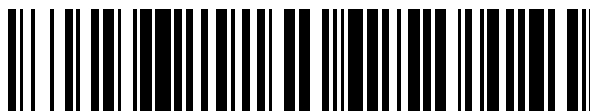


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 594**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4422 (2006.01)

A61K 31/44 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2008 E 08836256 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 2214666**

54 Título: **Método para reducir deposición amiloide, neurotoxicidad amiloide y microgliosis con enantiomero (-)-nilvadipina**

30 Prioridad:

05.10.2007 US 977953 P

18.04.2008 US 46109

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

20.03.2014

73 Titular/es:

ALZHEIMER'S INSTITUTE OF AMERICA, INC.
(100.0%)
7837 PARALLEL PARKWAY
KANSAS CITY, KS 66112, US

72 Inventor/es:

MULLAN, MICHAEL, J.;
PARIS, DANIEL y
IVEY, ROBERT, A., III

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 449 594 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).

Método para reducir deposición amiloide, neurotoxicidad amiloide y microgliosis con enantiomero (-)-nilvadipina

Descripción

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para tratar los efectos patofisiológicos de enfermedades amiloidogénicas, tales como enfermedad de Alzheimer. Más específicamente, el método incluye la administración de (-) enantiómero de nilvadipina para oponer los efectos patofisiológicos en el cerebro de animales o humanos que sufren de enfermedades asociadas con angiopatía amiloide cerebral, tal como enfermedad de Alzheimer, con menores efectos secundarios antihipertensivos en comparación con la mezcla racémica de nilvadipina.

Antecedentes de la invención

Descripción de técnica relacionada

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el trastorno neurodegenerativo más común de la vejez, que sufre aproximadamente el 1% de la población de más de 65 años. Los rasgos característicos de la enfermedad incluyen la acumulación progresiva de ovillos neurofibrilares intracelulares, placas seniles paenquimatosas extracelulares y depósitos cerebrovasculares en el cerebro. El principal componente de placas seniles y depósitos cerebrovasculares es el péptido β -amiloide ($A\beta$) de aminoácido 39-43 que se deriva proteolíticamente de la proteína precursora amiloide (PPA), una glicoproteína transmembranal.

PPA es una proteína de única transmembrana con un dominio de terminal amino extracelular de aminoácido 590-680 y una cola citoplásmica de aproximadamente 55 aminoácidos. El ARN mensajero del gen de PPA en el cromosoma 21 sufre una unión alternativa para producir ocho isoformas posibles, tres de las cuales (isoformas de 695, 751 y 770 aminoácidos) predominan en el cerebro. PPA sufre procesamiento proteolítico a través de tres actividades enzimáticas, denominadas α -, β - y γ -secretasa. Alfa-secretasa parte PPA en el aminoácido 17 del dominio de $A\beta$, liberando de este modo el gran fragmento soluble de amino-terminal α -PPA para secreción. Debido a que α -secretasa se parte dentro del dominio de $A\beta$, esta partición excluye la formación de $A\beta$. Alternativamente, PPA puede partirse por β -secretasa para definir el amino terminal de $A\beta$ y para generar fragmento β -PPA soluble de amino terminal. La partición posterior del dominio intracelular carboxi-terminal de PPA por γ -secretasa da como resultado la generación de múltiples péptidos, siendo los dos más comunes $A\beta$ de aminoácido 40 ($A\beta_{40}$) y $A\beta$ de aminoácido 42 ($A\beta_{42}$). $A\beta_{40}$ comprende 90-95% de $A\beta$ secretado y es la especie predominante recuperada de fluido cerebroespinal (Seubert et al., Nature, 359:325-7, 1992). En cambio, menos del 10% de $A\beta$ secretado es $A\beta_{42}$. A pesar de la relativa escasez de producción de $A\beta_{42}$, $A\beta_{42}$ es la especie predominante encontrada en placas y se deposita inicialmente, quizás debido a su habilidad para formar agregados amiloides solubles más rápidamente que $A\beta_{40}$ (Jarret et al., Biochemistry, 32:4693-7, 1993). Se cree que la acumulación anormal de $A\beta$ en el cerebro se debe a la sobre-expresión o procesamiento alterado de PPA.

De este modo, se cree que los péptido $A\beta$ juegan un papel crítico en la patobiología de EA, como todas las mutaciones asociadas con la forma familiar de EA dan como resultado el procesamiento alterando de estos péptidos de PPA. De hecho, los depósitos de fibrillas insolubles o agregadas de $A\beta$ en el cerebro son una características neuropatológica prominente de todas las formas de EA, sin tener en cuenta la predisposición genética del sujeto.

Simultáneo a la deposición de $A\beta$, existe una fuerte activación de secuencias inflamatorias en el cerebro de EA, incluyendo la producción de citoquinas pro-inflamatorias y reactivos en fase aguda en un alrededor de los depósitos de $A\beta$ (McGeer et al., J Leukocyte Biol., 65:409-15, 1999). Se piensa que la activación de las células inmunes innatas residentes del cerebro, las microgliales, está íntimamente implicada en esta cascada inflamatoria. Se ha demostrado que las microgliales reactivas producen citoquinas pro-inflamatorias, tales como proteínas inflamatorias y reactivos en fase aguda, tales como alfa-1-antiquimotripsina, factor β del crecimiento transformador, apolipoproteína E y factores de complemento, habiéndose demostrado que todos ellos están localizados en las placas $A\beta$ y para promover la "condensación" o maduración de placa $A\beta$ (Nilsson et al., J. Neurosci. 21:1444-5, 2001), y que a en grandes niveles promueven neurodegeneración. Estudios epidemiológicos han demostrado que pacientes que usan fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) tienen tanto como el 50% de menor riesgo de EA (Rogers et al., Neurobiol. Aging 17:681-6, 1996), y la evaluación post-mortem de pacientes de EA que se sometieron a tratamiento de AINE han demostrado que la reducción del riesgo está asociada al menos número de microgliales activadas (Mackenzie et al., Neurology 50:986-90, 1998). Además, cuando a los ratones Tg APPsw, un modelo de ratón para enfermedad de Alzheimer, se les dio un AINE (ibuprofeno), estos animales mostraron reducción en depósitos de $A\beta$, astrocitosis, y neuritis distrófica, estableciendo una correlación con la menor activación microglial (Lim et al., J. Neurosci. 20:5709-14, 2000).

Los productos del proceso inflamatorio en el cerebro de EA pueden por lo tanto exacerbar patología de EA. Además, hay evidencia de que los microgliales activados en cerebro de EA, en lugar de despejar $A\beta$, son patogénicos al promover fibrillogénesis de $A\beta$ y la consecuente deposición como placas seniles (Wegiel et al., Acta

Neuropathol. (Berl.) 100:356-64, 2000).

También se ha sugerido que la patogénesis de EA es debida a las propiedades neurotóxicas de A β . La citotoxicidad de A β se estableció primero en cultivos de células primarias de cerebros de roedores y también en cultivos de células humanas. El trabajo de Mattson et al. (J. Neurosci., 12:376-389, 1992) indica que A β , en presencia del glutamato neurotransmisor excitatorio, causa un incremento patológico inmediato en calcio intracelular, lo que se cree que es muy tóxico para la célula por medio de sus mayores actividades del segundo mensajero.

La Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2005/0009885 (13 Enero, 2005) (Mullan et al.) desvela un método para reducir la deposición de A β usando nilvadipina, así como métodos para diagnosticar enfermedades amiloidogénicas cerebrales usando nilvadipina. Sin embargo, la Patente de Estados Unidos 4.338.322 describe nilvadipina por sus efectos antihipertensivos. Nilvadipina (NIVADIL™) ha recibido aprobación reglamentaria en Irlanda para tratamiento de hipertensión en una dosis de 8 mg por día, o 16 mg por día si no se consigue un adecuado efecto anti-hipertensivo con 8 mg por día. Véase también Patente de Estados Unidos 5.508.413, que desvela efectos antihipertensivos del (+)-enantiómero de nilvadipina. La nilvadipina racémica y su efecto en el flujo sanguíneo cerebral regional en sujetos humanos se presentan en Hanyu et al. (Nuclear Medicine Communications, vol. 28, n° 4, páginas 281-287, Abril 2007).

A pesar de los artículos indicados anteriormente, existe una necesidad de una profilaxis para la progresión inexorable de degeneración cerebral que es un marcador característico de EA, donde la profilaxis se dirige a la deposición de A β , neurotoxicidad de A β , inflamación activada microglial y alteración o sobreexpresión de PPA que se ve en pacientes de EA con tratamiento terapéuticamente efectivo con mínimos efectos secundarios tales como reducción o deseada o excesiva en presión arterial.

Resumen de la invención

Con el fin de cumplir esta necesidad, la presente invención proporciona métodos para reducir la deposición de A β , neurotoxicidad de A β y microgliosis en un animal o humano que sufre de una enfermedad amiloidogénica cerebral, tal como enfermedad de Alzheimer (EA), administrando al animal o humano cantidades terapéuticamente efectivas de (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida. En particular, la presente invención proporciona la administración de (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida con un efecto hipotensor reducido en comparación con la misma cantidad de nilvadipina racémica. Además, la administración de (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida permite mayores dosis en comparación con la administración de nilvadipina racémica o (+)-nilvadipina debido a una reducción en el efecto hipotensor. Por ejemplo, los datos aquí presentados demuestran una contracción aórtica de referencia cuando se desafió con FPL64176 para el (-)-enantiómero, cuando se correlaciona con vasoactividad reducida para el (-)-enantiómero en comparación con la mezcla racémica o (+)-enantiómero que muestran vasoactividad (esto es, antagonismo de vasoconstricción inducida). En realizaciones preferentes, el (-)-enantiómero está presente en exceso en la composición administrada, y el exceso enantiomérico excede preferentemente 90% o más, 95% o más, y más preferentemente 98% o más, incluyendo 100%, hasta el límite detectable de pureza.

La presente invención proporciona además métodos para reducir el riesgo de deposición de de A β , neurotoxicidad de A β y microgliosis en animales o humanos que sufren de lesión cerebral traumática al administrar al animal o humano una cantidad terapéuticamente efectiva de (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida después de la lesión en la cabeza y continuar el tratamiento con (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida durante un periodo de tiempo prescrito a partir de entonces. En particular, la presente invención proporciona la administración de (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida con un efecto hipotensor reducido en comparación con la misma cantidad de nilvadipina racémica. Además, la administración de (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida permite mayores dosis en comparación con la administración de nilvadipina racémica debido a una reducción en el efecto hipotensor. En realizaciones preferentes, el (-)-enantiómero está presente en exceso en la composición administrada, y el exceso enantiomérico excede preferentemente 90% o más, 95% o más, y más preferentemente 98% o más, incluyendo 100%, hasta el límite detectable de pureza.

La presente invención también proporciona métodos para reducir el riesgo de desarrollar, o retrasar la aparición o progresión, o de estabilizar los síntomas de, una enfermedad amiloidogénica cerebral o condición en animales y humanos diagnosticados con un riesgo de desarrollar enfermedad o condición amiloidogénica cerebral, que comprende la administración al animal o humano de una cantidad terapéuticamente efectiva de (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida, donde la administración de (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida comienza después del diagnóstico de riesgo de desarrollar enfermedad o condición amiloidogénica cerebral. En particular, la presente invención proporciona la administración de (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida con un efecto hipotensor reducido en comparación con la misma cantidad de nilvadipina racémica. Además, la administración de (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida permite mayores dosis en comparación con la administración de nilvadipina racémica debido a una reducción en el efecto hipotensor. En realizaciones preferentes, el (-)-enantiómero está presente en exceso en la composición administrada, y el exceso enantiomérico excede preferentemente 90% o más, 95% o más, y más preferentemente 98% o más, incluyendo 100%, hasta el límite detectable de pureza.

La presente invención proporciona el tratamiento del perfil clínico de una enfermedad amiloidogénica cerebral que abarca uno o más de todos los rasgos cognitivos y de comportamiento asociados con la enfermedad amiloidogénica cerebral. Por ejemplo, en relación con EA, tales rasgos pueden incluir una lista no limitativa de síntomas tales como pérdida profunda de memoria, dificultad en la realización de tareas familiares, problemas con el lenguaje, desorientación, disminución de juicio, deficiencias en el pensamiento abstracto, cambios en la personalidad, humor o comportamiento y/o marcadores característicos en una batería de pruebas cognitivas. Tales pruebas cognitivas incluyen la Escala de Memoria de Wechsler Revisada (EMW-R), la Clasificación Clínica de la Demencia (CCD), el Mini Examen del Estado Mental (MEEM) y/o la Escala de Valoración-Subescala Cognitiva de Enfermedad de Alzheimer (EVEA).

