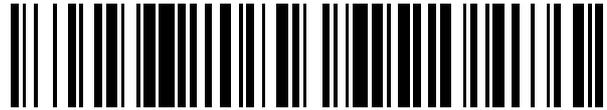


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 730**

51 Int. Cl.:

A01N 31/00 (2006.01)

A61K 31/045 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2010 E 10805177 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 2458983**

54 Título: **Inhibidores del deterioro cognitivo**

30 Prioridad:

26.02.2010 US 308686 P

31.07.2009 US 230326 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.10.2015

73 Titular/es:

COGNITION THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
2043 Sidney Street, Suite 261
Pittsburgh, PA 15203, US

72 Inventor/es:

RISHTON, GILBERT M. y
CATALANO, SUSAN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 547 730 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

Inhibidores del deterioro cognitivo

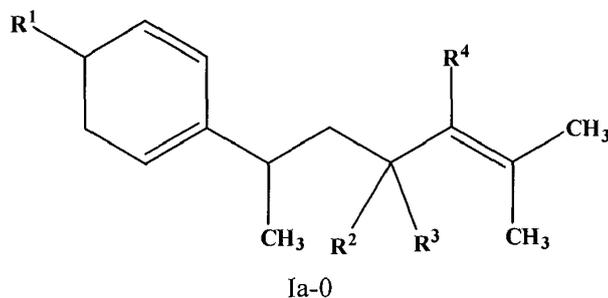
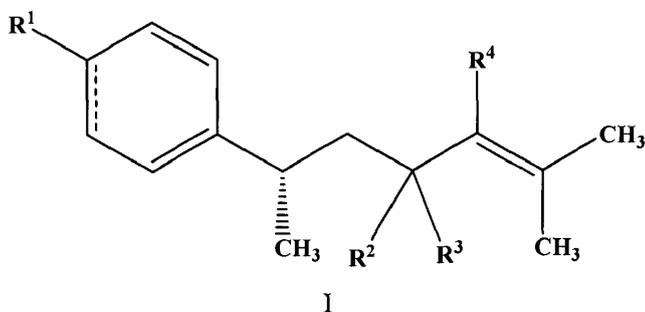
5 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente provisional de EE.UU. nº de serie 61/230.326 presentada el 31 de julio de 2009 y la solicitud de patente provisional de EE.UU. nº de serie 61/308.686 presentada el 26 de febrero de 2010.

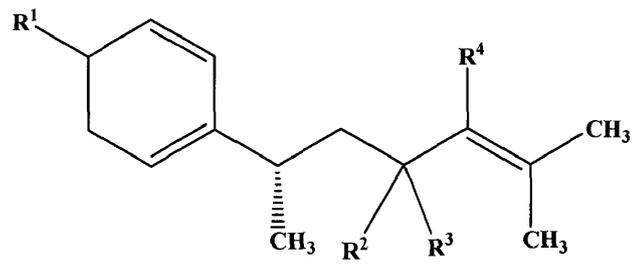
El documento US 2008193573 se refiere a extractos de material vegetal de especies de cúrcuma que utilizan métodos de extracción de CO₂ supercrítico, métodos de tratar a un sujeto que padece agregación de la placa de amiloide o la formación de fibrillas asociadas, por ejemplo, con la enfermedad de Alzheimer, y a métodos de inhibir la agregación de la placa de amiloide o la formación de fibrillas en tejido del mismo

10 COMPENDIO

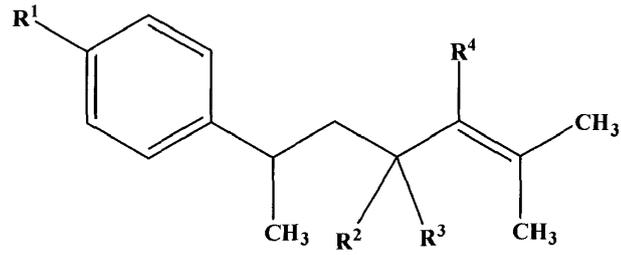
La presente invención proporciona, entre otros, compuestos y métodos para la preparación de los mismos, útiles para inhibir, tratar o reducir el deterioro cognitivo. En un método denominado "acondicionamiento químico", determinados compuestos de la presente invención se derivan de compuestos que se producen de forma natural
 15 descrito en esta memoria es aplicable a una gran diversidad de extractos biológicos y puede utilizarse para crear conjuntos de compuestos para el rastreo de posibles nuevos fármacos potenciales. Además, en general, los compuestos derivados por el proceso de acondicionamiento químico son químicamente estables y estructuralmente diversos, y son buenos candidatos para su uso en rastreos de fármacos para la actividad farmacéutica. En algunas realizaciones, se proporcionan compuestos derivados de aceite de cúrcuma. De acuerdo con algunas realizaciones
 20 de la invención, se proporcionan compuestos derivados de aceite de cúrcuma por el proceso de acondicionamiento químico descrito en esta memoria. En otra realización, la invención proporciona un método de preparar un conjunto de compuestos químicos de aceite de cúrcuma. En algunas otras realizaciones, los compuestos útiles para inhibir, tratar o reducir el deterioro cognitivo se preparan por síntesis química.

25 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona compuestos de Fórmula I-0, I, Ia-0, Ia, Ib-0, Ib, Ia-1-0, Ia-1, Ia-2-0, Ia-2, Ib-1-0, Ib-1, Ib-2-0 o Ib-2:

