

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

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional

WO 2009/112609 A1

(43) Fecha de publicación internacional
17 de septiembre de 2009 (17.09.2009)

PCT

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

A61K 31/47 (2006.01) A61K 38/43 (2006.01)
A61K 31/06 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/192 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)

Pio XII, 53, E-31008 Pamplona (Navarra) (ES).

GARCÍA OSTA, Ana María [ES/ES]; Instituto Científico y Tecnológico de Navarra, S.A., (D.P.I.) Avda.

Pio XII, 53, E-31008 Pamplona (Navarra) (ES). PÉREZ MEDIAVILLA, Luis Alberto [ES/ES]; Instituto Científico y Tecnológico de Navarra, S.A., (D.P.I.) Avda.

Pio XII, 53, E-31008 Pamplona (Navarra) (ES).

RICOBARAZA ABARQUERO, Ana Lourdes [ES/ES]; Instituto Científico y Tecnológico de Navarra, S.A., (D.P.I.) Avda. Pio XII, 53, E-31008 Pamplona (Navarra) (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2009/000121

(22) Fecha de presentación internacional:

6 de marzo de 2009 (06.03.2009)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P200800736 13 de marzo de 2008 (13.03.2008) ES

(74) Mandatario: UNGRÍA LÓPEZ, Javier; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L. [ES/ES]; Etxesakan 28, Oficina 5 - Planta Baja, E-31180 Zizur Mayor (Navarra) (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, 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, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): FRECHILLA MANSO, Diana Sara [ES/ES]; Instituto Científico y Tecnológico de Navarra, S.A., (D.P.I.) Avda.

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: NOVEL USES OF SODIUM 4-PHENYLBUTYRATE (4 PBA) AND THE PHARMACEUTICALLY ACCEPTABLE SALTS THEREOF

(54) Título: NUEVOS USOS DEL 4-FENILBUTIRATO DE SODIO (4 PBA) Y SUS SALES FARMACÉUTICAMENTE ACEPTABLES

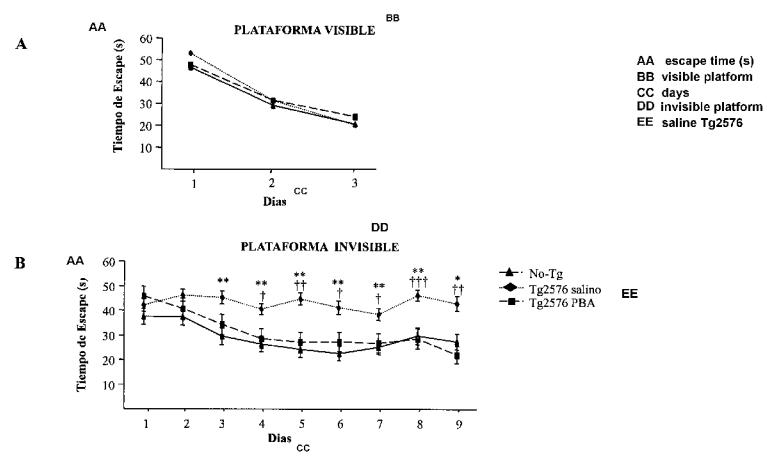


Figura 1

(57) Abstract: The invention relates to the use of sodium 4-phenylbutyrate (4 PBA) in the production of a medicament used to treat cognitive disorders in dementias with tauopathies. Treatment with 4 PBA improves the cognitive deficit of a classic murine Alzheimer's disease (AD) model (Tg 2576), reducing a characteristic AD marker, such as phosphorilated Tau, and increasing the synthesis of some marker proteins for synaptic plasticity, such as GluR1 and PSD95. The reduction of stress in the endoplasmic reticulum, manifested by an increase in the GRP78 protein, constitutes a mechanism for mediating the therapeutic effect. In addition, the effect thereof as an inhibitor of the deacetylation of histones and the involvement thereof in the remodelling of the chromatin facilitates the protein synthesis processes, improving the synaptic plasticity.

(57) Resumen:

[Continúa en la página siguiente]

WO 2009/112609 A1



- (84) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,

SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

Se describe el uso del 4-fenilbutirato de sodio (4 PBA) en la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento de trastornos cognitivos en demencias que cursan con taupatías. El tratamiento con 4 PBA 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.

NUEVOS USOS DEL 4-FENILBUTIRATO DE SODIO (4PBA) Y SUS SALES FARMACÉUTICAMENTE ACEPTABLES

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

5 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 20 extracelulares de β -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).

25 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 30 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.

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. En consecuencia, un aumento de la expresión de GRP78 puede permitir el desarrollo de estrategias terapéuticas para la Enfermedad de Alzheimer (AD).

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.

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 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 situaciones 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.

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., 5 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-PBA que han demostrado mejorar los procesos anómalos durante el plegamiento y 10 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, et al., 2007).

15 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 20 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 25 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 30 al., 2004). La literatura médica también cita sus efectos beneficiosos sobre la toxicidad poliglutamínica (Steffan et al., 2001).

Potencialmente beneficioso para el tratamiento de la EA y de 35 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 3α/β (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 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).

25

La subunidad GluR1 del receptor AMPA y PSD95 son marcadores postsinápticos de crucial importancia en la 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 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 experimentaron una mejoría (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. En el caso particular de la enfermedad del Alzheimer, estos mecanismos patogénicos incluyen principalmente la agregación y depósito de A β con el desarrollo de placas, la hiperfosforilación de tau con la formación de ovillos, la disfunción neurovascular, y otros mecanismos como las alteraciones del ciclo celular, los procesos inflamatorios, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial. La hipótesis central sobre la causa de la enfermedad del Alzheimer es la hipótesis de la cascada amiloidea.

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 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.

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

Dado que no existe un tratamiento efectivo para la 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.

Kim et al demostraron en 2004 que la expresión de la proteína amiloide precursora de los fragmentos C-terminales (APP-CTs) induce el aumento en la acetilación de la histona H3 y la histona H4, y que la citotoxicidad inducida por las APP-CTs es aumentada significativamente por el tratamiento con butirato de sodio en células PC12 NGF-diferenciadas y en neuronas corticales primarias de rata. En conjunto, los resultados sugieren que las APP-CTs intercambian neurotoxicidad mediante mecanismos de transcripción dependientes y esto puede contribuir a la patogénesis de la enfermedad de la EA.

