

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 501 565**

51 Int. Cl.:

A61K 31/427 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 27/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2009 E 09735906 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014 EP 2276485**

54 Título: **Uso de epotilona D en el tratamiento de enfermedades asociadas a Tau incluyendo enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

24.04.2008 US 47729

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

02.10.2014

73 Titular/es:

**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road P.O. Box 4000
Princeton, NJ 08543-4000, US**

72 Inventor/es:

**ALBRIGHT, CHARLES F.;
BARTEN, DONNA MARIE y
LEE, FRANCIS Y.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 501 565 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

Uso de epotilona D en el tratamiento de enfermedades asociadas a Tau incluyendo enfermedad de Alzheimer

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, en general, a epotilona D para su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas a Tau y más específicamente, en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Antecedentes de la invención

10 La enfermedad de Alzheimer (AD) es la forma más común de demencia, afectando según se estima a 27 millones de personas en todo el mundo en 2006. La edad es el mayor factor de riesgo conocido para la AD con una incidencia del 25-50 % en personas de edad de 85 años o mayores. A medida que se incrementa la edad media de la población, se espera que el número de pacientes con AD aumente exponencialmente. La AD es la quinta causa principal de muerte en personas de 65 años de edad o mayores y la mayoría de los pacientes necesitan eventualmente cuidados asistenciales en el hogar. Por consiguiente, la AD tiene un impacto económico enorme, por ejemplo, los costes directos e indirectos estimados para 2005 solamente en los Estados Unidos fueron de 148.000 millones de dólares. Además de los costes económicos, la AD tiene un impacto devastador sobre los pacientes y los miembros de sus familias, causando una grave angustia emocional y confusión.

20 Se diagnostica a los pacientes probable AD en base a la presencia de demencia con empeoramiento progresivo de la memoria y de otras funciones cognitivas y con la exclusión de otras causas de demencia. Un diagnóstico de AD solamente puede confirmarse post mortem ya que el diagnóstico clínico se basa en neuropatología del cerebro, específicamente, el diagnóstico requiere una evaluación del tejido cerebral, incluyendo la existencia y concentración de placas extracelulares en el cerebro, marañas intracelulares y neurodegeneración cerebral. La demencia es también una parte requerida del diagnóstico, dado que las placas y las marañas se observan también en adultos normales cognitivamente, aunque usualmente en un menor grado.

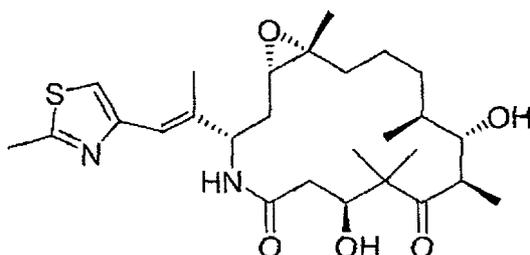
25 Están actualmente aprobadas para la AD dos clases de medicamentos, inhibidores de colinesterasa y un antagonista de ácido N-metil-D-aspártico (NMDA). Aunque estas dos clases de productos terapéuticos muestran algún beneficio clínico, muchos pacientes no responden y estos fármacos solo mejoran los síntomas de la AD (por ejemplo, función cognitiva) con escasa o nula modificación de la progresión de la enfermedad. Por estas razones, la identificación de productos terapéuticos modificadores de esta devastadora enfermedad es un objetivo principal de la industria farmacéutica.

30 Los estabilizadores de microtúbulos se han sugerido como terapias para tratar tauopatías incluyendo AD. Véase, por ejemplo, Lee y col. (lista de referencias, *infra*). En la Patente de los Estados Unidos 5.580.898, presentada en mayo de 1994 y concedida el 3 de diciembre de 1996, a Trojanowski y col. se sugiere el uso de paclitaxel (TAXOL®) para tratar pacientes que sufren de AD mediante la estabilización de los microtúbulos. El paclitaxel ha probado ser altamente eficaz como agente estabilizador de microtúbulos en el tratamiento de pacientes de cáncer; sin embargo, presenta penetración cerebral y establece neuropatía periférica cuando se considera para AD (descrito adicionalmente más adelante) y no ha surgido como una terapia viable para tratar AD.

40 En 1995, se comunicó que epotilona B ejerce efectos estabilizadores de microtúbulos similares a paclitaxel (Bollag y col. 1995). La epotilona A y la epotilona B son compuestos que se dan en la naturaleza que se aislaron por Hofle y col. a partir de productos de fermentación del microorganismo *Sorangium cellulosum* (por ejemplo, documento WO 93/10121). Hofle y col. también descubrieron 37 variantes naturales de epotilona y compuestos relacionados producidos por *S. cellulosum* y cepas modificadas, incluyendo epotilonas C, D, E, F y otros isómeros y variantes (por ejemplo, Patente de los Estados Unidos N.º: 6.624.310).

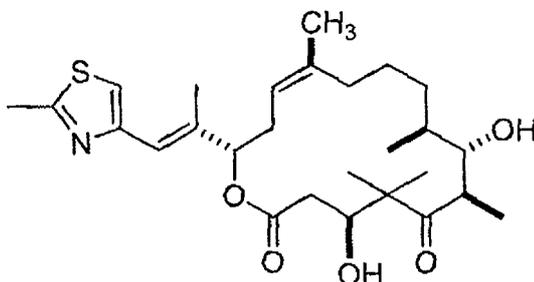
45 Las características únicas de las epotilonas naturales generaron mucho interés en su exploración como fármacos anticancerígenos potenciales. Ahora, han pasado cerca de veinte años desde el primer descubrimiento de las epotilonas naturales A y B. Se han descubierto cientos de análogos de epotilona y se han descrito en diversas solicitudes de patente y se ha publicado bibliografía abundante con el título, "epotilonas" (Véase, por ejemplo, Altmann y col., lista de referencias, *infra*, en 396-423).

El cesionario de la presente solicitud ha desarrollado ixabepilona, un análogo semisintético de epotilona B, para el tratamiento de cáncer. La ixabepilona tiene la fórmula estructural:



El nombre químico para ixabepilona es (1*S*,3*S*,7*S*,10*R*,11*S*,12*S*,16*R*)-7,11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-3-[(1*E*)-1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-17-oxa-4-azabicyclo[14.1.0]heptadecano-5,9-diona. Véase también la Patente de los Estados Unidos N.º: 6.605.599, cedida al presente cesionario, Bristol-Myers Squibb Company (BMS). La ixabepilona es un agente estabilizador de microtúbulos que se ha aprobado por la FDA para el tratamiento de cáncer de mama metastático y se comercializa por BMS con el nombre comercial IXEMPRA®. La ixabepilona se puede preparar como se describe las patentes de los Estados Unidos N.ºs: 6.605.599 o US 7.172.884.

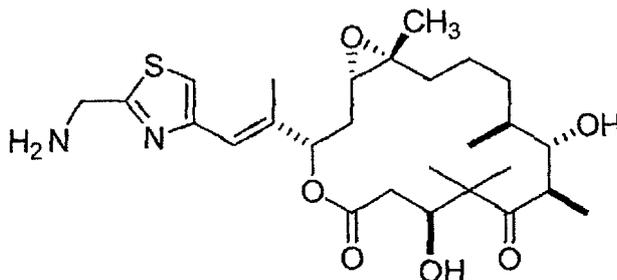
Se incluyen otras epotilonas naturales y análogos en ensayos clínicos avanzados para tratamiento de cáncer incluyendo epotilona B (papatulona de a/k/a, o EPO-906), en ensayos de Fase III por Novartis Pharma AG, para tratamiento de cáncer ovárico; sagopilona (o ZK-EPO), un análogo sintético de benzotiazolil-7-propenilo de epotilona B, en ensayos de Fase II por Bayer Schering AG para tratamiento de diversos cánceres incluyendo tumores del ovario, mama, pulmón, próstata y melanoma. En 2007, un ensayo de Fase II con sagopilona se inició en los Estados Unidos para tratamiento de metástasis cerebrales a partir de cáncer de mama. Adicionalmente, un análogo de epotilona D, KOS-1584, ha avanzado a ensayos clínicos de Fase II para tratamiento de cáncer por Kosan Biosciences Inc. (ahora una filial subsidiaria de BMS) para el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas y de tumores sólidos y epotilona D ha avanzado a ensayos clínicos de Fase II para tratamiento de cáncer por Kosan en colaboración con Hoffmann-La Roche, Inc.; sin embargo, los ensayos clínicos con epotilona D para tratar cáncer se interrumpieron en 2007. La estructura para epotilona D se puede representar por la siguiente fórmula:



(Epotilona D).

El compuesto epotilona B se reivindica, como composición del asunto que nos ocupa, en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de N.º de Serie 091313.524 cedida a Hofle y col. y se describe en las Patentes de los Estados Unidos N.ºs: 6.242.469 y 6.284.781 cedidas a Danishefsky y col., solicitud y patentes que fueron el sujeto de Interferencia N.º: 105.298, antes del Consejo de Apelaciones e Interferencias en materia de Patentes de la USPTO.

El cesionario de la presente solicitud también ha evaluado clínicamente BMS-310705 (Compuesto II en el presente documento), para terapia del cáncer. BMS-310705 se continuó a través de ensayos clínicos de Fase I para tratamiento de cáncer ovárico; es un análogo de amino-epotilona F y tiene la estructura química:



Se puede preparar el Compuesto II (BMS 310705) como se describe en la patente de Estados Unidos N.º: 6.262.094.

Aunque algunos de los compuestos de epotilona y análogos se han evaluado clínicamente para tratar cánceres, es altamente impredecible si un fármaco contra el cáncer se puede usar de forma eficaz para tratar enfermedades neurodegenerativas incluyendo la AD. Hay diversos factores que afectan a esto de forma impredecible. Un factor es la dificultad sustancial de lograr buena penetración cerebral debido a la barrera hematoencefálica (BHE). Para que un compuesto sea útil en el tratamiento de enfermedades cerebrales neurodegenerativas, es necesario que el compuesto cruce la BHE; sin embargo, dado que una función de la BHE es proteger el cerebro de sustancias y toxinas externas, resulta un desafío descubrir un fármaco útil que tenga buena penetración de la BHE. Además, la penetración de la BHE es una característica indeseable para un fármaco contra el cáncer (distinto de los fármacos contra el cáncer de cerebro). Con un fármaco contra el cáncer, se busca usualmente que se evite la penetración de la BHE, mientras que para un fármaco diseñado para tratar AD u otras enfermedades cerebrales neurodegenerativas, es necesaria buena penetración de la BHE para que el compuesto sea eficaz. Así, por ejemplo, mientras que paclitaxel es un fármaco contra el cáncer altamente exitoso, no ha surgido como una terapia útil para tratar enfermedades cerebrales tales como AD, ya que hay una baja velocidad de penetración cerebral a través de la BHE.

Factores adicionales que afectan la impredecibilidad de evaluar la utilidad de fármacos contra el cáncer, particularmente fármacos estabilizadores de microtúbulos, en el tratamiento de AD y otras enfermedades cerebrales implican la capacidad de un fármaco para penetrar en el cerebro, para retenerse en el cerebro durante periodos largos y para acumularse selectivamente en el cerebro en relación a los tejidos periféricos. Estos parámetros se pueden medir usando proporciones de cerebro frente a plasma, semivida cerebral y la proporción de la cantidad de fármaco retenido en el cerebro comparado con los tejidos periféricos (más particularmente el hígado). Adicionalmente, medir la penetración cerebral, la retención cerebral y la acumulación cerebral selectiva con estabilizadores de microtúbulos es complejo porque estos compuestos tienen, de forma típica, un rápido aclaramiento del plasma pero tienen un aclaramiento más lento de tejidos que contienen microtúbulos, haciendo importante ajustar ventanas temporales apropiadas para comparaciones de niveles de plasma y tejidos. La proporción del cerebro frente a los tejidos periféricos es una medida particularmente importante dado que los agentes estabilizadores de microtúbulos a ciertas dosis son altamente citotóxicos para tejidos periféricos: cuando agentes estabilizadores de microtúbulos, tales como paclitaxel, se administran a dosis quimioterapéuticas, tiene lugar a menudo una neuropatía periférica y otros efectos secundarios (Postma y col. 1999). Estos efectos secundarios pueden ser tolerables al tratar pacientes de cáncer pero existe una ventana terapéutica diferente y un perfil de efectos secundarios aceptable diferente al tratar pacientes que sufren de AD y otras enfermedades cerebrales.

Otros retos adicionales implicados en la búsqueda de fármacos contra el cáncer para aplicación potencial para enfermedades neurodegenerativas incluyen el modo de administración y la biodisponibilidad y citotoxicidad asociada con el mismo.

En el documento WO 2005/075023 A1, publicado el 30 de enero de 2004, cedido a Andrieux y col. de INSERM, se sugiere que ciertas epotilonas y análogos que incluyen epotilona A, B, C, D, E y F y análogos de epotilona B y D de epotilona de benzotiazolilo y de epotilona de piridilo pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades que implican un defecto de conectividad neuronal, tales como esquizofrenia o autismo. Sin embargo, Andrieux y col. niegan y por lo tanto reseñan en contra del uso de estos compuestos para el tratamiento de la AD, estableciendo que las enfermedades asociadas con defectos de conectividad neuronal (es decir, aquellas reivindicadas en esta solicitud) "son diferentes de los trastornos de demencia progresiva tales como Alzheimer, que implican degeneración neuronal".

En el documento WO 03/074053, ('053), cedido a Lichtner y col. de Schering AG (publicado el 12 de sept. de 2003), hay una reivindicación amplia para usar un género amplio de compuestos de epotilona y análogos sintéticos para tratar cáncer de cerebro y otras enfermedades cerebrales, incluyendo tumor cerebral primario, tumor cerebral secundario, esclerosis múltiple y AD. Lichtner y col. comunican ciertos datos en cuatro compuestos, a saber, paclitaxel comparado con los compuestos nombrados en esto como compuesto 1: 4,8-dihidroxi-16-(1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)-etenil-1-oxa-7-(1-propil)-5,5,9,13-tetrametil-ciclohexadec-13-eno-2,6-diona; compuesto 2: dihidroxi-3-(1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)-etenil)-10-propil-8,8,12,16-tetrametil-4,17-dioxabicyclo[14.1.0]heptadecano-5,9-diona; y compuesto 3: 7,11-dihidroxi-3-(2-metilbenzotiazol-5-il)-10-(prop-2-en-1-il)-8,8,12,16-tetrametil-4,17-diooxabicyclo[14.10]heptadecano-5,9-diona (véase publicación del documento WO '053 en la página 21).

Notablemente, Lichtner y col. comunican datos de concentración cerebral y plasmática para los anteriores tres análogos de epotilona, pero solo durante periodos de hasta 40 minutos. Lichtner y col. no son capaces de comunicar datos comparativos frente a paclitaxel a niveles cerebrales frente a plasmáticos debido a que sus niveles cerebrales de paclitaxel estuvieron por debajo del nivel de detección y no comunican datos relativos a proporciones cerebro frente a hígado, semivida o retención cerebral para cualquiera de los compuestos (por ejemplo, concentración de fármaco en tejido cerebral durante periodos de tiempo prolongados).

Los documentos WO 99/28324 y WO 00/7151 divulgan un procedimiento de reducción de oxiranil epotilonas a epotilonas olefinicas

En vista de lo precedente, permanece aún la necesidad en la técnica de compuestos para su uso en procedimientos

de tratamiento de tauopatías, en particular la enfermedad de Alzheimer.

Sumario de la invención

Los autores de la presente invención han descubierto en base a múltiples estudios *in vivo* que incluyen estudios de comportamiento y neuropatológicos, que la epotilona D logra un perfil sorprendentemente ventajoso en el tratamiento de tauopatías (y otras enfermedades neurodegenerativas), incluyendo AD. Los autores de la invención han descubierto que la epotilona D presenta una combinación remarcable de propiedades ventajosas, haciendo al compuesto particularmente adecuado para tratar tales enfermedades. Estas propiedades incluyen no solo un alto nivel de penetración cerebral a través de la BHE, sino también una semivida sorprendentemente larga en el cerebro y una tasa de retención selectiva sorprendentemente alta en el cerebro comparada con niveles de fármaco encontrados en tejidos periféricos, más notablemente, el hígado, durante periodos prolongados de tiempo. Además, los autores de la invención han descubierto adicionalmente que ventajas terapéuticas, sorprendentes en el tratamiento de enfermedades asociadas a Tau, particularmente, AD, se pueden lograr con dosificaciones bajas de epotilona D, por ejemplo, con dosificaciones que son aproximadamente 100 veces menores que las administradas para lograr efectos quimioterapéuticos. Por consiguiente, los autores de la invención han descubierto procedimientos que tienen en cuenta terapias en el tratamiento de enfermedades asociadas a Tau con epotilona D, particularmente el tratamiento de AD, sin causar efectos secundarios inducidos por fármacos y/o niveles de concentración de fármaco-plasma que requerirían uso de la epotilona D para interrumpirse. Dando la dosis baja según se compara con tratamientos quimioterapéuticos, cualesquiera efectos secundarios están muy reducidos en comparación con efectos secundarios que se inducen tras administración de las epotilonas y análogos para el tratamiento de cáncer.

El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones. La presente invención se refiere al uso de epotilona D para preparar un medicamento para el tratamiento de enfermedades asociadas a Tau seleccionadas de es demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Pick, enfermedad de los granos argirófilos, enfermedad de Parkinson, síndrome de Down, distrofia miotónica, enfermedad de Niemann-Pick C, demencia pugilística, enfermedad de Blint y daño cerebral traumático. La presente invención se refiere también al uso de epotilona D para preparar un medicamento de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

La presente invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica para administración a un paciente humano para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada a Tau seleccionada de las mencionadas anteriormente así como AD, en la que dicha formulación comprende una monodosis de epotilona D de 0,0001-10 mg/m². La presente invención proporciona adicionalmente epotilona D para su uso en el tratamiento de las enfermedades asociadas a Tau mencionadas anteriormente en el paciente, particularmente AD.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 muestra el diseño básico de un experimento en ratones Tg4510 usando epotilona D (Compuesto I).

La FIG. 2 muestra los resultados de una prueba de laberinto de agua de Morris (MWM) de los ratones Tg4510 a los 2,5 meses, antes de administrar dosis con epotilona D (Compuesto I).

La FIG. 3 muestra los resultados de una prueba de MWM de los ratones Tg4510 a los 4,5 meses, después de 2 meses de administrar dosis con epotilona D (Compuesto I).

La FIG. 4 muestra los datos de la prueba 18 horas después de 5 días de entrenamiento en los ratones Tg4510 de 4,5 meses de edad administrados con dosis durante 2 meses con epotilona D (Compuesto I). "TQ" representa cuadrante objetivo, "AR" representa adyacente a la derecha, "AL" representa adyacente a la izquierda y "OP" representa el cuadrante opuesto. Se describen dos medidas del rendimiento, a saber % de longitud del camino (A) y número de cruces de la plataforma (B).

La FIG. 5 muestra conteos neuronales en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo en ratones Tg4510 a 5,5 meses tras el tratamiento con vehículo, epotilona D 1 mpk (Compuesto I) y epotilona D 10 mpk (Compuesto I).

La FIG. 6 muestra tinción de Tau fosforilada de los ratones Tg4510 tratados con vehículo, epotilona D 1 mpk (Compuesto I) y epotilona D 10 mpk (Compuesto I) en el hipocampo. Se muestran las secciones representativas de 3 ratones por grupo. La tinción positiva con AT8 es gris oscura y negra.

Las FIGS. 7A-7B muestran tinción de plata de Gallyas para marañas neurofibrilares en ratones Tg4510 tratados con vehículo, epotilona D 1 mpk (Compuesto I), o epotilona D 10 mpk (Compuesto I). La FIG. 7A muestra micrografías representativas de tinción cortical, donde la tinción con plata negra es positiva. Se observan la tinción de fondo más clara y alguna tinción de vasos sanguíneos en ratones no transgénicos. La FIG. 7B muestra la cuantificación de la tinción de plata tanto en córtex como en hipocampo.

Las FIGS. 8A-8D muestra la concentración de Compuesto II (FIG. 8A), ixabepilona (FIG. 8B), paclitaxel (FIG. 8C) y epotilona D (Compuesto I) (FIG. 8D) en el plasma, cerebro e hígado de ratones tras administración intravenosa a diversos intervalos de hasta 24 horas.

La FIG. 9 muestra la concentración de epotilona D (Compuesto 1) y Compuesto III (como se describe en el ejemplo 7 en el presente documento) en el cerebro después de administración oral (35 mpk) hasta 5 a 24 horas después de administrar la dosis.

5 La FIG. 10 muestra la concentración de epotilona D en el plasma, cerebro e hígado en ratones después de intervalos hasta una semana después de la dosificación.

Abreviaturas

Las siguientes son abreviaturas de diversos términos usados en esta memoria descriptiva:

- 3R = tres repeticiones
- 4R = cuatro repeticiones
- 10 AD = enfermedad de Alzheimer
- APP = proteína precursora de β -amiloide
- BHE = barrera hematoencefálica
- BMS = Bristol-Myers Squibb, Co.
- CHCl₃ = cloroformo
- 15 CH₂Cl₂ = cloruro de metileno
- DMAO = 4-dimetilaminopiridina
- EtOAc = acetato de etilo
- HPLC = cromatografía líquida de alta presión
- FDA = Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
- 20 FTDP-17 = demencia frontotemporal con parkinsonismo asociada al cromosoma 17
- h, hr = hora/horas
- IP = intraperitoneal
- IV = intravenosa
- LDA = diisopropilamida de litio
- 25 LLQ = límite mínimo de cuantificación
- <LLQ= por debajo de LLQ, no detectable
- MAP = proteína asociada a microtúbulos
- MeOH = metanol
- min = minutos
- 30 MT = microtúbulos
- mpk = miligramo por kilogramo
- MWM = laberinto de agua de Morris
- nM = nanomolar
- NQ = no cuantificable debido a que uno o más puntos de datos son < LLQ
- 35 PEG = polietilenglicol
- PGP = glucoproteína P
- PO = *per os* (administración oral)
- PVP = polivinilpirrolidona

	RT =	temperatura ambiente
	SiO ₂ =	gel de sílice
	TBAF =	fluoruro de tetrabutilamonio
	TBS =	solución salina tamponada de Tris
5	TEA =	trietilamina
	TFA =	ácido trifluoroacético
	THF =	tetrahidrofurano
	TPGS =	succinato de d- α -tocoferil polietilenglicol 1000

Descripción detallada de la invención

10 Definiciones

“Alrededor de” o “aproximadamente” tal como se usa en el presente documento quiere decir dentro de un intervalo aceptable de desviación estándar para el valor particular como se determina por alguien de habilidad ordinaria en la técnica, considerando la medida en cuestión y el instrumento usado para realizar la medida (es decir, las limitaciones en el sistema de medida). Por ejemplo, “aproximadamente” puede significar dentro de una o más desviaciones estándar. Como se aplica a las formulaciones y dosificaciones, “aproximadamente” puede significar una desviación dentro del 10 %, más preferiblemente dentro del 5 % e incluso más preferiblemente dentro del 2 %, de las cantidades comunicadas.

Los términos “al menos x” y “x o más”, en los que x denota un valor numérico, se usan de forma indistinta en el presente documento ya que se desea que tengan el mismo significado.

20 “Penetración cerebral” se refiere a la capacidad de un compuesto de cruzar la BHE. Debido a la rápida eliminación periférica para la mayoría de los agentes estabilizadores de microtúbulos, es importante medir las proporciones de cerebro frente a plasma a tiempos relativamente cortos tras la administración de la dosis, por ejemplo, en periodos de aproximadamente de 20 minutos a 1 hora tras la administración de la dosis, para evaluar la penetración cerebral por sí misma. Un compuesto que tiene buena penetración cerebral según se define en el presente documento quiere decir un compuesto que mostrará a 20 minutos a 1 hora tras la administración de la dosis una proporción de cerebro frente a plasma de 0,5 o mayor, más preferiblemente, 0,8 o mayor y lo más preferiblemente, una proporción de 1 o más (de nuevo, a un tiempo entre 20 minutos y 1 hora tras la administración de la dosis). Al valorar si un compuesto de fármaco satisface este estándar de proporción cerebro/plasma alta (por ejemplo, como se enumera en las reivindicaciones en el presente documento), hay que basarse en los estudios no humanos *in vivo* puesto que el tejido cerebral humano no puede analizarse para evaluar la concentración de fármaco.

