

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 987**

51 Int. Cl.:

A61K 31/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61K 31/496 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2009 E 09761084 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 2365804**

54 Título: **Reducción de la carga de amiloide β en tejido no cerebral**

30 Prioridad:

13.11.2008 US 114459 P

03.08.2009 US 230926 P

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

26.08.2015

73 Titular/es:

MODGENE, LLC (100.0%)

P.O. Box 422

Cardiff By The Sea, CA 92007, US

72 Inventor/es:

SUTCLIFFE, J. GREGOR;

BLOOM, FLOYD E. y

HILBUSH, BRIAN S.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 543 987 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

Reducción de la carga de amiloide β en tejido no cerebral

La presente solicitud reivindica prioridad sobre las solicitudes provisionales de EE.UU. N° de serie 114.459, presentada el 13 de noviembre de 2008, y 61/230.926, presentada el 3 de agosto de 2009.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a usos y composiciones para modular los niveles del péptido amiloide β ($A\beta$) que presentan las células no neurales (es decir, periféricas), fluidos o tejidos. La invención también se refiere a la modulación de los niveles de $A\beta$ a través de la modulación selectiva (por ejemplo, inhibición) de la actividad de γ -secretasa en los tejidos periféricos. La invención se refiere adicionalmente a prevenir, tratar o mejorar los síntomas de un trastorno, incluyendo, entre otros, un trastorno relacionado con la $A\beta$ -neural, mediante la administración periférica de un compuesto que tiene como resultado la modulación de la γ -secretasa, ya sea directa o indirectamente. La invención también se refiere al uso de moduladores de la actividad de la γ -secretasa mediante administración periférica para prevenir, tratar o mejorar los síntomas de la enfermedad de Alzheimer.

Antecedentes

15 Los péptidos de amiloide- β ($A\beta$) son metabolitos de la proteína precursora asociada a la enfermedad de Alzheimer, la proteína precursora de β -amiloide (APP), y se cree que son los principales determinantes patológicos de la enfermedad de Alzheimer (EA). La EA es un trastorno neurodegenerativo que se caracteriza por el depósito dependiente de la edad de $A\beta$ en las regiones vulnerables del cerebro, especialmente la corteza frontal y el hipocampo (Terry RD. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 19:125-128, 2006). El $A\beta$ tiene un efecto patogénico, lo que lleva a la pérdida progresiva de neuronas que causa deterioro de la capacidad de esas regiones del cerebro para orquestar los procesos neurales tanto básicos como de orden superior. A medida que el deterioro empeora, el individuo afectado se enfrenta a demencia y a un empeoramiento de la calidad de vida, y, finalmente, la afección es fatal (Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM. *Alzheimer's Dement* 3:186-191, 2007; Powers JM. *Neurobiol Aging* 18:S53-S54, 1997).

25 Se cree que el desarrollo de la EA es la consecuencia de los procesos bioquímicos naturales asociados con el envejecimiento, y que casi cada individuo manifestaría, en última instancia, síntomas de la enfermedad si vivieran el tiempo suficiente. La edad es el factor de riesgo más grande conocido para la EA, con una incidencia del 25-50 % en personas de 85 años de edad o mayores (Giacobini E. *Ann NY Acad Sci* 920:321-327, 2000). Para un individuo dado, el tiempo en el que el trastorno se manifiesta es la consecuencia de una serie adicional de factores de riesgo, algunos de los cuales podrían deberse a causas ambientales, pero muchos de ellos se deben a la dotación genética del individuo: variaciones naturales en las estructuras y las actividades de los genes de un individuo produce conjuntos de proteínas cuyas complejas redes de interacciones hacen que ese individuo sea más o menos propensos a la EA. Se han identificado algunos de los genes cuyos productos proteicos afectan al riesgo de EA. por ejemplo, hay tres variantes comunes del gen que codifica la proteína sérica apolipoproteína E, que se denominan e2, e3 y e4. Los individuos que heredan un alelo que codifica e4 tienen un riesgo mayor que el promedio para sufrir EA y tienden a desarrollar la enfermedad antes que los individuos que no tienen alelos e4. Aquellos que heredan alelose4 de ambos padres se encuentran en un riesgo aún mayor de sufrir EA de inicio precoz, mientras que los individuos con alelos e2 tienen un riesgo muy bajo y desarrollan la enfermedad más tarde en su vida que el promedio, si la desarrollan (Cedazo-Minguez A. *J Cell Mol Med*. 11:1227-38, 2007). También se ha descubierto que la lesión cerebral traumática y el traumatismo cerebral repetitivo aceleran el depósito de $A\beta$ cerebral y el deterioro cognitivo. Uryu y col., *J. Neurosci.* 22 (2): 446 (2002).

La mayoría, si no toda la EA se considera que tiene algún componente genético que está ligado al umbral de riesgo de cada individuo. Sin embargo, algunas formas de EA humana son particularmente altamente hereditarias. Estas formas hereditarias están causadas por mutaciones raras en los genes individuales que codifican proteínas que se asocian con esta enfermedad neurodegenerativa y que desempeñan un papel central en la iniciación del proceso de la enfermedad. Las mutaciones en estos genes pueden heredarse o pueden surgir esporádicamente.

Uno de estos genes codifica la proteína precursora de amiloide (APP) (Tanzi RE. *Ann Med*. 21:91-94, 1989). La APP es una proteína de membrana cuya función bioquímica es actualmente desconocida. Se sabe que la APP es un sustrato de la proteólisis por varias proteasas endógenas y que la proteólisis libera fragmentos que tienen diversas estructuras. Dos de las actividades de la proteasa se conocen como β -secretasa y γ -secretasa. La proteólisis de la APP por la β -secretasa genera un fragmento que posteriormente puede ser escindido por la γ -secretasa en múltiples sitios para producir los péptidos $A\beta$. La γ -secretasa es un complejo de varias proteínas (incluyendo la presenilina 1 y presenilina 2), y la escisión de la APP por la γ -secretasa produce múltiples isoformas de $A\beta$, que van desde 37 hasta 43 restos de aminoácidos (véase, por ejemplo, Steiner H, Fluhrer R, Haass C., *J Biol Chem*. 2008 Jul 23). Se piensa que una forma de 42 residuos de $A\beta$ es la más patogénica (Wolfe MS. *Biochemistry* 45:7931-7939, 2006). El fragmento $A\beta$ de 42 residuos forma estructuras oligoméricas, que, además de la formación de las placas que se depositan en el cerebro afectado por la EA, se cree que causan déficit cognitivos (Barten DM, Albright CF. *Mol Neurobiol* 37:171-186, 2008).

Se generan variaciones de la APP que predisponen al clúster de EA en las proximidades de los sitios de escisión proteolítica, que afectan a la velocidad a la que se generan fragmentos de A β patogénicos, su estabilidad, y su capacidad para formar oligómeros (Selkoe DJ. *Physiol Rev* 81:741-766, 2001). Las personas que heredan estas variaciones de la APP suelen mostrar signos de EA a la edad de 50 años, mientras que la EA esporádica no es frecuente hasta que los individuos llegan a los 70 años de edad (Waring SC, Rosenberg RN. *Arch Neurol*. 65:329-34, 2008).

La identidad molecular completa de la enzima γ -secretasa todavía se desconoce. La presenilina 1, o la presenilina 2 estrechamente relacionada, es necesaria para la actividad γ -secretasa. La actividad γ -secretasa se reduce un 80 % en las células cultivadas derivadas de embriones con delección genética de la presenilina 1. Toda la actividad de la γ -secretasa se pierde en las células que carecen tanto de presenilina 1 como de presenilina 2. Los inhibidores peptidomiméticos de la actividad γ -secretasa se pueden reticular a las presenilinas 1 y 2, lo que sugiere que estas proteínas son subunidades catalíticas para la escisión. Sin embargo, la actividad de la γ -secretasa aislada de cromatografías de células como un complejo grande de > 1 M dalton. En estudios genéticos recientes se han identificado tres proteínas más necesarias para la actividad γ -secretasa; nicastrina, APH-1 y la pen-1. (Francis y col., 2002, *Developmental Cell* 3(1): 85-97; Steiner y col., 2002, *J. Biol. Chemistry*: 277(42): 3906239065; y Li y col., 2002, *J. Neurochem*. 82(6): 1540-1548). La acumulación de la presenilina en complejos de alto peso molecular está alterado en las células que carecen de estas proteínas. Variaciones raras en los genes que codifican los componentes presenilina 1 y presenilina 2 de la γ -secretasa también confieren un alto riesgo de EA de inicio precoz (Waring SC, Rosenberg RN. *Arch Neurol*. 65:329-34, 2008).

Una tercera enzima, la α -secretasa, escinde la proteína precursora entre los sitios de escisión β y γ , lo que impide la producción de A β y liberando un péptido de aproximadamente 3 kDa conocido como P3, que es no patológico. Tanto la escisión de β - como de α -secretasa también da lugar a fragmentos terminales solubles secretadas de APP, conocidos como sAPP β y sAPP α , respectivamente. Se ha sugerido que el fragmento sAPP α es neuroprotector.

Como consecuencia de estas observaciones genéticas y una considerable experimentación bioquímica y neuroanatómica, ha surgido el modelo de que los acontecimientos bioquímicos que aumentan la producción y acumulación de A β , particularmente A β -42, aceleran la aparición y progresión de la EA. Los programas terapéuticos y profilácticos, por lo tanto, se han dirigido a la reducción de la producción de A β o a disminuir su acumulación.

El enfoque actual del tratamiento de la EA es la reducción de la producción y / o acumulación de A β en el cerebro. Actualmente se están investigando varios enfoques (Rojas-Fernandez CH, Chen M, Fernandez HL. *Pharmacotherapy* 22:1547-1563, 2002; Hardy J, Selkoe DJ. *Science*. 297:353-356, 2002). Los ratones que son transgénicos para la APP que predispone a la EA y que, además, portan una mutación defectiva de inactivación en el gen de la β -secretasa exhiben reducciones casi completos de A β en el cerebro (Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, Martin L, Louis JC, Yan Q, Richards WG, Citron M, Vassar R. *Nat Neurosci* 4:231-232, 2001). Sin embargo, se ha demostrado que tales ratones presentan, no obstante, déficit cognitivos, muerte prematura e hipomielinización (Ohno M, Chang L, Tseng W, Oakley H, Citron M, Klein WL, Vassar R, Disterhoft JF. *Eur J Neurosci* 23:251-260, 2006; Ohno M, Sametsky EA, Younkin LH, Oakley H, Younkin SG, Citron M, Vassar R, Disterhoft JF. *Neuron* 41:27-33, 2004; Laird FM, Cai H, Savonenko AV, Farah MH, He K, Melnikova T, Wen H, Chiang H-C, Xu G, Koliatsos VE, Borchelt DR, Price DL, Lee H-K, Wong PC. *J Neurosci* 25:11693-11709, 2005; Dominguez D, Tournoy J, Hartmann D, Huth T, Cryns K, Deforce S, Serneels L, Camacho IE, Marjaux E, Craessaerts K, Roebroek AJ, Schwake M, D'Hooge R, Bach P, Kalinke U, Moechars D, Alzheimer C, Reiss K, Saftig P, De Strooper B. *J Biol Chem* 280:30797-30806, 2005; Hu X, Hicks CW, He W, Wong P, Macklin WB, Trapp BD, Yan R. *Nat Neurosci* 9:1520-1525, 2006). Esto lleva a la conclusión de que la actividad β -secretasa en el cerebro es necesaria para la función neuronal sana y las terapéuticas que disminuyen la actividad cerebral de la β -secretasa podrían tener efectos secundarios adversos. Además, ha sido difícil diseñar inhibidores potentes de la β -secretasa que penetren en el cerebro (Barten DM, Albright CF. *Mol Neurobiol* 37:171-186, 2008), que ha sido el objetivo de los que trabajan en el tratamiento farmacológico de la EA.

También se han investigado los efectos de los inhibidores de la γ -secretasa en la reducción del A β cerebral. Se ha demostrado que los inhibidores de la γ -secretasa que penetran en el cerebro reducen la síntesis de A β y reducen los déficit cognitivos en modelos en ratón de EA (Barten DM, Meredith JE Jr, Zaczek R, Houston JG, Albright CF. *Drugs R D* 7:87-97, 2006). Sin embargo, la γ -secretasa tiene objetivos además de la APP (Pollack SJ, Lewis H. *Curr Opin Investig Drugs* 6:35-47, 2005), Uno de los cuales es la familia Notch de receptores transmembrana. La inhibición de la señalización de Notch mediante la administración crónica de los inhibidores de la γ -secretasa provoca cambios en el tracto gastrointestinal, el bazo y el timo que limitan el grado de inhibición de A β alcanzable *in vivo* usando los compuestos estudiados (Searfoss GH, Jordan WH, Calligaro DO, Galbreath EJ, Schirtzinger LM, Berridge BR, Gao H, Higgins MA, May PC, Ryan TP. *J Biol Chem* 278:46107-46116, 2003; Wong GT, Manfra D, Poulet FM, Zhang Q, Josien H, Bara T, Engstrom L, Pinzon-Ortiz M, Fine JS, Lee HJ, Zhang L, Higgins GA, Parker EM. *J Biol Chem* 279:12876-12882, 2004; Milano J, McKay J, Dagenais C, Foster-Brown L, Pognan F, Gadiant R, Jacobs RT, Zacco A, Greenberg B, Ciaccio PJ. *Toxicol Sci* 82:341-358, 2004).

La solicitud de patente de EE.UU. 20020128319 A1 establece que ciertos fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) disminuyen la producción y / o los niveles de A β 42 en cultivos de células que expresan A β 40 y A β 42 derivados de la escisión de APP. Dado que hay buenas pruebas de que los altos niveles de A β 42 son un importante

factor de riesgo para la EA, estos fármacos pueden ser útiles para prevenir, retrasar o invertir la progresión de la EA. El inconveniente de la utilización de estos fármacos, sin embargo, es que se requieren grandes dosis de AINE para producir una disminución significativa de A β 42 y los efectos secundarios gastrointestinales significativos, incluyendo úlceras sangrantes, están asociados con el uso prolongado de los AINE a dosis altas (Langman y col., 1994, Lancet 343:1075-1078). Además, sigue existiendo un riesgo desconocido de sufrir la enfermedad de Alzheimer debido a la formación de amiloide a partir de A β 40 y otras formas no afectadas por los agentes reductores de A β 42. Hay, por lo tanto, una necesidad en la técnica de desarrollar tratamientos para enfermedades o trastornos relacionados con la regulación de la producción de A β .

Se ha descubierto que una clase de compuestos reducen la producción de A β sin afectar a la señalización de Notch. Esta clase de compuestos incluye el inhibidor de la tirosina quinasa mesilato de imatinib (STI-571, nombre comercial GLEEVEC) y el compuesto relacionado, 6-(2,6-diclorofenil)-8-metil-2-(metilsulfanilfenil-amino)-8*H*-pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-ona, conocido como inhibidor de 2 (Netzer WJ, y col., Proc Natl Acad Sci USA. 100:12444-12449, 2003). Véase también la solicitud de patente de EE.UU. 2004/0028673 y la publicación de patente PCT WO 2004/032925. STI-571 está actualmente aprobado para el tratamiento de la leucemia mielógena y tumores del estroma gastrointestinal. STI-571 reduce potentemente la producción de A β , tanto en células de neuroblastoma transfectadas con APP como en los extractos libres de células de células transfectadas, mediante un mecanismo que no requiere la Abl tirosina quinasa, uno de los objetivos importantes de este fármaco en las células de leucemia (Netzer, citado anteriormente). STI-571 y un compuesto relacionado llamado se encontraron "inhibidor de 2" para reducir la producción de A β en cultivos de neuronas primarias preparadas a partir de la corteza cerebral de ratas en el día embrionario 18 (Netzer, citado anteriormente), lo que indica que estos fármacos afectan al procesamiento proteolítico de las proteínas de los genes de APP tanto endógenos y transfectados.