Fischer et al mostraron en 2007 que el butirato de sodio, no el 4PBA, restablece el nivel de acetilación de las histonas, el aprendizaje y la memoria en un modelo de neurodegeneración en ratones, es decir, el ratón bi-transgénico CK-p25 Tg, en el que la expresión de p25, una proteína implicada en varias enfermedades neurodegenerativas, está bajo el control del promotor CamKII y puede ser activado o desactivado con una dieta con doxicilina. Sin embargo, el modelo animal empleado por Fischer et al en 2007 no es un modelo representativo de la enfermedad del Alzheimer, dado que no reproduce los mecanismos patogénicos relativos a la proteína beta-amiloide humana o la fosforilación aberrante de tau. En particular, sólo representa la expresión deficiente de la proteína p25, una forma truncada de la p35, la cual es una subunidad reguladora de la quinasa dependiente de ciclina-5 (CDK5).

En cambio, los inventores de la presente invención, usando un modelo de ratón transgénico consensuado y validado para la enfermedad del Alzheimer, es decir Tg2576, el cual expresa una variedad de proteína humana precursora de beta-amiloide (APP) 5 relacionada con la enfermedad del Alzheimer, sorprendentemente han encontrado que el 4-fenilbutirato es efectivo en el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer. Los inventores han sido capaces de demostrar que se mejoran los síntomas clínicos así como la adquisición y retención de memoria, y lo más 10 importante, también han demostrado que tras la administración de 4PBA se reducen los niveles de tau hiperfosforilada.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

15 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 revirtió el déficit de memoria espacial. Los resultados obtenidos sugieren que es probable que 20 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 25 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 ratones 30 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 represión 5 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 10 plasticidad neuronal (subunidad GluR1 del receptor AMPA y PSD95) y de proteínas del retículo endoplásmico (GRP78) que a su vez llevan la correcta función del hipocampo y conducen a la recuperación de la función de la memoria deteriorada.

15 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 20 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 recientes observaciones que sugieren que la reducción de tau tiene efectos beneficiosos en la prevención de 25 déficits de comportamiento en ratones transgénicos que expresan una proteína precursora de amiloide humano sin alterar sus niveles de A β (Roberson et al., 2007).

30 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 35 cuerpos de Lewy.

La presente invención se refiere al uso del 4PBA o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad del Alzheimer. En otras palabras, 5 la presente invención se refiere al uso del 4PBA o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para la obtención de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad del Alzheimer. De manera similar, la presente invención describe un método para prevenir o tratar la enfermedad del Alzheimer, el 10 cual comprende la administración de una cantidad farmacéuticamente aceptable de 4PBA o una de sus sales farmacéuticamente aceptables a un sujeto en la necesidad de dicha prevención o tratamiento.

15 El término "4PBA" aquí empleado también se refiere a aquellos metabolitos o compuestos resultantes de su metabolización en el cuerpo. Las realizaciones de la presente invención relacionados con los diferentes usos terapéuticos de este compuesto también comprenden el uso de su metabolito, es 20 decir, el fenilacetato.

En una realización, la presente invención se refiere 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 25 tratamiento de demencias que cursan con taupatía, y más particularmente para su uso en la prevención o tratamiento de trastornos cognitivos en dichas demencias.

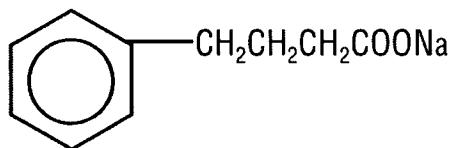
30 La invención se refiere también al uso de 4PBA o alguna de sus sales farmacéuticamente aceptables, o de una composición que comprende 4PBA o alguna de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la preparación de un medicamento para prevención o tratamiento de demencias que cursan con taupatía, y en

particular de los trastornos cognitivos asociados a dichas demencias.

En una realización, la invención se refiere particularmente 5 a la sal sódica de 4PBA para su uso en la prevención o tratamiento de demencias que cursan con taupatía.

El 4PBA es el ácido 4-fenil-butírico (4-fenil-butirato), producto disponible comercialmente, que puede obtenerse por 10 ejemplo de SIGMA-ALDRICH (Nº Producto: P21005); tiene número de registro CAS 1821-12-1; su fórmula química es $C_6H_5(CH_2)_3COOH$.

La sal sódica del 4PBA es también un producto disponible comercialmente, que puede obtenerse por ejemplo de BIOMOL 15 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 $C_6H_5(CH_2)_3COONa$; y su fórmula estructural es:



20

Alternativamente, este compuesto puede obtenerse por métodos conocidos.

25 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).

30 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. Para el uso terapéutico, las sales de 4PBA son aquellas en las que el contra-ión es farmacéuticamente aceptable.

5 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.

10 Se considera que las sales farmacéuticamente aceptables anteriormente mencionadas comprenden las formas no tóxicas activas que puede formar el 4PBA. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden obtenerse convenientemente mediante el tratamiento de la forma ácida de 4PBA con los cationes apropiados. Las sales básicas apropiadas comprenden aquellas formadas con cationes orgánicos como la benzatina, la cloroprocaina, la colina, la dietanolamina, la etilendiamina, la meglumina, la procaína y aquellas formadas con cationes metálicos como el aluminio, el calcio, el litio, el magnesio, el 15 potasio, el sodio y el zinc.

20

A la inversa, dichas formas de sales pueden ser convertidas en sus formas libres mediante el tratamiento con un ácido apropiado.

25 El término "sales" también pretende incluir los hidratos y los solvatos que es capaz de formar el 4PBA, como por ejemplo, alcoholatos como los metanolatos o etanolatos. El término "solvato" se refiere a aquellas formas cristalinas de 4PBA que comprenden cantidades de solvente tanto estequiométricas como no estequiométricas. Dado que el agua es un solvente, los solvatos también incluyen los hidratos. El término "pseudopolimorfo" es un sinónimo de solvato cuando éste se refiere a formas polimórficas cristalinas que poseen moléculas de solvente 30 incorporadas en sus estructuras laminares. Los hidratos y los 35

alcoholatos como los metanolatos o los etanolatos son ejemplos de este tipo de solvatos.

El término "prevención" se refiere al acto de "prevenir", 5 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.

10 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.

15

"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 20 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.

Una realización particular, la invención se relaciona con la 25 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.

30

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.

35

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.

5 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
10 particular la composición comprende la sal sódica de 4PBA. Una realización particular concierne una composición farmacéutica que comprende una sal farmacéuticamente aceptable de 4PBA y un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en la prevención y tratamiento de la enfermedad del Alzheimer.