35 “Beneficios cognitivos” quiere decir que se observa o muestra una mejora o disminución en el declive de la función cognitiva para al menos un paciente en necesidad de tratamiento, como se caracteriza por pruebas de cognición, medidas de función global y actividades de la vida diaria y comportamiento. Típicamente, los beneficios cognitivos se miden con pruebas de cognición diseñadas para medir declive cognitivo en un paciente o grupo de pacientes. Ejemplos de tales pruebas incluyen pruebas de cognición como ADAS-cog (Escala de Valoración de la enfermedad de Alzheimer, subescala cognitiva) y el MMSE (mini-exámen de estado mental); pruebas de comportamiento como el NPI (Inventario Neuropsiquiátrico); pruebas de actividades de la vida diaria como la ADCS-ADL (Estudio Cooperativo de la Enfermedad de Alzheimer-Actividades de la Vida Diaria); y pruebas de función global tales como la CIBIC-plus (Impresión Basada en Entrevista Clínica de Cambio) y suma de CDR de cajas (Índice de Demencia Clínica).

40 “Periodos de tiempo prolongados” como se usan en el presente documento quieren decir periodo de 24 horas o más, típicamente 24 a 76 h.

45 “Tasa de retención selectiva alta” o “retención selectiva alta” como se usan en el presente documento quiere decir que el fármaco o compuesto se retiene en un tejido u órgano, específicamente el cerebro, a un nivel más alto que el que se encuentra en otros tejidos y órganos, especialmente el hígado, como se mide a un periodo de tiempo prolongado tras administrar dosis. Más particularmente según se define en el presente documento, una tasa de retención selectiva alta quiere decir que la concentración de fármaco en el cerebro a es 4 o más veces la que se encuentra en el hígado a 24 o más horas tras administrar dosis), más preferiblemente, un factor de al menos 6 o más y lo más preferiblemente a un factor de 8 o más a 24 horas o más tras administrar dosis. En valorar si un compuesto o fármaco satisface este estándar o retención selectiva de cerebro/hígado alta (por ejemplo, como se enumera en las reivindicaciones en el presente documento), los estudios no en seres humanos naturalmente deben tenerse en cuenta ya que el tejido del cerebro humano no se puede analizar para valorar la concentración de fármaco.

“Impacto sobre enfermedad subyacente” quiere decir un incremento en una medida de los biomarcadores y otros

parámetros asociados con la progresión de la enfermedad, incluyendo marcadores bioquímicos en CSF o plasma, cambios en volumen cerebral, cambios en función cerebral como se miden mediante formación de imágenes funcionales y cambios en histopatología o bioquímica que pueden observarse después de la autopsia. Biomarcadores típicos que se pueden usar para ensayos clínicos de AD incluyen analitos medidos en CSF tales como Tau, fosfo Tau, beta-amiloide e isoprostanos, así como modalidades de formación de imágenes cerebrales tales como PET de fluorodesoxiglucosa y MRI volumétrica. Biomarcadores adicionales que pueden ser potencialmente útiles, particularmente aquellos que examinan la actividad sináptica, integridad/función de MT y estrés oxidativo incluyen, pero no se limitan a: GABA, neuropéptido Y, alfa-sinucleína, neuregrina y péptido intestinal vasoactivo, tubulina, fragmentos de Tau, proteínas ubiquitinadas, formas solubles de proteína precursora amiloide, cromogranina B, 4-hidroxi-nonenal, nitrotirosina y 8-hidroxi-desoxiguandina.

“Intermitente” cuando se usa con referencia a un programa de administración de dosis quiere decir que hay interrupciones en el programa de administración de dosis que son irregulares. Por ejemplo, un programa de administración de dosis diario, semanal, bisemanal, o mensual no se considera intermitente con esta definición, debido a que la interrupción entre dosis es en cada caso regular y definida por el ciclo de dosis de administración del fármaco. Sin embargo, un programa de administración de dosis más elaborado con una o más interrupciones irregulares se consideraría intermitente, tal como 5 días sí, seguidos de 2 días no; o una dosis administrada en los días 1, 8 y 15, de un ciclo de 30 días y así sucesivamente.

“Semivida larga”, o “semivida cerebral larga” como se usa en el presente documento quiere decir que un fármaco tiene una semivida de 20 o más horas tras administrar dosis (lo que se considera independiente de dosis) y más preferiblemente, durante un periodo de 30 o más horas tras administrar dosis y lo más preferiblemente, durante un periodo de 40 o más horas tras administrar dosis. Como con las velocidades de retención selectivas, hay que tener en cuenta estudios *in vivo* no humanos en valorar si el compuesto tiene una semivida cerebral larga.

“Dosis baja” como se usa en el presente documento quiere decir una dosis del compuesto de epotilona D que es significativamente menos que aquella administrada para lograr efectos quimioterapéuticos (por ejemplo, dado un modo particular de administración, ensayo clínico, y/o experimento), preferiblemente una dosis que es 10 veces o menos que la dosis quimioterapéutica, más preferiblemente una dosis que es 50 veces o más menos que la dosis quimioterapéutica e incluso más preferiblemente una dosis que es 100 veces o más de 100 veces menor que la dosis quimioterapéutica, **es decir**, aquella previamente valorada como terapéuticamente eficaz usando el mismo procedimiento de administración para el experimento, estudio o ensayo dado. Por ejemplo, en ensayos clínicos de Fase II de epotilona D, una dosis administrada fue administrada a 100 mg/m² como una infusión de 90 minutos una vez a la semana durante tres semanas cada cuatro semanas (3 semanas sí, una semana no), para un total acumulativo de 300 mg/m² administrado cada 4 semanas. Una dosis baja en relación a esta dosis de ensayo clínico, según se define en el presente documento, querría decir una dosis de un mes acumulativa tras la administración IV de 30 mg/m² o menos, más preferiblemente una dosis de 6 mg/m² o menos e incluso más preferiblemente una dosis de 3 mg/m² o menos. Así, como un ejemplo alternativo, una dosis baja según se compara con la dosis de ensayo clínico anterior cuando se administra una vez cada 4 semanas sería una dosis de 30 mg/m², más preferiblemente una dosis de 6 mg/m² e incluso más preferiblemente una dosis de 3 mg/m². Dado que la biodisponibilidad puede cambiar dependiendo del modo de administración (**por ejemplo**, administración oral frente a administración IV, con biodisponibilidad menor lograda en administración oral), las dosificaciones relativas (**es decir**, valoración si una dosis dada es una “dosis baja” según se define en el presente documento), se basarían en una comparación que implicaría el mismo modo o modos similares de administración.

“Paciente en necesidad de tratamiento” como se usa en el presente documento se desea que incluya uso de epotilona D para un paciente 1) ya diagnosticado con una enfermedad asociada a Tau (incluyendo una tauopatía, particularmente AD) en cualquier fase clínica, incluyendo pacientes que tienen trastorno cognitivo suave a demencia avanzada; y/o 2) que tiene síntomas tempranos o prodrómicos y signos de una enfermedad asociada a Tau (incluyendo una tauopatía, particularmente AD); y/o 3) que se ha diagnosticado como susceptible a una enfermedad asociada a Tau (incluyendo una tauopatía, particularmente AD), debida a edad, factores hereditarios, u otros factores para quien se recomienda médicamente un curso de tratamiento para retrasar la aparición o evolución o agravamiento o deterioro de los síntomas o signos de la enfermedad.

“Beneficios cognitivos estadísticamente significativos” quieren decir que hay beneficios cognitivos (**por ejemplo**, mejora o la disminución en declive de la función cognitiva), tras un periodo de 6 meses a un año de tratamiento para al menos el 10 % o más de los pacientes evaluados, más preferiblemente al menos el 25 % o más pacientes e incluso más preferiblemente, 50 % o más del grupo de pacientes. Preferiblemente, la mejora a una velocidad comparada con un grupo control se evalúa y refleja una mejora de al menos el 10 % (**por ejemplo**, como se evalúa en base a registros de pruebas comparativas entre placebo y control, en la que “mejora” se desea para incluir reducción en declive en una afección de paciente), más preferiblemente, se observa mejora a una velocidad de más del 25 % o más y lo más preferiblemente, a una velocidad del 35 % o más.

“Enfermedad asociada a Tau” según se define en el presente documento quiere decir enfermedades asociadas con anomalías en Tau así como enfermedades que son “tauopatías”. Las enfermedades asociadas a Tau son AD y demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Pick, enfermedad de los granos argirófilos, síndrome de Down, distrofia

miotónica, enfermedad de Niemann-Pick C, demencia pugilística, enfermedad de Blint y daño cerebral traumático.

“Tauopatía” según se define en el presente documento quiere decir una enfermedad neurodegenerativa asociada con formas fibrilares de proteína Tau (marañas) en cerebro. Estas enfermedades incluyen AD; sin embargo, otras tauopatías incluyen, pero no se limitan a, demencia frontotemporal, incluyendo el subtipo de demencia frontotemporal y parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Pick y enfermedad de los granos argirófilos.

“Cantidad terapéuticamente eficaz de epotilona D” quiere decir una cantidad de epotilona D suficiente para

(1) mitigar o aliviar al menos un síntoma de una enfermedad asociada a Tau (preferiblemente, una tauopatía y más preferiblemente AD), incluyendo funciones cognitivas tales como demencia, pérdida de memoria, comprensión reducida, destreza en llevar a cabo actividades de la vida diaria reducida y/o efectos mediados centralmente tales como déficits motores y visión; y/o

(2) revertir, reducir, evitar, inhibir, o retardar la aparición o agravamiento de la pérdida de función cognitiva asociada con una enfermedad asociada a Tau (preferiblemente, una tauopatía y más preferiblemente AD) y/o revertir, reducir, evitar, inhibir, o retardar la aparición o agravamiento de uno o más efectos mediados centralmente de dicha enfermedad, incluyendo déficits motores, visión y así sucesivamente. En realizaciones preferidas de la invención, el compuesto farmacéutico de la epotilona D es terapéuticamente eficaz no solo en mitigar o aliviar los síntomas de la enfermedad asociada a Tau (preferiblemente, una tauopatía y más preferiblemente AD), sino que también es eficaz teniendo un impacto sobre la enfermedad subyacente (*es decir*, según se definió anteriormente).

Realizaciones alternativas

Los autores de la presente invención han encontrado que la epotilona D, administrada para el tratamiento de una enfermedad asociada a Tau logra un nivel sorprendente de penetración cerebral, semivida cerebral larga y retención selectiva, particularmente en comparación con otros estabilizadores de microtúbulos. Los autores de la invención han descubierto adicionalmente que remarcablemente, efectos terapéuticos incrementados en el tratamiento de enfermedades asociadas a Tau, (particularmente tauopatías y más particularmente AD), se logran con dosis bajas de epotilona D. Como tal, se puede administrar una dosificación relativamente baja de epotilona D para tratamiento eficaz de una enfermedad asociada a Tau, preferiblemente AD. Los autores de la invención han desarrollado así un procedimiento de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer empleando la administración de epotilona D a un paciente que tiene AD. El procedimiento se espera que sea terapéuticamente eficaz en el tratamiento de AD en pacientes humanos mientras que también plantea efectos secundarios significativamente menos serios o menos comparados con los efectos secundarios que tienen lugar típicamente cuando los estabilizadores de microtúbulos se administran a pacientes humanos para quimioterapia. Tales efectos secundarios que se reducen o eliminan pueden incluir uno o más de aflicción gastrointestinal (incluyendo, sin limitación, náuseas, diarrea, estomatitis/mucositis, vómitos, anorexia, estreñimiento y/o dolor abdominal), toxicidad hepática, neutropenia, leucopenia, mielosupresión, alopecia, mialgia/artralgia, fatiga, dolor musculoesquelético, trastornos de las uñas, pirexia, dolor de cabeza, exfoliación de la piel, y/o efectos neurosensores a diversos niveles de grado.

De acuerdo con una realización alternativa de la invención, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de epotilona D para su uso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, en la que el compuesto de epotilona D tiene dos o más propiedades seleccionadas de buena penetración cerebral, una semivida cerebral larga y una tasa de retención altamente selectiva, según se define en el presente documento, más preferiblemente, donde la epotilona D demuestra todas las tres propiedades de buena penetración cerebral, semivida cerebral larga y una tasa de retención altamente selectiva, según se definen estos términos en el presente documento.

De acuerdo con otra realización de la invención, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de epotilona D para su uso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, en la que el compuesto de la epotilona D tras la administración tiene propiedades seleccionadas de dos o más de:

- penetración cerebral de 0,5 o mayor, más preferiblemente, 0,8 o mayor, lo más preferiblemente, 1 o mayor, como se mide a 20 min. a 1 h tras administrar dosis; y/o
- una semivida cerebral de al menos 24 horas y más preferiblemente, de al menos 30 h y lo más preferiblemente de hasta 40 h o más; y/o
- una tasa de retención selectiva de cerebro frente a hígado de al menos 4 a 24 horas o más tras administrar dosis, más preferiblemente a una velocidad de 6 o más a 24 horas o más y lo más preferiblemente a un factor de 8 o más a 24 o más h tras la dosificación.

De acuerdo con otra realización, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de epotilona D para su uso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, en la que el compuesto epotilona D tras la administración tiene propiedades seleccionadas de entre las tres siguientes:

ES 2 501 565 T3

- penetración cerebral de 0,5 o mayor, más preferiblemente, 0,8 o mayor, lo más preferiblemente, 1 o mayor, como se mide a 20 min. a 1 h tras administrar dosis; y/o
 - una semivida cerebral de al menos 24 horas y más preferiblemente, de al menos 30 h y lo más preferiblemente de hasta 40 h o más; y/o
- 5
- una tasa de retención selectiva de cerebro frente a hígado de al menos 4 a 24 horas o más tras administrar dosis, más preferiblemente, a una velocidad de 6 o más a 24 horas o más y lo más preferiblemente a un factor de 8 o más a 24 o más h tras la dosificación.

De acuerdo con otra realización, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de epotilona D para su uso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer sin causar efectos secundarios inducidos por fármacos y/o niveles de concentración de fármaco en plasma que requerirían que el uso de dicho tratamiento sea discontinuo.

10

De acuerdo con otra realización, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de epotilona D para su uso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer y proporciona beneficios cognitivos, más preferiblemente, beneficios cognitivos estadísticamente significativos, al tratar AD, sin causar efectos secundarios inducidos por fármacos y/o niveles de concentración de fármaco en plasma que requerirían que el uso de dicho tratamiento sea discontinuo.

15 De acuerdo con otra realización, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de epotilona D para su uso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer en la que el tratamiento tiene un impacto en la enfermedad subyacente, más preferiblemente un impacto estadísticamente significativo en la enfermedad subyacente, sin causar efectos secundarios inducidos por fármaco y/o niveles de concentración de fármaco en plasma que requerirían que el uso de dicho tratamiento sea discontinuo.

20 De acuerdo con otra realización, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de epotilona D para su uso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer en la que el tratamiento tiene un impacto en enfermedades subyacentes, proporciona beneficios cognitivos, y/o es terapéuticamente eficaz de otra manera, sin causar efectos secundarios tales como efectos secundarios gastrointestinales, leucopenia, y/o neurotoxicidad, que requerirían que el uso de dicho tratamiento sea discontinuo.

25 De acuerdo con otra realización, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de epotilona D para su uso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer cantidad terapéuticamente eficaz de epotilona D a un paciente, en la que la dosis de epotilona D es una dosis baja, según se define en el presente documento.

De acuerdo con otra realización, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de epotilona D para su uso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, en la que la dosis de epotilona D está entre 0,001-10 mg/m², o alternativamente, en una dosis entre 0,0003-0,3 mpk, administrada a un ciclo de dosificación diario, semanal o intermitente.

30

De acuerdo con otra realización, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de epotilona D, para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, en la que la epotilona D se administra por vía IV y la dosis de epotilona D durante un ciclo de administración de dosis mensual acumulativa (**es decir**, dosificación total de compuesto administrada durante un ciclo de un mes, independientemente del programa, **por ejemplo**, semanalmente, bisemanalmente, 3 semanas sí, una semana no, etc.) está en el intervalo entre 0,001-5 mg/m², más preferiblemente entre 0,01-5 mg/m², incluso más preferiblemente entre 0,01-3 mg/m², todavía incluso más preferiblemente entre 0,1-3 mg/m² y lo más preferiblemente entre 0,1-1 mg/m².

35

De acuerdo con otra realización, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de epotilona D para su uso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, en la que la epotilona D se administra oralmente y la dosis de epotilona D calculada sobre una base diaria está en el intervalo entre 0,001-2 mg/m², más preferiblemente entre 0,01-2 mg/m², incluso más preferiblemente entre 0,1-2 mg/m², todavía incluso más preferiblemente entre 0,2-2 mg/m².

40

De acuerdo con otra realización, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de epotilona D para su uso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, en la que la epotilona D se administra oralmente y la dosis de epotilona D para una base mensual acumulativa (**es decir**, dosis total de compuesto administrada durante un ciclo de un mes, independientemente del programa, por ejemplo, diariamente, semanalmente, bisemanalmente, etc.) está en el intervalo entre 0,03-60 mg/m², más preferiblemente entre 0,30-60 mg/m², incluso más preferiblemente entre 3-60 mg/m², aún más preferiblemente entre 6-60 mg/m².

45

De acuerdo con otra realización, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de epotilona D para su uso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, en la que la epotilona D se administra oralmente en un programa de administración de dosis seleccionado de una vez diariamente, una vez semanalmente, una vez cada dos semanas, o una vez al mes.

50

De acuerdo con otra realización, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de epotilona D para su uso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, en la que la epotilona D se administra oralmente en un programa de administración de dosis seleccionado de una vez diariamente y en el que la dosis diaria de epotilona D está entre 0,2

55

a 2 mg/m².

De acuerdo con otro aspecto de la invención, la epotilona D se puede usar para tratar las otras tauopatías, además de AD, de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones de la invención enumeradas anteriormente. Así, una realización de la invención comprende el uso de epotilona D, de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, para tratar no solo AD sino también una enfermedad seleccionada de demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Pick y enfermedad de los granos argirófilos, síndrome de Down, distrofia miotónica, enfermedad de Niemann-Pick C, demencia pugilística, enfermedad de Blint y daño cerebral traumático. Una realización preferida comprende epotilona D, de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, para usar para tratar una enfermedad seleccionada de AD, demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Pick y enfermedad de los granos argirófilos.

De acuerdo con otra realización, se proporciona epotilona D, para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada a Tau según se define anteriormente, más preferiblemente, una tauopatía, lo más preferiblemente AD.

Se divulga que cada uno de los usos médicos de la invención también pueden combinarse con uno o más usos médicos de la invención diferentes y todas las diversas combinaciones tales de los usos médicos de la invención anteriores se contemplan también en el presente documento. Por ejemplo, una combinación de los usos médicos de la invención anteriores puede incluir una cantidad terapéuticamente eficaz de epotilona D para su uso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, en la que la epotilona D es terapéuticamente eficaz en el tratamiento de AD en el paciente sin causar efectos secundarios inducidos por fármacos y/o niveles de concentración de fármacos en plasma que requerirían el uso discontinuo de dicho tratamiento; y en la que la dosis de epotilona D es una dosis mensual acumulativa de entre 0,001–5 mg/m², administrada por vía IV; y/o en la que la dosis de epotilona D está entre 0,001 y 2 mg/m², administrada PO diariamente; y/o en la que la dosis de epotilona D se selecciona de una dosis dentro de uno cualquiera de los intervalos preferidos expresados anteriormente para administración oral o para administración IV.

También se divulga además que cualquiera de los usos médicos enumerados se pueden combinar con la realización que implica epotilona D, para su uso en el tratamiento de una tauopatía, preferiblemente AD, en un paciente humano. Así, por ejemplo, una realización, que comprende una combinación de las realizaciones alternativas anteriores, comprendería epotilona D para tratar AD, en la que el uso es terapéuticamente eficaz en el tratamiento de AD y en la que la epotilona D se administra al paciente a una dosis entre 0,001–10 mg/m², o alternativamente, a una dosis entre 0,0003–0,3 mpk, administrada en un ciclo de dosificación diario, semanal o intermitente. Aún otra realización comprendería epotilona D, para tratar una tauopatía, particularmente AD, en la que la epotilona D se administra a un paciente humano a una dosis baja y es terapéuticamente eficaz en tener un impacto en la enfermedad subyacente y/o en proporcionar beneficios cognitivos.

De acuerdo con otra realización, se proporciona una formulación farmacéutica que comprende epotilona D adecuada para administración a un paciente humano que necesita tratamiento para una enfermedad asociada a Tau según se define anteriormente, preferiblemente una tauopatía, más preferiblemente AD, en el que la administración de la formulación es terapéuticamente eficaz en el tratamiento de la enfermedad en el paciente sin causar efectos secundarios inducidos por el fármaco y/o niveles de concentración de fármaco en plasma que requerirían el uso discontinuo de dicha formulación de epotilona D.

De acuerdo con aún otra realización, se proporciona una formulación farmacéutica que comprende epotilona D adecuada para administración a un paciente humano para tratar una enfermedad asociada a Tau según se define anteriormente, preferiblemente una tauopatía, más preferiblemente AD, en la que la administración de la formulación proporciona beneficios cognitivos significativos estadísticamente en el tratamiento de la enfermedad, sin causar efectos secundarios inducidos por fármacos y/o niveles de concentración de fármacos en plasma que requerirían el uso discontinuo de dicha formulación de epotilona D.

De acuerdo con aún otra realización, se proporciona una formulación farmacéutica que comprende epotilona D adecuada para administración a un paciente humano para tratar una enfermedad asociada a Tau según se define anteriormente, preferiblemente una tauopatía, más preferiblemente, AD, en la que la formulación es eficaz en proporcionar un impacto sobre la enfermedad subyacente, sin causar efectos secundarios inducidos por fármacos y/o niveles de concentración de fármaco en plasma que requerirían el uso discontinuo de dicha formulación de epotilona D.

De acuerdo con aún otra realización, se proporciona una formulación farmacéutica adecuada para administración a un paciente humano para tratar una enfermedad asociada a Tau según se define anteriormente, preferiblemente una tauopatía, más preferiblemente, AD, en la que dicha formulación comprende una monodosis de epotilona D de entre 0,0001–10 mg/m², más preferiblemente entre 0,001–5 mg/m², más preferiblemente entre 0,001–3 mg/m², incluso más preferiblemente entre 0,001–1 mg/m² y lo más preferiblemente entre 0,001–0,5 mg/m².

De acuerdo con aún otra realización, se proporciona una formulación farmacéutica para administración oral a un

paciente humano, en la que dicha formulación comprende epitolona D en un sistema disolvente farmacéuticamente aceptable que comprende de aproximadamente 0 a 50 % de propilenglicol, aproximadamente 1 a 10 % de TPGS, aproximadamente 0,5 a 10 % de etanol, aproximadamente 0-90 % de agua, y/o aproximadamente 5 al 85 % de PEG tal como PEG-400.

- 5 Las combinaciones de cada una de las formulaciones farmacéuticas de la invención anteriores se divulgan también en el presente documento.

Utilidad

Tauopatías

10 Las tauopatías son enfermedades neurodegenerativas asociadas con formas anormales de la proteína Tau en el tejido cerebral. La enfermedad de Alzheimer (AD) fue la primera enfermedad neurodegenerativa en identificarse como que implica disfunción de Tau. En particular, se encontró que las marañas neurofibrilares –la presencia de las cuales es una de las patologías características de AD– contenían formas fibrilares, hiperfosforiladas, formas conformacionalmente alteradas de la proteína Tau. Subsiguientemente, se identificaron otras tauopatías incluyendo demencia frontotemporal y parkinsonismo ligadas a cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Pick y enfermedad de granos argirófilos. Además, se ha asociado un enlace con las anomalías de Tau (incluyendo Tau hiperfosforilado, agregados de Tau, y/o una asociación con el haplotipo H1/H1Tau) con enfermedad de Parkinson, síndrome de Down, parkinsonismo post-encefálico, distrofia miotónica, enfermedad de Niemann-Pick C, demencia pugilística, enfermedad de Blint, enfermedades priónicas, esclerosis lateral amiotrófica, complejo de parkinsonismo-demencia de Guam, esclerosis múltiple, glaucoma, retinopatía diabética y daño cerebral traumático (Avila y col. 2004; Bartosik-Psujek y Stelmasiak 2006; Dickey y Petrucelli 2006; Wostyn, Audenaert y col. 2008).