STI-571, de acuerdo con la literatura de producto para GLEEVEC, se administra por vía oral. El fármaco se ha investigado por su efecto sobre la acumulación de A β en el cerebro y se ha demostrado que el fármaco tiene escasa penetración a través de la barrera hematoencefálica. En un paciente con leucemia tratada con STI-571 que recibió el fármaco, el nivel en el líquido cefalorraquídeo (LCR) del fármaco fue 92 veces menor que el nivel en sangre (Takayama N, Sato N, O'Brien SG, Ikeda Y, Okamoto S. Br J Haematol. 119:106-108, 2002). Por lo tanto, su utilidad en forma no modificada como potencial agente terapéutico para la EA se ha descartado (Netzer, citado anteriormente).

En vista de la escasa penetración de la barrera hematoencefálica, los investigadores que investigan el efecto de STI-571 en el A β cerebral han utilizado minibombas osmóticas implantadas para liberar STI-571 o el inhibidor 2 por vía intratecal a los cerebros de cobayas (Netzer, citado anteriormente). Aunque Netzer, y col., observaron una disminución en la acumulación de A β en el cerebro, sin embargo, concluyeron "En el caso de Gleevec y fármacos relacionados, la capacidad para lograr un alto grado de penetración de la barrera hematoencefálica sería necesario mejorar la probabilidad de beneficio terapéutico." (Netzer, citado anteriormente).

Sigue habiendo una necesidad de tratamientos para reducir eficazmente los niveles de A β en el cerebro.

La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas y se refiere al uso de compuestos que modulan la producción de A β en un tejido periférico. Las realizaciones de la descripción que no entran dentro del alcance de dichas reivindicaciones se proporcionan solamente con fines ilustrativas y no forman parte de la presente invención.

Las composiciones para la modulación de los niveles de A β se conocen a partir del documento WO-A-03/057165.

Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones y se refiere a procedimientos para tratar, prevenir o controlar un trastorno de A β cerebral, mediante pruebas y / o tratamientos de tejidos periféricos (no cerebrales no del SNC). En algunas realizaciones preferidas, el tejido periférico comprende el hígado, mientras que en otras realizaciones, el tejido periférico comprende sangre / y o suero. En algunas realizaciones, la presente descripción comprende evaluar a un sujeto para determinar la presencia de EA o la predisposición a EA, administrando por vía periférica un compuesto que modula la acumulación o producción de A β y evaluando en dicho sujeto la EA o la progresión de la EA.

La presente descripción proporciona usos, composiciones y procesos relacionados con el tratamiento o prevención de la EA mediante el tratamiento del hígado de un sujeto. En particular, la presente descripción se refiere a la alteración de la producción, procesamiento, acumulación o transporte de A β en el hígado de un sujeto mediante la inhibición directa de la producción (por ejemplo, mediante la inhibición de la expresión de APP), o mediante la modulación de un factor que a su vez modula la producción, procesamiento, acumulación o transporte de A β en el hígado. Tales factores incluyen, entre otros, γ -secretasa, presenilina 1, presenilina 2, ApoE, calmirina, neugrina, receptor del inositol 1,4,5-trifosfato (InsP3R) o proteína 1 de interacción con Smad (SIP1, codificada por Zfhx1b), clusterina (codificada por CLU, también conocida como ApoJ), proteína de ensamblaje de claterina de unión a fosoinositol (codificada por PICALM), receptor del componente del complemento 1 (codificado por CR1) y moduladores de los mismos. La descripción abarca el tratamiento o prevención de la EA mediante la modulación de cualquier factor que, cuando se modula, incluye ya sea directamente (por ejemplo, actuando sobre la producción o el

procesamiento de la APP) o indirectamente (por ejemplo, actuando sobre un factor que, a su vez, actúa sobre un factor que actúa sobre la APP), la producción de A β en el hígado de un sujeto. No hay ninguna limitación por la naturaleza de la modulación o la identidad o el número de factores sobre los que actúan para modular el A β en el hígado de un sujeto.

5 En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona usos para tratar a un sujeto con un diagnóstico de un trastorno cerebral de A β o predisposición a un trastorno cerebral de A β , que comprende administrar periféricamente un compuesto que modula la producción de A β en un tejido periférico. En algunas realizaciones preferidas, el compuesto inhibe la producción de A β . En realizaciones particularmente preferidas, un compuesto administrado periféricamente tiene un coeficiente de reparto de menos de 2,0, más preferentemente menos de 1,5, y aún más preferentemente de menos de aproximadamente 1,0. En realizaciones particularmente preferidas, el compuesto no atraviesa sustancialmente la barrera hematoencefálica.

10 En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona usos para tratar a un sujeto por un trastorno cerebral de A β o predisposición a un trastorno cerebral de A β en un sujeto, que comprende administrar periféricamente un compuesto que modula la expresión de un gen en un tejido periférico de dicho sujeto. En realizaciones preferidas, la modulación de dicha expresión de dicho gen da lugar a la modulación de la producción o acumulación de A β en dicho tejido periférico. En ciertas realizaciones preferidas, el tejido periférico es el hígado de un sujeto.

15 La presente descripción abarca cualquier uso para influir sobre la producción de A β en el hígado, incluyendo, sin limitaciones, la alteración de la expresión y / o el procesamiento de APP. En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona usos que comprenden la administración periférica de un compuesto que modula la expresión de uno o más de los genes Psen1, Apo E, InsP3R, Psen2, APP, Cib1, Ngrn, Zfx1b, CLU (también conocida como ApoJ), PICALM y CR1. En algunas realizaciones, los procedimientos de la presente descripción comprenden la administración periférica de un compuesto que modula la actividad de una o más de presenilina 2, calmirina, neugrina, Zfx1b, clusterina, proteína de ensamblaje de claterina de unión fosfoinositol, el receptor 1 del componente del complemento o la expresión o actividad de la APP. En algunas realizaciones, uno o más de estos genes o actividades se modula en el hígado de un sujeto. En algunas realizaciones, la modulación comprende la inhibición de la expresión o la actividad, mientras que en algunas realizaciones, la modulación comprende la estimulación de la expresión o la actividad.

20 En algunas realizaciones, la presente descripción comprende un tratamiento de un trastorno cerebral de A β , que comprende las etapas de evaluar a un sujeto para determinar la presencia de un trastorno cerebral de A β o la predisposición a un trastorno cerebral de A β , mediante la administración periférica de un compuesto que modula la producción de A β , en el que el compuesto no atraviesa sustancialmente la barrera hematoencefálica, y la evaluación del sujeto para determinar un trastorno cerebral de A β o la progresión de un trastorno cerebral de A β . También se contempla que, en algunas realizaciones, se comparan los resultados de la evaluación antes y después del tratamiento para determinar, por ejemplo, el efecto del tratamiento sobre el estado del trastorno cerebral de A β (por ejemplo, para determinar un efecto sobre el inicio o la tasa de aparición o de alivio de enfermedades). La modulación de la producción de A β no se limita a ningún medio o vía de modulación particular. La modulación de la producción puede incluir, por ejemplo, la alteración (por ejemplo, la reducción) de la expresión de APP, o la alteración del procesamiento de APP en A β .

30 En algunas realizaciones, la descripción comprende las etapas de evaluar a un sujeto para determinar la presencia de un trastorno cerebral de A β o la predisposición a un trastorno cerebral de A β , mediante la administración periférica de un compuesto que modula la producción de A β , en el que el compuesto no atraviesa sustancialmente la barrera hematoencefálica, y la evaluación del sujeto para determinar un trastorno cerebral de A β o la progresión de un trastorno cerebral de A β . La modulación de la acumulación de A β no se limita a ningún medio particular. La modulación de la acumulación puede incluir, por ejemplo, la disminución de la producción de A β y / o el aumento de la degradación o el aclaramiento de A β , o la alteración de A β para producir una forma modificada con diferentes propiedades (por ejemplo, una forma no patogénica).

45 Se contempla que en algunas realizaciones de la descripción, la modulación de la producción y / o la acumulación de A β , el compuesto administrado comprende un modulador de una actividad de γ -secretasa, mientras que en algunas realizaciones preferidas, el compuesto comprende un inhibidor de una actividad de γ - secretasa.

50 Se contempla además que en algunas realizaciones de la descripción, la modulación de la producción y / o acumulación de A β , el compuesto administrado comprende un modulador de la presenilina 2. En algunas realizaciones preferidas, el compuesto comprende un inhibidor de la presenilina 2. En algunas realizaciones, el compuesto comprende un modulador de la escisión de la proteína precursora de amiloide, mientras que en algunas formas de realización, el compuesto comprende un inhibidor de la escisión de la proteína precursora de amiloide.

55 En algunas realizaciones, el compuesto comprende una composición seleccionada del grupo que consiste en STI-571, el Compuesto 1, el Compuesto 2, LY450139, GSI-953, Flurizan, y E2012 (Eisei) o una variante impermeable a la barrera hematoencefálica del mismo. En realizaciones particularmente preferidas, la composición tiene un coeficiente de reparto (por ejemplo, en un sistema de octanol/agua) de menos de 2,0, más preferentemente menos de 1,5, y aún más preferentemente de menos de aproximadamente 1,0. En realizaciones particularmente preferidas,

el compuesto no atraviesa sustancialmente la barrera hematoencefálica.

Se contempla que en algunas realizaciones, el compuesto comprende además un agente terapéutico conocido para tratar, mejorar o reducir el riesgo o la gravedad de un trastorno relacionado con A β cerebral. En ciertas realizaciones preferidas, el agente terapéutico conocido se selecciona del grupo que consiste en cannabinoides, dimebom, prednisona, ibuprofeno, naproxeno, indometacina; estatinas, moléculas selectivas del receptor de estrógenos, antihipertensores, alfa-bloqueantes, beta-bloqueantes, alfa-beta bloqueantes, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, bloqueantes de los receptores de angiotensina, bloqueantes de los canales de calcio, diuréticos y antioxidantes.

La administración periférica de dicho compuesto en los usos de la presente descripción no se limita a ninguna vía concreta. Las vías de administración incluyen, entre otras, a través de los ojos (oftálmica), boca (oral), piel (transdérmica), nariz (nasal), pulmones (inhalación), mucosa oral (por ejemplo, bucal), oído, mediante inyección (por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea, intraperitoneal etc.) y similares. En ciertas realizaciones preferidas, la administración por vía periférica comprende la administración oral.

En algunas realizaciones de los usos de la presente descripción, la evaluación comprende una evaluación del estado mental. En algunas realizaciones preferidas, las evaluaciones comprenden una o más de las pruebas neuropsicológicas y de imagen del cerebro.

Se contempla que en algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un uso para evaluar el riesgo de o presencia de un trastorno cerebral de A β en un sujeto, que comprende determinar un nivel de A β en un tejido periférico de dicho sujeto. En algunas otras realizaciones, la descripción proporciona un uso de la monitorización de un trastorno cerebral de A β en un sujeto, que comprende determinar un nivel de A β en un tejido periférico de dicho sujeto. En algunas realizaciones, el tejido periférico es la sangre, mientras que en algunas realizaciones, el tejido periférico es suero. En algunas realizaciones particularmente preferidas, la monitorización comprende la medición de A β en dicho tejido periférico en una pluralidad de puntos de tiempo.

En realizaciones preferidas de los procedimientos descritos anteriormente en el presente documento, el trastorno de A β cerebral es la enfermedad de Alzheimer.

En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona usos para la monitorización de un trastorno A β cerebral en un sujeto que comprende el análisis de la expresión o la actividad de un producto génico en el tejido periférico de dicho sujeto. En ciertas realizaciones preferidas, el producto génico es de un gen seleccionado del grupo que consiste en Psen2, APP, Cib1, Ngrn y Zfhx1b.

En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un uso, que comprende las etapas de evaluar a un sujeto para determinar la presencia de un trastorno cerebral de A β o predisposición a un trastorno cerebral de A β y la administración periférica de un compuesto que inhibe el transporte de A β periférica a través de la barrera hematoencefálica, en el que dicho compuesto no es un anticuerpo anti-A β . En realizaciones preferidas, comprende además la evaluación de dicho sujeto para determinar un trastorno cerebral de A β o la progresión de un trastorno cerebral de A β . En realizaciones particularmente preferidas, el trastorno cerebral de A β es la enfermedad de Alzheimer.

En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un procedimiento de identificación de un objetivo genético para el tratamiento de un trastorno cerebral de A β , que comprende la comparación de un perfil de expresión génica en el hígado de la descendencia de un primer padre que tiene o que está predispuesto a dicho trastorno A β y un segundo padre que tiene una susceptibilidad menor a dicho trastorno A β , para identificar un marcador genético hereditario que tiene un nivel de expresión en el hígado, en el que el aumento o disminución de la expresión de dicho marcador genético hereditario en el hígado de dicha descendencia respecto al nivel de expresión en el hígado de dicho primer padre se correlaciona con la herencia de dicho marcador genético de dicho segundo padre.

En algunas realizaciones, la presente descripción comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en STI-571, el Compuesto 1, el Compuesto 2, LY450139, GSI-953, Flurizan y el compuesto E2012, o una variante impermeable a la barrera hematoencefálica de los mismos, para su uso en la modulación de la producción de A β en el tejido periférico de un sujeto que tiene, o está predispuesto a desarrollar, un trastorno A β . En algunas realizaciones, el trastorno A β es un trastorno cerebral de A β . En realizaciones particularmente preferidas, el compuesto tiene un coeficiente de reparto de menos de 2,0, más preferentemente menos de 1,5, y aún más preferentemente de menos de aproximadamente 1,0. En realizaciones particularmente preferidas, el compuesto no atraviesa sustancialmente la barrera hematoencefálica.

En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un compuesto seleccionado del grupo que consiste en STI-571, el Compuesto 1, el Compuesto 2, LY450139, GSI-953, Flurizan y el compuesto E2012, o una variante impermeable a la barrera hematoencefálica de los mismos, para su uso en la modulación (por ejemplo, la inhibición) de la producción de A β en el hígado de un sujeto que tiene, o está predispuesto a desarrollar, un trastorno A β . En algunas realizaciones, el trastorno A β es un trastorno cerebral de A β . En realizaciones particularmente preferidas, el compuesto tiene un coeficiente de reparto de menos de 2,0, más preferentemente menos de 1,5, y aún más

preferentemente de menos de aproximadamente 1,0. En realizaciones particularmente preferidas, el compuesto no atraviesa sustancialmente la barrera hematoencefálica.

En algunas realizaciones, la descripción se refiere al uso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en imatinib (STI-571), WGB-BC-15, el Compuesto 1, el Compuesto 2, LY450139, GSI-953, Flurizan y el compuesto E2012, una variante impermeable a la barrera hematoencefálica de los mismos, y / o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para la fabricación de un medicamento para la modulación de la producción de A β en un tejido periférico de un sujeto que tiene, o está predispuesto a desarrollar, un trastorno cerebral de A β . En realizaciones preferidas, el medicamento se formula para administración oral. En realizaciones particularmente preferidas, el tejido periférico comprende hígado. En realizaciones todavía más particularmente preferidas, el compuesto tiene un coeficiente de reparto de menos de 2,0, más preferentemente menos de 1,5, y aún más preferentemente de menos de aproximadamente 1,0. En realizaciones particularmente preferidas, el compuesto no atraviesa sustancialmente la barrera hematoencefálica. En algunas realizaciones preferidas, la presente descripción se refiere al uso de imatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la fabricación de un medicamento para la inhibición de la producción de A β en el hígado de un sujeto que tiene, o está predispuesto a desarrollar, un trastorno cerebral de A β .

La descripción también proporciona el uso de los compuestos como se ha descrito anteriormente para la fabricación de un medicamento que comprende un segundo agente terapéutico para el tratamiento de un trastorno cerebral de A β . En algunas realizaciones, se selecciona un segundo agente terapéutico de imatinib (STI-571) WGB-BC-15, el Compuesto 1, el Compuesto 2, LY450139, GSI-953, Flurizan y el compuesto E2012, una variante impermeable a la barrera hematoencefálica de los mismos y / o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. En ciertas realizaciones preferidas, el segundo agente terapéutico comprende uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en cannabinoides, dimebom, prednisona, ibuprofeno, naproxeno, indometacina; estatinas, moléculas selectivas del receptor de estrógenos, antihipertensores, alfa-bloqueantes, beta-bloqueantes, alfa-beta bloqueantes, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, bloqueantes de los receptores de angiotensina, bloqueantes de los canales de calcio, diuréticos y antioxidantes. En ciertas realizaciones particularmente preferidas de los procedimientos y composiciones descritos anteriormente, el compuesto comprende imatinib en forma de la sal mesilato.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1A muestra una gráfica que compara la cantidad de ARNm de PSEN2 en muestras de hígado de ratones sujeto comparados con el genotipo de los ratones en el locus Psen2.