15 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 A_β 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 A_β en el cerebro y el deterioro de la memoria observado en ratones transgénicos es específica a la tarea, y compleja. Adicionalmente, no se ha hallado una clara correlación en estudios extensos entre las formas depositadas de A_β (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 A_β soluble pueden tener
20 más correlación con la neurodegeneración y el deterioro de la memoria (Lue et al., 1999; McLean et al., 1999; Lesné et al., 2007).

De modo que otra realización de la presente invención para conseguir potenciar su efecto curativo es una combinación que
35

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 β -amiloide cerebral. Una realización más preferente utiliza como agente inductor de aclaramiento de dichos depósitos agentes quelantes de metales, enzimas catabolizantes de la forma soluble del péptido β -amiloide, cerebrolisina o nitrofenoles.

Otra realización de la presente invención ofrece una combinación farmacéutica aceptable que comprende 4PBA o una de sus sales farmacéuticas como primer ingrediente activo, un segundo agente ingrediente activo es un inductor o un agente facilitador del aclaramiento de los depósitos de β -amiloide en el cerebro, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una realización más preferente utiliza como agente inductor de aclaramiento de dichos depósitos, agentes quelantes de metales, enzimas catabolizantes de la forma soluble del péptido β -amiloide, cerebrolisina o nitrofenoles.

20

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

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

30

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 β -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 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 5 uso secuencial.

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 10 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 15 hacerse si se desea.

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 20 aceptables junto con un agente inductor o facilitador del aclaramiento de los depósitos de β-amiloide cerebral, en cualquiera de las realizaciones especificadas.

En otro aspecto, la invención se refiere a dicha combinación 25 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 30 demencias, en particular cualquiera de las que se han especificado anteriormente, y más particularmente de la enfermedad de Alzheimer.

En otro aspecto la invención se refiere también a un método 35 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 β -amiloide cerebral.

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.

La dosis de sustancias activas de la presente invención, es decir, el 4PBA y/o sus sales farmacéuticamente aceptables, que debe ser administrada depende de cada caso individual y, habitualmente, tiene que ser adaptada a las condiciones individuales del caso para un efecto óptimo. Por tanto depende, por supuesto, de la frecuencia de administración y de la potencia y duración de la acción del compuesto empleado en cada caso para terapia o profilaxis, pero también en la naturaleza y severidad de la enfermedad y los síntomas, y en el sexo, edad, peso, co-medicación y la propia responsabilidad del humano o animal que es tratado y si la terapia es aguda o profiláctica.

La cantidad terapéuticamente efectiva de 4PBA y/o de sus sales farmacéuticamente aceptables, debe encontrarse en los siguientes rangos, desde 1 mg hasta 200 g al día, desde 2 mg hasta 150 g al día, desde 5 mg hasta 100 g al día, desde 10 mg hasta 75 g al día, desde 20 mg hasta 75 g al día, desde 50 mg hasta 75 g al día, desde 0.1 g hasta 75 g al día, desde 0.2 g

hasta 75 g al día, desde 0.5 hasta 75 g al día, desde 1 g hasta 50 g al día y desde 5 g hasta 50 g al día.

El término "sujeto" significa un animal, en particular un 5 mamífero como primates, perros, gatos, animales bovinos, caballos, ovejas y humanos. Se aplica particularmente a mamíferos humanos de ambos sexos.

Una forma de administración preferente de la preparación de 10 medicamento que contiene 4PBA para los usos arriba 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.

15

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 20 silicio coloidal.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1A: Tiempos de latencia de los ratones transgénicos 25 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.

Figura 1B: Tiempos de latencia de los ratones transgénicos tratados con 4PBA y con salino, con respecto a ratones no 30 transgénicos, en distintos días de medición de un test de Morris en la fase de plataforma invisible.

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 35 medición de un test de Morris.

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

5 **Figura 2B:** Marcaje de placas formadas por acumulación del péptido A β 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.

10 **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.

15 **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.

20 **Figura 6:** Niveles de expresión de proteínas GluR1, PSD95 y MAP-2 en extractos proteicos enriquecidos en membrana obtenidos de hipocampo de ratones transgénicos tratados con 4PBA y salino, respecto a ratones no transgénicos.

25

MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCIÓN

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.

EJEMPLOS

35 **Ejemplo 1. 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.

5 En los ratones transgénicos Tg2576 que se utilizaron en el modelo experimental murino que sufrían la enfermedad de Alzheimer, el contenido del péptido A β 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

10 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

15 preparó una solución de 4PBA titulando cantidades equimoleculares 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

20 clínico se realizaron de acuerdo a la legislación europea y española (86/609/CEE; RD1201/2005).

Ejemplo 2. Laberinto Acuático de Morris (MWM)

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 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 les sacó de ella para devolverlos a sus jaulas. Al principio del 4°, 7° 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 los 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 aprender a localizar la plataforma visible o a los ratones que exhibieron patrones de natación anormales o flotaban persistentemente.

20

Para estudiar los efectos de 4PBA en la función cognitiva se analizó si 5 semanas de tratamiento con 4PBA aliviarián el déficit de aprendizaje exhibido por ratones transgénicos Tg2576 de 16 meses de edad al realizar la prueba 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).

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 5 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 del que pasaron los ratones del grupo de control de la misma edad 10 (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 15 de la memoria relativa a la prueba del laberinto acuático en ratones transgénicos Tg2576.

Ejemplo 3. Método para determinar los niveles de A β

Debido a que el tratamiento con 4PBA demostró beneficiar 20 claramente el proceso de adquisición y retención de memoria, el siguiente aspecto a explorar fue el efecto de los niveles de A β 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 acuático de Morris. Se 25 disecaron el córtex y el hipocampo y se utilizaron para realizar análisis bioquímicos. A continuación se determinaron los niveles de A β 40 y A β 42 en la corteza cerebral mediante una prueba ELISA tipo sándwich.

30 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 Na₃VO₄, 1 mM NaF). Los homogeneizados así obtenidos se sonicaron durante 2 min y se 35 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 β 42 se midieron con un kit de ELISA extra-sensible tipo sándwich de Biosource (Camarillo, Ca, USA), para ello se depositaron 300 μ g de proteína total del sobrenadante 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 β 40 o de A β 42 en ratones transgénicos Tg2576 tratados con el vehículo en comparación con los ratones transgénicos tratados con 4PBA. No se detectó A β en hermanos de camada no transgénicos. Se obtuvieron resultados similares cuando se midieron los niveles de A β y el porcentaje de área cubierta por inmunoreactividad A β para medir la carga de placas en el hipocampo (Figura 2B).

