



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 321 996**

② Número de solicitud: 200600176

⑤ Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 31/727 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **26.01.2006**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **15.06.2009**

Fecha de la concesión: **23.02.2010**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **05.03.2010**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
05.03.2010

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad Autónoma de Madrid**

⑱ Inventor/es: **Ávila de Grado, Jesús;
Gómez Ramos, Alberto;
Díaz Hernández, Miguel;
Engel, Tobias y
Hernández Pérez, Félix**

⑲ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Uso de compuestos que se unen al dominio de unión a microtúbulos de tau en la elaboración de composiciones farmacéuticas, dichas composiciones farmacéuticas y su aplicación en el tratamiento de tauopatías.**

㉑ Resumen:

Uso de compuestos que se unen al dominio de unión a microtúbulos de tau en la elaboración de composiciones farmacéuticas, dichas composiciones farmacéuticas y su aplicación en el tratamiento de tauopatías.

La presente invención se basa en el hecho que la heparina inhibe la toxicidad neuronal de la proteína tau. Así, la invención describe el uso de un compuesto que se une al dominio de unión a microtúbulos de la proteína tau, preferentemente heparina, en la elaboración de medicamentos; y una composición farmacéutica para la profilaxis y/o el tratamiento de tauopatías, preferentemente para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en humanos.

ES 2 321 996 B1

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

DESCRIPCIÓN

Uso de compuestos que se unen al dominio de unión a microtúbulos de tau en la elaboración de composiciones farmacéuticas, dichas composiciones farmacéuticas y su aplicación en el tratamiento de tauopatías.

5 **Sector de la técnica**

La invención se encuadra en el sector biomédico, en el desarrollo de nuevas composiciones farmacéuticas, y más concretamente hace referencia al uso de compuestos de unión a la proteína tau para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (AD) y otras tauopatías.

10 **Estado de la técnica**

La enfermedad de Alzheimer es el tipo más común de demencia entre los ancianos y la tauopatía más abundante. A nivel histopatológico, se caracteriza por la presencia de dos estructuras aberrantes: placas de amiloide y ovillos neurofibrilares (NFT), además de por pérdida de neuronas en regiones específicas del cerebro (para una revisión sobre el tema ver: (Ávila *et al.*, 2004)). Los NFT consisten en acúmulos de fibras helicoidales insolubles llamadas filamentos apareados helicoidales (PHF) (Kidd, 1963) que se encuentran en el interior de las neuronas y están formados fundamentalmente por la proteína específica neuronal tau (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986), la cual forma parte de estructuras subcelulares llamadas microtúbulos. Los microtúbulos son uno de los componentes del citoesqueleto celular y están involucrados en varias funciones como el transporte intracelular y la generación de asimetría. La función principal de la proteína tau en condiciones fisiológicas es la estabilización de los microtúbulos (Ávila *et al.*, 2004). En la enfermedad de Alzheimer y también en otras tauopatías, la proteína tau muestra varias alteraciones bioquímicas de las cuales la fosforilación es la más notable (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986). La proteína tau en estas condiciones se autoagrega, los microtúbulos se desestabilizan y como consecuencia, la función neuronal se compromete.

La hiperfosforilación de tau se ha usado para estudiar el progreso de la patología en la enfermedad de Alzheimer. La progresión de la enfermedad se ha caracterizado en diferentes estadios en función de las regiones del cerebro afectadas. Comienza en la corteza transentorrinal y avanza a través de la corteza entorrinal, hipocampo y cortezas temporal, parietal y frontal (Braak and Braak, 1991). Estos cambios en la fosforilación de tau son seguidos por lesiones neurofibrilares donde tau se agrega de forma aberrante para formar los NFT. No está claro, sin embargo, que las lesiones intracelulares de tau sean tóxicas para la neurona, ya que la degeneración de una neurona que contenga lesiones neurofibrilares puede llevar un periodo de tiempo muy largo, incluso décadas (Morsch *et al.*, 1999). La neurona dañada, eventualmente degenera y tras la muerte y lisis neuronal, componentes intracelulares, como los NFT (Goedert, 1999) y la proteína tau no polimerizada (Iqbal *et al.*, 2005) son secretados al medio extracelular. Los NFT que se encuentran en el espacio extracelular, son llamados "ovillos fantasmas", existiendo una correlación inversa entre el número de ovillos extracelulares y el de neuronas que sobreviven en el hipocampo (Bondareff *et al.*, 1989; Cras *et al.*, 1995; Fukutani *et al.*, 1995). Esto sugiere un efecto tóxico de la proteína tau extracelular no unida a microtúbulos tras la degeneración neuronal. Modificaciones como la fosforilación pueden incrementar la población de tau no unida a microtúbulos (Busciglio *et al.*, 1995). La muerte neuronal es un rasgo patológico que ocurre en la enfermedad de Alzheimer y en otras tauopatías, cuya causa no se conoce exactamente aunque podría producirse un efecto tóxico sobre las mismas por parte de elementos liberados tras la muerte neuronal. Por otro lado, la heparina es un componente de la matriz extracelular que se une a tau a través de su región de unión a microtúbulos (Pérez *et al.*, 1996), aunque se desconoce las implicaciones directas de dicha unión sobre los efectos deletéreos de la proteína tau.