La presente invención proporciona tratamiento con (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida que puede producir un resultado clínico específico. Un punto final para el tratamiento es una mejora medible en uno o más síntomas de la enfermedad en aquellos que sufren enfermedad amiloidogénica cerebral. La mejora puede dar como resultado un paciente asintomático, o puede reflejar una mejora en la habilidad en comparación con uno o más síntomas antes del tratamiento. Alternativamente, un punto final para el tratamiento puede ser mantener un nivel sintomático de referencia. En otras palabras, este punto final representa la estabilización de la enfermedad o uno o más síntomas de la enfermedad de manera permanente durante un periodo de tiempo. Además, un punto final para el tratamiento puede ser una reducción en el ritmo de progresión de la enfermedad en comparación con un control no tratado. Además, el tratamiento puede incluir un pre-tratamiento de un individuo considerado en riesgo de desarrollar enfermedad amiloidogénica cerebral, pero antes de la manifestación clínica de uno o más síntomas. La referencia al tratamiento de la enfermedad también abarca el tratamiento de uno o más síntomas, donde el tratamiento es paliativo más que curativo.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un gráfico de barras que ilustra el efecto de la administración crónica de nilvadipina en la deposición de A β (carga A β) en diferentes regiones del cerebro de ratones TgAPP_{sw} usando una técnica de inmunotinción 4G8.

La FIG. 2 es un gráfico de barras que ilustra el efecto de la administración crónica de nilvadipina en la activación microglial en ratones TgAPP_{sw} en tres regiones del cerebro usando una técnica de inmunotinción CD45 que determina el número de microgliales CD45+.

La FIG. 3 es un gráfico de barras que ilustra el efecto de nilvadipina en la activación microglial en células microgliales murinas N9 in vitro activadas con lipopolisacárido (LPS) durante 24 horas. La activación microglial se determina mediante la producción de TNF- α (pg/ml) medido por ELISA.

La FIG. 4 es un gráfico de barras que ilustra el efecto de la administración de nilvadipina en neurotoxicidad de A β usando células HPNC tratadas durante tres días con 30 μ M de A β -40 (AgA β) pre-agregado. La neurotoxicidad se evalúa midiendo la cantidad de deshidrogenasa láctica (DHL) liberado de las células.

Las FIGS. 5A y 5B son gráficos de barra que ilustra el efecto de nilvadipina en el procesamiento de PPA usando célula de glioblastoma humanas transfectadas con APP_{sw}. Las células tratadas con nilvadipina 50 nM y 250 nM durante 24 horas (FIG. 5A) y durante 48 horas (FIG. 5B). La producción de A β 1-40 se en el medio de cultivo se midió mediante ELISA.

La FIG. 6 es una curva de respuesta de dosis que muestra el efecto de formas enantioméricas puras de nilvadipina (nilvadipina 1 y nilvadipina 2) así como una mezcla de los 2 enantiómeros en igual proporción (N1+N2) en la producción de A β 1-40 por células de ovario de hámster chino 7W W5 APP751 después de un tratamiento de 24 horas. Ambos enantiómeros parecen inhibir dependientemente de la dosis la producción de A β 1-40 de una manera similar.

La FIG. 7 es una curva de respuesta de dosis que muestra el efecto de formas enantioméricas puras de nilvadipina (nilvadipina 1 y nilvadipina 2) así como una mezcla de los 2 enantiómeros en igual proporción (N1+N2) en la producción de A β 1-40 por células de ovario de hámster chino 7W W5 APP751 después de un tratamiento de 24 horas. Señalar que enantiómero puro de nilvadipina 2 así como la mezcla racémica de nilvadipina (N1+N2) estimulan ligeramente A β 1-42 en dosis baja mientras el enantiómero nilvadipina 1 está privado de tal efecto.

La FIG. 8 es una cromatografía quiral que muestra la separación de los enantiómeros de nilvadipina. Nilva_Pico_1 corresponde a (-)-nilvadipina (nilvadipina 1); Nilva_Pico_2 corresponde a (+)-nilvadipina (nilvadipina 2). Nilva_10, que se refiere a la mezcla racémica original de nilvadipina, está incluida para fines ilustrativos.

La FIG. 9 muestra el efecto de (-)-nilvadipina (nilvadipina 1) y (+)-nilvadipina (nilvadipina 2) en vasoconstricción inducida por FPL64176 en aortas de rata. Los datos muestra que (+)-nilvadipina antagoniza por completo la vasoconstricción inducida por FPL64176 mientras (-)-nilvadipina no afecta al efecto vasoactivo de agonistas de canal de calcio de tipo L lo que demuestra que (+)-nilvadipina es un bloqueador de canal de calcio de tipo L mientras (-)-

nilvadipina está privada de tal efecto.

La FIG. 10 es un gráfico de barras que ilustra el efecto de (-)-nilvadipina en niveles A β 1-40 y A β 1-42 del cerebro en ratones TgAPP_{sw} de 70 semanas de edad. Los animales se trataron intraperitonealmente diariamente durante cuatro días con (-)-nilvadipina (10 mg/kg de peso corporal).

La FIG. 11 es un gráfico de barras que ilustra el efecto de una liberación lenta de (-)-nilvadipina en niveles A β 1-42 del cerebro en ratones TgAPP_{sw} de 70 semanas de edad. Los animales se trataron durante 26 días usando bolitas biodegradables que se implantaron subcutáneamente.

La FIG. 12 ilustra un modelo *in vitro* de la Barrera Hematoencefálica usando inserciones de 24 pozos, traslúcidas con membrana de 0,4 μ m que contenían una capa de Células Endoteliales Microvasculares del Cerebro Humano (CEMCH). La migración de amiloide fluoresceína-beta 1-42 al compartimento apical se evaluó en varios puntos en el tiempo.

La FIG. 13 es un gráfico de barras que muestra el efecto *in vitro* de (-)-nilvadipina en el despeje de A β cerebral en la Barrera Hematoencefálica. A=Apical, B=Basolateral.

La FIG. 14 es un gráfico de barras que muestra el efecto *in vitro* de (-)-nilvadipina contra mezcla racémica de nilvadipina en el despeje de A β cerebral en la Barrera Hematoencefálica. A=Apical, B=Basolateral.

La FIG. 15 es un gráfico de barras que muestra el efecto *in vitro* de (-)-nilvadipina en el despeje de A β cerebral en la Barrera Hematoencefálica, como se mide por los niveles de plasma A β en ratones.

La FIG. 16 es un gráfico de barras que muestra el efecto *in vitro* de bolita de (-)-nilvadipina biodegradable en el despeje de cerebro A β en la Barrera Hematoencefálica.

Las FIGS. 17A y 17B muestran propiedades vasoactivos de (+)-nilvadipina contra (-)-nilvadipina en una variedad de dosis de fármaco.

Descripción de las realizaciones

La presente invención proporciona métodos profilácticos y métodos terapéuticos para abordar la progresión inexorable de la degeneración cerebral que es un marcador característico de ciertas enfermedades amiloidogénicas cerebrales, tal como, enfermedad de Alzheimer (EA), en animales y humanos, administrando (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida (isopropil-3-metil-2-ciano-1,4-dihidro-6-metil-4-(m-nitrofenil)-3,5-piridina-dicarboxilato; PM 385,4). Los métodos de acuerdo con la invención abarcan el tratamiento, prevención y mejora de síntomas.

A menos que se especifique lo contrario, el término nilvadipina como aquí se usa se refiere a la mezcla racémica. Los términos “enantioméricamente enriquecido/a” como aquí se usan, se refieren a un compuesto que es una mezcla de enantiómeros en la que el (-)-enantiómero está presente en exceso, y preferentemente presente hasta una extensión de 90% o más, 95% o más, y más preferentemente 98% o más, incluyendo 100%, hasta el límite detectable de pureza. Por ejemplo, la pureza puede determinarse mediante la detección con métodos HPLC quirales. En una realización, el exceso enantiomérico se calcula restando el componente menor del componente menor, por ejemplo, una mezcla de enantiómeros con 89% (-)-enantiómero y 2% (+)-enantiómero se calcularía como un 96% de exceso enantiomérico del (-)-enantiómero.

En particular, una realización de la presente invención proporciona un método para reducir la deposición de A β , neurotoxicidad de A β y microgliosis en un animal o humano que sufre una enfermedad o condición amiloidogénica cerebral administrando cantidades terapéuticamente efectivas de (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida al animal o humano. Debido a que la mayoría de las enfermedades amiloidogénicas cerebrales, tal como EA, son crónicas, progresivas, demencias cerebrales intratables, se contempla que la duración del tratamiento con (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida dure durante toda la vida del animal o humano. Las enfermedades o condiciones amiloidogénicas cerebrales incluyen sin limitación enfermedad de Alzheimer, lesión cerebral traumática, y angiopatía amiloide cerebral.

En otra realización, la presente invención proporciona un método para tratar encefalopatía esponjiforme transmisible, tembladera o síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker.

En otra realización de la presente invención, se proporciona un método para reducir el riesgo de deposición de A β , neurotoxicidad de A β y microgliosis en animales y humanos que sufren lesión cerebral traumática (LCT) administración al animal o humano una cantidad terapéuticamente efectiva de (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida después de la LCT y continuando el tratamiento con (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida durante un periodo de tiempo prescrito a partir de entonces. La duración del tratamiento con (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida que se contempla para aquellos animales o humanos que sufren una LCT puede

durar entre aproximadamente una hora y cinco años, preferentemente entre aproximadamente dos semanas y tres años, y más preferentemente entre aproximadamente seis meses y doce meses.

En otra realización, se proporciona un método para tratar el perfil clínico de una enfermedad amiloidogénica cerebral que abarca uno o más de todos los rasgos cognitivos y de comportamiento asociados con la enfermedad amiloidogénica cerebral. Por ejemplo, en relación con EA, tales rasgos pueden incluir una lista no limitativa de síntomas tales como pérdida profunda de memoria, dificultad en la realización de tareas familiares, problemas con el lenguaje, desorientación, disminución de juicio, deficiencias en el pensamiento abstracto, cambios en la personalidad, humor o comportamiento y/o marcadores característicos en una batería de pruebas cognitivas. Tales pruebas cognitivas incluyen la Escala de Memoria de Wechsler Revisada (EMW-R), la Clasificación Clínica de la Demencia (CCD), el Mini Examen del Estado Mental (MEEM) y/o la Escala de Valoración-Subescala Cognitiva de Enfermedad de Alzheimer (EVEA).

En una o más realizaciones, el tratamiento con (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida puede producir un resultado clínico específico. Un punto final para el tratamiento es una mejora medible en uno o más síntomas de la enfermedad en aquellos que sufren enfermedad amiloidogénica cerebral. La mejora puede dar como resultado un paciente asintomático, o puede reflejar una mejora en la habilidad en comparación con uno o más síntomas antes del tratamiento. Alternativamente, un punto final para el tratamiento puede ser mantener un nivel sintomático de referencia. En otras palabras, este punto final representa la estabilización de la enfermedad o uno o más síntomas de la enfermedad de manera permanente durante un periodo de tiempo. Además, un punto final para el tratamiento puede ser una reducción en el ritmo de progresión de la enfermedad en comparación con un control no tratado. Además, el tratamiento puede incluir un pre-tratamiento de un individuo considerado en riesgo de desarrollar enfermedad amiloidogénica cerebral, pero antes de la manifestación clínica de uno o más síntomas. La referencia al tratamiento de la enfermedad también abarca el tratamiento de uno o más síntomas, donde el tratamiento es paliativo más que curativo.

La cantidad terapéuticamente efectiva de (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida que se administra, opcionalmente en forma de dosis de unidad, a animales o humanos que sufren una enfermedad amiloidogénica cerebral o que sufren una lesión cerebral traumática, así como la administrada con el fin de determinar el riesgo de desarrollar y/o un diagnóstico de una enfermedad amiloidogénica cerebral en un animal o humano, de acuerdo con los métodos de la presente invención, puede oscilar entre aproximadamente 0,05 mg a 20 mg por día, preferentemente entre aproximadamente 2 mg y 15 mg por día, más preferentemente entre aproximadamente 4 mg a 12 mg por día, y más preferentemente aproximadamente 8 mg por día. La dosis diaria puede administrarse en una única dosis de unidad o dividida en dos, tres o cuatro dosis de unidad por día. En otra realización, la cantidad terapéuticamente efectiva de (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida es superior a 16 mg por día hasta el límite de la dosis máxima tolerada. Por ejemplo, la cantidad terapéuticamente efectiva de (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida puede oscilar entre 16 mg y aproximadamente 20 mg por día. Alternativamente, la cantidad terapéuticamente efectiva de (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida puede ser aproximadamente 20 mg por día, aproximadamente 30 mg por día, aproximadamente 40 mg por día, aproximadamente 50 mg por día, aproximadamente 75 mg por día, aproximadamente 100 mg por día, aproximadamente 125 mg por día, aproximadamente 150 mg por día, aproximadamente 175 mg por día, aproximadamente 200 mg por día, aproximadamente 225 mg por día, aproximadamente 250 mg por día, aproximadamente 275 mg por día, aproximadamente 300 mg por día, aproximadamente 325 mg por día, aproximadamente 350 mg por día, aproximadamente 375 mg por día, aproximadamente 400 mg por día, aproximadamente 425 mg por día, aproximadamente 450 mg por día, aproximadamente 472 mg por día, aproximadamente 500 mg por día, o hasta la máxima dosis tolerada por día, y cualquier cantidad, entera o de otra manera, entre las cantidades anteriores. Los rangos pueden variar. Por ejemplo, rangos no limitativos incluyen puntos finales inferiores de 20, 40, 60, 80 o 100 mg por día, y puntos finales superiores de 50, 100, 150, 200, 250, 300 y 500 mg por día, y cualquier cantidad entera o de otra manera, dentro de las cantidades mencionadas anteriormente puede servir como un punto final.

