

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 664**

51 Int. Cl.:

A61K 31/381 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2007 E 07840403 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2013 EP 2170322**

54 Título: **Procedimientos de modificación de oligómeros β amiloides utilizando compuestos no peptídicos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2013

73 Titular/es:

**ACUMEN PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
4435 NORTH FIRST STREET 360
LIVERMORE, CA 94551, US**

72 Inventor/es:

**KRAFFT, GRANT A.;
PRAY, TODD y
Goure, WILLIAM F.**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 401 664 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de modificación de oligómeros β amiloides utilizando compuestos no peptídicos.

5 **Antecedentes de la invención**Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a procedimientos para inhibir, regular y/o modular la formación de oligómeros β_{1-42} amiloides solubles, globulares, no fibrilares, neurotóxicos procedentes de monómeros β_{1-42} amiloides utilizando compuestos no peptídicos que tienen un peso molecular inferior a 1000. La presente invención también se refiere a procedimientos de tratamiento de un paciente que padece enfermedades relacionadas con la formación de oligómeros β_{1-42} amiloides neurotóxicos solubles, globulares, no fibrilares mediante la administración de compuestos no peptídicos a los pacientes.

15 Estado de la técnica

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una demencia progresiva mortal sin cura en la actualidad. Aunque la base molecular de la enfermedad no se ha demostrado, considerables pruebas implican actualmente a las neurotoxinas derivadas de péptidos beta amiloides (A β) y, en particular, el péptido beta amiloide de 42 aminoácidos (A β_{1-42}). A β es un péptido anfipático, cuya abundancia aumenta por mutaciones genéticas y factores de riesgo relacionados con la EA. Las fibrillas formadas a partir de A β constituyen los núcleos de las placas amiloides seniles, que son señas de identidad del cerebro EA. Las fibrillas análogas generadas *in vitro* son letales para las neuronas cerebrales cultivadas. Estos descubrimientos proporcionan la lógica central para la hipótesis de la cascada amiloide original, una teoría en la que se propuso que la pérdida de memoria es la consecuencia de la muerte neuronal producida por A β fibrilar (Hardy y Higgins (1992) *Science* 256:184-185).

A pesar de su fuerte apoyo experimental y atractivo intuitivo, la hipótesis de la cascada amiloide original ha demostrado ser inconsistente con las observaciones clave, incluida la escasa correlación entre la demencia y la carga amiloide de la placa senil (Katzman (1988) *Ann. Neurol.* 23 (2):138-144). Utilizando un modelo de ratón transgénico de la EA, se obtuvieron dos conclusiones sorprendentes cuando los ratones se trataron con anticuerpos monoclonales contra A β : (1) los ratones vacunados presentaron inversión de la pérdida de memoria, con recuperación evidente en 24 horas, y (2) beneficios cognitivos de la vacunación acumulados a pesar de ningún cambio en los niveles de la placa senil (Dodart *et al.* (2002) *Nat. Neurosci.* 5:452-457; Kotilinek *et al.* (2002) *J. Neurosci.* 22:6331-6335). Dichos descubrimientos no son coherentes con un mecanismo para la pérdida de memoria dependiente de la muerte neuronal producida por fibrillas de amiloide.

Los defectos destacados en la hipótesis de la cascada amiloide original se han eliminado por una hipótesis actualizada de la cascada amiloide que incorpora una función para moléculas adicionales neurológicamente activas formadas por autoensamblaje A β . Estas moléculas son ligandos difundibles derivados de β -amiloides (LDDA), que se ensamblan en A β_{1-42} a bajas concentraciones (Lambert *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6448-6453). Esencialmente los eslabones que faltan en la hipótesis de la cascada amiloide original, LDDA inhiben rápidamente a largo plazo la potenciación (Lambert *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6448-6453; Walsh *et al.* (2002) *Nature* 416:535-539; Wang *et al.* (2002) *Brain Res.* 924:133-140), un paradigma experimental clásico para la memoria y la plasticidad sináptica. En la hipótesis de la cascada A β actualizada la pérdida de memoria surge de la falta de sinapsis, antes de la muerte de las neuronas, originándose el fallo por LDDA, no fibrillas (Hardy y Selkoe (2002) *Science* 297:353-356). Los LDDA se producen en el tejido cerebral y son sorprendentemente elevados en el tejido cerebral de EA en comparación con referencias de edad similar (Kayed *et al.* (2002) *Science* 300:486-489; Gong *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:10417-10422) y en modelos de ratones transgénicos de EA (Kotilinek *et al.* (2002) *J. Neurosci.* 22:6331-6335; Chang *et al.* (2003) *J. Mol. Neurosci.* 20:305-313).

Un enfoque mecanicista simplista a esta teoría puede ilustrarse de la manera siguiente:

55 Placa amiloide senil \rightleftharpoons A β_{1-42} monomérico \rightleftharpoons LDDA

donde la formación de LDDA es una ruta separada de formación de la placa amiloide senil de los cuales ambas están en equilibrio con A β_{1-42} monomérico.

Otros experimentos han demostrado importantes propiedades neurológicas de los LDDA. Se ha demostrado que los LDDA tienen toxicidad selectiva para las neuronas CA1 del hipocampo en comparación con neuronas CA3, y completa ausencia de toxicidad para con las neuronas cerebelares (Kim *et al.* (2003) *FASEB J.* 17:118-120). La inyección ventricular de oligómeros A β_{1-42} en ratas naturales dio lugar a modelos de comportamiento rápidos y alterados con recuperación completa que ocurre en 24 horas (Cleary *et al.* (2005) *Nat. Neurosci.* 8:79-84), y estas carencias se atribuyen a oligómeros de orden superior, específicamente 12-meros (Lesne *et al.* (2006) *Nature* 440:352-357). La unión de LDDA a las neuronas se produce con una alta especificidad y se localiza en receptores posinápticos en un subconjunto de neuronas del hipocampo (Lacor *et al.* (2004) *J. Neurosci.* 24:10191-10200). Esto

provoca la rápida y persistente regulación por incremento del arco del producto génico precoz inmediato, cuya traducción es dependiente de la actividad en polirribosomas situados en subconjuntos de las espinas dendríticas (Steward *et al.* (1998) *Neuron* 21:741-751; Guzowski *et al.* (2000) *J. Neurosci.* 20:3993-4001). Más recientemente, los LDDA han estado implicados como activadores corriente arriba de la fosforilación de tau y se ha demostrado que interfiere en el comportamiento animal a niveles femtomolares (Matsubara *et al.* (2004) *Neurobiol. Aging* 25:833-841).

La reversibilidad de la pérdida de memoria en modelos de ratón, acoplados con las propiedades neurológicas de los LDDA y su presencia en el cerebro de un EA, proporciona un fuerte apoyo a la hipótesis de que la EA es una enfermedad sináptica provocada por LDDA (Lambert *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6448-6453; Klein *et al.* (2001) *Trends Neurosci.* 24:219-220; Selkoe (2002) *Science* 298:789-791).

La utilización de anticuerpos específicos para los LDDA es una poderosa manera de modular el equilibrio entre A β ₁₋₄₂ monomérico y los LDDA proporcionando de este modo tratamiento para las enfermedades mediadas por LDDA. Sin embargo, la administración de anticuerpos por lo general está limitada a soluciones inyectables que plantean problemas de observancia por parte del paciente, así como la presencia de un médico adjunto. Las pequeñas moléculas que modulan este equilibrio, administrables por medios no inyectables tales como la administración oral, la administración transdérmica, la administración pulmonar, la administración nasal, etc. serían especialmente beneficiosas.

Se afirma que numerosas moléculas pequeñas desarrolladas originalmente como bloqueadores de fibrillas de amiloide poseen propiedades de bloqueo de ensamblaje de A β oligómeros. Algunos de estos compuestos incluyen Alzhemed™ (Gervais (2004) *Neurobiol. Aging* 25:S11-12), Clioquinol (Ritchie *et al.* (2003) *Arch. Neurol.* 60:1685-1691), β -ciclodextrinas sustituidas (Yu *et al.* (2002) *J. Mol. Neurosci.* 19:51-55), trehalosa (Lui (2005) *Neurobiol. Disease* 20:74-81), fenoles sustituidos con un solo amino, carbonilo y nitro (De Felice *et al.* (2001) *FASEB J.* 20 de marzo; De Felice *et al.* (2004) *FASEB J.* 18:1366-1372), Curcumina (Yang *et al.* (2005) *J. Biol. Chem.* 280(7):5892-5901), análogos de ciclohexanhexol (McLaurin *et al.* (2006) *Nature Med.* 12:801-808), esteroesteros (Lecanu *et al.* (2004) *Steroids* 69:1-16) y pironas tricíclicas (Maeqawa *et al.* (2006) *J. Neurochem.* 98:57-67). Dos de estos compuestos, Alzhemed™ y Clioquinol, han avanzado en ensayos clínicos.

Alzhemed™ (ácido 3-amino-1-propansulfónico), denominado "GAG mimético", se propone para reducir los niveles de amiloide soluble e insoluble al unirse al monómero A β , aunque ningún detalle experimental ha aparecido para confirmar el modo de acción propuesto. Alzhemed™ ha completado recientemente una ampliación de 20 meses de estudio abierto de un ensayo en fase II, y hay informes de deterioro cognitivo ralentizado en algunos pacientes con EA leve, sin embargo, no se observó eficacia durante la fase a ciegas del estudio (Gervais (2004.) *Neurobiol Aging* 25: S11-12).

El segundo compuesto en un ensayo clínico en fase II, Clioquinol, se demostró que estabiliza la capacidad cognitiva de los pacientes en comparación con los pacientes no tratados y presentaban concentraciones inferiores de A β ₁₋₄₂ en su plasma (Ritchie *et al.* (2003) *Arch. Neurol.* 60:1685-1691). Sin embargo, una impureza tóxica (una forma di-yodo de Clioquinol) aparecida durante la producción ha dado como resultado que el estudio se interrumpa y que Clioquinol se reemplace por un análogo denominado PBT2 (Blennow *et al.* (2006) *Lancet* 368:387-403).

Por último, un compuesto o compuestos no identificados en un extracto de hojas de ginkgo biloba se informó que reducen las concentraciones de trímeros y tetrámeros de A β ₁₋₄₂ y aumentan las concentraciones de polímeros de alto peso molecular en función de la dosis (Yao *et al.* (2001) *Brain Res.* 889:181-190). También se informó la protección en función de la dosis frente a la toxicidad provocada por el oligómero A β a las células PC-12.

De los compuestos descritos para bloquear el montaje A β o unirse al monómero A β ₁₋₄₂, pocos parecen tener un potencial terapéutico alto. Dada su estructura muy sencilla y sus propiedades hidrófilas, es muy poco probable que Alzhemed™ tenga una afinidad elevada y selectiva por el monómero A β ₁₋₄₂. Cualquier efecto que Alzhemed™ tenga sobre la agregación o desagregación de A β es probablemente atribuible a su interacción con restos iónicos cerca del terminal N de A β ₁₋₄₂. Las ciclodextrinas no tienen propiedades similares al plomo ni similares a medicamentos que serían recomendables para desarrollo (Oprea *et al.* (2001) *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 41:1308-1315; Vieth *et al.* (2004) *J. Med. Chem.* 47:224-232.), y los fenoles de De Felice contienen grupos funcionales aldehído y nitro que a menudo se consideran reactivos y excluidos de las bibliotecas de cribado (Walters y Namchuk (2003) *Nat. Rev.* 2:259-266). Numerosas moléculas que contienen el grupo funcional fenol se han descrito como "bateadores frecuentes" en bibliotecas de cribado (Roche *et al.* (2002) *J. Med. Chem.* 45:137-142). Por lo tanto, la evaluación adicional de la actividad y la selectividad de los fenoles de De Felice es necesario para confirmar que estos compuestos son golpes válidos. Algunos compuestos con un esqueleto esteroideo se ha señalado que son inhibidores promiscuos debido a un proceso de autoagregación inesperado (McGovern *et al.* (2002) *J. Med. Chem.* 45:1712-1722), lo que puede explicar los resultados ambiguos de esteroesterol. Por último, el principio activo en el extracto de ginkgo biloba es desconocido. Por lo tanto, la mayoría de los bloqueadores del montaje A β pretendidos no se considerarían compuestos para el desarrollo terapéutico.