La Figura 1B muestra gráficos que representan el genotipo del locus Psen2 (B6 / B6 o D2 / D2) frente a la concentración de ARNm de Psen2 en 6 tejidos (unidades arbitrarias) de las hasta 89 líneas endogámicas recombinantes (ER). Los valores DE C57 y DBA parentales se representan al lado de los de las líneas de ER. Algunos tejidos tienen datos de líneas individuales ER únicas que son heterocigotas en el locus Psen2: estos están representados en los gráficos como B6 / D2. Los datos obtenidos de GeneNetwork.org (J. Wang, R.W. Williams, K.F. Manly KF, Neuroinformatics 1, 299 (2003)). Para el hígado, los datos de expresión se expresaron inicialmente como la relación entre la señal de fluorescencia en el hígado y la generada por la muestra de ARNm de referencia para cada sonda. Los datos se normalizaron usando un procedimiento de suavizado LOWESS robusto que se ajusta a la no linealidad de la señal en los dos canales. A continuación, se calculó el logaritmo en base 2 de estas relaciones (mediana). Un valor de -1 indica que la expresión en el hígado es aproximadamente 1/2 de la del control; un valor de -2 indica que la expresión en el hígado es aproximadamente 1/4 de la del control, etc. Por el contrario, un valor de +2 indica que la expresión en el hígado es 4 veces mayor en el hígado. Los datos del hígado se establecen a partir de 40 líneas endogámicas recombinantes descritas por Gatti, y col., Hepatology 46, 548 (2007). Para otros tejidos, los valores de expresión y los procedimientos de normalización alternativos fueron como se ha indicado (Wang, citado anteriormente).

La Figura 2 es un diagrama de las estructuras químicas de STI-571, la sal mesilato GLEEVEC™, la variante STI-571 ("WGB-BC-15"), el Compuesto 1 (PD173955, Moasser et al, 1999, Cancer Research 59: 6145-6152; Wisniewski y col., Cancer Research 2002, 62(15):4244-55), y el Compuesto 2 (PD166326; Wisniewski y col., Cancer Research 2002, 62(15):4244-55).

Las Figuras 3A-3F muestran los efectos de STI-571 administrado por vía periférica sobre los niveles de A β en plasma y cerebro completo. A ratones B6 y D2 de tipo salvaje (edad de 8-12 semanas [AF] o de 15-18 meses [G, H]) se les administró fármaco o vehículo dos veces al día durante 7 días mediante inyección intraperitoneal. La Fig. 3A muestra transferencias de tipo Western que muestran los niveles de hexámeros A β en plasma de ratones D2 jóvenes tratados con vehículo de solución salina (carriles 1, 2, 9 y 10) o STI-571 en tres dosis: los carriles 3, 4, 11, y 12 muestran los resultados con 1 mg / kg; los carriles 5, 6, 13 y 14 muestran los resultados con 10 mg / kg; y los carriles 7, 8, 15 y 16 muestran los resultados con 100 mg / kg; n = 4 por grupo. La Fig. 3B muestra un gráfico de barras de las imágenes de la transferencia de tipo Western en la Fig. 3A. La Fig. 3C muestra una transferencia de tipo Western que muestra los niveles de hexámeros A β en extractos de cerebro de ratones B6 jóvenes tratados con vehículo salino o STI-571 a 20 mg / kg (n = 10 por grupo en total, solo n = 5 se muestran en la transferencia de tipo Western). La Figura 3D muestra una cuantificación en gráfico de barras de las imágenes de la transferencia de tipo Western en la Fig. 3C. Las Figs. 3E y 3F gráficos muestran gráficos de barras que indican los niveles de hexámeros A β en extractos de cerebro (E) o plasma (F) de ratones B6 viejos tratados con vehículo salino o STI-571 a 20 mg / kg (n = 4 por grupo).

La Figura 4 muestra una gráfica que compara la cantidad de ARNm de *Ngrn* en muestras de hígado de ratones sujeto comparados con el genotipo de los ratones en el locus *Ngrn*.

La Figura 5 muestra gráficos que representan el genotipo de *Cib1* (Fig. 5A) o *Zfx1b* (Fig 5B) (B6 / B6, B6 / D2 o D2 / D2) frente a la concentración del ARNm de calmirina (Fig. 5A) o *Zfx1b* (Fig 5B) en el hígado (unidades arbitrarias) para 40 líneas endogámicas recombinantes, como en la Figura 1B. Datos obtenidos de GeneNetwork.org (Wang, citado anteriormente); conjunto de datos del hígado descritos por Gatti, citado anteriormente.

Definiciones

Como se usa en el presente documento, los términos "sujeto" y "paciente" se usan de forma intercambiable. Como se usa en el presente documento, los términos "sujeto" y "sujetos" se refieren a un animal, preferentemente un mamífero, incluyendo un no primate (por ejemplo, una vaca, cerdo, caballo, burro, cabra, camello, gato, perro, cobaya, rata, ratón, oveja) y un primate (por ejemplo, un mono, tal como un mono *cynomolgus*, gorila, chimpancé, y un ser humano), preferentemente un ser humano. En una realización, el sujeto es un sujeto con la enfermedad de Alzheimer (EA).

Como se usa en el presente documento, la expresión "trastorno relacionado con A β " o "trastorno de A β " es una enfermedad (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer) o una afección (por ejemplo, demencia senil) que implica una aberración o la alteración de la regulación de los niveles de A β . Un trastorno relacionado con A β incluye, entre otros, EA, trastornos de amiloide relacionados con un traumatismo cerebral, síndrome de Down y miositis con cuerpos de inclusión.

Como se usa en el presente documento, la expresión "en riesgo de enfermedad" se refiere a un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que está predispuesto a experimentar una enfermedad concreta. Esta predisposición puede ser genética (por ejemplo, una tendencia genética concreta a experimentar la enfermedad, tal como trastornos hereditarios) o debido a otros factores (por ejemplo, edad, peso, condiciones ambientales, exposiciones a compuestos perjudiciales presentes en el ambiente etc.). Por tanto, no se pretende que la presente invención esté limitada a ningún riesgo concreto ni se pretende que la presente invención esté limitada a ninguna enfermedad concreta.

Como se usa en el presente documento, la expresión "que sufre enfermedad" se refiere a un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que está experimentando una enfermedad concreta o que se la ha diagnosticado que tiene una enfermedad concreta. No se pretende que la presente invención esté limitada a ningún signo o síntoma concreto ni a ninguna enfermedad concreta. Por tanto, se pretende que la presente invención abarca sujetos que estén experimentando cualquier gama de enfermedades (por ejemplo, desde manifestación subclínica hasta la enfermedad en toda su amplitud), en la que el sujeto exhibe al menos algunos de los indicios (por ejemplo, signos y síntomas) asociados con la enfermedad concreta.

Como se usa en el presente documento, los términos "enfermedad" y "afección patológica" se usan de forma intercambiable describir un estado, signos y/o síntomas que estén asociados con cualquier alteración del estado normal de un animal vivo o de cualquiera de sus órganos o tejidos que interrumpe o modifica el funcionamiento de las funciones normales, y puede ser una respuesta a factores ambientales (tales como trauma emocional, traumatismo físico, malnutrición, riesgos industriales o clima), a agentes infecciosos específicos (tales como gusanos, bacterias o virus), a defectos inherentes del organismo (tal como varias anomalías genéticas) o a combinaciones de estos y otros factores.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "sujeto que padece EA" o "sujeto que muestra signos o síntomas o patología indicativa de EA" o "sujetos que se sospecha que muestran signos o síntomas o patología indicativa de EA" se refieren a un sujeto que se identifica o se diagnostica como que padece, o es probable que padezca, EA en base a signos, síntomas y patología conocidos de EA.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "sujeto en riesgo de mostrar patología indicativa de EA" y "sujeto en riesgo de EA" hacen referencia a un sujeto que se identifica como que está en riesgo de desarrollar EA.

Como se usa en el presente documento, la expresión "terapéutica para la EA" se refiere a un agente usado para tratar o prevenir la EA. Dichos agentes incluyen, entre otros, moléculas pequeñas, fármacos, anticuerpos, productos farmacéuticos y similares.

Como se usa en el presente documento, la expresión "función cognitiva" se refiere, en general, a la capacidad para pensar, razonar, concentrarse o recordar. En consecuencia, la expresión "disminución de la función cognitiva" se refiere al deterioro o falta de capacidad para pensar, razonar, concentrarse o recordar.

Como se usa en el presente documento, los términos "modular", "modula", "modulado/a" o "modulación" tendrán sus significados habituales, y abarcan los significados de las palabras "mejorar", "estimular", "aumentar", "agonizar" "inhibir", "disminuir" o "antagonizar". Un modulador de, por ejemplo, una actividad enzimática, tal como una actividad de γ -secretasa, puede actuar directamente, es decir mediante interacción directa con la enzima que tiene la actividad a modular, o puede actuar indirectamente, es decir, sin interacción directa con la enzima, sino a través de una ruta que da como resultado la modulación de la actividad.

Como se usa en el presente documento, la expresión "evaluación de un sujeto para determinar EA" se refiere a la realización de una o más pruebas para determinar, por ejemplo, la presencia o progresión de la EA en un sujeto, o el riesgo de desarrollar EA en un sujeto. La evaluación de un sujeto para determinar EA y/o distinguir la enfermedad de Alzheimer de otras causas de pérdida de memoria, puede comprender la evaluación de uno o más de los siguientes:

- 5 1. Historial clínica, que comprende evaluar el estado de salud general de un sujeto y los problemas médicos anteriores, los problemas que puede tener un sujeto para llevar a cabo las actividades diarias
2. Pruebas médicas básicas, que comprenden, por ejemplo, análisis de sangre para descartar otras posibles causas de la demencia, tales como trastornos del tiroides o deficiencias vitamínicas.
- 10 3. Evaluación del estado mental, por lo que, por ejemplo, pruebas de memoria, capacidades para la resolución de problemas, capacidad de atención, capacidad para contar y lenguaje.
4. Pruebas neuropsicológicas, que comprenden una evaluación más extensa de la memoria, capacidades para resolver problemas, ciclos de atención, capacidades para contar y lenguaje.
5. Escáneres cerebrales o pruebas de imagen, utilizando, por ejemplo, tomografía computarizada (TAC, resonancia magnética (RMN) y tomografía de emisión de positrones (PET) para buscar anomalías visibles.

- 15 Como se usa en el presente documento, un "agonista" es cualquier compuesto que actúa directa o indirectamente sobre una molécula para producir un efecto farmacológico, mientras que un "antagonista" es cualquier compuesto que actúa directa o indirectamente sobre una molécula para reducir un efecto farmacológico.

- Los términos "muestra" y "especímen" se usan en su sentido más amplio y abarcan muestras o especímenes obtenidos de cualquier fuente. Como se usa en el presente documento, el término "muestra" se usa para hacer referencia a muestras biológicas obtenidas de animales (incluidos seres humanos) y abarca fluidos, sólidos, tejidos y gases. En algunas realizaciones de la invención, las muestras biológicas incluyen tejido neural (por ejemplo tejido cerebral), líquido cefalorraquídeo (LCR), fluido seroso, orina, saliva, sangre y productos sanguíneos, tales como plasma, suero y similares. No obstante, estos ejemplos no se tienen que considerar como limitantes de los tipos de muestra que encuentran utilidad en la presente invención.

- 25 Como se usa en el presente documento, la expresión "barrera hematoencefálica" se refiere a una estructura en el sistema nervioso central (SNC) que restringe el paso de diversas sustancias químicas y objetos microscópicos (por ejemplo, bacterias) entre el torrente sanguíneo y el tejido neural. Las referencias de dirección a "dentro" y "fuera" de la barrera hematoencefálica se refieren a las cosas en el lado de tejido cerebral / neural de la barrera hematoencefálica o el lado no cerebral/neural de la barrera hematoencefálica, respectivamente.

- 30 Como se usa en el presente documento, la expresión "variante impermeable a la barrera hematoencefálica" tal como se utiliza en referencia a un material o compuesto (por ejemplo, un fármaco) se refiere a una variante de un compuesto que tiene una capacidad reducida para atravesar la barrera hematoencefálica cuando se administra periféricamente a un sujeto, comparado con la penetrabilidad de un compuesto original o de referencia, de tal manera que, por ejemplo, la variante no atraviesa sustancialmente la barrera hematoencefálica del sujeto al que se administra. Como se discute más adelante, la capacidad de un compuesto para cruzar la barrera hematoencefálica puede estar caracterizada por cualquiera de una serie de procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante pruebas vivo o in vitro, mediante modelado computacional, o mediante la caracterización de un compuesto (por ejemplo, pruebas físicas o modelado computacional) con respecto a las características ligadas a la transmisibilidad por la barrera hematoencefálica, por ejemplo, tamaño, carga, etc.

- 40 Los procedimientos para determinar o estimar la captación por el cerebro / SNC de los fármacos incluyen procedimientos in vivo (por ejemplo, inyección intravenosa o en la carótida, seguida de obtención de muestras o formación de imágenes), procedimientos in vitro que utilizan, por ejemplo, microvasos cerebrales aislados o modelos de cultivo celular y procedimientos de predicción computacional (*in silico*) por lo general sobre la base de factores tales como el peso molecular y la lipofilicidad. Véase, por ejemplo, U. Bickel, *NeuroRx*. 2005 January; 2(1): 15-26 para una revisión y comparación de los procedimientos de medición del transporte de fármacos a través de la barrera hematoencefálica.

- La lipofilicidad / hidrofiliicidad de un compuesto se asocia generalmente con la velocidad y extensión de la entrada de un compuesto en el cerebro. La lipofilicidad / hidrofiliicidad de un fármaco a menudo se representa como un coeficiente de reparto que representa el comportamiento de un fármaco cuando se reparte en un sistema de disolvente inmiscible orgánico/acuosos. Un sistema de partición en 1-octanol/ agua se ha utilizado ampliamente en la evaluación de la capacidad de los compuestos para cruzar la barrera hematoencefálica. El coeficiente de reparto en 1-octanol/agua, "log *P*," se ha estado usando durante tiempo como descriptor de la lipofilicidad y los algoritmos de ordenador que proporcionan los valores de Log de *P* calculados, como Clog *P* y Mlog *P*, equivalen estrechamente a valores medidos experimentalmente (en aproximadamente 0,3 unidades log; Bickel, citado anteriormente). Para las moléculas ionizables, se usan los coeficientes de distribución, es decir, los valores de log *P* a un pH definido (típicamente, el pH fisiológico en plasma de 7,4). Si el log *P* y el pKa se conocen, el log *D* (log del coeficiente de distribución) puede derivarse utilizando la ecuación de Henderson-Hasselbalch. El Log *D* a pH 7,4 a menudo se cita para dar una indicación de la lipofilicidad de un fármaco al pH del plasma sanguíneo.

Hansch y col. han determinado que los fármacos con un log P de aproximadamente 2 generalmente encontrará una entrada fácil en el sistema nervioso central (Hansch y col., , 1987, J. Pharm. Sci. 76 (9): 663-687), y que los fármacos que son más hidrófilos, como los que tienen valores de log P bajos (por ejemplo, de aproximadamente 1) por lo general tienen una capacidad menor de entrar en el SNC. Esta observación se ha aplicado a la modificación de fármacos para reducir la penetración en el SNC como medio de control, por ejemplo, la toxicidad para el SNC o los efectos secundarios. por ejemplo, la penetración en el SNC del fármaco para el corazón, ARL-57. Este fármaco se consideró que era un excelente fármaco cardiotónico, pero que no podría usarse en pacientes porque producía una "espectacular la visión del color brillante" en los seres humanos. ARL-57 tiene un log P = 2,59 a pH 8. Se produjo una variante más hidrófila de la sustancia, ARL115, (sulmazol; log P = 1,17 a pH 8; calcd. 1,82) y se encontró que carecía de los efectos secundarios del SNC, lo que demuestra que la modificación de la lipofilicidad/hidrofilicidad se puede usar como medio de alterar, por ejemplo reducir, la penetración del fármaco en la barrera hematoencefálica (Hansch, y col., citado anteriormente).

