



(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C07D 313/20 (2006.01) **A61P 3/06** (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01) **A61P 3/10** (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2012/070237

(22) Fecha de presentación internacional:

9 de abril de 2012 (09.04.2012)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P201130573 12 de abril de 2011 (12.04.2011) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA [ES/ES]; Área de Valorización, Transferencia e Emprendemento, Edificio Emprendia, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **RUBIOLO, Juan Andrés** [AR/ES]; Área de Valorización, Transferencia e Emprendemento, Edificio Emprendia,

Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (ES). **BOTANA LÓPEZ, Luis Miguel** [ES/ES]; Área de Valorización, Transferencia e Emprendemento, Edificio Emprendia, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (ES). **ÓPEZ ALONSO, Henar** [ES/ES]; Área de Valorización, Transferencia e Emprendemento, Edificio Emprendia, Edificio Emprendia, E-15782 Santiago de Compostela (ES).

(74) Mandatario: **ACUÑA ÁLVAREZ, Laura**; Área de Valorización, Transferencia e Emprendemento, Edificio Emprendia, Campus Vida S/N, E-15782 Santiago de Compostela (ES).

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

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: USE OF YESSOTOXINS AND THE DERIVATIVES THEREOF FOR THE TREATMENT AND/OR PREVENTION OF METABOLIC DISEASES

(54) Título : USO DE LA YESSOTOXINA Y SUS DERIVADOS PARA EL TRATAMIENTO Y/O LA PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES METABÓLICAS

(57) Abstract: The invention relates to the use of yessotoxins and the derivatives thereof for producing a medicament for the prevention and/or treatment of metabolic diseases and preferably metabolic syndrome or diabetes mellitus type 2, *inter alia*.

(57) Resumen: La presente invención se refiere al uso de la yessotoxina y sus derivados para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades metabólicas y más preferiblemente del síndrome metabólico o la diabetes mellitus tipo 2, entre otras.

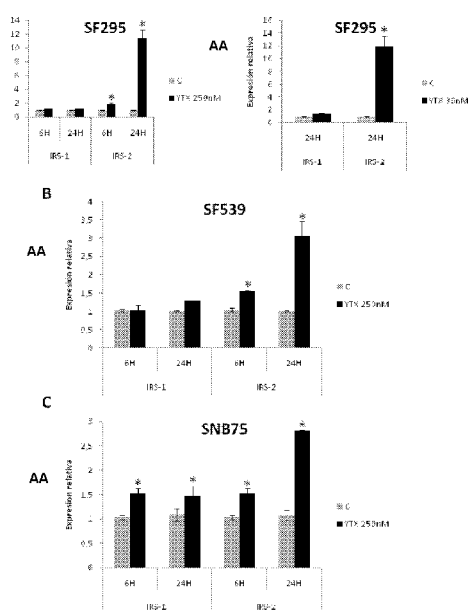


Figura 1



(84) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*):

ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*
- *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))*
- *con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))*

Uso de la Yessotoxina y sus derivados para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades metabólicas

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biomedicina. Específicamente se refiere al uso de la yessotoxina y sus derivados para la elaboración de un medicamento, preferiblemente para la prevención o el tratamiento de enfermedades metabólicas, más preferiblemente del síndrome metabólico o la diabetes mellitus tipo 2.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Hay dos formas mayoritarias de diabetes. La diabetes tipo 1 se debe primordialmente a la destrucción de los islotes pancreáticos de células β de manera autoinmune, resultando en una deficiencia absoluta de insulina. Las personas con diabetes tipo 1 deben recibir insulina exógena para prevenir el desarrollo de cetoacidosis y poder sobrevivir. La frecuencia de este tipo de diabetes es muy baja en comparación con la diabetes tipo 2 que representa más del 90% de los casos globalmente. La diabetes tipo 2 se caracteriza por la resistencia a la insulina y/o por la secreción anormal de insulina en la que cualquiera de las 2 pueden predominar. Las personas con este tipo de diabetes no dependen de insulina exógena, pero pueden necesitarla para el control de los niveles de glucosa si esto no se consigue a través de la dieta o agentes hipoglucémicos.

La epidemia de diabetes que se está produciendo a nivel global se relaciona principalmente con la diabetes tipo 2, y está teniendo lugar tanto en naciones desarrolladas como en vía de desarrollo.

Aunque la diabetes tipo 2 es numéricamente más prevalente en la población general, la diabetes tipo 1 es la enfermedad crónica más común en niños. Pero, con el incremento de la diabetes tipo 2 en niños y adolescentes, esto puede revertirse en una o dos décadas siendo el tipo 2 la mayoritaria en muchos grupos étnicos y potencialmente en los grupos Europeicos (esto es, descendientes de europeos).

Alrededor de 285 millones de personas en todo el mundo sufren diabetes mellitus tipo 2 y sus comorbilidades asociadas. Se estima que la cantidad de personas

afectadas se incrementa en un 6,5% anual alcanzándose 439 millones de personas afectadas para el año 2030. Tanto la morbilidad así como la mortalidad por diabetes son consecuencias de complicaciones microvasculares y macrovasculares. De los 285 millones de personas con diabetes, alrededor de medio millón mueren anualmente a raíz de complicaciones asociadas a esta enfermedad, haciendo a la diabetes la quinta causa de muerte en países desarrollados. Estas estadísticas ilustran el fallo terapéutico de los fármacos contra la diabetes que actualmente están en el mercado para retrasar la progresión de esta enfermedad. También ilustran la necesidad continua de ampliar la investigación y el desarrollo de fármacos alternativos con mecanismos de acción nuevos que permitan retrasar la progresión de la enfermedad y las complicaciones asociadas.

La mayoría de las muertes en personas con diabetes son a causa de aterosclerosis cardiovascular y cerebrovascular acelerada. La mortalidad atribuible a causas cardiovasculares (CVD) se incrementa en 1,5-4,5 veces mientras que la mortalidad por causas múltiples se incrementa 1,5-2,7 veces. La diabetes ha sido identificada como un factor de riesgo independiente por CVD, aunque en personas con diabetes frecuentemente coexisten otros factores de riesgo como la obesidad, hipertensión y la dislipidemia.

El mayor riesgo de sufrir un CVD se relaciona con la intolerancia a la glucosa (IGT) y con la diabetes. La IGT se define como hiperglucemia (con valores de glucosa intermedios entre normales y los correspondientes a la diabetes) luego del consumo de glucosa. Representa la etapa clave en la historia natural de la diabetes tipo 2 y los individuos que la sufren están en un mayor riesgo que la población general de desarrollar diabetes. Aproximadamente el 40% de las personas con IGT progresan hacia la diabetes en los siguientes 5-10 años. La IGT está relacionada frecuentemente con el síndrome metabólico (síndrome de resistencia a insulina). Tanto la IGT así como la glucosa alterada en ayunas (IFG) son marcadores muy potentes para el desarrollo de diabetes y están asociados con un incremento en el riesgo de sufrir CVD.

El algoritmo para el tratamiento de la diabetes revisado en 2008 por la Asociación Americana de Diabetes y por la Asociación Europea para el Estudio de la Diabetes recomienda la medicación tradicional con metformina, ya sea como mono-terapia o

en combinación con sulfonilurea o insulina, como opciones preferidas en el nivel 1. Este algoritmo solo sugiere la adición de fármacos alternativos como la pioglitazona y la incretina como agentes de segunda línea en el nivel 2 (peor validado). Sin embargo, estas medicaciones tradicionales han sido incapaces de retrasar el curso progresivo de la diabetes, lo que se evidencia con la necesidad de incrementar la terapia multifarmacológica a lo largo del tiempo a fin de mantener un control adecuado de la glucemia (Lo MC, Lansang MC. 2010. Am J Ther, ISSN: 1536-3686). Actualmente existen varias alternativas farmacológicas para el tratamiento de la hiperglucemia y la diabetes tipo 2. Las sulfonilureas producen la liberación de insulina en las células beta pancreáticas, las metiglinidas que ayudan al páncreas a producir insulina, las biguanidas (en esta categoría está incluida la metformina, que es generalmente el primer tipo de medicación que se utiliza para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2) reducen la liberación de glucosa del hígado e incrementan la captación de glucosa por los tejidos periféricos incluido el músculo esquelético, las tiazolidinedionas también conocidas como glitazonas afectan los genes que responden a insulina aumentando la producción de los ARNm para las enzimas dependientes de insulina generando un mejor uso de la glucosa por parte de las células, los inhibidores de la alfa-glucosidasa que disminuyen la digestión y absorción del almidón en el intestino delgado, y los análogos de péptidos (análogos y agonistas del péptido similar al glucagón, inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 y los análogos de la amilina) que actúan a nivel de las incretinas. Debido a que los medicamentos para el tratamiento de la diabetes tipo 2 tienen una eficacia limitada y efectos secundarios adversos, el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la diabetes mellitus con nuevos mecanismos de acción se hace necesaria.

La diabetes tipo 2 se considera actualmente epidémica debido al incremento de la obesidad y del estilo de vida sedentario. Varios estudios han demostrado convincentemente que la prevención de la diabetes tipo 2 es posible. El mejor abordaje para prevenir la diabetes no está todavía del todo claro, pero existe evidencia abrumadora de que el 60% de los nuevos casos de diabetes pueden ser prevenidos o al menos retrasados a través de modificaciones en el estilo de vida y/o por intervenciones farmacológicas en individuos de alto riesgo.

La diabetes mellitus tipo 2 se caracteriza por la incapacidad del organismo para utilizar eficientemente los nutrientes circulantes. En condiciones normales, en respuesta a la elevación de la glucosa en plasma, se secreta insulina en las células β de los islotes de Langerhans en el páncreas, promoviéndose la captación de energía, el metabolismo, y el almacenamiento. La diabetes tipo 2 está precedida por el desarrollo de resistencia a insulina en tejidos blanco, pero las causas moleculares de su iniciación y progresión siguen sin estar establecidas claramente. La obesidad es el factor de riesgo más importante para el inicio de la resistencia a insulina, aunque otros factores genéticos y ambientales contribuyen. Los islotes compensan inicialmente la pérdida de sensibilidad a la insulina expandiendo la masa de células β y la capacidad secretora de insulina, pero con el tiempo, no pueden seguir compensando el estrés crónico del incremento en la demanda de insulina, produciéndose una pérdida de células β con la consecuente reducción de los niveles de insulina circulantes, a pesar de la continua resistencia a insulina periférica, generándose una hiperglucemia crónica. Sin embargo, las conexiones moleculares subyacentes en la cascada de obesidad, resistencia a insulina, compensación por parte de los islotes, fallo eventual de las células β , y finalmente diabetes permanecen sin establecer.

La señalización celular por insulina se produce a través de su unión a receptores tirosina quinasa específicos que se expresan en células blanco, lo que resulta en un incremento en la fosforilación de proteínas intracelulares y la activación de complejas cascadas de segundos mensajeros que regulan el metabolismo de la glucosa y de los lípidos. Las proteínas sustrato de los receptores de insulina (IRS) son una familia de moléculas que son fosforiladas directamente por el receptor de insulina, lo que conduce al reclutamiento y activación de proteínas señalizadoras adicionales. El papel crucial de las proteínas IRS ha sido demostrado a través de modelos de ratones transgénicos *knockout*. La ablación de IRS1 resulta en un retraso en el crecimiento y resistencia a la insulina, pero produce diabetes debido a un aumento en la masa de células β . En contraste, los ratones IRS 2-/- presentan muchas de las características de la diabetes tipo 2 en humanos: resistencia de los tejidos periféricos a la insulina con incapacidad de incrementar las células β de manera compensatoria, lo que resulta en hiperglucemia, diabetes y muerte prematura. Estos resultados demuestran que IRS2 desempeña un papel crucial en

la sensibilidad a la insulina en el hígado y músculo esquelético, así como también en la proliferación de las células β .

