12 años después del diagnóstico). En cuanto al tratamiento preventivo, se detuvo la investigación de las vacunas debido a efectos secundarios en el sistema nervioso central.

35 Estas consideraciones demuestran que la enfermedad de Alzheimer será el gran reto de la planificación sociosanitaria de los próximos 50 años.

### Descripción de la invención

La presente invención describe el papel potencialmente beneficioso del 4PBA en la amnesia tipo Alzheimer. Encontramos que el tratamiento de ratones transgénicos Tg2576 de 16 meses de edad con 4PBA durante 5 semanas 40 revirtió el déficit de memoria espacial. Los resultados obtenidos sugieren que es probable que el efecto del 4PBA sea mediado, por una parte por la protección que confiere a las células contra los efectos del estrés del retículo endoplásmico al aumentar los niveles de acompañantes moleculares e inducir la defosforilación de tau, y por otra parte al aumentar la acetilación de la histona H4 que induce la expresión de marcadores sinápticos, que a su vez conduce a la recuperación de la memoria espacial de largo plazo.

También se encontró en la investigación llevada a cabo que el nivel de GRP78 es menor en el hipocampo de 45 ratones transgénicos Tg2576; es más, se observó que la expresión de GRP78 alcanzaba niveles similares en ratones no transgénicos después del tratamiento con 4PBA, lo que concuerda con las observaciones de Katayama (1999).

Se observó asimismo que una reducción en la acetilación de H4 en las cortezas cerebrales de ratones transgénicos Tg2576 podría estar relacionada con una estructura de cromatina empaquetada muy densamente que correspondería a 50 represión transcripcional.

Los resultados de las investigaciones sugieren la hipótesis de que 4PBA, al aumentar la acetilación de la histona H4, activa la transcripción y la síntesis de proteínas que favorecen la plasticidad neuronal (subunidad GluR1 del receptor AMPA y PSD95) y de proteínas del retículo endoplásmico (GRP78) que a su vez conllevan la correcta función del 55 hipocampo y conducen a la recuperación de la función de la memoria deteriorada.

También se observó un aumento del nivel de fosforilación de tau en la localización Ser202/Thr205 (AT8) en los hipocampos de ratones transgénicos Tg2576 tratados con solución salina, mientras que el nivel de fosforilación de tau entre los ratones transgénicos tratados con 4PBA y los de los ratones no transgénicos no se diferenciaban. La presente invención demuestra que al reducir los niveles de fosfo-tau se mejoran las funciones cognitivas en ratones transgénicos. Este hallazgo concuerda con observaciones recientes que sugieren que la reducción de tau tiene efectos beneficiosos en la prevención de déficits de comportamiento en ratones transgénicos que expresan una proteína precursora de amiloide humano sin alterar sus niveles de A $\beta$  (Roberson *et al.*, 2007).

60 Debido a que uno de los mecanismos de acción del PBA es la disminución de la forma hiperfosforilada de tau, se puede suponer que será también efectivo para el tratamiento cognitivo de otras demencias que cursan con taupatía además del Alzheimer, como la demencia frontotemporal, la parálisis progresiva supranuclear (PSP), la enfermedad de Pick y la demencia con cuerpos de Lewy.

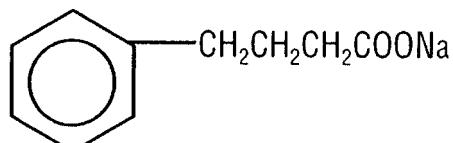
De modo que la presente invención se refiere en un primer aspecto al 4PBA o alguna de sus sales farmacéuticamente aceptables, o de una composición que comprende 4PBA o alguna de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en la prevención o tratamiento de demencias que cursan con taupatía, y más particularmente para su uso en la prevención o tratamiento de trastornos cognitivos en dichas demencias.

5 La invención se refiere también al uso de 4PBA o alguna de sus sales farmacéuticamente aceptables, o de una composición que comprende 4PBA o alguna de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la preparación de un medicamento para prevención o tratamiento de demencias que cursan con taupatía, y en particular de los trastornos cognitivos asociados a dichas demencias.

10 En una realización, la invención se refiere particularmente a la sal sódica de 4PBA para su uso en la prevención o tratamiento de demencias que cursan con taupatía.

15 El 4PBA es el ácido 4-fenil-butírico (4-fenil-butirato), producto disponible comercialmente, que puede obtenerse por ejemplo de SIGMA-ALDRICH (Nº Producto: P21005); tiene número de registro CAS 1821-12-1; su fórmula química es  $C_6H_5(CH_2)_3OOH$ .

20 La sal sódica del 4PBA es también un producto disponible comercialmente, que puede obtenerse por ejemplo de BIOMOL International L.P. (Palatine House, Matford Court, Exeter EX2 8NL, UK; Nº Catálogo EI320); tiene número de registro CAS 1716-12-7; su fórmula química es  $C_6H_5(CH_2)_3OOONa$ ; y su fórmula estructural es:



Alternativamente, este compuesto puede obtenerse por métodos conocidos.

35 Buphenyl® y Ammonaps® son marcas comerciales de composiciones de fenil-butirato sódico, autorizadas por la FDA y la EMEA respectivamente, para tratamiento de trastornos del ciclo de la urea. Puede encontrarse también bajo la marca comercial TriButyrate® (Triple Crown America).

40 El término “farmacéuticamente aceptable” significa que el compuesto o combinación de compuestos debe ser compatible con el resto de ingredientes de una formulación, y que no resulte deletérea para el sujeto o paciente que la recibe.

45 En una realización la composición que comprende 4PBA o una de sus sales farmacéuticamente aceptables es una composición farmacéutica, que comprende también un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

50 El término “prevención” se refiere al acto de “prevenir”, entendido este por evitar que ocurra, exista, o alternativamente retrasar, la aparición o recurrencia de una enfermedad, desorden o condición a la que se aplica dicho término, o de uno o varios de los síntomas asociados a la enfermedad, desorden o condición.

55 El término “tratamiento” se refiere al acto de “tratar”, término que a su vez se entiende por revertir, aliviar o inhibir la progresión de la enfermedad, desorden o condición a la que se aplica el término, o de uno o varios de los síntomas de dicha enfermedad, desorden o condición.

“Demencias que cursan con taupatía” se refiere a enfermedades neurodegenerativas en las que se produce una alteración del metabolismo de la proteína Tau y en las que uno de sus síntomas o consecuencias más relevantes es la aparición de trastornos cognitivos. En particular, el uso de 4PBA o sus sales es útil para la prevención o tratamiento de los trastornos cognitivos asociados a dichas demencias.

60 Una realización particular, la invención se relaciona con la prevención o tratamiento de enfermedades como el Alzheimer, la demencia frontotemporal, la parálisis progresiva supranuclear, la degeneración corticobasal, la enfermedad de Pick, la demencia de cuerpos de Lewy, la demencia con granos argirófilos, la enfermedad de Niemann-Pick tipo C, o la demencia pugilística.

65 En una realización más particular se relaciona con la prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, y particularmente de los trastornos cognitivos asociados a esta enfermedad.

Una realización más preferente de la presente invención es el uso de la sal sódica del 4PBA en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de las enfermedades descritas.

En otro aspecto la invención se refiere una composición que comprende 4PBA o alguna de sus sales farmacéuticamente aceptables para su uso en la prevención o tratamiento de demencias que cursan con taupatía, y en particular de los trastornos cognitivos asociados a estas. En una realización particular la composición comprende la sal sódica de 4PBA.