Se ha calculado que el coeficiente de reparto (log P) de mesilato de imatinib es 1,198 y 1,267 a 25 y 37 °C, respectivamente (Velpandian, y col., Journal of Chromatography B, 804(2):431-434 (2004)). Este valor de log P es consistente con los datos que muestran que imatinib no atraviesa sustancialmente la barrera hematoencefálica.

Los términos "periférica/o" y "periferia", como se usan en referencia a un lugar dentro o sobre, o un tejido de un sujeto se refieren a todos los lugares y los tejidos del sujeto que se encuentran fuera de la barrera hematoencefálica.

Como se usa en el presente documento, la frase "no atraviesa sustancialmente la barrera hematoencefálica" o "no penetra sustancialmente en la barrera hematoencefálica" se refiere a materiales o compuestos, por ejemplo, GLEEVEC mesilato de imatinib (STI-571) que, si se administra en un tejido periférico o se toma por vía oral, permanece ausente de una toma de muestras del SNC (por ejemplo, en el tejido cerebral, líquido cefalorraquídeo) en conjunto o están presentes en la obtención de muestras del SNC en una pequeña porcentaje de la concentración encontrada en el tejido periférico, por ejemplo ,menos de aproximadamente 10 %, preferentemente menos de aproximadamente 5 %, y más preferentemente menos de aproximadamente 2 % de la concentración encontrada en los tejidos periféricos. por ejemplo, GLEEVEC/STI-571 tiene una escasa penetración en la barrera hematoencefálica, como se muestra en un paciente con leucemia tratado con STI-571 cuyo nivel del fármaco en el líquido cefalorraquídeo (LCR) fue 92 veces menor que en la sangre (Takayama N, N Sato, O'Brien SG, Ikeda Y, Okamoto S. Br J Haematol. 119:106-108, 2002). Por tanto, GLEEVEC / STI-571 mesilato de imatinib no atraviesa sustancialmente la barrera hematoencefálica.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad (por ejemplo, de una composición que comprende un modulador de la actividad γ -secretasa de la presente invención) suficiente para producir un efecto seleccionado. Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más administraciones, aplicaciones o dosis y no se pretende que esté limitada a una formulación o vía de administración concreta.

Como se usa en el presente documento, una "cantidad suficiente" de un compuesto, o "una cantidad de un compuesto suficiente para ..." se refiere a una cantidad que contiene al menos la cantidad mínima necesaria para lograr el resultado deseado. Un experto en la técnica puede determinar de forma rutinaria dicha cantidad basándose en los datos de los estudios que utilizan procedimientos de análisis tales como los divulgados en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significa de 10 a 15 %, preferentemente dentro de 5 a 10 %.

Como se usa en el presente documento, los términos "gestiona", "que gestiona" y "gestión" se refieren a los efectos beneficiosos que un sujeto obtiene de un compuesto, tal como un compuesto que reduce los niveles de A β que presenta una célula o tejido, que no tiene como resultado una cura de la enfermedad. En ciertas realizaciones, a un sujeto se administra uno o más de dichos agentes profilácticos o terapéuticos para "gestionar" un trastorno, de modo que se evite o ralente la progresión o empeoramiento del trastorno.

Como se usa en el presente documento, los términos "prevenir", "que previene" y "prevención" se refieren al impedimento de la recurrencia o aparición de un trastorno relacionado con A β o uno o más síntomas de un trastorno relacionado con A β en un sujeto.

Como se usa en el presente documento, un "protocolo" incluye programas de dosificación y regímenes de dosificación. Los protocolos de la presente invención son procedimientos de uso e incluyen protocolos profilácticos y terapéuticos.

Como se usa en el presente documento, los términos "administración" y "que administra" se refieren a la acción de dar un fármaco, profármaco u otro agente o tratamiento terapéutico (por ejemplo, composiciones de la presente invención) a un sujeto (por ejemplo, un sujeto o células, tejidos y órganos in vivo, in vitro o ex vivo). Ejemplos de vías de administración al cuerpo humano pueden ser a través de los ojos (oftálmica), boca (oral), piel (tópica o transdérmica), nariz (nasal), pulmones (inhalación), mucosa oral (bucal), oído, rectal, vaginal, mediante inyección (por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea, intratumoral, intraperitoneal etc.) y similares. "Administración periférica" se refiere a cualquier vía de administración que se da fuera de la barrera hematoencefálica.

Como se usa en el presente documento, los términos "coadministración" y "que coadministra" se refieren a la administración de al menos dos agentes (por ejemplo, composiciones que comprenden STI-y uno o más agentes adicionales, por ejemplo una terapéutica de una enfermedad relacionada con A β) o terapias a un sujeto. En algunas realizaciones, la coadministración de dos o más agentes o terapias es concurrente. En otras realizaciones, se administra un primer agente/terapia antes de un segundo agente/terapia. Los expertos en la técnica entienden que las formulaciones y/o vías de administración de los diversos agentes o terapias usadas pueden variar. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la dosificación adecuada para la coadministración. En algunas realizaciones, cuando los agentes o terapias se coadministran, los respectivos agentes o terapias se administran a dosis menores que las adecuadas para su administración en monoterapia. Por tanto, la coadministración es especialmente deseable en las realizaciones en las que la coadministración de los agentes o terapias disminuye la dosis requerida de un agente(s) potencialmente dañino (por ejemplo, tóxico) y/o cuando la coadministración de dos o más agentes tiene como resultado la sensibilización de un sujeto a los efectos beneficiosos de uno de los agentes mediante coadministración del otro agente.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar" y "tratamiento" incluyen la terapia de administración para prevenir, curar o aliviar / prevenir los síntomas asociados con un trastorno, enfermedad, lesión o afección específico.

Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento", o sus equivalentes gramáticos, abarcan la mejora y/o inversión de los síntomas de enfermedad (por ejemplo, una enfermedad relacionada con A β , tal como enfermedad de Alzheimer). Un compuesto que produce una mejora en cualquier parámetro asociado con la enfermedad cuando se usa en los procedimientos de detección selectiva de la presente invención puede identificarse de este modo como un compuesto terapéutico. El término "tratamiento" se refiere a tratamiento profiláctico y/o terapéutico o medidas preventivas. por ejemplo, los que se pueden beneficiar del tratamiento con composiciones y procedimientos de la presente invención incluyen aquéllos con una enfermedad y/o trastorno (por ejemplo, una enfermedad relacionada con A β o síntomas o patologías consistentes con una enfermedad relacionada con A β), así como aquéllos en los que una enfermedad y/o trastorno se va a prevenir (por ejemplo, usando un tratamiento profiláctico de la presente invención).

El término "compuesto" se refiere a cualquier entidad química, sustancia farmacéutica, fármaco y similares que se pueden usar para tratar o prevenir una enfermedad, patología, afección o trastorno de la función corporal. Como se usa en el presente documento, un compuesto puede ser una sola composición (por ejemplo, una preparación pura de una sustancia química) o puede ser una composición que comprende una pluralidad de sustancias químicas (por ejemplo, uno o más agentes eficaces y uno o más agentes inertes). Un compuesto puede comprender composiciones terapéuticas conocidas y potenciales. Se puede determinar que un compuesto es terapéutico mediante detección selectiva usando procedimientos de detección selectiva de la presente invención.

Un compuesto o agente "terapéutico conocido" incluye un compuesto terapéutico que se ha demostrado (por ejemplo, mediante ensayos con animales o experiencia previa con administración a seres humanos) que tiene un efecto terapéutico en un tratamiento. Sin embargo, un compuesto terapéutico conocido no se limita a un compuesto que tiene un determinado nivel de eficacia en el tratamiento o prevención de una enfermedad (por ejemplo, una enfermedad relacionada con A β), e incluye, por ejemplo, compuestos para los que los datos sugieren que existe algún efecto beneficioso y poco o ningún efecto negativo (por ejemplo, compuestos que generalmente son reconocidos como seguros, tales como extractos de alimentos y compuestos nutracéuticos). Ejemplos de agentes terapéuticos conocidos para el tratamiento, mejora o reducción del riesgo o la gravedad de las enfermedades relacionadas con A β (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer) cuando se usa solo o en combinación con otros compuestos o terapias incluyen, pero no se limitan, cannabinoides (véase, por ejemplo, Ramírez, et al, The Journal of Neuroscience, 23 de Febrero de 2005, 25 (8): 1904-1913); dimebom (véase, por ejemplo, Doody RS, et al, The Lancet 372: 207-215 (2008)); agentes antiinflamatorios tales como prednisona (un esteroide) y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), incluyendo, sin limitaciones, ibuprofeno, naproxeno, indometacina; fármacos reductores del colesterol y/o fármacos de protección cardíaca tales como estatinas, por ejemplo, atorvastatina (Lipitor®), cerivastatina (Baycol®), fluvastatina (por ejemplo, LESCOL®), mevastatina, pitavastatina (por ejemplo, LIVALO®), pravastatina (por ejemplo, PRAVACHOL®), rosuvastatina (por ejemplo, CRESTOR®) y simvastatina (por ejemplo, ZOCOR®); moléculas selectivas del receptor de estrógenos (SERM), por ejemplo, raloxifeno (EVISTA®); antihipertensores, incluyendo alfa-bloqueantes, beta-bloqueantes, bloqueantes alfa-beta, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, bloqueantes de los receptores de la angiotensina (ARA II, como valsartán (por ejemplo, Diovan®)), bloqueantes de los canales de calcio y diuréticos (véase, por ejemplo, I Hajjar, et al, The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences 60:67-73 (2005)); y antioxidantes tales como extracto de ajo, cúrcuma, melatonina, resveratrol, extracto de Ginkgo, té verde, vitamina C y vitamina E (véase, por ejemplo, B Frank, y col., Ann Clin Psychiatry 17(4):269-86 (2005)).

Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula pequeña" se refiere generalmente a una molécula de menos de aproximadamente 10 kDa de peso molecular, incluyendo, aunque sin limitaciones, compuestos orgánicos o inorgánicos naturales o sintéticos, péptidos, (poli)nucleótidos, (oligo)sacáridos y similares. Las moléculas pequeñas incluyen moléculas orgánicas e inorgánicas pequeñas no poliméricas (es decir no peptídicas o polipeptídicas).

Como se usa en el presente documento, el término "extracto" y términos similares se refiere a un procedimiento de separación y / o purificación de uno o más componentes de su fuente natural, o cuando se usa como sustantivo, se refiere a la composición producida por un proceso de este tipo.

5 Como se usa en el presente documento, el término "kit" se refiere a cualquier sistema de liberación para liberar materiales. En el contexto de los ensayos de actividad quinasa o de inhibición, dichos sistemas de liberación incluyen sistemas que permiten el almacenamiento, transporte o liberación de reactivos de reacción y/o materiales de soporte (por ejemplo, tampones, instrucciones escritas para realizar el ensayo etc.) de un lugar a otro. por ejemplo, los kit incluyen uno o más envases (por ejemplo, cajas) que contienen los reactivos de reacción y/o materiales de soporte relevantes. Como se usa en el presente documento, la expresión "kit fragmentado" se refiere a sistemas de liberación que comprenden dos o más recipientes separados, cada uno de los cuales contiene una subporción de todos los componentes del kit. Los recipientes se pueden liberar en el recipiente previsto juntos o por separado. por ejemplo, un primer recipiente puede contener una enzima para usar en un ensayo, mientras que un segundo recipiente contiene patrones para comparar los compuestos de ensayo. Con la expresión "kit fragmentado" se pretende abarcar kits que contienen reactivos específicos para analitos (REA) regulados en la sección 520(e) de la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos, pero no se limitan a ellos. De hecho, cualquier sistema de liberación que comprende dos o más recipientes separados, cada uno de los cuales contiene una subporción de todos los componentes del kit, está incluido en la expresión "kit fragmentado". En contraste con esto, un "kit combinado" se refiere a un sistema de liberación que contiene todos los componentes de un ensayo de reacción en un único recipiente (por ejemplo, en una sola caja cada uno de los componentes deseados). El término "kit" incluye los kits tanto fragmentados como combinados.

Como se usa en el presente documento, el término "tóxico" se refiere a cualquier efecto perjudicial o dañino en un sujeto, una célula o un tejido en comparación con la misma célula o tejido antes de la administración del tóxico.

Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente purificado" se refiere a una composición de pureza o calidad suficiente de la preparación para uso farmacéutico.

25 Como se usa en el presente documento, el término "purificado" se refiere a un tratamiento de una composición de partida para eliminar al menos otro componente (por ejemplo, otro componente de una composición de partida (por ejemplo, tejido vegetal o animal, una muestra ambiental etc.), un contaminante, un precursor de la síntesis, o un subproducto, etc.), tal que la relación entre el componente purificado y el componente eliminado es mayor que en la composición de partida.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a la combinación de un agente activo (por ejemplo, composición que comprende un modulador de la actividad γ -secretasa) con un vehículo, inerte o activo, haciendo que la composición sea especialmente adecuada para uso diagnóstico o terapéutico in vitro, in vivo o ex vivo.

35 Las expresiones "farmacéuticamente aceptable" o "o farmacológicamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a composiciones que no producen sustancialmente reacciones adversas, por ejemplo reacciones tóxicas, alérgicas o inmunológicas, cuando se administran a un sujeto.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier vehículo farmacéutico estándar, incluidos, entre otros, solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones (por ejemplo, tal como emulsiones de aceite/agua o de agua/aceite) y varios tipos de agentes humectantes, todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, laurilsulfato sódico, agentes de retraso de la absorción e isotónicos, disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de almidón sódico) y similares. Las composiciones también pueden incluir estabilizantes y conservantes. por ejemplo, vehículos, estabilizantes y adyuvantes. (Véase por ejemplo, Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15^a Ed., Mack Publ. Co., Easton, Pa. (1975), incorporado en el presente documento por referencia).

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier sal (por ejemplo, obtenido mediante reacción con un ácido o una base) o un compuesto de la presente invención que es fisiológicamente tolerado en el sujeto diana (por ejemplo, un sujeto mamífero y/o células, tejidos y órganos in vivo o ex vivo). Las "sales" de los compuestos de la presente invención pueden derivar de ácidos y bases orgánicos e inorgánicos. Ejemplos de ácidos incluyen, entre otros, ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, perclórico, fumárico, maleico, fosfórico, glicólico, láctico, salicílico, succínico, tolueno-p-sulfónico, tartárico, acético, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, fórmico, benzoico, malónico, sulfónico, naftaleno-2-sulfónico, bencenosulfónico y similares. Otros ácidos, tales como el oxálico, aunque en sí mismos no son farmacéuticamente aceptables, pueden emplearse en la preparación de sales útiles como compuestos intermedios en la obtención de los compuestos de la invención y sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables.

55 Ejemplos de bases incluyen, entre otras, hidróxidos de metales alcalinos (por ejemplo, sodio), hidróxidos de metales alcalino térreos (por ejemplo, magnesio), amoniaco y compuestos de fórmula NW_4^+ , en la que W es alquilo C_{1-4} , y similares.

Ejemplos de sales incluyen, entre otras: acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, alcanforato, alcanforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, flucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, cloruro, bromuro, yoduro, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato, undecanoato y similares. Otros ejemplos de sales incluyen aniones de los compuestos de la presente invención combinados con un catión adecuado, tal como Na^+ , NH_4^+ y NW_4^+ (en la que W es un grupo alquilo C_{1-4}) y similares. Para uso terapéutico, las sales de los compuestos de la presente invención se contemplan como farmacéuticamente aceptables. No obstante, las sales de ácidos y bases que no son farmacéuticamente aceptables también pueden encontrar utilidad en, por ejemplo, la preparación o purificación de un compuesto farmacéuticamente aceptable.