En ratones con mutación dirigida para IRS2, con disminuciones en la expresión de esta proteína del 90% en los islotes de Langerhans y 30-50% en el hipotálamo, sin cambios en el hígado, tejido adiposo y músculo esquelético, se observan muchos de los cambios fenotípicos que se observan en ratones IRS2^{-/-}: resistencia a la leptina, resistencia periférica a la insulina, obesidad, intolerancia a la glucosa, fallos en las células β e hiperglucemia. La reducción parcial de la IRS2 hipotalámica afecta a la sensibilidad periférica a la insulina independientemente de los niveles reducidos de IRS2 en hígado, músculo y tejido adiposo. Varios subtipos de neuronas hipotalámicas ejercen efectos profundos en el comportamiento alimenticio. Existe evidencia de interferencia entre la señalización por leptina e insulina que regula la capacidad neuronal hipotalámica de censar la energía y el apetito. Sin embargo, el mecanismo por el cual la reducción en la expresión de IRS2 en el cerebro disminuye tanto la sensibilidad central a la leptina como la sensibilidad periférica a la insulina no está claro.

En su conjunto, esto aporta evidencia sólida acerca del papel central de IRS2 en la regulación hipotalámica de la sensibilidad central y periférica por leptina e insulina respectivamente, así como también en la propagación de las células β , y sugiere enérgicamente que el incremento de IRS2 en células β en pacientes resistentes a la insulina puede retrasar significativamente la destrucción de los islotes de Langerhans y la aparición de la diabetes.

La insulina disminuye la gliconeogénesis e incrementa la lipogénesis a través de modificaciones transcripcionales y post-transcripcionales. A nivel transcripcional, el tratamiento agudo con insulina disminuye el ARNm codificante para las enzimas gliconeogénicas como la fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PCK2 o PEPCK) y la fructosa-1, 6-bis fosfatasa (FBP) que controlan la conversión de piruvato a glucosa disminuyendo también la glucosa-6-fosfatasa (G6PC) que libera glucosa a la circulación. Por otra parte la insulina incrementa los niveles de los ARNm codificantes para enzimas lipogénicas, incluyendo la glucoquinasa (GCK) (que inicia la conversión de glucosa en ácidos grasos), la acetil CoA carboxilasa (ACACA) y la ácido graso sintasa (FASN). La cascada postranscripcional desencadenada por la

insulina en el hígado y otros tejidos comienza con la unión de la insulina a su receptor tirosina quinasa con la consecuente activación de éste, produciéndose la fosforilación de varias proteínas acopladoras de la señal, siendo las más prominentes IRS1 (*insulin receptor substrate 1*) e IRS2. Las tirosinas fosforiladas en IRS1 y 2 forman sitios de unión para moléculas señalizadoras, incluyendo a la subunidad reguladora de 85 kDa de la fosfoinositido 3-quinasa (PI 3-quinasa). Esto produce PI 3,4,5-trifosfato, que activa una proteína quinasa dependiente de 3-fosfoinosítido. Esta última fosforila una serina quinasa designada Akt o proteína quinasa B. La Akt activada fosforila a las enzimas reguladas por insulina, mediando de esta manera en muchos de los efectos post-transcripcionales de la insulina.

Existen pruebas experimentales que demuestran que en dos modelos de resistencia a insulina en ratones, uno obeso y otro lipodistrófico, existe una reducción del ARNm codificante para IRS2 y la correspondiente proteína, lo que lleva a la resistencia a la insulina que se manifiesta a través de una disminución en la activación de Akt mediada por ésta. Los estudios indican que el descenso de IRS2 representa una respuesta compensatoria a niveles de insulina crónicamente elevados. Una vez iniciada la hiperinsulinemia, se produce una disminución de IRS2 en el hígado, lo que está asociado, directamente o indirectamente, con la resistencia a la represión de las enzimas gluconeogénicas mediada por la insulina.

Por tanto, existe la necesidad de encontrar un tratamiento efectivo que actúe sobre este tipo de enfermedades metabólicas, más particularmente enfermedades relacionadas con la expresión del sustrato de los receptores de insulina (IRS1 y 2), entre otros.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la utilización de una ficotoxina marina, yessotoxina o sus derivados, con propiedades farmacológicas y bioactivas. Tiene una estructura consiste en un esqueleto éter poli-cíclico en forma de escalera, una cadena lateral insaturada de nueve carbonos y dos grupos sulfato.

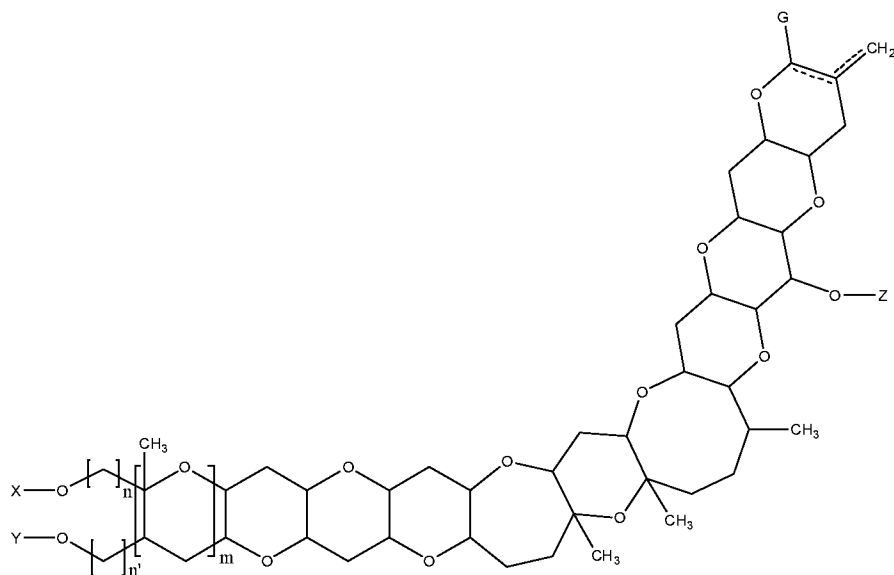
La yessotoxina presenta descritos numerosos análogos, aunque la estructura de algunos de ellos todavía se desconoce. Habitualmente el peso molecular de las

yessotoxinas se encuentra entre 955 y 1551 unidades de masa. En la actualidad se han identificado 36 derivados naturales de la yessotoxina. Algunas de las yessotoxinas son producidas directamente por dinoflagelados, mientras que otras son producidas durante el metabolismo en el marisco. Estructuralmente está relacionada con las ciguatoxinas y las brevetoxinas. Se aisló por primera vez a partir de vieiras contaminadas, *Pectinopecten yessoensis*, en Japón. Posteriormente se descubrió dicha toxina en cultivos de los dinoflagelados *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* y *Gonyaulax spinifera*. Hasta el momento se han descrito más de 30 análogos del compuesto (I) que se han obtenido a partir de marisco contraminado o de cultivos de dinoflagelados. Estos últimos son considerados los productores de la toxina.

Por otro lado, esta molécula puede ser sometida a modificaciones que den lugar a diversos derivados que pueden presentar una funcionalidad similar. Todos estos compuestos, tanto los análogos como los derivados, presentan una estructura química común (I) con la yessotoxina.

En la presente invención se demuestra cómo esta toxina induce la expresión del sustrato de los receptores de insulina (IRS1 y 2). Estos sustratos regulan la respuesta de las células a la insulina. Esto hace que las células puedan responder de mejor manera a la señalización por insulina. A su vez la toxina induce la expresión de los genes que codifican para enzimas glicolíticas inhibiendo la expresión de genes gliconeogénicos. También se observa un aumento en la expresión de genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos. Todos estos efectos se observan en la respuesta a insulina. Otro aspecto importante en el control de la glucemia es el transporte de glucosa desde la sangre hacia los tejidos, y la yessotoxina induce un aumento en la expresión de los transportadores encargados de esta actividad. Otro efecto de la toxina es el incremento del receptor de lipoproteínas de baja densidad encargado del transporte del colesterol hacia el hígado, lo que hace que sea potencialmente útil como fármaco para el tratamiento de la hipercolesterolemia.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades metabólicas:



(I)

donde:

X e Y se seleccionan independientemente entre H o $-SO_3H$,

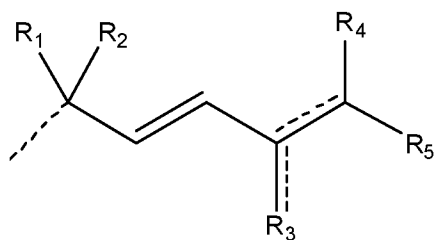
m puede ser 0 ó 1,

n y n' se seleccionan independientemente entre 0 y 5,

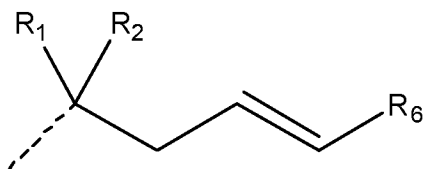
Z se selecciona entre H, un monosacárido u oligosacárido,

----- representa un enlace sencillo o doble,

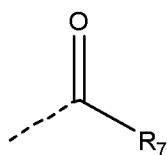
G es un grupo que se selecciona de entre los grupos de fórmula (II) a (IV):



(II)



(III)



(IV)

donde:

R_1 y R_2 se seleccionan independientemente entre $-OH$ o alquilo C_1-C_5 ;

R_3 , R_4 y R_5 se seleccionan independientemente entre H, alquilo C_1-C_{10} , alquenilo

C_1-C_{10} , $-OH$, $-COOH$, $=O$;

R₆ y R₇ se seleccionan independientemente entre alquilo C₁-C₁₀ o alqueno C₁-C₁₀ o amida, preferiblemente R₆ se selecciona de entre alquilo C₁-C₄, alqueno C₁-C₄ o amida y R₇ es un alquilo C₁-C₄

----- representa un enlace sencillo o doble.

El término "alquilo" se refiere, en la presente invención, a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, sustituidas o no sustituidas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 5, y más preferiblemente de 1 a 4, y que se unen al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, terc-butilo, sec-butilo, n-pentilo, n-hexilo, etc. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, carbonilo, ciano, acilo, alcóxicarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

El término "alqueno" se refiere en la presente invención a un radical alquilo, descrito anteriormente, y que tiene uno o más enlaces insaturados, concretamente tiene al menos un enlace doble, aunque también puede tener al menos un enlace triple, por ejemplo, vinilo, 1-propenilo, alilo, isoprenilo, 2-butenilo, 1,3-butadienilo etc. Los radicales alqueno pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcóxicarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

El término "amida" se refiere en la presente invención, a un radical de fórmula RCONR'R'' siendo R, R' y R'' radicales alquilo, alqueno, como los definidos anteriormente, o átomos de hidrógeno.