Sin desear quedar ligados a la teoría, se cree que los efectos anti-hipertensos pueden limitar la cantidad máxima tolerada de nilvadipina racémica. En una realización de acuerdo con la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva de (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida reduce la presión arterial en una cantidad seleccionada del grupo consistente en menos de aproximadamente 30%, menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 5% y menos de aproximadamente 1%, de la presión arterial del pre-tratamiento después de la administración de (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida. La presión arterial puede medirse en una variedad de maneras. Por ejemplo, la presión arterial puede medirse como una presión sistólica o una presión diastólica en milímetros de mercurio.

Alternativamente, la presión arterial puede calcularse de acuerdo con la fórmula de lecturas de presión 2/3 diastólica más 1/3 sistólica. En una realización, la presión arterial se controla continuamente y se integra conforme avanza el tiempo para dar un único valor para el área bajo la curva (ABC). El cambio en la presión arterial puede estar en comparación con la población normal, o puede estar en comparación con la presión arterial del individuo tratado en el pre-tratamiento. En una realización, la presión arterial post-tratamiento se mide después de un periodo de tratamiento de manera que se establezca un cambio de estado estacionario en la presión arterial. Por ejemplo, la presión sanguínea post-tratamiento puede medirse después de aproximadamente 1 semanas de tratamiento,

aproximadamente 4 semanas de tratamiento, aproximadamente 12 semanas de tratamiento, aproximadamente 6 meses de tratamiento, y similares. En una realización, la (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida se administra a un humano o animal que tiene presión arterial normal, o es hipotenso. En una realización, la (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida se administra a un humano o animal que es hipertenso. En humanos, se considera que es presión arterial normal entre aproximadamente 90/50 mm Hg y aproximadamente 135/90 mm Hg. La presión arterial en humanos por debajo del rango normal se considera hipotensa.

En otra realización, el terapéutico de la invención se administra a pacientes que son hipertensos o a pacientes sin considerar sus niveles de presión arterial. Los pacientes hipertensos pueden tratarse simultáneamente con un anti-hipertenso. La presión arterial en humanos por encima del rango normal se considera hipertensa.

Los rangos normales para varios animales pueden encontrarse en manuales veterinarios estándares. En una realización, la presión arterial está en el rango normal bien de manera natural o debido a intervención médica, tal como la administración de un agente anti-hipertenso adicional.

Se contempla que los métodos de la presente invención pueden probarse en modelos de animales transgénicos conocidos para EA, tal como modelos de ratón PDAPP o TgAPP_{sw} antes de probar la eficiencia en las condiciones de tratamiento, prevención y/o inhibición asociadas con deposición amiloide, neurotoxicidad de A β y microgliosis en el sistema nervioso central. Tales modelos de animales transgénicos para EA se construyen usando métodos estándares conocidos en la técnica y, por ejemplo, expuestos en los Números de Patente de Estados Unidos 5.487.992; 5.464.764; 5.387.742; 5.360.735; 5.347.075; 5.298.422; 5.288.846; 5.221.778; 5.175.384; 5.175.383 y 4.736.866.

La (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida puede administrarse a un paciente por medio de varias rutas incluyendo parenteralmente, oralmente o intraperitonealmente. La administración parenteral incluye las siguientes rutas: intravenosa; intramuscular; intersticial; intra-arterial; subcutánea; intraocular; intracraneal; intratecal; intraventricular; intrasinoval; transepitelial, incluyendo transdérmica, pulmonar mediante inhalación, oftalmológica, sublingual y bucal; tópica, incluyendo oftalmológica, dérmica, ocular, rectal o inhalación nasal mediante insuflación o nebulización.

La (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida que se administra oralmente puede estar envuelta en cápsulas duras o blandas con armazón de gelatina. La (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida también puede incorporarse con un excipiente y usarse en forma de comprimidos que pueden ingerirse, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, bolsitas, pastillas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Además, la (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida puede tener la forma de un polvo o gránulo, una solución o suspensión en un líquido acuoso o líquido no acuoso. O en una emulsión aceite en agua o agua en aceite.

Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas también pueden contener, por ejemplo, un aglutinante, tal como goma tragacanto, acacia, almidón de maíz; excipientes gelatinosos, tal como fosfato dicálcico; un agente desintegrante, tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante, tal como estearato de magnesio; un agente endulzante, tal como sacarosas, lactosa o sacarina; o un agente saborizante. El ingrediente activo puede formularse o administrarse en una forma de dosis de unidad o en una forma de dosis no-unidad. Cuando la forma de dosis de unidad es una cápsula, puede contener, además de los materiales descritos anteriormente, un transportador líquido. Varios otros materiales pueden estar presentes como coberturas o para modificar de otra manera la forma física de la unidad de dosis. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras o cápsula pueden estar recubiertas de goma laca, azúcar o ambas. Un jarabe o elixir puede contener nilvadipina, sacarosa como un agente endulzante, metilo y propilparabenos como conservantes, un tinte y saborizante. Además, la (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida puede incorporarse en preparación y formulaciones de liberación prolongada.

La (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida puede administrarse al SNC, parenteralmente o intraperitonealmente. Las soluciones de nilvadipina como una base libre o como una sal farmacéuticamente aceptable pueden prepararse en agua mezclada con un surfactante adecuado, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, glicoles de polietileno líquido, y mezclas de los mismos, y en aceites. Bajo condiciones ordinarias de almacenaje y uso, estas preparaciones pueden contener un conservante y/o antioxidante para prevenir el crecimiento de microorganismos o degeneración química.

El enantiómero de (-)-nilvadipina deseado tiene la configuración (S) en su centro quiral. El compuesto aquí proporcionado puede ser enantioméricamente puro, o puede ser una mezcla estereoisomérica con alguna cantidad de (+)(R)nilvadipina. Se entiende que la divulgación de (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida aquí abarca cualquier forma ópticamente activa, polimórfica o estereoisomérica, o mezclas de las mismas, que preferentemente poseen las propiedades útiles aquí descritas, es bien conocido en la técnica cómo preparar formas ópticamente activas y cómo determinar actividad usando las pruebas estándares aquí descritas, o usando otras pruebas similares que son bien conocidas en la técnica. Los términos "enantioméricamente enriquecido/a" como aquí se usan, se refieren a un compuesto que es una mezcla de enantiómeros en la que el (-)-enantiómero está presente en exceso, y preferentemente presente hasta una extensión de 90% o más, 95% o más, y más preferentemente 98% o más,

incluyendo 100%, hasta el límite detectable de pureza. Por ejemplo, la pureza puede determinarse mediante la detección con métodos HPLC quirales.

Ejemplos de métodos que pueden usarse para obtener isómeros ópticos de los compuestos incluyen los siguientes:

i) preparación física de cristales - una técnica por la que se cristales macroscópicos de los enantiómeros individuales se separan manualmente. Esta técnica puede usarse si existen cristales de los enantiómeros separados, esto es, el material es un conglomerado, y los cristales son visualmente distintos;

ii) cristalización simultánea - una técnica por la que los enantiómeros individuales se cristalizan por separado de una solución que es un racemato, solamente posible si éste es un conglomerado en el estado sólido;

iii) resoluciones enzimáticas - una técnica por la que se hace una separación parcial o completa de un racemato en virtud de diferentes velocidades de reacción para los enantiómeros con una enzima

iv) síntesis asimétrica enzimática, una técnica sintética por la que al menos una etapa de la síntesis usa una reacción enzimática para obtener un precursor sintético enantioméricamente puro o enriquecido del enantiómero deseado;

v) síntesis asimétrica química - una técnica sintética por la que el enantiómero deseado se sintetiza de un precursor aquiral bajo condiciones que producen asimetría (esto es, quiralidad) en el producto, que puede conseguirse usando catalizadores quirales o auxiliares quirales;

vi) separaciones de diastereómeros - una técnica por la que un compuesto, precursor o intermediario semi-sintético reacciona con un reagente enantioméricamente puro (el auxiliar quiral) que convierte los enantiómeros individuales a diastereómeros. Los diastereómeros resultantes se separan después mediante cromatografía o cristalización en virtud de sus diferencias estructurales ahora más distintas y el auxiliar quiral se retira más tarde para obtener el enantiómero deseado (véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos 5.508.413 asignada a Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd);

vii) transformaciones asimétricas de primer y segundo orden - una técnica por la que los diastereómeros del equilibrado racemato para producir una preponderancia en solución del diastereómero del enantiómero deseado o donde la cristalización preferencial del diastereómero del enantiómero deseado perturba el equilibrio de tal manera que finalmente en principio todo el material se convierte en diastereómero cristalino del enantiómero deseado. El enantiómero deseado se libera después del diastereómero;

viii) resoluciones cinéticas - esta técnica se refiere a la consecución de resolución parcial o completa de un racemato (o de una resolución adicional de un compuesto parcialmente resuelto) en virtud de velocidades desiguales de reacción del enantiómero con un reactivo o catalizador quiral, no racémico bajo condiciones cinéticas;

ix) síntesis enantioespecífica de precursores no racémicos - una técnica sintética por la que el enantiómero deseado se obtiene a partir de materiales de inicio no quirales y donde la integridad estereoquímica no se comprometen o sólo se comprometen mínimamente durante el curso de la síntesis.

x) cromatografía líquida quiral - una técnica por la que los enantiómeros de un racemato se separan en un fase móvil líquida en virtud de sus diferentes interacciones con una fase inmóvil. La fase inmóvil puede hacerse de un material quiral o la fase móvil puede contener un material quiral adicional para provocar las diferentes interacciones;

xi) cromatografía quiral de gases - una técnica por la que el racemato se volatiliza y los enantiómeros se separan en virtud de sus diferentes interacciones en la fase móvil gaseosa con una columna que contiene una fase adsorbente quiral fija no racémica;

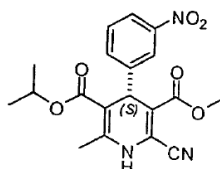
xii) extracción con disolventes quirales - una técnica por la que los enantiómeros se separan en virtud de disolución preferencial de un enantiómero en una disolvente quiral particular; y

xiii) transporte a través de membranas quirales - una técnica por la que un racemato se coloca en contacto con una barrera de membrana fina. La barrera típicamente separa dos fluidos miscibles, uno en contacto con el racemato, y una fuerza impulsora tal como un diferencial de concentración o presión provoca el transporte preferencial a través de la barrera de membrana. La separación ocurre como un resultado de la naturaleza quiral no racémica de la membrana que solamente permite que un enantiómero del racemato pase a través.

xiv) cromatografía líquida - una técnica por la que los enantiómeros se separan en una sistema de disolvente en fase normal en virtud de la diferencia en sus coeficientes de partición con respecto a una fase inmóvil quiral. Esta técnica se empleó para generar preparaciones ópticamente activas de (-)-nilvadipina y (+)-nilvadipona aquí descritas (véase Figura 8).

Los enantiómeros de nilvadipona se han separado de la siguiente manera:

Nilvadipina 1
(-)-Nilvadipina

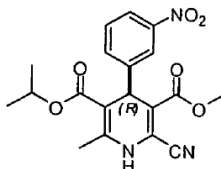


Bibliografía: $[\alpha]_D^{20} -219,6^\circ$ (c = 1,0, MeOH)
 Observado: $[\alpha]_D^{25} -99,0^\circ$ (c = 0,057, MeOH)

5

Nilvadipina 2
 (+)-Nilvadipina

10



15

Bibliografía: $[\alpha]_D^{20} +222,4^\circ$ (c = 1,0, MeOH)
 Observado: $[\alpha]_D^{25} +170,1^\circ$ (c = 0,05, MeOH)

Los valores de la bibliografía para rotaciones ópticas de los enantiómeros de nilvadipina se presentan en Satoh, Y; Okumura, K.; Shiokawa, Y. Chem. Pharm. Bull. 42(4)950-952 (1994). Véase Figura 5 para datos en relación a la pureza enantiomérica de los compuestos separados.

El término “aproximadamente” significa dentro del $\pm 10\%$ de la cantidad expuesta, o dentro del error experimental de la técnica de medición. La expresión “una composición consistente esencialmente en” significa que abarca una composición en la que el ingrediente farmacéuticamente activo es como se indica. En una realización, la expresión “consistente esencialmente en” excluye ingredientes farmacéuticamente activos no enumerados, pero no excluye vehículos, transportadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, o la manera en la que el ingrediente farmacéutico activo se formula. En una realización, por ejemplo en un método de tratamiento, la expresión “consistente esencialmente en” puede abarcar la administración de uno o más ingredientes farmacéuticos más activos como el único o únicos agente(s) activo(s) para esta indicación particular, mientras no se excluyen agentes terapéuticos administrados por otras razones o indicaciones.