Ejemplo 4. Producción de extractos proteínicos y análisis inmunológico tipo Western Blot

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 μ g/ml leupeptina, 1 μ g/ml aprotinina, 1 mM Na₃VO₄, 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 5 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 10 36°C y se diluyeron añadiendo un volumen de 0,1 de 500 mM Tris-HCl (pH = 9) /1% Tritón X-100, Después de centrifugar a 37.000 x g durante 10 min a 4°C, se almacenó el sobrenadante a -80°C.

15 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 Na4P2O7, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM benzamidina, 10 µg/ml leupeptina, 400 U/ml aprotinina), y se 20 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, 25 California).

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 30 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 35 (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), polyclonal de conejo anti-MAP2 (Chemicon, Temecula, CA), 5 monoclonal de ratón anti-actina, y monoclonal de ratón anti-tubulina (Sigma) en las correspondientes soluciones tampón. Todos los anticuerpos se emplearon en diluciones 1:1000 excepto el monoclonal de ratón anti-actina, y monoclonal de ratón anti-tubulina que fueron empleados en diluciones 1:10000. Después de 10 dos lavados en PBS/Tween-20 o TBS/Tween20 y uno solo en PBS o TBS, se detectaron bandas de proteínas inmunoetiquetadas 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 15 autoradiográfica a HyperfilmTM ECL (Amersham Biosciences). Las señales se cuantificaron utilizando el programa Scion Image (Scion Corporation).

Ejemplo 5. Marcadores patológicos de la enfermedad de Alzheimer

20 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 25 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 30 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).

La función de fosforilación de tau está regulada por varias proteínas kinasas y fosfatasas. 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 5 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).

10

Ejemplo 6. Marcadores de estrés del retículo endoplásmico

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 15 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 20 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).

25 Ejemplo 7. Marcadores de plasticidad sináptica

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 30 cortical 4 (H4) en ratones transgénicos que habían sido tratados con 4PBA (Fig. 5).

La subunidad GluR1 del receptor AMPA, PSD95 y MAP-2 son marcadores de plasticidad de vital importancia en la formación y 35 función de la sinapsis. La descripción de los déficits

postsinápticos de PSD95, GluR1, y MAP-2 en los cerebros de los pacientes de la EA y en los ratones Tg2576, pueden contribuir a la disfunción sináptica y provocar la deficiencia del aprendizaje. 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).

La proteína de asociación a microtúbulos (MAP-2) es una proteína localizada principalmente en las dendritas neuronales. La expresión de MAP-2 coincide con el crecimiento, ramificación y remodelación dendrítica post-lesión, sugiriendo que esta proteína juega un papel crucial en la plasticidad. Se realizó un análisis cuantitativo de MAP-2 mediante Western Blott, y se encontró que los niveles de expresión de MAP-2 eran significativamente menores que los del ratón no transgénico (54.9 ± 10.7) comparado con los ratones no transgénicos (100.0 ± 14.9) y parcialmente restablecidos tras el tratamiento con el 4PBA. (77.7 ± 11.6) (Fig.6).

BIBLIOGRAFÍA

- 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.
5 Neurobiol Dis 20:187 - 198.
- Anderson AN, Roncaroli F, Hodges A, Deprez M, Turkheimer FE (2007) Chromosomal profiles of gene expression in Huntington's disease. Brain.
- 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.
- 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.
- Bailey CH, Kandel ER, Si K (2004). The persistence of long-term 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.
- 25 - Chang KT, Min KT. (2002). Regulation of lifespan by histone deacetylase. Ageing Res Rev 1: 313 - 326.
- Chaudhuri TK, Paul S (2006). Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches. FEBS J 273: 1331 - 1349.
- 30 - 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.
5
- 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.
10 *Nat Neurosci* 5: 452 - 457.
- 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).
15 Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature* 447, 178 - 182.
- 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.
20
- Hernández F, Ávila J (2007). Tauopathies. *Cell Mol Life Sci* 64: 2219 - 2233.
- Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR, Barnes CL (1984).
25 Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science* 225: 1168 - 1170.
- Ikeda Y, Ishiguro K, Fujita SC (2007). Ether stress-induced Alzheimer-like tau phosphorylation in the normal mouse brain. *FEBS Lett* 581: 891 - 897.
- Kang HL, Benzer S, Min KT (2002). Life extension in
30 Drosophila by feeding a drug. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 838 - 843.

- 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.
- 5 - 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.
- 10 - 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.
- 15 - Kim HS, Kim EM, Kim NJ, Chang KA, Choi Y, Ahn KW, Lee JH, Kim S, Park CH, Suh YH (2004). Inhibition of histone deacetylation enhances the neurotoxicity induced by the C-terminal fragments of amyloid precursor protein. *J Neurosci Res* 75:117 - 124.
- 20 - 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.
- 25 - 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.
- 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 Pacl receptors and endoplasmic reticulum stress. *J Neurochem* 97:1259 - 1268.
- 30

- Langley B, Gensert JM, Beal MF, Ratan RR Curr Drug Targets CNS (2005). Remodelling chromatin and stress resistance in the central nervous system: histone deacetylase inhibitors as novel and broadly effective neuroprotective agents.
5 Neurol Disord 4:41 - 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.
10
- 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.
15
- Maestri NE, Brusilow SW, Clissold DB, Bassett SS (1996). Long-term treatment of girls with ornithine transcarbamylase deficiency. N Engl J Med 335:855 - 859.
20
- 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.
25
- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush Al, Masters CL (1999). Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. Ann Neurol 46: 860 - 866.
30

- 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.
- 5 - Mercuri E, Bertini E, Messina S, Solari A, D'Amico A, Angelozzi C, et al., (2007). Randomized, double-bind, placebo-controlled trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy. *Neurol* 68 (1): 51 - 55.
- 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.
- 10 - Petri s, Kiaci 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.
- 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 Y, 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 lH, Wu T, Gerstein H, Yu GQ, Mucke L (2007). Reducing endogenous tau ameliorate amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 316:750 - 754.
- Rubenstein RC, Zeitlin PL (2000). Sodium 4-phenylbutyrate