5 En estudios anteriores ya se ha demostrado que la mejora del proceso de aprendizaje y de la función de la memoria no siempre están asociadas a alteraciones detectables de niveles de  $\text{A}\beta$  en el cerebro (Dodart *et al.*, 2002; Gong *et al.*, 2004). Si se considera esa información con los datos de la presente invención, los resultados sugieren que la relación entre concentraciones solubles e insolubles de  $\text{A}\beta$  en el cerebro y el deterioro de la memoria observado en ratones 10 transgénicos es específica a la tarea, y compleja. Adicionalmente, no se ha hallado una clara correlación en estudios extensos entre las formas depositadas de  $\text{A}\beta$  (como el caso de las placas) y el deterioro de la memoria en pacientes afectados con la enfermedad de Alzheimer (Hyman *et al.*, 1984). De hecho, informes más recientes sugieren que los niveles de  $\text{A}\beta$  soluble pueden tener más correlación con la neurodegeneración y el deterioro de la memoria (Lue *et al.*, 1999; McLean *et al.*, 1999; Lesné *et al.*, 2007).

15 De modo que otra realización de la presente invención para conseguir potenciar su efecto curativo es una combinación que comprende 4PBA y/o alguna de sus sales farmacéuticamente aceptables como primer ingrediente activo junto con un segundo ingrediente activo agente que es un agente inductor o facilitador del aclaramiento de los depósitos de  $\beta$ -amiloide cerebral. Una realización más preferente utiliza como agente inductor de aclaramiento de dichos depósitos 20 agentes quelantes de metales, enzimas catabolizantes de la forma soluble del péptido  $\beta$ -amiloide, cerebrolisina o nitrofenoles.

Una realización más preferente aún es la utilización como agente inductor de aclaramiento el clioquinol, la cerebrolisina, o el 2,4-dinitrofenol o 3-nitrofenol.

25 Otra realización por tanto de la invención es el uso de un producto que contiene 4PBA y/o alguna de sus sales farmacéuticamente aceptables como primer ingrediente activo, y un segundo ingrediente activo que es un agente inductor o facilitador del aclaramiento de los depósitos de  $\beta$ -amiloide cerebral, como una preparación combinada para uso simultáneo en la prevención y/o tratamiento de trastornos cognitivos en demencias que cursan con taupatía. Otra 30 realización es que esta preparación combinada se diseñe para un uso separado de ambos principios activos, y otra realización más es que lo sea para un uso secuencial.

35 Por tanto los dos componentes o ingredientes activos de la combinación farmacéutica de la invención pueden estar formando parte de una misma formulación farmacéutica unitaria; o formando parte de formulaciones farmacéuticas separadas para la co- administración de los dos componentes o ingredientes activos pero formando parte de un mismo régimen terapéutico. Cuando los dos componentes se administran en formulaciones separadas, no es necesario que se administren a un mismo tiempo, aunque podría hacerse si se desea.

40 En un aspecto adicional la invención se refiere a un producto o kit que comprende una combinación farmacéutica que comprende 4PBA y/o alguna de sus sales farmacéuticamente aceptables junto con un agente inductor o facilitador del aclaramiento de los depósitos de  $\beta$ -amiloide cerebral, en cualquiera de las realizaciones especificadas.

45 En otro aspecto, la invención se refiere a dicha combinación farmacéutica o kit que comprende dicha combinación farmacéutica para su uso en la prevención o tratamiento de demencias que cursan con taupatía, y particularmente de los trastornos cognitivos asociados. Dicha combinación o kit son útiles para la preparación de un medicamento para prevención de dichas demencias, en particular cualquiera de las que se han especificado anteriormente, y más particularmente de la enfermedad de Alzheimer.

50 En otro aspecto la invención se refiere también a un método para prevención o tratamiento de demencias que cursan con taupatía, y particularmente de los trastornos cognitivos asociados a ellas, que comprende administrar a un sujeto que necesita dicha prevención y/o tratamiento una cantidad farmacéuticamente efectiva de 4PBA o alguna de sus sales farmacéuticamente aceptables, o de una composición que comprende 4PBA o alguna de sus sales farmacéuticamente aceptables, o de una de una combinación farmacéutica que comprende 4PBA y/o alguna de sus sales farmacéuticamente aceptables junto con un agente inductor o facilitador del aclaramiento de los depósitos de  $\beta$ -amiloide 55 cerebral.

60 El término “cantidad farmacéuticamente efectiva” se refiere a una cantidad de compuesto o combinación de compuestos activos que es efectiva en el tratamiento de la enfermedad, que mejora, atenúa o elimina uno o varios de sus síntomas; o previene o retrasa la aparición de uno o más síntomas de la enfermedad.

65 El término “sujeto” significa un animal, en particular un mamífero como primates, perros, gatos, animales bovinos, caballos, ovejas, humanos. Se aplica particularmente a mamíferos humanos de ambos sexos.

Una forma de administración preferente de la preparación de medicamento que contiene 4PBA para los usos arriba 65 descritos es en pastillas que contienen su sal sódica. La preparación farmacéutica de estas pastillas puede comprender excipientes como celulosa microcristalina, estearato de magnesio o dióxido de silicio coloidal.

Otra forma de administración preferente es un polvo que contiene la sal sódica de 4PBA y un excipiente para ser disuelto en agua. La preparación farmacéutica de este polvo puede comprender excipientes como estearato de calcio o dióxido de silicio coloidal.

5

### Breve descripción de las figuras

Figura 1A: Tiempos de latencia de los ratones transgénicos tratados con 4PBA y con salino, con respecto a ratones no transgénicos, en distintos días de medición de un test de Morris en la fase de plataforma visible.

10

Figura 1B: Tiempos de latencia de los ratones transgénicos tratados con 4PBA y con salino, con respecto a ratones no transgénicos, en distintos días de medición de un test de Morris en la fase de plataforma invisible.

15

Figura 1C: Tiempo de permanencia en el cuadrante correcto de los ratones transgénicos tratados con 4PBA y con salino, con respecto a ratones no transgénicos, en distintos días de medición de un test de Morris.

Figura 2A: Niveles de derivados de péptidos A $\beta$ 42 y A $\beta$ 40 en extracto de corteza de ratones transgénicos tratados con 4PBA y con salino.

20

Figura 2B: Marcaje de placas formadas por acumulación del péptido A $\beta$  en cerebro de ratones transgénicos tratados con 4PBA y con salino comparado con ratones no transgénicos.

Figura 3A: Relación entre niveles de tau fosforilada respecto a la proteína normal en ratones transgénicos tratados con 4PBA y salino, respecto a ratones no transgénicos.

25

Figura 3B: Relación entre niveles de GSK3 fosforilada (forma inactiva) respecto a la proteína sin fosforilar (forma activa) en ratones transgénicos tratados con 4PBA y salino, respecto a ratones no transgénicos.

30

Figura 4: Niveles de expresión de GRP78 en extractos de hipocampo de ratones transgénicos tratados con 4PBA y salino, respecto a ratones no transgénicos.

Figura 5: Niveles de Histonas 4 (AcH4) e histona 3 (AcH3) acetilada en extractos de corteza de ratones transgénicos tratados con 4PBA y salino, respecto a ratones no transgénicos.

35

Figura 6: Niveles de expresión de proteínas GluR1 y PSD95 en extractos proteicos enriquecidos en membrana obtenidos de hipocampo de ratones transgénicos tratados con 4PBA y salino, respecto a ratones no transgénicos.

### Modos de realización de la invención

40

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos, que junto con las Figuras descritas anteriormente ilustran la metodología experimental empleada para su desarrollo. Se entiende que los expertos en la materia serán capaces de comprender las modificaciones, variaciones y cambios que pueden hacerse dentro del alcance de la presente invención.