EJEMPLOS

Los métodos de la presente invención para reducir los efectos patológicos de A β en animales o humanos que sufren enfermedades asociadas con amiloidosis, tales como EA, se describirán con más detalle en los siguientes ejemplos no limitativos. Los Ejemplos 1-5 proporcionan datos para nilvadipina racémica para fines comparativos.

Purificación cromatográfica de Enantiómeros de Nilvadipina

La purificación cromatográfica de ambos enantiómeros de nilvadipina se consiguió mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) usando una fase inmóvil de celulosa modificada (Chiral Technologies, West Chester, PA). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: diámetro interno de columna, 10 mm; longitud de columna, 250 mm; fase móvil, 95:5 proporción volumétrica de hexanos con etanol; velocidad de flujo, 2,5 ml/min; temperatura de columna, 7 °C. Inyección repetida de nilvadipina racémica usando recogida de fracción con base de señal produjo enantiómeros purificados para los ejemplos aquí descritos. Véase Figura 8.

EJEMPLO 1

Administración Crónica de Nilvadipina en deposición de A β (Carga Amiloide)

El efecto de la administración crónica de nilvadipina en deposición de A β (carga amiloide) en diferentes regiones del cerebro de ratones TgAPP_{sw} se examinó usando una técnica de inmunotinción 4G8 de anticuerpo monoclonal anti- A β . La técnica de inmunotinción 4G8 se eligió para determinar la carga de A β debido a su fuerte señal y resultados óptimos para el análisis cuantitativo de deposición de A β . En resumen, las secciones de parafina se sometieron a inmunohistoquímica como se ha descrito previamente (Nakagawa, Y et al., Exp. Neurol., 163:244-252, 2000). A las secciones se les eliminó la parafina en xileno, se hidrataron en una serie de etanol y agua desionizada, y se sometieron a una etapa de recuperación de antígeno sumergiendo secciones en 88% ácido fórmico durante 60 minutos antes de inmunohistoquímica para A β . Las secciones se lavaron en agua, y las peroxidases endógenas se templaron usando una mezcla recién preparada de metanol (150 ml) más peróxido de hidrógeno (33%, 30 ml). El método del complejo avidina-biotina se usó de acuerdo con las instrucciones del vendedor (Vector Laboratories, Burlingame, Calif.). La carga amiloide se evaluó determinando el porcentaje de región cerebral que se tiñó positiva para A β . Los controles negativos incluyeron la aplicación del mismo protocolo de inmunohistoquímica a secciones, excepto que se aplicó suero pre-inmune en lugar de anticuerpo primario. Los ratones TgAPP_{sw} se dividieron en un grupo experimental que recibió una cantidad efectiva de nilvadipina (n=7) y un grupo de control que recibió un vehículo (n=5).

Como se muestra en la FIG. 1, el tratamiento con nilvadipina redujo la carga de A β aproximadamente 62% en la corteza visual en comparación con controles, aproximadamente 65% en la corteza parietal en comparación con controles, aproximadamente 58% en la corteza motora en comparación con controles, aproximadamente 58% en la corteza piriforme en comparación con controles, aproximadamente 52% en la región CA1 del hipocampo en comparación con controles, y aproximadamente 50% en la región CA2-CA3 del hipocampo en comparación con controles.

EJEMPLO 2

Administración Crónica de Nilvadipina en Activación Microglial

El efecto de la administración crónica de nilvadipina en la activación microglial en ratones TgAPP_{sw} se examinó en tres regiones del cerebro del ratón usando una técnica de inmunotinción CD45 en la que se determinó el número de microgliales CD45+.

En resumen, la inmunohistoquímica para CD45, un marcador específico de microgliales, se realizó en la sección del cerebro del criostato. Las células microgliales CD45 positivas se inmunolocalizaron mediante incubación con un anticuerpo monoclonal de ratón contra CD45 (Chemicon International) durante la noche a 4 °C, seguido de la aplicación de un anticuerpo secundario anti-ratón de conejo biotinilado durante 30 minutos. La detección de CD45 se completó con sustrato cromogeno de diaminobencidina, que produce un tinte marón en la superficie celular en células microgliales positivas CD45.

Como se muestra en la FIG. 2, el tratamiento con nilvadipina administrado en una cantidad de dosis efectiva redujo la activación microglial aproximadamente 33% en el hipocampo, aproximadamente 43% en la corteza parietal, y aproximadamente 27% en la corteza motora, cuando se compara con controles.

EJEMPLO 3

El Efecto de Administración de Nilvadipina en Activación Microglial

El efecto de nilvadipina en la activación microglial se examinó en células microgliales murinas N9 in vitro activadas con lipopolisacárido (LPS) durante 24 horas. Las células microgliales murinas N9 son clones microgliales murinos neutralizadores bien caracterizados derivados de cerebro de ratón embrionario. La extensión de activación microglial se determinó mediante la producción de TNF- α (pg/ml) medida por ELISA. Como se muestra en la FIG. 3, las células microgliales no activadas con LPS (células de control) produjeron aproximadamente 40 pg/ml TNF- α . El incremento de administración de nilvadipina 10 veces (500 nM) no cambió la producción de TNF- α . Las células microgliales en presencia de 1 μ g/ml LPS produjo aproximadamente 820 pg/ml TNF- α , un incremento de aproximadamente 95% de las células de control y células a las que se les administró nilvadipina. Las células microgliales en presencia de 1 μ g/ml LPS más 50 nM nilvadipina produjeron aproximadamente 670 pg/ml TNF- α . La administración de LPS más 500 nM nilvadipina descendió la producción de TNF- α a aproximadamente 610 pg/ml. De este modo, la nilvadipina se opuso a la activación microglial inducida por LPS en aproximadamente 20 a 35%.

EJEMPLO 4

El Efecto de Administración de Nilvadipina en Neurotoxicidad de A β

El efecto de la administración de nilvadipina (10 nM y 100 nM) en neurotoxicidad de A β se examinó usando células progenitoras neuronales humanas (HNPC) tratadas durante tres días con 30 μ M de A β 1-40 pre-agregado (Ag A β). Las células HNPC se diferencian en neuronas fácilmente después de tratamiento con AMP cíclico. AMP cíclico (1 mM) (Sigma) se añadió al medio de cultivo y las células HNPC se incubaron a 37 °C durante 48 horas o más bajo condiciones libres de suero. Este medio permitió la diferenciación de los progenitores en células de linaje neuronal, como se confirmó con la tinción de la mayoría de las células con anticuerpos contra la proteína asociada con el microtúbulo, MAP-2. La neurotoxicidad se evaluó midiendo la cantidad de deshidrogenasa láctica (DHL; una enzima intracelular encontrada en todas las células) liberada de las células.

Como se muestra en la FIG. 4, el tratamiento de las células con AgA β produjo aproximadamente un incremento del 44% en liberación de DHL en comparación con el tratamiento de las células con nilvadipina. No hubo cambio en la liberación de DHL cuando se añadieron 10 nM de nilvadipina junto con AgA β . Sin embargo, cuando la cantidad de dosis de nilvadipina aumento 10 veces a 100 nM, la cantidad de DHL descendió en aproximadamente 44%.

EJEMPLO 5

El Efecto de Administración de Nilvadipina en el Procesamiento de PPA

El efecto de nilvadipina en el procesamiento de PPA se examinó usando células de glioblastoma humano transfectadas con APP_{sw}. Las células se trataron con 50 nM y 250 nM nilvadipina durante 24 y 48 horas, y la

producción de A β 1-40 en el medio de cultivo se midió usando un ELISA A β 1-40 humano comercialmente disponible (Biosource, CA).

5 Como se muestra en la FIG. 5 A, después de 24 horas de tratamiento, 50 nM de nilvadipina redujeron la producción de A β 1-40 en aproximadamente 91%, y 250 nM de nilvadipina redujeron la producción de A β 1-40 en aproximadamente 15%. Después de 48 horas de tratamiento (FIG. 5B), 50 nM de nilvadipina redujeron la producción de A β 1-40 en aproximadamente 18%, y 250 nM de nilvadipina redujeron la producción de A β 1-40 en aproximadamente 5%.

10 EJEMPLO 6

El Efecto de Variar Dosis de Enantiómeros Racémicos y Aislados de Nilvadipina en Niveles A β .

15 El efecto de formas enantioméricas puras de nilvadipina, (-)-nilvadipina (nilvadipina 1) y (+)-nilvadipina (nilvadipina 2) (FIG. 8) así como una mezcla de los dos enantiómeros (en igual proporción) en la producción de A β 1-40 y A β 1-42 se examinó usando células de ovarios de hámster chino 7W WT APP751 después de un tratamiento de 24 horas. La producción de A β 1-40 y A β 1-42 en el medio de cultivo se midió usando un ELISA A β 1-40 humano comercialmente disponible (Biosource, CA) y ELISA A β 1-42 humano comercialmente disponible (Biosource, CA), respectivamente.

20 Como se muestra en la FIG. 6, ambos enantiómeros parecen inhibir dependientemente de la dosis la producción de A β 1-40 de una manera similar. Sin embargo, la (+)-nilvadipina (nilvadipina 2) así como la mezcla racémica de nilvadipina (N1-N2) estimulan ligeramente A β 1-42 en dosis bajas mientras (-)-nilvadipina (nilvadipina 1) no muestra este efecto (FIG. 7).

25 EJEMPLO 7

Efecto de Enantiómeros Aislados de Nilvadipina en Vasoconstricción en Aortas de Ratas

30 Se examinó el efecto de formas enantioméricas puras de nilvadipina, (-)-nilvadipina (nilvadipina 1) y (+)-nilvadipina (nilvadipina 2) (FIG. 8) en vasoconstricción inducida por FPL64176 en aortas de ratas. Ratas machos normales Sprague-Dawley (de 7-8 meses de edad) fueron sometidas a eutanasia humanamente, y las aortas de las ratas recién diseccionadas se segmentaron en anillos de 3 mm en tampón de Krebs en ganchos en un aparato de baño en recipiente. Estos ganchos se conectaron a un transductor isométrico unido a un sistema MacLab. Los anillos aórticos se equilibraron en el sistema del baño de tejido durante 2 horas con el tampón de Krebs cambiado cada 30 minutos. Una tensión de referencia de 2 g se aplicó a cada anillo aórtico. Los anillos aórticos se pre-trataron con 100 nM de (-)-nilvadipina (nilvadipina 1), 100 nM de (+)-nilvadipina (nilvadipina 2) o no se trataron durante 2 minutos antes de la adición de 1 μ M de FPL64176 (2,5-dimetil-4[2-(fenilmetil)benzoil]-1H-pirrol-3-ácido carboxílico éster metilo), un agonista potente y selectivo de canales de calcio de tipo L. Los anillos aórticos se apretaron con FPL64176 durante 30 minutos. Se determinó la cantidad de contracción (en g) en comparación con la referencia y se calcularon los medios y desviación estándar de tales valores.

45 Como se muestra en la FIG. 9, (+)-nilvadipina antagoniza por completo la vasoconstricción inducida por FPL64176 mientras que (-)-nilvadipina no produce el efecto vasoactivo del agonista de canal de calcio de tipo L que muestra que la (+)-nilvadipina es un bloqueador del canal de calcio de tipo L mientras que (-)-nilvadipina está privado de tal efecto. Los datos aquí presentados demuestran la contracción aórtica de referencia cuando se desafió con FPL64176 para el (-)-enantiómero, lo que se correlaciona con la vasoactividad reducida para el (-)-enantiómero en comparación con la mezcla racémica de (+)-enantiómero que muestra vasoactividad (esto es, antagonismo de vasoconstricción inducida).

50 EJEMPLO 8

El Efecto de (-)-Nilvadipina en Niveles Cerebrales de A β

55 Se examinó el efecto de (-)-nilvadipina aislada en niveles cerebrales A β 1-40 y A β 1-42. A ratones APP_{sw} machos transgénicos de 93 semanas de edad (Tg APP_{sw} línea 2576) se les inyectó intraperitonealmente diariamente 10 mg/kg de peso corporal de (-)-nilvadipina disuelta en DMSO (n=4) o con el mismo volumen (n=4) de vehículo (100 β L). Después de 4 días de tratamiento, los animales fueron sometidos a eutanasia humanamente una hora después de la inyección, se recogieron sus cerebros y se partieron congelados en nitrógeno líquido. Los cerebros fueron homogenizados a 4 °C en agua destilada que contenía 1X del cocktail IV de inhibidores de proteasa (Calbiochem, CA) y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. La bolita se volvió a suspender con un volumen igual de Guanidina 5 M disuelta en Tampón Tris HCl (pH=8) y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Se determinaron las concentraciones de proteína en las muestras tratadas con guanidina con el método BCA (Biorad, CA). Se evaluaron los niveles de A β 1-40 y A β 1-42 mediante ELISA (Biosource, CA) y los resultados se presentaron en pg de A β 1-40 y A β 1-42 por mg de proteína.