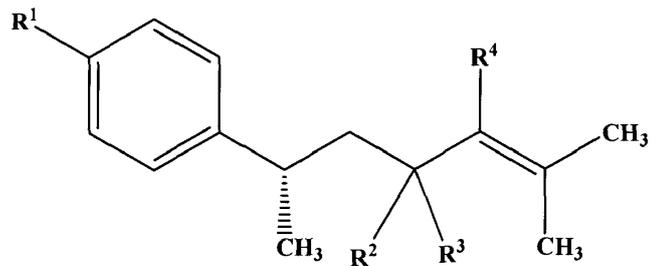




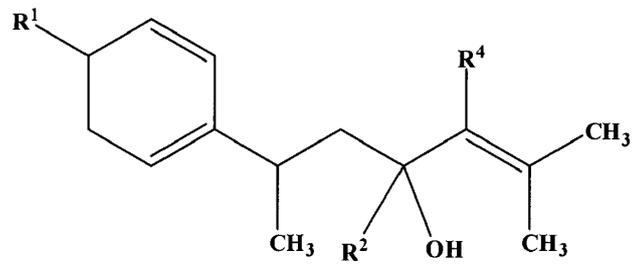
Ia



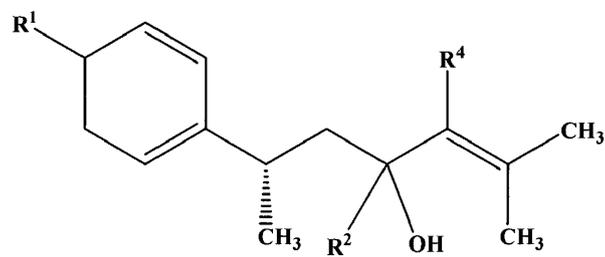
Ib-0



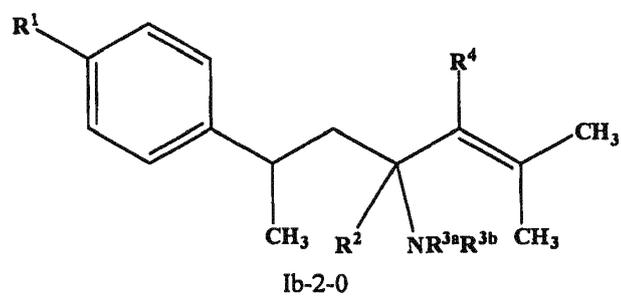
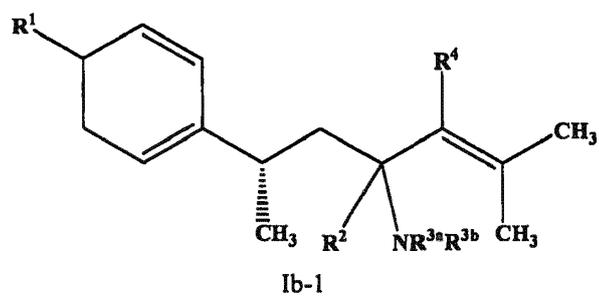
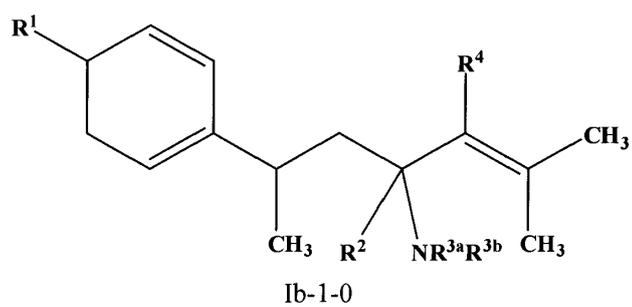
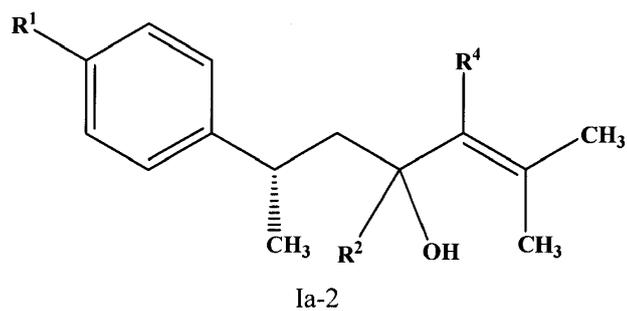
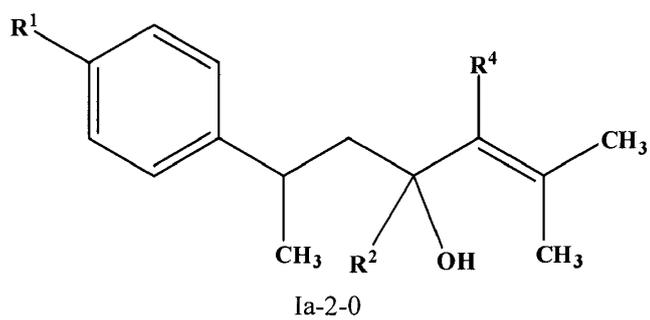
Ib

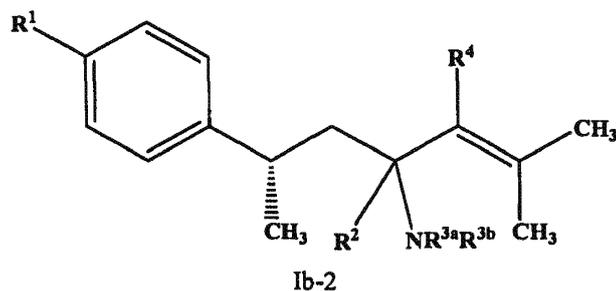


Ia-1-0



Ia-1





o sales farmacéuticamente aceptables, en donde los miembros constituyentes se proporcionan más adelante.

5 La presente invención proporciona, además, composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la presente invención (tal como un derivado de aceite de cúrcuma o un compuesto de Fórmula I-0, I, Ia-0, Ia, Ib-0, Ib, Ia-1-0, Ia-1, Ia-2-0, Ia-2, Ib-1-0, Ib-1, Ib-2-0 o Ib-2), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un soporte farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona, además, composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de Fórmula I-0, I, Ia-0, Ia, Ib-0, Ib, Ia-1-0, Ia-1, Ia-2-0, Ia-2, Ib-1-0, Ib-1, Ib-2-0 o Ib-2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un soporte farmacéuticamente aceptable.

La presente invención admite, además, métodos para inhibir, tratar y/o reducir el deterioro cognitivo y/o la enfermedad de Alzheimer con un compuesto de presente invención tal como un compuesto de fórmula I-0, I, Ia-0, Ia, Ib-0, Ib, Ia-1-0, Ia-1, Ia-2-0, Ia-2, Ib-1-0, Ib-1, Ib-2-0 o Ib-2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 La presente invención admite, además, métodos para inhibir, tratar o reducir el deterioro cognitivo con un compuesto de presente invención, tal como un compuesto de fórmula I-0, I, Ia-0, Ia, Ib-0, Ib, Ia-1-0, Ia-1, Ia-2-0, Ia-2, Ib-1-0, Ib-1, Ib-2-0 o Ib-2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente invención admite, además, métodos para inhibir, tratar o reducir uno o más de la producción de amiloide, el ensamblaje de amiloide, la agregación de amiloide, la unión a amiloide (a las células en el cerebro tales como células de las neuronas), la actividad/efecto de oligómeros de Abeta en las neuronas y la deposición de amiloide (en las células en el cerebro, tales como células de las neuronas) con un compuesto de presente invención tal como un compuesto de fórmula I-0, I, Ia-0, Ia, Ib-0, Ib, Ia-1-0, Ia-1, Ia-2-0, Ia-2, Ib-1-0, Ib-1, Ib-2-0 o Ib-2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente invención proporciona, además, compuestos de Fórmula I-0, I, Ia-0, Ia, Ib-0, Ib, Ia-1-0, Ia-1, Ia-2-0, Ia-2, Ib-1-0, Ib-1, Ib-2-0 o Ib-2, o sus sales farmacéuticamente aceptables, para uso en terapia.