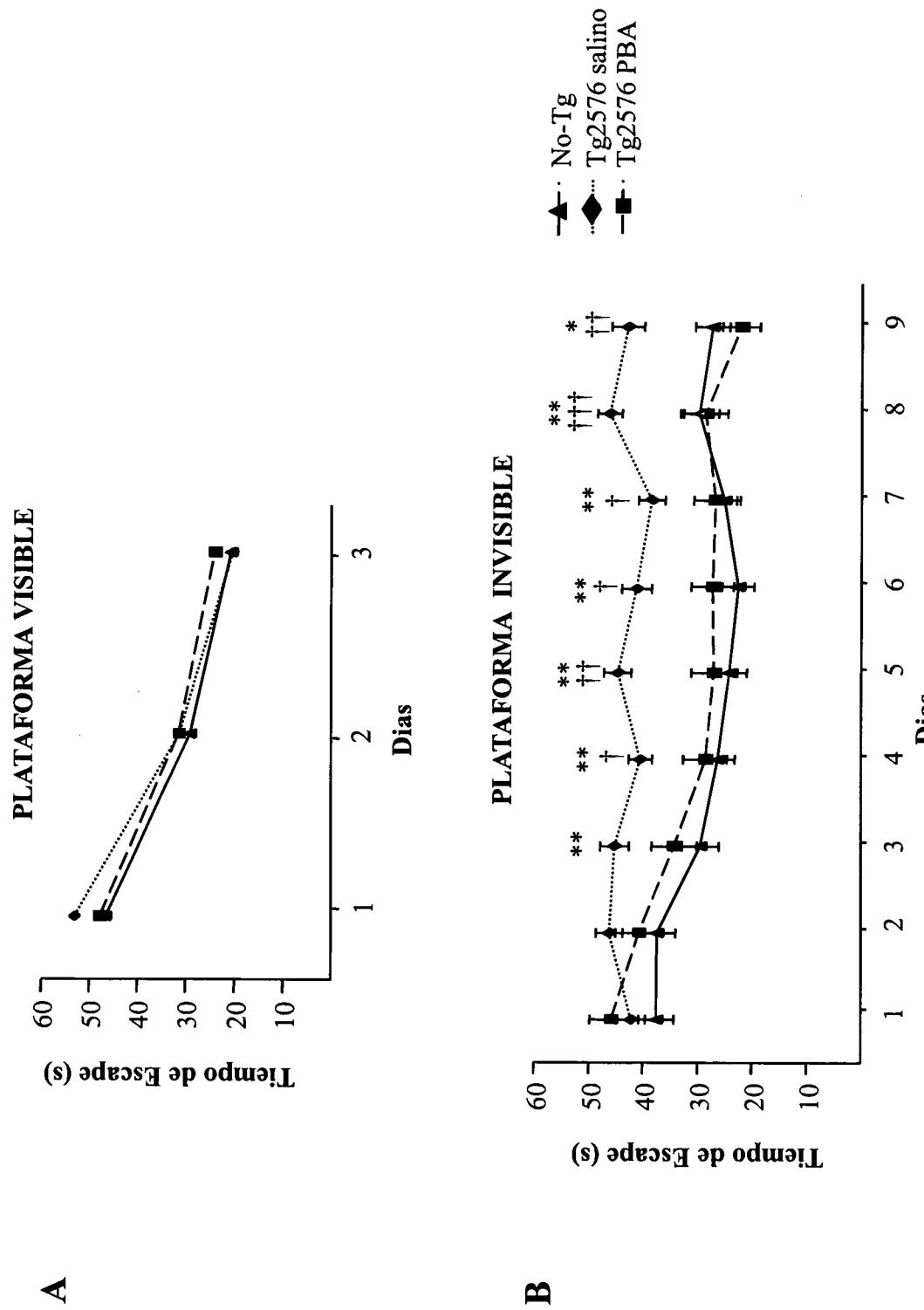
- downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of DeltaF508-CFTR. Am J Physiol Cell Physiol 278: 259 - 267.
- 5 - Ryu EJ, Harding HP, Angelastro JM, Vitolo OV, Ron D, Greene L (2002). Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. J Neurosci 22: 10690 - 10698.
- 10 - 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.
- 15 - Sato S, Ward CL, Kruse ME, Winc JJ, Kopito RR (1996) Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. J Biol Chem 271:635 - 638.
- Selkoe DJ (2004). Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases, Nat Cell Biol 6: 1054 - 1061.
- 20 - Steffan JS, Bodai L, Pallos 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.
- 25 - Tully T, Bourtchouladze A, 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.

REIVINDICACIONES

1. 4-fenilbutirato (4PBA) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en la prevención o tratamiento de la enfermedad del Alzheimer.
2. Uso de 4PBA o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de la enfermedad del Alzheimer.
3. 4PBA según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la sal farmacéuticamente aceptable es la sal de sodio del 4PBA.
4. Una composición farmacéutica que comprende la sal sódica de 4PBA y un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en la prevención y/o tratamiento de la enfermedad del Alzheimer.
5. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende 4PBA o alguna de sus sales farmacéuticamente aceptables como primer ingrediente activo, un segundo ingrediente activo es un agente inductor o facilitador del aclaramiento de los depósitos de β -amiloide cerebral y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. Una combinación según la reivindicación 5, que comprende la sal sódica de 4PBA como primer ingrediente.
7. Una combinación según las reivindicaciones 5 u 6, caracterizada porque el agente inductor del aclaramiento de los depósitos de β -amiloide es un agente quelante de metales
8. Una combinación según la reivindicación 7, caracterizada porque dicho agente inductor es el clioquinol.
9. Una combinación según las reivindicaciones 5 o 6, caracterizada porque el agente inductor del aclaramiento de los depósitos de β -amiloide es una enzima catabolizante.
10. Una combinación según la reivindicación 9 caracterizada porque dicho agente inductor es la enzima degradante de insulina IDE, o la neprilisina.
11. Una combinación según las reivindicaciones 9 o 10, caracterizada porque el agente inductor del aclaramiento de los depósitos de β -amiloide es la cerebrolisina.

12. Una combinación según las reivindicaciones 9 o 10, caracterizada porque el agente inductor del aclaramiento de los depósitos de β -amiloide son nitrofenoles.
13. Una combinación según la reivindicación 12, caracterizada porque dicho nitrofenol es el 2,4-dinitrofenol, o el 3-nitrofenol.
14. Una combinación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13, para su uso en la prevención o tratamiento de la enfermedad del Alzheimer.
15. Un método para prevención o tratamiento de la enfermedad del Alzheimer que comprende administrar a un sujeto que necesita dicha prevención o tratamiento una cantidad farmacéuticamente efectiva de 4PBA o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13.