Como se muestra en la FIG. 10, la administración de (-)-nilvadipina a ratones TgAPP_{sw} en una dosis de 10 mg/kg de peso corporal al día durante cuatro días dio como resultado un descenso del 26% en los niveles cerebrales de A β 1-42 (pg/ml) y un descenso del 43% en los niveles cerebrales de A β 1-40, en comparación con los animales de control

5

EJEMPLO 9

El Efecto de una Liberación Lenta de (-)-Nilvadipina en Niveles Cerebrales de A β

El efecto de una liberación lenta de (-)-nilvadipina en niveles cerebrales de A β 1-42. A Tg APP_{sw} de 66 semanas de edad (Tg APP_{sw} línea 2576) se les implantó subcutáneamente una bolita biodegradable de (-)-nilvadipina asegurando una liberación lenta continua de 30 mg de (-)-nilvadipina/kg de peso corporal/día (n=5), una bolita biodegradable de (-)-nilvadipina asegurando una liberación de 56 mg/Kg/Día (N=6), o una bolita que liberaba un placebo (n=6) durante un periodo de 30 días. Los animales fueron sometidos a eutanasia humanamente 26 días después de la implantación de la bolita, se recogieron sus cerebros y se partieron congelados en nitrógeno líquido. Los cerebros fueron homogenizados a 4 °C en agua destilada que contenía 1X del cocktail IV de inhibidores de proteasa (Calbiochem, CA) y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se volvió a suspender con un volumen igual de Guanidina 5 M disuelta en Tampón Tris HCl (pH=8) y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Se determinaron las concentraciones de proteína en las muestras tratadas con guanidina con el método BCA (Biorad, CA). Se evaluaron los niveles de A β 1-42 mediante ELISA (Biosource, CA) y los resultados se presentaron en pg de A β 1-42 por mg de proteína.

10

15

20

25

Como se muestra en la FIG. 11, la administración de (-)-nilvadipina en liberación lenta a ratones TgAPP_{sw} dio como resultado una doble reducción en el nivel de A β 1-42 cerebral para los ratones a los que se les dio una dosis de bolita en liberación lenta de 30 mg/Kg/Día de (-)-nilvadipina mientras que se observó una reducción de 2,5 veces en A β 1-42 en los animales tratados con una bolita de liberación lenta

De 56 mg/Kg/Día en comparación con ratones a los que se les implantó una bolita placebo.

30

EJEMPLO 10

El Efecto de (-)-Nilvadipina en el Despeje de Niveles Cerebrales de A β en la Barrera Hematoencefálica*Modelo In Vitro*

El efecto de (-)-nilvadipina en el despeje de niveles cerebrales de A β en la Barrera Hematoencefálica (BHE) se examinó usando un modelo *in vitro* e *in vivo*. El modelo *in vitro* se muestra en la FIG. 12. El medio de cultivo celular endotelial (MCE, ScienCell Research Laboratories) que contenía 2 μ M fluoresceína- β -amiloide (1-42) (3) se colocó en el compartimento basolateral (donante). El lado apical (receptor) de la membrana se expuso a varios compuestos de dihidropiridina (DHP) (1, 5, y 10 μ M) en MCE (2). Se tomó una muestra del compartimento del donante en el tiempo 0 para establecer la concentración inicial de fluoresceína- β -amiloide (1-42) en cada grupo. Después de la exposición del inserto al pozo que contenía la amiloide fluorescente, las muestras se recogieron del compartimento apical en varios puntos en el tiempo hasta 90 minutos (1) para evaluar el movimiento de fluoresceína- β -amiloide (1-42) en la monocapa de la célula endotelial microvascular del cerebro humano (CEMCH) (4) (basolateral a apical). Las muestras se analizaron (λ_{ex} = 485nm y λ_{em} = 516 nm) para fluoresceína- β -amiloide (1-42) usando un lector de microplaca multi-detección BioTek Synergy HT (Winooski, VT). La permeabilidad aparente (Pap) de fluoresceína- β -amiloide (1-42) se determinó usando la ecuación $Pap = 1/AC0 * (dQ/dt)$, donde A representa el área de superficie de la membrana, C0 es la concentración inicial de fluoresceína- β -amiloide (1-42) en el compartimento del donante basolateral, y dQ/dt es la cantidad de fluoresceína- β -amiloide (1-42) que aparece en el compartimento del receptor apical en el periodo de tiempo dado (polli). La Pap de fluoresceína- β -amiloide (1-42) en presencia de (-)-nilvadipina se comparó con pozos de control y se expresaron como un porcentaje.

35

40

45

50

Como se muestra en la FIG. 13, (-)-nilvadipina dependientemente de dosis estimula el transporte de A β del lado del cerebro (B) al lado periférico (A) en un modelo *in vitro* de la barrera hematoencefálica.

55

El modelo *in vitro* también se uso para examinar el efecto *in vitro* de (-)-nilvadipina contra mezcla racémica de nilvadipina en el despeje de A β cerebral en BHE. En estos experimentos se usó un protocolo similar al descrito anteriormente, siendo las diferencias principales la adición de una mezcla racémica para comparación. Como se muestra en la FIG. 14, tanto (-)-nilvadipina como mezcla racémica de nilvadipina dependientemente de dosis estimulan el transporte de A β en la barrera hematoencefálica del lado del cerebro (B) a la periferia (A) en un modelo *in vitro*.

60

Modelo In Vivo

El efecto de (-)-nilvadipina en el despeje de niveles cerebrales de A β en la BHE se examinó usando un modelo *in vivo*. Ratones hembra B6/SJL de tipo salvaje fueron anestesiados mediante inhalación usando una mezcla 3% isoflurano/oxígeno. Mientras duró la anestesia, a los ratones se les inyectó un vehículo (DMSO) o (-)-nilvadipina

65

intraperitonealmente (i.p). Cinco minutos después de la inyección i.p, a los ratones se les inyectó estereotáxicamente 3 μ l de β -amiloide humana (1-42) (1 mM en DMSO) en la región intra-ventricular del cerebro (3 mm posterior y 1,0 mm lateral del bregma y 4 mm por debajo de la superficie del cerebro). Diez minutos después de la inyección de β -amiloide humana (1-42), los ratones fueron sometidos a eutanasia. Las muestras de plasma se recogieron y analizaron para β -amiloide humana (1-42) usando un ELISA sándwich para β -amiloide humana (1-42). El nivel de β -amiloide humana (1-42) en las muestras de plasma recogidas de los ratones tratados con (-)-nilvadipina se comparó con el de aquellos que recibieron solamente el vehículo. Además, se realizaron experimentos similares usando animales a los que se les implantó subcutáneamente una bolita biodegradable de (-)-nilvadipina o un placebo y que recibieron la inyección cerebral de A β 1-42 13 días después de la implantación de la bolita. Todos los experimentos que usaron animales se realizaron bajo protocolos aprobados por el Comité Institucional Para el Cuidado y Uso de Animales.

Como se muestra en la FIG. 15, tanto la mezcla racémica de nilvadipina como la (-)-nilvadipina aumentan el transporte de A β en la barrera hematoencefálica *in vivo*. (-)-nilvadipina en 2 mg/Kg de peso corporal estimula el despeje de A β del cerebro a la sangre en 2 veces y en 4 veces en una dosis de 5 mg/Kg de peso corporal mientras que la mezcla racémica de nilvadipina aumenta el despeje en 4 veces en una dosis de 23 mg/Kg de peso corporal.

La FIG. 16 es un gráfico de barras que ilustra el efecto de (-)-nilvadipina en el despeje de niveles cerebrales de A β en la BHE usando animales a los que se les implantó subcutáneamente una bolita biodegradable de (-)-nilvadipina o un placebo y que recibieron una inyección intracerebral de A β 1-42 13 días después de la implantación de la bolita. Como se muestra en la FIG. 16, una liberación lenta de (-)-nilvadipina asegurada por una bolita biodegradable en una dosis de 30 mg/Kg de peso corporal/Día aumenta el despeje de A β intracerebral en 3 veces con comparación con los ratones de control a los que se les implantó una bolita de placebo.

Estos estudios *in vitro* e *in vivo* del efecto de (-)-nilvadipina en el despeje de niveles de A β cerebral en la Barrera Hematoencefálica (BHE) revelan un resultado terapéuticamente relevante. Los datos sugieren que el efecto de (-)-nilvadipina sobre el despeje es para aumentar la migración de A β cerebral en BHE. Esto surge del incremento observado en los niveles de suero de A β después de la administración de (-)-nilvadipina.

Como se muestra en las FIGS. 17 A y B, (-)-nilvadipina puede administrarse en una dosis mucho mayor en el modelo de aorta de rata FPL64176 de vasoconstricción antes de mostrara propiedades vasoactivos en comparación con (+)-nilvadipina.

Conclusiones Generales

En relación con los efectos de los diferentes enantiómeros de nilvadipina, ambos enantiómeros parecen inhibir dependientemente de la dosis la producción de A β 1-40 de una manera similar, aunque (+)-nilvadipina y nilvadipina racémica estimulan ligeramente A β 1-42 en dosis bajas. El efecto de (-)-nilvadipina en A β 1-42 es inferior y no es estadísticamente significativo. Véase, por ejemplo, las Figuras 6 y 7. También se descubrió sorprendentemente que (+)-nilvadipina antagoniza por completo vasoconstricción inducida por FPL64176 mientras que (-)-nilvadipina no antagoniza la vasoconstricción inducida por FPL64176 del agonista de canal de calcio de tipo L. Los datos aquí presentados demuestran la contracción aórtica de referencia cuando se desafió con FPL64176 para el (-)-enantiómero, que se correlaciona con la vasoactividad reducida para el (-)-enantiómero en comparación con la mezcla racémica o (+)-enantiómero que muestran vasoactividad (esto es, antagonismo de vasoconstricción inducida). Una evaluación de la influencia de (-)-nilvadipina en los niveles cerebrales de A β muestra que la administración de (-)-nilvadipina (10 mg/kg peso corporal al día) produce un descenso del 26% en los niveles cerebrales de A β 1-42 (pg/ml), y un descenso del 43% en los niveles del cerebro de A β 1-40, en ratones TgAPP_{sw} después de solamente cuatro días de tratamiento. Como se muestra en la FIG. 11, la administración de (-)-nilvadipina en liberación lenta a ratones TgAPP_{sw} durante 26 días dio como resultado una reducción a la mitad en el nivel de cerebro A β 1-42 para los ratones a los que se les suministró la dosis de una bolita de liberación lenta de 30 mg/Kg/Día de (-)-nilvadipina mientras que se observó una reducción de 2,5 en A β 1-42 en los animales tratados con una bolita de liberación lenta de 56 mg/Kg/Día en comparación con los ratones a los que se les implantó una bolita de placebo.

Los estudios *in vitro* e *in vivo* del efecto de (-)-nilvadipina en el despeje de niveles cerebrales de A β en la Barrera Hematoencefálica (BHE) también produce resultados inesperados y favorables. Los datos sugieren que el efecto de (-)-nilvadipina en este despeje es para incrementar la migración de A β cerebral a la BHE. Esto surge del incremento observado en niveles de suero de A β después de la administración de (-)-nilvadipina.

En vista de los datos anteriores, puede extrapolarse que la administración de (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida a animales o humanos que sufren una enfermedad amiloidogénica cerebral, tal como EA, puede disminuir de manera significativa la cantidad de deposición de A β en regiones críticas del cerebro que demuestran característicamente una abundancia de tales depósitos patológicos así como reducir la cantidad de A β ya depositado en el cerebro sin afectar de manera innecesaria a la presión arterial u otros posibles efectos secundarios. Además, la administración de (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida puede oponerse a efectos neurotóxicos de A β , efectos que se cree que son responsables de la extendida y devastadora destrucción

neuronal vista con EA, así como reducir la activación microglial que provoca la respuesta inflamatoria característica vista en los cerebros de pacientes de EA con reducidos efectos secundarios. Finalmente, el tratamiento con (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida puede reducir la concentración de A β ya depositado en cerebros de animales o humanos que sufren enfermedades amiloidogénicas cerebrales tales como EA sin provocar efectos secundarios no deseados.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** (-)-Nilvadipina enantioméricamente enriquecida para su uso en un método para reducir la deposición de A β , neurotoxicidad de A β y microgliosis en un animal o humano que sufre una enfermedad o condición amiloidogénica cerebral.
- 10 **2.** (-)-Nilvadipina enantioméricamente enriquecida para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la enfermedad o condición amiloidogénica cerebral se selecciona del grupo consistente en enfermedad de Alzheimer, lesión cerebral traumática y angiopatía amiloide cerebral.
- 15 **3.** (-)-Nilvadipina enantioméricamente enriquecida para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida se administra entre 0,05-20 mg por día.
- 20 **4.** (-)-Nilvadipina enantioméricamente enriquecida para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida se administra entre 16 mg y la máxima dosis tolerada.
- 25 **5.** (-)-Nilvadipina enantioméricamente enriquecida para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el enriquecimiento enantiomérico es superior al 95%.
- 30 **6.** (-)-Nilvadipina enantioméricamente enriquecida para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida se administra durante toda la vida del animal o humano.
- 35 **7.** (-)-Nilvadipina enantioméricamente enriquecida para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida se administra en una forma de dosis de unidad que se selecciona del grupo consistente en cápsulas duras o blandas con armazón de gelatina, comprimidos, trociscos, bolsitas, pastillas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, polvos, soluciones y emulsiones.
- 40 **8.** (-)-Nilvadipina enantioméricamente enriquecida para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la (-)-nilvadipina enantioméricamente enriquecida se administra mediante administración parenteral, oral o intraperitoneal.
- 45 **9.** Una composición farmacéutica que comprende nilvadipina ópticamente activa y un transportador farmacéuticamente aceptable, donde la composición farmacéutica tiene un exceso enantiomérico de (-)-nilvadipina en relación con (+)-nilvadipina de 90% o más y es una forma de dosis de unidad envuelta en cápsulas duras o blandas de gelatina o comprimida en comprimidos.
- 50
- 55
- 60
- 65