Para uso terapéutico, las sales de los compuestos de la presente invención se contemplan como farmacéuticamente aceptables. No obstante, las sales de ácidos y bases que no son farmacéuticamente aceptables también pueden encontrar utilidad en, por ejemplo, la preparación o purificación de un compuesto farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones de la presente invención, una composición de medicamento comprende una forma seleccionada del grupo que consiste en polvo, solución, emulsión, micela, liposoma, gel y forma de pasta. En algunas realizaciones, una composición de medicamento comprende un comprimido o una cápsula rellena, en el que dicho comprimido o cápsula rellena comprende opcionalmente un material de recubrimiento entérico.

Como se usa en el presente documento, el término "excipiente" se refiere a un ingrediente inactivo (es decir, no farmacéuticamente activo) añadido a una preparación de un ingrediente activo.

El término "gen" se refiere a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN), que comprende secuencias de codificación necesarias para la producción de un polipéptido, precursor o ARN (por ejemplo, ARNr, ARNt). El polipéptido puede estar codificado por una secuencia de codificación de longitud completa o por cualquier parte de la secuencia de codificación siempre se conserven la actividad deseada o las propiedades funcionales (por ejemplo, actividad enzimática, unión del ligando, transducción de la señal, inmunogenicidad etc.) de la longitud completa o del fragmento. El término también abarca la región de codificación de un gen estructural y las secuencias localizadas adyacentes a la región de codificación en los extremos tanto 5' como 3' para una distancia de aproximadamente 1 kb o más en cualquier extremo de modo que el gen corresponda a la longitud del ARNm de longitud completa. Las secuencias localizadas en 5' de la región de codificación y presentes en el ARNm se denominan secuencias 5' no traducidas. Las secuencias localizadas en 3' o cadena abajo de la región de codificación y presentes en el ARNm se denominan secuencias 3' no traducidas. El término "gen" abarca tanto ADNc como las formas genómicas de un gen. Una forma genómica o clon de un gen contiene la región de codificación interrumpida con secuencias no codificantes denominadas "intrones" o "regiones intermedias" o "secuencias intermedias". Los intrones son segmentos de un gen que se transcribe a ARN nuclear (ARNhn); los intrones pueden contener elementos reguladores, como los potenciadores. Los intrones se eliminan o "cortan" del transcrito nuclear o primario; por tanto, los intrones no están en el transcrito de ARN mensajero (ARNm). El ARNm funciona durante la traducción para especificar la secuencia u ordenar los aminoácidos en un polipéptido naciente.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "expresión génica" y "expresión" se refieren al proceso de convertir la información genética codificada en un gen en ARN (por ejemplo, ARNm, ARNr, ARNt o ARNsn) mediante la "transcripción" del gen (es decir, mediante la acción enzimática de una ARN polimerasa) y para genes de codificación de proteínas, en la proteína mediante la "traducción" del ARNm. La expresión génica se puede regular en muchas etapas del proceso. La "regulación por aumento" o "activación" se refiere a la regulación que aumenta y/o potencia la producción de los productos de expresión génica (por ejemplo, ARN o proteína), mientras que la "regulación por disminución" o "represión" se refieren a la regulación que disminuye la producción. Las moléculas (por ejemplo, factores de transcripción) que están implicadas en la regulación por aumento o la regulación por disminución a menudo se denominan "activadores" y "represores", respectivamente.

Además de contener intrones, las formas genómicas de un gen también pueden incluir secuencias localizadas en ambos extremos, 5' y 3', de las secuencias presentes en el transcrito de ARN. Estas secuencias se denominan secuencias o regiones "flanqueantes" (estas secuencias flanqueantes se localizan en 5' o 3' de las secuencias no traducidas presentes en el transcrito de ARN,). La región flanqueante en 5' puede contener secuencias reguladoras, tales como promotores y potenciadores, que controlen o influyan sobre la transcripción del gen. La región flanqueante en 3' puede contener secuencias que dirijan la terminación de la transcripción, la escisión postranscripcional y la poliadenilación.

La expresión "de tipo salvaje" se refiere a un gen o producto génico aislado de una fuente de origen natural. Un gen de tipo salvaje es el que se observa más frecuentemente en una población y, por lo tanto, se denomina arbitrariamente la forma "normal" o "de tipo salvaje" del gen. Por el contrario, el término "modificado" o "mutante" se refiere a un gen o producto génico que muestra modificaciones en secuencia y/o propiedades funcionales (es decir, características alteradas) cuando se compara con el gen o producto génico de tipo salvaje. Cabe destacar que se pueden aislar mutantes de origen natural; los mismos se identifican por el hecho de que tienen características alteradas (incluidas secuencias de ácido nucleico alteradas) cuando se compararon con el gen o producto génico de tipo salvaje.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "molécula de ácido nucleico codificante", "secuencia de ADN codificante" y "ADN codificante" se refieren a el orden o secuencia de desoxirribonucleótidos a lo largo de una hebra de ácido desoxirribonucleico. El orden de estos desoxirribonucleótidos determina el orden de los aminoácidos a lo largo de la cadena polipeptídica (proteína). Por tanto, la secuencia de ADN codifica la secuencia de aminoácidos.

Como se usa en el presente documento, el término "eucariota" se refiere a organismos distinguibles de "procariotas". Se pretende que el término abarque todos los organismos con células que exhiben las características habituales de los eucariotas, tales como la presencia de un núcleo verdadero unido por una membrana nuclear, dentro del cual están los cromosomas, la presencia de orgánulos unidos a la membrana y otras características observadas habitualmente en los organismos eucariotas. Por tanto, el término incluye, entre otros, organismos tales como hongos, protozoos y animales (por ejemplo, seres humanos).

Como se usa en el presente documento, el término "in Vitro" se refiere a un ambiente artificial y a procesos o reacciones que se producen dentro de un ambiente artificial. Los ambientes in Vitro pueden consistir en, entre otros, tubos de ensayo y cultivo celular. El término "in vivo" se refiere al ambiente natural (por ejemplo, un animal o una célula) y a procesos o reacciones que se producen dentro de un ambiente natural.

Las expresiones "compuesto de ensayo" y "compuesto candidato" se refieren a cualquier entidad química, sustancia farmacéutica, fármaco y similares que es un candidato para usar para tratar o prevenir una enfermedad, patología, afección o trastorno de la función corporal (por ejemplo, función cognitiva, trastorno asociado con amiloide, circulación, hipertensión, enfermedad cardíaca etc.). Los compuestos de ensayo comprenden compuestos terapéuticos conocidos y potenciales. Se puede determinar que un compuesto de ensayo es terapéutico mediante detección selectiva usando procedimientos de detección selectiva de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, una molécula "funcional" es una molécula en una forma en la que exhibe una propiedad por la cual se caracteriza. A modo de ejemplo, una enzima funcional es una que exhibe la actividad catalítica característica por la cual se caracteriza la enzima.

Como se usa en el presente documento, la expresión "oligonucleótido antisentido" se refiere a un ácido nucleico, por ejemplo, un segmento de ARN o de ADN, que es complementario a la secuencia de un ARN diana (o fragmento del mismo). Normalmente, el ARN diana es un ARNm expresado por una célula.

Como se usa en el presente documento, el término "oligonucleótido de interferencia" se refiere a un oligonucleótido capaz de inhibir la función de un producto génico diana, independientemente del mecanismo de inhibición. Como se usa en el presente documento, los oligonucleótidos de interferencia incluyen, entre otros, oligonucleótidos antisentido, aptámeros, microARN (ARNmi), ARN de interferencia corto (ARNsi) y ARN de horquilla corta (ARNsh). Los ARN de interferencia cortos normalmente consisten en moléculas de ARN de doble cadena, generalmente de 19- 22 nt", mientras que los ARN de horquilla corta consisten en secuencias palindrómicas conectadas por secuencias de bucle generalmente de 19-29 nt. Los procedimientos para producir oligonucleótidos de interferencia son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, aunque sin limitaciones, síntesis química, técnicas de ADN recombinante o generación a partir molécula precursora más grande utilizando escisión enzimática, por ejemplo mediante las enzimas Dicer.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina o a una proteína derivada de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento del antígeno. Los anticuerpos incluyen, aunque sin limitaciones, inmunoglobulinas naturales o recombinantes que comprenden dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, así como formas modificadas, incluyendo, por ejemplo, fragmentos de anticuerpos y anticuerpos de cadena sencilla que comprenden diferentes combinaciones de porciones de las cadenas pesadas y ligeras. El término abarca anticuerpos policlonales y monoclonales.

Descripción detallada

La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas y se refiere al uso de compuestos que modulan la producción de A β en un tejido periférico. Las realizaciones de la descripción que no entran dentro del alcance de dichas reivindicaciones se proporcionan solamente con fines ilustrativas y no forman parte de la presente invención.

La presente invención se basa, en parte, en los sorprendentes descubrimientos los solicitantes de que la modulación de la expresión o acumulación de A β en los tejidos periféricos, por ejemplo en el hígado, proporciona un efecto terapéutico en las enfermedades cerebrales ligadas a A β , por ejemplo la enfermedad de Alzheimer. Por tanto, la presente invención se refiere, en general, a composiciones para su uso en la prevención o el tratamiento de un trastorno cerebral relacionado con A β , tal como la EA, a través de la administración de compuestos que modulan la producción y / o acumulación de A β en células no neurales (es decir, células periféricas), líquidos y / o tejidos.

Como se ha tratado anteriormente, los péptidos de amiloide β (A β) son metabolitos de la proteína precursora de amiloide (APP) y se cree que son los principales determinantes patológicos de la enfermedad de Alzheimer (EA). La APP sufre proteólisis mediante la β y γ -secretasa para producir péptidos A β , con una forma de 42 residuos de A β que se piensa que es la más patogénica. La β -secretasa es necesaria para la función cerebral sana y, por lo tanto,

es un mal candidato para la inhibición como un medio de reducción de A β . Una serie de inhibidores de la γ -secretasa que entran en el cerebro han mostrado efectos secundarios indeseables como resultado de la interrupción de la acción de la γ -secretasa sobre otros objetivos, en particular, la familia Notch de receptores transmembrana. Se ha descubierto que una clase de compuestos reducen la producción de A β sin afectar a la señalización de Notch.

5 Esta clase de compuestos incluye el inhibidor de la tirosina quinasa mesilato de imatinib (STI-571, nombre comercial GLEEVEC) y el compuesto relacionado, 6-(2,6-diclorofenil)-8-metil-2-(metilsulfanilfenil-amino)-8*H*-pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-ona, conocido como inhibidor de 2 (Netzer WJ, y col., Proc Natl Acad Sci U S A. 100:12444-12449, 2003). Sin embargo, esta clase de compuestos se ha descartado como tratamiento de los trastornos cerebrales de A β porque no atraviesan la barrera hematoencefálica y, por lo tanto, es prohibitivamente difícil de administrar al

10 tejido cerebral.

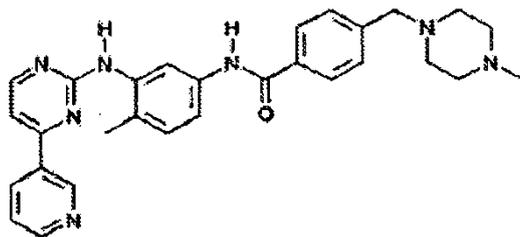
Como se ha indicado anteriormente, los inventores han descubierto que la modulación de la producción de A β en los tejidos periféricos, por ejemplo en el hígado, proporciona un efecto terapéutico en las enfermedades cerebrales ligadas a A β , por ejemplo la enfermedad de Alzheimer. La presente descripción proporciona usos, composiciones y procesos relacionados con el tratamiento o prevención de la EA mediante el tratamiento del hígado de un sujeto. En particular, la presente descripción se refiere a la alteración de la producción, procesamiento, acumulación o transporte de A β en el hígado de un sujeto mediante la inhibición directa de la producción (por ejemplo, mediante la inhibición de la expresión de APP), o mediante la modulación de un factor que a su vez modula la producción, procesamiento, acumulación o transporte de A β en el hígado. En realizaciones preferidas, la inhibición es mediante el uso de compuestos que no atraviesan sustancialmente la barrera hematoencefálica. En realizaciones particularmente preferidas, las composiciones y el procedimiento para el tratamiento comprenden el uso de un STI-571 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que se administra periféricamente, por ejemplo, por vía oral.

15

20

Uso de una composición en la fabricación de medicamentos

Imatinib es el nombre genérico [Nombre Común Internacional] para el compuesto 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[(4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilamino)fenil]benzamida de la fórmula I siguiente:



Q.

STI-571 generalmente se refiere a la sal mesilato de imatinib y se ha aprobado para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica y los tumores del estroma gastrointestinal. El uso de imatinib en el tratamiento del cáncer de mama se describe en el documento WO 2004/032925. Imatinib, su fabricación, sus sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de adición de ácido, y sus propiedades de inhibición de la proteína quinasa se describen en la patente de EE.UU. 5.521.184. "Imatinib" corresponde a 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N[4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilamino]fenil]benzamida, ya sea como la base libre o como la sal mesilato. La preparación de imatinib y el uso de del mismo se describen en el Ejemplo 21 de la solicitud de patente europea EP-A-O 564 409.

25

30

Aunque la administración periférica no se limita a ninguna vía de administración particular, en algunas realizaciones preferidas, la administración es oral. Por lo tanto, en algunas realizaciones preferidas, la presente descripción comprende el uso de STI-571 en la preparación de un medicamento administrado por vía oral para el tratamiento o prevención de un trastorno cerebral de A β . En algunas realizaciones, la forma administrada por vía oral comprende un comprimido, mientras que en algunas realizaciones, una forma administrada por vía oral comprende una cápsula.

35

En realizaciones preferidas, la presente descripción comprende la preparación de un comprimido o cápsula que comprende una cantidad eficaz de imatinib para reducir los niveles de A β en el cerebro. por ejemplo, una cápsula o comprimido puede comprender de 100 a 1.000 mg de un agente activo (por ejemplo, Imatinib o un derivado del mismo). por ejemplo, un comprimido o cápsula puede comprender 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1.000 mg, o cualquier cantidad de dosificación conveniente entremedias (por ejemplo, 125 mg, 150 mg, 175 mg, 225 mg, 250 mg, 975 mg, etc.). En algunas realizaciones, un comprimido o cápsula está configurado de modo que contenga una dosis eficaz más pequeña de imatinib, por ejemplo, de 1 a 5 mg (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 mg, o una cantidad fraccionaria conveniente de las mismas), de 6 a 10 mg, etc.

40

45

Las composiciones y formulaciones para administración oral incluyen, por ejemplo, polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en agua o medio no acuoso, cápsulas, sellos, obleas, tiras disolubles y comprimidos. Puede ser deseable usar espesantes, agentes aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, auxiliares de dispersión o aglutinantes. En realizaciones preferidas, un comprimido o cápsula (u otra forma de administración periférica) está

50

configurado para liberar una dosis de, o una cantidad equivalente a cualquier cantidad en número entero de mg entre 1 y 1.000 mg (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, etc.), o cualquier cantidad fraccionaria en mg entre 1 y 1.000 mg. En ciertas realizaciones, una formulación puede comprender, por ejemplo, una cápsula rellena con una mezcla de la composición.

Mesilato de imatinib (STI-571)	119,5 mg (correspondientes a 100 mg de la base libre de imatinib)
Celulosa MK GR	92 mg
Crospovidona XL	15 mg
Aerosil 200	2 mg
Estearato de magnesio	<u>1,5 mg</u> 230 mg

5

En algunas realizaciones, una cápsula o comprimido comprende un recubrimiento entérico. "Entérico" se refiere al intestino delgado, por lo tanto "recubrimiento entérico" generalmente se refiere a un recubrimiento que impide sustancialmente la liberación de un medicamento antes de que alcance el intestino delgado. Aunque sin limitar la invención a ningún mecanismo de acción concreto, se entiende que la mayoría de los recubrimientos entéricos funcionan mediante la presentación de una superficie que es estable a pH ácido, pero se degrada rápidamente a pH más alto.

10

Las composiciones y formulaciones para administración parenteral pueden incluir soluciones acuosas estériles que pueden también contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados, tales como, entre otros, compuestos transportadores y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

15

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que se pueden presentar de forma conveniente en forma de monodosis, se pueden preparar de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas incluyen la etapa de poner en contacto los ingredientes activos con el(los) transportador(es) farmacéutico(s) o excipiente(s). En general, las formulaciones se preparan poniendo en contacto de forma uniforme y estrecha los ingredientes activos con vehículos de líquidos o transportadores sólidos finamente divididos o con ambos y, después, en caso necesario, dando forma al producto.