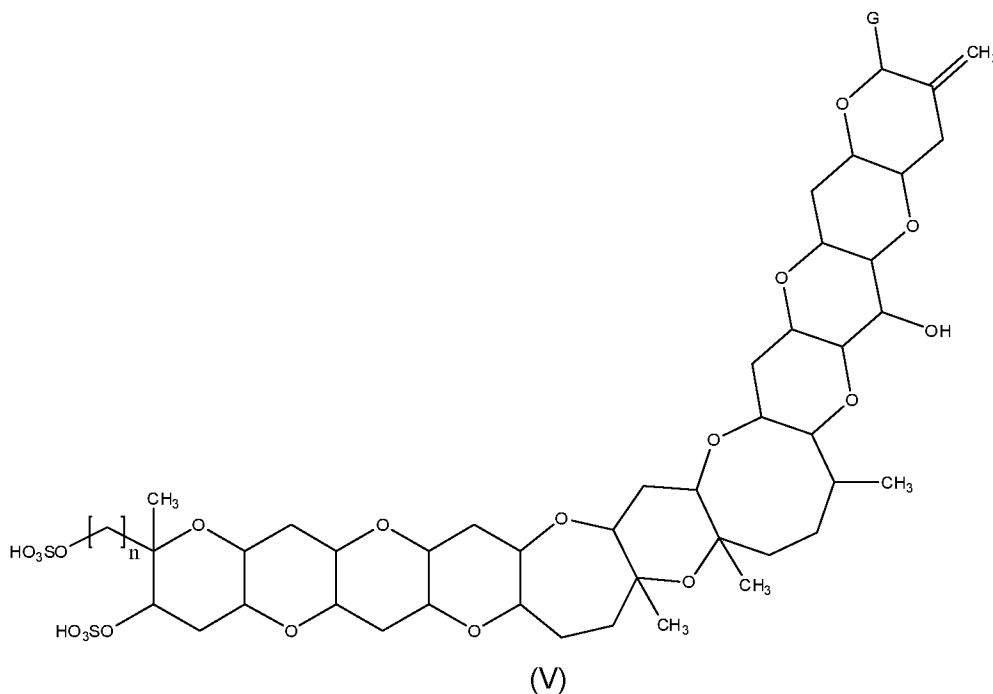
En una realización preferida X e Y son -SO₃H. En otra realización preferida X es H e Y es -SO₃H. En otra realización preferida X es -SO₃H e Y es H.

En una realización preferida m es 1. En otra realización preferida m es 0. En otra realización preferida n es 1, 2 ó 3 y n' es 0. En otra realización preferida n es 0 y n' es 1, 2 ó 3.

En otra realización preferida R₁ es metilo y R₂ es -OH.

En otra realización preferida, G es el grupo de fórmula (II). En una realización aún más preferida R_3 se selecciona entre H, alquilo C_1-C_4 , alquenilo C_1-C_4 o $-COOH$. En una realización aún más preferida R_4 se selecciona entre H, $-OH$ u $=O$. En otra realización R_5 se selecciona entre H, alquilo C_1-C_4 , alquenilo C_1-C_4 o $-OH$.

En otra realización preferida el compuesto es de fórmula (V), donde X e Y son $-SO_3H$, Z es H, n' es 0 y m es 1 del compuesto de fórmula (I):



y donde:

n se selecciona entre 1, 2 ó 3, y

G se ha definido anteriormente. Más preferiblemente G es el grupo de fórmula (II), más preferiblemente R_1 es metilo y R_2 es $-OH$. En una realización más preferida R_3 es un grupo $=CH_2$. En otra realización más preferida R_4 es H. En otra realización preferida R_5 es un etileno.

Cualquiera de los compuestos descritos anteriormente de fórmula general (I) o (V) pueden estar en forma de sal. Más preferiblemente la sal es de un alcalino o alcalinotérreo. Y aún más preferiblemente la sal es de sodio.

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I) o (V) pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por

ejemplo, Z, E), incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención, es decir, el término isómero también se refiere a cualquier mezcla de isómeros, como diastereómeros, racémicos, etc., incluso a sus isómeros ópticamente activos o las mezclas en distintas proporciones de los mismos. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

El término “análogo” tal y como aquí se utiliza, se refiere a una sustancia química similar a otra sustancia química en estructura y/o función. Por ejemplo, pueden considerarse análogos de la yessotoxina (YTX), aunque sin limitarse, la 45-hidroxi-YTX, la 45, 46,47-Trinor-YTX, la 45, 46, 47-Trinorhomo-YTX, la Homo-YTX, la 45OH-Homo-YTX, la Carboxi-YTX, la Carboxihomo-YTX, la 45OH-Carboxi-YTX, la Noroxo-YTX (41-keto-YTX), la Noroxohomo-YTX (41-ketohomo-YTX), la 40-epi-41-Keto-YTX, la 41-Keto-YTX-1,3-enona, la 41a-Homo-YTX, la 41a-Homo-YTXamida, la 44,45-diOH-YTX, la 44,45-diOH-41a-Homo-YTX, la 45-OH-dinor-YTX, la 44-Oxotrinor-YTX y la 41a-Homo-44-oxotrinor-YTX .

En la presente invención se entiende por “derivado”, aquel compuesto que se produce a partir de otro mediante modificaciones del mismo, y que presenta una funcionalidad similar. Estas modificaciones se pueden realizar por ejemplo, aunque sin limitarse, mediante métodos químicos, físicos, microbiológicos o farmacológicos. Pueden considerarse derivados de la yessotoxina aunque sin limitarse, los siguientes:

Desulfoderivados: 1-Desulfo-YTX, 1-desulfocarboxilhomo-YTX y 4-Desulfocarboxihomo-YTX

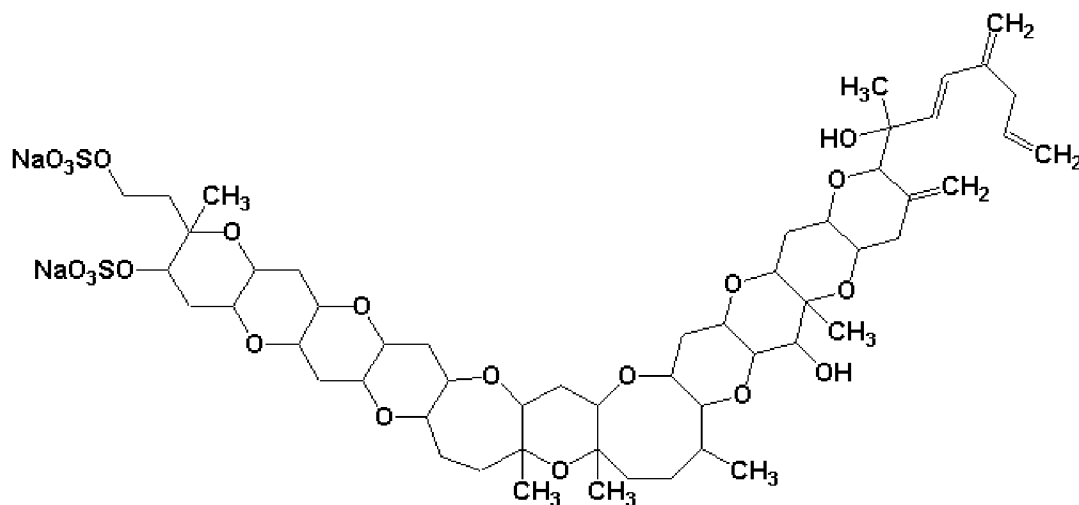
Los derivados 9-metilo: 9-metil-41-keto-YTX-1,3-enona, 9-metil-41a-homo-YTX, 9-metil-41a-homo-YTXamida y 44,45-diOH-9-metil-41^a-homoYTX.

Los derivados sin anillo A: Nor-ring-A-YTX, nor-ring-A-41-keto-YTX, nor-ring-A-40-epi-41-keto-YTX y nor-ring-A-41-keto-YTX-1,3-enona.

Los 32-glicosilderivados: glicosiyessotoxina A (GYTX-A), Protoceratina III, Yessotoxina 32-O-[β-L-arabinofuranosyl-(5'→1'')-β-L-arabinofuranosido, Protoceratin II, Tri-glicosilyessotoxina y Protoceratin IV.

Por tanto, en una realización preferida de la presente invención el compuesto de fórmula (I) se selecciona de la lista que comprende: yessotoxina (YTX), 45-hidroxi-YTX, 45, 46, 47-trinor-YTX, 45, 46, 47- trinorhomo- YTX, Homo-YTX, 45OH-homo-YTX, Carboxi-YTX, Carboxihomo-YTX, 45OH-carboxi-YTX, noroxo-YTX, noroxohomo-YTX, 40-epi-41-keto-YTX, 41-keto-YTX-1,3-enona, 41a-homo-YTX, 41a-homo-YTXamida, 44, 55-doOH-41a-homo-YTX, 45-OH-dinor-YTX, 44-oxotrinor-YTX, 41a-homo-44-oxotrinor-YTX, 1-desulfo-YTX, 1-desulfocarboxihomo-YTX, 4-desulfocarboxihomo-YTX, 9-metil-41-ceto-YTX-1,3-enona, 9-metil-41a-homo-YTX, 9-metil-41a-homo-YTXamida, 44, 55-diOH-9-metil-41a-homo-YTX, Nor-ring-A-YTX, nor-ring-A-41-keto-YTX, nor-ring-A-40-epi-41-keto-YTX, nor-ring-A-41-keto-YTX-1,3-enona, glicosiyessotoxina A (GYTX-A), Protoceratina III, Yessotoxina 32-O-[β -L-arabinofuranosyl-(5'→1'')- β -L-arabinofuranosido, Protoceratin II, Triglicosilyessotoxina y Protoceratin IV.

En una realización más preferida el compuesto de fórmula (I) es yessotoxina que se representa por la siguiente formula:



Los compuestos de la presente invención se demuestra que inducen un aumento en la expresión de IRS1 y 2 que son los responsables de modular la señal en respuesta a la unión de la insulina a su receptor de membrana, activando cascadas de señalización que en última instancia regulan el metabolismo de la glucosa y ácidos grasos. También inducen un aumento en la expresión de las enzimas glicolíticas hexoquinasa y fructosa-2,6-bifosfatasa 4 (HK1, HK2, PFKFB4), con disminución de las enzimas gluconeogénicas fosfoenolpiruvato carboxyikinasa 2 y

glucose 6 fosfatasa (PCK2, G6PC3). Esta alteración en el metabolismo de la glucosa es el que se observa en células en cultivo tratadas con insulina e in vivo cuando hay un aumento en la concentración sanguínea de insulina que induce un aumento en la degradación intracelular de glucosa con inhibición de la gliconeogénesis. Otro efecto de la insulina sobre el metabolismo celular es la alteración del metabolismo lipídico, de modo que se produce un aumento en la síntesis de ácidos grasos. Los compuestos de la presente invención inducen un aumento en la expresión de acetil-CoA carboxilasa (α ACACA) y la ácido graso sintasa (FASN).

La primera de estas enzimas cataliza la reacción limitante en la síntesis de ácidos grasos de cadena larga, mientras que la segunda es un complejo multi enzimático que desempeña un papel clave en la síntesis de ácidos grasos. Otro aspecto importante en la regulación del metabolismo de la glucosa in vivo, es el transporte de esta molécula hacia el interior celular desde el torrente sanguíneo.

En el síndrome metabólico, se produce hiperglucemia como consecuencia de la resistencia a la acción de la insulina. Con el tiempo, esta condición puede llevar a la diabetes mellitus tipo 2. Una de las causas de la hiperglucemia es la disminución de los transportadores de glucosa en las membranas celulares, esto hace que la glucosa pase hacia el interior celular más lentamente y aumente su concentración en sangre, necesitándose más insulina para alcanzar la misma tasa de transporte. Los compuestos de la invención inducen un aumento en la expresión de los genes que codifican para 3 transportadores de glucosa (SLC2A13, SLC2A14, SLC2A3).

Además están sobre-expresados genes corriente abajo de IRS1 y 2 en las células tratadas con yessotoxina cuando se comparan con células control (ver ejemplos).

Se entiende por "enfermedades metabólicas" o errores congénitos del metabolismo (ECM), a un grupo numeroso de enfermedades, generalmente hereditarias, producidas por el bloqueo de alguna vía metabólica en el organismo. El efecto de estas alteraciones varía según la vía afectada y la severidad del bloqueo. Tanto los efectos tóxicos de las sustancias acumuladas, como la deficiencia de los productos, son los principales responsables de las manifestaciones clínicas. Preferiblemente son patologías relacionadas con la resistencia a la insulina, intolerancia a la

glucosa, hiper-insulinemia, aumento de triglicéridos en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), disminución del colesterol tipo HDL e hipertensión arterial.