1/7

**Figura 1**

2/7

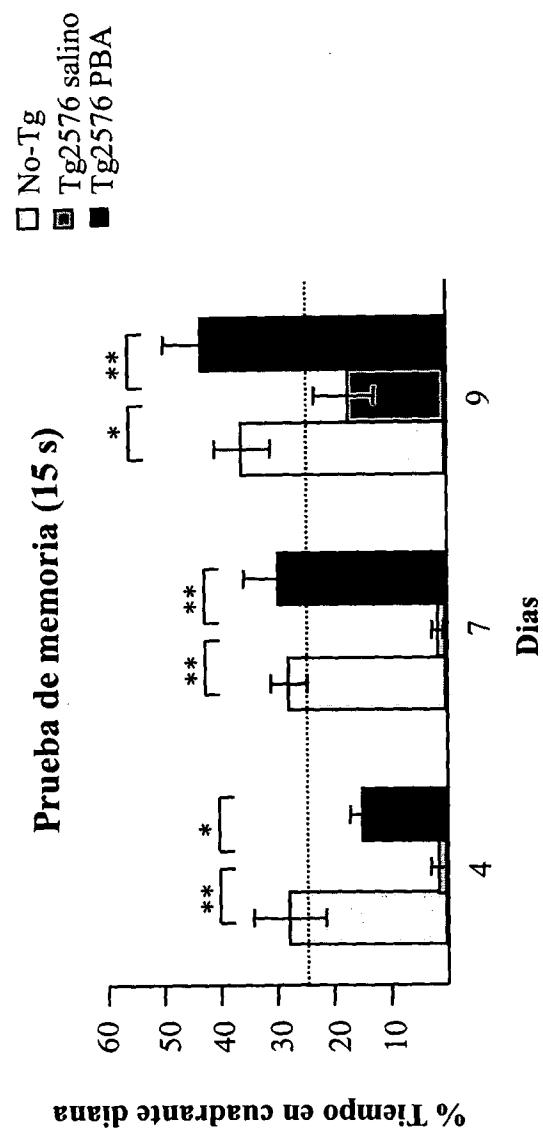


Figura 1C

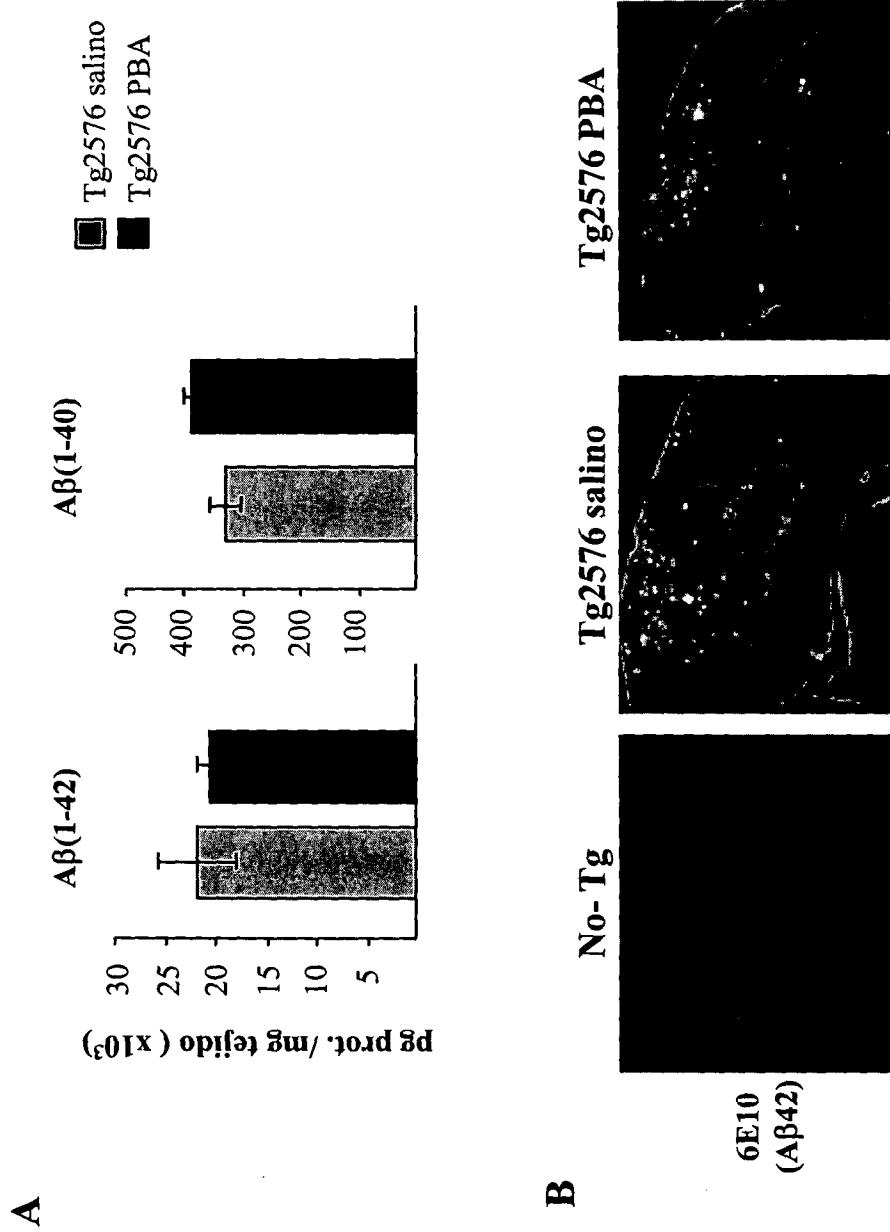
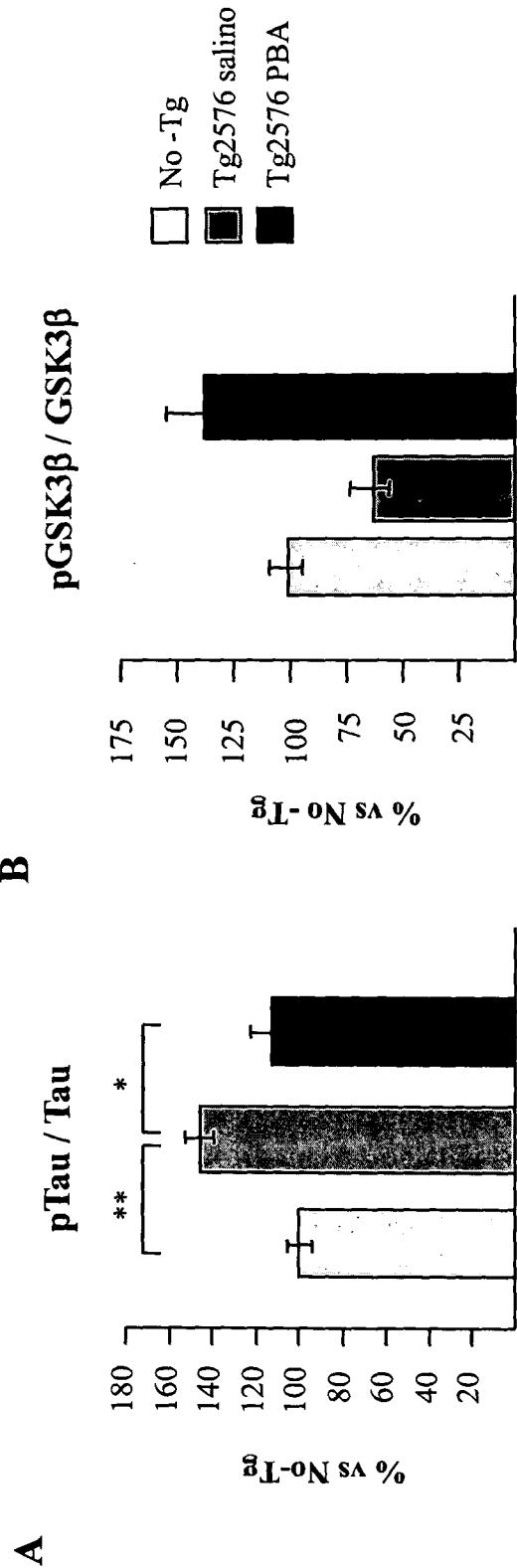