A pesar de los esfuerzos de investigación hechos en el pasado, el tratamiento y/o prevención de la enfermedad de Alzheimer esta muy lejos de ser satisfactorio. Por lo tanto, la provisión de compuestos para el tratamiento de alteraciones patológicas en sistemas neuronales, como la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías en humanos, es de gran importancia.

50 **Descripción**

- Breve descripción

55 Un objeto de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto que se une al dominio de unión a microtúbulos de la proteína tau, en adelante uso de un compuesto de la presente invención, en la elaboración de medicamentos o composiciones farmacéuticas para la profilaxis y/o el tratamiento de tauopatías, preferentemente para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en humanos.

60 Un objeto particular de la de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto de la invención en el que el compuesto es la heparina, y de forma preferente heparina de bajo peso molecular dada su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (Bergamaschini *et al.*, 2004).

65 Otro objeto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o un medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento de una tauopatía, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o agente que se une al dominio de unión a microtúbulos de la proteína tau, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un método de profilaxis y/o tratamiento de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por una tauopatía, en adelante uso de la composición farmacéutica de la presente invención, consistente en la administración de dicha composición terapéutica que inhibe la toxicidad de la proteína tau.

5

Un objeto particular de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de esta invención en el que la tauopatía pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: enfermedad de Alzheimer, demencia frontotemporal con parkinsonismo asociada al cromosoma 17, demencia supranuclear progresiva, esclerosis lateral amiotrófica/complejo parkinsonismo-demencia de Guam, enfermedad de pick, degeneración corticobasal y enfermedad granular argirofílica (Lee *et al.*, 2001); y de forma preferente, para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

10

- Descripción detallada

La presente invención se enfrenta al problema de proporcionar nuevas herramientas terapéuticas para la profilaxis y/o tratamiento de tauopatías, preferentemente de la enfermedad de Alzheimer.

15

La presente invención se basa en que los inventores han descubierto que compuestos que interaccionan con la proteína tau no polimerizada, y más concretamente con su región de unión a microtúbulos, como la heparina (Pérez *et al.*, 1996), inhiben la toxicidad debida a la proteína tau no polimerizada en células neuronales. Una consecuencia de esta inhibición provocada por la heparina es una bajada significativa en el número de células muertas cuando la proteína tau es añadida en su presencia, pero no cuando se añade tau polimerizado en forma de PHF (Ejemplo 1), lo que podría explicar la propagación de la patología de tau en el cerebro de los enfermos de Alzheimer previamente indicada (Braak and Braak, 1991). De este modo, poblaciones de neuronas de regiones susceptibles (como la corteza transentorrinal), serían dañadas y finalmente degenerarían, secretando al medio extracelular sus componentes intracelulares, entre los que se encuentra la proteína tau no polimerizada. Esta proteína tau no polimerizada sería tóxica para las neuronas vecinas, las cuales serían dañadas y finalmente degenerarían repitiéndose el proceso y avanzando la degeneración neuronal como se ha indicado previamente (Braak and Braak, 1991).

20

De este modo, otros compuestos que interaccionen con este dominio o región de tau, la heparina entre otros, podrían prevenir el efecto tóxico de la proteína tau. Así, anticuerpos como el 7.51 (Novak *et al.*, 1991) o el 12E8 (Seubert *et al.*, 1995) (Athena Neurosciences, CA), reaccionan específicamente contra esta región de tau, y podrían ser usados para prevenir dicho efecto tóxico.

30

El tratamiento terapéutico de las tauopatías derivado de esta invención tiene varias ventajas: se dirige contra la proteína tau no polimerizada extracelular, reduce la toxicidad causada por esta proteína eficazmente y, en el caso de la heparina, es un compuesto natural en el ser humano y, por tanto, no es tóxica.

35

Así, un objeto de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto que se une al dominio de unión a microtúbulos de la proteína tau, en adelante uso de un compuesto de la presente invención, en la elaboración de medicamentos o composiciones farmacéuticas para la profilaxis y/o el tratamiento de tauopatías, preferentemente para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en humanos. Las tauopatías son enfermedades neurodegenerativas que cursan con una deposición anormal de la proteína tau en neuronas y células gliales en el cerebro, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, pertenecientes al siguiente grupo: enfermedad de Alzheimer, demencia frontotemporal con parkinsonismo asociada al cromosoma 17, demencia supranuclear progresiva, esclerosis lateral amiotrófica/complejo parkinsonismo-demencia de Guam, enfermedad de pick, degeneración corticobasal y enfermedad granular argirofílica (Lee *et al.*, 2001).

40

Tal como se utiliza en la presente invención el término “compuesto que se une al dominio de unión a microtúbulos de la proteína tau” se refiere a una molécula que cuando se une o interactúa con una parte de dicho dominio de la proteína tau (vqivykpvldskvtskcgslgnihhkpgggq, SEQ ID NO1), o con fragmentos funcionales de la misma, disminuye o elimina el efecto tóxico de dicha proteína sobre las células neuronales y gliales.