La presencia de estas alteraciones metabólicas hacen que el sujeto que las padece tenga un alto riesgo de desarrollar diabetes, más preferiblemente diabetes mellitus tipo 2, en donde las alteraciones metabólicas arriba descritas se hacen crónicas, con el consecuente riesgo de padecer las complicaciones asociadas a esta enfermedad, como daño en vasos sanguíneos pequeños y grandes (microangiopatía, macroangiopatía), daño en nervios periféricos (polineuropatía), hipertensión arterial, daño de la retina (retinopatía diabética), daño renal, daño hepáticos (esteatosis hepática), cardiopatía, daños en la piel (dermatopatía diabética) y coma diabético.

Además, la insulina incrementa la actividad del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) en la superficie celular a través de un aumento en la transcripción del gen que codifica para esta proteína.

Por tanto, las enfermedades metabólicas se pueden seleccionar de la lista que comprende el síndrome metabólico, la hiperglucemia, la diabetes, más preferiblemente la diabetes mellitus tipo 2, la hipercolesterolemia, que se puede manifestar por altas concentraciones en sangre de LDL-colesterol, entre otras.

Los compuestos de la invención son capaces de inducir un aumento en la expresión del gen que codifica para el receptor de proteínas de baja densidad (LDLR) encargado de transportar el colesterol en sangre hacia el interior celular a través de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por endocitosis. Debido a que está demostrado que casi toda la actividad del LDLR que puede ser identificada in vivo en animales y humanos se observa en el hígado, en la presente invención se han utilizado cultivos de hepatocitos de rata para demostrar que los compuestos de la invención, y en particular la yessotoxina, inducen un aumento en el ARNm que codifica para el LDLR también en este tipo celular.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica (de aquí en adelante, composición farmacéutica de la invención) que comprende un compuesto de estructura química (I). En una realización preferida, la composición farmacéutica

comprende, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida la composición farmacéutica comprende además otro principio activo. En una realización más preferida de este aspecto de la invención la composición farmacéutica comprende un compuesto de estructura química (I) y además, un vehículo farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente con otro principio activo.

La composición de la presente invención puede formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse, en soluciones acuosas o no acuosas, en emulsiones o en suspensiones. Ejemplos de soluciones no acuosas son, por ejemplo, pero sin limitarse, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, o ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Ejemplos de soluciones acuosas, son por ejemplo, pero sin limitarse, agua, soluciones alcohólicas en agua, o medios salinos. Las soluciones acuosas pueden estar tamponadas o no, y pueden tener componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, o similares, o nutrientes, incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas o minerales. Alternativamente, las composiciones pueden prepararse para su administración en forma sólida. Las composiciones pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a: aglutinantes, tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes, tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes, tales como ácido algínico o almidón de maíz; lubricantes, tales como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes, tales como menta o salicilato de metilo. Tales composiciones y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse, a parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, epidural, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intracardiaca, intramuscular, intranasal, intracraneal, subcutánea, intraorbital, intracapsular, tópica, mediante parches transdérmicos, vía rectal, vía vaginal o uretral, mediante la administración de un supositorio, percutánea, aerosol nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna, bomba de infusión o vía catéter.

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo o tolerancia, del mamífero. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de la composición farmacéutica de la invención que produzcan el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dicha composición farmacéutica y el efecto terapéutico a conseguir.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

FIG. 1. muestra el incremento en la expresión de los genes que codifican para el sustrato receptor de insulina 1 y 2 (IRS1 y 2) después del tratamiento con yessotoxina. Cultivos de células SF295, SF539 o SNB75 fueron tratados con yessotoxina 250 nM durante 6 y 24 hs. En el caso de la línea celular más sensible a la toxina (SF295) se incluyó un tratamiento con yessotoxina 30nM durante 24 hs. Después de incubar en presencia de la toxina durante los tiempos arriba mencionados, se determinó la variación en la expresión de los ARNm codificantes para IRS1 y 2 por tecnología de microarrays. (A) En el caso de la línea SF295 se observa que no hay variación en la expresión de IRS1 mientras que hay un aumento en la expresión de IRS2 tanto a las 6 como a las 24 hs, siendo éste último tiempo de incubación el que produce el mayor incremento en la expresión. En las células incubadas con yessotoxina 30 nM durante 24 hs se observan un incremento en la expresión de IRS2 del mismo orden que el observado para la incubación con yessotoxina 250 nM durante 24 hs. (B) En el caso de la línea SF539 nuevamente se observa que no hay variación en la expresión de IRS1 y hay un aumento en la expresión de IRS2 al igual que en el caso anterior. También se observa un mayor incremento de este mensajero luego de 24 hs de incubación en presencia de

yessotoxina. (C) En el caso de SNB75 se observa un incremento de IRS1 después de 24 hs de incubación en presencia de yessotoxina sin observarse cambios a las 6 hs. Hay un incremento de IRS2 en las células incubadas con yessotoxina durante 6 y 24 hs siendo el último de mayor magnitud. Los cultivos se analizaron por duplicado para cada condición y las diferencias significativas que se muestran en las figuras tienen una $*p < 0,01$.

FIG. 2 muestra el incremento en la expresión de los genes que codifican para hexoquinasa 1 y 2 (HK1 y 2) y para la fructosa-2,6-bisfosfatasa 3 y 4 (PFKFB3 y 4) después del tratamiento con yessotoxina. Cultivos de células SF295, SF539 o SNB75 fueron tratados con yessotoxina 250 nM durante 6 y 24 hs. En el caso de la línea celular más sensible a la toxina (SF295) se incluyó un tratamiento con yessotoxina 30nM durante 24 hs. Después de incubar en presencia de la toxina durante los tiempos arriba mencionados, se determinó la variación en la expresión de los ARNm codificantes para HK1 y 2 y para PFKFB3 y 4 por tecnología de microarrays. (A) En la línea SF295 se observa un incremento de HK1 después de 24 hs de exposición a yessotoxina sin observarse variaciones después de 6 hs. Hay un incremento de HK2 después de 6 y 24 hs de incubación con yessotoxina, siendo el incremento mayor a las 24 hs. El mensajero para PFKFB3 está aumentado levemente en cultivos tratados con yessotoxina durante 24 hs, mientras que PFKFB4 está aumentado después de 6 y 24 hs en presencia de la toxina. El mayor incremento se observa a las 24 hs de incubación. En células tratadas con yessotoxina 30 nM durante 24 hs hay un aumento en la expresión de HK1, HK2 y PFKBF4 del mismo orden que el observado en células tratadas con yessotoxina 250 nM durante el mismo período de tiempo. (B) En el caso de SF539 se observa un incremento de HK1 después de 24 hs de incubación con yessotoxina sin observarse variaciones a las 6 hs. Hay un incremento de HK2 a las 6 y 24 hs de incubación con yessotoxina, siendo el incremento mayor a las 24 hs. Se observa en este caso un aumento de PFKFB3 y 4 tanto a las 6 como a las 24 hs de incubación en presencia de yessotoxina. El incremento a las 24 hs es de mayor magnitud. (C) En el caso de SNB75 hay un aumento de HK1 después de 24 hs de incubación con yessotoxina y un aumento de HK después de 6 y 24 hs en presencia de la toxina. PFKFB3 y 4 están incrementadas en los cultivos tratados con yessotoxina durante 6 y 24 hs. El mayor incremento se observa para PFKBF4 a las 24 hs de incubación con yessotoxina. Los cultivos se analizaron por duplicado para cada condición y las

diferencias significativas que se muestran en las figuras tienen una $*p < 0,01$ o $**p < 0,05$.

FIG. 3 muestra el incremento en la expresión de los genes que codifican para la ácido graso sintasa (FASN) y para la acetil CoA carboxilasa alfa (ACACA) después del tratamiento con yessotoxina. Cultivos de células SF295, SF539 o SNB75 fueron tratados con yessotoxina 250 nM durante 6 y 24 hs. En el caso de la línea celular más sensible a la toxina (SF295) se incluyó un tratamiento con yessotoxina 30nM durante 24 hs. Después de incubar en presencia de la toxina durante los tiempos arriba mencionados, se determinó la variación en la expresión de los ARNm codificantes para FASN y ACACA por tecnología de microarrays. (A) En el caso de la línea SF295 se observa un incremento de FASN luego de 24 hs de incubación en presencia de yessotoxina sin variaciones a las 6 hs. La misma variación en el perfil de expresión se observa para ACACA. En las células tratadas con yessotoxina 30nM durante 24 hs se observa un aumento de FASN y ACACA del mismo orden que el observado en las células tratadas con yessotoxina 250nM durante el mismo período de tiempo. (B) En el caso de la línea SF539 se observa un incremento de FASN después de 24 hs de incubación con yessotoxina sin variación a las 6 hs. Se observa un incremento del ARNm para ACACA tanto a las 6 como a las 24 hs de incubación con yessotoxina. (C) En el caso de la línea SNB75 se observan incrementos de FASN y ACACA a las 24 hs de incubación con yessotoxina sin observarse variaciones a las 6 hs. Los cultivos se analizaron por duplicado para cada condición y las diferencias significativas que se muestran en las figuras tienen una $*p < 0,01$.

FIG. 4 muestra la disminución en la expresión de los genes que codifican para fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 2 (PCK2) y para la glucosa-6-fosfatasa 3 (G6PC3) después del tratamiento con yessotoxina. Cultivos de células SF295, SF539 o SNB75 fueron tratados con yessotoxina 250 nM durante 6 y 24 hs. En el caso de la línea celular más sensible a la toxina (SF295) se incluyó un tratamiento con yessotoxina 30nM durante 24 hs. Después de incubar en presencia de la toxina durante los tiempos arriba mencionados, se determinó la variación en la expresión de los ARNm codificantes para PCK2 y G6PC3 por tecnología de microarrays. (A) En el caso de la línea SF295 se observa una disminución de PCK2 luego de 6 hs de incubación con yessotoxina. No se observan variaciones significativas para

G6PC3. (B) En el caso de la línea SF539 se observa una disminución en la expresión de PCK2 y G6PC3 después de 6 hs de incubación en presencia de yessotoxina. (C) En el caso de la línea SNB75 se observa una disminución en la expresión de PCK2 y G6PC3 cuando las células fueron incubadas con yessotoxina durante 6 hs. Los cultivos se analizaron por duplicado para cada condición y las diferencias significativas que se muestran en las figuras tienen una $*p<0,01$; $**p<0,05$.

FIG. 5 muestra el aumento en la expresión de los genes que codifican para los transportadores de glucosa 13, 14 y 3 (SLC2A13, 14 y 3) después del tratamiento con yessotoxina. Cultivos de células SF295, SF539 o SNB75 fueron tratados con yessotoxina 250 nM durante 6 y 24 hs. En el caso de la línea celular más sensible a la toxina (SF295) se incluyó un tratamiento con yessotoxina 30nM durante 24 hs. Después de incubar en presencia de la toxina durante los tiempos arriba mencionados, se determinó la variación en la expresión de los ARNm codificantes para SLC2A13, 14 y 3 por tecnología de microarrays. (A) En el caso de la línea SF295 se observa un incremento en la expresión de los tres transportadores de glucosa en las células tratadas con yessotoxina durante 6 y 24 hs, siendo el incremento mayor en las células tratadas durante 24 hs en los tres casos. En las células tratadas con yessotoxina 30nM durante 24 hs se observa un aumento en los tres transportadores del mismo orden que el que se observa en las células tratadas con yessotoxina 250nM durante el mismo período de tiempo. (B) En el caso de la línea SF539 se observa un aumento en la expresión de los tres transportadores en las células tratadas con yessotoxina durante 24 hs. Luego de 6 hs de incubación con yessotoxina se observa un aumento para los transportadores SLC2A14 y 3 sin observarse cambios significativos para SLC2A13. Las variaciones observadas son de mayor magnitud en los cultivos tratados durante 24 hs con la toxina. (C) En el caso de la línea SNB75 se observa un aumento significativo en la expresión de los tres transportadores luego de incubar las células con yessotoxina durante 24 hs mientras que luego de 6 hs de incubación el aumento es significativo para SLC2A14 y 3, sin cambios significativos en SLC2A13. Los cultivos se analizaron por duplicado para cada condición y las diferencias significativas que se muestran en las figuras tienen una $*p<0.01$; $**p<0.05$.