45

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

50

##### *Modelo de experimentación animal murino y tratamiento*

Utilizamos ratones transgénicos Tg2576 con la enfermedad de Alzheimer que expresan la isoforma humana 695-aa de APP que contiene la doble mutación sueca APPswe [(APP695)Lys670→Asn, Met671→Leu] desencadenada por un promotor criónico de hámster. En los ratones transgénicos Tg2576 que se utilizaron en el modelo experimental murino que sufrían la enfermedad de Alzheimer, el contenido del péptido A $\beta$  en el cerebro se acumula de forma exponencial entre los 7 y los 12 meses de edad, y los ratones así manipulados mostraron deterioro de la función de la memoria cuando se los sometió a la prueba del laberinto acuático de Morris cuando alcanzaron edades comprendidas entre los 12 y los 15 meses. Por lo tanto, las hembras de ratón Tg2576 de 16 meses fueron tratadas una vez al día por vía intraperitoneal con 200 mg/kg 4PBA o su vehículo durante 5 semanas. Para ello se preparó una solución de 4PBA titulando cantidades equimoléculares de ácido 4-fenilbutírico (Sigma) e hidróxido sódico con un pH: 7.4. Como grupo de control se utilizó un grupo de ratones no alterados genéticamente, ratones normales, de cepas y edad similares. Todos los procedimientos del ensayo clínico se realizaron de acuerdo a la legislación europea y española (86/609/CEE; RD1201/2005).

65

## Ejemplo 2

*Laberinto Acuático de Morris (MWM)*

5 Se utilizó el laberinto acuático de Morris (MWM) para evaluar la función de memoria operativa y de referencia en respuesta al tratamiento con 4PBA en ratones Tg2576 tal como ya se ha descrito en la literatura (Ribe *et al.* 2005). Se sometió a grupos de ratones hembras Tg2576 tratadas con 4PBA (n=6), vehículo (n=7) y hermanos de camada no transgénicos (n=10), a pruebas de aprendizaje espacial y de memoria utilizando el laberinto acuático de Morris cuando alcanzaron 16 meses de edad. El laberinto consistía en una piscina circular llena de agua a 20°C. Los ratones recibieron 10 entrenamiento previo en una piscina con plataforma visible durante tres días consecutivos (8 pruebas/día) pudiendo nadar hasta una plataforma elevada por encima del nivel del agua. El entrenamiento con plataforma escondida duró 9 días consecutivos (4 pruebas/día) durante el que se permitió a los ratones 60 segundos para encontrar la plataforma sumergida a 1 cm por debajo de la superficie del agua. A los ratones que les resultó imposible alcanzar la plataforma se les guió hasta ella. Se permitió a todos los animales un descanso sobre la plataforma de 20 segundos y después se 15 les sacó de ella para devolverlos a sus jaulas. Al principio del 4º, 7º y último día de la prueba, se realizó una prueba previa durante la que se retiró la plataforma de la piscina y se permitió a los ratones buscarla durante 60 segundos. Todas las intentos se monitorizaron con una cámara HVS y el programa Watermaze para analizar las latencias de escape y el porcentaje de tiempo de ocupación de cada cuadrante de la piscina durante las pruebas previas (con el programa Ethovision, Wageningen, Países Bajos). Se excluyó de los análisis a los ratones que no fueron capaces de 20 aprender a localizar la plataforma visible o a los ratones que exhibieron patrones de natación anormales o flotaban persistentemente.

Para estudiar los efectos de 4PBA en la función cognitiva se analizó si 5 semanas de tratamiento con 4PBA aliviarían el déficit de aprendizaje exhibido por ratones transgénicos Tg2576 de 16 meses de edad al realizar la prueba 25 del laberinto acuático de Morris. Al final del tratamiento, la proficiencia mostrada por los ratones transgénicos de 16 meses de edad tratados con el vehículo fue menor que la mostrada por ratones no alterados genéticamente de la misma edad. Por el contrario, la proficiencia de los ratones transgénicos tratados con 4PBA no se diferenció de la de los ratones del grupo de control de la misma edad (Figura 1B).

30 Después de 12, 24 y 32 pruebas, se sometió a todos los ratones a una prueba previa durante la que se les hizo nadar en la piscina de la que se había retirado la plataforma durante 15 segundos. Una medida de memoria de retención es el porcentaje de 15 segundos de natación en el cuadrante en el que estaba la plataforma durante las sesiones de entrenamiento (cuadrante diana). El porcentaje de tiempo que pasaron los ratones transgénicos tratados con vehículo en el cuadrante diana fue significativamente menor que el que pasaron los ratones del grupo de control. La cantidad de tiempo que pasaron los ratones transgénicos tratados con 4PBA en dicho cuadrante no difirió 35 del que pasaron los ratones del grupo de control de la misma edad (Fig. 1C). Aunque las diferencias se hicieron evidentes en la prueba de la plataforma invisible, las latencias de escape no difirieron significativamente durante las primeras pruebas de entrenamiento con plataforma visible (Fig. 1A). Estos datos sugieren que la administración crónica de 4PBA mejora la función de la memoria relativa a la prueba del laberinto acuático en ratones transgénicos 40 Tg2576.

## Ejemplo 3

45 *Método para determinar los niveles de A $\beta$* 

Debido a que el tratamiento con 4PBA demostró beneficiar claramente el proceso de adquisición y retención de memoria, el siguiente aspecto a explorar fue el efecto de los niveles de A $\beta$  y la patología de tau en Ratones transgénicos Tg2576. Se sacrificó a los ratones 24 horas después de que realizaran la última prueba en el laberinto 50 acuático de Morris. Se diseccionaron el córtex y el hipocampo y se utilizaron para realizar análisis bioquímicos. A continuación se determinaron los niveles de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 en la corteza cerebral mediante una prueba ELISA tipo sándwich.

55 Se homogeneizaron cortezas cerebrales en un tampón que contenía 5 M guanidina HCl y 50 mM Tris HCl, a pH = 8, inhibidores de proteasa (CompleteTM Protease Inhibitor Cocktail, de Roche) e inhibidores de fosfatasa (0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM NaF). Los homogeneizados así obtenidos se sonicaron durante 2 min y se centrifugaron a 100.000 x g durante 1 h. Se congelaron alícuotas del sobrenadante a -80°C y se determinó la concentración de proteína mediante el método Bradford con el kit de Bio-Rad. Los niveles de A $\beta$ 42 se midieron con un kit de ELISA extra-sensible tipo sándwich de Biosource (Camarillo, Ca, USA), para ello se depositaron 300  $\mu$ g de proteína total del sobrenadante 60 directamente en las placas de ELISA por duplicado de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Tal como se aprecia en la Fig. 2A, no se observó diferencia alguna entre los niveles de A $\beta$ 40 o de A $\beta$ 42 en ratones transgénicos Tg2576 tratados con el vehículo en comparación con los ratones transgénicos tratados con 4PBA. No se 65 detectó A $\beta$  en hermanos de camada no transgénicos. Se obtuvieron resultados similares cuando se midieron los niveles de A $\beta$  y el porcentaje de área cubierta por inmunoreactividad A $\beta$  para medir la carga de placas en el hipocampo (Figura 2B).