25 Tau es una proteína de 50 a 75 kDa asociada a microtúbulos (MAP) que une y estabiliza microtúbulos (MT). Hay seis variantes de secuencia primaria de Tau y estas variantes están formadas mediante ajuste alternativo (Lace y col. 2007). Las variantes de ajuste contienen cero, uno o dos (0N, 1N, o 2N) insertos N-terminales en combinación con bien tres repeticiones (3R) o bien cuatro repeticiones (4R) de un dominio de unión a microtúbulos. Los dominios repetidos son necesarios para estabilización de microtúbulos, mientras que las regiones ricas en prolina en cada lado de los dominios repetidos son necesarias para unir los microtúbulos (Preuss y col. 1997). Los dominios repetidos y las regiones ricas en prolina están fosforiladas por cinasas múltiples, conduciendo a disociación de Tau a partir de microtúbulos. El extremo N-terminal de Tau se extiende a partir de la superficie de microtúbulos, donde se cree que ayuda en determinar el espaciamiento entre microtúbulos y en la unión de la proteína motora dinactina a los microtúbulos (Magnani y col. 2007). En células normales, hay niveles aproximadamente iguales de 3R Tau y 4R Tau presentes. 4R Tau se une más estrechamente a microtúbulos de lo que lo hace 3R Tau.

35 Tau es más abundante en neuronas donde se localiza predominantemente en axones. Tau, es la proteína asociada a microtúbulos principal en axones neuronales, mientras que la familia MAP1 está ampliamente distribuida en neuronas y la familia MAP2 es predominantemente somatodendrítica. Tau estabiliza microtúbulos axonales, facilitando por lo tanto el transporte de proteínas, orgánulos, lípidos, componentes celulares marcados para degradación y moléculas de señalización celular bi-direccionalmente entre el cuerpo celular y los terminales sinápticos. La disfunción de Tau podría interferir con el tráfico axonal y por lo tanto afectar la función neuronal y la supervivencia neuronal. El gen de Tau puede desactivarse en ratones con consecuencias leves, pero si ambos genes Tau y MAP 1B se retiran, los ratones con los dos genes inactivados mueren cuando son embriones. Parece que alteraciones en la expresión de algunas MAP puede sustituirse unas a otras en muchos casos, incluyendo desarrollo (Avila y col. 2004).

45 En algunos casos, las mutaciones en el gen que codifica Tau (algunas veces llamado MAPT) causan tauopatías, en particular en FTDP-17 y otras demencias frontotemporales. Muchas mutaciones de FTDP-17 disminuyen la unión a microtúbulos *in vitro* y/o incrementan su propensión a formar fibrillas (Lace y col. 2007). Otras mutaciones asociadas con tauopatía alteran el patrón de ajuste de Tau para generar predominantemente 3R o 4R Tau. Aún otra clase de mutaciones de Tau en el extremo N-terminal alteran la capacidad de unir a dinactina (Magnani y col. 2007). Todas estas mutaciones tienen el potencial para interferir con funciones normales de Tau. En el caso de AD, se piensa que β -amiloides ($A\beta$) conduce a anomalías en Tau.

50 Aunque marañas y otros agregados de Tau son una característica patológica de tauopatías, varias líneas de evidencias sugieren que alguna otra forma no identificada, soluble, de Tau anormal es neurotóxica. Los datos que sugieren que el agregado de Tau en marañas neurofibrilares no es directamente patógeno incluyen observaciones de cerebros humanos y modelos de ratones. Por ejemplo, el examen de diferentes regiones y cerebros con diferentes fases de la enfermedad de Alzheimer ha conducido a la conclusión de que las neuronas pueden sobrevivir y funcionar con marañas neurofibrilares durante décadas (Morsch y col. 1999). Asimismo, los ratones transgénicos de Tau humana (hTau) tienen marañas y neurodegeneración grave, pero las neuronas con marañas no muestran signos selectivos de aflicción y son demasiado pocas en número para dar cuenta de la pérdida espectacular en neuronas observada en este modelo (Andorfer y col. 2005). Tg4510, una línea transgénica de Tau inducible, muestra formación de marañas espectacular y rápida, neurodegeneración y déficits del comportamiento cuando se

induce Tau-P301L (Santacruz y col. 2005). Cuando se reprime la expresión de Tau-P301L, se reducen grandemente la neurodegeneración y los déficits cognitivos, pero la formación de marañas continua. Estudios adicionales usando estos ratones muestran que los multímeros solubles de Tau correlacionan con déficits cognitivos. Se observaron también multímeros de Tau similares en FTDP-17 y en tejido cerebral de AD (Berger y col. 2007). Finalmente, se obtuvo evidencia de Tau no fibrilar que estaba implicado en déficits del comportamiento en AD usando ratones transgénicos que sobreexpresaban una forma mutante de proteína precursora de β -amiloide (APP) (Roberson y col. 2007). Cuando estos ratones APP se cruzaron con ratones con Tau inactivado, se formaron placas amiloides, pero se evitaron los déficits de comportamiento y las anomalías sinápticas. En esta línea APP, no pudieron detectarse anomalías de Tau en presencia de déficits sinápticos y déficits de comportamiento. Tomados conjuntamente, estos estudios muestran que una forma soluble, no identificada de Tau anormal es probablemente la especie neurotóxica.

Estabilización de microtúbulos para tratamiento de tauopatías

Hay dos hipótesis principales para el papel de Tau en la enfermedad neurodegenerativa. Una hipótesis propone que las formas anormales de Tau trastornan la función celular, mientras que la otra hipótesis propone que la pérdida de Tau funcional conduce a la desestabilización de los microtúbulos. (Avila y col. 2004; Lace y col. 2007). Es en base a la segunda hipótesis que se han sugerido los estabilizadores de microtúbulos como terapias para tratar tauopatías (Lee y col. 1994; Patente de los Estados Unidos N.º: 5.580.898). Las disrupciones inapropiadas en tráfico axonal se han implicado en un número de enfermedades además de aquellas identificadas con anomalías en Tau. Estas incluyen enfermedad de Huntington, demencia de cuerpos de Lewy, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, paraplejia espástica hereditaria y atrofia de múltiples sistemas (Roy y col. 2005).

Para poner a prueba si los estabilizadores de microtúbulos podrían beneficiar a los ratones que sobreexpresan Tau, los ratones transgénicos PrP T44 Tau se trataron con paclitaxel (Zhang y col. 2005). Los ratones PrP T44 sobreexpresan ON3R Tau humana normal en neuronas de la médula espinal y consecuentemente desarrollan déficits motores debidos a la sobreexpresión de Tau. El tratamiento de paclitaxel durante 3 meses redujo la disfunción motora e incrementó los números de microtúbulos y el transporte axonal en las raíces ventrales fuera de la médula espinal. Aunque paclitaxel es poco penetrante en el SNC, fue capaz de influir a los axones eferentes de neuronas en el cuerno ventral de la médula espinal que está fuera de la barrera hematoencefálica. Interesantemente, la patología de Tau en este modelo (esferoides) no estaba afectada. Aunque este modelo no muestre pérdida neuronal, el efecto de los estabilizadores de microtúbulos en supervivencia neuronal podría no valorarse. Adicionalmente, no está claro si los beneficios motores observados en la tauopatía de la médula espinal podrían traducirse en beneficios cognitivos en una tauopatía cortical-hipocámpica. Por ejemplo, se observaron resultados opuestos con el cruce de dos líneas de ratones transgénicos de tauopatía diferentes para ratones transgénicos que sobreexpresan la glucógeno sintasa cinasa 3 (Gsk3). En el modelo de tauopatía de médula espinal, los animales bigénicos Tau-Gsk3 tenían patología reducida, mientras que en el modelo de tauopatía del cerebro anterior, los animales bigénicos Tau-Gsk3 mostraron patología incrementada (Spittaels y col. 2000; Terwel y col. 2008).

La estabilización de microtúbulos se ha ofrecido como una explicación para los efectos de NAP, un péptido de secuencia NAPVSIPQ, en varios modelos animales. En particular, NAP tiene actividades neurotróficas, antiinflamatorias, antiapoptóticas y neuroprotectoras en muchos modelos celulares y en muchos modelos *in vivo*, incluyendo oclusión arterial cerebral medial (modelo de infarto), trauma encefálico, lesiones colinotóxicas, envejecimiento y defectos en el desarrollo en el síndrome alcohólico fetal y en ratones deficientes en apolipoproteína E (Gozes y Spivak-Pohis 2006; Gozes 2007). Como para tauopatías, la administración de NAP durante 3 o 6 meses se comunica que reduce niveles de $A\beta$, Tau hiperfosforilada y Tau insoluble de sarcosilo mientras que incrementa Tau soluble en ratones 3xTg (Matsuoka y col. 2007; Matsuoka y col. 2008). Los ratones 3xTg sobreexpresan APP y Tau-P301L (Oddo y col. 2003). El mecanismo de actividad de NAP no está totalmente definido, pero hay evidencia, en base a unión a una columna de afinidad a NAP y a efectos en formación de microtúbulos y/o en estabilización de microtúbulos en neuronas cultivadas que unen NAP en los microtúbulos (Divinski y col. 2006). NAP se conoce también por inhibir la agregación de $A\beta$, de tal forma que pueda actuar corriente arriba de Tau en el modelo de 3xTg. No es probable que NAP actúe como un agente estabilizador de microtúbulos típico, ya que es capaz de proteger contra neuropatía periférica inducida por paclitaxel en ratas (Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º: 2006/0247168 AI). Cuando los agentes estabilizadores de microtúbulos, tales como paclitaxel, se administran a dosis altas, quimioterapéuticas, tiene lugar a menudo una neuropatía periférica (Postma y col. 1999) que se cree que resulta de la sobreestabilización y empaquetamiento de microtúbulos en nervios periféricos. Dado que NAP evita la neuropatía periférica inducida por paclitaxel en ratas, es poco probable que paclitaxel y NAP actúen a través de mecanismos idénticos.

Hay también sugerencias de que los estabilizadores de microtúbulos podrían tener efectos neuroprotectores no relacionados con la disfunción de Tau obvia. Los compuestos estabilizadores de microtúbulos protegen neuronas cultivadas de múltiples agresiones tóxicas, incluyendo $A\beta$ 42, estrés oxidativo de $A\beta$ 40 soluble, disrupción lisosómica, toxicidad inducida por calcio y toxicidad inducida por glutamato (Burke y col. 1994; Furukawa 1995; Sponne y col. 2003; Michaelis y col. 2005; Butler y col. 2007). Se supone que los microtúbulos juegan un papel clave no solo en mecanismos de transporte, sino también en la regulación de señalización celular, en particular señalización de calcio, posiblemente a través de unión de complejos de señalización macromolecular en la vecindad de la

membrana plasmática (Michaelis y col. 2005). Los agentes estabilizadores de microtúbulos han mostrado también potenciar la función mitocondrial reduciendo la generación de especies de oxígeno reactivas e incrementando la expresión de los genes de fosforilación oxidativa implicados en la producción de ATP (Wagner y col, 2008). Los agentes estabilizadores de microtúbulos se conocen también por influir ampliamente la señalización celular durante la disgregación del huso mitótico en células cancerosas (Bergstralh y Ting 2006).

Estabilizadores de microtúbulos que penetran en el cerebro

La diana terapéutica de estabilizadores de microtúbulos para tauopatías y otras enfermedades neurodegenerativas es los microtúbulos en el cerebro. Sin embargo, los estabilizadores de microtúbulos pueden causar toxicidad para tejidos periféricos, tal como inhibición de proliferación celular, particularmente en el tracto gastrointestinal y en las células hematopoyéticas y neuropatía periférica. Se desea así altamente identificar estabilizadores de microtúbulos con penetración cerebral excelente y retención selectiva en el cerebro comparada con tejidos periféricos excelente, tal como para maximizar el índice terapéutico para tauopatías y otras enfermedades neurodegenerativas. La capacidad de los compuestos para unirse con una semivida más larga al tejido cerebral en relación a los tejidos periféricos es una propiedad altamente deseada.

Las series de taxano de estabilizadores de microtúbulos son sustratos de vehículos de resistencia a multifármacos múltiples, tales como P-glucoproteína (PGP), casete de unión a ATP, proteína de resistencia a multifármacos y proteína de resistencia a cáncer de mama. Estos vehículos de resistencia a multifármacos evitan que se acumulen compuestos en tejido tumoral y tejido cerebral. Múltiples laboratorios han trabajado para sintetizar taxanos que no son sustratos para vehículos de resistencia a multi-fármacos, en particular PGP, con éxito limitado (Minderman y col. 2004; Rice y col. 2005; Ballatore y col. 2007). Se ha intentado también la co-administración de un inhibidor de PGP con paclitaxel (Fellner y col. 2002). Estos esfuerzos han mostrado resultados de alguna entrada de taxano en el cerebro, logrando, por ejemplo, aproximadamente 1/30 de los niveles de paclitaxel en el cerebro como en el riñón con un inhibidor de PGP, o niveles cerebrales en el intervalo μM con KU-237, pero solo durante 4 horas después de administración (Michaelis 2006). Así, el uso de los inhibidores de PGP no es un procedimiento atractivo para incrementar la penetración cerebral de taxanos.

Procedimientos de preparación y formulaciones

La epotilona D es un compuesto conocido que se ha sintetizado químicamente de novo y se ha aislado a partir de fermentaciones de cepas de *S. cellulosum* como productos secundarios en la fermentación de *S. cellulosum*. La síntesis total de epotilona D se comunica en la Patente de los Estados Unidos N.º: 6.242.469 cedida a Danishefsky y col. y procedimientos adicionales para preparar epotilona D y otros compuestos de epotilona pueden encontrarse en las Patentes de los Estados Unidos N.ºs: 6.204.388, 6.288.237, 6.303.342, documentos WO 03/072730, Patente de los Estados Unidos N.º: 6.410.301; Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º: 2002/0137152A1; Patente de los Estados Unidos N.º: 6.867.333, Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º: 2006/004065. Los procedimientos sintéticos para elaborar epotilona D se han caracterizado como no prácticos para desarrollo farmacéutico de escala total. Un procedimiento alternativo de preparación es comprometerse en fermentación a gran escala de epotilona B, por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos 7.172.884 B2, con uso de cepas mejoradas diseñadas para proporcionar rendimientos relativamente grandes de epotilona B y la epotilona B puede desoxidarse para proporcionar epotilona D. Los procedimientos de desepoxidación se conocen bien pero pueden encontrarse también en la Patente de los Estados Unidos N.º: 6.965.034 (documento WO 99/43653), cedida a Danishefsky y col., particularmente como se aplican a epotilona D.

Se exponen procedimientos adicionales para fabricar epotilona D en las Patentes de los Estados Unidos N.ºs: 6.998.256B2 y 7.067.286, "Methods of Obtaining Epotilona D using Crystallization and/or By the Culture of Cells in the Presence of Methyl Oleate", que describe la producción biosintética de epotilona D usando cepas de *Myxococcus xanthus* K111-40-1 y K111-72.4.4, y/u otras cepas recombinantes que se han desarrollado por Kosan Biosciences Inc. (ahora BMS), para mejorar la producción de epotilona D. Las condiciones de fermentación y purificación para fabricar epotilona D se exponen también en las Patentes de los Estados Unidos N.ºs: 6.998.256B2 y 7.067.286, así como en las Patentes de los Estados Unidos N.ºs: 6.583.290, 6.858.411, 6.921.650 y 7.129.071, cada una de las cuales está cedida a Kosan (ahora BMS, el presente cesionario) e incorporada en el presente documento mediante referencia. Véase también, Lau y col., Kosan Biosciences, "Optimizing the Heterologous Production of epotilona D in *Myxococcus xanthus*," *Biotechnology & Bioengineering*, 78(3): 280-88(5 de mayo de 2002).

Procedimientos aún adicionales que se pueden usar en fabricar epotilona D se ilustran en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de Número de Serie 12/118.432. Esta solicitud divulga una combinación de etapas químicas y bioquímicas para preparar epotilonas tales como epotilona D. Por ejemplo, se proporcionan procedimientos en los que uno o más intermedios que se pueden usar para síntesis de epotilona se obtienen por fermentación de células recombinantes y después los intermedios biosintetizados con uso de células recombinantes, divulgados en el presente documento, se convierten en los compuestos de epotilona finales por medio de síntesis química.

La epotilona D se puede administrar a un paciente en diversas maneras conocidas en la técnica, típicamente mediante administración intravenosa, (IV) administración subcutánea, administración oral y así sucesivamente. Por ejemplo, la epotilona D se puede formular con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Una

composición farmacéutica que comprende epotilona D se puede formular en una manera clásica usando vehículos sólidos o líquidos, diluyentes y aditivos apropiados para el modo de administración deseado.

Las composiciones ejemplares para administración parenteral incluyen soluciones o suspensiones inyectables que pueden contener, por ejemplo, diluyentes o disolventes adecuados no tóxicos, parenteralmente aceptables, tales como manitol, 1,3-butanodiol, agua, solución de Ringer, una solución de cloruro de sodio isotónica (Inyección de Cloruro de Sodio al 0,9 % [Solución Salina Normal] o Inyección de Dextrosa al 5 %), u otros agentes de dispersión adecuados o agentes humectantes adecuados y agentes de suspensión adecuados, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos y ácidos grasos. Las composiciones farmacéuticamente aceptables y/o los procedimientos de administración de compuestos de la invención pueden incluir el uso de co-disolventes que incluyen, pero no se limitan a etanol, N,N-dimetilacetamida, propilenglicol, glicerol y polietilenglicoles, por ejemplo, polietilenglicol 300 y/o polietilenglicol 400. Se pueden usar tensioactivos (agentes de superficie farmacéuticamente aceptables) para incrementar las propiedades de extensión o humectantes de un compuesto reduciendo su tensión superficial, incluyendo sin limitación, succinato de d- α -tocoferil polietilenglicol 1000 (TGPS), Cremophor, Solutol HS 15, polisorbato 80, polisorbato 20, poloxámero, pirrolidonas tales como N-alquilpirrolidona (*por ejemplo*, N-metilpirrolidona) y/o polivinilpirrolidona; sin embargo, el uso de Cremophor tiene desventajas y no se prefiere. La formulación puede comprender también el uso de uno o más "tampones" (por ejemplo, un ingrediente que confiere una capacidad para resistir cambio en la acidez o alcalinidad eficaces de un medio tras la adición de incrementos de un ácido o base), incluyendo, sin limitación, fosfato de sodio, citrato de sodio, dietanolamina, trietanolamina, L-arginina, L-lisina, L-histidina, L-alanina, glicina, carbonato de sodio, trometamina (a/k/a tris[hidroximetil]aminometano o Tris), y/o mezclas de los mismos.

Las formulaciones para administrar compuestos de epotilona, incluyendo formulaciones que evitan el uso de tensioactivos no iónicos tales como Cremophor, se describen en la técnica anterior. Por ejemplo, una formulación para su uso en administración IV que comprende una mezcla de propilenglicol y etanol se describe en la Patente de los Estados Unidos N.º: 6.683.100. Las formulaciones adecuadas pueden comprender mezclas de polietilenglicol/alcohol deshidratado, o propilenglicol o glicerol/alcohol deshidratado. Por ejemplo, el documento WO 2006/105399 (PCT/US2006/011920) cedido a BMS, divulga formulaciones que incluyen mezclas de aproximadamente 30 a 70 por ciento de volumen de alcohol deshidratado por cada 30 a 70 por ciento de volumen de PEG 300 y/o PEG 400, que se pueden diluir con fluidos de infusión de solución salina o de dextrosa para administración IV y que pueden aplicarse para su uso en administrar epotilona D a pacientes por medio de administración IV. En tales formulaciones, se prefiere que la cantidad de etano se minimice para evitar efectos secundarios asociados con administración de etanol. Las proporciones óptimas de disolventes se pueden obtener fácilmente por alguien experto en el campo.

Las formulaciones preferidas adicionales diseñadas específicamente para administrar epotilona D y análogos se divulgan en la Patente de los Estados Unidos N.º: 7.091.193 (también publicada como Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º: 2005/0148543), cedida a Kosan (ahora BMS). Esta patente describe una formulación en la que epotilona D y una hidroxipropil-beta-ciclodextrina se combinan en una solución de alcohol-agua que después se liofiliza. Las realizaciones implican el uso de aproximadamente 10 mg de epotilona D y aproximadamente 0,4 g de hidroxipropil-beta-ciclodextrina combinada en una solución de terc-butanol-agua al 60 % que se liofiliza después (los ingredientes se pueden reducir proporcionalmente para preparación de monodosis más bajas, individuales, de acuerdo con la presente invención). El ingrediente activo liofilizado "torta" puede reconstituirse después para administración IV con uso de agua, etanol, y/o glicol, que pueden incluir propilenglicol, polietilenglicol 400, monooleato de polioxietileno sorbitán (vendido con el nombre comercial TWEEN 80) e hidrocarburos oxigenados relacionados. Se entiende que se pueden usar glicoles de diversas longitudes de cadena y de diversos pesos moleculares (por ejemplo, polietilenglicol 1000, otros compuestos de TWEEN).

Como un ejemplo más específico, una formulación que se puede usar para suministrar epotilona D a un paciente de acuerdo con la invención puede comprender aproximadamente 0 al 50 % de propilenglicol, aproximadamente 1 al 10 % de TGPS, aproximadamente 0,5 al 10 % de etanol, aproximadamente 0-90 % de agua, y/o aproximadamente 5 al 85 % de PEG tal como PEG-400. Más específicamente, una formulación puede comprender:

50 % de propilenglicol, 10 % de TPGS, 10 % de etanol, 30 % de agua; o

10 % de propilenglicol, 40 % de PEG-400, 5 % de TPGS, 5 % de etanol, 40 % de agua; o

85 % de PEG-400, 10 % de TPGS, 5 % de etanol; o

8,5 % de PEG-400, 1 % de TPGS, 0,5 % de etanol, 90 % de agua;

Un procedimiento preferido de administrar epotilona D de acuerdo con la invención implica administración oral. La Patente de los Estados Unidos N.º: 6.576.651 describe procedimientos para administración oral de epotilonas con uso de uno o más tampones ácido-neutralizantes farmacéuticamente aceptables. Sin embargo, un procedimiento de administración preferido implicará el uso de un comprimido o cápsula, incluyendo un comprimido o cápsula sólida o cápsula fluida o cargada de gelatina. Se puede preparar un comprimido sólido o una cápsula sólida de epotilona D con uno o más recubrimientos entéricos. Los recubrimientos entéricos se han usado durante muchos años para

detener la liberación del fármaco a partir de formas de dosificación ingeribles oralmente. Dependiendo de la composición y/o grosor, los recubrimientos entéricos son resistentes al ácido estomacal para periodos de tiempo requeridos antes de que empiecen a disgregarse y permitan liberación lenta del fármaco en el estómago inferior o en la parte superior del intestino delgado. Ejemplos de algunos recubrimientos entéricos se describen en las Patentes de los Estados Unidos N.ºs: 6.224.910, 5.225.202, 2.809.918, 3.835.221, 4.728.512 y 4.794.001.

Un comprimido recubierto entérico dirigido al uso de epotilona D se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de Número de Serie 11/281.834 que se puede usar para formular comprimidos de cápsulas de epotilona para practicar la invención. Esta formulación implica el uso de una partícula de base inactivada, tal como una perla de azúcar, a la que el agente activo (es decir, epotilona D), se aplica, que se encapsula después mediante un polímero de recubrimiento entérico, y/o una o más capas de sub-recubrimiento. Las perlas se incluyen después dentro de una cápsula. Los recubrimientos entéricos para su uso en formular comprimidos o cápsulas de epotilona D pueden incluir polímeros de recubrimiento entérico, tales como, por ejemplo, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato acetato de polivinilo, ftalato acetato de celulosa, copolímeros de ácido acrílico y copolímeros de ácido metacrílico. Un ejemplo de un copolímero del ácido metacrílico que se puede usar para formar un recubrimiento entérico es dispersión de copolímero acuoso Eudragit® L-30-D 55, que comprende un copolímero aniónico derivado de ácido metacrílico y de acrilato de etilo con una proporción de grupos carboxilo libres frente a los grupos de éster etílico de aproximadamente 1:1 y un peso molecular promedio de aproximadamente 250.000, que se suministra como una dispersión acuosa que contiene sólidos al 30 % en peso. La dispersión de copolímero acuoso Eudragit® L-30-D 55 se suministra por Rohm-Pharma Co., Alemania.