FIG. 6 (A) muestra el aumento en la expresión del gen que codifica para el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) después del tratamiento con yessotoxina en cultivos de células SF295, SF539 o SNB75 tratados con yessotoxina 250 nM durante 6 y 24 hs. En el caso de la línea celular más sensible a la toxina (SF295) se incluyó un tratamiento con yessotoxina 30nM durante 24 hs. Después de incubar en presencia de la toxina durante los tiempos arriba mencionados, se determinó la variación en la expresión del ARNm codificante para el LDLR por tecnología de microarrays. En las 3 líneas celulares estudiadas se observa un incremento de la expresión de LDLR después de 24 hs de tratamiento con yessotoxina. También se observa un aumento en la expresión de LDLR en las líneas SF295 y SNB75 a las 6 hs de tratamiento con la toxina de menor magnitud que le observado a las 24 hs. (B) En cultivos de hepatocitos primarios de rata tratados con yessotoxina 10 y 30nM durante 6 hs se puede observar que hay un aumento en la expresión de LDLR después de 6 hs de tratamiento con la toxina.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

METODOLOGÍA GENERAL: Para la realización de los experimentos de la presente invención se utilizan cultivos celulares derivados de glioma humano. Las líneas utilizadas son SF295, SF539 y SNB75. Todas las células se cultivaron en medio RPMI 1640 con 10% suero fetal bovino, penicilina 50 UI/ml y estreptomicina 1,2 μ M en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Una vez que las células alcanzaron la confluencia, se cambió el medio y 12 hs más tarde se agregó yessotoxina 250nM a los tres cultivos. Por otra parte se trataron cultivos de SF295 en las mismas condiciones de cultivo que las anteriores con yessotoxina 30 nM. Las células se incubaron en estas condiciones durante 6 y 24 hs para yessotoxina 250nM y durante 24 hs para yessotoxina 30nM. Luego de los respectivos períodos de incubación las células se lavaron con PBS y se extrajo ARN total utilizando el kit comercial RNeasy Mini Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. La

concentración del ARN extraído se determinó espectrofotométricamente utilizando un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). La integridad y pureza del ARN se determinó utilizando un bioanalizador (Bioanalyzer 2100-Applied Biosystems) junto con el kit comercial RNA 6000 nano reagents (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se sintetizó el ARN marcado fluorescentemente para analizar expresión diferencial utilizando los kits comerciales Low RNA Input Linear Amp Kit (Agilent Technologies) y Quick-Amp Labeling Kit (Agilent Technologies). El RNA fluorescente se hibridó en microarrays para detección de expresión diferencial de ARN en genoma humano (Whole Human Genome (4x44) Oligo Microarray Kit, Agilent Technologies). Luego de lavar los microarrays se determinó la fluorescencia con un scanner G2505 (Agilent Technologies). Los resultados se normalizaron y posteriormente se analizaron a fin de determinar expresión diferencial entre cultivos control y tratados con yessotoxina utilizando el software MeV, parte de TM4 (Microarray Software Suite).

Evidencia experimental soporta la noción de la utilización de células neuronales como un modelo útil para predecir si un compuesto afecta las rutas metabólicas reguladas por la insulina. Se ha observado que la disminución en la degradación de glucosa en el cerebro en pacientes con la enfermedad de Alzheimer, es consecuencia de una disminución en la transducción de señales inducida por la insulina. También estudios del volumen del hipocampo han revelado una relación entre la resistencia a insulina y el rendimiento cognitivo.

Por otro lado, la presente invención también demuestra que la yessotoxina, aunque se ha descrito como una toxina, ejerce el efecto arriba mencionado independientemente de la toxicidad que ejerza en cada cultivo en particular. Los cultivos de células SNB75, que no presentan disminución de viabilidad cuando se tratan con yessotoxina hasta 1000 nM hasta las 48 hs, responden, en lo que respecta a la expresión de los genes arriba mencionados, igual que las demás líneas analizadas que presentan distintas sensibilidades a la citotoxicidad de la yessotoxina (SF295 IC₅₀, 48H = 30nM, SF539 IC₅₀, 48H = 250nM).

EJEMPLO 1. EFECTO DE LA YESSOTOXINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LOS SUSTRATOS DE LOS RECEPTORES DE INSULINA 1 Y 2 (IRS1 Y 2) EN CÉLULAS SF295, SF539 Y SNB75.

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos descriptos en metodología general más arriba muestran que la yessotoxina induce un aumento en la expresión de IRS2 en las 3 líneas celulares analizadas, siendo el aumento mayor después de 24 hs de incubación en presencia de yessotoxina que a las 6 hs. En células SNB75 la yessotoxina induce a su vez un aumento en la expresión de IRS1 cuando las células son incubadas en presencia de este compuesto durante 6 y 24 hs, mientras que no hay diferencias significativas entre los niveles de expresión de este ARNm a las 6 y 24 hs.

EJEMPLO 2. EFECTO DE LA YESSOTOXINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA HEXOQUINASA 1 Y 2 (HK1 Y 2) Y PARA FRUCTOSA-2,6-BIFOSFATASA 3 Y 4 EN CÉLULAS SF295, SF539 Y SNB75.

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos descriptos en metodología general más arriba muestran que la yessotoxina induce un aumento en la expresión de HK1 y 2 en las 3 líneas celulares analizadas. La HK2 aumenta en cultivos tratados durante 6 o 24 hs con yessotoxina en los 3 tipos celulares, siendo el último tiempo de incubación el que produce el mayor aumento cuando se compara con cultivos control. La HK1 aumenta en cultivos tratados durante 24 hs con yessotoxina en los 3 tipos celulares sin observarse cambios en cultivos tratados con yessotoxina durante 6 hs. En SF295 la yessotoxina induce un aumento de PFKBF3 y 4 a las 24 hs mientras que a las 6 hs hay un aumento de PFKBK4, sin observarse variaciones significativas en PFKBF3. En SF539 y SNB75 la yessotoxina induce un aumento de PFKBF3 y 4. Este aumento en la expresión se observa a los dos tiempos estudiados, siendo la expresión mayor para PFKBF4 a las 24 hs, sin observarse variaciones para PFKBF3 entre las 6 y 24 hs de incubación.

EJEMPLO 3. EFECTO DE LA YESSOTOXINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LA ÁCIDO GRASO SINTASA (FASN) Y ACETIL CoA CARBOXILASA (ACACA) EN CÉLULAS SF295, SF539 Y SNB75.

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos descriptos en metodología general más arriba muestran que la yessotoxina induce un aumento en la expresión de FASN y ACACA en los tres tipos celulares después de 24 hs de incubación sin

observarse variaciones significativas después de 6 horas de incubación para SF295 y SNB75. La yessotoxina induce un aumento de ACACA después de 6 hs de incubación en SF539.

EJEMPLO 4. EFECTO DE LA YESSOTOXINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LA FOSFOENOL PIRUVATO CARBOXIQUINASA 2 (PCK2) Y GLUCOSA-6-FOSFATASA 3 (G6PC3) EN CÉLULAS SF295, SF539 Y SNB75.

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos descritos en metodología general más arriba muestran que la yessotoxina induce una disminución en la expresión de PCK2 en los tres tipos celulares utilizados después de 6 hs de incubación. La yessotoxina induce una disminución en la expresión de G6PC3 en SF539 y SNB75 después de 6 hs de incubación, sin observarse variaciones significativas en SF295 para este mismo tiempo de incubación.

EJEMPLO 5. EFECTO DE LA YESSOTOXINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LOS TRANSPORTADORES DE GLUCOSA 13, 14 Y 3 (SLC2A13, SLC2A14 Y SLC2A3) EN CÉLULAS SF295, SF539 Y SNB75.

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos descritos en metodología general más arriba muestran que la yessotoxina induce un aumento en la expresión de los tres transportadores de glucosa después de 6 y 24 hs de incubación en la línea celular SF295. El aumento es de mayor magnitud después de 24 hs de incubación en presencia de yessotoxina siendo SLC2A14 y 3 los más inducidos con respecto a los cultivos control. En SF539 y SNB75 los transportadores SLC2A14 y 3 están sobreexpresados en cultivos tratados con yessotoxina durante 6 y 24 hs, siendo el aumento en la expresión mayor a las 24 hs. En estos tipos celulares el transportador SLC2A13 está sobreexpresado después de 24 hs de incubación en presencia de yessotoxina, sin observarse variaciones a las 6 hs.

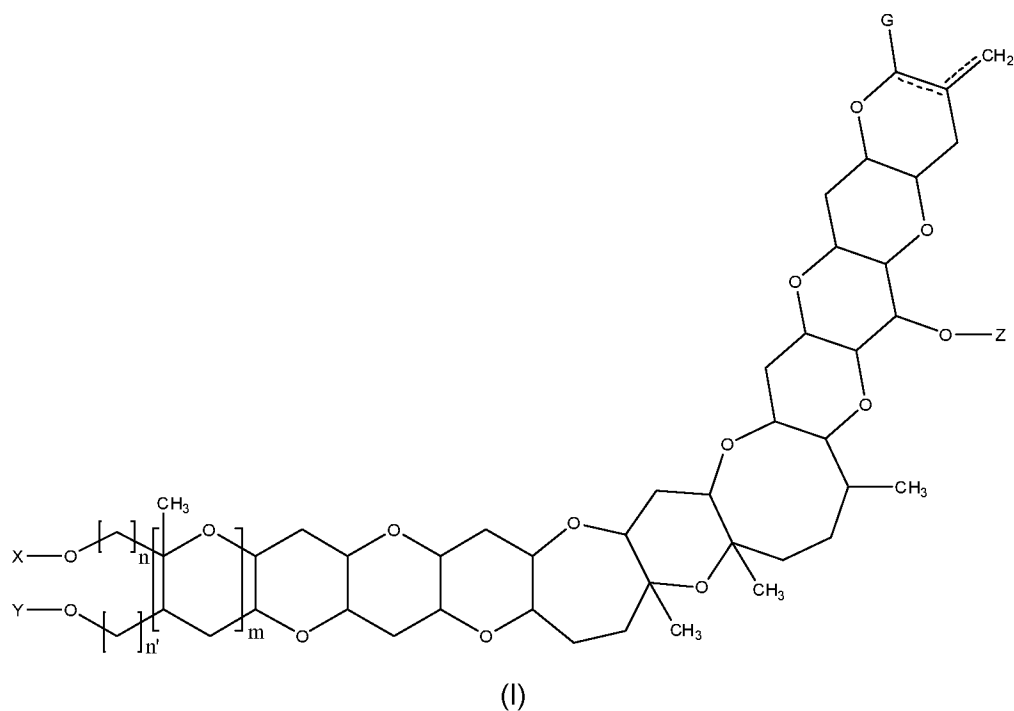
EJEMPLO 6. EFECTO DE LA YESSOTOXINA SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA EL RECEPTOR DE PROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDLR) EN CÉLULAS SF295, SF539 Y SNB75 Y EN HEPATOCITOS PRIMARIOS DE RATA.