25 La presente invención proporciona, además, el uso de los compuestos de Fórmula I-0, I, Ia-0, Ia, Ib-0, Ib, Ia-1-0, Ia-1, Ia-2-0, Ia-2, Ib-1-0, Ib-1, Ib-2-0 o Ib-2, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, para la fabricación/preparación de un medicamento para uso en terapia.

En algunas realizaciones, los compuestos de presente invención inhiben, tratan o reducen (parcialmente inhiben) la unión del amiloide (incluyendo oligómeros de Abeta) a las neuronas (tales como las neuronas en el cerebro) y son útiles para la inhibición, el tratamiento y la reducción del deterioro cognitivo y/o la enfermedad de Alzheimer. En algunas realizaciones, los compuestos de presente invención inhiben, tratan o reducen uno o más de la agregación de amiloide, la unión a amiloide y la deposición de amiloide. En algunas realizaciones, los compuestos de presente invención inhiben, tratan o disminuyen la agregación de amiloide. En algunas realizaciones, los compuestos de presente invención inhiben, tratan o reducen la unión a amiloide. En algunas realizaciones, los compuestos de presente invención inhiben, tratan o reducen la deposición de amiloide. En algunas realizaciones, los compuestos de presente invención inhiben, tratan o reducen la actividad/efecto de oligómeros de Abeta en las neuronas. En algunas realizaciones, los compuestos muestran actividad en un ensayo de beta-secretasa y son potencialmente útiles para la inhibición, el tratamiento y la reducción del deterioro cognitivo y la enfermedad de Alzheimer. En algunas realizaciones, el derivado de aceite de cúrcuma es un compuesto en forma purificada y aislada (por ejemplo, con una pureza mayor que 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% en peso). Los compuestos y métodos descritos en esta memoria pueden utilizarse para tratar uno o más síntomas de deterioro cognitivo y/o la enfermedad de Alzheimer tales como pérdida de memoria, confusión, deterioro del juicio, cambios de personalidad, desorientación y pérdida de habilidades lingüísticas. Además, los compuestos y métodos descritos en esta memoria pueden ser útiles para inhibir, tratar y/o reducir el deterioro cognitivo y/o la enfermedad de Alzheimer mediante la restauración de la potenciación a largo plazo, y/o para inhibir, tratar o reducir una o ambas de la neurodegeneración y amiloidosis

general, más específicamente, mediante la inhibición, el tratamiento o la reducción de uno o más de la producción de amiloide, el ensamblaje de amiloide, la agregación de amiloide, la unión de amiloide y la deposición de amiloide.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 La Figura 1 muestra los resultados de un ensayo de MTT en presencia y ausencia de un producto procesado de la proteína precursora amiloide.

La Figura 2 muestra la inhibición de producto procesado de efecto tráfico por la membrana mediado por la proteína precursora amiloide por CT0109.

La Figura 3 muestra CT0109 que inhibe los efectos de pérdida de la memoria de un producto procesado de la proteína precursora amiloide.

10 DESCRIPCIÓN DETALLADA

El deterioro cognitivo tal como pérdida de memoria, confusión, alteraciones del juicio, cambios de personalidad, desorientación y pérdida de habilidades de lenguaje se produce, en grado variable, en gran parte de la población a medida que envejece. La forma más común, grave e irreversible de deterioro cognitivo es la enfermedad de Alzheimer que, en la actualidad, es siempre fatal.

15 Se piensa que los síntomas de deterioro cognitivo y la enfermedad de Alzheimer se derivan de la formación de placas amiloides y ovillos neurofibrilares, que se piensa que contribuyen en la degradación de las neuronas (células nerviosas) en el cerebro y la subsiguiente aparición de los síntomas. Amiloide es un término general para fragmentos de proteínas que el cuerpo produce normalmente. Beta-amiloide es un fragmento de una proteína que se cortó de otra proteína denominada proteína precursora de amiloide (APP). En un cerebro sano, fragmentos de la
20 proteína beta-amiloide se descomponen y eliminan. En individuos con la enfermedad de Alzheimer y otras formas de deterioro cognitivo, los fragmentos se acumulan para formar placas duras e insolubles. Los ovillos neurofibrilares son fibras retorcidas insolubles que se encuentran dentro de las células del cerebro. La proteína contenida en los ovillos neurofibrilares, es decir, la proteína tau, forma un microtúbulo, el cual ayuda a transportar los nutrientes y otras sustancias importantes de una parte de la célula nerviosa a otra. En la enfermedad de Alzheimer la proteína tau es
25 anormal y las estructuras de los microtúbulos se colapsan.

Beta-secretasa es la enzima en el cerebro humano responsable de la producción de beta-amiloide, la sustancia patógena responsable de la formación de placas y ovillos cerebrales en el cerebro enfermo de Alzheimer. También se piensa que beta-amiloide y sus oligómeros (oligómeros de beta-amiloide u oligómeros de Abeta) son los responsables de un deterioro cognitivo temprano en el cerebro enfermo de pre-Alzheimer. Se espera que la
30 inhibición de la beta-secretasa para disminuir la carga de beta-amiloide en el cerebro y, por lo tanto, ralentizar el deterioro cognitivo, bloquee la formación de oligómeros de amiloide, la producción de placas y ovillos, detenga la neurodegeneración y potencialmente trate el deterioro cognitivo leve y formas más graves de deterioro cognitivo tal como la enfermedad de Alzheimer.

Millones de personas en todo el mundo se ven afectadas por el deterioro cognitivo y la enfermedad de Alzheimer. Por consiguiente, existe una fuerte necesidad de descubrir inhibidores del deterioro cognitivo y, en particular, compuestos que sean útiles en el tratamiento y la reducción del deterioro cognitivo y la enfermedad de Alzheimer, por métodos tales como la inhibición de la producción de amiloide (incluyendo oligómeros de Abeta), la agregación de amiloide (incluyendo oligómeros de Abeta) y/o la deposición de amiloide (incluyendo oligómeros de Abeta) (es decir, formación de placas), inhibiendo la neurodegeneración y/o la restauración de la potenciación a largo plazo
40 y/o inhibiendo la actividad/efecto de oligómeros de Abeta en las neuronas. También existe una necesidad de inhibidores del deterioro cognitivo que sean química y biológicamente estables.