## Ejemplo 4

*Producción de extractos proteínicos y análisis inmunológico tipo Western Blot*

5 Los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical y se diseccionaron sus hipocampos rápidamente del cerebro. Se obtuvieron homogeneizados totales homogeneizando los hipocampos en un tampón RIPA enfriado con hielo (50 mM Tris-HCl, pH = 7.4, 0,25% DOC, 1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml leupeptina, 1 µg/ml aprotinina, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM NaF), que se centrifugó a 14.000 x g 4°C durante 20 min y las alícuotas obtenidas del sobrenadante se congelaron a -80°C. Para obtener la fracción de proteína enriquecida en membranas (P2 proteínas de membrana), se utilizó un método estándar. Los hipocampos se homogeneizaron en un tampón Tris-EDTA enfriado con hielo (10 mM Tris-HCl y 5 mM EDTA, pH = 7.4), que contenía 320 mM de sucrosa y los inhibidores de proteasa y fosfatasa previamente descritos. El tejido homogeneizado se centrifugó a 700 x g durante 10 min. El sobrenadante así obtenido se volvió a centrifugar a 37.000 x g durante 40 min a 4°C. Por último, se resuspendió el pellet (P2) en 10 mM de tampón Tris-HCl (pH = 7.4), que contenía la mezcla de inhibidores de enzimas descrita anteriormente. La concentración de proteína se determinó en ambos casos (con la prueba Bradford de Bio-Rad) y se almacenaron las alícuotas a -80°C hasta su posterior uso. Para el análisis tipo Western, se solubilizaron las fracciones de membrana P2 en condiciones de desnaturalización añadiendo un volumen de 0,1 de 10% deoxicolato de sodio en un tampón de 500 mM Tris-HCl (pH = 9). Las muestras se incubaron durante 30 min a 36°C y se diluyeron añadiendo un volumen de 0,1 de 500 mM Tris-HCl (pH = 9) /1% Tritón X-100, Despues de centrifugar a 37.000 x g durante 10 min a 4°C, se almacenó el sobrenadante a -80°C.

20 Para el análisis de histonas, se obtuvieron extractos de corteza cerebral frontal de los ratones y se homogeneizaron en un tampón de lisis en frío con inhibidores de la proteasa (0,2 M NaCl, 0,1 M HEPES, 10% glicerol, 200 mM NaF, 2 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM benzamidina, 10 µg/ml leupeptina, 400 U/ml aprotinina), y se centrifugaron a 14.000 x g 4°C durante 20 min y se obtuvieron alícuotas del sobrenadante que se almacenaron a -80°C. La concentración total de proteínas se obtuvo con la prueba Bradford de BioRad Bradford (BioRad Laboratories, Hércules, California).

25 Para efectuar el análisis Western-Blot se mezclaron muestras de proteínas en tampones al mismo volumen de 2 x Laemmli que se resolvieron en geles de SDS-poliacrilamida y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con 5% leche, 0,05% Tween-20 en solución de bloqueo PBS o TBS seguido de un período de incubación durante toda la noche con los siguientes anticuerpos: monoclonal de ratón anti-fosfo tau AT8 (Pierce), polyclonal de conejo anti-pGSK3-Ser9 (Cell Signalling), polyclonal de conejo anti-GSK3, polyclonal de cabra anti-GRP78 (Santa Cruz), polyclonal de conejo anti-acetilado de histona 4 y 3 (Upstate), polyclonal de conejo anti-GluR1 (Chemicon), monoclonal de ratón anti-PSD95 (Chemicon) en las correspondientes soluciones tampón. Despues de dos lavados en PBS/Tween-20 o TBS/Tween20 y uno solo en PBS o TBS, se detectaron bandas de proteínas inmunotiquetadas utilizando un conjugado de HRP anti-conejo o anti-ratón (Santa Cruz; dilución 1:5000) seguido de un sistema de quimioluminiscencia (ECL Amersham Biosciences), y exposición autoradiográfica a HyperfilmTMECL (Amersham Biosciences). Las señales se cuantificaron utilizando el programa Scion Image (Scion Corporation).

40

## Ejemplo 5

*Marcadores patológicos de la enfermedad de Alzheimer*

45

Para investigar los cambios que pudieran explicar las diferencias observadas en la capacidad de aprendizaje de los ratones transgénicos después del tratamiento, se analizaron los niveles de fosforilación de tau en los hipocampos extraídos de los ratones utilizando AT8, un anticuerpo fosfoespecífico que reconoce epítopos aberrantes hiperfosforilados en Ser-202/Thr-205. Se halló que la fosforilación de tau aumentaba en los hipocampos de ratones transgénicos Tg2576 de 16 meses de edad en comparación con la de los ratones no transgénicos, mientras que los niveles globales de tau no estaban alterados. Un hallazgo interesante fue que no se encontraron diferencias en la tau fosforilada en el sitio AT8 de ratones transgénicos tratados con 4PBA cuando se comparó esta función en ratones no transgénicos (Fig. 3A).

55

La función de fosforilación de tau está regulada por varias proteínas kinasas y fosfatases. Se ha demostrado que GSK3b participa en la fosforilación patológica de tau. Se midieron los niveles de GSK3b inactivo, fosforilado en Ser 9, y se observó que eran más altos en los hipocampos de ratones transgénicos tratados con 4PBA cuando se compararon con los ratones tratados con el vehículo, lo que explicaría la reducción en la forma fosforilada de tau observada en los ratones tratados (Figura 3B).

60

## Ejemplo 6

*Marcadores de estrés del retículo endoplásmico*

65

El siguiente paso de la investigación fue analizar los niveles del acompañante molecular residente en el retículo endoplásmico GRP78 en los hipocampos de ratones transgénicos y de hermanos de camada de los ratones del grupo de control. Se encontró que los niveles de GRP78 son menores en los hipocampos de ratones transgénicos de 16 meses

de edad cuando se compararon con los de ratones de la misma edad. Como contraste, los niveles de GRP78 de ratones transgénicos tratados con 4PBA no se diferenciaron de los niveles de GRP78 hallados en ratones no transgénicos, lo que sugiere que el efecto del tratamiento con 4PBA se puede deber en parte a un aumento de la expresión de los niveles de GRP78 (Fig. 4).

5

### Ejemplo 7

#### *Marcadores de plasticidad sináptica*

10

Ratones transgénicos Tg2576 de 16 meses de edad mostraron niveles muy bajos de acetilación de H4 cuando se compararon con los de los ratones del grupo de control de la misma edad. Por lo tanto, se encontró inducción en la acetilación de la histona cortical 4 (H4) en ratones transgénicos que habían sido tratados con 4PBA (Fig. 5).

15

Se investigó a continuación si la expresión de los niveles de estos marcadores sinápticos se modificaba después del tratamiento con 4PBA y se encontró un aumento robusto ( $161,37 \pm 27,5\%$ ) en los niveles de expresión de la subunidad GluR1 del receptor AMPA en extractos de proteína del hipocampo enriquecidos en membrana en el grupo de ratones transgénicos que habían sido tratados con 4PBA comparados con los niveles hallados en los ratones tratados con el vehículo ( $81,18 \pm 9,5\%$ ) y comparados con los niveles hallados en el grupo de ratones no alterados genéticamente ( $100,0 \pm 6,5\%$ ). El tratamiento con 4PBA también indujo de forma significativa la expresión de los niveles de PSD95 en los mismos extractos (Fig. 6).

20

### Bibliografía

25

- Almeida CG, Tampellini D, Takahashi RH, Greengard P, Lin MT, Snyder EM, Gouras GK (2005) Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses. *Neurobiol Dis* 20:187-198.

30

- Anderson AN, Roncaroli F, Hodges A, Deprez M, Turkheimer FE (2007) Chromosomal profiles of gene expression in Huntington's disease. *Brain*.

35

- Andreasi C, Angelozzi C, Tiziano FD, Vitali T, De Vicenzi E, Boninsegna A, et al. (2004) Phenylbutyrate increases SMN expression *in vitro*: relevance for treatment of spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 14(2):130-135.

40

- Arendt T, Stieler J, Strijkstra AM, Hut RA, Rudiger J, Van der Zee EA, Harkany T, Holzer M, Hartig W (2003) Reversible paired helical filament-like phosphorylation of tau is an adaptive process associated with neuronal plasticity in hibernating animals. *J. Neurosci.* 23:6972-6981.

45

- Bailey CH, Kandel ER, Si K (2004) The persistence of longterm memory: a molecular approach to self-sustaining changes in learning-induced synaptic growth. *Neuron* 44:49-57.

- Cummings JL, Cole G. (2002) Alzheimer disease. *JAMA* 287:2335-2338.