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos descritos en la metodología general más arriba muestran que la yessotoxina induce un aumento en la expresión de LDLR en las líneas celulares SF295, SF539 y SNB75 después de 24 hs de tratamiento, mientras que después de 6 hs de tratamiento existe un aumento en la expresión del LDLR en SF295 y SNB75 de menor magnitud que el observado a las 24 hs. Debido a que in vivo en animales y humanos la mayoría de la actividad del LDLR se concentra en el hígado, se evaluó el efecto de la yessotoxina en cultivos de hepatocitos primarios de rata. Los hepatocitos se aislaron por el método de Seglen (Seglen PO. 1976, Methods Cell Biol 13: 29-83). Una vez aislados, se determinó la viabilidad de los hepatocitos por exclusión de azul de tripano y se cultivaron preparaciones con una viabilidad mayor al 90%. Las células se sembraron en medio de "*attachment*" [199:E-MEM 1:4 (Sigma), BSA 1 g/l, insulina (Sigma) 5 mg/l, HCO₃Na 26,2 mM, estreptomycin (Sigma) 100 µg/ml, penicilina (Calbiochem) 100 UI/ml, dexametasona (Sigma) 1,2 µM y suero fetal bovino (Gibco) 10 %] en el que permanecieron durante 3 hs, después de lo cual el medio fue reemplazado por medio de "*post-attachment*" [199:E-MEM 1:4 (Sigma), BSA 1 g/l, insulina (Sigma) 5 mg/l, HCO₃Na 26,2 mM, estreptomycin (Sigma) 100 µg/ml, penicilina (Calbiochem) 100 UI/ml, hidrocortisona (Sigma) 0,6 mM y suero fetal bovino (Gibco) 10 %] en donde permanecieron por 12 hs más. Veinticuatro horas después de sembrados los hepatocitos, se cambió el medio y se agregó yessotoxina 10 y 30nM, incubándose durante 6 hs. Después de esta incubación de purificó ARN total de acuerdo a como se describe en la metodología general. Se realizó transcripción reversa para 4µg de ARN de cada muestra utilizando una MMul RT (Fermentas) siguiendo las instrucciones del fabricante y el ADNc codificante para el LDLR fue cuantificado por PCR en tiempo real utilizando el kit de amplificación FastStart Universal SYBR Green Master (Roche) en un termociclador StepOne (Applied Biosystems). Se utilizó el método de $\Delta\Delta CT$ para cuantificación relativa usando como estándar interno para normalizar la ciclofilina. Los cebadores para amplificar el LDLR fueron: P-sentido-5'GAGGATGATGTGGCATGAACA3' (SEQ ID NO: 1) y P-antisentido-5'GCGTCCTTCCTGCCTAAGG3' (SEQ ID NO: 2). Los cebadores para amplificar la ciclofilina fueron: P-sentido-5'TGCTGGACCAACACAAATG3' (SEQ ID NO: 3) y P-antisentido-5'ATGCCCGCAAGTCAAAGAAA3' (SEQ ID NO: 4). Los resultados obtenidos para la cuantificación del LDLR en cultivos de hepatocitos primarios de rata tratados con

yessotoxina muestran que la toxina, a las 2 concentraciones utilizadas, induce un aumento en la expresión del LDLR cuando se compara con la expresión de cultivos control.

REIVINDICACIONES

1.- Uso de un compuesto de fórmula (I):



donde:

R_1 y R_2 se seleccionan independientemente entre -OH o alquilo C_1-C_5 ;

R_3 , R_4 y R_5 se seleccionan independientemente entre H, alquilo C_1-C_{10} , alquenilo C_1-C_{10} , -OH, -COOH, =O;

R_6 y R_7 se seleccionan independientemente entre alquilo C_1-C_{10} o alquenilo C_1-C_{10} o amida,

----- representa un enlace sencillo o doble,

para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades metabólicas.

2.-Uso según la reivindicación 1, donde X e Y son $-SO_3H$.

3.-Uso según la reivindicación 1, donde X es H e Y es $-SO_3H$.

4.-Uso según la reivindicación 1, donde X es $-SO_3H$ e Y es H.

5.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde m es 1.

6.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde m es 0.

7.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde n es 1, 2 ó 3 y n' es 0.

8.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde n es 0 y n' es 1, 2 ó 3.

9.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde R_1 es metilo y R_2 es -OH.

10.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde G es el grupo de fórmula (II).

11.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, donde R_3 se selecciona entre H, alquilo C_1-C_4 , alquenilo C_1-C_4 o -COOH.

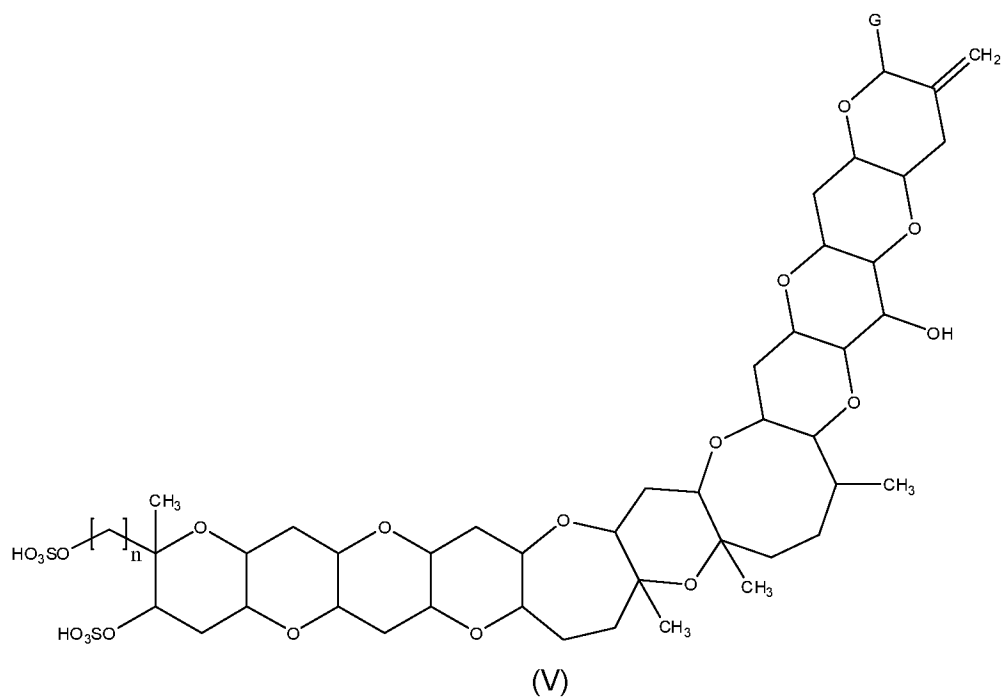
12.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 donde R_4 se selecciona entre H, -OH ú =O.

13.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 donde R_5 se selecciona entre H, alquilo C_1-C_4 , alqueno C_1-C_4 o -OH.

14.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde R_6 se selecciona entre alquilo C_1-C_4 , alqueno C_1-C_4 o amida.

15.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde R_7 es un alquilo C_1-C_4 .

16.-Uso según la reivindicación 1, donde X e Y son $-SO_3H$, Z es H, n' es 0, m es 1 y se representa por la fórmula (V):



donde:

n se selecciona entre 1, 2 ó 3,

G se define en las reivindicaciones anteriores.

17.-Uso según la reivindicación 16, donde G es el grupo de fórmula (II).

18.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 ó 17, donde R_1 es metilo y R_2 es -OH.

19.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, donde R_3 es un grupo $=CH_2$.

20.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, donde R_4 es H.

21.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, donde R_5 es un etileno.

22.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el compuesto está en forma de sal.

23.-Uso según la reivindicación anterior, donde la sal es de un alcalino o alcalinotérreo.

24.-Uso según la reivindicación anterior, donde la sal es de sodio.

25.-Uso según la reivindicación 1, donde el compuesto de fórmula (I) se selecciona de la lista que comprende: yessotoxina (YTX), 45-hidroxi-YTX, 45, 46, 47-trinor-YTX, 45, 46, 47- trinorhomo- YTX, Homo-YTX, 45OH-homo-YTX, Carboxi-YTX, Carboxihomo-YTX, 45OH-carboxi-YTX, noroxo-YTX, noroxohomo-YTX, 40-epi-41-keto-YTX, 41-keto-YTX-1,3-enona, 41a-homo-YTX, 41a-homo-YTXamida, 44, 55-doOH-41a-homo-YTX, 45-OH-dinor-YTX, 44-oxotrinor-YTX, 41a-homo-44-oxotrinor-YTX, 1-desulfo-YTX, 1-desulfocarboxihomo-YTX, 4-desulfocarboxihomo-YTX, 9-metil-41-ceto-YTX-1,3-enona, 9-metil-41a-homo-YTX, 9-metil-41a-homo-YTXamida, 44, 55-diOH-9-metil-41a-homo-YTX, Nor-ring-A-YTX, nor-ring-A-41-keto-YTX, nor-ring-A-40-epi-41-keto-YTX, nor-ring-A-41-keto-YTX-1,3-enona, glicosiyessotoxina A (GYTX-A), Protoceratina III, Yessotoxina 32-O-[β -L-arabinofuranosyl-(5'→1'')- β -L-arabinofuranosido, Protoceratin II, Tri-glicosilyessotoxina y Protoceratin IV.

26.- Uso según la reivindicación anterior, donde el compuesto es yessotoxina.

27.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, donde la enfermedad metabólica es el síndrome metabólico.

28.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, donde la enfermedad metabólica es la hiperglucemia.

29.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, donde la enfermedad metabólica es la diabetes mellitus tipo 2.

30.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, donde la enfermedad metabólica es la hipercolesterolemia que se manifiesta por altas concentraciones en sangre de LDL-colesterol.