Al preparar perlas con recubrimiento entérico para formar cápsulas de epotilona D, puede ser deseable incluir una o más capas de sub-recubrimiento que se sitúen entre el núcleo de la epotilona D y el recubrimiento entérico para minimizar el contacto entre esas capas. Por ejemplo, materiales adecuados para formar la capa de sub-recubrimiento incluyen almidón; gelatina; azúcares tales como sacarosa, glucosa, dextrosa, melaza y lactosa; cauchos naturales y sintéticos tales como goma arábica, alginato de sodio, metilcelulosa, carboximetilcelulosa y polímeros de y copolímeros de polivinilpirrolidona (PVP) tales como copolímeros de PVP-PVA; celulosas tales como etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa; polietilenglicol; y ceras. La capa de sub-recubrimiento puede comprender adicionalmente uno o más plastificantes, tales como polietilenglicol, propilenglicol, citrato de trietilo, triacitina, ftalato de dietilo, sebacato de tributilo, o combinaciones de los mismos.

El comprimido o cápsula de epotilona D puede comprender opcionalmente otros materiales tales como agentes aromatizantes, conservantes, o agentes colorantes según sea necesario o deseado.

Una dosificación apropiada de epotilona D puede determinarse por alguien experto en la técnica, tomando en consideración los hallazgos descritos en el presente documento conjuntamente con factores típicos tales como la masa corporal del paciente, la condición física del paciente y así sucesivamente. El agente de dosificación debe contener epotilona D en una cantidad que es eficaz para tratar enfermedades asociadas a Tau, incluyendo tauopatías tales como AD. Generalmente, un intervalo para la dosificación de epotilona D administrada para el tratamiento de enfermedades asociadas a Tau (incluyendo tauopatías tales como AD) se considera que está entre 0,0001–10 mg/m², más preferiblemente entre 0,001–5 mg/m². Otros, intervalos de dosificación más preferidos para administración PO e IV se expusieron anteriormente en la sección de realizaciones alternativas. Las unidades mg/m², se usan en el presente documento, para propósitos de comparación con las dosificaciones quimioterapéuticas previamente administradas con epotilonas y sus análogos. Sin embargo, las unidades mg/m² se pueden convertir fácilmente a mpk, considerando la especie animal que recibe (o que ha recibido) el fármaco y el peso corporal y/o altura de paciente. Por ejemplo, para un paciente humano que pese aproximadamente 70 kg, el intervalo de dosis de 0,0001–10 mg/m² se convierte a aproximadamente 0,000003-0,3 mpk. La información adicional que concierne a las conversiones de dosis se puede encontrar en www.rphworld.com/viewlink-25045.html y en Freireich y col., Cancer Chemother Repts 50 (4): 219 (1966).

El fármaco se puede administrar diariamente, semanalmente, o sobre una base intermitente. Por ejemplo, el fármaco se puede administrar durante tres semanas sí, seguidas por una semana que no, o durante dos semanas sí, seguidas por una semana que no, o con otros programas de dosificación como puede determinarse por alguien experto en el campo. La dosis particular seleccionada dependerá del modo de administración y régimen de dosificación seleccionado. Un programa preferido es un programa de dosificación oral diaria una vez. Cuando se prescriben periodos de tiempo más largos entre cada aplicación (típicamente el caso para administración IV), cada monodosis puede ser mayor que cuando se proporcionan dosificaciones diarias.

Notablemente, la dosis de epotilona D que se administró a pacientes para tratamiento de cáncer en ciertos ensayos clínicos de Fase II fue de 100 mg/m² administrada como una infusión de 90 minutos dada semanalmente durante 3 o 4 semanas (es decir, en los días 1, 8 y 15, cada 4 semanas), tras los ensayos de Fase I que implican escalas de dosis desde 9 hasta 150 mg/m² para cada dosis. La dosis de fármaco contemplada para tratamiento de AD es aproximadamente 10 veces menor y más probablemente, aproximadamente 100 veces menor y en otra realización contemplada, incluso más de 1000 veces menor que la dosis terapéutica de epotilona D que se administró para tratamiento de pacientes de cáncer en ensayos clínicos de Fase II, aunque el programa de dosificación y el modo de administración influirán en la dosis.

La presente invención se explicará en mayor detalle por medio de ejemplos no limitantes más adelante, que hacen referencia a los dibujos adjuntos. Los siguientes procedimientos se usaron en los experimentos descritos en los ejemplos que siguen a la descripción de los procedimientos.

Procedimientos para experimentales (ejemplos 1 a 5)

5 Se describió recientemente la creación de Tg45 10, una línea de ratón transgénico en Tau agresivo (Santacruz y col. 2005; Berger y col. 2007). La línea Tg4510 expresó Tau-P301L, un mutante de Tau hallado en FTDP-17, usando el promotor de calmodulina cinasa II. La línea Tg4510 era única en varios sentidos:

1. Alto nivel de expresión de Tau (13 veces en relación a Tau de ratón);
- 10 2. Restricción de expresión de Tau a los lóbulos frontotemporales (evitando de este modo los déficits motores que habían caracterizado las líneas Tau anteriores que expresaban Tau en la médula espinal); y
3. Neurodegeneración rápida y extensiva (el 60 % de neuronas CA1 se perdieron en 5,5 meses) precedida por déficits cognitivos medibles a 4,5 meses.

Preparación de fármacos para estudio de Tg4510

15 Eptilona D (Compuesto I) se administró intraperitonealmente con una aguja de calibre 26, en etanol al 10 %, agua al 90 %, 10 ml/kg a 0 (vehículo), 1 mpk y 10 mpk. Se hizo una solución de reserva 10x en etanol al 100 % y se diluyó justo antes de administrar dosis. Los ratones se administraron en 3 cohortes y se combinaron datos dando una N final de 12, 9 y 15 para los grupos de vehículo, 1 mpk y 10 mpk, respectivamente. Los ratones se administraron en una campana de extracción de productos químicos.

Inyección y programa de realización de pruebas de comportamiento para estudio de Tg4510

20 Se usaron ratones Tg4510 en este estudio. Estos ratones son un modelo bien caracterizado, agresivo de tauopatía que sobreexpresa Tau mutante P301L humana en el cerebro anterior (Santacruz y col. 2005; Berger y col. 2007). Los ratones se caracterizan por acumulaciones de formas anormales de Tau, incluyendo marañas similares a aquellas observadas en cerebro con AD, déficits del comportamiento y eventualmente pérdida de neuronas. A las 9 semanas (+/- 15 días) de edad, los ratones se aclimataron al manejo con una única inyección falsa de solución salina tamponada con fosfato, llevada a cabo dentro de una campana de extracción de productos químicos. Los ratones se albergaron después en jaulas mantenidas dentro de la campana de extracción de productos químicos durante 48 horas. Tras el periodo de 48 horas, los ratones se transfirieron a jaulas limpias y se llevaron a un alojamiento de examen de comportamiento para ponerlos a prueba.

30 Los ratones se pusieron a prueba en un laberinto de agua de Morris (MWM) durante seis días. Los ratones se distribuyeron en grupos de tratamiento en base a los resultados del análisis de comportamiento usando las puntuaciones de rango para investigar el índice de cruzamiento de los dos anillos del ensayo. Los ratones eran de 11 semanas (+/- 15 días) de edad al comienzo de la dosificación y se administraron una vez semanalmente. Se llevó a cabo un panel de pruebas de propensión física o química (SHIRPA Modificado) tras la primera semana de dosificación, incluyendo análisis de posición corporal, temblor, apariencia del pelaje, manera de andar, escape del toque, pasividad posicional, agarre del miembro y reflejo correcto. Los ratones se examinaron adicionalmente 48 horas después de cada dosis semanal con respecto a apariencia del pelo, agarre del miembro, reflejo correcto y para cualquier comportamiento estereotipado manifiesto. No se observó ningún signo de toxicidad, pérdida de peso o déficits motores manifiestos en el curso del estudio.

40 Los ratones se pusieron a prueba de nuevo en el MWM después de la octava dosis (19 semanas de edad +/- 15 días) durante seis días. Después de la prueba de comportamiento, la dosificación se reanudó hasta que los animales fueron de 5,5 meses de edad en el momento de la recogida. Los animales se albergaron y se trataron de acuerdo con el Institutional Care and Animal Use Committee y de acuerdo con los estándares de los National Institutes of Health.

Protocolo del laberinto de agua de Morris

45 Los ratones se pusieron a prueba en el laberinto de agua de Morris (MWM) en dos ocasiones, una vez antes de la dosificación y una vez dos meses después de haber comenzado la dosificación. La segunda ronda de la prueba del laberinto de agua se llevó a cabo en otra habitación de realización de pruebas. Los ratones se aclimataron a la habitación experimental durante 2-3 días antes de someterse a pruebas. Los ratones se situaron en un laberinto de agua de 1,5 m de diámetro, con una plataforma de 16 cm de diámetro situada 0,5–1,0 cm bajo la superficie del agua. El agua se hizo opaca con pintura blanca no tóxica y la temperatura del agua se reguló entre 22-25°C.

50 Se dio a los ratones 4 ensayos por día de hasta 90 segundos cada uno, con un periodo de descanso de 10 segundos en la plataforma después de cada ensayo. Si el ratón no encontró la plataforma en 90 segundos, el ratón se guió con cuidado a la plataforma y se dejó permanecer allí durante 10 segundos. Las habitaciones de prueba tenían cada una señales externas grandes para permitir a los ratones orientarse según aprendieron la localización

de la plataforma. Los ratones se situaron bajo una lámpara de calor para evitar la hipotermia después de cada ensayo. Los intervalos entre ensayos variaron desde 25 hasta 45 minutos. Se siguieron los ratones usando el programa HVS Image Advanced Tracker VP200 (Buckingham, Reino Unido) y se determinó la distancia total recorrida hasta alcanzar la plataforma.

- 5 El análisis estadístico de longitud del camino de adquisición de los cinco ensayos implicó un análisis de varianza de medidas repetidas. El modelo estadístico incluyó "tratamiento" (0, 1, o 10 mpk de epotilona D (Compuesto I)) como un término entre animales y los 5 ensayos como medidas repetidas sobre cada animal. Si el análisis indicó un efecto significativo de tratamiento, o una interacción de tratamiento mediante ensayo, las diferencias entre los grupos de 1 y 10 mpk se compararon con el grupo de vehículo usando prueba de Dunnett. Las longitudes de caminos de la
10 investigación en cada cuadrante y el número de cruces de plataforma en cada cuadrante, se analizaron usando prueba de Dunnett. En todos los casos, se compararon grupos de 1 y 10 mpk con el grupo de vehículo. Se hicieron todos los cálculos en SAS, versión 9.1, con el sistema operativo Windows XP Professional.

- 15 El entrenamiento de adquisición se llevó a cabo durante 5 días consecutivos. Se llevó a cabo un ensayo de investigación 18 horas después del último entrenamiento de adquisición en el día 6. Durante estos ensayos de 60 segundos, se retiró la plataforma y se midieron la distancia que el ratón gastó en el cuadrante objetivo y el número de cruces de una región donde estaba situada previamente la plataforma. Se controló la velocidad de natación para todos los animales; el tratamiento de fármacos no causó ningún cambio en velocidad de natación consistente con que el fármaco no afectó al comportamiento motor. El tiempo de flote (velocidades de natación de < 5 cm/segundo) tampoco varió entre grupos de tratamiento.

- 20 Recogida de tejidos

- Los ratones se sometieron a eutanasia mediante dislocación cervical a los 5,5 meses seguida por decapitación. Los cerebros se retiraron inmediatamente y se dividieron a lo largo de la línea media en dos hemisferios. El hemisferio derecho se situó en 20 ml de paraformaldehído al 4 % (preparado reciente en el día del sacrificio) y se almacenaron durante toda una noche a 4°C. El día siguiente, los cerebros se transfirieron a un tubo que contenía 20 ml de TBS (pH 7,4, TRIS 20 mM, NaCl 100 mM) y después se almacenaron a 4°C hasta procesamiento. Los hemisferios derechos se incrustaron en parafina, se seccionaron a 5 micrómetros y se montaron en portaobjetos de vidrio cargados positivamente. Los portaobjetos se secaron durante toda una noche en un horno de 60°C y se almacenaron a temperatura ambiente hasta que se tiñeron. Los hemisferios izquierdos se congelaron (en 2 minutos) en hielo seco.

- 30 El procedimiento de Gallyas

- El procedimiento de tinción de Gallyas se usó para detectar marañas neurofibrilares positivas en plata y neuritas distróficas positivas en plata. Las secciones finas incrustadas en parafina (5 micrómetros) montadas sobre portaobjetos de vidrio se desparafinaron y se rehidrataron por medio de incubación en serie en xileno (dos veces durante 10 minutos cada una), etanol al 100 % (dos veces durante 10 minutos cada una), MeOH al 95 % / H₂O₂ al 5 % (30 minutos), etanol al 95 % (dos veces durante 5 minutos cada una), etanol al 80 % (dos veces durante 5 minutos cada una), etanol al 50 % (dos veces durante 5 minutos cada una) y agua (dos veces durante 5 minutos cada una). Las secciones se situaron después en ácido peryódico al 5 % durante 5 minutos, se lavaron en dH₂O dos veces durante 5 minutos cada vez y se situaron en solución de yoduro de plata alcalina (que contiene nitrato de plata al 1 %) durante 1 minuto.

- 40 Las secciones se lavaron en ácido acético al 0,5 % durante 10 minutos, se situaron en solución reveladora recién preparada durante 15 minutos y se lavaron de nuevo en ácido acético al 0,5 % durante 5 minutos. Tras un aclarado en agua desionizada, las secciones se situaron en cloruro de oro al 0,1 % durante 5 minutos y se aclararon de nuevo en agua desionizada. Las secciones se incubaron en tiosulfato de sodio al 1 % (hipo) durante 5 minutos y después se aclararon en agua del grifo. Se llevó a cabo contratinción en rojo rápido nuclear al 0,1 % durante 2 minutos. Las
45 secciones se aclararon en agua del grifo, se deshidrataron en serie graduada de alcohol (95 %, 100 %, 100 %) durante 2 minutos y se aclararon en 3 cambios de xileno, 10 inmersiones cada uno. Finalmente, se añadieron el medio de montaje Cytoseal 60 y los cubreobjetos a los portaobjetos (Richard-Allan Scientific of Kalamazoo, MI). Se llevaron a cabo estadísticas usando la prueba de Kruskal-Wallis no paramétrica, seguida por la prueba de comparación múltiple de Dunn usando Graphpad Prism 4. Se obtuvieron los mismos resultados con el ANOVA paramétrico seguido por la prueba post-hoc de Dunnett.

Inmunohistoquímica

- Se desparafinaron secciones finas incrustadas en parafina (5 micrómetros) y rehidrataron con agua en 3 cambios de xileno, dos cambios de etanol al 100 % y un cambio de etanol al 95 %, seguido por aclarado en agua. La recuperación del antígeno se llevó a cabo empañando los portaobjetos en tampón de citrato de sodio 10 mM, pH 6,0 durante 30 minutos en un Vaporizador Black and Decker (Modelo n.º: HS900) y después enfriando durante 30 minutos. La actividad peroxidasa endógena se elimina mediante incubación en peróxido de hidrógeno al 0,6 % en MeOH al 90 % durante 15 minutos. Después de lavar en TBS, los cubreobjetos se bloquearon en suero de cabra normal al 10 % en TBS durante una hora. Esto fue seguido de incubación del anticuerpo de fosfoTau AT8 (Pierce

Biotechnology Inc., Rockford, IL, Goedert y col., 1995) diluido en la solución bloqueante durante toda una noche a 4°C. Después de 3 lavados en TBS, los cubreobjetos se incuban con un anticuerpo de IgG antirratón durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar en TBS, la señal se detectó usando un Kit de Vectastáina de ABC Elite (Vector Labs Burlingame, CA) durante una hora seguida de detección usando el reactivo diaminobenzadina de Vector Labs. Los núcleos se contratiñeron en azul con hematoxilina, seguido por sumergir los portaobjetos 2 veces en sustituto de agua del grifo de Scott (Surgipath N° 02900, Richmond, IL) y se enjuagaron después en agua del grifo. Las secciones se deshidrataron después en serie graduada de alcohol (95 %, 100 %, 100 %) después se eliminaron en tres cambios de xileno. Se añadieron después los portaobjetos y el medio de montaje de Cytoseal 60.

Estereología

Los portaobjetos teñidos de Nissl se escanearon y digitalizaron usando el Aperio ScanScope (Aperio Technologies, Inc., Vista, CA). Las imágenes de la sección de cerebro entera se tomaron a alta resolución y se almacenaron como ficheros en Spectrum (Aperio software). Para procesar imágenes, se tomó una región de 4.000 X 4.000 píxeles incluyendo el hipocampo entero usando la herramienta de extracción y se guardó como un fichero JPEG para importar en Metamorph (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) para cuantificación de pérdida de células en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo. Se utilizó una versión modificada del procedimiento disector de sección única (Moller y col. 1990) para cuantificar la pérdida de células debido a su adecuabilidad para secciones de tejido incrustadas en parafina, finas. Para obtener números relativos de células, se recogió cada quinta sección según los cerebros incrustados en parafina se cortaron sagittalmente entre la Bregma y aproximadamente 0,75 mm lateralmente. Se dibujaron tres regiones y se contaron por sección usando software Metamorph. Las mismas regiones se usaron para cada imagen y se contaron 5 secciones por animal, 5 cubreobjetos separados. Las estadísticas se llevaron a cabo usando ANOVA seguido por prueba post-hoc de Dunnett.

Ejemplo 1

El diseño del experimento de Tg4510 con epotilona D (Compuesto I) como se describe anteriormente se representa en la FIG. 1. En este experimento, los ratones se probaron a los 2,5 meses en el MWM y se asignaron a uno de los tres grupos (N = 12, 13, 16) de tal forma que se determinó que la realización del pretratamiento de cada grupo era similar. Empezando a 2,5 meses, se administró a los ratones una inyección intraperitoneal (IP) semanalmente bien de vehículo solo o bien de vehículo con 1 mpk o 10 mpk de epotilona D (Compuesto I). A 4,5 meses, los ratones se probaron de nuevo en el MWM determinando el efecto del tratamiento en el comportamiento cognitivo. Después de 5,5 meses, los ratones se sometieron a eutanasia y los cerebros se recogieron para análisis subsiguientes.

En experimentos de xenotransplantes tumorales, los investigadores típicamente administran epotilona D (Compuesto I) intraperitonealmente a 30 mpk cada dos días durante 5 días, proporcionando una dosis acumulativa de 150 mpk. (Chou y col., 1998). Así, el tratamiento con epotilona D (Compuesto I) 1 mpk durante 12 semanas, como se describe en el presente documento, se considera que está aproximadamente 100 veces por debajo de la dosis de oncología, con el tratamiento a 10 mpk estando aproximadamente 10 veces por debajo de la dosis de oncología típica administrada en este tipo de experimento. Cuando los ratones se dosificaron una vez semanalmente con 1 mpk y 10 mpk de epotilona D (Compuesto I) durante 2 o 6 meses, no se observaron anomalías histopatológicas en tejidos múltiples, incluyendo hígado, riñón, corazón, testículos, glándula adrenal, médula ósea, nervios periféricos, estómago e intestinos grueso y delgado.

La FIG. 2 muestra los resultados de una prueba de MWM de los ratones Tg4510 a 2,5 meses, antes de dosificar con epotilona D (Compuesto I) o con vehículo. No hubo diferencias estadísticas significativas entre los grupos antes de dosificar en adquisición o durante ensayos de sonda, que fue la base para separar animales en grupos. En otras palabras, la FIG. 2 opera como un control en mostrar que la realización del pre-tratamiento de cada grupo fue similar.

A los ratones Tg4510 se les administró después epotilona D (Compuesto I) una vez semanalmente intraperitonealmente a 1 mpk, 10 mpk y con vehículo y la prueba del MWM se llevó a cabo a los 4,5 meses, tras esta dosificación semanalmente durante 12 semanas. Los resultados que se comunican en la FIG. 3, revelaron que los ratones tratados con epotilona D (Compuesto I) 1 mpk fueron capaces de localizar la plataforma escondida en el MWM más rápidamente (es decir, en una manera significativa estadísticamente ($p < 0,01$)), de lo que pudieron los ratones que se trataron con vehículo. El grupo de tratamiento de 10 mpk mostró una tendencia a mejora comparado con el grupo vehículo. Estos hallazgos muestran que el tratamiento de ratones Tg4510 con epotilona D (Compuesto I) conduce a una función cognitiva mejorada significativa estadísticamente en relación al tratamiento con vehículo y adicionalmente, que la dosis más baja de 1 mpk generó resultados mejorados comparada con la dosis más alta (10 mpk). Notablemente, los autores de la invención en el presente documento confirmaron que la exposición usando este paradigma era dependiente de la dosis en base a experimentos separados comparando dosis de 1 mpk y de 10 mpk en ratones. Por esta razón, la reducción en la mejora del comportamiento en el grupo de 10 mpk, en relación al grupo de 1 mpk, no se debió a niveles de fármaco reducidos, no anticipados en los animales tratados con 10 mpk.

Ejemplo 2

La FIG. 4 muestra datos de sonda 18 horas después de 5 días de entrenamiento en los ratones Tg4510 de 4,5 meses de edad administrados con dosis durante 2 meses con epotilona D (Compuesto I) a 1 mpk, 10 mpk y con vehículo. En la FIG. 4, "TQ" significa cuadrante objetivo, "AR" significa contiguo a la derecha, "AL" significa contiguo a la izquierda y "OP" significa cuadrante opuesto. Dos medidas de comportamiento, a saber longitud del camino en % (A) y número de cruces de plataforma (B) en cada cuadrante, se indican en la FIG. 4. Una preferencia por el cuadrante diana indica que el ratón recordó la localización donde se situaba la plataforma durante la fase de adquisición del estudio. Como se puede observar a partir de los datos, los ratones tratados con vehículo actuaron a discreción con resultados similares para cada uno de TQ, AR, AL y OP, tanto para las medidas de longitud del camino (A) como para las medidas de cruce de plataforma (B) y no mostraron una preferencia de cuadrante. Sin embargo, los ratones tratados con 1 mpk (Compuesto I) mostraron diferencias estadísticamente significativas en ambas medidas comparados con el grupo de vehículo en memoria, *por ejemplo*, en recordar que la plataforma se había situado en el TQ. Adicionalmente, el grupo de 10 mpk mostró actuación significativamente mayor comparado con el grupo de vehículo en la medida de longitud del camino en porcentaje (A) pero no cuando se usó la medida del número de cruces de plataforma (B).

15 Ejemplo 3

Para determinar el efecto de epotilona D (Compuesto I) sobre patología cerebral, se examinó el tejido cerebral a partir de un subgrupo (N=5) de los ratones Tg4510 a partir del experimento precedente. Los estudios anteriores han mostrado que los ratones Tg4510 pierden aproximadamente el 60 % de sus neuronas en la región CA1 del hipocampo a 5,5 meses (Santacruz y col. 2005). Así, los autores de la presente invención examinaron primero el número de neuronas en la región de CA1 del hipocampo, seguido por el examen de la región CA3. La FIG. 5 representa conteos neuronales en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo en los ratones a 5,5 meses tras el tratamiento con vehículo, 1 mpk de epotilona D (Compuesto I) y 10 mpk de epotilona D (Compuesto I).