20

La farmacocinética de mesilato de imatinib (GLEEVEC) se ha evaluado en estudios realizados en sujetos sanos y en los estudios farmacocinéticos poblacionales. Imatinib se absorbe bien tras la administración oral, con una C_{max} alcanzada dentro de las 2-4 horas posteriores a la dosis. La biodisponibilidad absoluta media es del 98 %. Después de la administración oral en voluntarios sanos, las semividas de eliminación de imatinib y su principal metabolito activo, el derivado N-desmetil, son aproximadamente 18 y 40 horas, respectivamente. La AUC media de imatinib (área bajo la curva de la concentración plasmática del fármaco - tiempo) aumenta proporcionalmente con las dosis crecientes que van de 25 mg a 1.000 mg. No hay ningún cambio significativo en la farmacocinética de imatinib en dosis repetidas y la acumulación es de 1,5 a 2,5 veces en el equilibrio cuando se dosifica una vez al día. A concentraciones clínicamente relevantes de imatinib, la unión a las proteínas plasmáticas en experimentos *in vitro* es de aproximadamente 95 %, principalmente a la albúmina y a la glucoproteína α_1 ácida. Véase, por ejemplo, "Ficha técnica de Gleevec" 2003 revisión T2003-09; impreso en EE.UU. 89019001 (Novartis).

25

30

CYP3A4 es la principal enzima responsable del metabolismo de imatinib. Otras enzimas del citocromo P450, tales como CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9 y CYP2C19, desempeñan un papel menor en su metabolismo. El principal metabolito circulante activo en seres humanos es el derivado de piperazina N-desmetilado, formado predominantemente por el CYP3A4. Muestra una potencia *in vitro* similar a la del imatinib original. El AUC plasmática para este metabolito es de aproximadamente 15 % del AUC para imatinib.

35

La eliminación se produce predominantemente en las heces, principalmente como metabolitos. Sobre la base de la recuperación del o los compuestos después de una dosis oral marcada con ^{14}C de imatinib, aproximadamente el 81 % de la dosis se eliminó en 7 días, en las heces (68 % de la dosis) y la orina (13 % de la dosis). Imatinib sin modificar alcanza el 25 % de la dosis (5 % orina, 20 % heces), siendo el resto metabolitos.

40

Típicamente, se espera que el aclaramiento de imatinib en un paciente de 50 años de edad que pesa 50 kg sea de 8 l/h, mientras que para un paciente de 50 años de edad que pesa 100 kg el aclaramiento aumentará a 14 l/h. Sin embargo, la variabilidad entre pacientes de 40 % en el aclaramiento no requiere el ajuste de la dosis inicial en base al peso corporal y / o la edad, sino que indica la necesidad de una vigilancia estrecha de la toxicidad relacionada con el tratamiento.

45

Al igual que en los pacientes adultos, según consta, imatinib se absorbió rápidamente después de la administración oral en pacientes pediátricos, con una C_{max} de 2-4 horas. El aclaramiento oral aparente fue similar a los valores de adultos (11,0 l/h / m² en niños frente a 10,0 l/h / m² en los adultos), al igual que la semivida (14,8 horas en niños frente a 17,1 horas en adultos). La administración en niños, tanto a 260 mg / m² como a 340 mg / m² logró una AUC similar a la de la dosis de 400 mg en adultos. La comparación de la AUC(0-24) el día 8 frente al día 1 a niveles de dosis de 260 mg/m² y 340 mg/m² reveló una acumulación del fármaco por 1,5 y 2,2, respectivamente, después de la dosificación repetida de una vez al día. La AUC media de imatinib no aumentó proporcionalmente al aumentar la

50

dosis. Véase, por ejemplo, "Ficha técnica de Gleevec" revisión de 2003 T2003-09; impreso en EE.UU. 89019001 (Novartis).

- 5 Aunque la modulación de la producción de A β en el hígado mediante el tratamiento con imatinib se utiliza como ejemplo anterior, la presente descripción no está limitada al tratamiento del hígado con este compuesto y proporciona procedimientos generales de tratamiento de un sujeto para un trastorno cerebral de A β o la predisposición a un trastorno cerebral de A β en un sujeto, que comprende administrar periféricamente un compuesto que modula la expresión de un gen en un tejido periférico de dicho sujeto. En realizaciones preferidas, la modulación de dicha expresión de dicho gen da lugar a la modulación de la producción o acumulación de A β en dicho tejido periférico. En ciertas realizaciones preferidas, el tejido periférico es el hígado de un sujeto.
- 10 La presente descripción abarca cualquier uso para influir sobre la producción de A β en el hígado, incluyendo, sin limitaciones, la alteración de la expresión y / o el procesamiento de APP. En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona usos que comprenden la administración periférica de un compuesto que modula la expresión de uno o más de los genes Psen 1, Apo E, InsP3R, Psen2, APP, Cib1, Ngrn, Zfhx1b, CLU (también conocido como ApoJ), PICALM y CR1. En algunas realizaciones, los procedimientos de la presente descripción
- 15 comprenden la administración periférica de un compuesto que modula la actividad de una o más de presenilina 2, calmirina, neugrina, Zfhx1b, clusterina, proteína de ensamblaje de claterina de unión fosfoinositol, el receptor 1 del componente del complemento o la expresión o actividad de la APP. En algunas realizaciones, uno o más de estos genes o actividades se modula en el hígado de un sujeto. En algunas realizaciones, la modulación comprende la inhibición de la expresión o la actividad, mientras que en algunas realizaciones, la modulación comprende la
- 20 estimulación de la expresión o la actividad.

Evaluación y monitorización de trastornos cerebrales de A β durante el tratamiento periférico

- La presente descripción se refiere a las pruebas y el tratamiento de la EA y el riesgo de AD mediante pruebas de y la administración a tejidos periféricos (es decir, no cerebrales) de un sujeto. Como veremos más adelante, el presente estudio demuestra que la expresión de presenilina 2 en el hígado y / o en uno o más tejidos periféricos modifica la
- 25 acumulación de A β , y que la reducción de A β en la periferia es suficiente para modificar su depósito en el cerebro. Así, a pesar de la extensa enseñanza en la literatura de lo contrario, un tratamiento terapéutico o profiláctico eficaz para la EA que reduzca la acumulación de A β no necesita atravesar la barrera hematoencefálica y entrar en el cerebro. La inhibición de Psen2 o DE LA actividad DE γ -secretasa o la reducción de la producción o acumulación de A β por otros medios, fuera del sistema nervioso central (es decir, fuera de la barrera hematoencefálica) encuentra
- 30 aplicación en la protección del cerebro frente a patologías relacionadas con A β . El tratamiento de los tejidos periféricos tiene el beneficio adicional de proteger al cerebro frente a los efectos secundarios adversos que pudieran ocurrir si la terapéutica entra en el cerebro.

- En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona usos para adaptar los tratamientos al estado bioquímico de un sujeto o paciente. Se contempla que las características de dosis eficaces de uno o más de los
- 35 compuestos seleccionados para la modulación de A β en un tejido periférico pueden verse afectadas por las circunstancias bioquímicas concretas de un sujeto o paciente, incluyendo, entre otros, la presencia de otros fármacos o medicamentos (por ejemplo, para el tratamiento de un trastorno de A β afecciones no relacionadas) o cambios bioquímicos causados por otras circunstancias. La presente descripción proporciona procedimientos que comprenden la monitorización de un sujeto mediante la evaluación en dicho sujeto de un trastorno cerebral de A β o de la progresión de un trastorno cerebral de A β antes y después de la administración de un compuesto que modula la producción de A β , por ejemplo, en el hígado. En algunas realizaciones, la terapia para un trastorno cerebral de A β se selecciona, ajusta o modifica en consecuencia.

Ejemplos experimentales

- 45 El ejemplo siguiente se proporciona para demostrar e ilustrar adicionalmente ciertas realizaciones preferidas y aspectos.

Ejemplo 1

Identificación de los modificadores del Desarrollo de una patología de tipo EA

- Se han desarrollado modelos de ratones transgénicos que resumen las características cruciales de la enfermedad de Alzheimer en seres humanos. El gen de la APP portador de algunas de las variaciones que predisponen a sufrir
- 50 la EA en seres humanos se ha unido a diversos promotores de la transcripción y se HA introducido en la línea germinal de ratón (Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, y col., Nature 373:523-527; Hsia AY, Masliah E, McConlogue L, Yu GQ, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Malenka RC, Nicoll RA, Mucke L. Proc Natl Acad Sci U S A. 96:3228-3233, 1999; Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G. Science 274:99-102, 1996; Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Bürki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B. Proc Natl Acad Sci U S A 94:13287-13292, 1997; Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reverse D, Baekelandt V, Naidu A, Tesseur I, Spittaels K, Haute CV, Checler F, Godaux E, Cordell B, Van Leuven F. J Biol Chem. 274:6483-6492, 1999; Richardson JC, Kendal CE, Anderson R,

Priest F, Gower E, Soden P, Gray R, Topps S, Howlett DR, Lavender D, Clarke NJ, Barnes JC, Haworth R, Stewart MG, Rupniak HT. *Neuroscience* 122:213-228, 2003; Buttini M, Yu GQ, Shockley K, Huang Y, Jones B, Masliah E, Mallory M, Yeo T, Longo FM, Mucke L. *J Neurosci.* 22:10539-10548, 2002). Los ratones transgénicos resultantes desarrollan depósitos de A β , pero el tiempo varía de 3 meses a 15 meses de edad. Las variables responsables de estas diferencias de edad incluyen el promotor concreto de la transcripción elegido, las mutaciones concretas que predisponen a la EA en el gen APP, el sitio cromosómico de integración del transgén y la cepa inicial de ratón en la que se perpetúa el transgén (revisado en Bloom FE, Reilly JF, Redwine JM, Wu CC, Young WG, Morrison JH. *Arch Neurol.* 62:185-187, 2005).

Un informe (Kulnane LS, Lamb BT. *Neurobiol Dis.* 8:982-992, 2001) introdujo R1,40, un transgén de la APP humana portador de las denominadas mutaciones suecas (K670 N, M671 I, las variaciones que predisponen a los seres humanos que heredan este gen mutado para desarrollar EA de inicio temprano) en un fondo genético en ratones mixtos C57BL / 6x129 / Sv. La expresión del transgén R1. 40 estaba dirigida por el promotor natural de la APP humana. Los depósitos de A β se detectaron primero en los cerebros de estos ratones a 14-16 meses. Posteriormente, el transgén R1.40 se cruzó desde su origen inicial por separado en las zonas de C57B1/6 (B6), DBA/2 (D2) y 129/Sv. A continuación, cada una de estas 3 cepas se cruzó hasta congenidad: 10 o más retrocruzamientos en el mismo origen, por lo que se crearon 3 cepas transgénicas con orígenes uniformes pero distintos (Lehman EJ, Kulnane LS, Gao Y, Petriello MC, Pimpis KM, Younkin L, Dolios G, Wang R, Younkin SG, Lamb BT. *Hum Mol Genet.* 12:2949-2956, 2003). Aunque las tres cepas transgénicas produjeron la misma cantidad de precursor APP (lo que indica que el transgén se expresaba de forma comparable en los orígenes de las 3 cepas), B6s acumuló más A β (el fragmento patogénico de APP) según lo medido mediante ELISA en homogeneizados de cerebro y plasma a los 21 y 60 días que las otras 2 cepas, y desarrollaron depósitos de amiloide característicos de la EA humana en 13,5 meses, mientras que los D2 estaban protegidas (sin depósitos a los 2 años). Por lo tanto, esto indica que hay genes que distinguen ratones B6 y D2 y que modifican el desarrollo de la patología de tipo EA y muy probablemente estos están involucrados en la acumulación de la sustancia patogénica A β (Lehman EJ, Kulnane LS, Gao Y, Petriello MC, Pimpis KM, Younkin L, Dolios G, Wang R, Younkin SG, Lamb BT. *Hum Mol Genet.* 12:2949-2956, 2003). Las identidades de los genes modificadores podrían sugerir modalidades terapéuticas o profilácticas que imitarían el efecto modificador y retrasarían o prevendrían la aparición de la patología de EA.

Con el fin de asignar los genes modificadores a intervalos cromosómicos, Ryman y col. (Ryman D, Gao Y, Lamb BT. *Neurobiol Aging* 29:1190-1198, 2008) cruzaron ratones B6 R1,40 hembra (homocigotos para el transgén) con ratones D2 R1,40 macho (también homocigotos para el transgén), después cruzaron su descendencia F1 (todos ellos tenían 2 copias del transgén R1,40) a descendencia B6 x D2 F1 no transgénica, de modo que se generaron ratones 516 F2, cada uno de los cuales portaban un único transgén. Estos fueron genotipados con 909 SNP. A β se midió mediante ELISA en homogeneizados cerebrales de los 516 ratones. El análisis de regresión de correlación de la cantidad de acumulación de A β con los genotipos de los 516 ratones permitió asignar 3 loci modificadores a regiones amplias centradas en las siguientes posiciones: cromosoma 1, 182,049374 megabases (Mb); cromosoma 2, 41,216315 Mb; cromosoma 7, 63,680922 Mb.

Identificación de un modificador de genes

El gen de ratón que codifica la presenilina 2, Psen2, está situado en el cromosoma 1 en 182,06371 Megabases, el centro del intervalo del locus del rasgo, lo que sugiere que como un candidato para la modificación de la acumulación y el depósito de A β . Esto es coherente con su función como componente de la γ -secretasa. Para que Psen2 represente el modificador real mapeado en el cromosoma 1 por Ryman y col., su actividad debe variar de forma hereditaria (de una manera mendeliana) entre las cepas de ratón B6 y D2, y la actividad de Psen2 debe ser mayor en los ratones B6 que en los ratones D2, debido a que cabría esperar que una actividad de γ -secretasa menor fuera protectora en la EA. Los autores han investigado este problema mediante la determinación de la cantidad de ARNm que se acumula a partir del gen Psen2 en diversos tejidos en las cepas de ratón B6 y D2 y hasta 89 cepas de ratones endogámicos recombinantes producidos mediante el cruce de ratones B6 y D2 y la cría de la descendencia hasta congenidad. Las concentraciones de cada uno de más de 20. 000 ARNm en 10 tejidos (cerebro, cerebelo, hígado, cuerpo estriado, riñón, hipocampo, ojo, corteza prefrontal, núcleo accumbens y neocórtex) de las cepas de ratón B6 y D2 las 89 cepas de ratón endogámicas recombinantes están disponibles en bases de datos públicas recopiladas en <http://www.GeneNetwork.org>. Para cada una de las 89 cepas de ratón endogámicas recombinantes, se ha determinado mediante genotipificación si la cepa ha heredado cada intervalo de su genoma de los padres B6 o D2.

La sonda rs13476267 se encuentra en el cromosoma 1 en 182,120454 Mb. Usando el software en el sitio público de la red informática internacional en www.genenetwork.org/webqtl/WebQTL.py, los autores realizaron correlaciones de rasgos entre el genotipo del intervalo rs13476267 y la cantidad de ARNm de Psen2 que se acumula en cada uno de los 10 tejidos en los hasta 89 ratones endogámicos recombinantes, calculando producto-momento de Pearson. Los valores fueron:

Cerebro	r >0,05
cerebelo	r = 0,6344
hígado	r = -0,9402
estriado	r = 0,5329

(continuación)

riñón	r = -0,4733
hipocampo	r >0,36
ojo	r >0,35
corteza prefrontal	r >0,51
núcleo accumbens	r = 0,7260
neocórtex	r = 0,5500

Ninguna de las muestras de tejido derivadas de cerebro muestra una alta heredabilidad ($|r| > 0,9$) de expresión de Psen2 y para las dos regiones del cerebro que muestran una modesta heredabilidad de la expresión del ARNm de Psen2, el cerebelo y el núcleo accumbens, más ARNm de Psen2 se correlacionó con el genotipo D2 que con el genotipo B6. Así, la expresión de Psen2 en el cerebro no es un modificador de la acumulación de A β . Sin embargo, en el hígado, la cantidad de ARNm de Psen2 se correlacionó altamente con el genotipo en el locus de Psen2 (Figura 1A). Además, los ratones B6 expresan más ARNm de Psen2 que los ratones D2.