A pesar de estos supuestos resultados y como se señaló anteriormente, los ensayos de unión indican que estos

compuestos son, en el mejor de los casos, antagonistas moderados para la formación de LDDA.

Por consiguiente, sería particularmente beneficioso proporcionar moléculas pequeñas que proporcionan mejor inhibición, regulación y/o modulación de la formación de LDDA.

5

Sumario de la invención

Esta descripción se refiere al descubrimiento de que la formación de A β ₁₋₄₂ (LDDA) neurotóxico, no fibrilar, globular, soluble, puede ser antagonizada por compuestos no peptídicos sustancialmente puros que tienen un peso molecular inferior a 1.500, preferentemente inferior a 1.000, compuestos que antagonizan la formación de LDDA a niveles mayores que los previamente alcanzables. Esta invención se refiere además al descubrimiento de numerosas estructuras que presentan este antagonismo mejorado demostrando que no es dependiente de la estructura.

10

Por consiguiente, en uno de sus aspectos del método, la presente invención se refiere a la formación que antagoniza LDDA neurotóxico a partir de A β ₁₋₄₂ monomérico poniendo en contacto A β ₁₋₄₂ monomérico con un compuesto no peptídico sustancialmente puro, caracterizándose dicho compuesto por:

15

(a) tener un peso molecular inferior a 1.000;

20

(b) ser una antagonista contra la formación de LDDA neurotóxicos a partir de monómeros A β ₁₋₄₂; y

(c) presentar una Cl₅₀ de aproximadamente 5 μ M o inferior en el ensayo del Ejemplo 1, que mide la formación de LDDA neurotóxicos, en el que dicho compuesto se selecciona de entre el grupo de compuestos definidos en la reivindicaciones.

25

Aún en otra forma de realización, la invención se refiere a la inhibición, regulación y/o modulación de la disfunción neuronal y/o a la neurotoxicidad provocadas por LDDA en una neurona al inhibir la formación de LDDA al utilizar un compuesto, en el que dicho compuesto se selecciona de entre el grupo de compuestos definidos en las reivindicaciones. El procedimiento comprende poner en contacto monómeros A β ₁₋₄₂ que pueden estar en la presencia de células neuronales con una cantidad eficaz de un compuesto no peptídico sustancialmente puro, caracterizándose dicho compuesto por:

30

(a) tener un peso molecular inferior a 1.000;

35

(b) ser un antagonista contra la formación de LDDA neurotóxicos en monómeros A β ₁₋₄₂; y

(c) presentar una Cl₅₀ de aproximadamente 5 μ M o menos en el ensayo del Ejemplo 1, que mide la formación de LDDA neurotóxicos.

40

Aún en otra forma de realización, la invención se refiere a la utilización de un compuesto en el tratamiento de un paciente que padece o está en situación de riesgo de padecer una enfermedad relacionada con el LDDA seleccionada de entre el grupo que consta de la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down, la apoplejía, el deterioro cognitivo leve, la demencia relacionada con la isquemia focal y la degeneración neuronal, en el que dicho compuesto se selecciona de entre el grupo de compuestos definidos en la reivindicaciones y es un compuesto no peptídico sustancialmente puro, caracterizándose dicho compuesto por:

45

(a) tener un peso molecular inferior a 1.000;

50

(b) ser un antagonista contra la formación de LDDA neurotóxicos en monómeros A β ₁₋₄₂; y

(c) presentar una Cl₅₀ de aproximadamente 5 μ M o menos en el ensayo del Ejemplo 1, que mide la formación de LDDA neurotóxicos.

55

En otra forma de realización, la presente invención se refiere a una composición para su utilización en el tratamiento de un paciente que padece o está en situación de riesgo de padecer una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consta de la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down, la apoplejía, el deterioro cognitivo leve, la demencia relacionada con la isquemia focal y la degeneración neuronal en la que la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto no peptídico sustancialmente puro, caracterizándose dicho compuesto por:

60

(a) tener un peso molecular inferior a 1.000;

(b) ser un antagonista contra la formación de LDDA neurotóxicos en monómeros A β ₁₋₄₂; y

65

(c) presentar una Cl₅₀ de aproximadamente 5 μ M o menos en el ensayo del Ejemplo 1, que mide la formación de LDDA neurotóxicos.

La presente descripción se refiere también a un procedimiento de preparación de un medicamento que comprende un compuesto como se indica en las formas de realización de este apartado.

5 Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la inhibición del montaje en función de la dosis representativa de compuestos descritos en la presente memoria utilizando el análisis TERF. Se muestran los resultados del compuesto A de ensayo analizado a concentraciones entre 0,05 a 3 μM , así como los resultados del compuesto B de ensayo analizado a una concentración de 30 μM . Se muestran también las referencias positivas y negativas. El eje X indica el tiempo en minutos, en tanto que el eje Y indica las unidades de fluorescencia relativa (UFR) $\times 10^3$ medido por el análisis TERF en el Ejemplo 1.

La figura 2 muestra la inhibición del montaje en función de la dosis representativa del supuesto compuesto bloqueador de fibrilla amiloide Alzhemed™ (Neurochem) analizado en el análisis TERF descrito en la presente memoria. Se muestran también las referencias positivas y negativas. El eje X indica el tiempo en minutos, en tanto que el eje Y indica las unidades de fluorescencia relativa (UFR) $\times 10^3$ medido por el análisis TERF.

20 Descripción detallada de la invención

A. Procedimientos de la invención

Debe señalarse que, como se emplean en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen los mismos significados entendidos comúnmente por cualquier experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque en la puesta en práctica o las pruebas de la presente invención pueden utilizarse cualquiera de los procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria, los procedimientos, dispositivos y materiales preferidos se describen a continuación. Nada en la presente memoria debe interpretarse como un reconocimiento de que la invención no da derecho a anteceder dicha divulgación en virtud de la invención anterior.

Las definiciones utilizadas en la presente memoria se limitan a la aplicación de pequeñas moléculas como las que se refieren a la agregación de LDDA o a la oligomerización y enfermedades mediadas por éste.

La presente descripción se refiere al descubrimiento de que la formación de péptidos $\text{A}\beta_{1-42}$ (LDDA) neurotóxicos, no fibrilares, globulares, oligoméricos, solubles, pueden ser antagonizados por compuestos no peptídicos sustancialmente puros que tienen un molecular peso inferior a 1500, preferentemente menos de 1000. Los compuestos antagonizan la formación de LDDA a nucleósido mayores que las que pudieron conseguirse anteriormente.

Sin limitarse por ninguna teoría, se cree que la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los compuestos descritos en este documento va a interactuar con motivos claves del montaje dentro de los monómeros $\text{A}\beta_{1-42}$ o dentro de los motivos críticos en los oligómeros $\text{A}\beta_{1-42}$. Esta interacción, a su vez, impedirá la formación de LDDA neurotóxicos o la actividad de dichos ligandos. La perturbación de los LDDA o de la actividad de dichos ligandos protegerá la potenciación a largo plazo de las neuronas obviando de ese modo y/o invirtiendo la neurotoxicidad relacionada con los LDDA. Además, esta interacción no interfiere con la formación de placas seniles de $\text{A}\beta$.

La expresión "compuesto no peptídico" se refiere a un compuesto, cuyos ejemplos se describen en la presente memoria, que no están compuestas de péptidos y/o proteínas. Debe apreciarse que la presencia de 1 a 10, o de 1 a 5, o 1 a 2 restos de amino ácidos unidos a las estructuras del compuesto dadas a conocer en la presente memoria no hacen a dichas estructuras peptídicas siempre que el peso molecular del compuesto sea inferior a 1.500, preferentemente inferior a 1.000, y los restos de aminoácidos no poseen ninguna función de unión al antígeno y además siempre que la propia estructura en ausencia de los restos de aminoácidos posea inhibición de la formación de LDDA como se expone en el Ejemplo 1 en la presente memoria. En una forma de realización preferida, los compuestos no peptídicos descritos en la presente memoria no contienen restos de aminoácidos derivados de uno de los 20 aminoácidos de origen natural.

Los términos "péptidos" y "proteínas" se refieren a compuestos de alto peso molecular que tienen numerosos restos de aminoácidos unidos por enlaces amido (-C(O)-NR-). Los restos de aminoácidos se derivan por lo general de uno de los 20 aminoácidos de origen natural.

El término "soluble" significa la capacidad de una sustancia determinada, el soluto (un ejemplo en la presente invención es el oligómero $\text{A}\beta_{1-42}$) para disolverse en un disolvente. En el contexto de la presente invención, los

oligómeros A β solubles son capaces de fraccionarse por centrifugación.

El término "oligómero" se refiere a un complejo de proteínas de un número finito de subunidades monoméricas. En el contexto de la invención, los oligómeros se conocen como trímeros, polímeros de bajo n, dodecámeros (12-meros), y polímeros de n grande compuestos de péptidos A β ₁₋₄₂. El término "oligómero" no incluye las placas amiloides seniles.

El término "globular" significa un gran complejo de proteína soluble, que va de distinguirse de fibrillas y placas amiloides. Preferentemente, los intervalos de estructura globular de 4 nanómetros (nm) a aproximadamente 12 nm de tamaño, preferentemente, de aproximadamente 4,7 a aproximadamente 11 nm, que pueden observarse en el análisis de microscopio atómico (AFM) de fracciones sobrenadantes de preparados de oligómero A β ₁₋₄₂ soluble como se describe en la patente US nº 6.218.506.

La expresión "no fibrilar" significa los péptidos y complejos oligoméricos A β ₁₋₄₂ que no están alineados en un patrón morfológicamente distinto conocidos como protofibrillas amiloides o fibrillas amiloides.

El término "LDDA" se define convencionalmente como beta-amiloides derivadas de ligandos difundibles que tienen las siguientes características: péptidos A β ₁₋₄₂ neurotóxicos, no fibrilares, globulares, oligoméricos y solubles.

La expresión "sustancialmente puro" se define como sustancialmente exento de impurezas, como por ejemplo menos de 20% de impurezas. En una forma de realización, un compuesto es sustancialmente puro si contiene menos de 10% de impurezas y, en otra forma de realización, si contiene menos de 1% de impurezas.

Los compuestos descritos en la presente memoria son útiles en la inhibición, regulación y/o modulación del montaje de los LDDA *in vitro* o *in vivo*.

Los términos "enfermedad", "trastorno" y "afección" se utilizan inclusivamente y se refieren a cualquier afección mediada, al menos en parte por los LDDA. En el contexto de esta invención, la enfermedad puede estar relacionada con fibrillas amiloides insolubles, placas seniles, ovillos neurofibrilares y/o la sobreexpresión de la proteína β ₁₋₄₂ amiloide. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down, el deterioro cognitivo leve, apoplejía, demencia relacionada con la isquemia focal y degeneración neuronal. Los pacientes susceptibles de tratamiento incluyen las personas en situación de riesgo de la enfermedad, pero que no presentan síntomas, así como los pacientes que actualmente presentan síntomas. Por lo tanto, los compuestos descritos en la presente memoria pueden administrarse profilácticamente a la población general sin necesidad de ninguna evaluación del riesgo del paciente.