Sorprendentemente, como se puede ver en la FIG. 5, los ratones Tg4510 tratados con epotilona D 1 mpk (Compuesto I) tienen sustancialmente más neuronas CA1 que animales tratados con vehículo. De hecho, la diferencia entre los ratones tratados con vehículo y los ratones tratados con 1 mpk de epotilona (Compuesto I) muestra que el 1 mpk de epotilona D (Compuesto I) evitó la pérdida neuronal con una diferencia estadísticamente significativa con el vehículo ($p < 0,01$). Los ratones tratados con 10 mpk de epotilona D (Compuesto I) tuvieron niveles neuronales de CA1 que eran intermedios entre los ratones tratados con vehículo y los ratones tratados con 1 mpk de epotilona D (Compuesto I). Estos resultados son consistentes con y refuerzan los hallazgos de los estudios de comportamiento de Ejemplos 1 y 2, *es decir*, que muestran que la dosis 100 veces menor (*es decir*, que las dosificaciones quimioterapéuticas administradas en experimentos de xenotransplantes tumorales) produjo consistentemente resultados mejorados significativamente en el tratamiento de tauopatía.

Se observó también una tendencia similar para los conteos celulares totales de regiones CA3 del hipocampo, con diferencias significativas entre el 1 mpk y los ratones no transgénicos comparados con los ratones tratados con vehículo. La elevación en conteos celulares en la región CA3 en el grupo tratado fue menos pronunciada que en la región CA1 donde hay más neurodegeneración a esta edad; sin embargo, estos resultados muestran un impacto sobre la enfermedad subyacente en múltiples regiones del cerebro.

40 Ejemplo 4

El efecto de tratamiento en tinción de Tau fosforilada que tiñe CA1 se examinó también. El anticuerpo AT8 reconoce Tau que está fosforilada en los residuos 202 y 205. Esta forma de Tau hiperfosforilada está muy enriquecida en cerebros de pacientes de AD y de otras tauopatías (Goedert y col., 1995).

La FIG. 6 muestra tinción de AT8 fosfoTau de los ratones Tg4510 tratados con vehículo, epotilona D 1 mpk (Compuesto I) y epotilona D 10 mpk (Compuesto I), como se describe anteriormente. La tinción de fosfoTau se indicó en negro intenso. Sorprendentemente, los ratones tratados con 1 mpk de epotilona D (Compuesto I), mostraron mucha menos tinción de fosfoTau, en particular en comparación con los ratones tratados con vehículo. Los ratones tratados con 10 mpk de epotilona D (Compuesto I) mostraron niveles intermedios de tinción con fosfoTau.

45 Ejemplo 5

El efecto de tratamiento con epotilona D (Compuesto I) en formación de maraña neurofibrilar en el córtex se examinó por tinción de plata de Gallyas. La FIG. 7A muestra tinción de plata de Gallyas para marañas neurofibrilares en el córtex frontal de ratones Tg4510 tratados con vehículo, epotilona D 1 mpk (Compuesto I) y epotilona D 10 mpk (Compuesto I), como se describe anteriormente. En la FIG. 7A, la tinción de plata está en negro y "NT" significa no transgénicos, manifestando alguna tinción no específica asociada con los vasos sanguíneos. Como se puede observar en la FIG. 7A, los ratones tratados con 1 mpk de epotilona D (Compuesto I) tuvieron niveles mucho más bajos de marañas neurofibrilares que los ratones tratados con vehículo; esto se cuantificó para todos los animales en el estudio en la FIG. 7B. Se observó un impacto significativo en la enfermedad subyacente tanto en el córtex como en el hipocampo en la dosis de 1 mpk, con la dosis de 10 mpk mostrando de nuevo una tendencia pequeña hacia la mejora.

Como se describe en los ejemplos precedentes, el tratamiento de ratones Tg4510 con epotilona D (Compuesto I) evitó el declive cognitivo y mejoró la función cognitiva a lo largo del tiempo comparada con los ratones no tratados con Tg4510. Además, las pruebas neuropatológicas como medidas de impacto sobre enfermedad subyacente (es decir, conteos celulares, tinción fosfo Tau y pruebas de tinción con plata), demuestran que el tratamiento con epotilona D evita pérdida neuronal, reduce la acumulación de Tau anormal y evita la formación de marañas neurofibrilares a niveles estadísticamente significativos comparados con ratones Tg4510 no tratados. Así, los autores de la invención en el presente documento creen ser los primeros en descubrir y demostrar la prevención de pérdida cognitiva, patología de Tau y neurodegeneración tras tratamiento con un compuesto estabilizador de microtúbulos, a saber, epotilona D.

Adicionalmente, los autores de la invención en el presente documento han descubierto que los efectos terapéuticos logrables tras tratamiento con epotilona D son probablemente no dependientes linealmente de dosis. Específicamente, resultados dosodependientes consistentes se obtuvieron repetidamente en cada uno de los estudios de comportamiento y neuropatológicos comunicados, en los que a la dosis menor (1 mpk) (aproximadamente 10 veces menor que la dosis quimioterapéutica en experimentos de xenotransplante de tumores), se obtuvo efecto beneficioso significativamente potenciado en todas las medidas comparadas con el vehículo, mientras que la dosis más alta (10 mpk), mostró una tendencia hacia un efecto con la mayoría de las medidas y una diferencia estadísticamente significativa sobre el vehículo en una medida de la prueba de sonda del MWM.

Ejemplo 6

Rendimiento de epotilona D comparado con otros estabilizadores de microtúbulos en experimentos de bolo intravenoso

En un grupo de experimentos, ixabepilona (análogo de aza-epotilona B), Compuesto II (BMS 310705, 21-amino epotilona F) y epotilona D (Compuesto I) se evaluaron y compararon con paclitaxel tras la administración de bolo IV en las venas de la cola de ratones desnudos a dosificaciones de 1 a 12 mpk con 3 ratones/grupo. Cada uno de los cuatro compuestos se administró a 5 ml/kg usando Cremophor al 10 %, etanol al 10 % y agua al 80 % conteniendo dextrosa al 5 %. Para determinar la penetración cerebral relativa de cada compuesto, se midieron los niveles de plasma, cerebro e hígado de los compuestos en diversos momentos después de una dosis única usando cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (CL/EM/EM) después de una extracción de fase orgánica, como se muestra en las figuras 8A-8D y en la Tabla 1. Los niveles hepáticos no se midieron en los ratones tratados con paclitaxel.

La FIG. 8A muestra la concentración del Compuesto I en el plasma, cerebro e hígado de ratones tras administración IV a 1 miligramo por kilogramo (mpk) en diversos momentos.

La FIG. 8B muestra la concentración de ixabepilona en el plasma, cerebro e hígado de ratones tras administración IV a 12 mpk en diversos momentos.

La FIG. 8C muestra la concentración de paclitaxel en el plasma y cerebro de ratones tras administración IV a 4 mpk en diversos momentos.

La FIG. 8D muestra la concentración de epotilona D (Compuesto I) en el plasma, cerebro e hígado de ratones tras administración IV a 5 mpk en diversos momentos.

Los datos mostraron que el Compuesto II y la ixabepilona tuvieron niveles cerebrales modestos en relación al tejido periférico medidos por la proporción de los niveles de compuesto en el cerebro frente al hígado, particularmente en los últimos tiempos después de la distribución inicial y de la eliminación del fármaco del plasma. Como se esperaba, los niveles cerebrales de paclitaxel eran bajos. En particular, los niveles cerebrales de paclitaxel no excedieron niveles de fármacos en plasma durante al menos 24 horas después de dosificación. Inesperadamente, la epotilona D (Compuesto I) tuvo las propiedades combinadas de penetración cerebral y retención selectiva remarcablemente mejores que los compuestos puestos a prueba en este experimento, como se evidenció por los altos niveles cerebrales que excedían los niveles hepáticos a 6 y 24 horas después de dosificación. Esto demostró retención inesperada de epotilona D (Compuesto I) en el órgano objetivo (cerebro) en relación a la periferia, incluyendo el plasma y tejidos, lo más notablemente el hígado, que es un sitio potencial de toxicidad.

Más específicamente, la tabla 1 presenta datos de penetración cerebral comparativos para cuatro estabilizadores de microtúbulos-paclitaxel, Compuesto II (BMS 310705), ixabepilona y epotilona D -- después de dosificación de bolo IV (mpk varió, como se comunica en la tabla) usando ratones desnudos, datos que se reflejan también en las figuras 8A-8D. La proporción cerebro frente a plasma se incrementa generalmente con el tiempo después de dosificar cada compuesto debido a la pérdida rápida desde el plasma y la retención del fármaco en el cerebro mediante unión a microtúbulos. La proporción cerebro frente a plasma puede caer después para compuestos donde hay menos retención en el cerebro, tal como se observa para el Compuesto II que muestra un decrecimiento entre 6 y 24 horas.

A pesar del cambio en la proporción cerebro frente a plasma con el tiempo, esta proporción proporciona una medida de penetración cerebral intrínseca para un compuesto cuando se comparan los datos de tiempos cortos después de dosificación (por ejemplo, entre 20-60 minutos después de dosificación). En las tablas en el presente documento, se calcularon las proporciones cerebro frente a plasma y cerebro frente a hígado calculando primero las proporciones

para animales individuales y determinando después el promedio de las proporciones; las tablas en el presente documento comunicaron los valores promedio así obtenidos.

TABLA 1

Compuesto	Dosis (mpk)	Tiempo (hr)	Conc. en plasma (nM)	Conc. cerebral (nM)	Proporción cerebro frente a plasma	Proporción cerebro frente a hígado
Paclitaxel	4	1	447	47	0,10	NQ
		6	43	16	0,37	NQ
		24	12	15	1,25	NQ
Compuesto II	1	6	3	6,8	2,1	0,01
		24	1	1,3	1,2	0,02
Ixabepilona	12	0,12	11,236	579	0,05	0,05
		0,33	3057	495	0,16	0,09
		1	390	284	0,73	0,07
		2	171	360	2,1	0,11
		6	53	371	7,0	0,30
		24	8	236	30	1,2
Epotilona D	5	6	6	2794	470	149
		24	1	2046	2046	1204

5 Observando la tabla 1, paclitaxel es pobremente penetrante en el cerebro como se evidencia por una proporción cerebro frente a plasma de 0,1 en 1 hora después de dosificación; ixabepilona es más penetrante en el cerebro que paclitaxel con una proporción cerebro frente a plasma de 0,73 a 1 hora después de dosificación (tabla 1); A tiempos de 6-24 horas después de dosificación, la proporción de cerebro frente a plasma es una reflexión tanto de la penetración cerebral intrínseca como de la retención cerebral intrínseca (semivida) en el cerebro. Los datos a 6 y 24 horas después de la dosificación de epotilona D muestran al menos un incremento de 60 veces en la proporción cerebro frente a plasma por encima de ixabepilona, el compuesto con la siguiente proporción cerebro frente a plasma más alta en este grupo.

15 Las proporciones cerebro frente a hígado no solo proporcionan una medida más singular de retención cerebral y semivida, sino que también muestran la retención selectiva comparada con tejidos periféricos. Esto es valioso porque el hígado, elegido en gran parte porque está bien perfundido y tiende a tener niveles más altos que muchos otros tejidos periféricos, contiene microtúbulos donde el compuesto puede retenerse, a diferencia del plasma no celular. A diferencia de la proporción cerebro frente a plasma donde el tiempo de medida óptimo está en el intervalo de 20-60 minutos, es preferible comparar las proporciones cerebro frente a plasma a tiempos más tardíos después de la administración de la dosis (por ejemplo, 24 horas o más), cuando los niveles de plasma han disminuido significativamente, permitiendo por lo tanto una medida más segura del fármaco que está específicamente retenido dentro de las células cerebrales y hepáticas. Una comparación de las proporciones cerebro frente a hígado muestra que la epotilona D está retenida alta y selectivamente en el cerebro en relación al hígado. Por ejemplo, la proporción de cerebro frente a hígado a las 24 horas de epotilona D es 1204, una proporción remarcablemente, mucho más alta comparada con las proporciones mucho menores para ixabepilona (1,2) y Compuesto II (0,02) en el mismo grupo de experimentos.

25 En un experimento separado, se evaluaron las concentraciones en plasma y en cerebro para periodos de tiempo más largos, es decir, hasta 168 horas, tras administración de bolo IV, usando un protocolo similar al descrito anteriormente, pero con ratones transgénicos triples de mediana edad (Oddo y col., 2003), en las manos de científicos diferentes. Los resultados de este experimento se muestran a continuación en la tabla 2 y en la FIG. 10.

30

TABLA 2 (SOLO EPOTILONA D)

Tiempo (hr)	Conc. en plasma (nM)	Conc. cerebral (nM)	Proporción cerebro frente a plasma	Proporción cerebro frente a hígado
0,05	25,100	1127	0,04	0,42
0,17	2003	595	0,28	1,1
0,33	549	529	0,86	0,38
1	325	422	1,2	0,42
3	70	468	6,1	0,30
6	43	141	3,3	0,24
16	0,8	210	265	NQ
24	0,9	82,7	89	NQ
96	<LLQ (0,6 nM)	25,2	NQ	NQ
168	<LLQ (0,6 nM)	16,3	NQ	NQ

- Estos datos demuestran la retención extendida de epotilona D en tejido cerebral durante al menos 168 horas (7 días) después de una dosis individual. Los niveles cerebrales absolutos y las proporciones en la tabla 1 y en la tabla 2 para epotilona D varían; es importante destacar que los experimentos descritos en las tablas 1 y 2 se llevaron a cabo separadamente a tiempos diferentes por científicos diferentes con cepas de ratones diferentes. Los autores de la invención han observado que pequeñas diferencias en el tiempo de inyección de IV pueden alterar el perfil de exposición exacto, particularmente la concentración en plasma máxima, lo que influirá en la concentración en el cerebro y adicionalmente, en que el tiempo de inyección IV pueda diferir entre científicos. Por esta razón, es mejor comparar compuestos dentro de un experimento único. A pesar de este asunto, las tendencias generales y las características relacionadas de los estabilizadores de microtúbulos según se comparan unos con otros son consistentes y estos resultados muestran que la epotilona D es altamente penetrante en el cerebro con penetración y retención cerebral mejoradas sustancialmente comparadas con el Compuesto II, ixabepilona y paclitaxel. Por ejemplo, incluso cuando nos comprometemos en una comparación de datos obtenidos de dos experimentos aparte, la proporción de cerebro frente a plasma de epotilona D a 6 horas después de dosificación fue de 2046 en la tabla 1 y de 89 en la tabla 2, aún marcadamente mayor que las proporciones a los mismos tiempos para paclitaxel (0,37) y Compuesto II (2,1) en la tabla 1. Debido a que los niveles en hígado en el estudio descrito en la tabla 2 caen por debajo del nivel más bajo de cuantificación (LLQ de 49 nM en este estudio) a las 24 horas, una proporción cerebro frente a hígado no fue cuantificable (NQ) a este tiempo.
- El documento WO 03/074053 A1 muestra en líneas generales el uso de ciertas epotilonas para el tratamiento de enfermedades del cerebro. De acuerdo con esa publicación, niveles plasmáticos y cerebrales para tres epotilonas (no incluyendo epotilona D) se midieron durante los primeros 40 minutos tras la administración intravenosa a 5 mpk. Los datos de concentración plasmática y cerebral comunicados en el documento WO 03/074053 A1 para lo que se identifica en este como compuesto 1: 4,8-dihidroxi-16-(1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)-etenil-1-oxa-7-(1-propil)-5,5,9,13-tetrametil-ciclohexadec-13-eno-2,6-diona y para paclitaxel se reproducen en la tabla 1 más adelante. Los datos se mostraron en el documento WO 03/074053 de acuerdo con las unidades, µg/ml y en minutos; estos datos se convirtieron a nM y se mostraron en la tabla 3 en nM y horas, para propósitos de comparación. Estos datos (por la tabla 3) no se confirmaron independientemente por los autores de la invención en el presente documento sino que más bien, se reproducen en base a los valores presentados en esa publicación (ya que se convierten en horas y nM). Adicionalmente, se destaca que estereoisomería y/o un procedimiento de preparación no se comunican para compuesto 1 en el documento WO 03/074053 y se referencia una mezcla E/Z (véase página 13, línea 15).

TABLA 3

Compuesto	Tiempo (horas)	Conc. en Plasma (nM)	Concentración en Cerebro (nM)	Proporción Cerebro frente a Plasma
Compuesto III	0,17	1540	580	0,4
	0,33	1150	1540	1,3
	0,67	580	1150	2
Paclitaxel	0,17	940	<LLQ	NQ
	0,33	700	<LLQ	NQ
	0,67	230	<LLQ	NQ

Debido a que los datos se registraron a solo 40 minutos, solo se puede valorar la penetración cerebral a partir de este estudio examinando la proporción cerebro frente a plasma. Se presume que paclitaxel tiene penetrancia cerebral baja (consistente con los datos en la tabla 1) debido a que los niveles cerebrales están por debajo de LLQ, aunque no se da a conocer el nivel de detección. Las medidas de retención cerebral que necesitan medirse al menos 24 horas tras dosificación y la penetración cerebral selectiva por comparación con tejidos periféricos no se discutieron en el documento WO 03/074053 A1.

Ejemplo 7

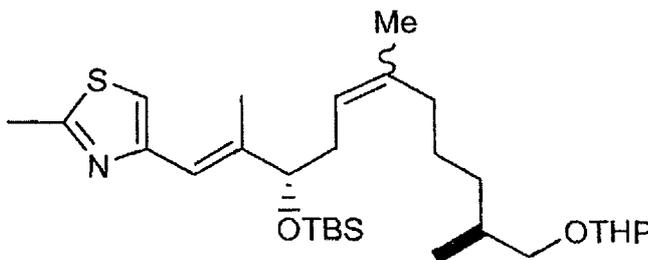
10 Comportamiento de la epotilona D tras administración oral

Para analizar adicionalmente la actuación de epotilona D en el tratamiento de tauopatías, el compuesto se evaluó en dos experimentos que implican administración a ratones C57BL/6 a 10 mpk y a 35 mpk mediante sonda oral, respectivamente. Adicionalmente, en estos experimentos un isómero de 4,8-dihidroxi-16-(1-metil-2-(2-metil-4-triazolil)-etenil-1-oxa-7-(1-propil)-5,5,9,13-tetrametil-ciclohexadec-13-ene-2,6-diona (compuesto III, en el presente documento), se evaluó después y se hizo una comparación lado a lado entre epotilona D y compuesto III. A continuación, los autores de la invención comunican primero el detalle experimental para preparación y aislamiento del compuesto III y después se describen los datos biológicos, *in vivo*.

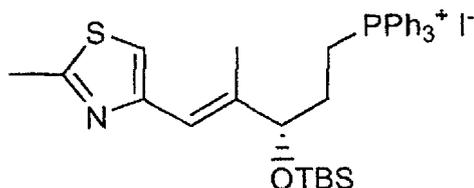
Información experimental general:

En los siguientes procedimientos, todas las temperaturas se dan en grados Celsius. Los espectros de RMN de ^1H se hacen funcionar en un instrumento Bruker 500, 400, o 300 MHz y los cambios químicos se comunican en ppm (δ) con referencia a tetrametilsilano ($\delta=0,0$). Todas las evaporaciones se llevaron a cabo a presión reducida. A menos que se señale lo contrario, los análisis de CL/EM se llevaron a cabo en un instrumento de Waters usando una columna en fase reversa Phenomenex-Luna 3,0 x 50 mm S 10 que emplea una velocidad de flujo de 4 ml/min usando un gradiente de TFA al 0,1 % en MeOH/agua [0-100 % en 3 min, con tiempo de funcionamiento de 4 min] y un aparato detector de UV a 220 nm o una columna en fase reversa Phenomenex-Luna 3,0 x 50 mm 10u que emplea una velocidad de flujo de 5 ml/min usando un gradiente de acetato de amonio acetonitrilo 10 mM/agua [5-95 % en 3 min, con 4 minutos de tiempo de funcionamiento] y un aparato detector de UV fijado a a 220 nm. A menos que se establezca otra cosa, se hicieron purificaciones en columnas de gel de sílice de malla 40-63, o usando un sistema de BIOTAGE® Horizon, o usando equipamiento de HPLC especificado y condiciones de HPLC especificadas.

Etapa 1:



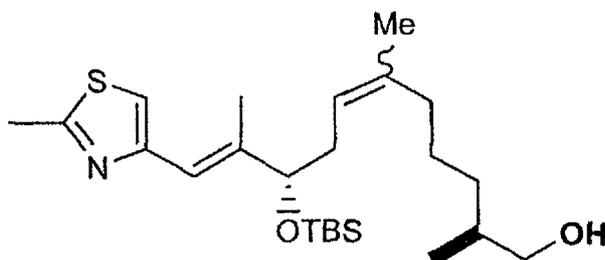
Intermedio de Síntesis-1



Sal de fosfonio A

A una solución de sal de fosfonio A (preparada de acuerdo con Nicolaou et al., J. Am. Chem. Soc. 1997,119, 7974-7991; 40,5 g, 57,9 mmol) en 300 ml de THF a 0° se añadió bis(trimetilsilil)amida de sodio (63,7 ml, 63,7 mmol) y la solución se agitó durante 5 min. Se añadió una solución de (6S)-6-metil-7-(tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)heptan-2-ona (preparada de acuerdo con el documento US 7.326.798; 14,54 g, 63,7 mmol) en 50 ml de THF rápidamente y la mezcla se dejó calentar a RT durante 16 horas. La mezcla de reacción se vertió en NH₄Cl saturado y se extrajo con EtOAc (300 ml). La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó al vacío. El producto en bruto se purificó en una columna de gel de sílice (EtOAc 0-10 %/hexano) proporcionando 16 g (30,7 mmol, 53 %) de Intermedio de Síntesis-1. RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 6,90 (s, 1H), 6,43 (s, 1H), 5,20 - 5,05 (m, 1H), 4,6 - 4,5 (m, 1H), 4,15 - 4,00 (m, 1H), 3,9 - 3,8 (m, 1H), 3,6 - 3,3 (m, 2H), 3,25 - 3,05 (m, 1H), 2,70 (s, 3H), 2,35 - 2,15 (m, 2H), 2,05 - 1,90 (m, 5H), 1,90 - 1,75 (m, 1H), 1,75 - 1,65 (m, 3H), 1,65 - 1,45 (m, 6H), 1,45 - 1,25 (m, 3H), 1,15 - 1,00 (m, 1H), 1,00 - 0,80 (m, 12H), 0,05 - -0,05 (dd, 6H), EM (CLEM) [M+H] = 522,44, [M+Na] = 544,42.

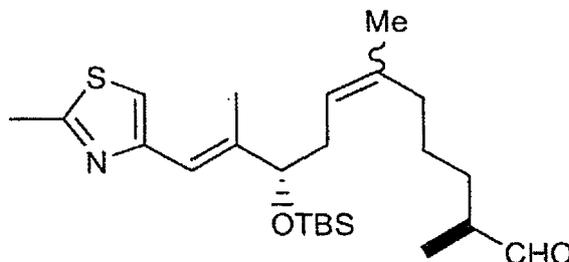
15 Etapa 2:



Intermedio de Síntesis-2

A una solución de Intermedio de Síntesis-1 (16 g, 30,7 mmol) en 300 ml de etanol a RT se añadió monohidrato de ácido p-toluenosulfónico (5,83 g, 30,7 mmol). La mezcla se agitó durante 7 horas, se vertió en NaHCO₃ saturado y se extrajo dos veces con cloruro de metileno (300 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre sulfato de magnesio. Después de filtración y eliminación del disolvente, la materia prima se purificó usando un sistema de BIOTAGE® (EtOAc/hexano, 10-45 %) proporcionando 9,8 g (22,4 mmol, 73 %) de Intermedio de Síntesis-2. RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 6,92 - 6,90 (m, 1H), 6,45 - 6,40 (m, 1H), 5,15 - 5,00 (m, 1H), 4,10 - 4,00 (m, 1H), 3,50 - 3,30 (m, 2H), 2,69 (s, 3H), 2,35 - 2,15 (m, 2H), 2,1 - 1,9 (m, 5H), 1,75 - 1,50 (m, 5H), 1,50 - 1,25 (m, 3H), 1,10 - 0,75 (m, 13H), 0,05 - -0,05 (dd, 6H), EM (CLEM) [M+H] = 438,29, [M+Na] = 460,24.