- Chang KT, Min KT. (2002) Regulation of lifespan by histone deacetylase. *Ageing Res Rev* 1:313-326.

50

- Chaudhuri TK, Paul S (2006) Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches. *FEBS J* 273:1331-1349.

55

- Collins AF, Pearson HA, Giardina P, McDonagh KT, Brusilow SW, Dover GJ (1995) Oral sodium phenylbutyrate therapy in homozygous beta thalassemia: a clinical trial. *Blood* 85:43-49.

- Dasgupta S, Zhou Y, Jana M, Banik NL, Pahan K (2003) Sodium phenylacetate inhibits adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice at multiple steps. *J Immunol* 170:3874-3882.

60

- Dodart JC, Bales KR, Gannon KS, Greene SJ, DeMattos RB, Mathis C, DeLong CA, Wu S, Wu X, Holtzman DM, Paul SM. (2002) Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci* 5:452-457.

65

- Dover GJ, Brusilow S, Charache S (1994) Induction of fetal hemoglobin production in subjects with sickle cell anemia by oral sodium phenylbutyrate. *Blood* 84(1):339-343.

- Fischer A, Sananbenesi F, Wang X, Dobbin M, Tsai LH (2007) Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature* 447, 178-182.

70

- Gong B, Vitolo OV, Trinchese F, Liu S, Shelanski M, Arancio O (2004) Persistent improvement in synaptic and cognitive functions in an Alzheimer mouse model after rolipram treatment. *J Clin Invest* 114:1624-1634.

- **Henández F, Ávila J** (2007) Taupathies. *Cell Mol Life Sci* 64:2219-2233.
- **Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR, Barnes CL** (1984) Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science* 225:1168-1170.
- 5 - **Ikeda Y, Ishiguro K, Fujita SC** (2007) Ether stress-induced Alzheimer-like tau phosphorylation in the normal mouse brain. *FEBS Lett* 581:891-897.
- 10 - **Kang HL, Benzer S, Min KT** (2002) Life extension in Drosophila by feeding a drug. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:838-843.
- 15 - **Katayama T, Imaizumi K, Sato N, Miyoshi K, Kudo T, Hitomi J, Morihara T, Yoneda T, Gomi F, Mori Y, Nakano Y, Takeda J, Tsuda T, Itoyama Y, Murayama O, Takashima A, St George-Hyslop P, Takeda M, Tohyama M.** (1999) Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 1, 479-485.
- 20 - **Katayama T, Imaizumi K, Honda A, Yoneda T, Kudo T, Takeda M, Mori K, Rozmahel R, Fraser P, George-Hyslop PS, Tohyama M** (2001) Disturbed activation of endoplasmic reticulum stress transducers by familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutations. *J Biol Chem* 276:43446-43454.
- 25 - **Katayama T, Imaizumi K, Manabe T, Hitomi J, Kudo T, Tohyama M** (2004) Induction of neuronal death by ER stress in Alzheimer's disease. *J Chem Neuroanat* 28:67-78.
- 30 - **Kim HJ, Rowe M, Ren M, Hong JS, Chen PS, Chuang DM** (2007) Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action. *J Pharmacol Exp Ther* 321: 892 - 901.
- 35 - **Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ, Sambrook J** (1998) The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* 332:462-464.
- 40 - **Kubota K, Niinuma Y, Kaneko M, Okuma Y, Sugai M, Omura T, Uesugi M, Uehara T, Hosoi T, Nomura Y** (2006) Suppressive effects of 4-phenylbutyrate on the aggregation of Pael receptors and endoplasmic reticulum stress. *J Neurochem* 97:1259-1268.
- 45 - **Langley B, Gensert JM, Beal MF, Ratan RR** Curr Drug Targets CNS (2005) Remodeling chromatin and stress resistance in the central nervous system: histone deacetylase inhibitors as novel and broadly effective neuroprotective agents. *Neurol Disord* 4:41-50.
- 50 - **Lea MA, Randolph VM** (1998) Induction of reporter gene expression by inhibitors of histone deacetylase. *Anticancer Res* 18:2717-2722.
- **Lesné S, Kotilinek L, Ashe KH** (2007) Plaque-bearing mice with reduced levels of oligomeric amyloid-beta assemblies have intact memory function. *Neuroscience* Epub ahead of print.
- 55 - **Levenson JM, Sweatt JD** (2005) Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci* 6:108-118.
- **Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J** (1999) Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 155:853-862.
- 60 - **Maestri NE, Brusilow SW, Clissold DB, Bassett SS** (1996) Long-term treatment of girls with ornithine trans-carbamylase deficiency. *N Engl J Med* 335:855-859.
- 65 - **Masatoshi I, Yoshihisa K, Hiroki T, Takashi Y, Kazuyuki T, Yuka K, Takashi T, Kanji Y, Masahiko K, Yasunobu O, Takahiro T, Hiroyoshi A, Shun S.** (2007) Neurodegeneration of mouse nigrostriatal dopaminergic system induced by repeated oral administration of rotenone is prevented by 4-phenylbutyrate, a chemical chaperone. *Jour of Neurochem* 101:1491-1504.
- **McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL** (1999) Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 46:860-866.
- **Mercuri E, Bertini E, Messina S, Pelliccioni M, D'Amico A, Colitto F, et al.** (2004) Pilot trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 14(2):130-135.
- 70 - **Mercuri E, Bertini E, Messina S, Solari A, D'Amico A, Angelozzi C, et al.** (2007) Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy. *Neurol* 68(1):51-55.

# ES 2 332 687 B1

- **Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, Hori S, Kakizuka A, Ichijo H (2002)** ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* 16:1345-55.
- 5 - **Petri s, Kiaei M, Kipani K, Chen J, Calingasan NY, Crow JP, et al. (2006)** Additive neuroprotective effects of a histone deacetylase inhibitor and a catalytic antioxidant in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Dis* 22(1):40-49.
- 10 - **Qi X, Hosoi T, Okuma Y, Kaneko M, Nomura Y (2004)** Sodium 4-phenylbutyrate protects against cerebral ischemic injury. *Mol Pharmacol* 66:899-8908.
- 15 - **Ribé EM, Pérez M, Puig B, Gich I, Lim F, Cuadrado M, Sesma T, Catena S, Sánchez B, Nieto M, Gómez-Ramos P, Morán MA, Cabodevilla F, Samaranch L, Ortiz L, Pérez A, Ferrer I, Avila J, Gómez-Isla T (2005)** Accelerated amyloid deposition, neurofibrillary degeneration and neuronal loss in double mutant APP/tau transgenic mice. *Neurobiol Dis* 20:814-822.
- 20 - **Roberson ED, Scearce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu GQ, Mucke L (2007)** Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 316:750-754.
- 25 - **Rubenstein RC, Zeitlin PL (2000)** Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of DeltaF508-CFTR. *Am J Physiol Cell Physiol* 278:259-267.
- **Ryu EJ, Harding HP, Angelastro JM, Vitolo OV, Ron D, Greene L (2002)** Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 22:10690-10698.
- 30 - **Ryu H, Smith K, Camelo SI, Carreras I, Lee J, Iglesias AH, Dangond F, Cormier KA, Cudkowicz ME, Brown RH Jr, Ferrante RJ (2005)** Sodium phenylbutyrate prolongs survival and regulates expression of anti-apoptotic genes in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *J Neurochem* 93:1087-1098.
- **Sato S, Ward CL, Krouse ME, Wine JJ, Kopito RR (1996)** Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J Biol Chem* 271:635-638.
- 35 - **Selkoe DJ (2004)** Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Cell Biol* 6:1054-1061.
- **Steffan JS, Bodai L, Palios J, Poelman M, McCampbell A, Apostol BL, Kazantsev A, Schmidt E, Zhu YZ, Greenwald M, Kurokawa R, Housman DE, Jackson GR, Marsh JL, Thompson LM (2001)** Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in Drosophila. *Nature* 413:739-743.
- 40 - **Tully T, Bourtchouladze R, Scott R, Tallman J (2003)** Targeting the CREB pathway for memory enhancers. *Nat Rev Drug Discov* 2:267-277.
- **WO/1999/026657. Inderjit, S. (1999)** Inhibitors of nitric oxide synthase.