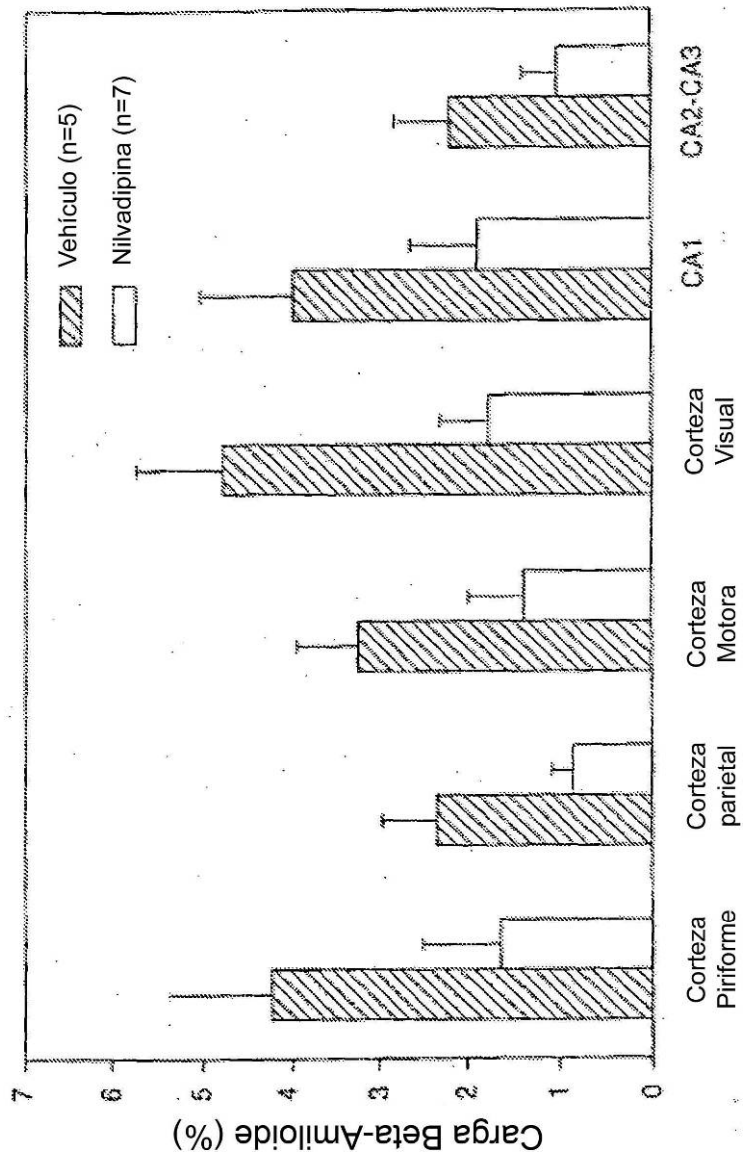


FIG. 1

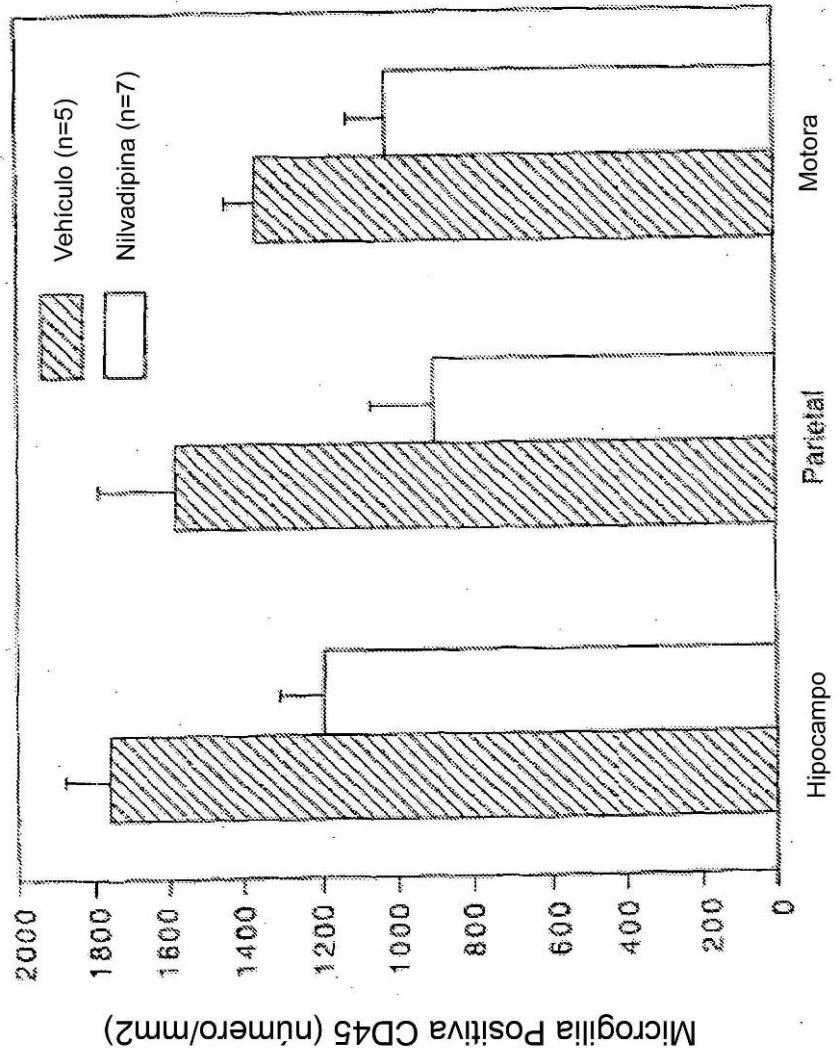


FIG. 2

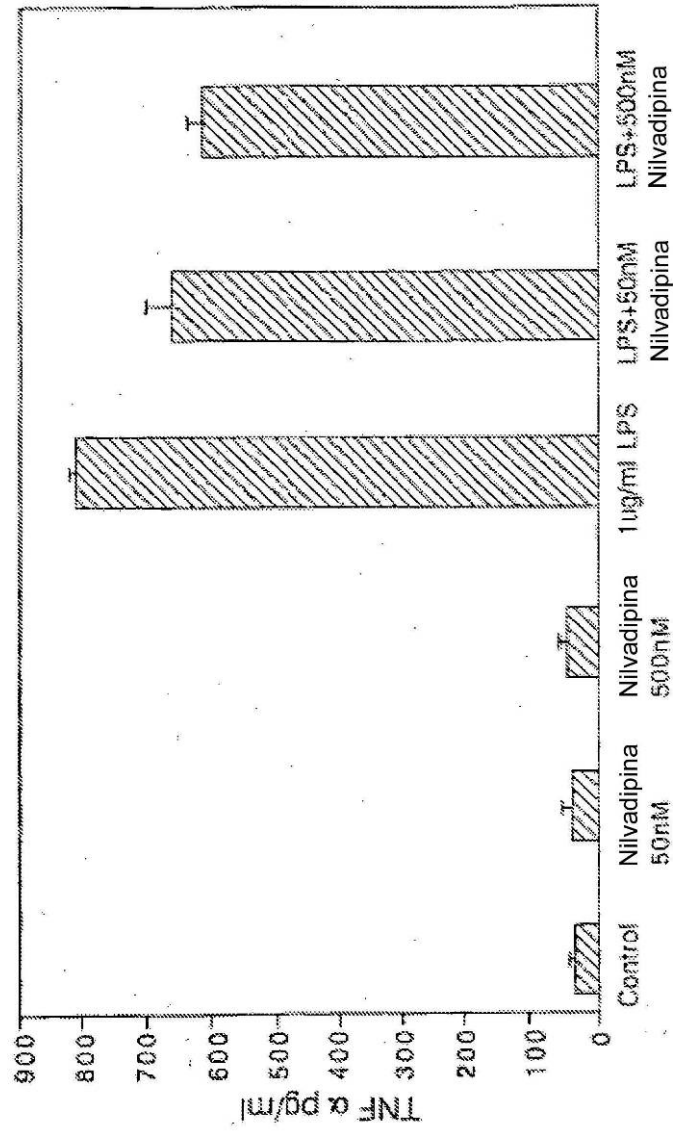


FIG. 3

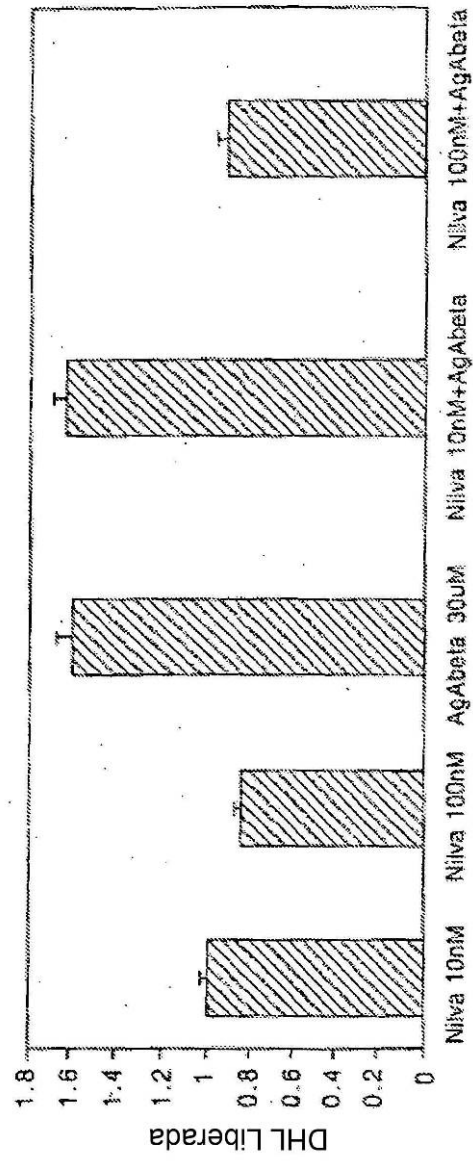


FIG. 4

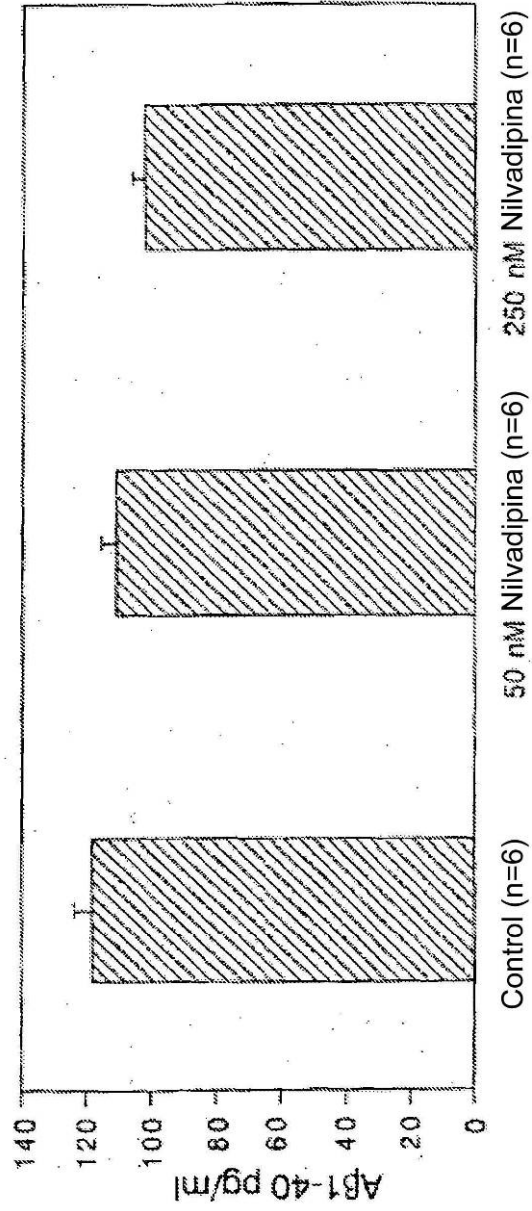


FIG. 5A

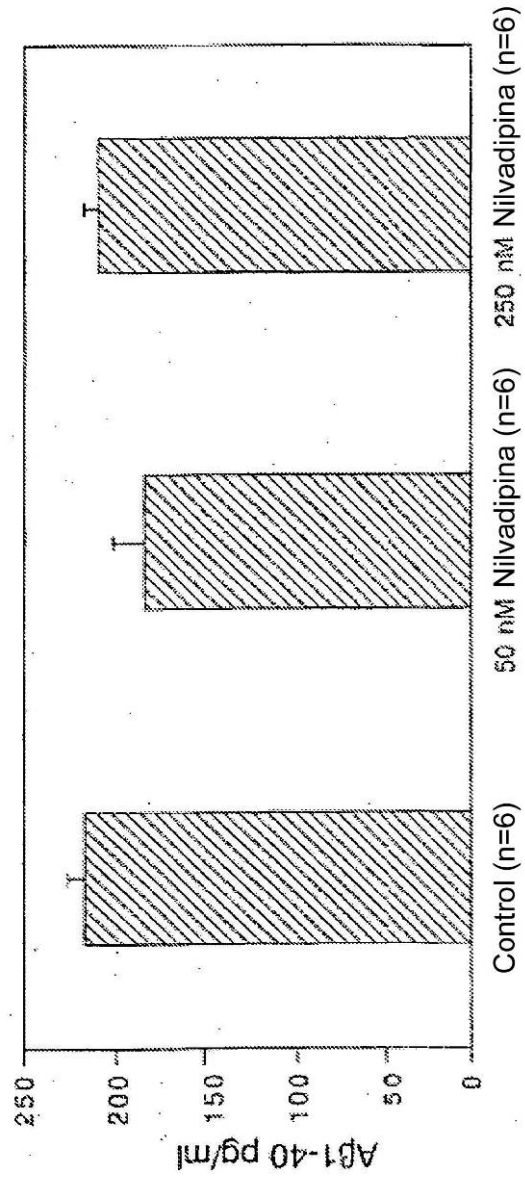


FIG. 5B