Etapa 3:

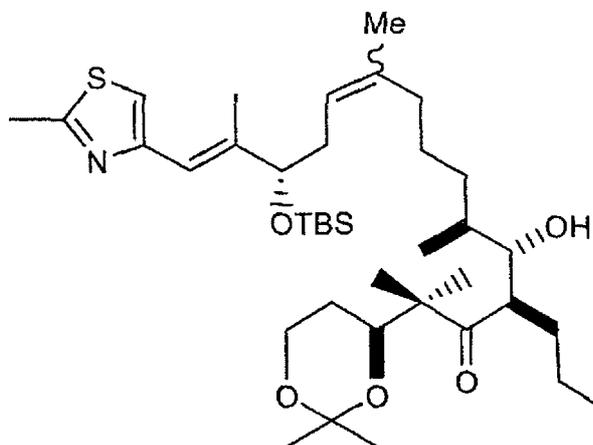


Intermedio de Síntesis-3

A una solución de cloruro de oxalilo (2,94 ml, 33,6 mmol) en 100 ml de cloruro de metileno se añadió DMSO (4,88 ml, 68,8 mmol) lentamente a -78°. Después de agitar 10 minutos, se añadió el Intermedio de Síntesis-2 (7 g, 15,99 mmol) en 100 ml de cloruro de metileno y se continuó la agitación durante 30 min. Se añadió TEA (11,14 ml, 80 mmol) y la mezcla se dejó calentar a -10°. Después de que se añadiera NaHCO₃ saturado, la mezcla de reacción se extrajo dos veces con cloruro de metileno (100 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se

secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se evaporaron dando el producto en bruto como un aceite amarillo. La filtración a través de una columna de SiO_2 corta, eluyendo con disolvente EtOAc al 15 %/hexano y concentración al vacío proporcionó 7 g (16 mmol, 100 %) de Intermedio de Síntesis-3 como un aceite incoloro. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 9,6 - 9,5 (d, 1H), 6,9 (m, 1H), 6,4 (m, 1H), 5,2 - 5,1 (m, 1H), 4,1 - 4,0 (m, 1H), 2,7 (s, 3H), 2,3 - 2,2 (m, 3H), 2,2 - 1,8 (m, 5H), 1,7 - 1,5 (m, 4H), 1,4 - 1,2 (m, 3H), 1,1 - 1,0 (m, 3H), 0,87 (s, 9H), 0,03 (s, 3H), 0,01 (s, 3H).

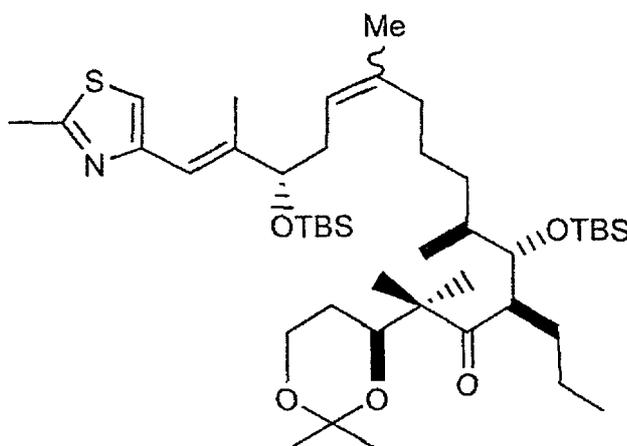
Etapa 4:



Intermedio de Síntesis-4

Se siguió el procedimiento de Klar y col. (Angew. Chem. Int. Ed. 2006, 45: 7942-7948). A 200 ml de THF a -78°C se añadieron 70 ml de LDA 0,5 M recién preparado (35 mmol), seguido por 8,48 g (35 mmol) de (S)-2-(2,2-dimetil-1,3-dioxan-4-il)-2-metilheptan-3-ona (Klar y col., Synthesis 2005, 2, 301-305). La agitación se continuó durante 30 min a -30° . Después de enfriar a -78° , se añadió una solución de ZnCl_2 1,0 M (35,0 ml, 35 mmol) y la solución resultante se agitó durante 20 min. Se añadió una solución de Intermedio de Síntesis-3 (7 g, 16,06 mmol) en 50 ml de THF durante 20 min. La mezcla se agitó durante 8 horas adicionales a -78°C . La mezcla se vertió en NH_4Cl saturado y se extrajo con EtOAc (300 ml). Las fases orgánicas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron al vacío. El residuo se purificó usando una columna de SiO_2 (EtOAc/hexano, 0-10 %) proporcionando 7,5 g (11 mmol, 69 %) de Intermedio de Síntesis-4 como el isómero que eluye primero y como el isómero de aldol principal. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 6,90 (m, 1H), 6,43 (m, 1H), 5,15 - 5,05 (m, 1H), 4,15-4,00 (m, 2H), 4,00 - 3,80 (m, 2H), 3,50 - 3,40 (m, 1H), 3,30 - 3,20 (m, 1H), 2,85 - 2,75 (m 1H), 2,69 (s, 3H), 2,35 - 2,15 (m, 2H), 2,10 - 1,90 (m, 5H), 1,75 - 0,75 (m, 41H), 0,05 - -0,05 (d, 6H), EM (CLEM) $[\text{M}+\text{H}] = 678,47$, $[\text{M}+\text{Na}] = 700,44$.

Etapa 5:



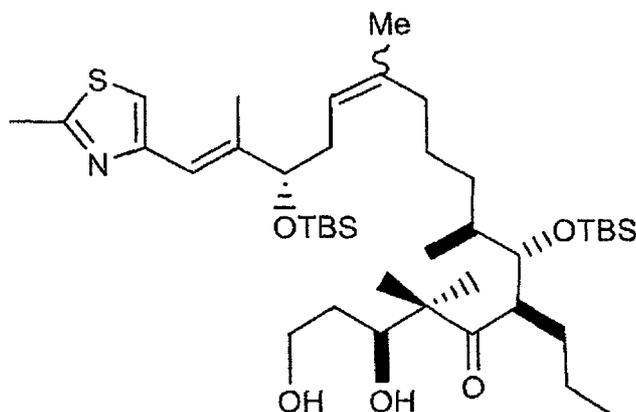
Intermedio de Síntesis-5

A una solución de Intermedio de Síntesis-4 (8 g, 11,8 mmol) en 200 ml de cloruro de metileno a 0° se añadió 2,6-lutidina (6,87 ml, 59 mmol), seguida por trifluorometanosulfonato de terc-butildimetilsililo (8,13 ml, 35,4 mmol). La mezcla se dejó calentar a RT durante toda una noche, se vertió en NaHCO_3 saturado y se extrajo con cloruro de metileno. Las fases orgánicas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 y los disolventes se eliminaron al vacío. El residuo se purificó en una columna de SiO_2 (EtOAc/hexano, 5-10 %) proporcionando Intermedio de

ES 2 501 565 T3

Síntesis-5 (7,8 g, 9,84 mmol, 83 %). RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 6,90 (s, 1H), 6,44 (s, 1H), 5,15 - 5,05 (m, 1H), 4,25 - 4,20 (m, 1H), 4,10 - 4,00 (m, 1H), 4,00 - 3,90 (m, 1H), 3,90-3,75 (m, 1H), 3,75-3,70 (m, 1H), 3,10 - 3,00 (, 1H), 2,70 (s, 3H), 2,35 - 2,15 (m, 2H), 2,00 - 1,85 (m, 5H), 1,70 - 0,75 (m, 50H), 0,10- -0,05 (m, 12H). EM (CLEM) $[\text{M}+\text{H}] = 792,48$, $[\text{M}+\text{Na}] = 814,44$.

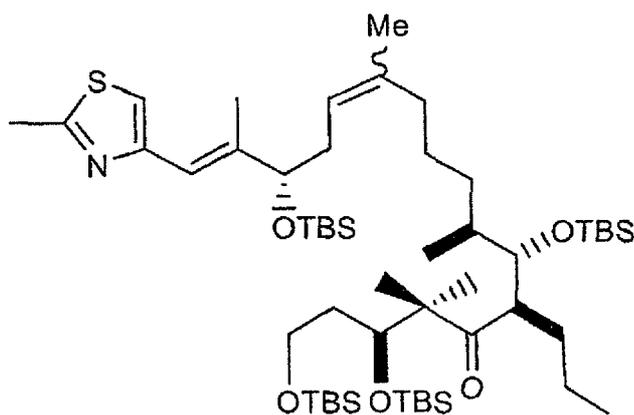
5 Etapa 6:



Intermedio de Síntesis-6

10 A una solución de Intermedio de Síntesis-5 (6,8 g, 8,58 mmol) en 100 ml de etanol a RT se añadió monohidrato de ácido p-toluenosulfónico (1,8 g, 9,44 mmol). Después de agitar durante 6 horas, se añadió NaHCO_3 y la mezcla se extrajo con EtOAc. Las fases orgánicas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron al vacío. La reacción se repitió usando 1 g de Intermedio de Síntesis-5. Los productos en bruto combinados se purificaron usando un sistema de BIOTAGE® (EtOAc/hexano, 10-40 %) proporcionando Intermedio de Síntesis-6 (5 g, 6,65 mmol, 68 %). RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 6,9 (s, 1H), 6,44 (s, 1H), 5,15-5,05 (m, 1H), 4,15 - 4,00 (m, 1H), 4,00 - 3,90 (m, 1H), 3,90 - 3,80 (m, 1H), 3,75 - 3,65 (m, 1H), 3,65 - 3,55 (m, 1H), 3,10 - 2,90 (m, 2H), 2,69 (s, 3H), 2,25 - 2,15(m, 2H), 2,00 - 0,75 (m, 50H), 0,10 - 0,05 (m, 12H). EM (CLEM) $[\text{M}+\text{H}] = 752,42$.

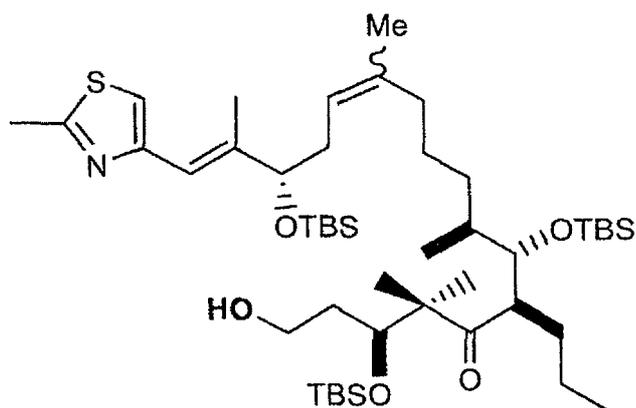
Etapa 7:



Intermedio de Síntesis-7

20 A una solución de Intermedio de Síntesis-6 (5 g, 6,65 mmol) en 200 ml de cloruro de metileno a 0° se añadió 2,6-lutidina (7,7 ml, 66,5 mmol), seguida por trifluorometanosulfonato de terc-butildimetilsililo (9,16 ml, 39,9 mmol). La mezcla se dejó calentar a RT durante 16 horas, después se vertió en NaHCO_3 saturado y se extrajo con cloruro de metileno. El disolvente orgánico se evaporó y la mezcla en bruto se filtró a través de una fase de SiO_2 con EtOAc/hexano (10-20 %) proporcionando Intermedio de Síntesis-7 como un aceite (6,9 g, 100 %). RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 6,9 (s, 1H), 6,44 (s, 1H), 5,20 - 5,05 (m, 1H), 4,10 - 4,00 (m, 1H), 3,95 - 3,85 (m, 1H), 3,80 - 3,75 (m, 1H), 3,70 - 3,60 (m, 1H), 3,60 - 3,50 (m, 1H), 3,10 - 3,00 (m, 1H), 2,69 (s, 3H), 2,25 - 2,15 (m, 2H), 2,00 - 0,75 (m, 67H), 0,10- -0,05 (m, 24H).

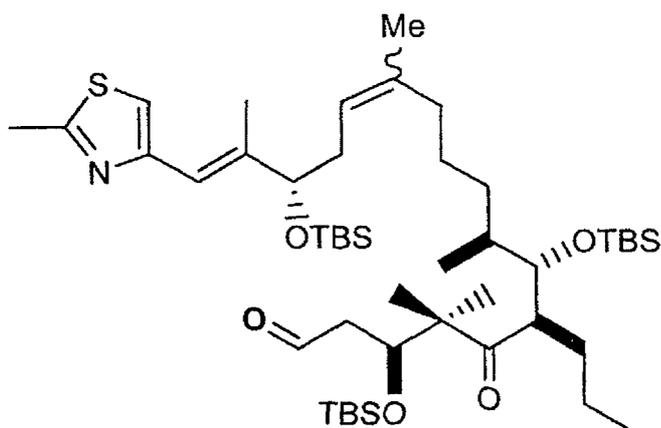
Etapa 8:



Intermedio de Síntesis-8

5 A una solución de Intermedio de Síntesis-7 (5 g, 5,1 mmol) en 80 ml de cloruro de metileno y 40 ml de MeOH a 0° se añadió ácido (+/-)-canfo-10-sulfónico (1,18 g, 5,1 mmol). La mezcla se agitó durante 6 h a 0°, se vertió en NaHCO₃ saturado y se extrajo con cloruro de metileno. Las fases orgánicas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron proporcionando Intermedio de Síntesis-8 como un aceite (3,6 g, 4,15 mmol, 81 %). RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 6,90 (s, 1H), 6,44 (s, 1H), 5,2 - 5,1 (m, 1H), 4,1 - 4,0 (m, 2H), 3,85 - 3,75 (m, 1H), 3,7 - 3,6 (m, 2H), 3,1 - 3,0 (m, 1H), 2,7 (s, 3H), 2,3 - 2,2 (m, 2H), 2,0 - 1,9 (m, 6H), 1,7 - 1,5 (m, 5H), 1,5 - 1,3 (m, 3H), 1,3 - 1,1 (m, 6H), 1,1 - 1,0 (m, 4H), 1,0 - 0,8 (m, 35H), 0,1 - -0,1 (m, 18H). EM (CLEM) [M+H] = 866,49.

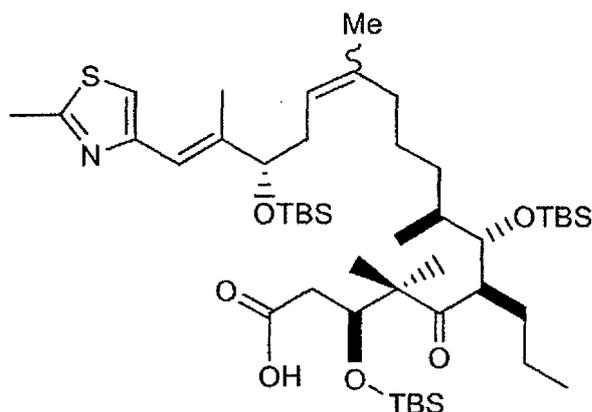
10 Etapa 9:



Intermedio de Síntesis-9

15 A una solución de cloruro de oxalilo (0,8 ml, 9,14 mmol) en 40 ml de cloruro de metileno a -78° se añadió DMSO (1,24 ml, 17,5 mmol). Después de agitar durante 10 min, se añadió una solución de Intermedio de Síntesis-8 (3,6 g, 4,15 mmol) en 40 ml de cloruro de metileno. Después de 30 min, se añadió TEA (3,76 ml, 27,0 mmol) y la mezcla de reacción se dejó calentar a 0° durante 2 h. Se añadió NaHCO₃ saturado y la mezcla se extrajo con cloruro de metileno. Las fases orgánicas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron al vacío proporcionando Intermedio de Síntesis-9 como un aceite (3,6 g, 4,16 mmol, 100 %). RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 9,77 (m, 1H), 6,9 (s, 1H), 6,44 (s, 1H), 5,3 (s, 1H), 5,2 - 5,1 (m, 1H), 4,5 - 4,4 (m, 1H), 4,1 - 4,0 (m, 1H), 3,8 - 3,7 (m, 1H), 3,1 - 3,0 (m, 1H), 2,7 (s, 3H), 2,6 - 2,1 (m, 4H), 2,0 - 1,9 (m, 4H), 1,7 - 1,5 (m, 4H), 1,5 - 1,3 (m, 5H), 1,3 - 1,1 (m, 5H), 1,1 - 1,0 (m, 3H), 1,0 - 0,8 (m, 35H), 0,1 - -0,1 (m, 18H).

Etapa 10:

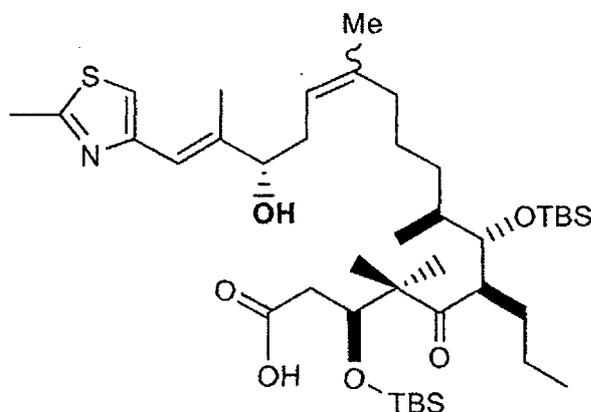


Intermedio de Síntesis-10

5 A una solución de Intermedio de Síntesis-9 (3,6 g, 4,16 mmol) en 120 ml de *t*-BuOH y 85 ml de THF a 0° se añadieron 30 ml de agua, 2-metilbut-1-eno (18,5 g, 264 mmol), dihidrógenofosfato de sodio (1,6 g, 13,2 mmol) y clorito de sodio (2,98 g, 26,4 mmol). Después de agitar a 2 h a 0°, la mezcla se vertió en solución de Na₂S₂O₃ saturada (100 ml) y se extrajo tres veces con EtOAc (300 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron al vacío. El residuo se purificó usando un sistema Biotage (EtOAc/hexano, 10-50 %) dando el Intermedio de Síntesis-10 como un aceite incoloro (2,8 g, 3,18 mmol, 72 %).

10 RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 6,93 (s, 1H), 6,66 (s, 0,5H), 6,46 (s, 0,5H), 5,25 - 5,0 (m, 1H), 4,4 - 4,3 (m, 1H), 4,2 - 4,0 (m, 1H), 3,9 - 3,7 (m, 1H), 3,2 - 3,0 (m, 1H), 2,7 (d, 3H), 2,6 - 2,4 (m, 1H), 2,4 - 2,0 (m, 3H), 2,0 - 1,0 (m, 23H), 1,0 - 0,8 (m, 35H), 0,1 - -0,1 (m, 18H). EM (CLEM) [M+H] = 881,53.

Etapa 11:

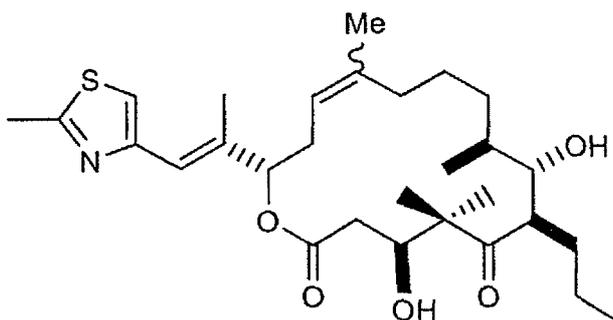


Intermedio de Síntesis-11

15 A una solución de Intermedio de Síntesis-10 (2,8 g, 3,18 mmol) en 5 ml de THF a RT se añadió TBAF (42 ml, 1,0 M). La mezcla se agitó durante 6 horas, después se vertió en NH₄Cl saturado y se extrajo dos veces con EtOAc (300 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con HCl (1,0 N, 200 ml), NaHCO₃ saturada y salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄ dando el Intermedio de Síntesis-11 como un aceite viscoso (2,6 g, 3,3 mmol, 100 %). RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 6,9 (s, 1H), 6,6 - 6,5 (m, 1H), 5,2 - 5,1 (m, 1H), 4,4 - 4,3 (m, 1H), 4,15 - 4,05 (m, 1H), 3,8 - 3,7 (m, 1H), 3,4 - 3,2 (m, 1H), 3,1 - 3,0 (m, 1H), 2,8 - 2,7 (m, 2H), 2,66 (d, 3H), 2,5 - 2,4 (m, 1H), 2,4 - 2,3 (m, 2H), 2,3 - 2,2 (m, 1H), 2,0 - 0,8 (m, 46H), 0,1 - 0,0 (m, 12H). EM (CLEM) [M+H] = 766,3, [M-H₂O] = 748,3.

20

Etapa 12:



Mezcla 13 E/Z de Compuesto III

5 A una solución de Intermedio de Síntesis-11 (2,6 g, 3,3 mmol) en 27 ml de THF a RT se añadió TEA (2,36 ml, 17 mmol), seguido por cloruro de 2,4,6-triclorobenzoílo (3,31 g, 13,57 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 20 min, después se diluyó con 260 ml de tolueno. La solución de tolueno se añadió lentamente a una mezcla agitada de DMAP (3,86 g, 31,6 mmol) en 1400 ml de tolueno durante 4 h, después de lo que TLC indicó finalización. Se añadió HCl (4,0 N, 12,5 ml) y el disolvente se eliminó al vacío. El residuo se purificó parcialmente usando un sistema de BIOTAGE® (EtOAc/hexano, 0-10 %), proporcionando una mezcla que contenía un producto de monosililo y la mezcla anterior (isómeros 13 E/Z) incluyendo Compuesto III (1,1 g). EM (CLEM) (520,2, 634,2). Este material se sometió a desprotección sin purificación adicional.

Etapa 13: Compuesto III

15 A una solución de la mezcla de reacción anterior (102 mg) a -20° se añadió 1 ml de TFA/CH₂Cl₂ (20 % v/v). La mezcla de reacción se transfirió a un baño de hielo y se agitó durante 1 h. El disolvente se retiró al vacío, añadiéndose pequeñas porciones de tolueno re-evaporando después, lo que proporcionó un sólido blanco. La misma reacción se repitió con 125 mg de la mezcla parcialmente purificada. Los dos residuos de la reacción se combinaron y purificaron en una columna de SiO₂ (EtOAc/hexano, 20-35 %) lo que proporcionó un sólido blanco (180 mg). El sólido blanco se llevó en 5 ml de MeOH y se purificó por HPLC (Varian, detector Dynamax PDA-2; columna Waters C18; A: agua con TFA al 0,05 %; B: acetonitrilo con TFA al 0,05 %, isocrático). Se recogieron dos picos principales (Pico 1, 73,4 mg, 38 %; y Pico 2, 41,8 mg, 22 %).

20 El Pico 1 se determinó que es el isómero 13-Z (numeración 1-oxa) mediante observación de NOE entre el protón olefínico de C-14 y el metilo C-13. RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,14 (s, 1H), 6,75 (s, 1H), 5,15-5,05 (m, 1H), 5,05-5,00 (m, 1H), 4,45-4,35 (m, 1H), 3,65-3,55 (m, 1H), 3,35-3,25 (m, 1H), 2,92 (s, 3H), 2,55-2,45 (m, 2H), 2,35-2,25 (m, 2H), 2,25-2,15 (m, 1H), 2,00 (s, 3H), 1,90-1,80 (m, 1H), 1,80-1,65 (m, 5H), 1,60-1,45 (m, 2H), 1,45-1,30 (m, 5H), 1,25-1,15 (m, 3H), 1,05-0,95 (m, 6H), 0,90-0,85 (t, 3H). EM (CLEM) [M+H] = 520,3.

25 El Pico 2 se determinó que es el isómero 13-E (Compuesto III para experimento del Ejemplo 7, a continuación) por ausencia de NOE entre el protón olefínico C-14 y el metilo C-13. RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,03 (s, 1H), 6,65 (s, 1H), 5,3-5,2 (m, 1H), 5,05-5,00 (m, 1H), 4,45-4,40 (m, 1H), 3,65-3,60 (m, 1H), 3,4-3,3 (m, 1H), 2,77 (s, 3H), 2,6-2,3 (m, 4H), 2,15-2,05 (m, 1H), 1,99 (s, 3H), 1,95-1,85 (m, 1H), 1,8-1,7 (m, 2H), 1,57 (s, 3H), 1,50-1,35 (m, 4H), 1,29 (s, 3H), 1,25-1,10 (m, 3H), 1,0-0,9 (m, 6H), 0,9-0,8 (t, 3H). EM (CLEM) [M+H] = 520,3.