45 50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de 4PBA o alguna de sus sales farmacéuticamente aceptables, o de una composición que comprende 4PBA o alguna de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la preparación de un medicamento para prevención o tratamiento de trastornos cognitivos en demencias que cursan con taupatía.
- 10 2. Uso de la sal sódica de 4PBA para prevención o tratamiento de trastornos cognitivos según la reivindicación 1.
- 15 3. Uso de 4PBA o alguna de sus sales farmacéuticamente aceptables, o de una composición que comprende 4PBA o alguna de sus sales farmacéuticamente aceptables, según la reivindicación 1 ó 2, para prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, demencia frontotemporal, parálisis progresiva supranuclear, degeneración corticobasal, enfermedad de Pick, demencia de cuerpos de Lewy, demencia con granos argirófilos, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, o demencia pugilística.
- 20 4. Uso de 4PBA o alguna de sus sales farmacéuticamente aceptables, o de una composición que comprende 4PBA o alguna de sus sales farmacéuticamente aceptables, según la reivindicación 1 ó 2, para prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
- 25 5. Una composición que comprende 4PBA o alguna de sus sales farmacéuticamente aceptables para su uso en la prevención o tratamiento de trastornos cognitivos en demencias que cursan con taupatía.
- 30 6. Una composición que comprende la sal sódica de 4PBA para su uso según la reivindicación 5.
- 25 7. Una combinación farmacéutica **caracterizada** porque comprende 4PBA o alguna de sus sales farmacéuticamente aceptables como primer ingrediente activo, y un segundo ingrediente activo que es un agente inductor o facilitador del aclaramiento de los depósitos de  $\beta$ -amiloide cerebral.
- 35 8. Una combinación según la reivindicación 7, **caracterizada** porque comprende como primer ingrediente la sal sódica de 4PBA.
- 30 9. Una combinación según las reivindicaciones 7 u 8, **caracterizada** porque el agente inductor del aclaramiento de los depósitos de  $\beta$ -amiloide es un agente quelante de metales.
- 35 10. Una combinación según la reivindicación 9, **caracterizada** porque dicho agente inductor es el clioquinol.
- 40 11. Una combinación según las reivindicaciones 7 u 8, **caracterizada** porque el agente inductor del aclaramiento de los depósitos de  $\beta$ -amiloide es una enzima catabolizante.
- 45 12. Una combinación según la reivindicación 11, **caracterizada** porque dicho agente inductor es la enzima degradante de insulina IDE, o la neprilisina.
- 50 13. Una combinación según las reivindicaciones 7 u 8, **caracterizada** porque el agente inductor del aclaramiento de los depósitos de  $\beta$ -amiloide es la cerebrolisina.
- 55 14. Una combinación según las reivindicaciones 7 u 8, **caracterizada** porque el agente inductor del aclaramiento de los depósitos de  $\beta$ -amiloide son nitrofenoles.
- 50 15. Una combinación según la reivindicación 14, **caracterizada** porque dicho agente inductor es el 2,4-dinitrofenol, o el 3-nitrofenol.
- 60 16. Un kit que comprende una combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15.
- 55 17. Una combinación según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15, o un kit según la reivindicación 16, para su uso en la prevención o tratamiento de trastornos cognitivos en demencias que cursan con taupatía.
- 65 18. Una combinación o un kit según la reivindicación 17, para su uso en la prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, demencia frontotemporal, parálisis progresiva supranuclear, degeneración corticobasal, enfermedad de Pick, demencia de cuerpos de Lewy, demencia con granos argirófilos, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, o demencia pugilística.
- 60 19. Una combinación o un kit según la reivindicación 17, para su uso en la prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