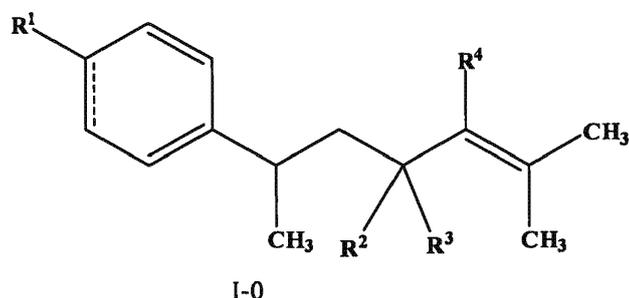
Las plantas han atraído relativamente poca atención como recursos potencialmente valiosos para el descubrimiento de fármacos en el sector del deterioro cognitivo y la enfermedad de Alzheimer. El uso de extractos vegetales para producir derivados no naturales de compuestos de interés medicamentoso no se utiliza generalmente. Por
45 consiguiente, existe también una necesidad de un método para producir compuestos de interés medicinal a partir de extractos vegetales y extractos de otras fuentes biológicas. En particular, también existe la necesidad de producir e identificar compuestos derivados de extractos vegetales que sean útiles en el tratamiento y la reducción del deterioro cognitivo y la enfermedad de Alzheimer.

50 Turmérico- una hierba de gran prestigio en el sistema indio de la medicina Ayurveda - es el rizoma de *Curcuma longa* L. Syn. *Curcuma domestica* Valetton (Fam. Zingiberaceae), que crece en abundancia en la India. Durante mucho tiempo se ha utilizado como una especia y un agente colorante en los alimentos. Su polvo o extractos se

recomiendan para el tratamiento de heridas y la inflamación. Se reseña que extractos solubles de lípidos de rizomas y hojas de *Curcuma* especie de la familia Zingiberaceae son útiles para el tratamiento de trastornos neurocerebrovasculares. Véase el documento WO 2003051380. El aceite de cúrcuma puede ser extraído de la cúrcuma (*Curcuma longa*) con dióxido de carbono supercrítico. Véase, p. ej., B. Gopalan, et. al., "Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Turmeric (*Curcuma longa*)", *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48 (6), págs. 2189-2192; véase también L-H Chang, et. al., "Supercritical carbon dioxide extraction of turmeric oil from *Curcuma longa* Linn and purification of turmerones", *Separation and Purification Technolgy* Volumen 47, N° 3, enero de 2006, páginas 119-125. La presente invención, en parte, se refiere a la producción y a la identificación de compuestos derivados del aceite de cúrcuma (es decir, derivados de aceite de cúrcuma) que son útiles en el tratamiento y la reducción del deterioro cognitivo y la enfermedad de Alzheimer. La presente invención, también en parte, se refiere a la síntesis química de compuestos que son útiles en el tratamiento y la reducción del deterioro cognitivo y la enfermedad de Alzheimer.

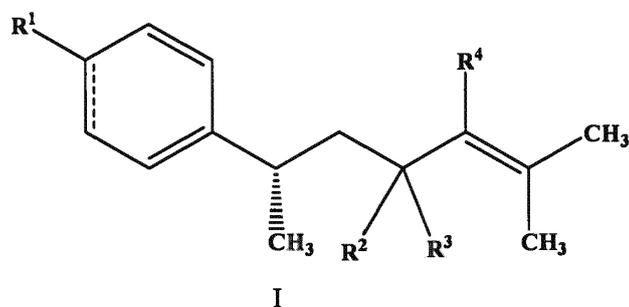
Los compuestos, composiciones y métodos descritos en esta memoria están dirigidos a estas necesidades y otros extremos.

Realizaciones de la presente invención proporcionan, entre otros, un compuesto de Fórmula de I-0:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según se define en la reivindicación 1.

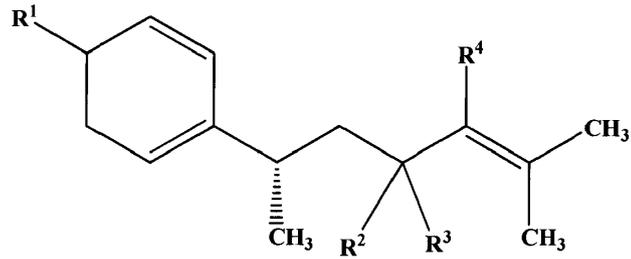
En algunas realizaciones, el compuesto de la presente invención es un compuesto de Fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R¹, R², R³ y R⁴ son como se definen en la reivindicación 1.

Otras realizaciones se definen en las reivindicaciones dependientes.

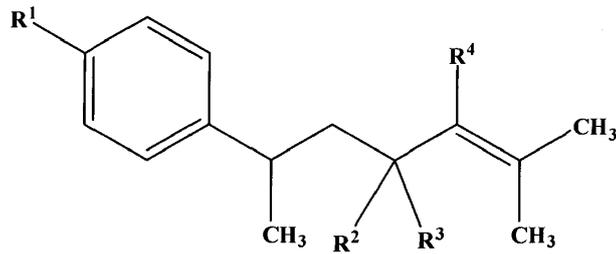
En algunas realizaciones, el compuesto de la presente invención es un compuesto de Fórmula Ia:



Ia

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, el compuesto de la presente invención es un compuesto de Fórmula Ib-0:

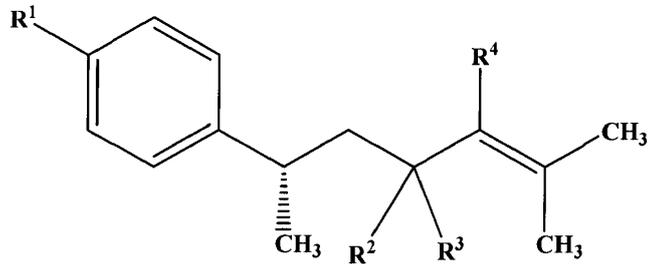


Ib-0

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5

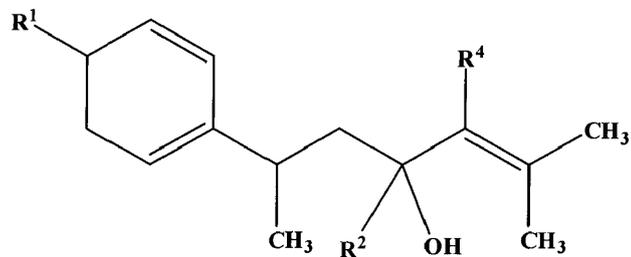
En algunas realizaciones, el compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es un compuesto de Fórmula Ib:



Ib

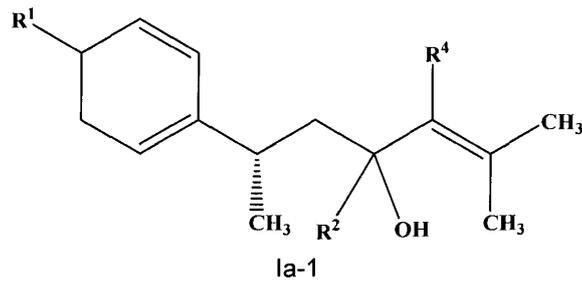
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 En algunas realizaciones, el compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es un compuesto de Fórmula Ia-1-0:



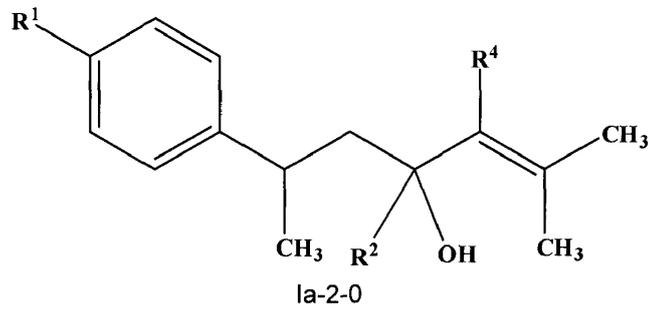
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 En algunas realizaciones, el compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es un compuesto de Fórmula Ia-1:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

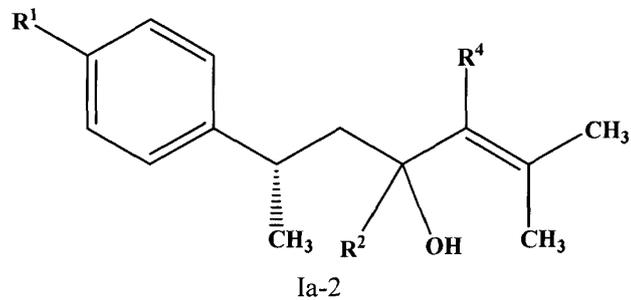
Se describe un compuesto de fórmula Ia-2-0:



5

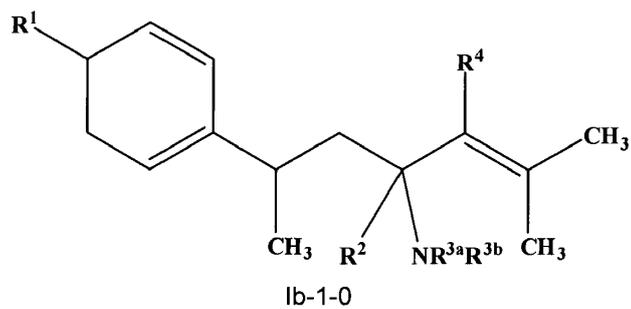
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

También se describe un compuesto de fórmula Ia-2:



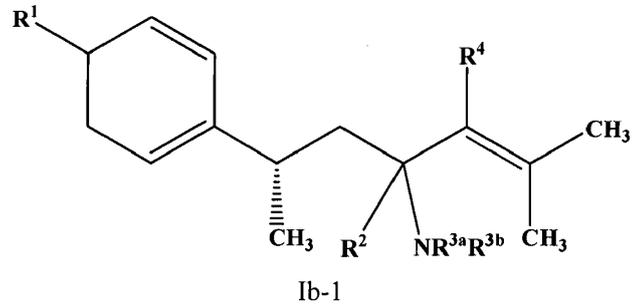
10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, el compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es un compuesto de Fórmula Ib-1-0:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

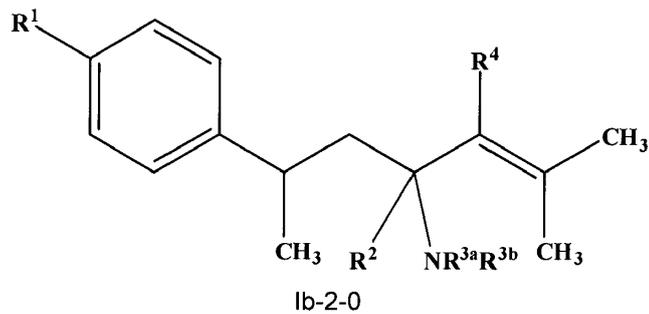
En algunas realizaciones, el compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es un compuesto de Fórmula Ib-1:



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

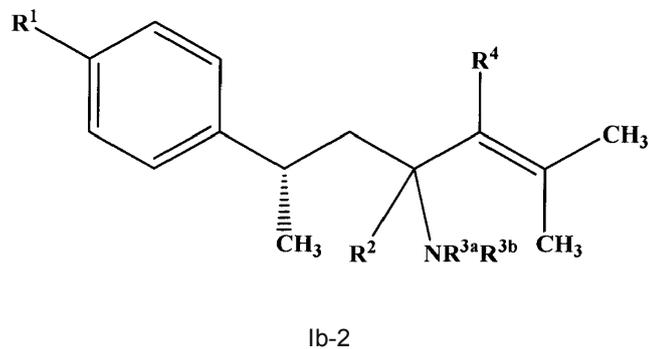
En algunas realizaciones, el compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es un compuesto de Fórmula Ib-2-0:



10

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, el compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es un compuesto de Fórmula Ib-2:



15

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, R¹ es H, CH₃ o CF₃. En realizaciones adicionales, R¹ es CH₃ o CF₃. Aún en realizaciones adicionales, R¹ es CH₃.

20 En algunas realizaciones, R¹ es H o CH₃.

ES 2 547 730 T3

En algunas realizaciones, R¹ es F, Cl o Br. En otras realizaciones, R¹ es OCF₃.

En algunas realizaciones, R² es H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇ o arilo C₆₋₁₀. En algunas realizaciones adicionales, R² es H, alquilo C₁₋₆ o cicloalquilo C₃₋₇.

5 En algunas realizaciones, R² es H o alquilo C₁₋₆. En algunas realizaciones adicionales, R² es H o metilo. Aún en realizaciones adicionales, R² es H.

En algunas realizaciones, R¹ es H, CH₃ o CF₃; y R² es H o alquilo C₁₋₆. En algunas realizaciones adicionales, R¹ es CH₃ o CF₃; y R² es H. Aún en realizaciones adicionales, R¹ es CH₃; y R² es H.

10 En algunas realizaciones, R^{3a} es H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilalquilo, cicloalquilo C₃₋₇, arilalquilo o arilo C₆₋₁₀, en donde cada uno de los alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilalquilo, cicloalquilo C₃₋₇, arilalquilo o arilo C₆₋₁₀ está sustituido con 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituyentes seleccionados cada uno independientemente de halo, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ y haloalcoxi C₁₋₆. En algunas realizaciones, R^{3a} es H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilalquilo, cicloalquilo C₃₋₇, arilalquilo o arilo C₆₋₁₀.

15 En algunas realizaciones, R^{3b} es H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilalquilo, cicloalquilo C₃₋₇, arilalquilo o arilo C₆₋₁₀, en donde cada uno de los alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilalquilo, cicloalquilo C₃₋₇, arilalquilo o arilo C₆₋₁₀ está sustituido con 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituyentes seleccionados cada uno independientemente de halo, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ y haloalcoxi C₁₋₆. En algunas realizaciones adicionales, R^{3b} es H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilalquilo, cicloalquilo C₃₋₇, arilalquilo o arilo C₆₋₁₀.