30 Estudios *in-vivo* orales con epotilona D y Compuesto III

Para cada compuesto (epotilona D y Compuesto III, preparado y descrito como por el experimento inmediatamente anterior), se administraron dosis a tres ratones por grupo (10 mpk y 35 mpk) a 10 ml/kg usando PEG-400 al 85 %, TPGS al 10 % y etanol al 5,0 %. A diversos intervalos después de la dosificación, los niveles de compuesto de plasma, cerebro e hígado se midieron tras homogeneización tisular, extracción con acetonitrilo y cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (CL/EM/EM). Los resultados de los estudios se resumen en las tablas 4 y 5 y además, los resultados del estudio a 35 mpk se comunican en la FIG. 9. Específicamente, la tabla 4 comunica la concentración de la epotilona D (Compuesto 1) y del Compuesto III en el cerebro después de administración oral (10 mpk) hasta 24 horas después de dosificación (para Compuesto III, a la extensión aún detectable dando LLQ) y la tabla 5 comunica y la FIG. 9 traza, la concentración de epotilona D (Compuesto 1) y de Compuesto III en el cerebro después de administración oral (35 mpk) hasta 5 a 24 horas después de dosificación (de nuevo, para el Compuesto III, a la extensión detectable). (No se preparó un trazado para los datos de la tabla 4 ya que solo fue detectable un valor de concentración cerebral para el Compuesto III). En las tablas 4 y 5, a continuación, donde los valores eran <LLQ, se anota el valor LLQ entre paréntesis.

TABLA 4

Compuesto	Tiempo (hr)	Conc. en plasma (nM)	Conc. en cerebro (nM)	Proporción Cerebro/Plasma	Proporción Cerebro/Hígado
Compuesto III	1	12,3	9,6	0,8	0,1
	5	1,3	<LLQ (3,7 nM)	NQ	NQ
	7	1,2	<LLQ (3,7 nM)	NQ	NQ
	24	<LLQ (0,2 nM)	<LLQ (3,7 nM)	NQ	NQ
Epotilona D	1	15,1	10,6	0,7	0,4
	3	3,9	7,0	1,8	1,3
	4	2,5	9,9	4,0	3,4
	8	1,4	6,4	4,6	1,8
	13	0,1	6,3	47,3	5,1
	24	0,2	9,1	44,5	8,0
	48	<LLQ (0,1 nM)	5,4	NQ	NQ
	96	<LLQ (0,1 nM)	3	NQ	NQ

TABLA 5

Compuesto	Tiempo (hr)	Conc. en plasma (nM)	Conc. en cerebro (nM)	Proporción Cerebro/Plasma	Proporción Cerebro/Hígado
Compuesto III	1	47,7	67,7	2,3	0,4
	5	3,0	4,6	1,4	NQ
	24	0,7	<LLQ	NQ	NQ
Epotilona D	1	52,7	61,3	1,1	0,5
	5	3,6	76,9	25,2	11,3
	24	<LLQ (0,5 nM)	118	NQ	18,7

5

10

Como se puede observar, para el Compuesto III, los niveles de tejidos de las últimas veces (es decir, después de 1 hora o más) muestran que los niveles de Compuesto III disminuyeron rápidamente en el tejido cerebral. Así, el Compuesto III tiene retención cerebral baja según se observó en la carencia de niveles cerebrales medibles a 24 horas en ambos experimentos. La dosificación oral con epotilona D reveló proporciones de cerebro frente a plasma de 0,7 y 1,1 a 1 hora, reflejando buena penetración cerebral. A diferencia del Compuesto III, los niveles cerebrales de epotilona D se mantuvieron durante más de 24 horas (tablas 2, 4 y 5, figuras 9-10). La proporción cerebro frente a hígado para dosificación oral de epotilona D indica que la epotilona D está retenida selectivamente en el cerebro,

de forma consistente con los datos en las tablas 1 y 2 después de la dosificación IV. En particular, la proporción cerebro a hígado para epotilona D fue de 8 y 19 a 24 horas después de dosificación a 10 mpk y a 35 mpk, respectivamente (tablas 4 y 5). Estos valores reflejan velocidades de retención de cerebro frente a hígado selectivas remarcablemente altas para epotilona D.

5 Ejemplo 8

Datos de semivida de epotilona D tras administración IV, oral e IP

Para evaluar adicionalmente las propiedades de epotilona D para tratar tauopatías, la semivida cerebral de epotilona D se calculó a partir de múltiples estudios y los resultados se mostraron en la tabla 6. Para calcular una semivida cerebral segura para un compuesto de semivida larga, necesitan tomarse medidas para varias semividas después de una dosis individual. A partir del estudio descrito en la tabla 2, donde se midieron las concentraciones cerebrales por 7 días después de una dosis única, la semivida cerebral de epotilona D (Compuesto I) después de dosificación IV es 61 horas (tabla 6). La semivida cerebral en ratones después de múltiples vías de administración y dosificaciones promedió 46,0 +/- 7 horas (tabla 6). De forma similar, la semivida cerebral después de dosificación IV en ratas fue de 31 horas (tabla 6). En contraste, la semivida cerebral del Compuesto III fue claramente significativamente más corta que la epotilona D, como se refleja en la FIG. 9. Como una ilustración adicional de la semivida cerebral de la epotilona D, se proporciona la FIG. 10 que traza los resultados de un estudio (datos comunicados en la tabla 2, anteriormente) que muestra los niveles de concentración cerebral a periodos de tiempo de hasta 175 horas tras dosificación, tras una administración de bolo IV de 5 mpk.

TABLA 6

Especie	Vía	Dosis (mpk)	Semivida (horas)
Ratón	IV	5	61
Ratón	Oral	10	46
Ratón	IP	1	44
	IP	10	41, 37, 45, 46
Rata	IV	1	31

20 Lista de citas

Altmann y col., "The Chemistry and Biology of Epotilones—The Wheel Keeps Turning", *Chem. Med. Chem.*, vol. 2 (2007).

Andorfer, C. y col., "Cell-cycle reentry and cell death in transgenic mice expressing nonmutant human tau isoforms", *J. Neurosci.*, 25(22): 5446-5454 (2005).

25 Andrieux, A. y col., "Microtubule stabilizer ameliorates synaptic function and behavior in a mouse model for schizophrenia", *Biol. Psychiatry*, 60(11): 1224-1230 (2006).

Avila, J. y col., "Role of tau protein in both physiological and pathological conditions", *Physiol. Rev.*, 84(2): 361-384 (2004).

30 Ballatore, C. y col., "Paclitaxel C-10 carbamates: potential candidates for the treatment of neurodegenerative tauopathies", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17(13): 3642-3646 (2007).

Bartosik-Psujek, H. y Z. y col., "The CSF levels of total-tau and phosphotau in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis", *J. Neural. Transm.*, 113(3): 339-345 (2006).

Berger, Z., H. y col., "Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy", *J. Neurosci.*, 27(14): 3650-3662 (2007).

35 Bergstralh, D. T. y col., "Microtubule stabilizing agents: their molecular signaling consequences and the potential for enhancement by drug combination", *Cancer Treat. Rev.*, 32(3): 166-179 (2007).

Bollag, D. M. y col., "Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action", *Cancer Res.*, 55(11): 2325-2333 (1995).

40 Burke, W. J. y col., "Taxol protects against calcium-mediated death of differentiated rat pheochromocytoma cells." *Life Sci.*, 55(16): 313-319 (1994).

Butler, D., y col., "Microtubule-stabilizing agent prevents protein accumulation-induced loss of synaptic markers",

- Eur. J. Pharmacol., 562(1-2): 20-27 (2007).
- Chou, T.C. y col., "Desoxyepothilone B: An efficacious microtubule-targeted antitumor agent with a promising *in vitro* profile relative to epothilone B", Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 95: 9642-9647 (1998).
- 5 Dickey, C. A. y col., "Current strategies for the treatment of Alzheimer's disease and other tauopathies", Expert. Opin. Ther. Targets, 10(5): 665-676 (2006).
- Divinski, I. y col., "Peptide neuroprotection through specific interaction with brain tubulin", J. Neurochem., 98(3): 973-984 (2006).
- Fellner, S., y col., "Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier *in vitro* and *in vivo*", J. Clin. Invest., 110(9): 1309-1318 (2002).
- 10 Furukawa, K. y col., "Taxol stabilizes [Ca²⁺]_i and protects hippocampal neurons against excitotoxicity", Brain Res., 689(1): 141-146 (1995).
- Gerth y col., "Epothilons A and B: Antifungal and Cytotoxic Compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria)", Journal of Antibiotics, 49(6): 560-563 (junio 1996).
- 15 Goedert y col., "Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205", Neurosci. Lett., 189: 167-170 (1995).
- Gozes, I. "Activity-dependent neuroprotective protein: from gene to drug candidate", Pharmacol. Ther., 114(2): 146-154 (2007).
- Gozes, I. y col., "Neurotrophic effects of the peptide NAP: a novel neuroprotective drug candidate", Curr. Alzheimer Res., 3(3): 197-199 (2006).
- 20 Kolman, A., "Epothilone D (Kosan/Roche)", Curr. Opin. Investig. Drugs, 5(6): 657-667 (2004).
- Lace, G. L. y col., "A brief history of tau: the evolving view of the microtubule-associated protein tau in neurodegenerative diseases." Clin. Neuropathol., 26(2): 43-58 (2007).
- Lee, y col., "Microtubule stabilizing drugs for the treatment of Alzheimer's disease." Neurobiol. Aging, 15 (supl. 2): S87-S89 (1994).
- 25 Magnani y col., "Interaction of tau protein with the dynactin complex", EMBOJ., 26(21): 4546-4554 (2007).
- Matsuoka, Y. y col., "Intranasal NAP administration reduces accumulation of amyloid peptide and tau hyperphosphorylation in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease at early pathological stage". J. Mol. Neurosci., 31(2): 165-170 (2007).
- 30 Matsuoka, Y. y col., "A neuronal microtubule-interacting agent, NAPVSIPQ, reduces tau pathology and enhances cognitive function in a mouse model of Alzheimer's disease", J. Pharmacol. Exp. Ther., 325(1): 146-153 (2008).
- Michaelis, M. L., "Ongoing *in vivo* studies with cytoskeletal drugs in tau transgenic mice", Curr. Alzheimer Res., 3(3): 215-219 (2006).
- Michaelis, M. L. y col., "{beta}-Amyloid-induced neurodegeneration and protection by structurally diverse microtubule-stabilizing agents", J. Pharmacol. Exp. Ther., 312(2): 659-668 (2005).
- 35 Michaelis, M. L. y col., "Cytoskeletal integrity as a drug target", Curr. Alzheimer Res., 2(2): 227-229 (2005).
- Minderman, H., y col., "Broad-spectrum modulation of ATP-binding cassette transport proteins by the taxane derivatives ortataxel (IDN-5109, BAY 59-8862) and tRA96023", Cancer. Chemother. Pharmacol., 53(5): 363-369 (2004).
- 40 Moller, A. y col., "Efficient estimation of cell volume and number using the nucleator and the disector", J. Microsc., 159(Pt 1): 61-71 (1990).
- Morsch, R. y col., "Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles", J. Neuropathol. Exp. Neurol., 58(2): 188-197 (1999).
- Oddo, S., A. y col., "Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction", Neuron 39(3): 409-421 (2003).
- 45 Postma, T. J. y col., "Peripheral neuropathy due to biweekly paclitaxel, epirubicin and cisplatin in patients with advanced ovarian cancer", J. Neuro-Oncology 45: 241-246 (1999).

- Preuss, U., J. y col., "The 'jaws' model of tau-microtubule interaction examined in CHO cells", *J. Cell Sci.*, 110 (Pt. 6): 789-800 (1997).
- Rice, A. y col., "Chemical modification of paclitaxel (Taxol) reduces P-glycoprotein interactions and increases permeation across the blood-brain barrier *in vitro* and *in situ*", *J. Med. Chem.*, 48(3): 832-838 (2005).
- 5 Roberson, E. D. y col., "Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model", *Science*, 316 (5825): 750-754 (2007).
- Roy, S. y col., "Axonal transport defects: a common theme in neurodegenerative diseases", *Acta Neuropathol.*, 109(1): 5-13 (2005).
- 10 Santacruz, K. y col., "Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function", *Science*, 309(5733): 476-481 (2005).
- Spittaels, K. y col., "Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates protein tau and rescues the axonopathy in the central nervous system of human four-repeat tau transgenic mice", *J. Biol. Chem.*, 275(52): 41340-41349 (2000).
- 15 Sponne, I. y col., "Apoptotic neuronal cell death induced by the non-fibrillar amyloid-beta peptide proceeds through an early reactive oxygen species-dependent cytoskeleton perturbation", *J. Biol. Chem.*, 278(5): 3437-45 (2003).
- Terwel, D. y col., "Amyloid activates GSK-3beta to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice", *Am. J. Pathol.*, 172(3): 786-98 (2008).
- 20 Wagner, B.K. y col., "Large-scale chemical dissection of mitochondrial function", *Nature Biotechnology*, 26(3): 343-351 (2008).
- Wostyn, P. y col., "Alzheimer's disease-related changes in diseases characterized by elevation of intracranial or intraocular pressure", *Clin Neurol Neurosurg.*, 110(2): 101-9 (2008).
- Zhang, B. y col., "Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model", *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 102(1): 227-31 (2005).
- 25

REIVINDICACIONES

1. Uso de epotilona D en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer en un paciente humano que necesita tratamiento de la misma.
- 5 2. Uso de epotilona D en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedad asociada a Tau en un paciente humano que necesita tratamiento de la misma, en el que enfermedad asociada a Tau está seleccionada entre demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Pick, enfermedad de los granos argirófilos, síndrome de Down, distrofia miotónica, enfermedad de Niemann-Pick C, demencia pugilística, enfermedad de Blint y daño cerebral traumático.
- 10 3. Uso de epotilona D de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la epotilona D es administrada intravenosamente.
4. Uso de epotilona D de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la dosis mensual acumulativa de epotilona D a administrar al paciente humano es de 30 mg/m^2 o menos.
- 15 5. Uso de epotilona D de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la dosis mensual acumulativa de epotilona D a administrar al paciente humano es de 6 mg/m^2 o menos.
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la dosis de epotilona D a administrar intravenosamente durante un ciclo de un mes, independientemente del calendario de administración, está en el intervalo de $0,01\text{-}5 \text{ mg/m}^2$.
- 20 7. Uso de epotilona D de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la dosis de epotilona D a administrar intravenosamente durante un ciclo de un mes, independientemente del calendario de administración, está en el intervalo de $0,1\text{-}3 \text{ mg/m}^2$.
8. Uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la epotilona D es para ser administrada por vía oral.
9. Uso de epotilona D de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la dosis de epotilona D a administrar por vía oral durante un ciclo de un mes, independientemente del calendario de administración, está en el intervalo de $0,03$ a 60 mg/m^2 .
- 25 10. Una formulación farmacéutica para la administración a un paciente humano para su uso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, en el que dicha formulación comprende una monodosis de epotilona D de $0,0001\text{-}10 \text{ mg/m}^2$.
- 30 11. Una formulación farmacéutica para la administración a un paciente humano para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada a Tau seleccionada de demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Pick, enfermedad de los granos argirófilos, síndrome de Down, distrofia miotónica, enfermedad de Niemann-Pick C, demencia pugilística, enfermedad de Blint y daño cerebral traumático, en la que dicha formulación comprende una monodosis de epotilona D de $0,0001\text{-}10 \text{ mg/m}^2$.
12. Epotilona D para su uso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer.
- 35 13. Epotilona D para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada a Tau seleccionada de demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Pick, enfermedad de los granos argirófilos, síndrome de Down, distrofia miotónica, enfermedad de Niemann-Pick C, demencia pugilística, enfermedad de Blint y daño cerebral traumático.

FIG. 1

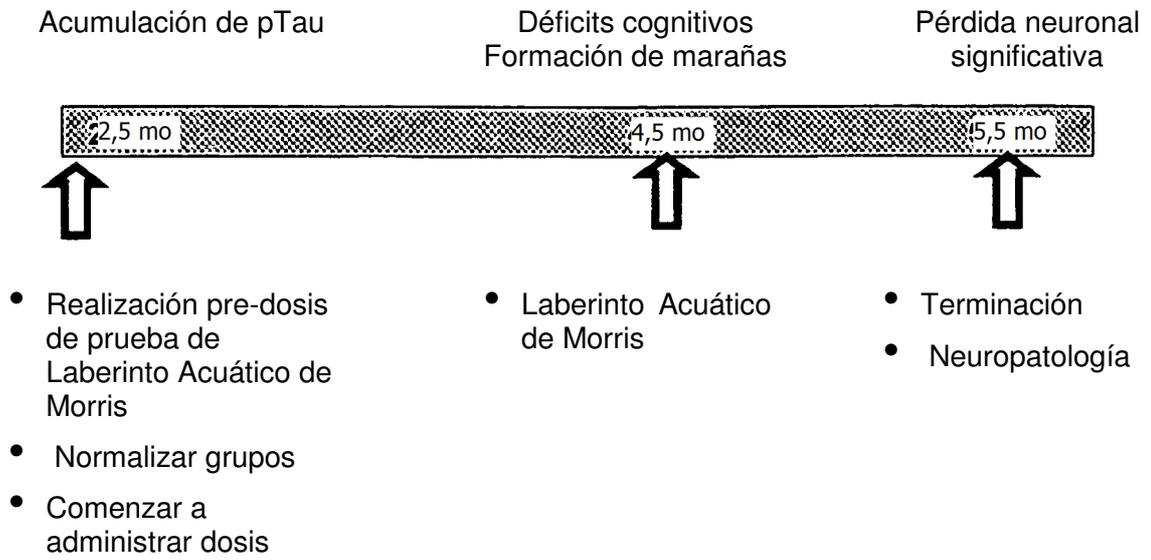


FIG. 2

PRE-DOSIS

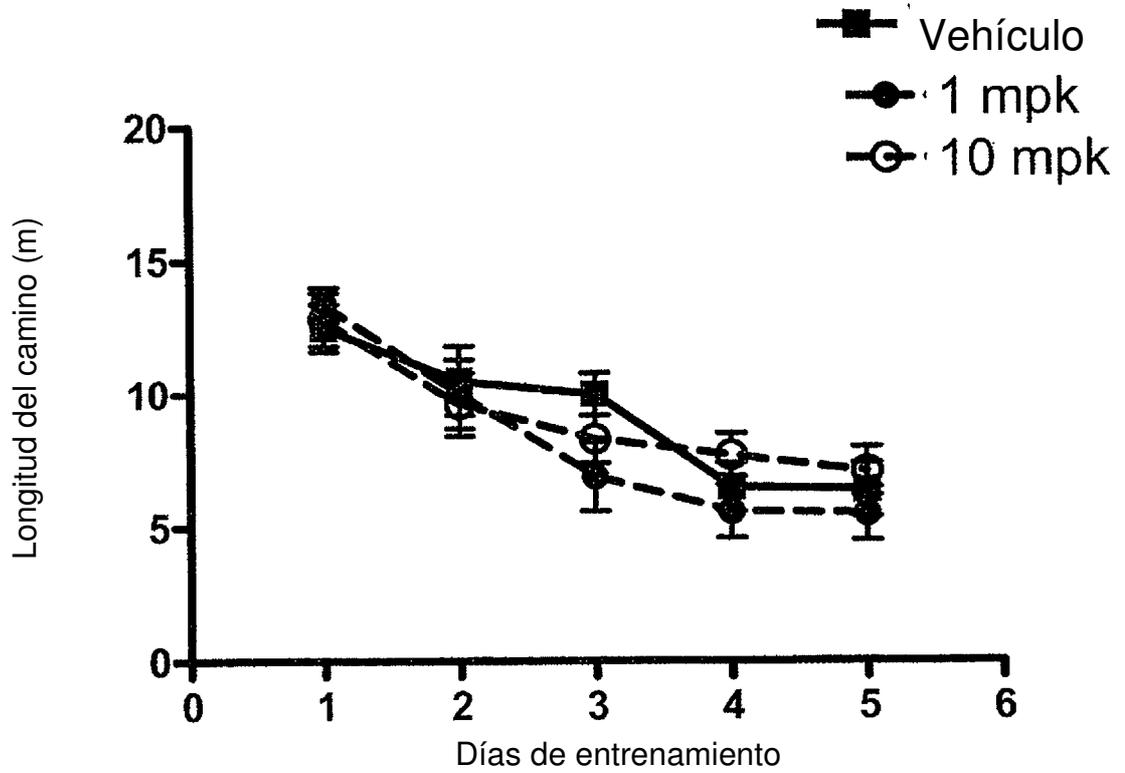


FIG. 3

POST-DOSIS

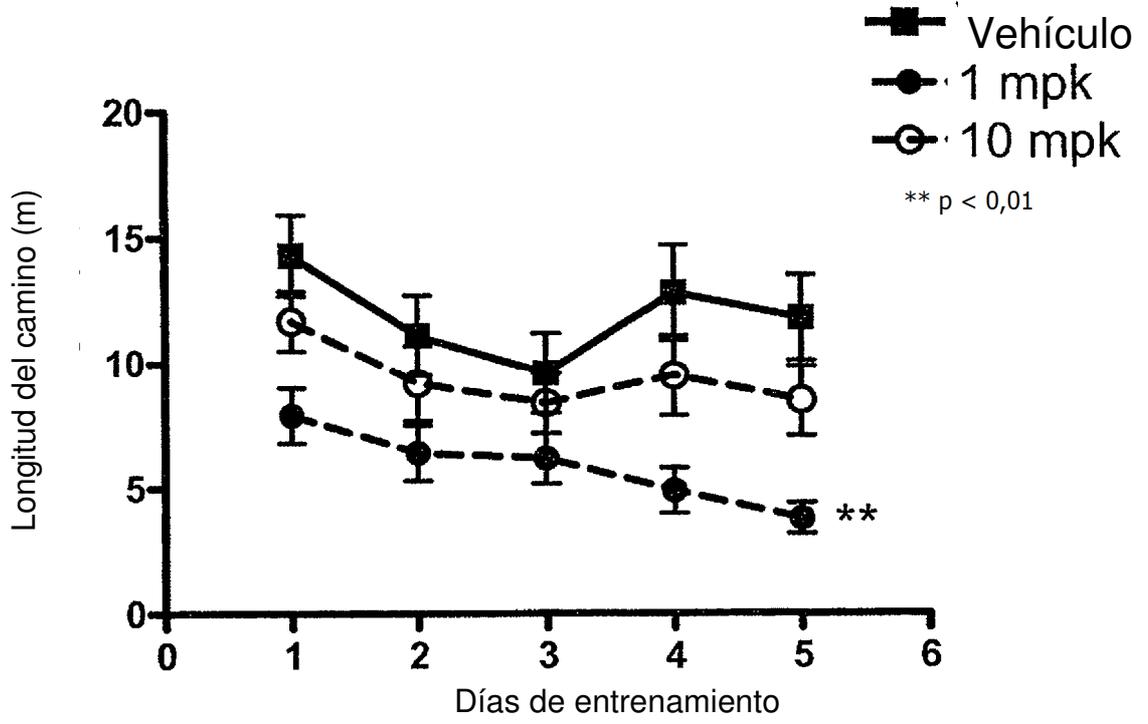


FIG. 4

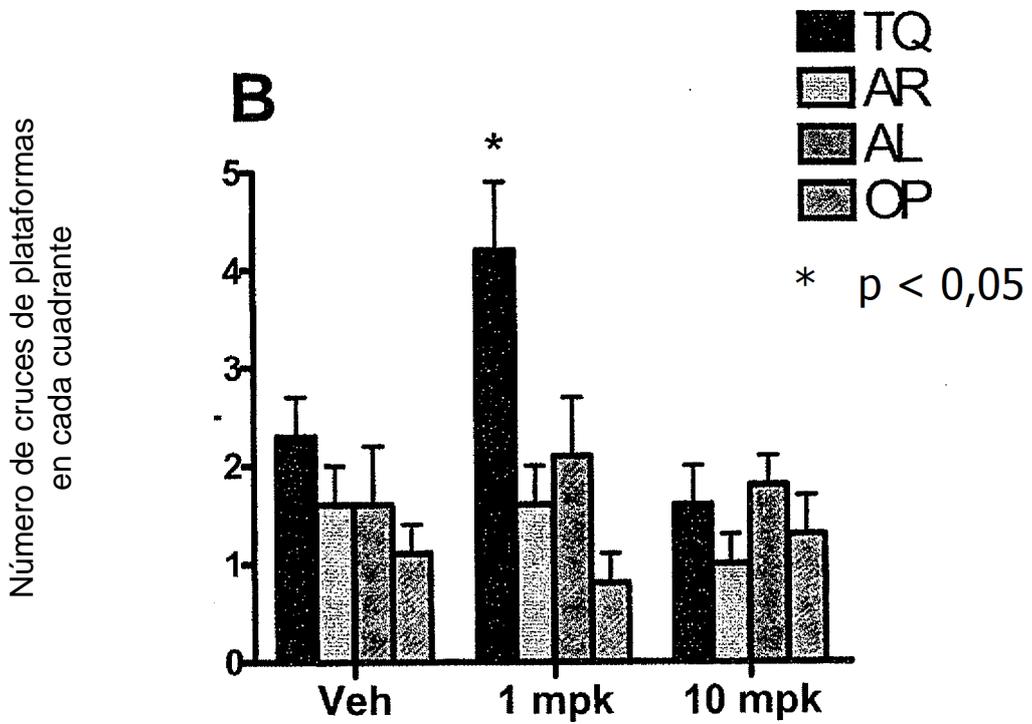
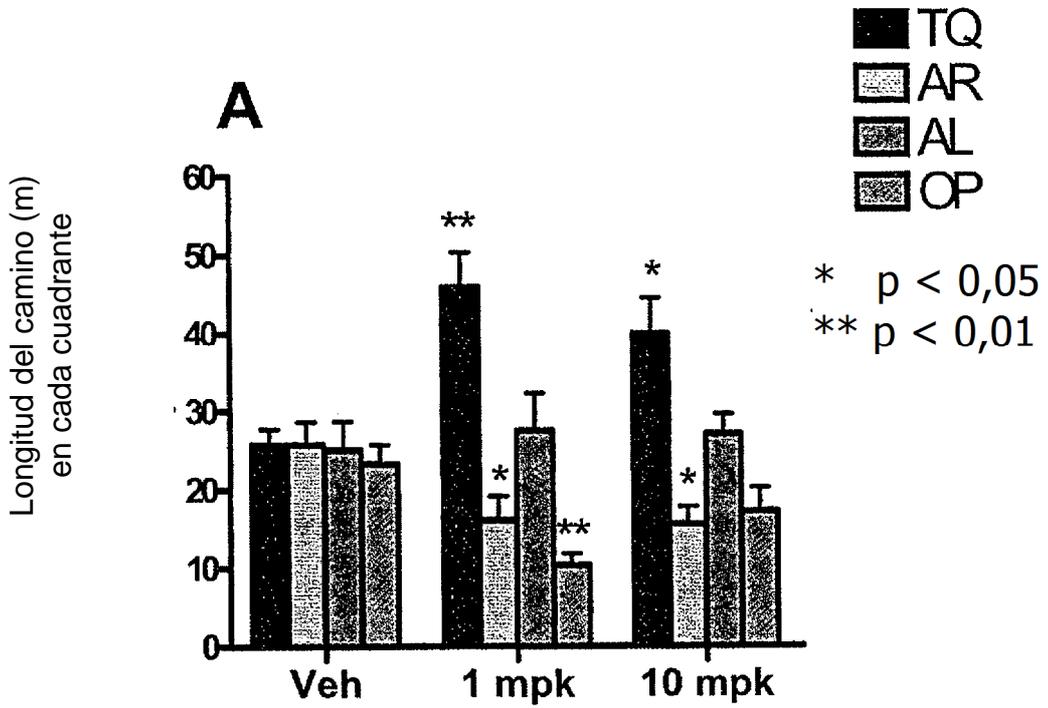