El término "paciente" se refiere a animales, incluyendo mamíferos, seres humanos y mamíferos no humanos. En determinadas formas de realización, un paciente es un animal, particularmente un animal seleccionado de entre una especie de mamífero incluyendo ratas, conejos, ganado bovino, ovino, porcino, felino, canino, murino, equino, y primates, particularmente seres humanos.

Los compuestos son especialmente útiles para las personas que tienen una situación de riesgo genético conocido de enfermedad de Alzheimer. Dichas personas incluyen aquellos que tienen parientes que han sido diagnosticados con la enfermedad y aquellos cuyo riesgo se determina por análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo para la enfermedad de Alzheimer incluyen mutaciones en el gen APP, particularmente mutaciones en la posición 717 y las posiciones 670 y 671 denominadas mutaciones de Hardy y Swedish, respectivamente. Otros marcadores de riesgo son las mutaciones en los genes de presenilina, PS1 y PS2, y ApoE4, antecedentes familiares de enfermedad de Alzheimer, hipercolesterolemia o aterosclerosis. Los individuos que padecen actualmente la enfermedad de Alzheimer pueden reconocerse por la demencia característica, así como la presencia de factores de riesgo descritos anteriormente. Además, una serie de pruebas de diagnóstico están disponibles para la identificación de individuos que tienen la enfermedad de Alzheimer. Éstas incluyen la medición de concentraciones de CSF tau y A β ₁₋₄₂. Los individuos que padecen la enfermedad de Alzheimer también pueden diagnosticarse por los criterios ADRDA o el procedimiento descrito en la presente memoria.

En los pacientes asintomáticos, el tratamiento puede comenzar a cualquier edad (por ejemplo, a los 10, 20, 30 años). Normalmente, sin embargo, no es necesario comenzar el tratamiento hasta que un paciente alcanza los 40, 50, 60 o 70 años. El tratamiento por lo general conlleva múltiples dosificaciones durante un período. El tratamiento se puede controlar analizando la presencia de LDDA a lo largo del tiempo.

"Tratar" o "tratamiento" de una enfermedad incluye: (1) prevenir la enfermedad, es decir, hacer que los síntomas clínicos de la enfermedad no se desarrollen en un paciente que puede estar expuesto o predispuesto a la enfermedad pero que todavía no experimenta ni presenta síntomas de la enfermedad, (2) inhibir la enfermedad, es decir, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o de sus síntomas clínicos; o (3) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o de sus síntomas clínicos.

El término "padecer", en cuanto que está relacionado con el término "tratamiento" se refiere a un paciente o individuo

que ha sido diagnosticado de una enfermedad o está predispuesto a ella. De un paciente también puede decirse que está "en situación de riesgo de padecer" una enfermedad. Este paciente no ha desarrollado aún la patología característica de la enfermedad, sin embargo se sabe que está predispuesto a la enfermedad debido a los antecedentes familiares, estando genéticamente predispuesto para desarrollar la enfermedad, o diagnosticado de una enfermedad o trastorno que los predispone a desarrollar la enfermedad que se va a tratar.

Además de la enfermedad de Alzheimer, se conocen varias otras enfermedades que están relacionadas con la formación de A β ₁₋₄₂ que incluyen, pero no se limitan a, síndrome de Down, apoplejía y deterioro cognitivo leve. Es concebible que al igual que la enfermedad de Alzheimer, es posible el tratamiento de pacientes que padecen o están en situación de riesgo de padecer estas enfermedades debido a los mecanismos paralelos de las enfermedades.

El término "placa senil" o "formación de la placa senil" se refiere al depósito extracelular de amiloide en la materia gris del cerebro. Los depósitos están relacionados con estructuras neuronales degenerativas. Se entiende que la placa senil es diferente de los LDDA y se distingue de los mismos.

Asimismo, la sobreexpresión de A β ₁₋₄₂ está relacionada con la demencia relacionada con la isquemia focal y la degeneración neuronal. La sobreexpresión de A β ₁₋₄₂ se cree que provoca acumulación de los LDDA, provocando de este modo neurotoxicidad. El tratamiento de un paciente que padece o está en situación de riesgo de padecer una de estas enfermedades mediante la administración de uno o más de los compuestos descritos en la presente memoria mejorará la neurotoxicidad de A β ₁₋₄₂ sobreexpresado.

El término "neurotoxicidad" se refiere al efecto tóxico de los LDDA sobre células neuronales ya sea *in vitro* y/o *in vivo*. Los LDDA se unen a receptores neuronales específicos que activan la señalización neuronal anómala, que pone en peligro la potenciación a largo plazo y produce insuficiencia de memoria. Por lo tanto, los LDDA alteran la función de las neuronas de tal manera que, aunque todavía viables, las neuronas no funcionan adecuadamente. Dicha funcionalidad alterada se denomina en la presente memoria "disfunción neuronal", que es una subclase de neurotoxicidad. La señalización persistente de LDDA provoca la transcripción anómala y la pérdida progresiva de sinapsis, y señalización persistente de LDDA a muy largo plazo y la patología estructural acumulada conduce a la eventual muerte de neuronas y la distrofia cerebral macroscópica.

En las aplicaciones terapéuticas, una composición farmacéutica que contiene uno o más compuestos descrita en la presente memoria se administra a un paciente que se sospecha, o que ya padece dicha enfermedad relacionada con la acumulación de LDDA, en la que dichos compuestos se administran en una cantidad suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad (bioquímicos histológicos y/o del comportamiento), incluyendo sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad. En aplicaciones profilácticas, una composición farmacéutica que contiene uno o más compuestos descritos en la presente memoria se administra a un paciente sensible a, o si no en situación de riesgo de, una enfermedad relacionada con la acumulación de LDDA, en la que dichos compuestos se administran en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad, o retrasar el comienzo de la enfermedad. Esto incluye los síntomas bioquímicos, histológicos y/o del comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad.

En algunos procedimientos, la administración del compuesto reduce o elimina el deterioro cognitivo leve en pacientes que aún no han desarrollado la patología de Alzheimer característica. En las formas de realización particulares, una cantidad terapéuticamente eficaz está destinada a indicar la cantidad de uno o más compuestos descritos en la presente memoria administrados o suministrados al paciente que lo más probable es que produzca la respuesta deseada al tratamiento. Una descripción más detallada de las formas de realización relativas a la función cognitiva mejorada se puede encontrar en la solicitud PCT/US2007/073410, presentada el 12 de julio de 2007, titulada "Methods of Enhancing Cognitive Function Using Non-Peptidic Compounds", Expediente nº 089265-1450.

Una "cantidad eficaz" es una cantidad de uno o más de los compuestos descritos en la presente memoria que trata la enfermedad mediada por LDDA. Preferentemente, los compuestos de la presente invención disminuirán la formación de LDDA ya sea *in vitro* o *in vivo* por lo menos 10%, 25%, 40%, 60%, 80%, 90% o 95% en comparación con la referencia.

La "cantidad terapéuticamente eficaz" variará dependiendo del compuesto, la enfermedad y su gravedad y la edad, peso, etc., del paciente que va a ser tratado, todo lo cual está dentro de la experiencia del médico adjunto. Se contempla que una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los compuestos descritos en la presente memoria alterará la formación de LDDA (incluyendo el inhibir o invertir la formación de los LDDA) en el paciente en comparación con la unión de los LDDA en ausencia de tratamiento. Como tal, se reduce el deterioro de la potenciación a largo plazo y la subsiguiente formación de la memoria. Una cantidad terapéuticamente eficaz es distinguible de una cantidad que tiene un efecto biológico (una "cantidad biológicamente eficaz"). Un compuesto de la presente invención puede tener uno o más efectos biológicos *in vitro* o incluso *in vivo*, tal como la reducción en la formación de LDDA en cierta medida. Un efecto biológico, sin embargo, puede no dar lugar a cualquier efecto terapéutico clínicamente mensurable como se describió anteriormente tal como se determina por métodos dentro de la experiencia del médico adjunto.

Una "célula neuronal" o "neurona" es una célula que transmite y procesa las señales en el cerebro o en otras partes del sistema nervioso. Además, una célula neuronal, tal como se emplea en la invención, se pueden aislar del tejido cerebral de animales y cultivarse en cultivos tisulares. Las células aisladas pueden estar compuestas de una estirpe celular neuronal creada seleccionada de, por ejemplo, pero sin limitarse a, MC65; HCN-2; SH-SY5Y, SK-N-AS, SK-N-FI; SK-N-DZ; H19-7/IGF-IR; QNR/D; QNR/K2; C8-D30; C8-S; C8-D1A; OLGA-PH-J/92; Daoy; RSC96; SW10; RT4-D6P2T; RN33B, PC-12; DBRTG-05MG; C8-B4; SK-N-SH; B35; R3 [33-10ras3]; Neuro-2A; y HCN-1A o cualesquiera de las variantes genéticas, químicas y/o bioquímicas modificadas de los mismos. Las células aisladas también pueden estar compuestas de células primarias y/o astrocitos aislados a partir de tejidos neuronales seleccionados de, por ejemplo, pero sin limitarse a, hipocampo; cerebelo; corteza cerebral; hipotálamo; mesencéfalo; médula espinal; cuerpo estriado; lóbulo frontal; lóbulo temporal; lóbulo parietal; lóbulo occipital y cualesquiera de las variantes genéticas, químicas y/o bioquímicas modificadas de los mismos. La célula animal aislada y cultivada puede estar compuesta de una célula madre neural o de cualquiera de las variantes diferenciadas, genéticas, químicas y/o bioquímicas modificadas de las mismas.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "tejido neuronal" se refiere a cualquier porción del sistema nervioso central incluyendo, pero sin limitarse a, el cerebro o la médula espinal. El tejido neuronal puede estar compuesto de, por lo menos en parte, células neuronales.

La expresión "fibrillas de amiloide" significa agregados de proteínas que comparten rasgos estructurales específicos. Las técnicas histopatológicas generalmente identifican las estructuras por birrefringencia verde manzana cuando se tiñen con rojo Congo y se observan bajo luz polarizada.

El término "ovillos", significa los ovillos neurofibrilares formados en el interior de las neuronas que se degeneran por la agrupación de filamentos helicoidales emparejados, que se ensamblan a partir de las formas hiperfosforiladas de la proteína asociada a microtúbulos conocida como tau.

B. Compuestos

Los compuestos útiles en la presente memoria son sustancialmente puros no peptídicos, y tienen un peso molecular inferior a 1.000. En una forma de realización, los compuestos útiles en la invención contienen preferentemente uno o más y cualquier combinación de las siguientes características: (1) de baja o submicromolar potencia cuando se probó en el ensayo de TERF descrito en la presente memoria, (2) sin agregación, (3) poca o ninguna toxicidad neuronal cuando se administra a un paciente, (4) solubilidad favorable en un ambiente acuoso, (5) tratable químicamente; (6) características dependientes de la dosis, (7) unión reversible a la proteína A β ; (8) capaz unirse al monómero β amiloide; (9) capaz de unirse a oligómeros β amiloides solubles.