50

Un compuesto que se une al dominio de unión a microtúbulos de la proteína tau puede estar constituido por un péptido, una proteína, un ácido nucleico, carbohidratos, un anticuerpo, un compuesto químico, o cualquier otro tipo de molécula que disminuya o elimine el efecto y/o la duración de la actividad tóxica de la proteína tau.

55

Un objeto particular de la de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto de la invención en el que el compuesto es la heparina, y de forma preferente heparina de bajo peso molecular dada su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (Bergamaschini *et al.*, 2004).

60

Otro objeto particular de la de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto de la invención en el que el compuesto es un anticuerpo que se une al dominio mencionado (SEQ ID NO1), preferentemente el anticuerpo 7.51 (Novak *et al.*, 1991) y el 12E8 (Seubert *et al.*, 1995) (Athena Neurosciences, CA).

65

El término “anticuerpo” tal como aquí se utiliza incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos recombinantes de anticuerpos, combibodies, fragmentos Fab y scFv de anticuerpos, así como los dominios de unión a ligando.

Otro objeto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o un medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento de una tauopatía, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o agente que se une al dominio de unión a microtúbulos de la proteína tau, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Otro objeto particular es la composición farmacéutica de la invención donde el compuesto que se une al dominio de unión a microtúbulo de la proteína tau es la heparina, y más preferentemente heparina de bajo peso molecular.

Otro objeto particular es la composición farmacéutica de la invención donde el compuesto que se une al dominio de unión a microtúbulo de la proteína tau es un anticuerpo específico de dicho dominio (Proteína tau 42, SEQ ID NO1), preferentemente el anticuerpo 7.51 (Novak *et al.*, 1991) y el 12E8 (Seubert *et al.*, 1995) (Athena Neurosciences, CA).

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del agente o compuesto inhibidor de la actividad tóxica de la proteína tau, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

En una realización particular, dicha composición terapéutica se prepara en forma de una forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se efectúa por vía parenteral, por vía oral, por vía intraperitoneal, subcutánea, etc. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en el “Tratado de Farmacia Galénica”, C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid. Para obtener una mayor efectividad en el sistema nervioso la composición de la presente invención puede ser administrada, independientemente de la vía utilizada, unido a un compuesto que ayude a cruzar la barrera hematoencefálica como, por ejemplo, liposomas o nanopartículas (Chen *et al.*, 2004; Roney *et al.*, 2005).

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un método de profilaxis y/o tratamiento de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por una tauopatía, en adelante uso de la composición farmacéutica de la presente invención, consistente en la administración de dicha composición terapéutica que inhibe la toxicidad de la proteína tau.

Un objeto particular de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de esta invención en el que la tauopatía pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: enfermedad de Alzheimer, demencia frontotemporal con parkinsonismo asociada al cromosoma 17, demencia supranuclear progresiva, esclerosis lateral amiotrófica/complejo parkinsonismo-demencia de Guam, enfermedad de pick, degeneración corticobasal y enfermedad granular argirofílica (Lee *et al.*, 2001); y de forma preferente, para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Descripción de las figuras

Figura 1

Efecto de la proteína tau, un fragmento de la misma que comprende parte de su región de unión a microtúbulos (tau 2R) y polímeros de tau procedentes de cerebro humano (PHF) sobre la supervivencia de neuronas

Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y fueron incubadas durante 24 horas con tau recombinante humano no polimerizado (tau), el fragmento de la proteína tau de su región de unión a microtúbulos tau 2R y PHF purificados de pacientes de Alzheimer. Se observa un claro efecto tóxico sobre la supervivencia en aquellas que han sido incubadas con la proteína tau no polimerizada y con tau 2R, pero no en aquellas incubadas con PHF. Los datos corresponden a la media y desviación típica de tres experimentos independientes.

Figura 2

Efecto en la concentración intracelular de calcio de la adición de la proteína tau a cultivos de neuroblastoma humano SH-SY5Y

Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, fueron cargadas con la sonda fura 2-AM, tal y como se explica posteriormente, con objeto de comprobar el efecto que sobre la concentración intracelular de calcio tiene la adición de la proteína tau y los PHF. En la Figura 2A se observa que la adición de la proteína tau provoca una entrada de calcio intracelular sostenida (línea negra), hecho que puede ser tóxico para la célula. La línea roja muestra el perfil de células control. En la Figura 2B se observa que la adición de PHF no provoca una entrada significativa de calcio

al interior celular, al ser el perfil indistinguible de las células control. En ambos casos se utilizó acetilcolina (ACh), que provoca un incremento masivo del calcio intracelular, como control para comprobar la validez del sistema. Los datos se corresponden con las medias y desviaciones típicas de al menos 20 células individuales en cada caso y en los controles.

5

Figura 3

Efectos de la heparina sobre la toxicidad de tau

10 Al igual que en la figura 1, se observa que la adición del fragmento procedente de la región de unión a microtúbulos (2R) provoca un incremento en la toxicidad celular con respecto al control (Ctrl). La adición de heparina (Hep), que no es tóxica como muestra el hecho de que no provoque muerte celular con respecto al control, previene la toxicidad debida a tau en células de neuroblastoma humano (2R + Hep). Los datos se corresponden con las medias y desviaciones típicas de tres experimentos independientes.