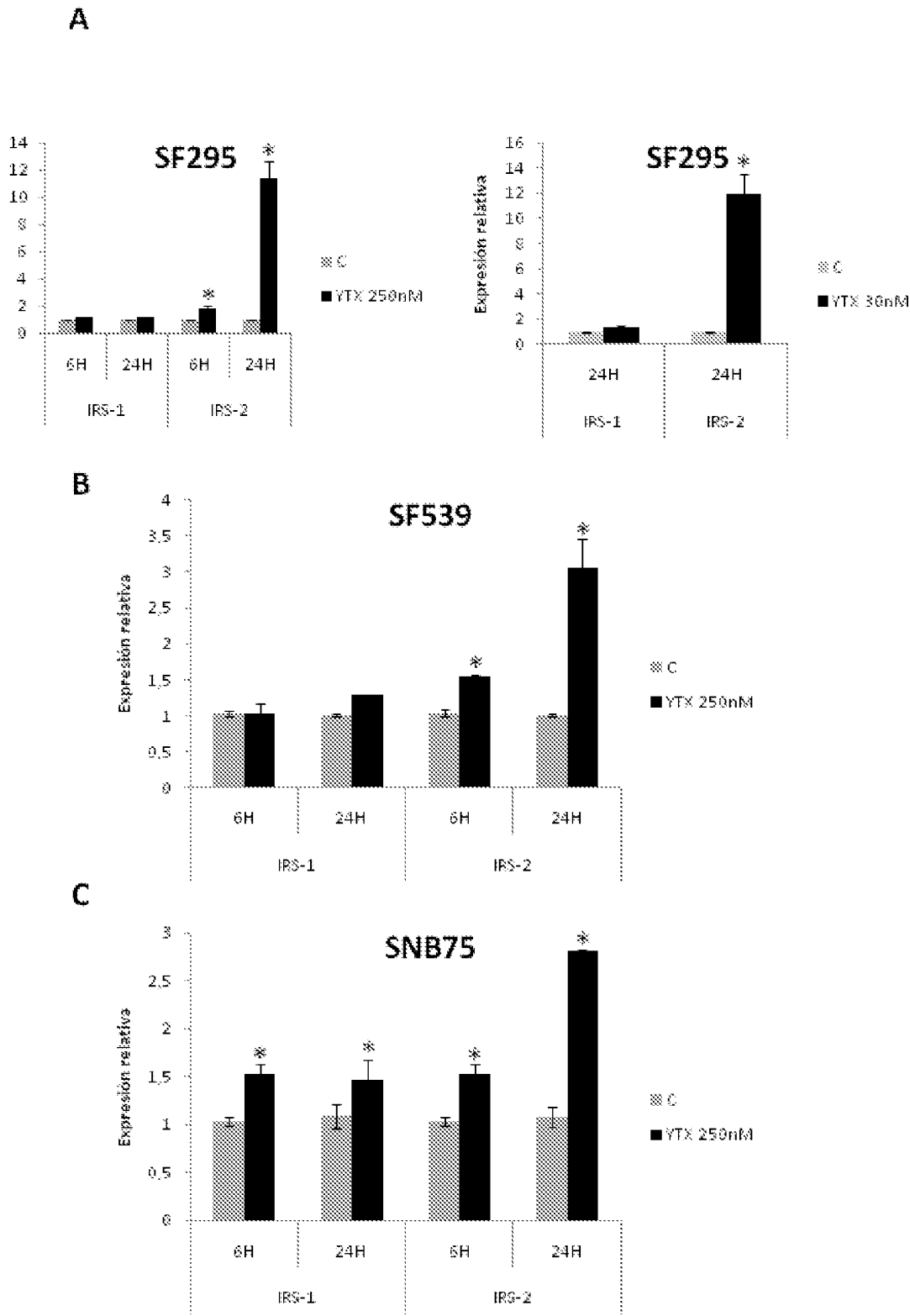


Figura 1

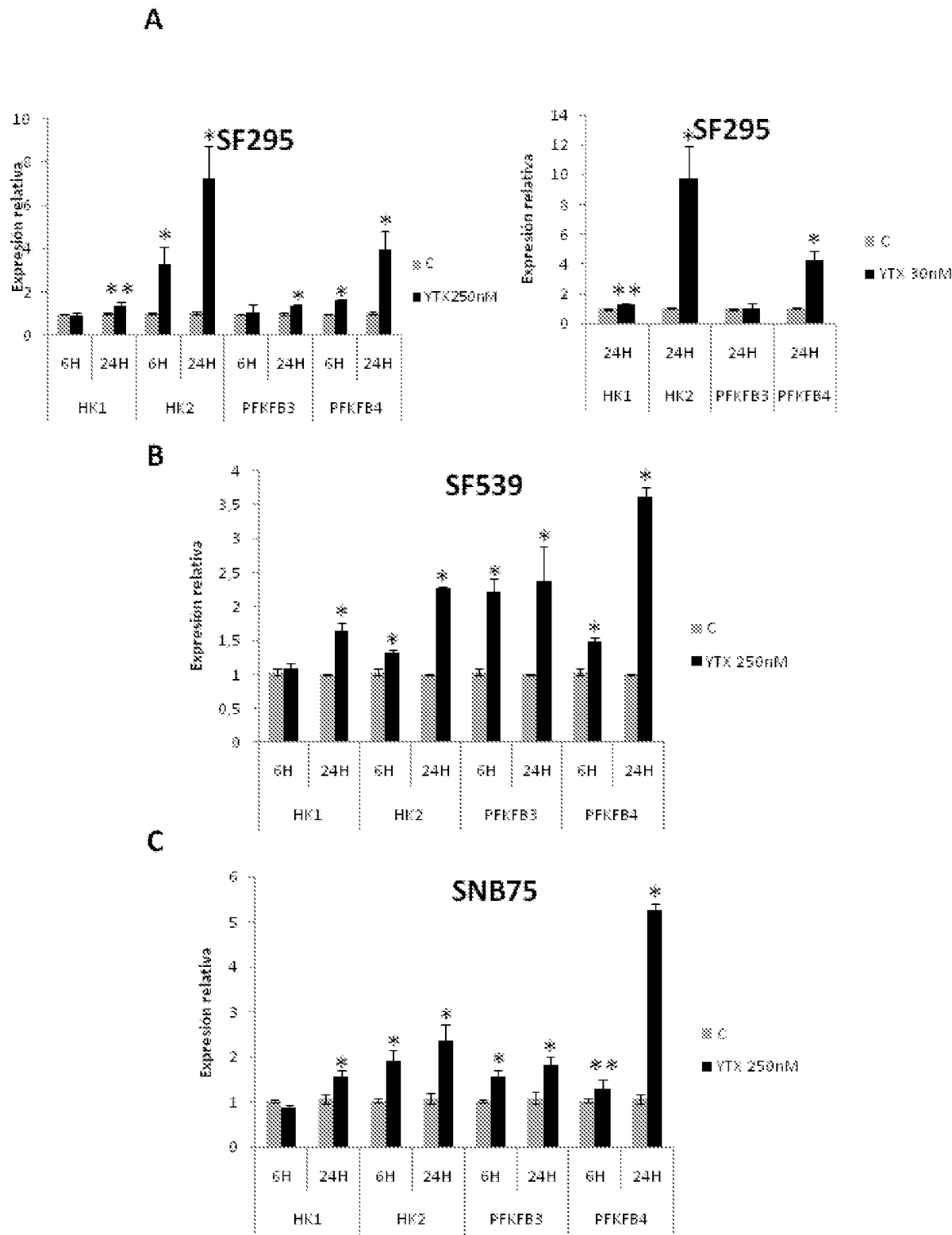


Figura 2

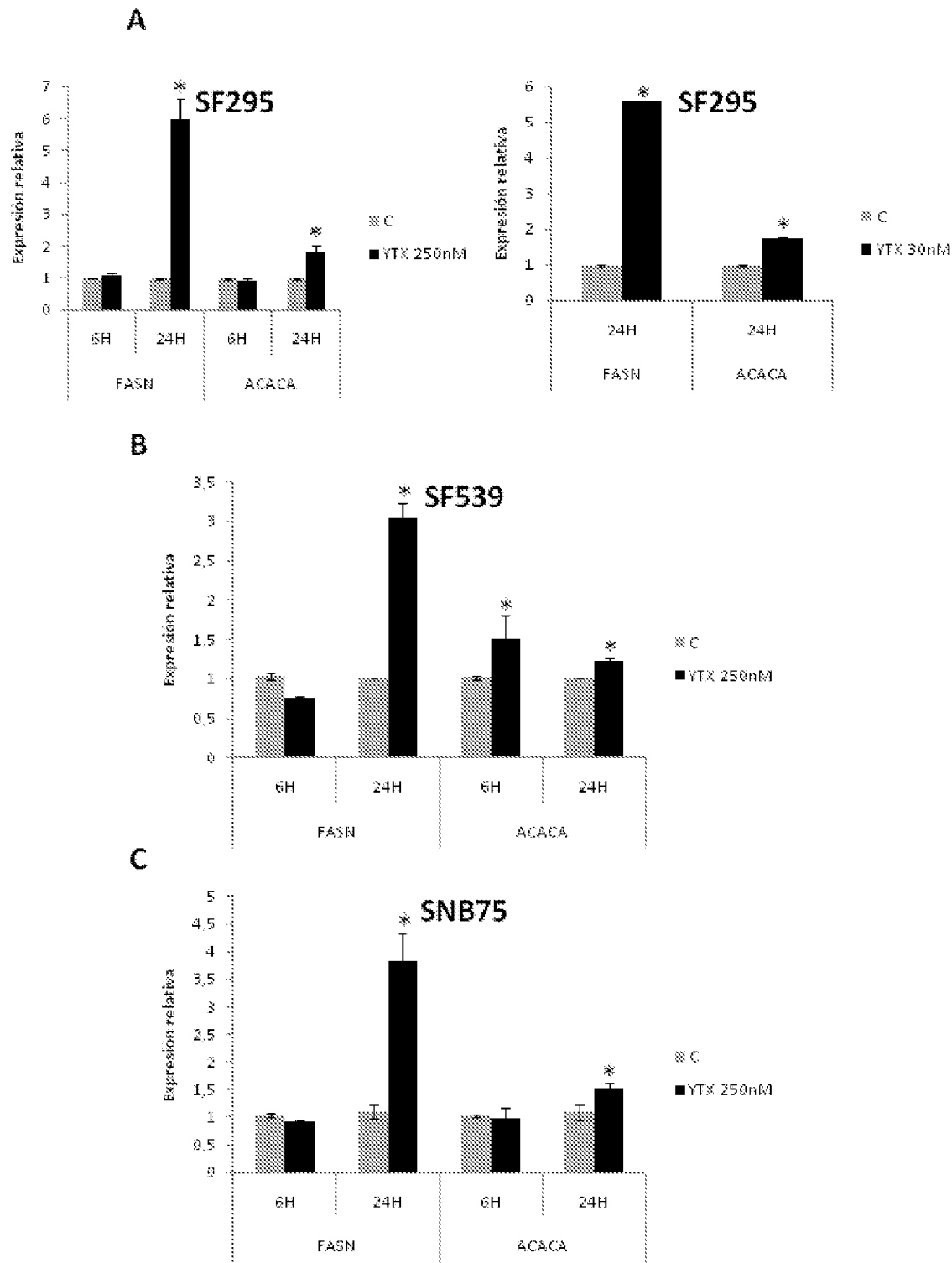


Figura 3

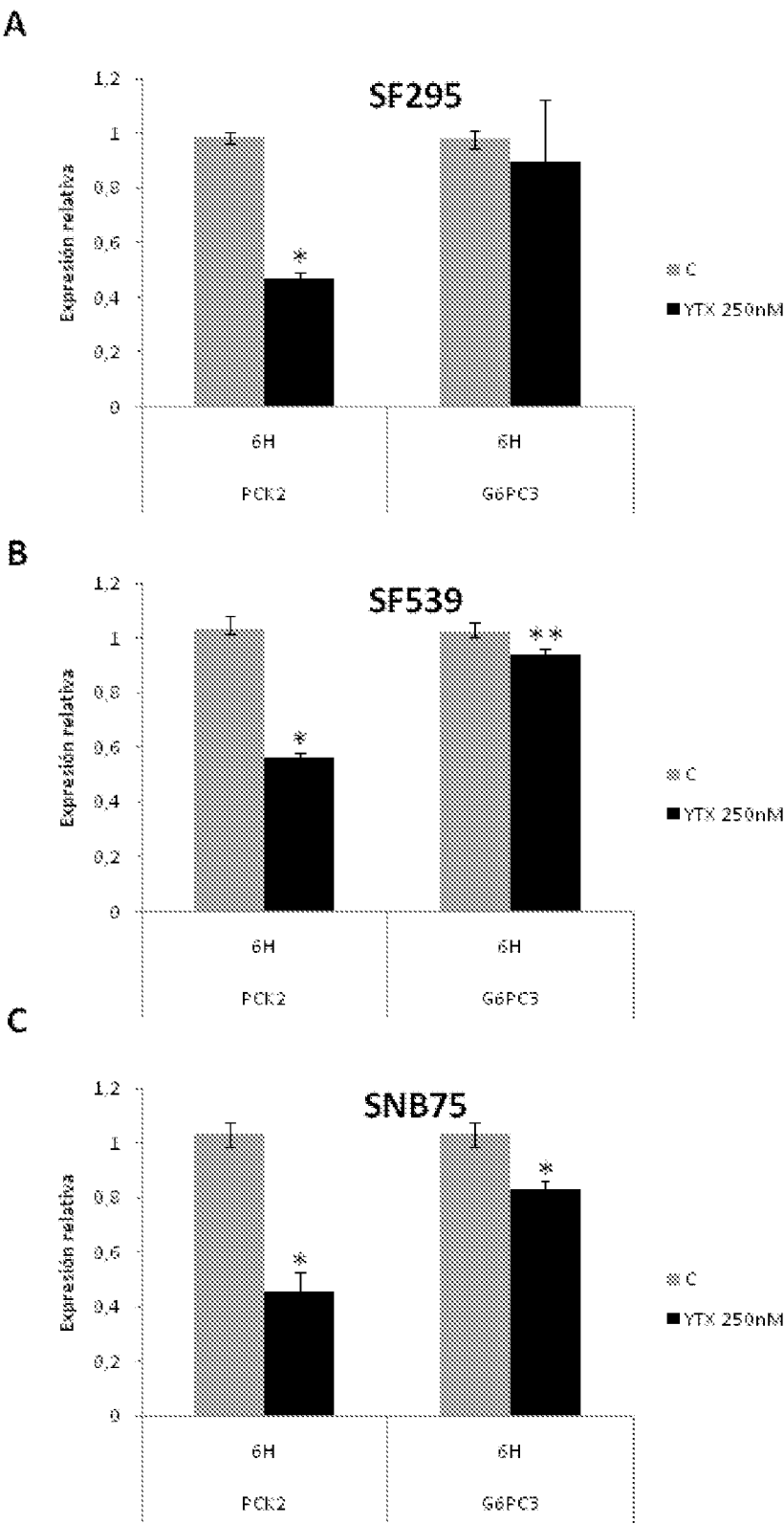


Figura 4

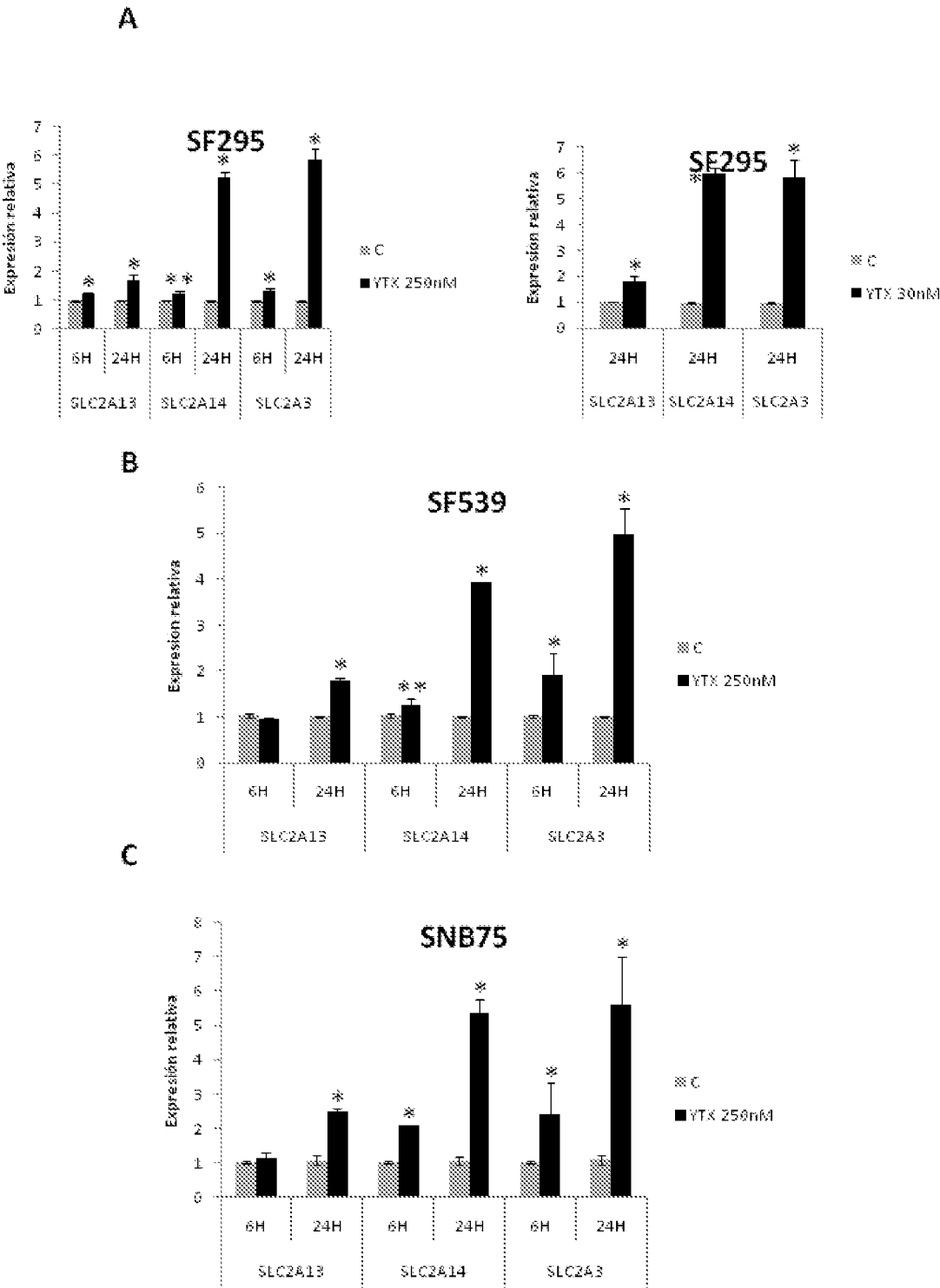


Figura 5

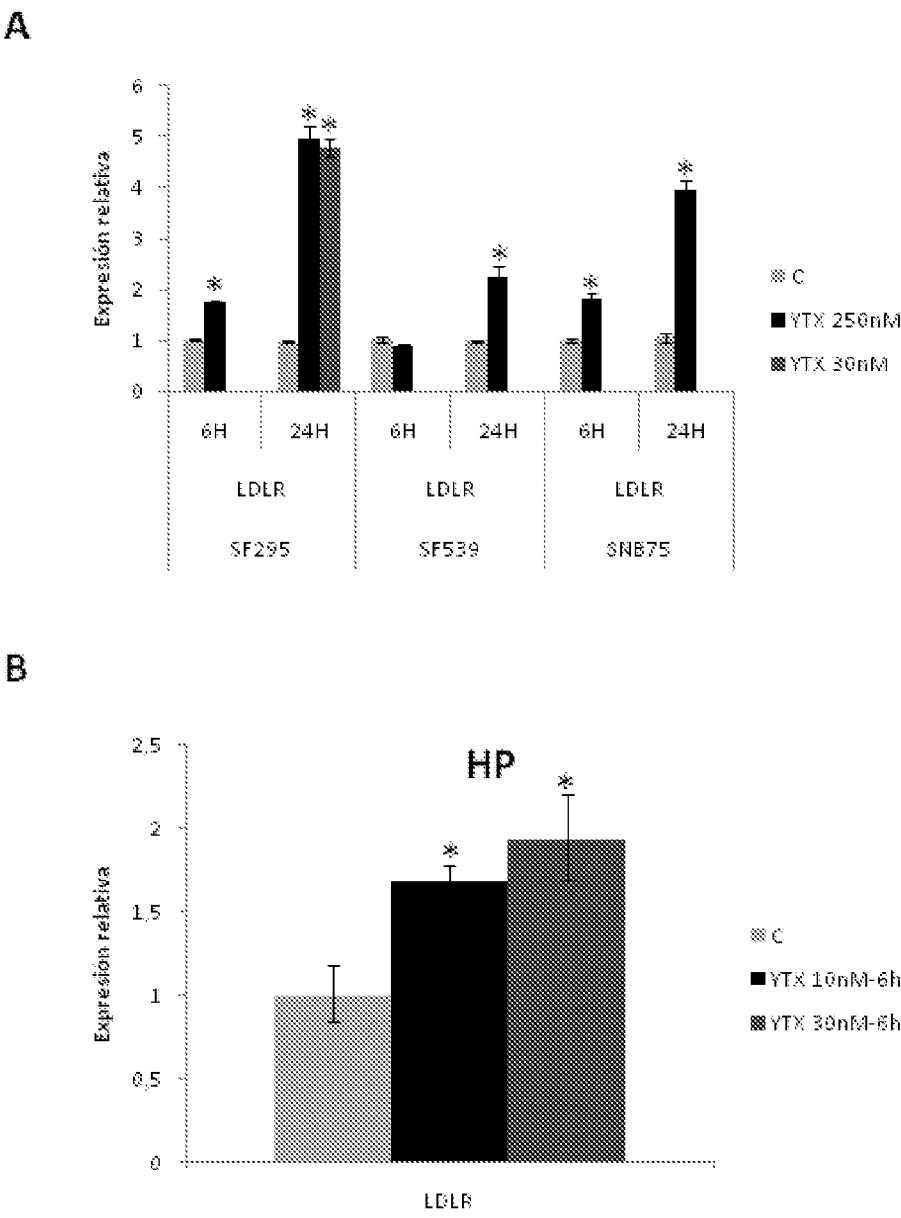


Figura 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070237

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D, A61K, A61P

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TURBARO, A. et al. "Yessotoxins: A toxicological overview". Toxicon 2010, Volume 56, pages 163-172. [Available online 04.08. 2009]. See page 163, abstract; page 164, figure 1.	1-30
A	TERAO, K. et al. "Histopathological studies on experimental marin toxin poisoning-5. The effects in mice of yessotoxin isolated from <i>Patinopecten yessoensis</i> and of a desulfated derivative". Toxicon 1990, Volume 28, Number 9, pages 1095-1104. See page 1095, abstract and introduction.	1-30
A	SASAKI, M. "Development and Application of a Convergent Strategy for the Total Synthesis of Polycyclic Ether Natural Products". Bulletin of the Chemical Society of Japan 2007, Volume 80, Number 5, pages 856-871.	1-30

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search
10/08/2012

Date of mailing of the international search report
(16/08/2012)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)

Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer

G. Esteban García

Telephone No. 91 3495425

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2012/070237

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MILES, C.O. et al. "Isolation of Yessotoxin 32- <i>O</i> -[β -arabino furanosyl-(5' $\rightarrow$ 1'')- β -L-arabinofuranoside] from <i>Protocerratium reticulatum</i> ". Toxicon 2006, Volume 47, pages 510-516. See page 510, abstract; page 513, figure 1; page 516, column 1, paragraph 3.	1-30
A	RONZINI, G. & ROSSINI, G.P. "Yessotoxin induces the accumulation of altered E-cadherin dimers that are not part of adhesive structures in intact cells". Toxicology 2008, Volume 244, pages 145-156. See page 145, abstract.	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070237

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D313/20 (2006.01)

A61K31/352 (2006.01)

A61P3/00 (2006.01)

A61P3/06 (2006.01)