20 En algunas realizaciones, R^{3a} es H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇ o arilo C₆₋₁₀, en donde cada uno de los alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇ o arilo C₆₋₁₀ está sustituido con 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituyentes seleccionados cada uno independientemente de OH, amino, halo, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ y haloalcoxi C₁₋₆.

25 En algunas realizaciones, R^{3b} es H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇ o arilo C₆₋₁₀, en donde cada uno de los alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇ o arilo C₆₋₁₀ está sustituido con 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituyentes seleccionados cada uno independientemente de OH, amino, halo, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ y haloalcoxi C₁₋₆.

30 En algunas realizaciones, R^{3a} es H; y R^{3b} es H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilalquilo, cicloalquilo C₃₋₇, arilalquilo o arilo C₆₋₁₀, en donde cada uno de los alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilalquilo, cicloalquilo C₃₋₇, arilalquilo o arilo C₆₋₁₀ está sustituido con 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituyentes seleccionados cada uno independientemente de OH, amino, halo, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ y haloalcoxi C₁₋₆. En algunas realizaciones adicionales, R^{3a} es H; y R^{3b} es H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilalquilo, cicloalquilo C₃₋₇, arilalquilo o arilo C₆₋₁₀, en donde cada uno de los alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilalquilo, cicloalquilo C₃₋₇, arilalquilo o arilo C₆₋₁₀ está sustituido con 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituyentes seleccionados cada uno independientemente de halo, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ y haloalcoxi C₁₋₆.

35 En algunas realizaciones, R^{3a} es H; y R^{3b} es H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilalquilo, cicloalquilo C₃₋₇, arilalquilo o arilo C₆₋₁₀.

En algunas realizaciones, R^{3a} es H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇ o arilo C₆₋₁₀; y R^{3b} es H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇ o arilo C₆₋₁₀.

En algunas realizaciones, R^{3a} es H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇ o arilo C₆₋₁₀; y R^{3b} es H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇ o arilo C₆₋₁₀.

40 En algunas realizaciones, R^{3a} es H; y R^{3b} es H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆ o cicloalquilo C₃₋₇.

En algunas realizaciones, R^{3a} es H; y R^{3b} es alquilo C₁₋₆ o haloalquilo C₁₋₆.

En algunas realizaciones, R^{3a} es H; y R^{3b} es alquilo C₁₋₆.

45 En algunas realizaciones, R^{3a} y R^{3b}, junto con el átomo de N al que están fijados forman pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo o morfolinilo, cada uno sustituido con 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituyentes seleccionados cada uno independientemente de OH, amino, halo, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, haloalcoxi C₁₋₆, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, cicloalquilo y heterocicloalquilo.

En algunas realizaciones, R^{3a} y R^{3b}, junto con el átomo de N al que están fijados forman pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo o morfolinilo, cada uno sustituido con 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituyentes seleccionados cada uno independientemente de OH, amino, halo, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, haloalcoxi C₁₋₆, fenilo y bencilo.

5 En algunas realizaciones, R⁴ es H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇ o arilo C₆₋₁₀. En algunas realizaciones adicionales, R⁴ es H, alquilo C₁₋₆ o cicloalquilo C₃₋₇.

En algunas realizaciones, R⁴ es H o alquilo C₁₋₆. En algunas realizaciones adicionales, R⁴ es H o metilo. Aún en realizaciones adicionales, R⁴ es H.

En algunas realizaciones,

En algunas realizaciones, R² es H o alquilo C₁₋₆, y R⁴ es H o alquilo C₁₋₆.

10 En algunas realizaciones, R² es H o metilo, y R⁴ es H o metilo.

En algunas realizaciones, R¹ es H, CH₃ o CF₃; R² es H o alquilo C₁₋₆, y R⁴ es H o alquilo C₁₋₆. En algunas realizaciones adicionales, R¹ es CH₃ o CF₃; R² es H; y R⁴ es H. En aún realizaciones adicionales, R¹ es CH₃; R² es H; y R⁴ es H.

15 En varios lugares de la presente memoria descriptiva, los sustituyentes de compuestos de la invención se describen en grupos o en intervalos. Se pretende específicamente que realizaciones de la invención incluyan todas y cada una de las subcombinaciones individuales de los miembros de estos grupos e intervalos. Por ejemplo, el término "alquilo C₁₋₆" pretende específicamente describir individualmente metilo (alquilo C₁), etilo (alquilo C₂), alquilo C₃, alquilo C₄, alquilo C₅ y alquilo C₆.

20 Para compuestos de la invención en los que una variable aparece más de una vez, cada una de las variables puede ser un resto diferente seleccionado del grupo de Markush que define la variable. Por ejemplo, en los casos en los que se describe que una estructura tiene dos grupos R que están presentes simultáneamente en el mismo compuesto, entonces los dos grupos R pueden representar diferentes restos seleccionados del grupo de Markush definido para R.

25 Se aprecia, además, que determinadas características de la invención que, por fines de claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también se pueden proporcionar en una sola combinación. A la inversa, diversas características de la invención que, por brevedad, se describen en el contexto de una sola realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier sub-combinación adecuada.

30 La expresión "n miembros", en donde n es un número entero típicamente describe el número de átomos formadores de anillo en un resto en que el número de átomos formadores de anillo es n. Por ejemplo, piridina es un ejemplo de un anillo heteroarilo de 6 miembros y tiofeno es un ejemplo de un grupo heteroarilo de 5 miembros.

35 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "alquilo" pretende referirse a un grupo hidrocarbonado saturado que es de cadena lineal o ramificada. Ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero no se limitan a metilo (Me), etilo (Et), propilo (p. ej., n-propilo e isopropilo), butilo (p. ej., n-butilo, isobutilo, t-butilo), pentilo (p. ej., n-pentilo, isopentilo), y similares. Un grupo alquilo puede contener de 1 a aproximadamente 20, de 2 a aproximadamente 20, de 1 a aproximadamente 10, de 1 a aproximadamente 8, de 1 a aproximadamente 6, de 1 a aproximadamente 4 o de 1 a aproximadamente 3 átomos de carbono.

Tal como se utiliza en esta memoria, "haloalquilo" se refiere a un grupo alquilo que tiene uno o más sustituyentes halógeno. Ejemplos de grupos haloalquilo incluyen, pero no se limitan a CF₃, C₂F₅, CHF₂, CCl₃, CHCl₂, C₂Cl₅, CH₂CF₃ y similares.

40 Tal como se utiliza en esta memoria, "arilo" se refiere a hidrocarburos aromáticos monocíclicos o policíclicos (p. ej., que tienen 2, 3 ó 4 anillos condensados) tales como, por ejemplo, fenilo, naftilo, antraceno, fenantreno, indanilo, indenilo y similares. En algunas realizaciones, los grupos arilo tienen de 6 a aproximadamente 20 átomos de carbono. En algunas realizaciones, los grupos arilo tienen de 6 a aproximadamente 10 átomos de carbono.