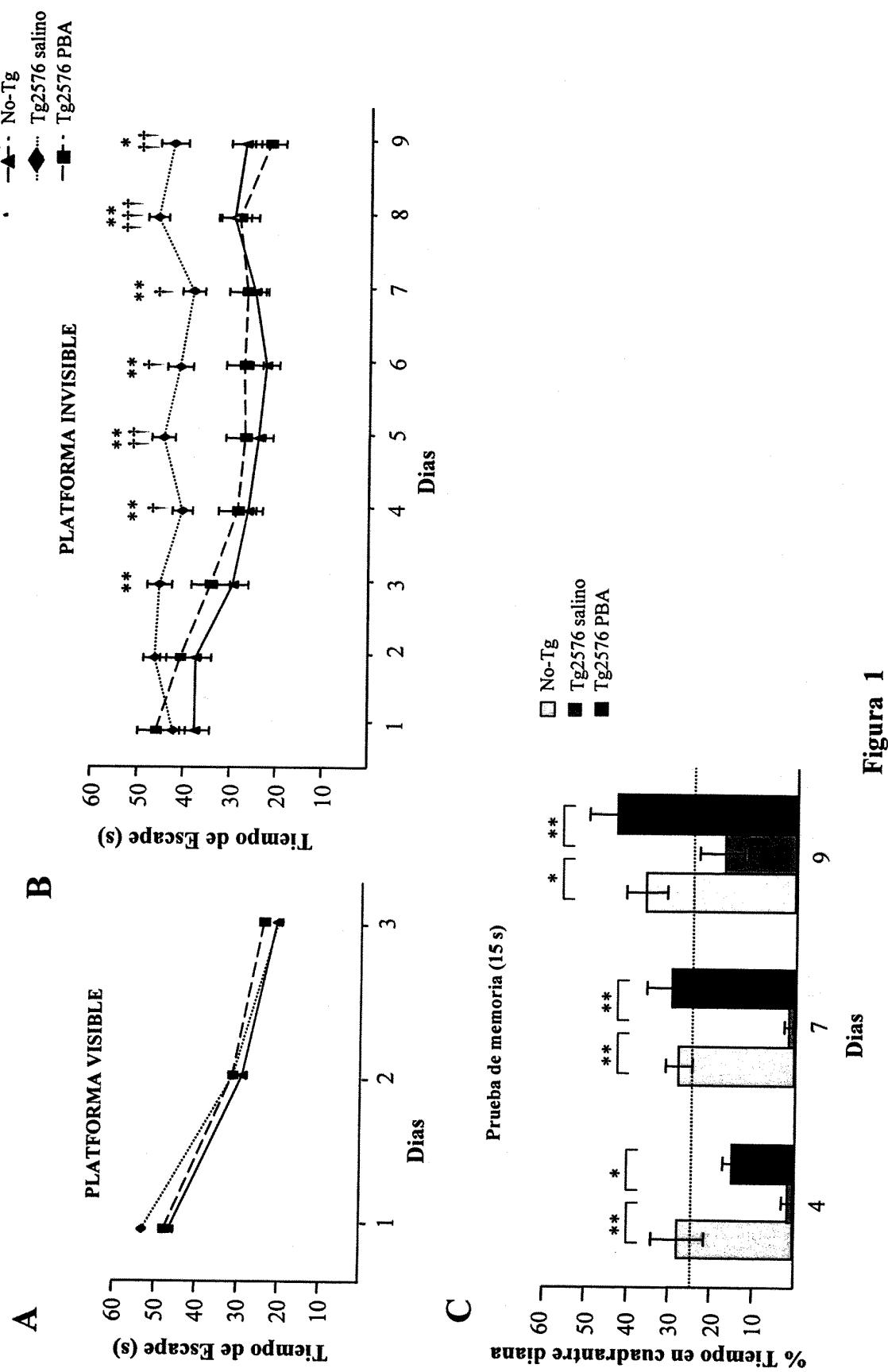


Figura 1

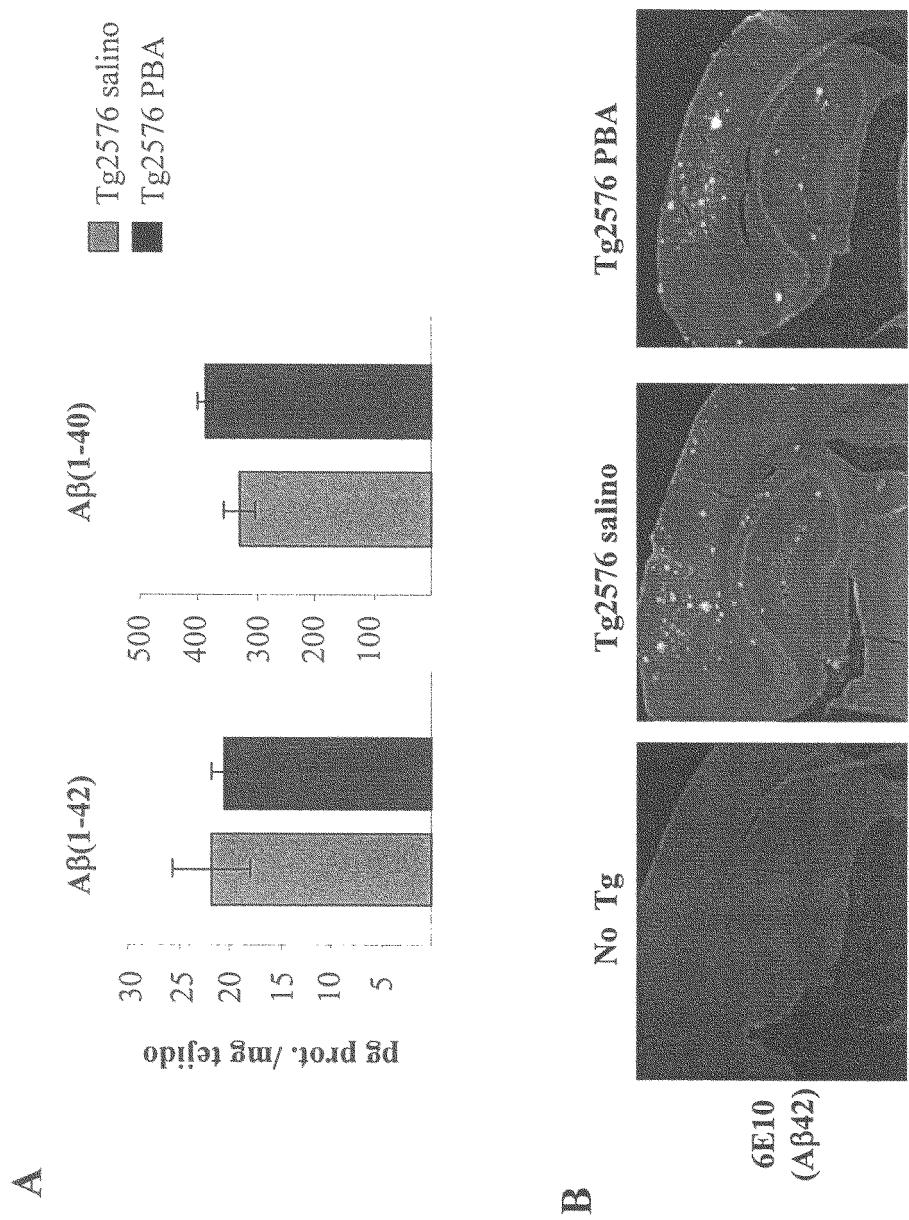
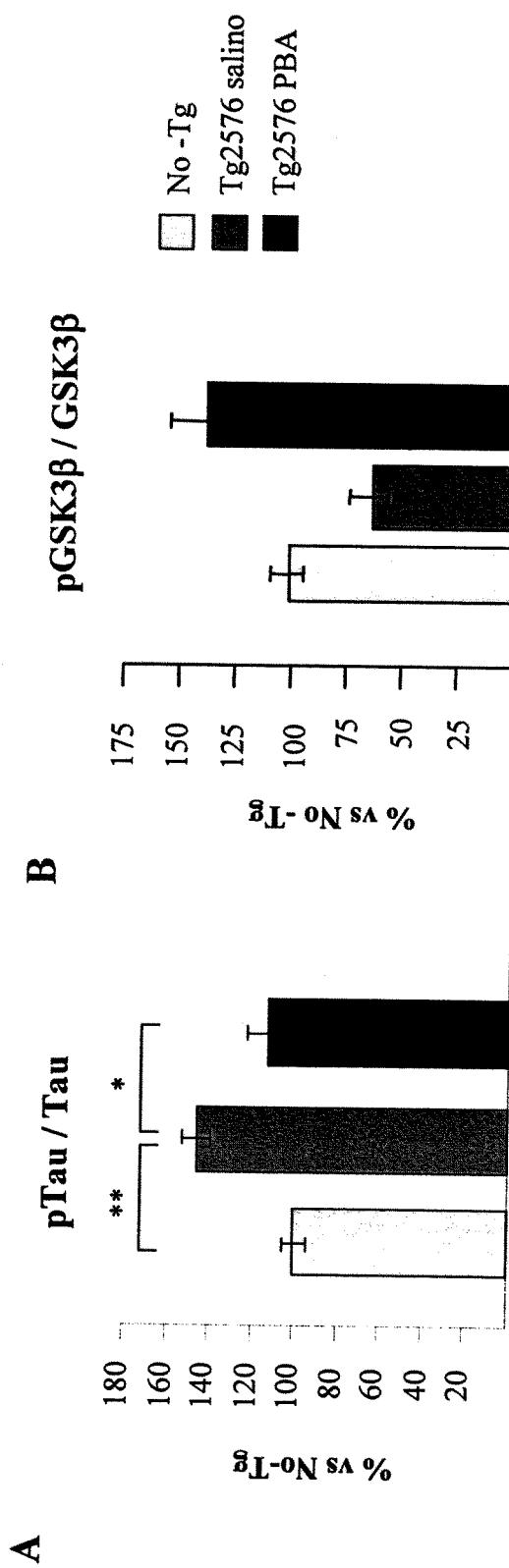