A61P3/10 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/070237

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

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

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C07D, A61K, A61P

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

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

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

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	TURBARO, A. et al. "Yessotoxins: A toxicological overview". Toxicon 2010, Volumen 56, páginas 163-172. [Disponible en línea el 04.08. 2009]. Ver página 163, resumen; página 164, figura 1.	1-30
A	TERAO, K. et al. "Histopathological studies on experimental marin toxin poisoning-5. The effects in mice of yessotoxin isolated from <i>Patinopecten yessoensis</i> and of a desulfated derivative". Toxicon 1990, Volumen 28, Número 9, páginas 1095-1104. Ver página 1095, resumen e introducción.	1-30
A	SASAKI, M. "Development and Application of a Convergent Strategy for the Total Synthesis of Polycyclic Ether Natural Products". Bulletin of the Chemical Society of Japan 2007, Volumen 80, Número 5, páginas 856-871.	1-30

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

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

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
03/08/2012

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
16-AGOSTO-2012 (16/08/2012)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
G. Esteban García

Nº de teléfono 91 3495425

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2012/070237

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	MILES, C.O. et al. "Isolation of Yessotoxin 32- <i>O</i> -[β -arabino furanosyl-(5' $\rightarrow$ 1'')- β -L-arabinofuranoside] from <i>Protocerratium reticulatum</i> ". Toxicon 2006, Volumen 47, páginas 510-516. Ver página 510, resumen; página 513, figura 1; página 516, columna 1, párrafo 3.	1-30
A	RONZINI, G. & ROSSINI, G.P. "Yessotoxin induces the accumulation of altered E-cadherin dimers that are not part of adhesive structures in intact cells". Toxicology 2008, Volumen 244, páginas 145-156. Ver página 145, resumen.	1-30

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C07D313/20 (2006.01)

A61K31/352 (2006.01)

A61P3/00 (2006.01)

A61P3/06 (2006.01)

A61P3/10 (2006.01)