Figura 2

4/7

**Figura 3**

5/7

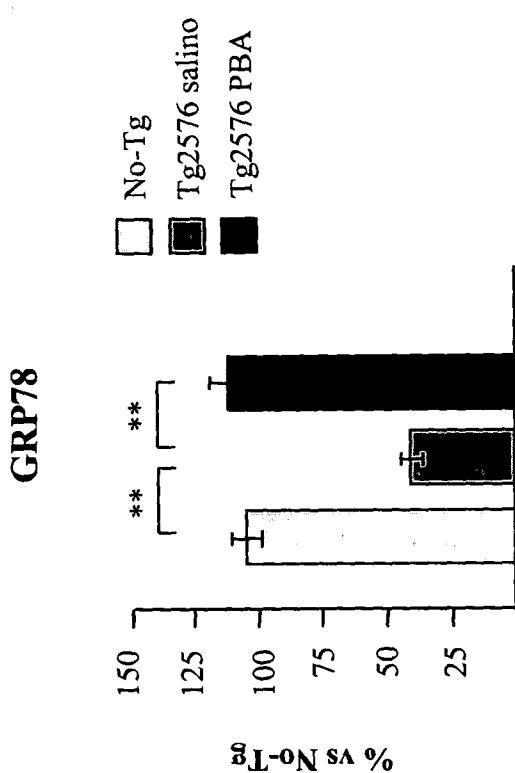


Figura 4

6/7

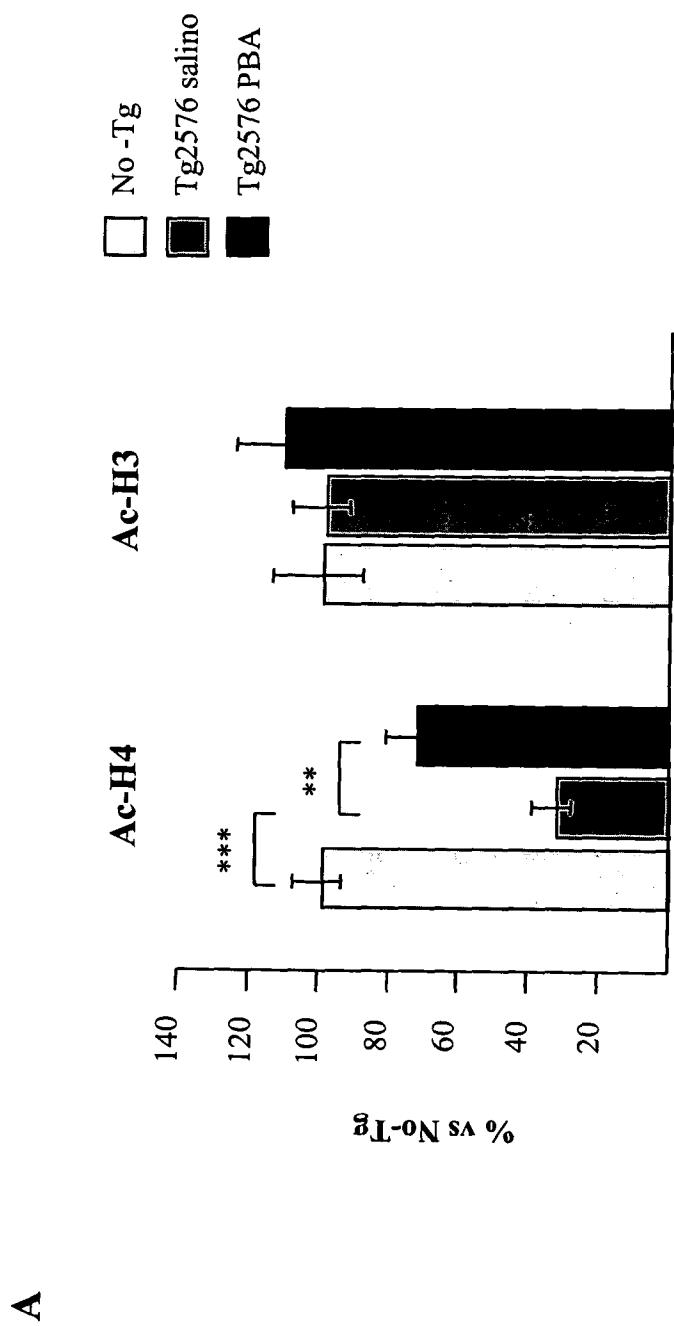


Figura 5



Figura 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/ES2009/000121

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

| | | | |
|------|-----------|-----------|------------|
| INV. | A61K31/47 | A61K31/06 | A61K31/192 |
| | A61K45/06 | A61P25/28 | A61K38/16 |
| | | | A61K38/43 |