En una forma de realización de la invención, los compuestos útiles para el tratamiento de pacientes son adecuados para administración oral. En esta forma de realización, los compuestos son compatibles con la regla del cinco de Lipinski que proporciona un criterio para evaluar la semejanza de fármacos. La norma establece que, en general, un fármaco activo por vía oral tiene: no más de 5 donantes de enlaces de hidrógeno (grupos OH y NH); no más de 10 receptores de enlaces de hidrógeno (principalmente N y O); un peso molecular inferior a 500 g/mol; y un coeficiente de reparto log *P* inferior a 5.

1. Selección de compuesto

Un método preferido de selección de compuestos para su utilización en la invención implica analizar los compuestos con transferencia de energía de resonancia fluorescente (TERF). La TERF se ha utilizado para medir, detectar, identificar, ensayar, analizar y caracterizar varias interacciones y procesos en sistemas biológicos (véase por ejemplo, Mitra *et al.* (1996) *Gene* 173:13-17; De Angelis (1999) *Physiol Genomics*. 21:93-99; Latif y Graves (2000) *Thyroid* 10(5):407-412; Rye (2001) *Methods* 24(3):278-288; Kenworthy (2001) *Methods* 24(3):289-296; Periasamy (2001) *J. Biomed Opt.* 6(3):287-291; Truong e Ikura (2001) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11(5):573-578; Zhang *et al.* (2002) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3(12):906-918; Sitte y Freissmuth (2003) *Eur. J. Pharmacol.* 479:229-236; Milligan (2004) *Eur. J. Pharm. Sci.* 21(4): 397-405; Herman *et al.* (2004) *Methods Mol. Biol.* 261:351-370; Roda *et al.* (2004) *Trends Biotechnol.* 22(6):295-303; Wallrabe y Periasamy (2005) *Curr. Opin. Biotechnol.* 16(1):19-27; Milligan y Bouvier (2005) *FEBS J.* 272(12):2914-2915; referencias en cualquiera de los anteriores).

Los métodos, protocolos, técnicas, ensayos TERF y similares se describen en general y específicamente en numerosas patentes y solicitudes de patente, incluyendo: patente US nº 6.908.769; patente US nº 6.824.990; patente US nº 6.762.280; patente US nº 6.689.574; patente US nº 6.661.909; patente US nº 6.642.001; patente US nº 6.639.078; patente US nº 6.472.156; patente US nº 6.456.734; patente US nº 6.376.257; patente US nº 6.348.322; patente US nº 6.323.039; patente US nº 6.291.201; patente US nº 6.280.981; patente US nº 5.914.245; patente US nº 5.661.035; referencias en cualquiera de los anteriores.

Asimismo, la polarización fluorescente (PF) también se ha utilizado para medir, detectar, identificar, ensayar, analizar y caracterizar varias interacciones y procesos en sistemas biológicos (véase, por ejemplo, Lundblad *et al.*

(1996) *Mol. Endocrinol.* 10(6):607-612; Nasir y Jolley (1999) *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2(4):177-190; Park y Raines (2004) *Methods Mol. Biol.* 261:161-166; referencias en cualquiera de los anteriores).

5 Los métodos, protocolos, técnicas, ensayos de polarización fluorescente (PF) y similares se describen en general y específicamente en numerosas patentes y solicitudes de patente, incluyendo: patente US nº 6.794.158; patente
 10 US nº 6.632.613; patente US nº 6.630.295; nº 6.596.546; patente US nº 6.569.628; nº 6.555.326; patente
 US nº 6.511.815; patente US nº 6.448.018; patente US nº 6.432.632; patente US nº 6.331.392; patente
 US nº 6.326.142; patente US nº 6.284.544; patente US nº 6.207.397; patente US nº 6.171.807; patente
 15 US nº 6.066.505; patente US nº 5.976.820; patente US nº 5.804.395; patente US nº 5.756.292; patente
 US nº 5.445.935; patente US nº 5.427.960; patente US nº 5.407.834; patente US nº 5.391.740; patente
 US nº 5.315.015; patente US nº 5.206.179; patente US nº 5.070.025; patente US nº 5.066.426; patente
 US nº 4.952.691; patente US nº 4.863.876; patente US nº 4.751.190; patente US nº 4.681.859; patente
 US nº 4.668.640; patente US nº 4.614.823; patente US nº 4.585.862; patente US nº 4.510.251; patente
 20 US nº 4.476.229; patente US nº 4.429.230; patente US nº 4.420.568; patente US nº 4.203.670; referencias en
 cualquiera de los anteriores.

Las TERF y PF se han utilizado en el campo de la investigación amiloide (véase, por ejemplo, patente
 US nº 6.927.401; patente US nº 6.906.104; patente US nº 6.905.827; patente US nº 6.881.546; patente
 20 US nº 6.864.290; patente US nº 6.864.103; patente US nº 6.858.383; patente US nº 6.846.813; patente
 US nº 6.828.106; patente US nº 6.803.188; patente US nº 6.770.448; patente US nº 6.713.276; patente
 US nº 6.600.017; patente US nº 6.515.113; patente US nº 6.495.664; patente US nº 6.323.039; patente
 US nº 6.294.330; patente US nº 6.280.981; patente US nº 6.197.928; patente US nº 5.981.200; Kim y Lee (2004)
 25 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316(2):393-397; Bacskai *et al.* (2003) *J. Biomed. Opt.* 8(3):368-375; Gorman, PM
et al. (2003) *J. Mol. Biol.* 325(4):743-757; Garzón-Rodrequez *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272(34):21037-21044;
 Lindgren *et al.* (2005) *Biophys. J.* 88(6):4200-4212; Lewis *et al.* (2004) *Neurobiol. Aging* 25(9):1175-1185; Leissring
et al. (2003) *J. Biol. Chem.* 278(39):37314-37320; Taylor *et al.* (2003) *J. Protein Chem.* 22(1):31-40; Allsop *et al.*
 (2001) *Biochem. Soc. Symp.* 67:1-14; Allsop *et al.* (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285(1):58-63; Huang *et al.*
 (2000) *J. Biol. Chem.* 275(46):36436-36440; referencias en cualquiera de los anteriores).

30 2. Aplicaciones de la TERF para descubrimiento del compuesto

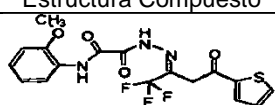
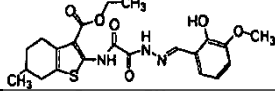
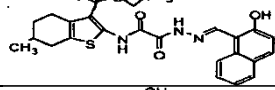
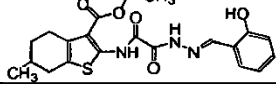
El ensayo TERF del Ejemplo 1 se utilizó en una variedad de bibliotecas de compuestos comercializados para
 evaluar la inhibición específica de la formación de oligómeros β_{1-42} amiloides solubles de cada compuesto. Se
 35 identificaron compuestos de plomo y se obtuvieron otras bibliotecas de compuestos. Además, se llevaron a cabo las
 relaciones de actividad de la estructura alrededor de los compuestos de plomo dando lugar a mejoras aún mayores
 en la actividad.

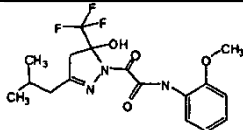

3. Compuestos para utilización en la invención

40 Se presentan a continuación en la Tabla 1 compuestos para su utilización en la presente invención.

También se proporciona en la tabla los valores CI_{50} de los compuestos como se prueba utilizando el ensayo descrito
 en el Ejemplo 1. En cada caso, los compuestos mencionados estaban comercializados o se sintetizaron a partir de la
 45 fuente indicada en la tabla. También hay que señalar que los siguientes compuestos pueden presentar
 estereoisometría (es decir, isómeros E y Z) y la invención contempla la utilización de cualquier isómero y mezclas de
 los mismos.

Tabla 1. Compuestos

nº	Estructura Compuesto	Denominación del compuesto	CI_{50} (μM)	Fuente
1.		N-(2-metoxi-fenil)-2-oxo-2-([N'-(3-oxo-3-tiofen-2-il-1-trifluorometil-prop-(Z)-ilideno]-hidrazino)-acetamida	3,9	deCODE
2.		éster etílico del ácido 2-([1-(2-hidroxi-3-metoxi-fenil)-met-(E)-iliden-hidrazinooxalil]-amino)-6-metil-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofeno-3-carboxílico	3,5	Aldrich
3.		éster etílico del ácido 2-([1-(2-hidroxinaftalen-1-il)-met-(E)-iliden-hidrazinooxalil]-amino)-6-metil-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofeno-3-carboxílico	4,4	Aldrich
4.		éster etílico del ácido 2-([1-(2-hidroxifenil)-met-(E)-iliden-hidrazinooxalil]-amino)-6-metil-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofeno-3-carboxílico	1,1	Aldrich

nº	Estructura Compuesto	Denominación del compuesto	Cl ₅₀ (µM)	Fuente
5.		2-(5-hidroxi-3-isobutil-5-(trifluorometil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)-N-(2-metoxifenil)-2-oxoacetamida	3,2	ChemDiv
6.		(E)-2-hidroxi-N'-((1-hidroxinaftalen-2-il)metil)benzohidrazida	3,8	deCODE

C. Pruebas y administración

5 Las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de las enfermedades descritas anteriormente, varían dependiendo de diferentes factores, incluyendo medios de administración, estado fisiológico del paciente, si el paciente es un ser humano o un animal, de otras medicaciones administradas, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Normalmente, el paciente es un ser humano, pero en determinadas formas de realización, un paciente es un animal, particularmente un animal seleccionado de una especie de mamífero incluyendo ratas, conejos, ganado bovino, ganado ovino, ganado porcino, canino, felino, murino, equino y primates.

10 Los compuestos pueden administrarse en múltiples ocasiones, en las que los intervalos entre las dosis individuales puede ser a diario, semanalmente, mensualmente o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica midiendo las concentraciones en sangre de proteína Aβ₁₋₄₂ o LDDA, o complejos de LDDA en el paciente. Alternativamente, pueden administrarse uno o más de los compuestos de la invención como una formulación de liberación lenta, en cuyo caso se requiere administración menos frecuente. La dosis y frecuencia puede variar dependiendo de la vida media de los compuestos de la invención. En aplicaciones terapéuticas, se requiere a veces una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que la evolución de la enfermedad se reduce o termina, y preferentemente hasta que el paciente presenta mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, puede administrarse al paciente un régimen profiláctico.

20 La administración de una composición farmacéutica de uno o más compuestos descritos en la presente memoria puede llevarse a cabo por una variedad de vías incluyendo, pero sin limitarse a, oral, tópica, pulmonar, rectal, subcutánea, intradérmica, intranasal, inyección intracraneal, intramuscular, intraocular, o intrarticular y similares. La vía de administración más típica es la oral, aunque otras vías pueden ser igualmente eficaces.

25 Uno o más compuestos descritos en la presente memoria pueden administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes biológicos o químicos que son al menos parcialmente eficaces en el tratamiento de una enfermedad relacionada con Aβ₁₋₄₂. Un ejemplo de dicho agente es, pero no se limita a, anticuerpos dirigidos contra Aβ₁₋₄₂ tal como se describe en la solicitudes internacionales WO 2003/253673, WO 2006/014478, patente US nº 2.489.195, publicación US nº 2007-0048312, y la solicitud US 11/571.532.