15

Propósitos adicionales, ventajas y características de la invención podrán desarrollarse en la técnica o ser aprendidos por la práctica del invento. A través de los métodos descritos y demandas no se intenta excluir otros rasgos técnicos, componentes, aditivos o etapas del proceso que surjan como resultado del desarrollo de la técnica. Los siguientes ejemplos e ilustraciones no intentan limitar la presente invención.

20

Ejemplos de la invención

Ejemplo 1

25 *La heparina previene la toxicidad mediada por tau en células de neuroblastoma*

En primer lugar, se procedió a estudiar el efecto de la proteína tau no polimerizada y de los PHF sobre la supervivencia celular. Células de la línea de neuroblastoma SH-SY5Y (ref: 94030304 de la Colección Europea de Cultivos Celulares, Salysbury, Whiltshire, Gran Bretaña) fueron crecidas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Invitrogen-Gibco, Carlsbad, CA) suplementado con un 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS; Invitrogen-Gibco), 2 mM de glutamina y 50 µg/ml de gentamicina. La mayor isoforma de tau humano del sistema nervioso central (con 4 repeticiones en su dominio de unión a tubulina y dos insertos aminotermiales -SEQ ID NO 2- (Goedert *et al.*, 1989)) y el fragmento tau 2R (SEQ ID NO3) que contiene la primera y tercera repeticiones del dominio de unión a tubulina de la proteína tau, fueron producidos y purificados según ha sido descrito anteriormente (Pérez *et al.*, 1996)). Muestras de cerebros de pacientes de Alzheimer proporcionadas por el Dr Ravid (Netherlands Brain Bank, Holanda) fueron utilizadas para el aislamiento de PHF siguiendo el protocolo previamente descrito (Greenberg and Davies, 1990). Las muestras fueron obtenidas con todos los permisos y los enfermos diagnosticados por criterios estándares.

Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y fueron incubadas 24 horas con proteína tau recombinante no polimerizada, NFT o tau 2R a una concentración final de 0.5 µM en cada caso y se realizó un estudio de viabilidad celular añadiendo al cultivo calceína-AM (Molecular Probes, Eugene, Oregon) (que marca con fluorescencia solamente células vivas) e yoduro de propidio (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri) (que marca con fluorescencia roja solamente células muertas) a 37°C durante 30 minutos a una concentración final de 1 µM y 2 µM, respectivamente. Seguidamente, se procedió al conteo de células vivas y muertas en un microscopio de fluorescencia, representándose el porcentaje de células muertas con respecto al total. Las células control fueron incubadas con el mismo volumen de solvente (tampón fosfato salino). Los resultados demuestran que el porcentaje de células muertas aumentó con respecto al control en el caso en que fueron incubadas con proteína tau no polimerizada y con tau 2R, pero no en el caso en que fueron incubadas con PHF (Figura 1), en consonancia con lo descrito anteriormente.

Con objeto de estudiar el efecto que sobre la concentración intracelular de calcio tiene la proteína tau no polimerizada, células de neuroblastoma humano SH-SY5Y fueron cultivadas en las mismas condiciones descritas anteriormente, pero el día antes del experimento fueron depositadas en cubres con poli-L-lisina (10 µg/ml). El medio de cultivo fue entonces sustituido por medio de incubación (composición: 122 mM NaCl; 3.1 mM KCl; 0.4 mM KH₂PO₄; 5 mM NaHCO₃; 1.2 mM MgSO₄; 10 mM glucosa y 20 mM de buffer TES; pH 7.4). Seguidamente fueron cargadas con Fura 2-AM (Molecular Probes, Eugene, Oregon) (5 µM) durante 1 hora a 37°C. Los cubres fueron lavados con medio fresco y montados en una pequeña cámara de perfusión en la plataforma de un microscopio NIKON TE-200. La proteína tau no polimerizada y los PHF fueron añadidos al medio a una concentración final de 0.5 µM. Los estudios de medición de calcio intracelular fueron llevados a cabo tal y como se ha descrito anteriormente (Díaz-Hernández *et al.*, 2001). Se aplicó un pulso de 1.5 mM de acetilcolina al principio y al final (no mostrado) de cada experimento, para comprobar la viabilidad y la validez del sistema. Los resultados mostrados en la figura 2A indican que la adición de la proteína tau no polimerizada al medio de cultivo provoca una entrada continuada de calcio en la célula (línea roja), cosa que no ocurre cuando se añaden PHF (Figura 2B). Esta entrada de calcio puede ser tóxica para las células pudiendo ser la causa del incremento de la mortalidad neuronal observada en el experimento anterior y mimetizar lo ocurrido durante el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

65

Como se ha comentado anteriormente, la heparina es un compuesto que se une a la proteína tau promoviendo su autoagregación (Pérez *et al.*, 1996). Con objeto de comprobar el efecto de la heparina en la toxicidad mediada por la proteína tau no polimerizada en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, se añadieron al medio de cultivo tau

ES 2 321 996 B1

2R (0.5 μ M), heparina (1 μ g/ml) o ambos compuestos a la vez a las mismas concentraciones indicadas anteriormente durante 24 horas. Las células control SH-SY5Y fueron incubadas con el mismo volumen de solvente (tampón fosfato salino). En la Figura 3 se muestra que, al igual que en lo descrito anteriormente, la adición de tau 2R provoca un aumento significativo en la muerte celular, que la heparina no tiene tal efecto y que la adición de ambos compuestos a la vez reduce la muerte celular hasta los mismos niveles que el control.