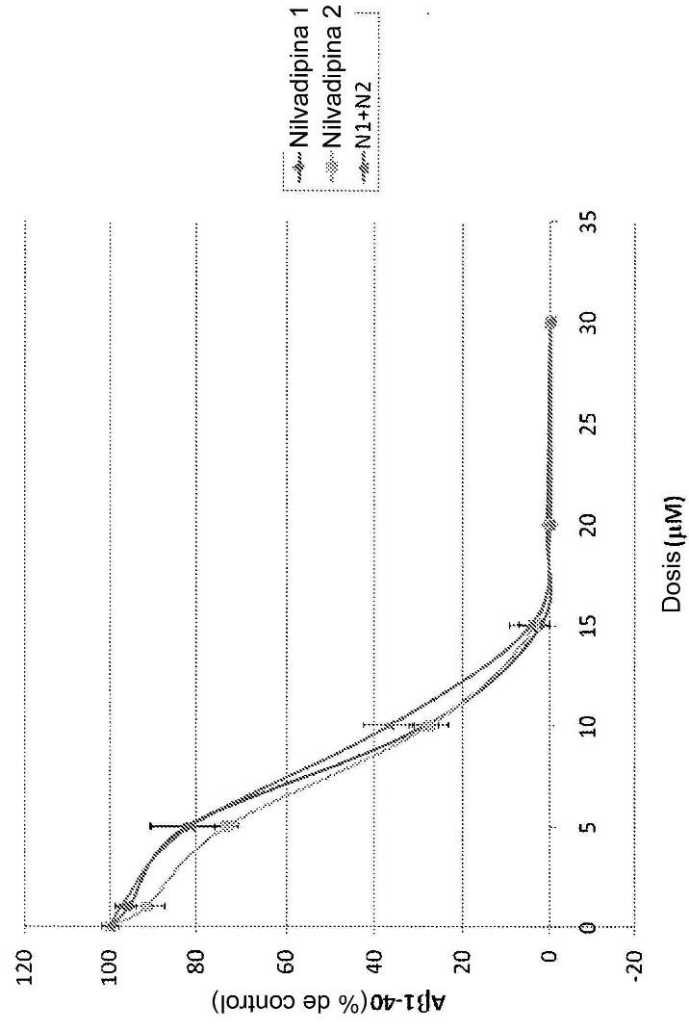


FIG. 6

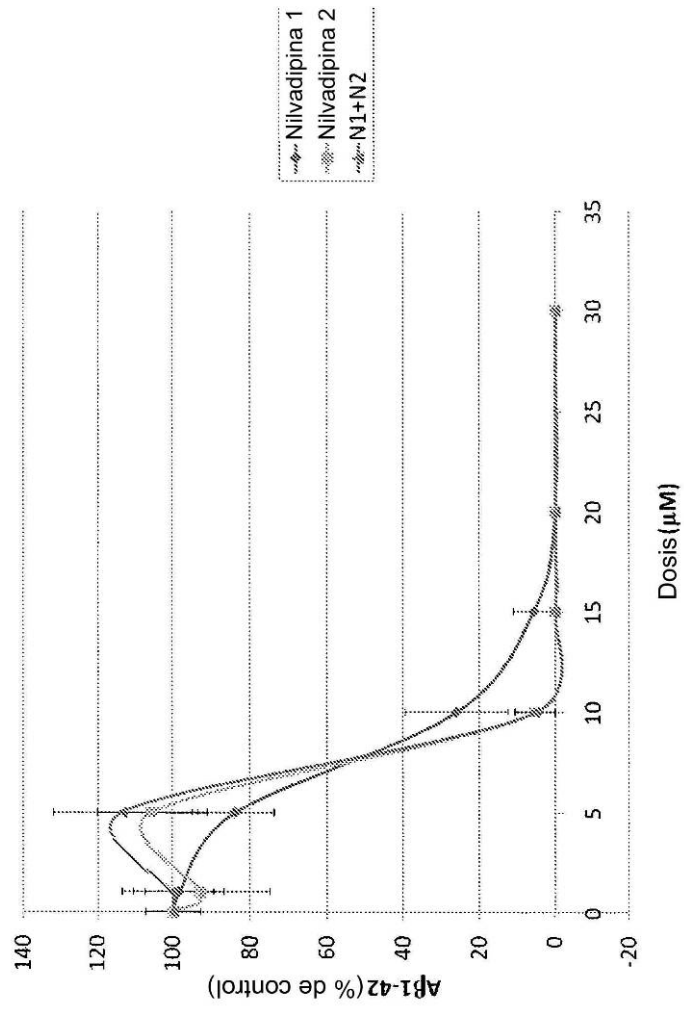


FIG. 7

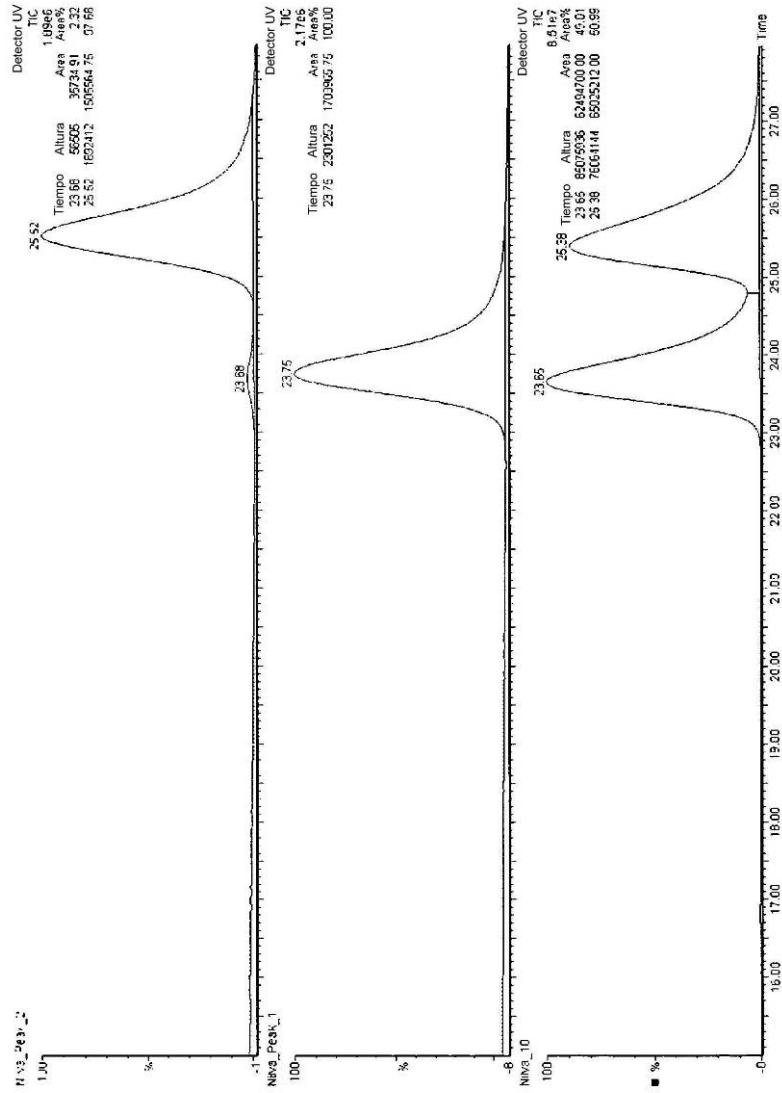


FIG. 8

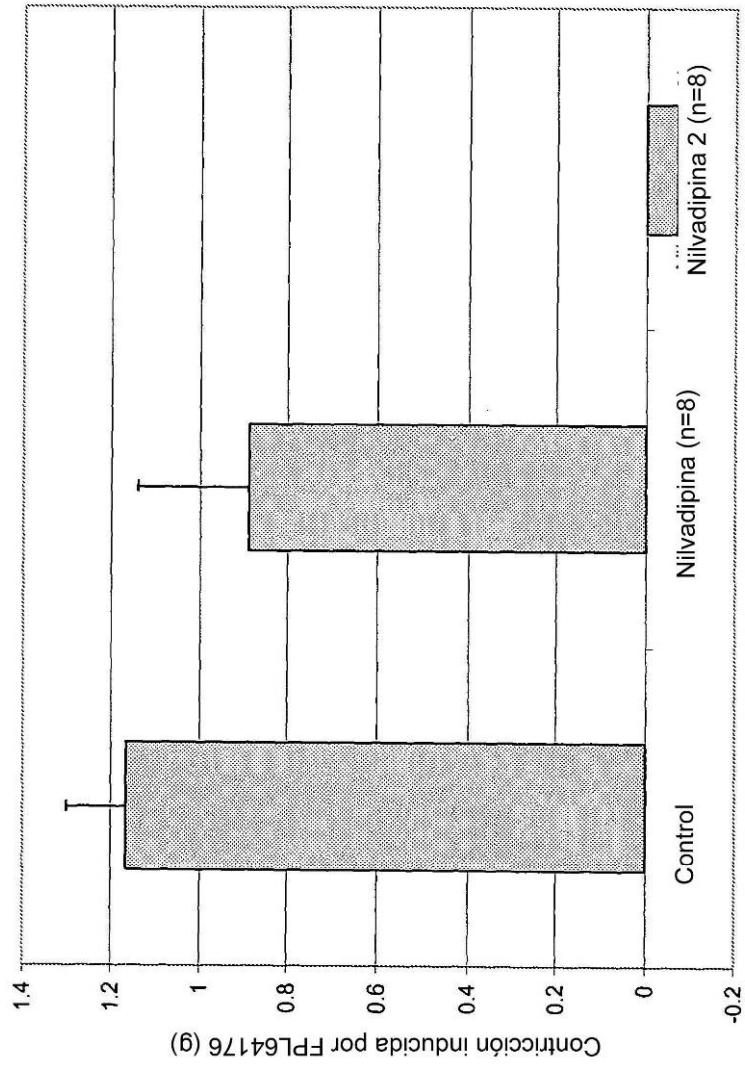


FIG. 9

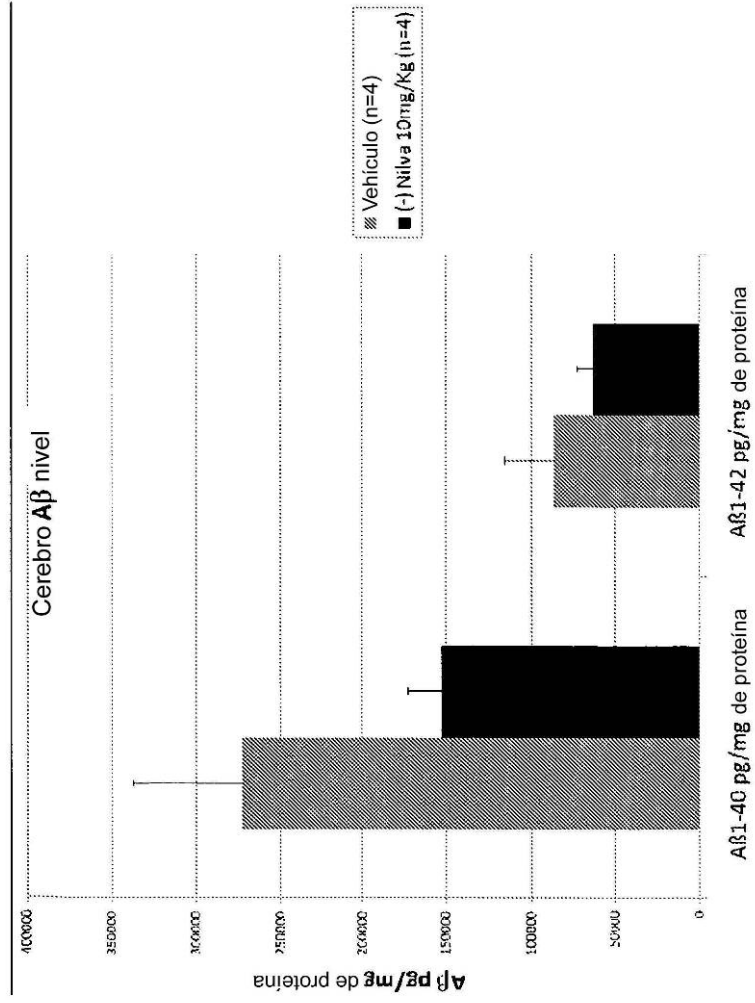


FIG. 10

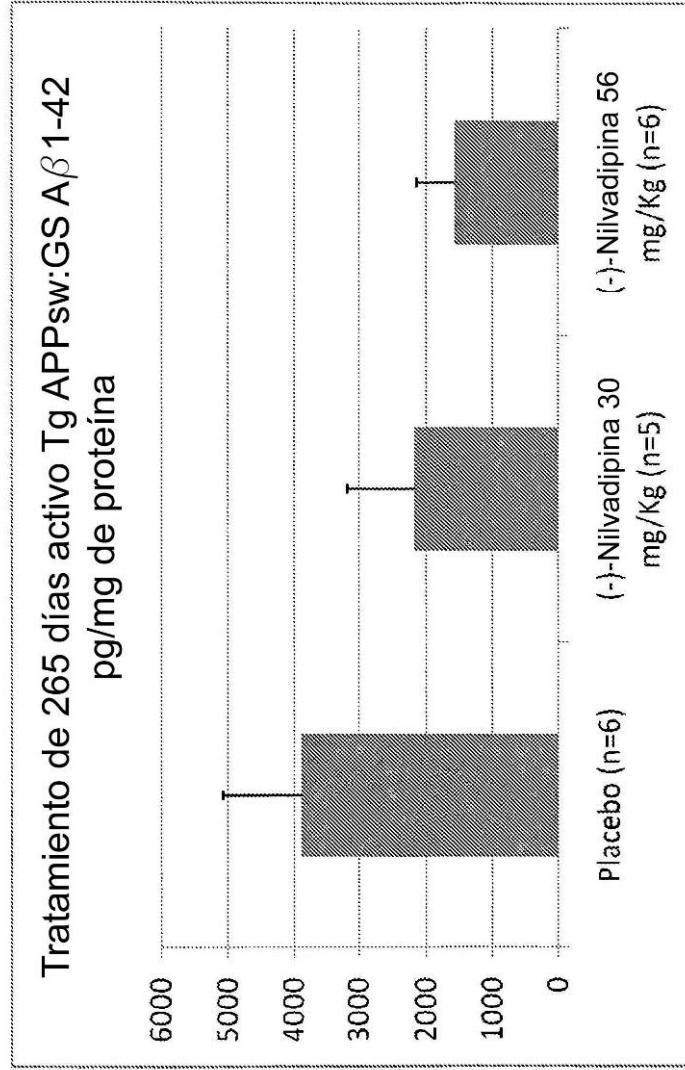
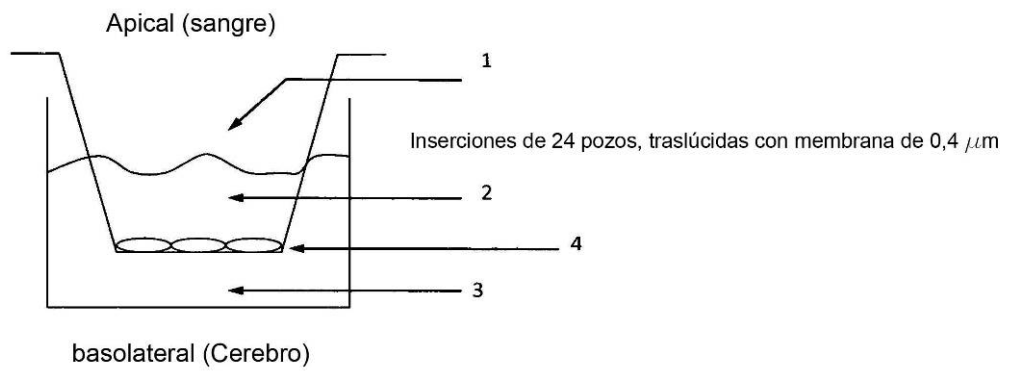


FIG. 11