30 Los compuestos descritos en la presente memoria se pueden administrar a un paciente en una cantidad suficiente para inhibir, regular y/o modular la formación de LDDA neurotóxicos o la actividad de tales ligandos en dicho paciente. Un médico experto sería capaz de determinar fácilmente las cantidades apropiadas de los compuestos descritos en este documento para inhibir, regular y/o modular de forma eficaz la formación de LDDA neurotóxicos o la actividad de tales ligandos en dicho paciente. Las cantidades contempladas de los compuestos descritos en la presente memoria incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, de aproximadamente 0,05 a 2000 mg/m²/día de un compuesto o de más de un compuesto.

35 Como se expuso anteriormente, los compuestos descritos en la presente memoria pueden administrarse, por ejemplo, pero no se limitan a, por vía oral, tópica, pulmonar, rectal, subcutánea, intradérmica, intranasal, intracraneal, intramuscular, intraocular, o intrarterial y similares. El portador o excipiente o mezcla de excipientes puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, pero no se limitan a, varios disolventes polares o apolares, mezclas adecuadas de los mismos, o aceites. Como se emplea en la presente memoria, "portador" o "excipiente" significa un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable e incluye cualquier y todos los disolventes, agentes o medios dispersantes, recubrimiento(s), agentes antimicrobianos, agentes iso/hipo/hipertónicos, agentes modificadores de la absorción y similares. La utilización de dichas sustancias y de los agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocida en la técnica. Además, otro de los principios activos complementarios se puede incorporar también en la composición final.

50 Las enfermedades que se tratan por los procedimientos descritos en la presente memoria incluyen la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down, la apoplejía, el deterioro cognitivo leve, la demencia relacionada con la isquemia focal y la degeneración neuronal.

D. Formulaciones farmacéuticas y vías de administración

5 Cuando se emplean como productos farmacéuticos, los compuestos de la presente invención se administran normalmente en forma de composiciones farmacéuticas. Estos compuestos se pueden administrar por varias vías incluyendo la oral, tópica, pulmonar, rectal, subcutánea, intradérmica, intranasal, intracraneal, intramuscular, intraocular, o inyección intrarticular. Estos compuestos son eficaces como composiciones tanto inyectables como orales. Tales composiciones se preparan de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica y comprenden por lo menos un compuesto activo.

10 La presente invención también incluye composiciones farmacéuticas que contienen, como principio activo, uno o más de los compuestos descritos en la presente memoria relacionados con portadores farmacéuticamente aceptables. Al preparar las composiciones de esta invención, el principio activo normalmente se mezcla con un excipiente, se diluye con un excipiente o está contenido dentro de dicho portador que puede estar en la forma de cápsula, bolsita, papel u otro recipiente. El excipiente empleado es normalmente un excipiente adecuado para la
 15 administración a los pacientes. Cuando el excipiente sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido, o líquido, que actúa como un vehículo, portador o medio para el principio activo. Por consiguiente, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, pastillas, sobres, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (en forma sólida o en un medio líquido), ungüentos que contienen, por ejemplo, hasta 10% en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, soluciones
 20 inyectables estériles, y polvos envasados estériles.

25 En la preparación de una formulación, puede ser necesario moler el compuesto activo para proporcionar el tamaño de partícula apropiado antes de combinarlo con los demás ingredientes. Si el compuesto activo es sustancialmente insoluble, normalmente se muele hasta un tamaño de partícula inferior a 200 mesh. Si el compuesto activo es sustancialmente soluble en agua, el tamaño de partícula se ajusta normalmente mediante molienda para proporcionar una distribución sustancialmente uniforme en la formulación, por ejemplo aproximadamente 40 mesh.

30 Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábica, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polividona, celulosa, agua, jarabe y metilcelulosa. Las formulaciones pueden incluir además: agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes y de suspensión; agentes conservantes tales como metil- y propilhidroxi-benzoatos; agentes edulcorantes; y agentes aromatizantes. Las composiciones de la invención pueden formularse de manera que proporcionen una liberación rápida, mantenida o retardada del principio activo tras la administración al paciente empleando procedimientos conocidos en
 35 la técnica.

40 La administración de agentes terapéuticos mediante formulación intravenosa se conoce bien en la industria farmacéutica. Una formulación intravenosa debe poseer ciertas cualidades aparte de ser sólo una composición en la que el agente terapéutico es soluble. Por ejemplo, la formulación debería favorecer la estabilidad general del principio o principios activos, también, la preparación de la formulación debe ser rentable. Todos estos factores determinan en última instancia el éxito y la utilidad total de una formulación intravenosa.

45 Otros aditivos accesorios que pueden incluirse en formulaciones farmacéuticas de los compuestos de la presente invención son los siguientes: disolventes: etanol, glicerol, propilenglicol; estabilizantes: ácido etilendiamintetraacético (EDTA), ácido cítrico; conservantes antimicrobianos: alcohol bencílico, metilparabeno, propilparabeno; agentes tamponantes: ácido cítrico/citrato de sodio, tartrato ácido de potasio, tartrato ácido de sodio, ácido acético/acetato sódico, ácido maleico/maleato sódico, ftalato ácido de sodio, ácido fosfórico/fosfato dibásico de potasio, ácido fosfórico/fosfato ácido disódico; y modificadores de tonicidad: cloruro de sodio, manitol y dextrosa.

50 La presencia de un tampón puede ser necesaria para mantener el pH acuoso en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 8 y más preferentemente en un intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 6. El sistema de tampón es generalmente una mezcla de un ácido débil y una sal soluble del mismo, por ejemplo, citrato sódico/ácido cítrico, o la sal monocatiónica o dicatiónica de un ácido dibásico, por ejemplo, tartrato ácido de potasio; tartrato ácido de sodio, ácido fosfórico/fosfato diácido de potasio y ácido fosfórico/fosfato ácido disódico.

55 La cantidad de sistema tampón utilizado depende de (1) el pH deseado, y (2) la cantidad de fármaco. Generalmente, la cantidad de tampón usada se encuentra en una relación molar de 0,5:1 a 50:1 de tampón:fármaco (en la que los moles de tampón se consideran los moles combinados de los ingredientes tampón, por ejemplo, citrato de sodio y ácido cítrico) de formulación para mantener un pH en el intervalo de 4 a 8 y, en general, se utiliza una relación molar
 60 1:1 a 10:1 de tampón (combinado) a fármaco presente.

Un tampón útil en la invención es el citrato de sodio/ácido cítrico en el intervalo de 5 a 50 mg por ml de citrato de sodio a 1 a 15 mg por ml de ácido cítrico, suficiente para mantener un pH acuoso de 4 a 6 de la composición.

65 El agente tamponante también puede estar presente para evitar la precipitación del fármaco mediante la formación de complejo metálico soluble con iones metálicos disueltos, por ejemplo, Ca, Mg, Fe, Al, Ba, que pueden lixiviarse

de envases de vidrio o tapones de caucho o estar presentes en el agua de grifo corriente. El agente puede actuar como un agente complejante competitivo con el fármaco y producir un complejo metálico soluble que conduce a la presencia de partículas no deseadas.

5 Además, la presencia de un agente, por ejemplo, cloruro de sodio en una cantidad de alrededor de 1 a 8 mg/ml, para
ajustar la tonicidad al mismo valor de la sangre humana puede ser necesaria para evitar la hinchazón o contracción
de los eritrocitos en la administración de la formulación intravenosa que conduce a efectos secundarios indeseables
tales como náuseas o diarrea y posiblemente a trastornos sanguíneos relacionados. En general, la tonicidad de la
10 formulación coincide con el de la sangre humana que está en el intervalo de 282 a 288 mOsm/kg, y en general es de
285 mOsm/kg, que es equivalente a la presión osmótica correspondiente a una solución al 0,9% de cloruro de sodio.

La formulación intravenosa puede administrarse por inyección intravenosa directa, i.v. a emboladas, o se puede
administrar por infusión mediante la adición a una solución de infusión apropiada tal como inyección de cloruro
sódico al 0,9% u otra solución de infusión compatible.

15 Las composiciones pueden formularse en forma de dosis unitaria oral. La expresión "formas de dosis unitarias" se
refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para un paciente, que contienen cada
unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, junto
con un excipiente farmacéutico adecuado.

20 El compuesto activo es eficaz en un amplio intervalo de dosis y se administra generalmente en una cantidad
farmacéuticamente eficaz. Debe entenderse, sin embargo, que la cantidad del compuesto realmente administrada
será determinada por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes, incluyendo la afección que ha de tratarse,
la vía de administración elegida, el compuesto real administrado, la edad, peso y respuesta de cada paciente, la
25 gravedad de los síntomas del paciente, y similares.

Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, el principio activo principal se mezcla con un
excipiente farmacéutico para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea
de un compuesto de la presente invención. Cuando hace referencia a estas composiciones de preformulación como
30 homogéneas, significa que el principio activo se dispersa uniformemente por toda la composición de manera que la
composición puede subdividirse fácilmente en formas farmacéuticas unitarias igualmente eficaces tales como
comprimidos, píldoras y cápsulas. Esta preformulación sólida se subdivide a continuación en formas farmacéuticas
unitarias del tipo descrito anteriormente que contienen de, por ejemplo, 0,05 a aproximadamente 2.000 mg del
principio activo de la presente invención.

35 Los comprimidos o píldoras de la presente invención pueden estar recubiertos o sino combinados para proporcionar
una forma farmacéutica que proporcione la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora
puede constar de un componente para administración interna y un componente para administración externa, estando
este último en forma de una envoltura sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa
40 entérica que sirve para resistir la disgregación en el estómago y permite que el componente interno pase intacto al
duodeno o que se retrase su liberación. Una variedad de materiales pueden utilizarse para dichas capas o
recubrimientos entéricos, incluyendo dichos materiales una serie de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos
poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

45 Las formas líquidas en las que se pueden incorporar las nuevas composiciones de la presente invención para la
administración por vía oral o por inyección incluyen jarabes adecuadamente aromatizados en soluciones acuosas,
suspensiones acuosas u oleosas, y emulsiones aromatizadas con aceites comestibles tales como aceite de semillas
de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco, o aceite de cacahuete, así como elixires y vehículos farmacéuticos
similares.

50 Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en disolventes acuosos u
orgánicos, farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas
pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se ha descrito anteriormente.
Preferentemente, las composiciones se administran por la vía respiratoria oral o nasal para un efecto local o general.
55 Las composiciones en disolventes con preferencia farmacéuticamente aceptables se pueden nebulizar mediante el
uso de gases inertes. Las soluciones nebulizadas pueden inhalarse directamente desde el dispositivo nebulizador o
el dispositivo nebulizador puede estar acoplado a una mascarilla facial o a una máquina de respiración a presión
positiva intermitente. Las composiciones en solución, suspensión o polvo pueden administrarse, preferentemente por
vía oral o nasal, desde dispositivos que suministran la formulación de una manera apropiada.

60 Los siguientes ejemplos de formulación ilustran las composiciones farmacéuticas que se contemplan de la presente
invención.

65 **Ejemplo de formulación 1**

Se preparan cápsulas de gelatina dura que contienen los siguientes ingredientes:

Ingrediente	Cantidad (mg/cápsula)
Principio activo	30,0
Almidón	305,0
Estearato de magnesio	5,0

Los ingredientes anteriores se mezclan y se rellenan en cápsulas de gelatina dura en cantidades de 340 mg

5 **Ejemplo de formulación 2**

Se prepara una fórmula de comprimido utilizando los siguientes ingredientes:

Ingrediente	Cantidad (mg/comprimido)
Principio activo	25,0
Celulosa, microcristalina	200,0
Dióxido de silicio coloidal	10,0
Ácido esteárico	5,0

10 Los componentes se mezclan y comprimen para formar comprimidos, pesando cada uno 240 mg.

Ejemplo de formulación 3

Se prepara una formulación de inhalador de polvo seco que contiene los siguientes componentes:

15

Ingrediente	% en peso
Principio activo	5
Lactosa	95

El principio activo se mezcla con la lactosa y la mezcla se añade a un dispositivo de inhalación de polvo seco.