Referencias

- 10 - **Ávila J, Lucas JJ, Pérez M, Hernández F (2004)** Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 84: 361-384.
- **Bergamaschini L, Rossi E, Storini C, Pizzimenti S, Distaso M, Perego C, De Luigi A, Vergani C, De Simoni MG (2004)** Peripheral treatment with enoxaparin, a low molecular weight heparin, reduces plaques and beta-amyloid accumulation in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24: 4181-4186.
- 15 - **Bondareff W, Mountjoy CQ, Roth M, Hauser DL (1989)** Neurofibrillary degeneration and neuronal loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 10: 709-715.
- 20 - **Braak H, Braak E (1991)** Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)* 82: 239-259.
- **Busciglio J, Lorenzo A, Yeh J, Yankner BA (1995)** beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* 14:879-888.
- 25 - **Chen Y, Dalwadi G, Benson HA (2004)** Drug delivery across the blood-brain barrier. *Curr Drug Deliv* 1: 361-376.
- **Cras P, Smith MA, Richey PL, Siedlak SL, Mulvihill P, Perry G (1995)** Extracellular neurofibrillary tangles reflect neuronal loss and provide further evidence of extensive protein cross-linking in Alzheimer disease. *Acta Neuropathologica* 89: 291-295.
- 30 - **Díaz-Hernández M, Pintor J, Castro E, Miras-Portugal MT (2001)** Independent receptors for diadenosine pentaphosphate and ATP in rat midbrain single synaptic terminals. *Eur J Neurosci* 14:918-926.
- 35 - **Fukutani Y, Kobayashi K, Nakamura I, Watanabe K, Isaki K, Cairns NJ (1995)** Neurons, intracellular and extracellular neurofibrillary tangles in subdivisions of the hippocampal cortex in normal ageing and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 200: 57-60.
- 40 - **Goedert M (1999)** Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases: tauopathies and alpha-synucleinopathies. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354: 1101-1118.
- **Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (1989)** Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3: 519-526.
- 45 - **Greenberg SG, Davies P (1990)** A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5827-5831.
- 50 - **Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986)** Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4913-4917.
- 55 - **Iqbal K, Flory M, Khatoon S, Soininen H, Pirttila T, Lehtovirta M, Alafuzoff I, Blennow K, Andreasen N, Vanmechelen E, Grundke-Iqbal I (2005)** Subgroups of Alzheimer's disease based on cerebrospinal fluid molecular markers. *Ann Neurol* 58: 748-757.
- **Kidd M (1963)** Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197: 192-193.
- 60 - **Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ (2001)** Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* 24: 1121-1159.
- **Morsch R, Simon W, Coleman PD (1999)** Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles. *J Neuro-pathol Exp Neurol* 58: 188-197.
- 65 - **Novak M, Jakes R, Edwards PC, Milstein C, Wischik CM (1991)** Difference between the tau protein of Alzheimer paired helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of monoclonal antibodies 423 and 7.51. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5837-5841.

ES 2 321 996 B1

- Pérez M, Valpuesta JM, Medina M, Montejo de Garcini E, Ávila J (1996) Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: the minimal sequence required for tau-tau interaction. *J Neurochem* 67: 1183-1190.

5 - Roney C, Kulkarni P, Arora V, Antich P, Bonte F, Wu A, Mallikarjuana NN, Manohar S, Liang HF, Kulkarni AR, Sung HW, Sairam M, Aminabhavi TM (2005) Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for Alzheimer's disease. *J Control Release* 108: 193-214.

10 - Seubert P, Mawal-Dewan M, Barbour R, Jakes R, Goedert M, Johnson GV, Litersky JM, Schenk D, Lieberburg I, Trojanowski JQ, *et al.* (1995) Detection of phosphorylated Ser262 in fetal tau, adult tau, and paired helical filament tau. *J Biol Chem* 270: 8917-18922.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un compuesto que se une al dominio de unión a microtúbulos de la proteína tau en la elaboración de medicamentos o composiciones farmacéuticas para la profilaxis y/o el tratamiento de tauopatías perteneciente al siguiente grupo: enfermedad de Alzheimer, demencia frontotemporal con parkinsonismo asociada al cromosoma 17, demencia supranuclear progresiva, esclerosis lateral amiotrófica/complejo parkinsonismo-demencia de Guam, enfermedad de pick, degeneración corticobasal y enfermedad granular argirofílica.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el compuesto es la heparina.
3. Uso según la reivindicación 2 **caracterizado** porque la heparina es heparina de bajo peso molecular.
4. Uso según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el compuesto es un anticuerpo.
- 15 5. Uso según la reivindicación 4 **caracterizado** porque el anticuerpo pertenece al siguiente grupo: anticuerpo 7.51 y el 12E8.
- 20 6. Composición farmacéutica o medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento de una tauopatía **caracterizado** porque comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o agente que se une al dominio de unión a microtúbulos de la proteína tau, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.
- 25 7. Composición según la reivindicación 6 **caracterizada** porque el compuesto que se une al dominio de unión a microtúbulo de la proteína tau es la heparina.
8. Composición según la reivindicación 7 **caracterizada** porque la heparina es heparina de bajo peso molecular.
9. Composición según la reivindicación 6 **caracterizada** porque el compuesto es un anticuerpo.
- 30 10. Composición según la reivindicación 9 **caracterizada** porque el anticuerpo pertenece al siguiente grupo: anticuerpo 7.51 y el 12E8.
- 35 11. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 6 a la 10 en un método de profilaxis y/o tratamiento de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por una tauopatía que consiste en la administración de dicha composición terapéutica que inhibe la toxicidad de la proteína tau.
- 40 12. Uso según la reivindicación 11 **caracterizado** porque la tauopatía pertenece al siguiente grupo: enfermedad de Alzheimer, demencia frontotemporal con parkinsonismo asociada al cromosoma 17, demencia supranuclear progresiva, esclerosis lateral amiotrófica/complejo parkinsonismo-demencia de Guam, enfermedad de pick, degeneración corticobasal y enfermedad granular argirofílica.