FIG. 12



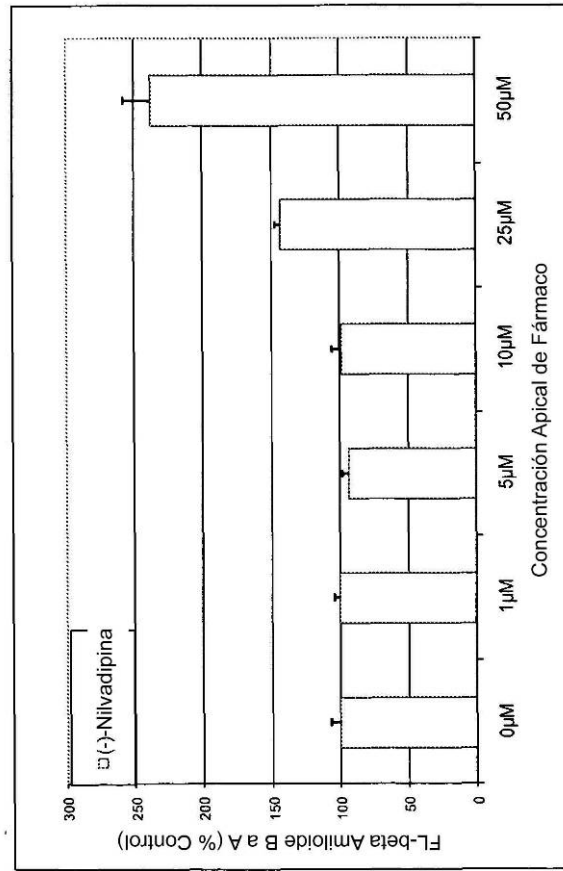


FIG. 13

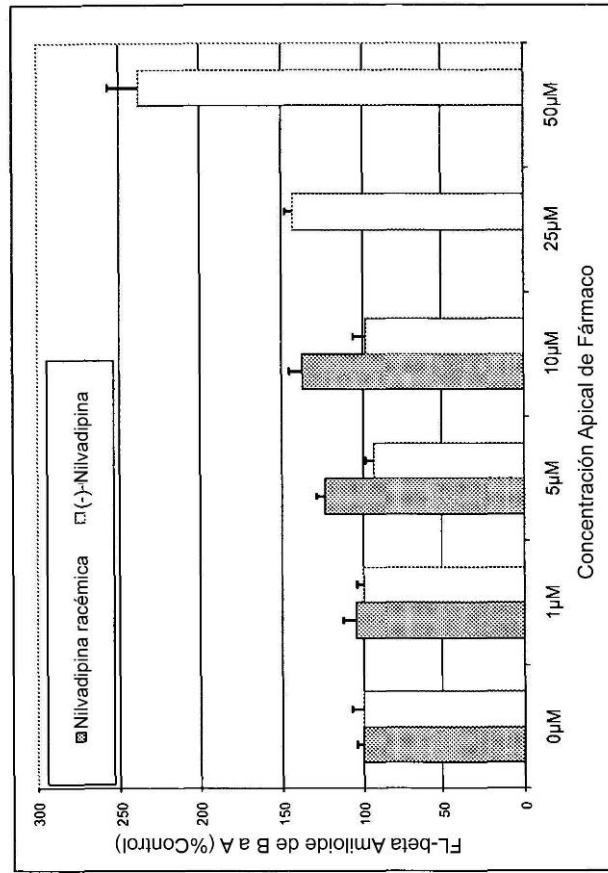


FIG. 14

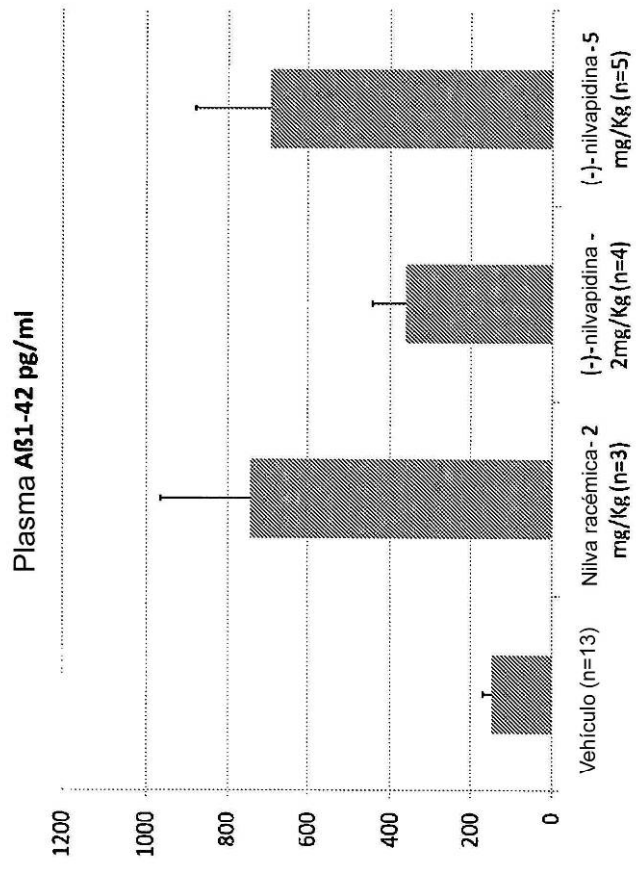


FIG. 15

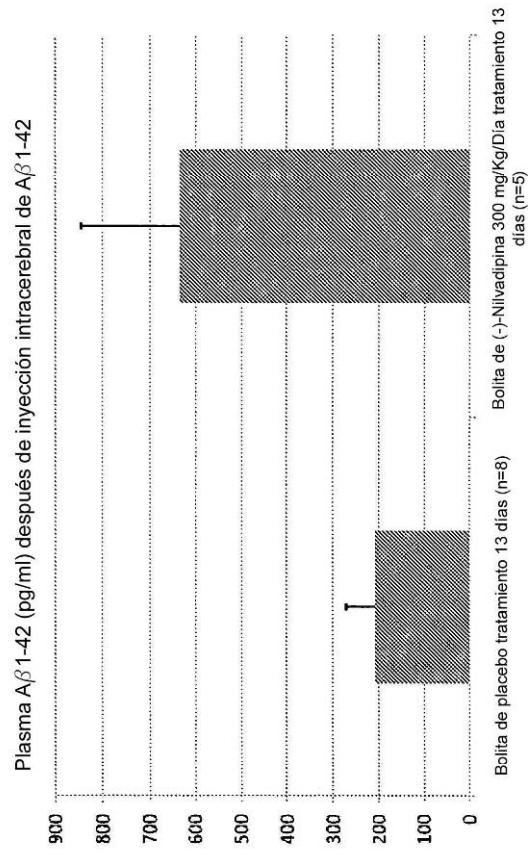


FIG. 16

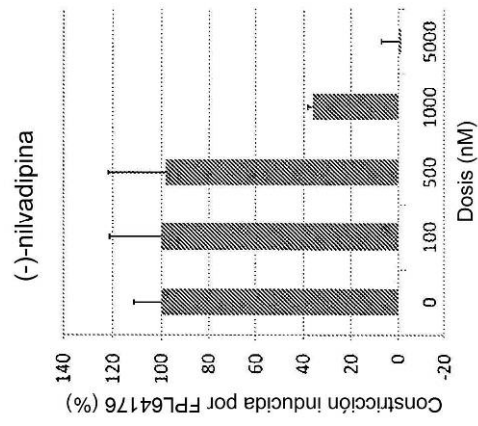


FIG. 17B

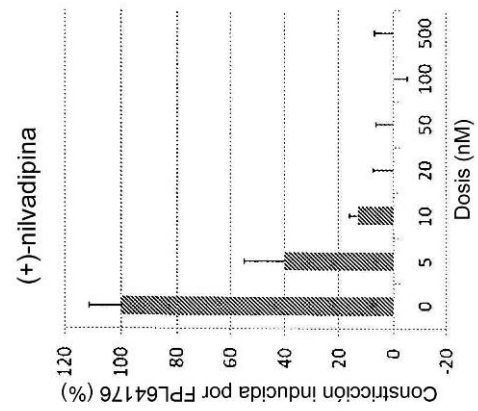


FIG. 17 A