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)
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 practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|------------------------|
| X | WO 02/090534 A (UNIV CALIFORNIA [US]; STEFFAN JOAN S [US]; THOMPSON LESLIE M [US]; MAR) 14 November 2002 (2002-11-14) claim 36 ----- | 1-4,15 |
| Y | ----- | 1-15 |
| X | WO 99/26657 A (UNIV SOUTH CAROLINA [US]; SINGH INDERJIT [US]) 3 June 1999 (1999-06-03) claims 57,59,65 ----- | 1-4,15 |
| Y | US 2006/074104 A1 (BUSH ASHLEY I [US] ET AL) 6 April 2006 (2006-04-06) claims 1,2 ----- | 7,8,14, 15 ----- |

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *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)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *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
- *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
- *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 such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 June 2009

Date of mailing of the international search report

25/06/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lemarchand, Aude

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/ES2009/000121

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| Y | FINDEIS ET AL: "The role of amyloid beta peptide 42 in Alzheimer's disease" PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, ELSEVIER, GB, vol. 116, no. 2, 26 September 2007 (2007-09-26), pages 266-286, XP022272072 ISSN: 0163-7258 paragraph 3.4.2. page 280, paragraph 2 ----- | 9,10,14, 15 |
| Y | SALLOWAY S ET AL: "Disease-modifying therapies in Alzheimer's disease" ALZHEIMER'S & DEMENTIA: THE JOURNAL OF THE ALZHEIMER'S ASSOCIATION, ELSEVIER, NEW YORK, NY, US, vol. 4, no. 2, 1 March 2008 (2008-03-01), pages 65-79, XP022613407 ISSN: 1552-5260 [retrieved on 2008-02-20] page 73, right-hand column, paragraph 3 page 69, paragraph 1.8. page 67; table 1 ----- | 7,8,14, 15 |
| Y | DE FELICE FERNANDA G ET AL: "Inhibition of Alzheimer's disease beta-amyloid aggregation, neurotoxicity, and in vivo deposition by nitrophenols: Implications for Alzheimer's therapy" FASEB JOURNAL, vol. 15, no. 7, May 2001 (2001-05), pages 1297-1299, XP007908887 ISSN: 0892-6638 the whole document ----- | 12-15 |
| A | BLENNOW K ET AL: "Alzheimer's disease" LANCET THE, LANCET LIMITED. LONDON, GB, vol. 368, no. 9533, 29 July 2006 (2006-07-29), pages 387-403, XP025094408 ISSN: 0140-6736 [retrieved on 2006-07-29] page 398; table 2 ----- | 1-15 |
| Y | | 7-10 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/ES2009/000121

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|---|--|
| WO 02090534 | A 14-11-2002 | AT 401395 T EP 1390491 A1 ES 2310213 T3 | 15-08-2008 25-02-2004 01-01-2009 |
| WO 9926657 | A 03-06-1999 | NONE | |
| US 2006074104 | A1 06-04-2006 | NONE | |

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2009/000121

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/47 A61K31/06 A61K31/192 A61K38/16 A61K38/43 A61K4506 A61P2528

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

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

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) **EPO-Internal , EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data, WPI Data**

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes | Relevante para las reivindicaciones nº |
|------------|---|--|
| X | WO 02/090534 A (UNIV CALIFORNIA [US]; STEFFAN JOAN S [US]; THOMPSON LESLIE M [US]; MAR) 14 noviembre 2002 (2002-11-14) reivindicación 36 | 1-4,15 |
| Y | | 1-15 |
| X | WO 99/26657 A (UNIV SOUTH CAROLINA [US]; SINGH INDERJIT [US]) 3 junio 1999 (1999-06-03) | 1-4,15 |
| Y | reivindicaciones 57,59,65 | 1-15 |
| Y | US 2006/074104 A1 (BUSH ASHLEY I [US] ET AL) 6 Abril 2006 (2006-04-06) reivindicaciones 1,2 -/- | 7,8,14, 15 |

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.

17 de junio de 2009

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

25/06/2009

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la

búsqueda internacional **European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2**

NL - 2280 HV Ri)SWIJK

Tel (+31-70) 340-2040,

Fax (+31-70) 340-0016

Funcionario autorizado

Nº de teléfono

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2009/000121

| C (Continuación). | | DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES |
|-------------------|--|--|
| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes | Relevante para las reivindicaciones nº |
| Y | FINDEIS ET AL : "The role of amyloid beta peptide 42 in Alzheimer ' s disease" PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS , ELSEVIER , GB , vol . 116 , no . 2 , 26 septiembre 2007 (2007-09-26) , páginas 266-286, XP022272072 ISSN : 0163-7258 párrafo 3.4.2. página 280, párrafo 2 | 9 , 10, 14 , 15 |
| Y | SALLOWAY S ET AL : "Disease-modifying therapies in Alzheimer' s disease" ALZHEIMER ' S & DEMENTIA : THE JOURNAL OF THE ALZHEIMER ' SASSOCIATION , ELSEVIER , NEW YORK , NY , US , vol . 4 , no . 2 , 1 marzo 2008 (2008-03-01) , páginas 65-79 , XP022613407 ISSN : 1552-5260 [recuperado el 2008-02-20] página 73 , columna de derecha , párrafo 3 | 7, 8, 14, 15 |
| Y | página 69 , párrafo 1 .8. página 67; tabla 1 | 11 , 14, 15 |
| Y | DE FELICE FERNANDA. G ET AL : " Inhibition of Alzheimer ' s disease beta-amyloid aggregation , neurotoxicity, and in vivo deposition by nitrophenols : Implications for Alzheimer ' s therapy" FASEB JOURNAL , vol . 15 , no . 7 , mayo 2001 (2001-05) , páginas 1297-1299 , XP007908887 ISSN : 0892-6638 todo el documento | 7, 8, 14 , 15 |
| A | BLENNOW K ET AL : "Alzheimer ' s disease" LANCET THE , LANCET LIMITED . LONDON , GB , vol . 368, no . 9533 , 29 julio 2006 (2006-07-29) , páginas 387-403 , XP025094408 ISSN : 0140-6736 [recuperado el 2006-07-29] página 398 ; tabla 2 | 12-15 |
| | | 1-15 |
| Y | | 7-10 |

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº
PCT/ES2009/000121

| Documento de patente citado en el informe de búsqueda | Fecha de publicación | Miembro(s) de la familia de patentes | Fecha de publicación |
|---|-------------------------------|--|----------------------|
| WO 02090534 | A 14-11-2002 | AT 401395 T 15-08-2008 EP 1390491 A1 25-02-2004 ES 2310213 T3 01-01-2009 | |
| WO 9926657 US 2006074104 | A 03-06-1999 A1 06-04-2006 | NINGUNO NINGUNO | |