45 Tal como se utiliza en esta memoria, "cicloalquilo" se refiere a hidrocarburos cíclicos no aromáticos que incluyen grupos alquilo, alqueno y alquino ciclados que contienen hasta 20 átomos de carbono que forman el anillo. Los grupos cicloalquilo pueden incluir sistemas de anillos monocíclicos o policíclicos (p. ej., que tienen 2, 3 ó 4 anillos condensados), así como sistemas de anillo espiro. Un grupo cicloalquilo puede contener de 3 a aproximadamente

15, de 3 a aproximadamente 10, de 3 a aproximadamente 8, de 3 a aproximadamente 6, de 4 a aproximadamente 6, de 3 a aproximadamente 5 o de 5 a aproximadamente 6 átomos de carbono que forman el anillo. Átomos de carbono que forman el anillo de un grupo cicloalquilo pueden estar opcionalmente sustituidos con oxo o sulfido. Ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, ciclohexadienilo, cicloheptatrienilo, norbornilo, norpinilo, norcarnilo, adamantilo, y similares. También se incluyen en la definición de cicloalquilo restos que tienen uno o más anillos aromáticos condensados (es decir, que tienen un enlace en común con el) al anillo cicloalquilo, por ejemplo derivados benzo o tienilo de pentano, penteno, hexano, y similares (p. ej., 2,3-dihidro-1H-indeno-1-ilo o 1H-inden-2(3H)-ona-1-ilo). Preferiblemente, "cicloalquilo" se refiere a grupos alquilo ciclados que contienen hasta 20 átomos de carbono que forman el anillo. Ejemplos de cicloalquilo incluyen preferiblemente ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, adamantilo y similares.

Tal como se utiliza en esta memoria, grupos "heteroarilo" se refieren a un heterociclo aromático que tiene hasta 20 átomos que forman el anillo y que tiene al menos un miembro del anillo heteroátomo (átomo que forma el anillo) tales como azufre, oxígeno o nitrógeno. En algunas realizaciones, el grupo heteroarilo tiene al menos uno o más átomos que forman el anillo heteroátomos, cada uno seleccionado independientemente entre azufre, oxígeno y nitrógeno. Grupos heteroarilo incluyen sistemas monocíclicos y policíclicos (p. ej., que tienen 2, 3 ó 4 anillos condensados). Ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, sin limitación, piridilo, pirimidinilo, pirazinilo, piridazinilo, triazinilo, furilo, quinolilo, isoquinolilo, tienilo, imidazolilo, tiazolilo, indolilo, pirrilo, oxazolilo, benzofurilo, benzotienilo, benzotiazolilo, isoxazolilo, pirazolilo, triazolilo, tetrazolilo, indazolilo, 1,2,4-tiadiazolilo, isotiazolilo, benzotienilo, purinilo, carbazolilo, bencimidazolilo, indolinilo y similares. En algunas realizaciones, el grupo heteroarilo tiene de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, y en realizaciones adicionales de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, de aproximadamente 1 a aproximadamente 4, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 átomos de carbono como átomos que forman el anillo. En algunas realizaciones, el grupo heteroarilo contiene 3 a aproximadamente 14, 3 a aproximadamente 7, o 5 a 6 átomos que forman el anillo. En algunas realizaciones, el grupo heteroarilo tiene 1 a aproximadamente 4, 1 a aproximadamente 3, o 1 a 2 heteroátomos.

Tal como se utiliza en esta memoria, "heterocicloalquilo" se refiere a heterociclos no aromáticos que tienen hasta 20 átomos que forman el anillo, incluyendo grupos alquilo, alquenilo y alquinilo ciclados, en donde uno o más de los átomos de carbono que forman el anillo se reemplaza por un heteroátomo tal como un átomo de O, N o S. Grupos heterocicloalquilo pueden ser monocíclicos o policíclicos (p. ej., sistemas tanto condensados como espiro). Ejemplos de grupos "heterocicloalquilo" incluyen morfolino, tiomorfolino, piperazinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotienilo, 2,3-dihidrobenzofurilo, 1,3-benzodioxol, benzo-1,4-dioxano, piperidinilo, pirrolidinilo, isoxazolidinilo, isotiazolidinilo, pirazolidinilo, oxazolidinilo, tiazolidinilo, imidazolidinilo, pirrolidin-2-ona-3-ilo y similares. Átomos de carbono que forman el anillo y heteroátomos de un grupo heterocicloalquilo pueden estar opcionalmente sustituidos con oxo o sulfido. Por ejemplo, un átomo de S que forma el anillo puede estar sustituido con 1 ó 2 oxo [es decir, forman un S(O) o S(O)₂]. Para otro ejemplo, un átomo de C que forma el anillo puede estar sustituido con oxo (es decir, forma carbonilo). También se incluyen en la definición de heterocicloalquilo restos que tienen uno o más anillos aromáticos condensados (es decir, que tiene un enlace en común con el) al anillo heterocíclico no aromático, por ejemplo piridinilo, tiofenilo, ftalimidilo, naftalimidilo y derivados benzo de heterociclos tales como indoleno, isoindoleno, isoindolin-1-ona-3-ilo, 4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-c]piridina-5-ilo, 5,6-dihidrotieno[2,3-c]piridin-7(4H)-ona-5-ilo y 3,4-dihidroisoquinolin-1(2H)-ona-3-ilo. Átomos de carbono que forman el anillo y heteroátomos del grupo heterocicloalquilo pueden estar opcionalmente sustituidos con oxo o sulfido. En algunas realizaciones, el grupo heterocicloalquilo tiene de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, y en realizaciones adicionales, de aproximadamente 3 a aproximadamente 20 átomos de carbono. En algunas realizaciones, el grupo heterocicloalquilo contiene 3 a aproximadamente 14, 3 a aproximadamente 7, o 5 a 6 átomos que forman el anillo. En algunas realizaciones, el grupo heterocicloalquilo tiene 1 a aproximadamente 4, 1 a aproximadamente 3, o 1 a 2 heteroátomos. En algunas realizaciones, el grupo heterocicloalquilo contiene 0 a 3 dobles enlaces. En algunas realizaciones, el grupo heterocicloalquilo contiene 0 a 2 triples enlaces.

Tal como se utiliza en esta memoria, "halo" o "halógeno" incluye flúor, cloro, bromo y yodo.

Tal como se utiliza en esta memoria, "alcoxi" se refiere a un grupo -O-alquilo. Ejemplos de grupos alcoxi incluyen metoxi, etoxi, propoxi (p. ej., n-propoxi e isopropoxi), t-butoxi, y similares.