45

50

55

60

65

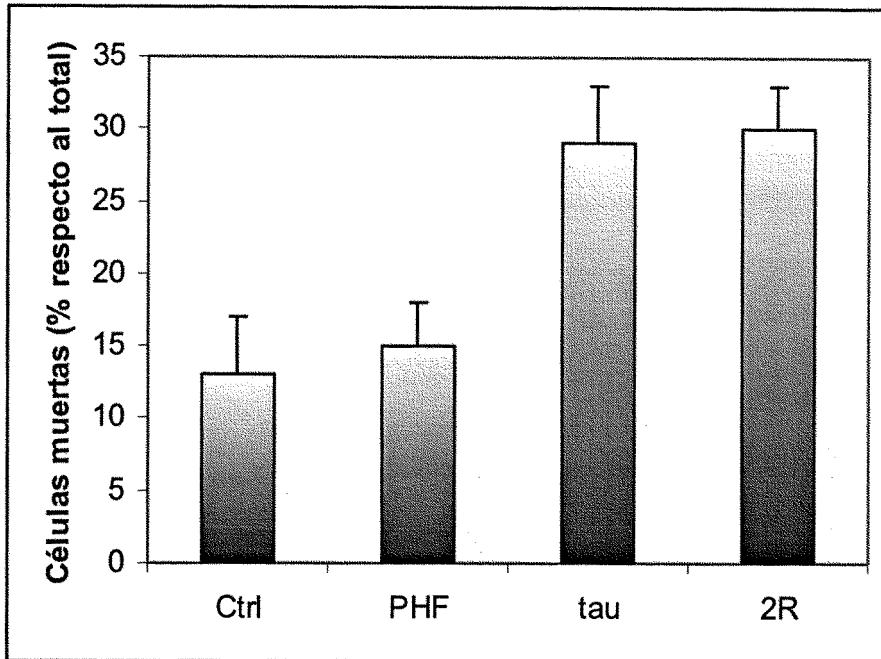
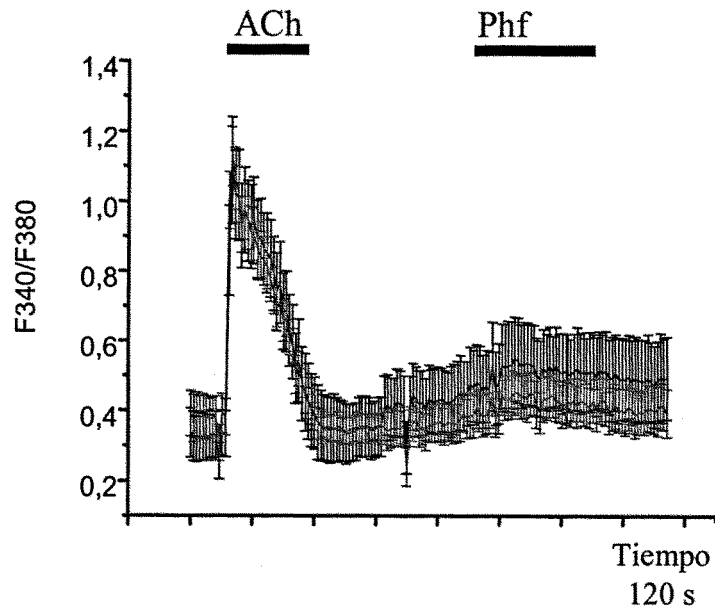


Figura 1

A)



B)