Figura 2



**Figura 3**

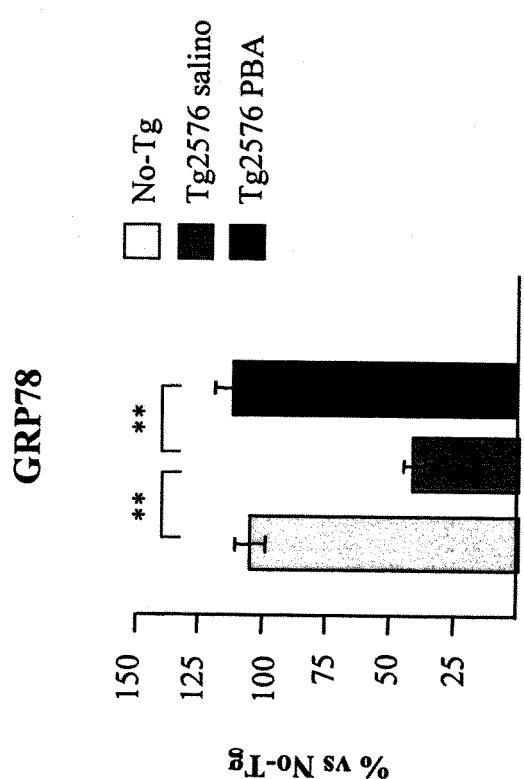


Figura 4

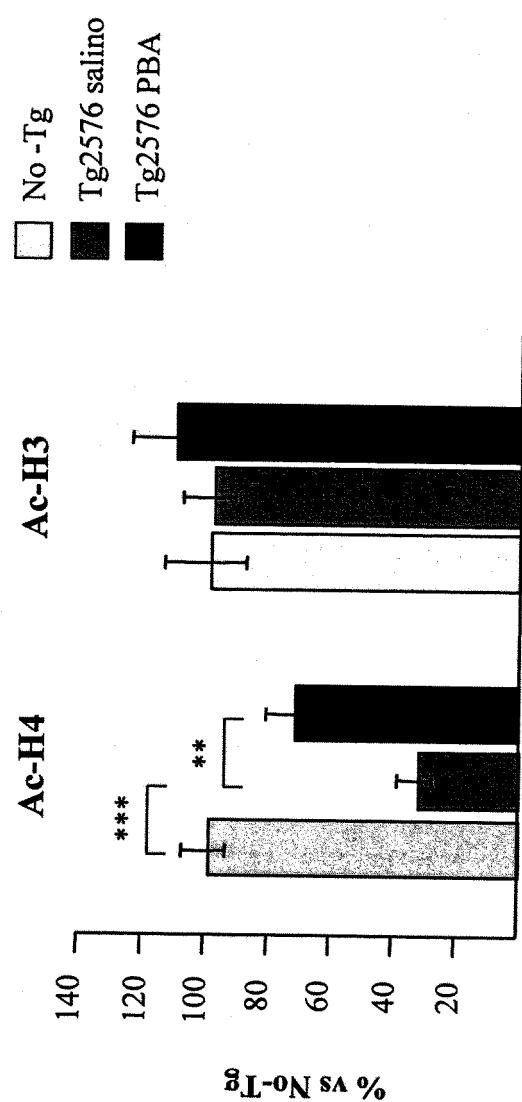


Figura 5

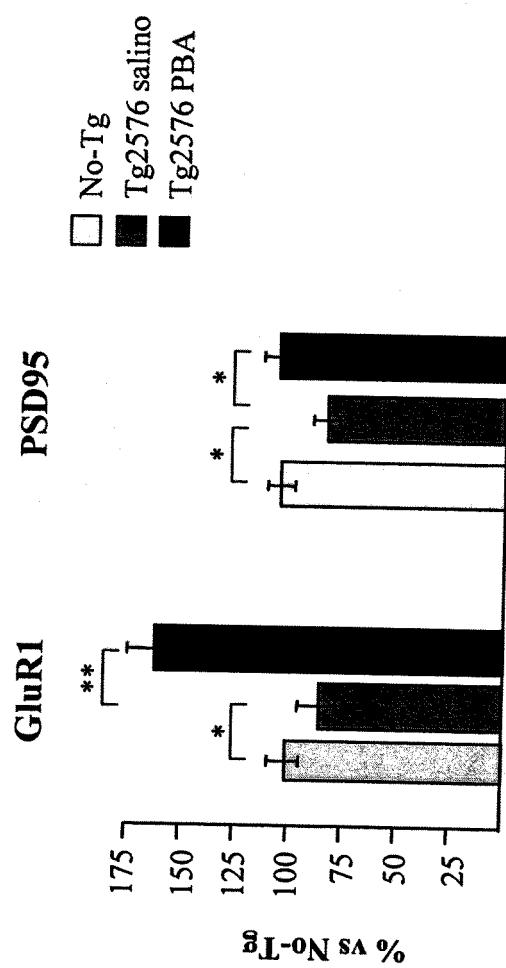


Figura 6



## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 02090534 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 14.11.2002, reivindicaciones 33,36.	1-6
Y		7-19
X	WO 9926657 A1 (MEDICAL UNIVERSITY OF SOUTH CAROLINA) 03.06.1999, reivindicaciones 59,65.	1-6
Y		7-19
Y	US 2006074104 A1 (BUSH. A. y col.) 06.04.2006, reivindicaciones 1,2.	7-10,16-19
Y	FINDEIS, M.A. The role of amyloid Beta peptide 42 in Alzheimer's disease. <i>Pharmacology &amp; Therapeutics</i> . 2007, Vol. 116, Nº 2 páginas 266-286, ISSN 0163-7258. Página 274, apartado 3.4.2.	7-8,11-12 16-19
Y	Página 280, párrafo 2º.	7-10,16-19
Y	SALLOWAY, S. y col. Disease-modifying therapies in Alzheimer's disease. <i>Alzheimer's &amp; Dementia</i> . 2008, Vol. 4, Nº 2, páginas 65-79, ISSN 1552-5260. Página 73, columna derecha, párrafo 3.	13,16-19
Y	Página 69, párrafo 1.8. Página 67, tabla 1.	7-10,16-19
Y	DE FELICE, F.G. y col. Inhibition of Alzheimer's disease beta-amyloid aggregation, neurotoxicity, and in vivo deposition by nitrophenols: implications for Alzheimer's therapy. <i>The FASEB Journal</i> . 2001, Vol. 15, Nº 7, páginas 1297-1299, ISSN 0892-6638. Todo el documento.	14-19
Y	BLENNOW, K. y col. Alzheimer's disease. <i>The Lancet</i> . 2006, Vol. 368, Nº 9533, páginas 387-403, ISSN 0140-6736. Página 398 tabla 2.	7-13

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

O: referido a divulgación no escrita

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

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

A: refleja el estado de la técnica

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 25.01.2010	Examinador E. Albarrán Gómez	Página 1/4
--	---------------------------------	---------------

## INFORME DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

Nº de solicitud: 200800736

### CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K 31/192** (2006.01)  
**A61K 31/47** (2006.01)  
**A61K 38/43** (2006.01)  
**A61K 38/16** (2006.01)  
**A61K 31/06** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)

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

A61K, A61P

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, MEDLINE

**OPINIÓN ESCRITA**

Nº de solicitud: 200800736

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.01.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	7-19	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	1-6	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones		<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	1-19	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión:**

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

**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	WO 02090534 A1	14-11-2002
D02	WO 9926657 A1	03-06-1999
D03	US 2006074104 A1	06-04-2006
D04	Pharmacology & Therapeutics.	2007
D05	Alzheimer's & Dementia	2008
D06	The FASEB Journal	2001
D07	The Lancet	2006

**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 invención tiene por objeto el uso del compuesto 4-fenilbutirato o algunas de sus sales farmacéuticamente aceptables, en concreto la sal sódica, en el tratamiento de trastornos cognitivos en demencias que cursan con tautopatía, en particular la enfermedad de Alzheimer. También se refiere a la combinación de 4-fenilbutirato con un agente inductor o facilitador del aclaramiento de los depósitos de beta-amiloide como Clioquinol (agente quelante de metales) o la enzima degradante de insulina IDE o Neprilisina o Cerebrolisina o nitrofenoles

Los documentos D01 y D02 describen el uso del 4-fenilbutirato y su sal sódica en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto se considera que las reivindicaciones 1 a 6 de la presente solicitud carecen de novedad (Art. 6.1 L.P. 11/1986).

El uso de Clioquinol, Neprilisina, Cerebrolisina y nitrofenoles en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer aparece descrito en los documentos D03 a D07.

En base a los documentos del estado de la técnica sería obvio para un experto en la materia la combinación del 4-fenilbutirato con cada uno de los agentes inductores del aclaramiento de los depósitos de beta-amiloide citados, en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. En consecuencia, en ausencia de un efecto sinérgico sorprendente, se considera que la combinación de 4-fenilbutirato con Clioquinol o Neprilisina o Cerebrolisina o nitrofenoles, recogida en las reivindicaciones 7 a 19 de la solicitud, útiles en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, carecen de actividad inventiva (Art. 8.1. LP 11/1986).