Los datos demuestran que la expresión de Psen2 en el hígado o en uno o más tejidos periféricos modifica la acumulación de A β , y que la reducción de A β en la periferia es suficiente para modificar su depósito en el cerebro. Por lo tanto, a pesar de la enseñanza extensa en la literatura de lo contrario, en base al menos en parte a la suposición natural de que una enfermedad cerebral estaría causada por acontecimientos que se producen dentro del cerebro, un tratamiento terapéutico o profiláctico eficaz para la EA que reduce la acumulación de A β no necesita cruzar la barrera hematoencefálica y entrar en el cerebro. La inhibición de Psen2 o de la actividad γ -secretasa, o la reducción de la producción o acumulación de A β por otros medios, fuera del sistema nervioso central, es suficiente para proteger al cerebro del depósito de A β al tiempo que protege al cerebro de los efectos secundarios adversos que pudieran producirse si la terapéutica entrara en el cerebro. El tratamiento de la acumulación de A β en la periferia se puede lograr mediante el uso de vías de administración de fármacos que no comprenden la aplicación directa al SNC (por ejemplo, mediante liberación en el LCR), tal como a través de administración oral.

Ejemplo 2

Administración periférica de mesilato de imatinib STI-571 para reducir A β en el cerebro

Los datos de los estudios de mapeo e ideas adicionales de los inventores sugirieron una nueva vía terapéutica para tratar la EA (su inicio, progresión o gravedad), en base a la modulación de la producción de A β en el hígado. La base de una nueva estrategia terapéutica es que un fármaco que disminuye los niveles en el equilibrio de A β en sangre (mediante la inhibición de la producción de A β en el hígado) reduciría las concentraciones de A β en el cerebro.

Se diseñó un experimento para probar el efecto de la administración de mesilato de imatinib STI-571 sobre los niveles de proteína A β en el cerebro y el tejido sanguíneo en 2 cepas de ratones. Se administró a los ratones mesilato de imatinib STI-571 mediante inyección i.p. en el transcurso de una semana y las muestras de cerebro y tejido extirpado y los niveles de proteína A β medidos mediante ELISA o transferencia de tipo Western.

A ratones macho C57B1/6 y DBA/2J de tipo salvaje (8-12 semanas de edad) se administró el fármaco o vehículo dos veces al día durante 7 días mediante inyección intraperitoneal. A los grupos de vehículo (n = 4 animales por cepa) se inyectaron 100 μ l de solución salina y los grupos de tratamiento con el fármaco (n = 4) recibieron 1, 10 o 100 mg / kg de STI-571 (GLEEVEC imatinib, sal metanosulfonato, n° de catálogo I- 5508, LC laboratories, Woburn, MA). La dosis de STI-571 prescrita para los pacientes de cáncer humano es 100 mg a 1.000 mg. Véase, por ejemplo, Gleevec Ficha técnica 2003, revisión T2003-09; Impreso en EE.UU. 89019001 (Novartis).

Se sacrificó a los animales 12 horas después de la última inyección. Se anestesió a cada ratón individual con isoflurano y se extrajeron muestras de sangre (100-300 μ l) mediante punción cardiaca con jeringas heparinizadas. Las muestras se introdujeron en hielo durante 30 minutos en presencia de EDTA y después se centrifugaron durante 20 minutos a 16,000 x g a 4 °C. La fracción de plasma se retiró y se almacenó a -80 °C. Se extrajeron los cerebros y se congelaron rápidamente en hielo seco y se almacenaron a -80 °C.

La detección de A β_{1-40} de ratón en las muestras de sangre y de cerebro se llevó a cabo mediante el uso de un kit de inmunoensayo disponible comercialmente (Biosource mouse A β_{1-40} , n° de catálogo KMB3481, Invitrogen, Carlsbad, CA) o mediante transferencia de tipo Western. Se prepararon muestras de cerebro de ratón mediante homogeneización de tejido cerebral en un Polytron en presencia de guanidina HCl 5 M y HCl Tris 50 mM, a pH 8,0 como se describe en el protocolo de ensayo. (véase, por ejemplo, Masliah, E., y col., (2001) β amyloid peptides enhance α -synuclein accumulation and neuronal deficits in a transgenic mouse model linking Alzheimer's disease and Parkinson's disease. PNAS 98:12245-12250; Johnson-Wood, K, y col., (1997) Amyloid precursor protein processing and A beta42 deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease PNAS 94:1550-1555; y Chishti, M.A., y col., (2001); Early-onset amyloid deposition and cognitive defects in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. J. Biol. Chem. 276:21562-21570.)

Para el ensayo, los homogeneizados cerebrales se diluyeron a 1:10 en un tampón de reacción que contiene solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco con 5 % de BSA y 0,03 % de Tween-20, complementado con cóctel inhibidor de proteasa (Nº de catálogo 539131, EMD Biosciences, La Jolla, CA). Las muestras de sangre se diluyeron a 1:5 en tampón diluyente estándar. Las muestras se analizaron por duplicado y se midió la DO450 en un lector de placas Tecan infinita 2000.

El A β oligomérico se extrajo en la fracción SDS esencialmente como se describe (T. Kawarabayashi, y col., *Neurosci* 21, 372 (2001)). Para las transferencias de tipo Western, las muestras se sometieron a análisis PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF y los hexámeros de A β se visualizaron usando un anticuerpo monoclonal 4G8 dirigido contra A β de ratón (1:1000; Covance) utilizando el protocolo recomendado por el fabricante. Las transferencias se escanearon mediante densitometría y después se volvieron a sondear con un anticuerpo frente a la histona H3 (1:50.000; Abcam) como control de carga y transferencia. Los datos se representan como la densidad óptica normalizada.

Los niveles de A β tanto en el cerebro como en la sangre difirieron entre las dos cepas de ratones (C57B1 / 6 y DBA / 2J) analizadas. Los niveles de A β fueron mayores en las muestras tanto cerebrales como de sangre de ratones C57B1 / 6 en comparación con DBA / 2J en los grupos control tratados con vehículo, como se ha demostrado anteriormente.

La Fig. 3 muestra los efectos de STI-571 administrado por vía periférica sobre los niveles de A β en plasma y cerebro. La Fig. 3A muestra transferencias de tipo Western que muestra los niveles de los hexámeros A β en plasma de ratones D2 jóvenes tratados con vehículo de solución salina (carriles 1,2, 9 y 10) o STI-571 a tres dosis: los carriles 3, 4, 11, y 12 muestran los resultados con 1 mg / kg; los carriles 5, 6, 13 y 14 muestran los resultados con 10 mg / kg; y los carriles 7, 8, 15 y 16 muestran los resultados con 100 mg / kg; n = 4 por grupo. La Fig. 3B muestra un gráfico de barras de las imágenes de la transferencia de tipo Western en la Fig. 3A. La Fig. 3C muestra una transferencia de tipo Western que muestra los niveles de hexámeros A β en extractos de cerebro de ratones B6 jóvenes tratados con vehículo salino o STI-571 a 20 mg / kg (n = 10 por grupo en total, solo n = 5 se muestran en la transferencia de tipo Western). La Figura 3D muestra una cuantificación en gráfico de barras de las imágenes de la transferencia de tipo Western en la Fig. 3C. Las Figs. 3E y 3F gráficos muestran gráficos de barras que indican los niveles de hexámeros A β en extractos de cerebro (E) o plasma (F) de ratones B6 viejos tratados con vehículo salino o STI-571 a 20 mg / kg (n = 4 por grupo).

Se observó una reducción de A β dependiente de la dosis en el plasma (Fig. 3A-B) y la dosis más alta redujo el A β circulante en aproximadamente un 75 %. Se seleccionó una dosis intermedia, de 20 mg / kg, para el estudio de los efectos cerebrales. Esta dosis redujo los niveles en cerebro y plasma de A β en aproximadamente un 50 % en ratones B jóvenes y viejos (Figs. 3B y 3C). Se ha observado que estos niveles de A β son protectores en el modelo de ratón R1. 40 (E.J. Lehman, y col., *Hum Mol Genet* 12, 2949 (2003)).

Estos resultados demuestran que el tratamiento con mesilato de imatinib STI-571 a corto plazo (una semana) disminuye significativamente los niveles de A β en la sangre y el cerebro. Además, como el fármaco no atraviesa la barrera hematoencefálica de forma apreciable a las concentraciones utilizadas en este estudio, los resultados indican que el mesilato de imatinib STI-571 puede alterar indirectamente los niveles de A β en el cerebro mediante la modulación de la producción de A β periféricamente.

Ejemplo 3

Identificación de los genes modificadores 2 y 7 del cromosoma candidato

Los estudios descritos anteriormente demuestran que el A β patogénico probablemente deriva del hígado. Utilizando la misma base de datos y la metodología descrita anteriormente, los inventores también realizaron búsquedas de genes que se asignan en los intervalos de los cromosomas 2 y 7 y cuyas actividades en el hígado variaron hereditariamente entre las cepas de ratón B6 y D2.

El marcador rs4226715 se encuentra en el cromosoma 7 en 80.138616 Mb, dentro del locus modificador para ese cromosoma. Dos genes de este intervalo mostraron una heredabilidad de la expresión en el hígado extremadamente alta: El gen *Ngrn* y el gen *CIB1*. El gen *Ngrn* codifica la neugrina, una proteína ampliamente expresada de función desconocida cuya expresión aumenta en algunos tipos de cáncer y se ha asociado con la diferenciación del neuroblastoma (S. Ishigaki, y col., *Biochem Biophys Res Commun* 279, 526 (2002), S.R. Hustinx, y col., *Cancer Biol Ther* 3, 1254 (2004)) y el gen *Cib1* codifica la calmirina, una proteína miristoilada asociada a la membrana de unión al calcio y a la integrina descubierta inicialmente por su interacción preferente con presenilina 2 en las células HeLa (S.M. Stabler, y col., *J Cell Biol* 14, 145, 1277 (1999)). Estos genes mostraron las correlaciones más altas: valores de Pearson $r = 0,945$, y $r = -0,913$, respectivamente, ambas $p < 4,99 \times 10^{-39}$, (Figs. 5 y 4, respectivamente). *Ngrn* se encuentra en el cromosoma 7 en 80,138736 Mb y *Cib1* en 80,101507, ambos en consonancia con el locus del modificador mapeado.

Como se señaló anteriormente, la calmirina tiene una interacción demostrada con la presenilina 2. Sin embargo, debido a que la distribución de la calmirina en el cerebro no se correlaciona bien con la distribución de presenilina en el cerebro o las regiones más susceptibles a la patología EA, estudios previos han considerado su posible papel en

la contribución a la producción de A β en el prosencéfalo, pero han pensado que este papel es improbable (M. Blazejczyk, y col., *Biochim Biophys Acta* 1762, 66 (2006)). No obstante, la calmitina se expresa altamente en el hígado (S.M. Stabler, citado anteriormente). Una actividad sugerida de la calmirina es como un ligando proteico para el canal de liberación de Ca(2+) del receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (C. White, y col., *J Biol Chem* 281, 20825 (2006).), cuya actividad de puerta es aberrante e células de pollo transfectadas con genes de presenilina mutantes (K.H. Cheung, y col., *Neuron* 58, 871 (2008)).

La heredabilidad de la expresión de ARNm de la calmirina hepática era extremadamente alta. En cada cepa que heredó sus genes *Cib1* de los padres B6, la cantidad de ARNm de calmirina fue mayor que la cantidad observada en las cepas que heredaron sus genes *Cib1* de los padres D2 (Fig. 5A). Una cepa (línea 73) parece ser heterocigota en la sonda, pero expresa cantidades de tipo D2 del ARNm de calmirina. Esto sugiere que la baja expresión de calmirina en el hígado disminuye la acumulación de A β en el cerebro y protege a los ratones de sus efectos adversos.

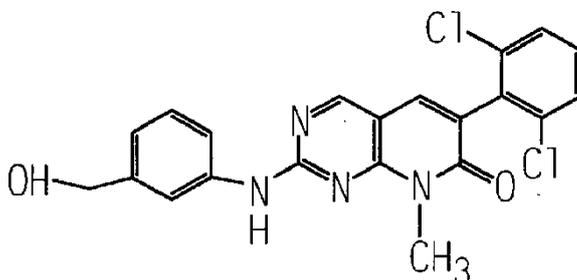
El tratamiento con un compuesto que disminuye la actividad de potenciación de A β de calmirina debería imitar a la baja expresión del genotipo D2 y, por lo tanto, tener un efecto protector.

La neugrina tiene una correlación inversa (Fig. 4). La abundancia de neugrina en el hígado se correlaciona con menor acumulación de A β , lo que sugiere que el tratamiento con un compuesto que aumenta la neugrina debería ser protector.

El marcador rs3669981 se encuentra en el cromosoma 2 en 44,943029 Mb, dentro del locus modificador bastante amplio para ese cromosoma. El gen *Zfhx1b* (44,810557 Mb), que codifica la proteína homeobox 1b en dedo de cinc, mostró la correlación más alta: $r = -0,919$, $p = 4,99 \text{ e-}39$ (Fig. 5B). La proteína Zthxb1 es un correpresor de la transcripción que interacciona con Smad implicado en la señalización Wnt y hedgehog (G. Bassez, y col., *Neurobiol Dis* 15, 240 (2004); G. Verstappen, y col., *Hum Mol Genet* 17, 1175 (2008); N. Isohata, y col., *Int J Cancer* 125, 1212 (2009).). Las variantes perjudiciales del gen causan el trastorno del desarrollo síndrome de Mowat-Wilson, que se presenta con múltiples déficit congénitos, que incluyen retraso mental (C. Zweier, y col., *Am J Med Genet* 108, 177 (2002)). Aunque el ARNm de *Zfhx1b* se expresa ampliamente durante el desarrollo, especialmente en el sistema nervioso, en el ratón adulto se expresa mucho más altamente en el hígado (G. Bassez, citado anteriormente). El gen *Zfhx1b* se localiza en el cromosoma 2 en 44,810557 Mb, consistente con el locus modificador mapeado. La heredabilidad de la expresión de ARNm en hígado era extremadamente alta para este gen. En casi todas las cepas que heredó sus genes *Zfhx1b* de los padres B6, la cantidad de ARNm de *Zfhx1b* fue mayor que en las cepas que heredaron sus genes *Zfhx1b* de los padres D2 (Fig. 5B). Las cepas 12 y 36 difirieron en el genotipo en la sonda, pero tuvieron niveles de ARNm similares. Estos datos sugieren que la baja expresión de *Zfhx1b* en el hígado disminuye la acumulación de A β en el cerebro y protege a los ratones de sus efectos adversos. El tratamiento con un compuesto que disminuye la actividad de *Zfhx1b* debería imitar a la baja expresión del genotipo D2 y, por lo tanto, tener un efecto protector.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en imatinib (STI-571), LY450139, GSI-953, Flurizan, el compuesto E2012 y



5

Compuesto 2

o una variante impermeable del mismo a la barrera hematoencefálica, para su uso en la reducción de la producción de A β en el tejido periférico de un sujeto que tiene o está predisposto a desarrollar un trastorno A β .

2. El compuesto para su uso de la reivindicación 1, en del que el trastorno de A β es un trastorno cerebral de A β .

3. El compuesto para su uso de la reivindicación 1 o 2, en el que el tejido periférico es hígado.

10 4. El compuesto para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho compuesto tiene un coeficiente de reparto menor de 2,0, preferentemente menor de 1,5, aún más preferente menor de 1,0.

5. El compuesto para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho compuesto no atraviesa sustancialmente la barrera hematoencefálica.