Ejemplo de formulación 4

20

Se preparan comprimidos, conteniendo cada uno 30 mg de principio activo, de la forma siguiente:

Ingrediente	Cantidad (mg/comprimido)
Principio activo	30,0 mg
Almidón	45,0 mg
Celulosa microcristalina	35,0 mg
Polividona	4,0 mg
(como solución al 10% en agua esterilizada)	
Carboximetil almidón sódico	4,5 mg
Estearato de magnesio	0,5 mg
Talco	1,0 mg

25 El principio activo, el almidón y la celulosa se pasan a través de un tamiz nº 20 mesh US y se mezcla a fondo. La solución de polividona se mezcla con los polvos resultantes, que se pasan a continuación a través de un tamiz nº 16 mesh US. Los gránulos producidos de este modo se secan entre 50°C y 60°C y se pasan a través de un tamiz nº 16 mesh US. El carboximetil almidón sódico, el estearato de magnesio, y el talco, se pasan previamente a través de un tamiz nº 16 mesh U.S, se añaden a continuación a los gránulos que, después de mezclar, se comprimen en una máquina de comprimidos para producir comprimidos que pesan cada uno 120 mg.

30

Ejemplo de formulación 5

Se preparan cápsulas, que contienen cada una 40 mg de medicamento, de la forma siguiente:

Ingrediente	Cantidad (mg/cápsula)
Principio activo	40,0 mg
Almidón	109,0 mg
Estearato de magnesio	1,0 mg
Total	150,0 mg

35

El principio activo, el almidón y estearato de magnesio se mezclan, se pasan a través de un tamiz nº 20 mesh US y se rellenan en cápsulas de gelatina dura en cantidades de 150 mg.

Ejemplo de formulación 6

Se preparan supositorios, que contienen cada uno 25 mg de principio activo, de la forma siguiente:

Ingrediente	Cantidad
Principio activo	25 mg
Glicéridos de ácidos grasos saturados hasta	2.000 mg

5

El principio activo se pasa por un tamiz nº 60 mesh US y se pone en suspensión en los glicéridos de ácidos grasos saturados previamente fundidos utilizando el calor mínimo necesario. La mezcla se vierte luego en un molde de supositorios de 2,0 g de capacidad nominal y se deja enfriar.

Ejemplo de formulación 7

Se preparan suspensiones, que contienen cada una 50 mg de medicamento por cada 5,0 ml de dosis de la forma siguiente:

Ingrediente	Cantidad
Principio activo	50,0 mg
Goma de xantano	4,0 mg
Carboximetilcelulosa de sodio (11%)	
Celulosa microcristalina (89%)	50,0 mg
Sacarosa	1,75 g
Benzoato sódico	10,0 mg
Aroma y color	c.s.
Agua purificada hasta	5,0 ml

15

El principio activo, la sacarosa y la goma de xantano se mezclan, se pasan a través de un tamiz nº 10 mesh US, y a continuación se mezclan con una solución previamente preparada de celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa de sodio en agua. El benzoato de sodio, saborizante y colorante se diluyen con algo de agua y se añaden con agitación. A continuación se añade agua suficiente para producir el volumen requerido.

20

Ejemplo de formulación 8

Ingrediente	Cantidad (mg/cápsula)
Principio activo	5,0 mg
Almidón	407,0 mg
Estearato de magnesio	3,0 mg
Total	425,0 mg

El principio activo, el almidón y el estearato de magnesio se mezclan, se pasan a través de un tamiz nº 20 mesh US y se rellenan en cápsulas de gelatina dura en cantidades de 425,0 mg.

25

Ejemplo de formulación 9

Una formulación subcutánea se puede preparar de la forma siguiente:

30

Ingrediente	Cantidad
Principio activo	5,0 mg
Aceite de maíz	1,0 ml

Ejemplo de formulación 10

Una formulación intravenosa puede prepararse de la forma siguiente:

35

Ingrediente	Cantidad
Principio activo	250 mg
Solución salina isotónica	1.000 ml

40

Otra formulación empleada en los procedimientos de la presente invención emplea dispositivos de administración transdérmica ("parches"). Dichos parches transdérmicos pueden utilizarse para proporcionar infusión continua o discontinua de los compuestos de la presente invención en cantidades controladas. La construcción y utilización de parches transdérmicos para la administración de agentes farmacéuticos es bien conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, patente US nº 5.023.252, publicada el 11 de junio 1991, incorporada en la presente memoria como referencia. Dichos parches pueden construirse para la administración continua, pulsátil o según demanda de agentes farmacéuticos.

5 Frecuentemente, será deseable o necesario introducir la composición farmacéutica en el cerebro, ya sea directa o indirectamente. Las técnicas directas normalmente implican la colocación de un catéter de suministro de fármaco en el sistema ventricular del anfitrión para evitar la barrera sangre-cerebro. Uno de dichos sistemas de suministro implantable empleado para el transporte de factores biológicos a regiones anatómicas específicas del cuerpo se describe en la patente US nº 5.011.472.

10 Las técnicas indirectas, normalmente implican formular las composiciones para proporcionar la latencia del fármaco mediante la conversión de fármacos hidrófilos en fármacos liposolubles. La latencia se consigue generalmente mediante el bloqueo de los grupos hidroxilo, carbonilo, sulfato y amina primaria presentes en el fármaco para hacer al fármaco más liposoluble y susceptible al transporte a través de la barrera sangre-cerebro. Alternativamente, el suministro de fármacos hidrófilos se puede potenciar por infusión intrarterial de soluciones hipertónicas, que pueden abrir transitoriamente la barrera sangre-cerebro.

15 Otras formulaciones adecuadas para su utilización en la presente invención se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA., 17^a ed. (1985).

20 Como se expuso anteriormente, los compuestos descritos en la presente memoria son adecuados para su uso en una variedad de sistemas de suministro de fármacos descritos anteriormente. Además, con el fin de mejorar la vida media en el suero *in vivo* del compuesto administrado, los compuestos pueden encapsularse, introducirse en el lumen de liposomas, prepararse como un coloide, o pueden emplearse otras técnicas convencionales que proporcionan una vida media prolongada en el suero de los compuestos. Una variedad de procedimientos están disponibles para preparar liposomas, como se describe en, por ejemplo, Szoka, *et al.*, patentes US nº 4.235.871, nº 4.501.728 y nº 4.837.028.

25 En aplicaciones profilácticas, las composiciones se administran a un paciente en situación de riesgo de desarrollar la EA (determinado por ejemplo por cribado genético o rasgo familiar) en una cantidad suficiente para inhibir la aparición de los síntomas de la enfermedad. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "dosis profilácticamente eficaz". Las cantidades eficaces para esta utilización dependerán del criterio del médico responsable dependiendo de factores tales como la edad, el peso y el estado general del paciente.

30 Como se expuso anteriormente, los compuestos administrados a un paciente están en forma de composiciones farmacéuticas descritas anteriormente. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales, o pueden filtrarse de forma esterilizante. Las soluciones acuosas resultantes pueden ser envasadas para uso como tales, o liofilizadas, estando combinada la preparación liofilizada con un vehículo acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones del compuesto por lo general estará entre 3 y 11, más preferentemente entre 5 y 9 y aún más preferentemente entre 7 y 8. Debe entenderse que el empleo de algunos de los excipientes, portadores o estabilizantes anteriores darán como resultado la formación de sales farmacéuticas.

40 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la presente invención y no deben interpretarse en modo alguno que limitan el alcance de la presente invención. A menos que se indique lo contrario, todas las temperaturas están en grados Celsius.

45 Ejemplos

La invención se comprenderá mejor haciendo referencia a los siguientes ejemplos.

En estos ejemplos y en otras partes, las abreviaturas tienen los siguientes significados:

50 µl = microlitro
 DMSO = dimetilsulfóxido
 g = gramo
 h = hora
 Hz = hercio
 55 M = Molar
 mg = miligramos
 min = minuto
 ml = mililitro
 mM = milimolar
 60 mm = milímetros
 mmol = milimolar
 mol = moles
 MS = espectroscopia de masas
 N = Normal
 65 nm = nanómetros
 µM = micromolar

Ejemplo 1Ensayo de TERF

5 La Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente (TERF) (o Förster) es una transferencia de energía no radiactiva, dependiente de la distancia, en la que la desexcitación de un fluoróforo (donante) se acopla a la excitación de otro fluoróforo (receptor). La TERF se produce si (1) el cuanto de energía emitida por un fluoróforo donante corresponde a la energía de excitación de un fluoróforo receptor, (2) las orientaciones de los dipolos de transición donante y receptor son casi paralelas y (3) el espectro de emisión fluorescente del donante se superpone al espectro de absorción del receptor.

15 En este ensayo, el montaje de formación de oligómeros A β ₁₋₄₂ se sigue por TERF utilizando conjugados con terminal N de fluoresceína-A β ₁₋₄₂ ya que tanto el fluoróforo donante como el receptor (fluoresceína-fluoresceína R_o ~ 45 Å). Los monómeros A β ₁₋₄₂ que se montan en especies oligoméricas producen una disminución de la fluorescencia a medida que los péptidos A β ₁₋₄₂ marcados con fluoresceína llegan a estar próximos entre sí y aumenta la eficacia de TERF. La inhibición de montaje de A β ₁₋₄₂ se observa como la ausencia o atenuación de extinción de la fluoresceína.

20 Los ensayos de TERF y PF se llevan a cabo en, placas de microvaloración negras, opacas, Corning Non-Binding Surface, de 384 pocillos y el tampón de ensayo consiste en MOPS-Tris 50 mM (pH 8,0) con MgCl₂ 100 mM. El volumen de ensayo, que contiene FITC-A β (1-42) 0,2 μ M y A β (1-42) 0,8 μ M, es de 50 μ l y la temperatura es de 37°C. El montaje de LDDA se controla en un lector de placas Tecan GENios Pro, excitándose a una longitud de onda de 485 nm y detectando la emisión a una longitud de onda de 515 nm. Los huellas cinéticas se recogen registrando la intensidad de fluorescencia y las lecturas de polarización cada cinco minutos durante alrededor de tres a alrededor de un periodo de seis horas. Las reacciones de referencia negativa, que no se ensamblan apreciablemente en LDDA durante este tiempo, carecen de MgCl₂, pero contienen todos los demás componentes tamponantes y peptídicos. Las reacciones de referencia positiva contienen todos los componentes del tampón en ausencia de pequeñas moléculas o reactivos de anticuerpos añadidos. Para la prueba de inhibición de montaje de LDDA, el compuesto no peptídico se incubó con la mezcla de péptidos a seis concentraciones desde aproximadamente 30 μ M disminuyendo hasta aproximadamente 0,05 μ M.

35 Utilizando el ensayo descrito anteriormente con las condiciones de: el compuesto de ensayo A que oscila entre 0,05 y 3 mM, el compuesto de ensayo A presenta inhibición dependiente de la dosis del montaje del oligómero A β ₁₋₄₂, como se muestra en la figura 1. El compuesto de ensayo A aparece como compuesto 4 de la Tabla 1. Además, el compuesto B de ensayo ensayado a una concentración de 30 μ M muestra sólo la inhibición de montaje parcial en concentraciones muy altas (figura 1). Los ejemplos de otros compuestos que tienen un peso molecular inferior a 1.000 y actividad necesaria como los analizados en este ensayo se encuentran en la Tabla 1.