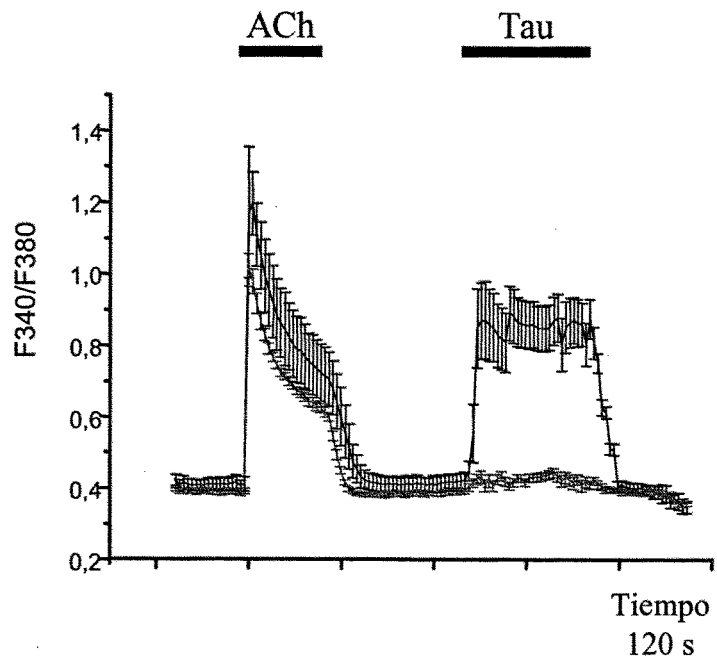


Figura 2

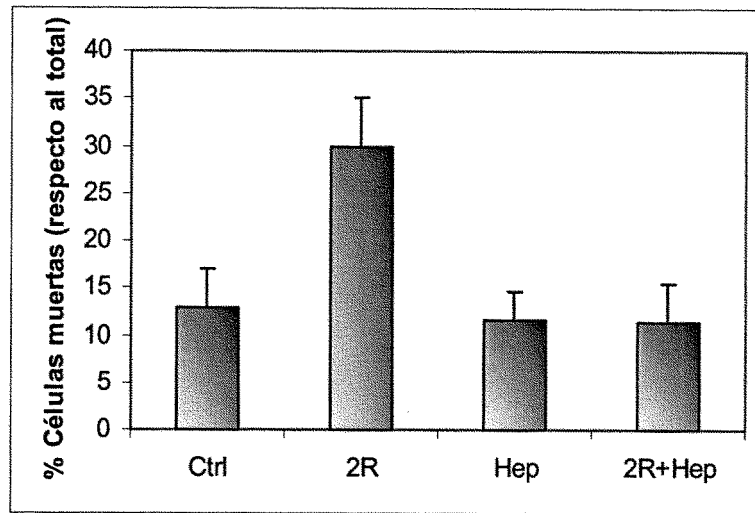


Figura 3

ES 2 321 996 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

5 <120> USO DE COMPUESTOS QUE SE UNEN AL DOMINIO DE UNION A MICROTÚBULOS DE TAU EN LA ELABORACIÓN DE COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS, DICHAS COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y SU APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE TAUOPATÍAS

10 <130> Tau-heparina

<160> 3

15 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 31

20 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

25 Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys
1 5 10 15

30 Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
20 25 30

<210> 2

35 <211> 441

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

40 <400> 2

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

45 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

50 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45

55 Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 55 60

60 Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65 70 75 80

65 Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
85 90 95

ES 2 321 996 B1

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
 100 105 110

5

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
 115 120 125

10

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
 130 135 140

15

Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
 145 150 155 160

20

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
 165 170 175

25

Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
 180 185 190

30

Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 195 200 205

35

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 210 215 220

40

Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
 225 230 235 240

45

Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
 245 250 255

50

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
 260 265 270

55

Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
 275 280 285

60

Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
 290 295 300

65

Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
 305 310 315 320

Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
 325 330 335

ES 2 321 996 B1

Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
 340 345 350

5

Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 355 360 365

10

Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
 370 375 380

15

Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
 385 390 395 400

20

Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
 405 410 415

25

Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
 420 425 430

30

Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 435 440

<210> 3

<211> 63

35 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

40

Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys
 1 5 10 15

45

Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val
 20 25 30

50

Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys
 35 40 45

55

Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 50 55 60

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 321 996

② Nº de solicitud: 200600176

③ Fecha de presentación de la solicitud: **26.01.2006**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	DETURE M., GRANGER B., et al. "Evidence for independent mechanisms and a multiple-hit model of tau assembly" Biochemical and Biophysical Research Communications (28 de noviembre de 2005) Vol. 339, Nº. 3, páginas 858-864 [recuperado el 15.05.2009] Recuperado de Internet < http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.11.087 >	1,2,6,7
Y		3-5,8-12
Y	WALZER M., et al. "Low molecular weight glycosaminoclycan blockade of beta-amyloid induced neuropathology" European Journal of Pharmacology (12 de junio de 2002) Vol. 445, Nº. 3, páginas 211-220; ISSN 0014-2999; todo el documento.	3,8,11,12
Y	NOVAK M. et al. "Difference between the tau protein of Alzheimer paired helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of monoclonal antibodies 423 and 7.51" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1 de julio de 1991) Vol. 88, Nº. 13, páginas 5837-5841; ISSN 0027-8424; todo el documento.	4,5,9-12
Y	SEUBERT P. et al. "Detection of Phosphorylated Ser262 in Fetal Tau, Adult Tau, and Paired Helical Filament Tau" The Journal of Biological Chemistry (11 de agosto de 1995) Vol. 270, Nº. 32, páginas 18917-18922; ISSN 0021-9258; todo el documento.	4,5,9-12
A	WO 0118546 A2 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.) 15.03.2001, todo el documento.	1-12
A	WO 02062851 A1 (AXON NEUROSCIENCE FORSCHUNGS-UND ENTWICK-LUNGS GMBH) 15.08.2002, todo el documento.	1-12
A	WO 2004009062 A2 (KHALID IQBAL, INGE GRUNDKE-IQBAL) 29.01.2004, todo el documento.	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
29.05.2009