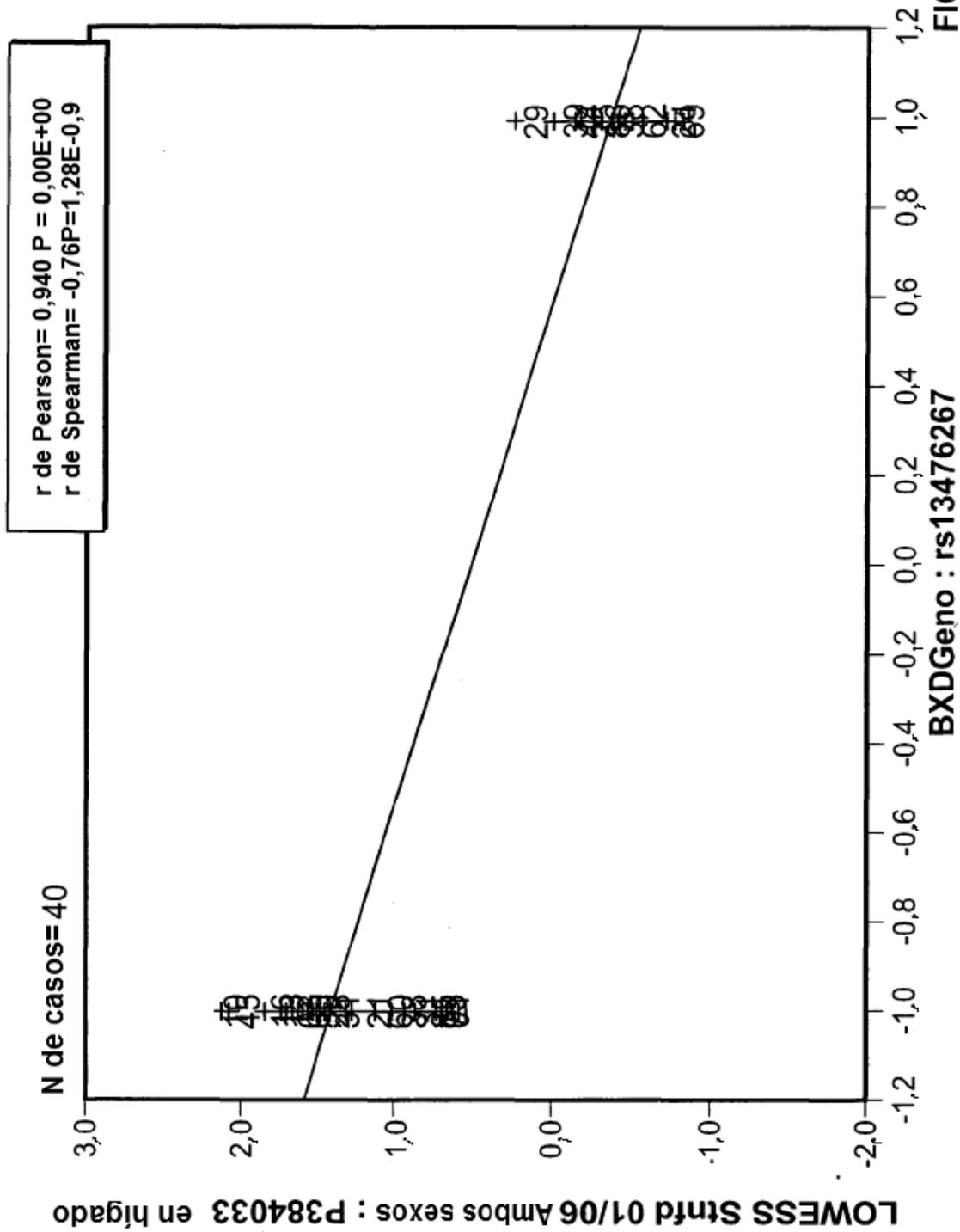
15 6. El compuesto para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el trastorno cerebral de A β es enfermedad de Alzheimer.

7. El compuesto para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 formulado como un medicamento para administración oral.

20 8. El compuesto para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, formulado como un medicamento que comprende además una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico para el tratamiento de un trastorno cerebral de A β .

25 9. El compuesto para su uso de la reivindicación 8, en el que dicho agente terapéutico comprende un agente seleccionado del grupo que consiste en cannabinoides, dimebom, prednisona, ibuprofeno, naproxeno, indometacina; estatinas, moléculas selectivas del receptor de estrógenos, antihipertensores, alfa-bloqueantes, beta-bloqueantes, alfa-beta bloqueantes, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, bloqueantes de los receptores de angiotensina, bloqueantes de los canales de calcio, diuréticos, AINE y antioxidantes.

10. El compuesto para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho imatinib está en forma de la sal mesilato.



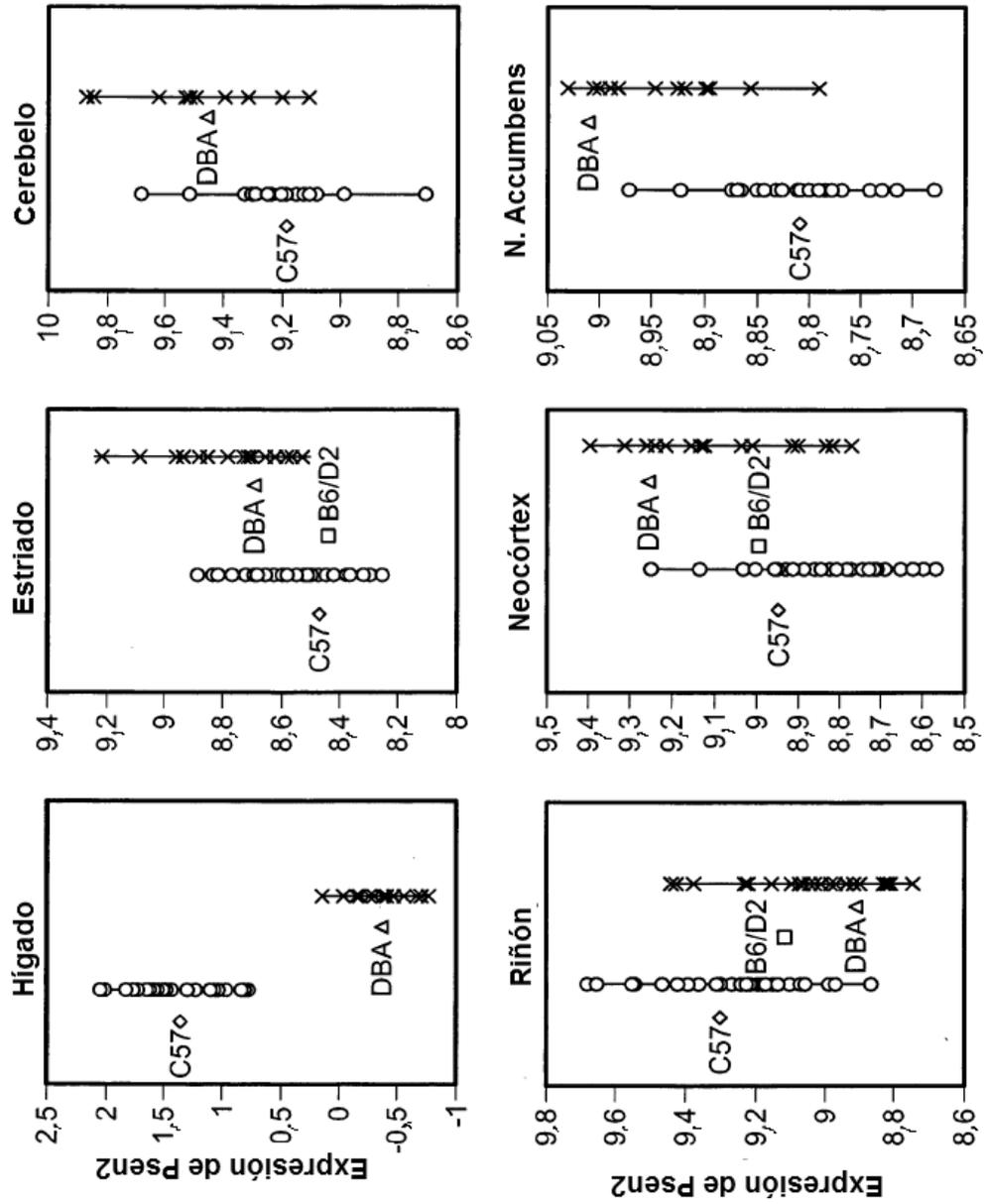
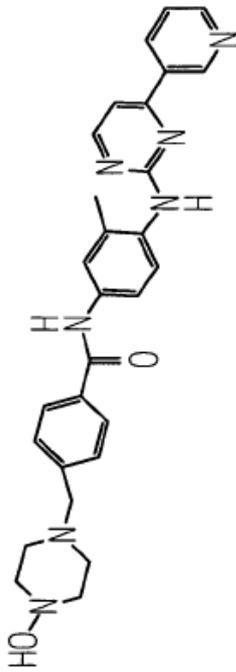
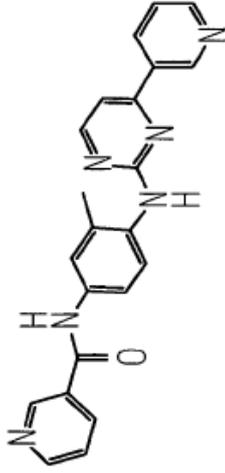


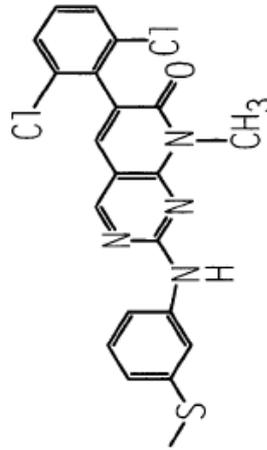
FIG. 1B



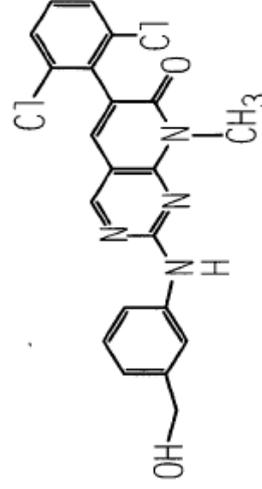
STI-571 ("Gleevec™")



**Variante de STI-571
("WGB-BC-15")**



Compuesto 1



Compuesto 2

FIG. 2

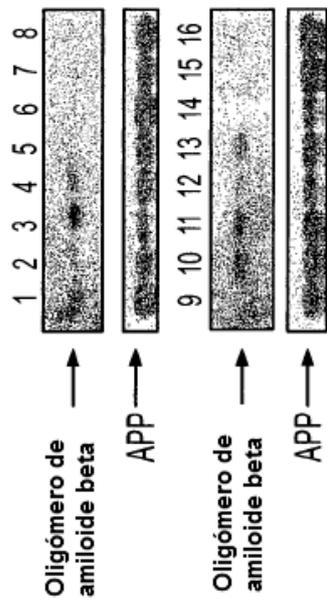


FIG. 3A

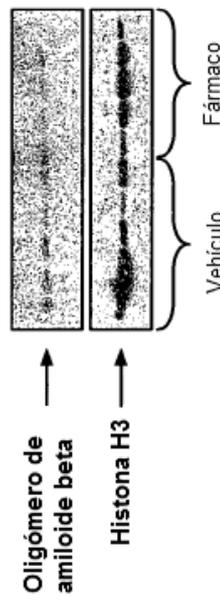


FIG. 3C

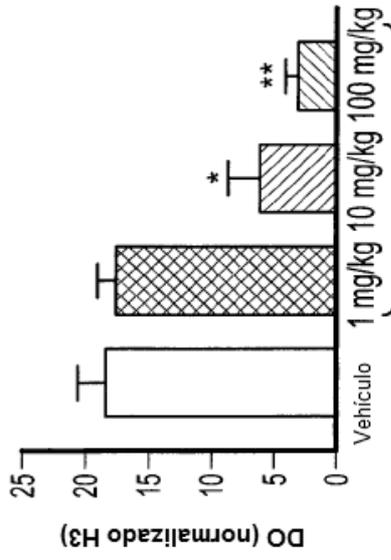


FIG. 3B

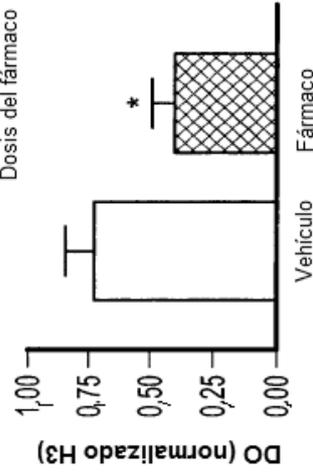


FIG. 3D

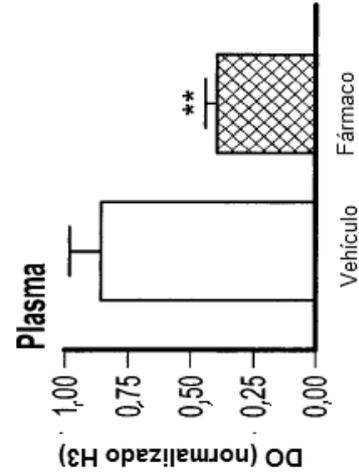


FIG. 3F

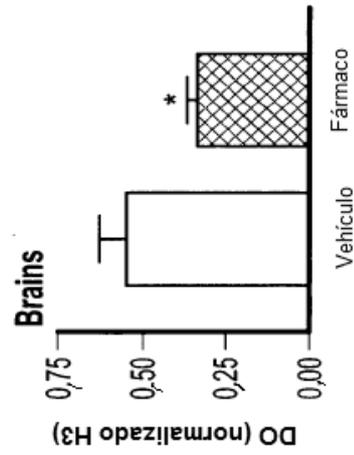
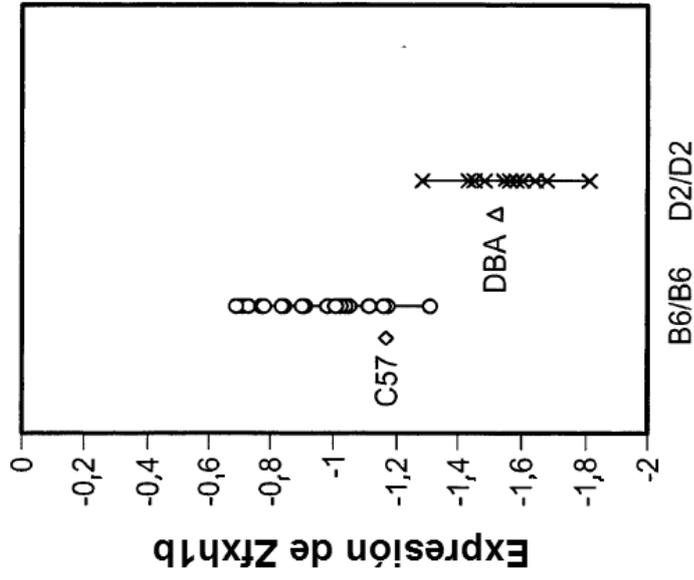
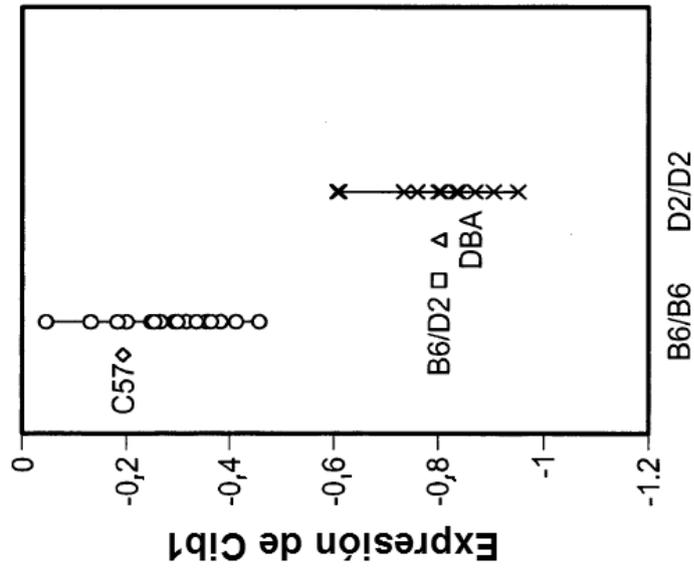


FIG. 3E



Genotipo
FIG. 5B



Genotipo
FIG. 5A