Ejemplo 2Ejemplo comparativo de supuesto bloqueador de montaje de A β

45 Utilizando el ensayo de TERF descrito anteriormente, varios compuestos originalmente desarrollados como bloqueadores fibrilares amiloides se probaron para el bloqueo de montaje del monómero A β ₁₋₄₂ en oligómeros de A β . Los compuestos probados incluyen, Alzhemed™ (Neurochem), escilo-inositol conocido también como AZD-103 (Ellipsis), SP-235 (Samaritan), benzofuranos (GE), 9-acridinonas (Warner-Lambert), ciclodextrinas (University of Illinois, Chicago), RS-406 (Sankyo), Clioquinol (Prana) y Curcumina (UCLA/UCI). Se utilizaron las condiciones de ensayo estándar TERF descritas en el Ejemplo 1. La incapacidad del compuesto Alzhemed para inhibir el montaje del monómero A β ₁₋₄₂ en oligómeros de A β se muestra en la figura 2. Estos resultados son representativos de todos los compuestos mencionados anteriormente, que fueron desarrollados originalmente como bloqueadores de amiloides fibrilares.

Ejemplo 3Modelo de rata con relación alternativa cíclica de palanca

55 Las preparaciones de los LDDA de A β ₁₋₄₂ y un potencial compuesto terapéutico conforme al modelo de rata con relación alternativa cíclica de palanca (ALCR) de EA se prueban para demostrar la eficacia *in vivo*. Este modelo muy sensible ha sido capaz de detectar deficiencias cognitivas debidas a la inyección directa de oligómeros de A β procedentes de células en el cerebro de rata. Utilizando esta técnica, puede probarse una inyección directa de los LDDA preparados a partir de A β ₁₋₄₂ sintético y un supuesto compuesto terapéutico conforme al procedimiento ALCR.

65 La prueba ALCR ha demostrado ser mucho más sensible que los procedimientos previamente publicados para medir los efectos de los fármacos en la función cognitiva. En esta tarea, las ratas tienen que aprender una secuencia compleja de requisitos de pulsación de la palanca a fin de conseguir refuerzos comida en una cámara experimental con dos palancas. Los sujetos deben alternar entre dos palancas cambiando a la otra palanca después de pulsar la

primera palanca lo suficiente para obtener recompensa de comida. El número exacto de pulsaciones necesarias para cada recompensa de comida cambia, en primer lugar aumentando desde 2 respuestas por alimento granulado hasta 56 pulsaciones por alimento granulado, volviendo a reducir a continuación a 2 respuestas por granulado. Los valores intermedios se basan en la función cuadrática, x^2-x . Un ciclo es una secuencia entera ascendente y descendente de estos requisitos de pulsación de la palanca (por ejemplo, 2, 6, 12, 20, 30, 42, 56, 56, 42, 30, 20, 12, 6 y 2 pulsaciones para recompensa de comida). Seis de dichos ciclos completos se presentan durante cada sesión diaria. Se puntúan los errores cuando el sujeto persevera en una palanca después de pulsar lo suficiente para obtener la recompensa de comida, es decir, sin alternar (error de perseverancia), o cuando un sujeto cambia de palanca, interruptores antes de completar el requisito de respuesta en esa palanca (error de estrategia).

10 Materiales y procedimientos

15 Se disuelve polvo de A β ₁₋₄₂ sintético en 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (HFIP) para proporcionar una solución de A β ₁₋₄₂ en HFIP de aproximadamente 1 mM y se deja incubar a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 h. La solución resultante se enfría en hielo durante unos 5 a 10 minutos, a continuación se colocan alícuotas en tubos eppendorf para proporcionar aproximadamente 50 μ l de solución por cada tubo. Los tubos se colocan a continuación en una campana de extracción de humos y se deja reposar durante la noche para permitir que el HFIP se evapore bajo una corriente lenta de nitrógeno. Para eliminar las trazas finales de HFIP, los tubos se someten a dos ciclos Speedvac de 15 min a temperatura ambiente y aproximadamente 15 a 25 mm Hg de vacío. Las películas resultantes de péptido A β ₁₋₄₂ monomerizado se almacenan sobre desecante a -80°C hasta su utilización.

25 Un tubo de péptido A β ₁₋₄₂ monomerizado se calienta a temperatura ambiente y el péptido A β ₁₋₄₂ se disuelve en DMSO anhidro para proporcionar una solución madre del péptido en DMSO que contiene aproximadamente 10 μ M a aproximadamente 100 μ M de péptido A β ₁₋₄₂ en DMSO.

30 Se añaden 2 μ l de una solución madre 20 mM del compuesto de ensayo en DMSO anhidro a aproximadamente 998 μ l de medio basal neural (exento de fenol rojo, Gibco 12348-017) para proporcionar una solución del compuesto en medio basal neural que contiene 40 μ M de compuesto de ensayo en medio basal neural.

35 Para el tratamiento sólo con péptido A β ₁₋₄₂, se añade la solución madre del péptido en DMSO a la solución de medio basal neuronal a 37°C para obtener el requisito de concentración de monómero del péptido A β ₁₋₄₂, con tal que la concentración máxima de DMSO sea del 1% o menos, y el tubo se agita con vórtice durante 30 a 60 segundos, se centrifuga brevemente en una microcentrifugadora y se incuba a 37°C durante 15 min antes del comienzo de las inyecciones.

40 Para el tratamiento con péptido A β ₁₋₄₂ más el compuesto de ensayo, se añade la solución madre del péptido en DMSO a la solución de medio basal neuronal a 37°C para obtener el requisito de concentración de monómero del péptido A β ₁₋₄₂, con tal que la concentración máxima de DMSO sea del 1% o menos, y el tubo se agita con vórtice durante 30 a 36 segundos, se centrifuga brevemente en una microcentrifugadora y se incuba a 37°C durante 15 min antes al comienzo de las inyecciones.

45 Para las inyecciones de referencia, la solución del compuesto en medio basal neural se incuba a 37°C durante 15 min antes del inicio de las inyecciones.

50 Ratas: Se entrenan ratas bajo ALCR hasta que sus índices de error son estables. Una vez que las ratas están situadas en el procedimiento ALCR final, las sesiones de entrenamiento se llevan a cabo 7 días cada semana hasta el final del estudio.

Intervención quirúrgica: Todas las ratas reciben una sola cánula 28 ga, que está permanentemente fijada al cráneo, y dirigida al ventrículo lateral. La mitad de las ratas reciben la cánula en el ventrículo derecho y la otra mitad reciben la cánula en el ventrículo izquierdo. Se deja a las ratas 5 días para que se recuperen de la intervención quirúrgica antes de reanudar los entrenamientos.

55 Inyección del material de ensayo y pruebas ALCR: Se realizan pruebas aproximadamente cada cuatro días. Los animales recibieron una inyección de 20 μ l de soluciones de referencia, péptido o péptido más compuesto, a través de la cánula implantada durante aproximadamente 3 a 4 minutos. Se realizan pruebas con los animales aproximadamente 3 horas después de la inyección.

60 Análisis del índice de error: Todos los índices de error menores se compararán con los índices de error de referencia que consisten en por lo menos 3 días sin tratamiento contiguos en el tiempo a la inyección. La prueba de la t de Student de inferencia estadística se utilizó para el análisis de los efectos.

Resultados contemplados

65 Se contempla que un aumento significativo en el índice de error de perseverancia se encontrará entre los índices de error de referencia y los índices de error producidos por los LDDA de A β ₁₋₄₂. También se contempla que la adición

de uno o más de los compuestos descritos en la presente memoria no va a aumentar los índices de error cuando se administran solos, pero cuando se combina con los LDDA de $A\beta_{1-42}$, el/los compuesto(s) eliminará(n) el aumento de los errores de perseverancia. Por lo tanto, se contempla que al menos uno o más de los compuestos descritos en la presente memoria auxiliarán los errores producidos por los LDDA de $A\beta_{1-42}$.

5

REIVINDICACIONES

1. Compuesto seleccionado de entre el grupo constituido por

5 N-(2-metoxi-fenil)-2-oxo-2-{N'-[3-oxo-3-tiofen-2-il-1-trifluorometil-prop-(Z)-ilideno]-hidrazino}-acetamida;
éster etílico del ácido 2-[[1-(2-hidroxi-3-metoxi-fenil)-met-(E)-iliden-hidrazinooxalil]-amino]-6-metil-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofeno-3-carboxílico;

10 éster etílico del ácido 2-[[1-(2-hidroxinaftalen-1-il)-met-(E)-iliden-hidrazinooxalil]-amino]-6-metil-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofeno-3-carboxílico;

éster etílico del ácido 2-[[1-(2-hidroxifenil)-met-(E)-iliden-hidrazinooxalil]-amino]-6-metil-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofeno-3-carboxílico;

15 2-(5-hidroxi-3-isobutil-5-(trifluorometil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)-N-(2-metoxifenil)-2-oxoacetamida; y
(E)-2-hidroxi-N'-((1-hidroxinaftalen-2-il) metilen)benzohidrazida

20 para su utilización en un procedimiento *in vivo* en un paciente que consiste en:

(a) antagonizar la formación de LDDA neurotóxico del A β ₁₋₄₂ monomérico poniendo en contacto A β ₁₋₄₂ monomérico con dicho compuesto; o para

25 (b) inhibir, regular y/o modular la disfunción neuronal y/o la neurotoxicidad provocadas por LDDA en una célula neuronal o tejido neuronal inhibiendo la formación de los LDDA que comprende poner en contacto los monómeros de A β ₁₋₄₂ que pueden estar en presencia de células neuronales con una cantidad eficaz de dicho compuesto.

30 2. Compuesto para su utilización según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto es la 2-(5-hidroxi-3-isobutil-5-(trifluorometil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)-N-(2-metoxifenil)-2-oxoacetamida.

3. Compuesto seleccionado de entre el grupo constituido por

35 N-(2-metoxi-fenil)-2-oxo-2-{N'-[3-oxo-3-tiofen-2-il-1-trifluorometil-prop-(Z)-ilideno]-hidrazino}-acetamida;
éster etílico del ácido 2-[[1-(2-hidroxi-3-metoxi-fenil)-met-(E)-iliden-hidrazinooxalil]-amino]-6-metil-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofeno-3-carboxílico;

40 éster etílico del ácido 2-[[1-(2-hidroxinaftalen-1-il)-met-(E)-iliden-hidrazinooxalil]-amino]-6-metil-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofeno-3-carboxílico;

éster etílico del ácido 2-[[1-(2-hidroxifenil)-met-(E)-iliden-hidrazinooxalil]-amino]-6-metil-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofeno-3-carboxílico;

45 2-(5-hidroxi-3-isobutil-5-(trifluorometil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)-N-(2-metoxifenil)-2-oxoacetamida; y
(E)-2-hidroxi-N'-((1-hidroxinaftalen-2-il) metilen)benzohidrazida

50 para su utilización en el tratamiento de un paciente que padece o está en situación de riesgo de padecer una enfermedad seleccionada de entre el grupo constituido por la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down, apoplejía, el deterioro cognitivo leve, la demencia relacionada con la isquemia focal y la degeneración neuronal.