Examinador
A. García Coca

Página
1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 31/727 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

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

C07K, A61K, A61P

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

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.05.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-12	NO

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

Base de la Opinión:

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

1. Documentos considerados:

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	DETURE M., GRANGER B., et al.	28.11.2005
D02	WALZER M., et al.	12.06.2002
D03	NOVAK M. et al.	01.07.1991
D04	SEUBERT P. et al.	11.08.1995

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

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-12, es el uso de un compuesto que se une al dominio de unión a microtúbulos de la proteína tau, para la elaboración de medicamentos o composiciones farmacéuticas para el tratamiento o profilaxis de tauopatías. Dicho compuesto es la heparina (más específicamente heparina de bajo peso molecular) o un anticuerpo (7.51 o 12E8). También es objeto de la invención la composición farmacéutica y su uso.

El documento D01 divulga las características patológicas de distintas tauopatías, como la formación de ovillos neurofibrilares debido a la hiperfosforilación de tau que reduce su capacidad de unión a microtúbulos, favoreciendo la propia autoagregación de tau (ver pág 858 columna izq. Líneas 1-8 y pág. 858 columna dcha. líneas 7-9). En condiciones patológicas se ve aumentada la capacidad de polimerización de tau debido a cambios conformacionales, mediante modificaciones covalentes o mediante la interacción de tau con otros factores celulares, como la heparina, la cuál se une a tau a través del dominio de unión a microtúbulos de la propia proteína tau (ver pág. 859 columna izq. Párrafo 2; pág. 859 columna dcha. párrafo 6 y figura 1).

El problema técnico planteado sería encontrar un compuesto que se una al dominio de unión de microtúbulos de tau y que, debido a su tamaño, sea capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. En este sentido, el documento del estado de la técnica más próximo, sería el documento D01.

La diferencia técnica esencial entre el documento D01 y la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-3, 6-8, 11 y 12, radica en que el compuesto de la invención es la heparina de bajo peso molecular, cuya ventaja técnica es su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica.

El documento D02 divulga un estudio sobre el papel de proteoglicanos y glicosaminoglicanos en la enfermedad de Alzheimer (ver abstract y pág. 211 columna izq. párrafo 1-columna dcha. párrafo 1). Este documento describe el efecto terapéutico del Ateroid (un compuesto formado por glicanos de alto y bajo peso molecular), y propone que el componente activo de dicho compuesto serían los glicosaminoglicanos de bajo peso molecular debido a su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (ver página 212, columna izq. párrafos 2 y 3).

A partir de los documentos del estado de la técnica, D01 y D02, resultaría obvio para un experto en la materia usar un glicosaminoglicano de bajo peso molecular, como la heparina de bajo peso molecular, de la que se conoce que se une al dominio de unión a microtúbulos de la proteína tau y que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para la profilaxis o el tratamiento de distintas tauopatías.

Por lo tanto, el objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-3, 6-8, 11 y 12, aunque es nuevo, según el artículo 6.1 Ley 11/1986 de patentes, no implica actividad inventiva según el sentido del artículo 8.1 Ley 11/1986 de patentes.

El documento D01 divulga la unión de distintos compuestos al dominio de unión de microtúbulos de la proteína tau, entre ellos y de forma más específica, la heparina (ver explicación anterior).

El documento D03 describe el anticuerpo monoclonal 7.51 (mAb 7.51) que reconoce un pequeño fragmento del dominio de unión a microtúbulos de tau, que forma parte también del núcleo de los filamentos apareados helicoidales (PHF) que dan lugar a los ovillos neurofibrilares (NFT) característicos de la enfermedad de Alzheimer (ver abstract, pág. 5837 columna izq. párrafo 2-columna dcha. párrafo 1, pág. 5839 columna dcha. párrafo 2, pág. 5840 columna dcha. párrafo 4-pág. 5841 columna izq.).

Hoja adicional

El documento D04 divulga el uso del anticuerpo 12E8 (mAb 12E8) para la detección de ser262 y ser356 de la proteína tau, localizadas en el dominio de unión a microtúbulos de la propia proteína tau. Este anticuerpo reconoce específicamente proteínas tau fosforiladas tanto en la ser262, como en la ser356.

Por lo tanto, a partir de la información contenida en los documentos del estado de la técnica, D03 y D04 (considerados por separado) con el documento D01, resultaría obvio para un experto en la materia usar un anticuerpo, en vez de la heparina, del que se conoce que se une al dominio de unión a microtúbulos de la proteína tau, para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para la profilaxis o el tratamiento de distintas tauopatías.

Por lo tanto, el objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1, 4-6, 9-12, aunque es nuevo, según el artículo 6.1 Ley 11/1986 de patentes, no implica actividad inventiva según el sentido del artículo 8.1 Ley 11/1986 de patentes.