FIG. 5

Células totales en el área de CA1 o CA3 del hipocampo

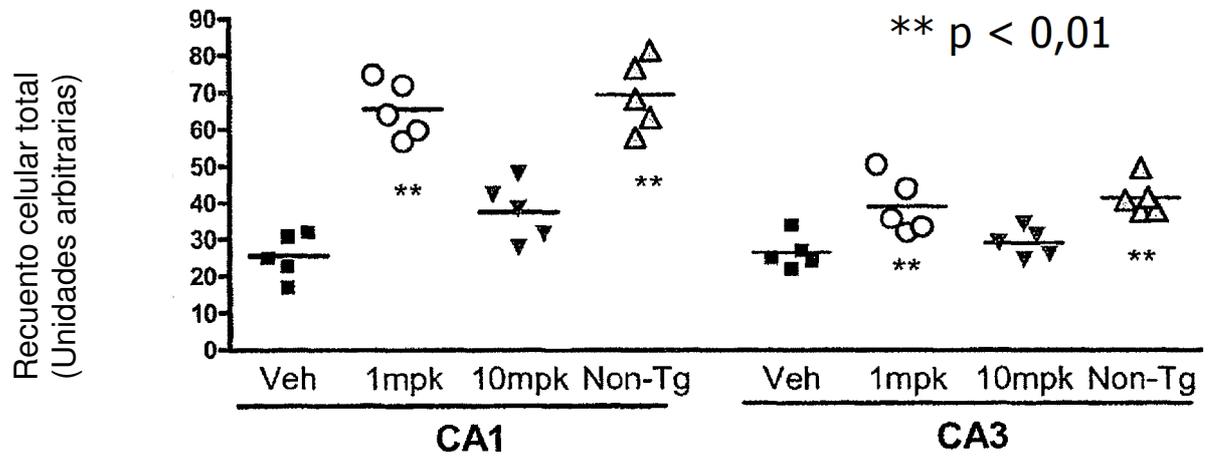


FIG. 6

Vehículo

1 mpk

10 mpk

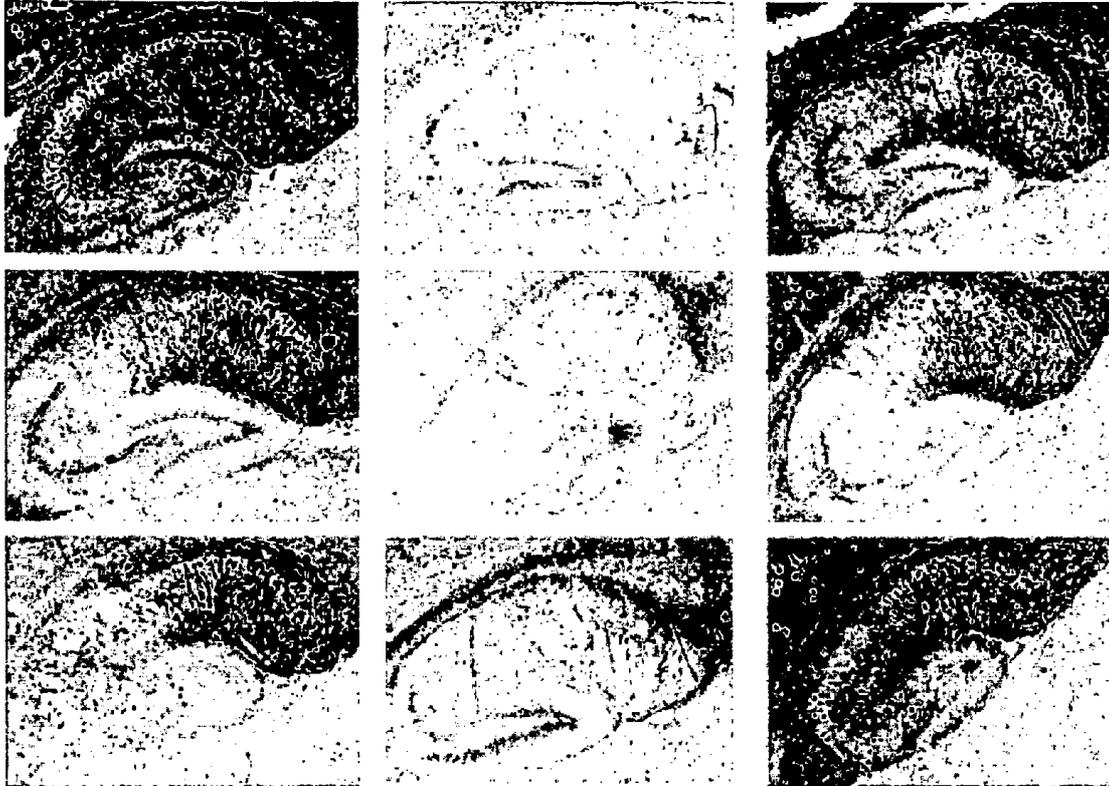


FIG. 7A

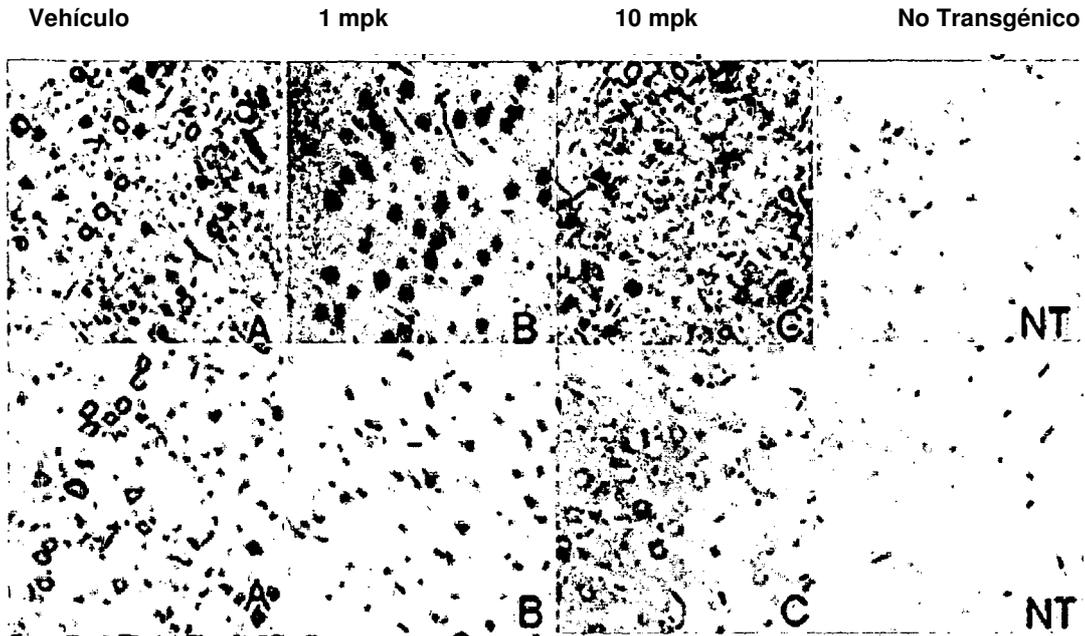


FIG. 7B

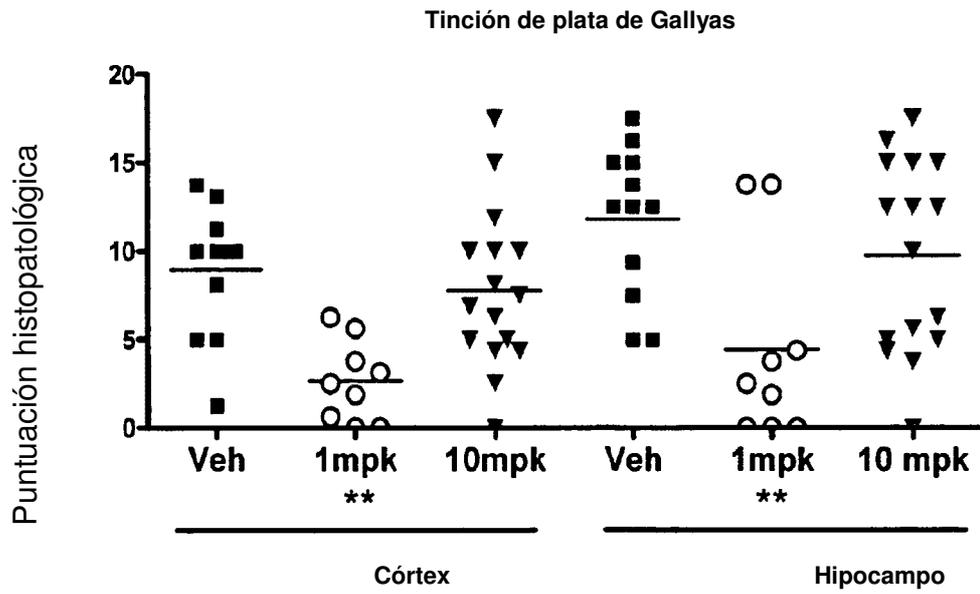


FIG. 8A
Compuesto II
1 mpk IV

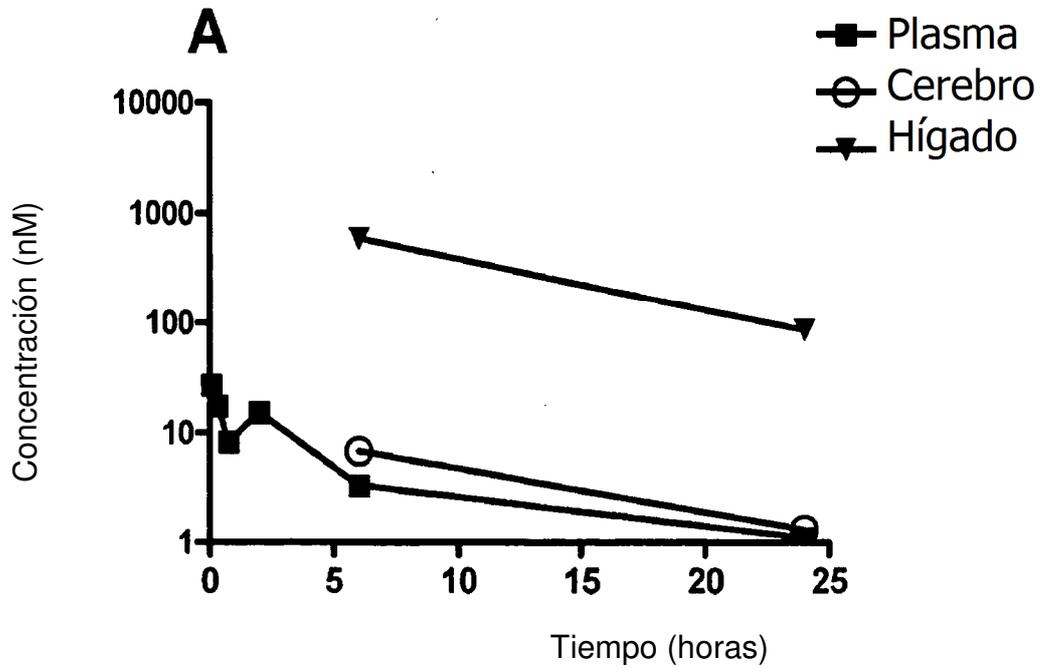


FIG. 8B
Ixabepilona
12 mpk (IV)

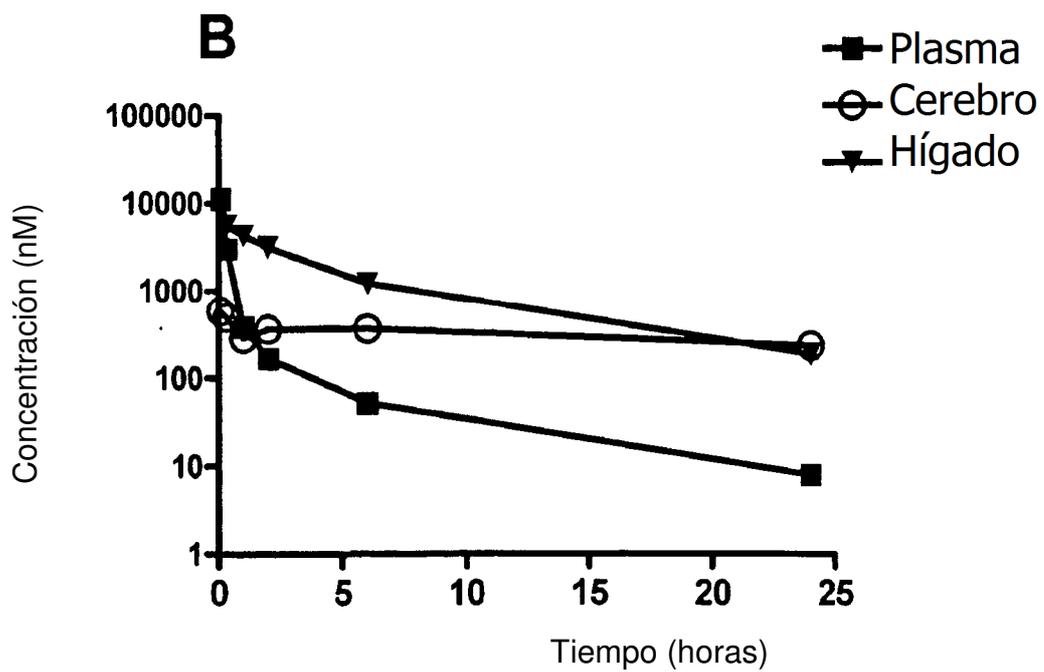


FIG. 8C

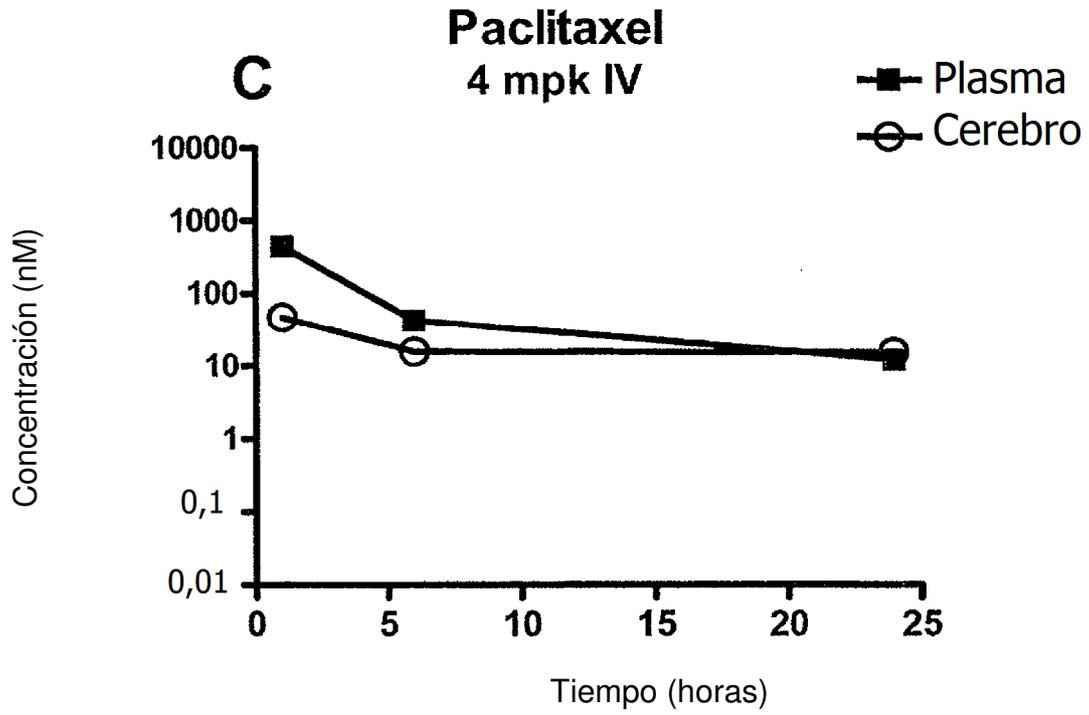


FIG. 8D

Epotilona D (Compuesto I)
5 mpk IV

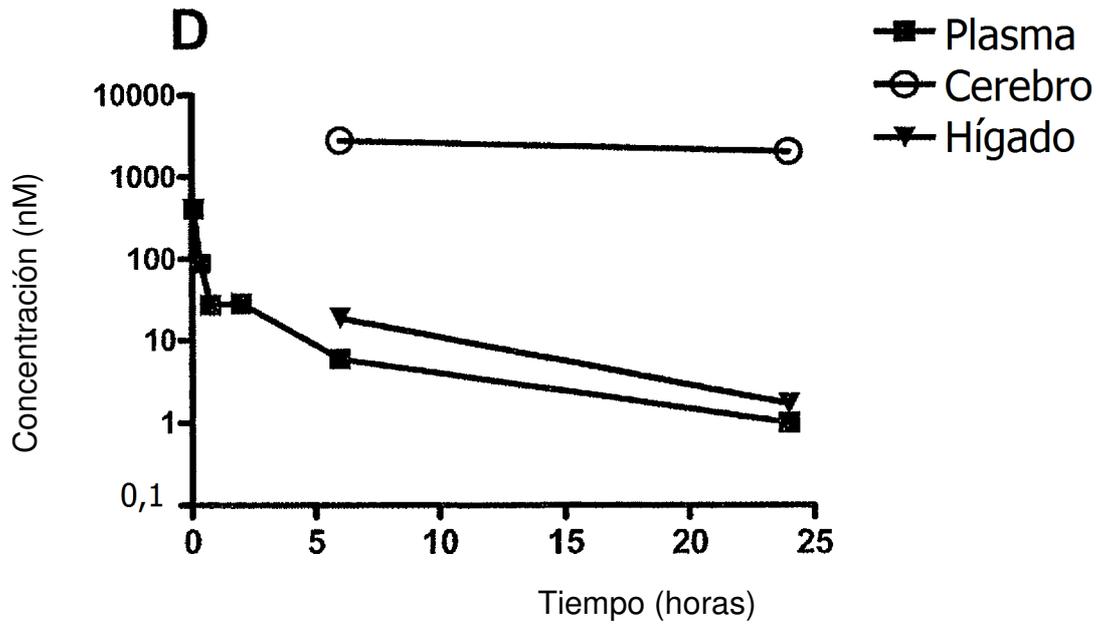


FIG. 9

Niveles cerebrales

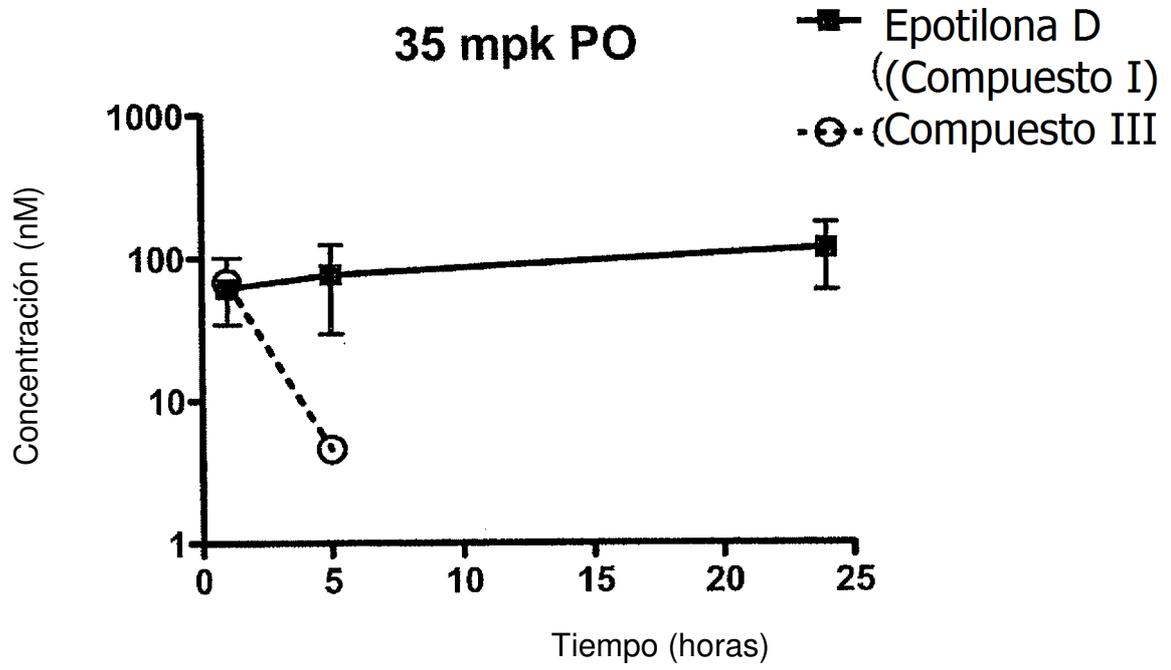


FIG. 10
Epotilona D (Compuesto I)
5 mpk IV