55 4. Composición para su utilización *in vivo* en el antagonismo de la formación de LDDA neurotóxico del A β ₁₋₄₂ monomérico en un paciente en la que la composición comprende una cantidad eficaz de un compuesto seleccionado de entre el grupo constituido por

N-(2-metoxi-fenil)-2-oxo-2-{N'-[3-oxo-3-tiofen-2-il-1-trifluorometil-prop-(Z)-ilideno]-hidrazino}-acetamida;

60 éster etílico del ácido 2-[[1-(2-hidroxi-3-metoxi-fenil)-met-(E)-iliden-hidrazinooxalil]-amino]-6-metil-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofeno-3-carboxílico;

éster etílico del ácido 2-[[1-(2-hidroxinaftalen-1-il)-met-(E)-iliden-hidrazinooxalil]-amino]-6-metil-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofeno-3-carboxílico;

65 éster etílico del ácido 2-[[1-(2-hidroxifenil)-met-(E)-iliden-hidrazinooxalil]-amino]-6-metil-4,5,6,7-tetrahidro-

benzo[b]tiofeno-3-carboxílico;

2-(5-hidroxi-3-isobutil-5-(trifluorometil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)-N-(2-metoxifenil)-2-oxoacetamida; y

5 (E)-2-hidroxi-N'-((1-hidroxinaftalen-2-il) metilen)benzohidrazida.

5. Composición para su utilización *in vivo* en la inhibición, la regulación y/o la modulación de cualquier disfunción neuronal o la neurotoxicidad provocadas por LDDA en una célula neuronal de un paciente inhibiendo la formación de los LDDA, en la que la composición comprende una cantidad eficaz de un compuesto seleccionado de entre el grupo
10 constituido por

N-(2-metoxi-fenil)-2-oxo-2-{N'-[3-oxo-3-tiofen-2-il-1-trifluorometil-prop-(Z)-ilideno]-hidrazino}-acetamida;

15 éster etílico del ácido 2-[[1-(2-hidroxi-3-metoxi-fenil)-met-(E)-iliden-hidrazinooxalil]-amino]-6-metil-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofeno-3-carboxílico;

éster etílico del ácido 2-[[1-(2-hidroxinaftalen-1-il)-met-(E)-iliden-hidrazinooxalil]-amino]-6-metil-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofeno-3-carboxílico;

20 éster etílico del ácido 2-[[1-(2-hidroxifenil)-met-(E)-iliden-hidrazinooxalil]-amino]-6-metil-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofeno-3-carboxílico;

2-(5-hidroxi-3-isobutil-5-(trifluorometil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)-N-(2-metoxifenil)-2-oxoacetamida; y

25 (E)-2-hidroxi-N'-((1-hidroxinaftalen-2-il)metilen)benzohidrazida.

6. Composición para su utilización según la reivindicación 4 o 5, en la que dicho compuesto es 2-(5-hidroxi-3-isobutil-5-(trifluorometil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)-N-(2-metoxifenil)-2-oxoacetamida.

30 7. Composición para su utilización según la reivindicación 4 o 5, en la que el compuesto se administra en un cantidad de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 1.000 mg, una o más veces al día.

8. Composición para su utilización según la reivindicación 4 o 5, en la que la composición comprende además un
35 excipiente farmacéuticamente aceptable.

9. Composición para su utilización según la reivindicación 4 o 5, en la que el LDDA, si existe, está asociado a fibrillas amiloides insolubles, placas seniles u ovillos.

40 10. Composición para su utilización según la reivindicación 4 o 5, en la que el LDDA, si existe, está asociado a una enfermedad seleccionada de entre el grupo constituido por la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down, la apoplejía y el deterioro cognitivo leve.

45 11. Composición para su utilización según la reivindicación 4 o 5, en la que el LDDA, si existe, está asociado a una enfermedad seleccionada de entre el grupo constituido por la demencia relacionada con la isquemia focal y la degeneración neuronal.

12. Composición para su utilización según la reivindicación 4 o 5, en la que el LDDA, si existe, está asociado a la sobreexpresión de la proteína β_{1-42} amiloide.

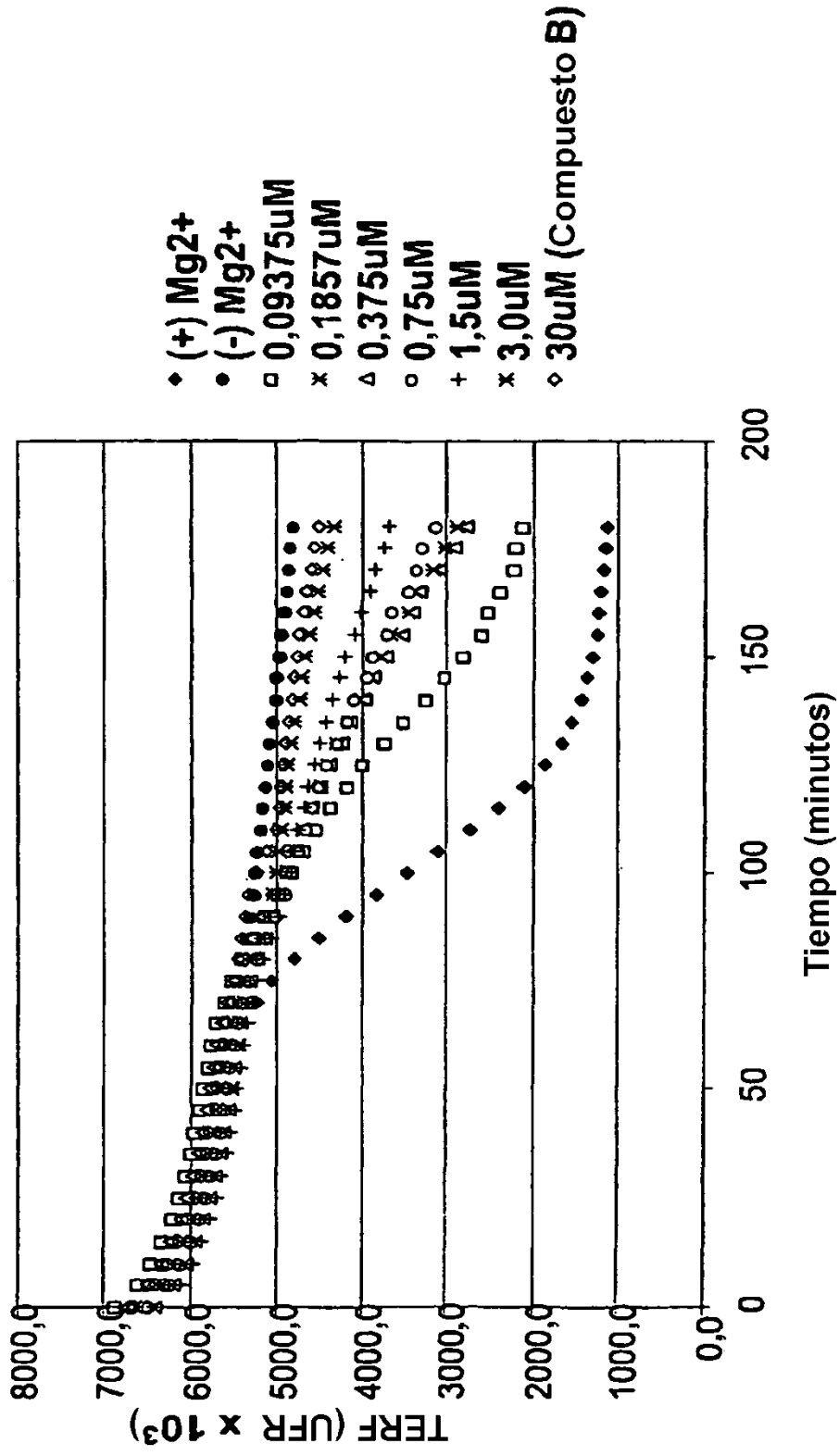


FIG.1

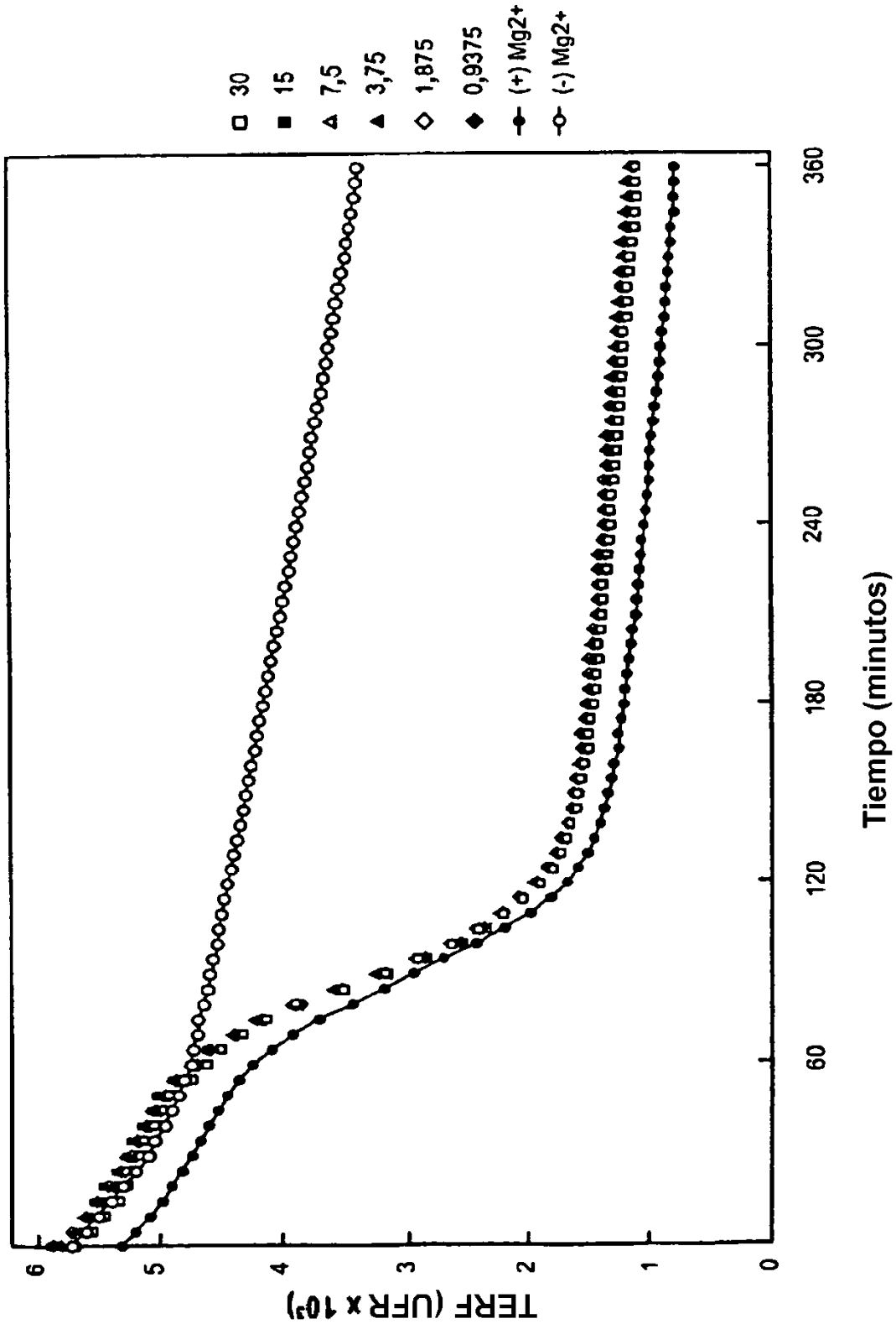


FIG. 2