Tal como se utiliza en esta memoria, "haloalcoxi" se refiere a un grupo -O-haloalquilo. Un ejemplo de grupo haloalcoxi es OCF₃. Tal como se utiliza en esta memoria, "trihalometoxi" se refiere a un grupo metoxi que tiene tres sustituyentes halógeno. Ejemplos de grupos trihalometoxi incluyen, pero no se limitan a -OCF₃, -OCClF₂, -OCCl₃ y similares.

Tal como se utiliza en esta memoria, "arilalquilo" se refiere a un alquilo C₁₋₆ sustituido con arilo. Un ejemplo de grupos arilalquilo incluyen, pero no se limitan a alquilo C₁₋₆ sustituido con arilo C₆₋₁₀ (p. ej., bencilo).

Tal como se utiliza en esta memoria, "cicloalquilalquilo" se refiere a alquilo C₁₋₆ sustituido con cicloalquilo. Un ejemplo de grupos cicloalquilo incluye, pero no se limita a alquilo C₁₋₆ sustituido con cicloalquilo C₃₋₁₀ o cicloalquilo C₃₋₇ (p. ej., ciclopropilmetilo).

Tal como se utiliza en esta memoria, "amino" se refiere a NH₂.

- 5 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "opcionalmente sustituido" significa que la sustitución es opcional y, por lo tanto, incluye tanto los átomos y restos sustituidos como no sustituidos. Un átomo o resto "sustituido" indica que cualquier hidrógeno en el átomo o resto designado puede ser reemplazado por una selección del grupo sustituyente indicado, siempre que no se exceda la valencia normal del átomo o resto designado, y que la sustitución resulte en un compuesto estable. Por ejemplo, si un grupo metilo (es decir, CH₃) está opcionalmente sustituido, entonces 3 átomos de hidrógeno en el átomo de carbono pueden estar reemplazados por grupos sustituyentes.

- 10 Los compuestos descritos en las realizaciones en esta memoria pueden ser asimétricos (p. ej., que tienen uno o más estereocentros). Se pretenden todos los estereoisómeros, tales como enantiómeros y diastereómeros, a menos que se indique lo contrario. Compuestos de la presente invención que contienen átomos de carbono sustituidos asimétricamente pueden aislarse en formas ópticamente activas o racémicas. Métodos sobre cómo preparar formas ópticamente activas a partir de materiales de partida ópticamente activos son conocidos en la técnica tal como por resolución de mezclas racémicas o por síntesis estereoselectiva. Muchos isómeros geométricos de olefinas, dobles enlaces C=N y similares también pueden estar presentes en los compuestos descritos en esta memoria, y todos estos isómeros estables se contemplan en la presente invención. Se describen isómeros geométricos *cis* y *trans* de los compuestos de la presente invención y pueden aislarse como una mezcla de isómeros o como formas isoméricas separadas. En los casos en los que un compuesto capaz de estereoisomería o isomería geométrica se designa en su estructura o nombre sin referencia a configuraciones R/S o *cis/trans* específicas, se pretende que se contemplen todos estos isómeros.

- 15 La resolución de mezclas racémicas (o mezclas de diastereoisómeros) de compuestos puede realizarse por cualquiera de numerosos métodos conocidos en la técnica. Un ejemplo de método incluye la recristalización fraccionada utilizando un ácido de resolución quiral, que es un ácido ópticamente activo, formador de sales orgánicas. Agentes de resolución adecuados para los métodos de recristalización fraccionada son, por ejemplo, ácidos ópticamente activos tales como las formas D y L de ácido tartárico, ácido diacetiltartárico, ácido dibenzoiltartárico, ácido mandélico, ácido málico, ácido láctico o los diversos ácidos canfosulfónicos ópticamente activos tales como ácido α -canfosulfónico. Otros agentes de resolución adecuados para los métodos de cristalización fraccionada incluyen formas estereoisoméricamente puras de α -metilbencilamina (p. ej., formas S y R, o formas diastereoméricamente puras), 2-fenilglicinol, norefedrina, efedrina, N-metilefedrina, ciclohexiletilamina, 1,2-diaminociclohexano, y similares.

- 20 La resolución de mezclas racémicas (o mezclas de diastereoisómeros) también puede llevarse a cabo mediante elución en una columna empaquetada con un agente de resolución ópticamente activo (p. ej., dinitrobenzoilfenilglicina). Una composición de disolvente de elución adecuada puede ser determinada por un experto en la técnica.

- 25 Compuestos de realizaciones de la invención también incluyen formas tautoméricas. Las formas tautoméricas resultan de la permutación de un enlace sencillo por un doble enlace adyacente junto con la migración concomitante de un protón. Formas tautoméricas incluyen tautómeros prototrópicos, que son estados de protonación isoméricos que tienen la misma fórmula empírica y carga total. Ejemplos de tautómeros prototrópicos incluyen pares de cetona-enol, pares de amida-ácido imídico, pares de lactama-lactima, pares de amida-ácido imídico, pares de enamina-imina, y formas anulares, en donde un protón puede ocupar dos o más posiciones de un sistema heterocíclico, por ejemplo, 1H- y 3H-imidazol, 1H-, 2H- y 4H-1,2,4-triazol, 1H- y 2H-isoindol y 1H- y 2H-pirazol. Las formas tautoméricas pueden estar en equilibrio o pueden estar estéricamente bloqueadas en una forma mediante sustitución apropiada.

Compuestos de realizaciones de la invención incluyen, además, hidratos y solvatos, así como formas anhidras y no solvatadas.

El término "compuesto", tal como se utiliza en esta memoria, quiere dar a entender que incluye todos los estereoisómeros, isómeros geométricos, tautómeros e isótopos de las estructuras representadas.

- 50 Todos los compuestos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos se pueden preparar o presentar junto con otras sustancias tales como agua y disolventes (p. ej., hidratos y solvatos) o se pueden aislar.

Compuestos de realizaciones de la invención también pueden incluir todos los isótopos de átomos que aparecen en los compuestos intermedios o compuestos finales. Isótopos incluyen los átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números de masa. Por ejemplo, los isótopos de hidrógeno incluyen tritio y deuterio.

5 En algunas realizaciones, los compuestos de la invención, o sales de los mismos, están sustancialmente aislados. Por "sustancialmente aislado" se quiere dar a entender que el compuesto está separado al menos parcial o sustancialmente del entorno en el que se forma o se detecta. La separación parcial puede incluir, por ejemplo, una composición enriquecida en el compuesto de la invención. Una separación sustancial puede incluir composiciones que contienen al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 97% o al menos aproximadamente 99% en peso del compuesto de la invención, o una sal del mismo. Métodos para aislar los compuestos y sus sales son de rutina en la técnica.

15 Compuestos de realizaciones de la invención pretenden incluir compuestos con estructuras estables. Tal como se utiliza en esta memoria, "compuesto estable" y "estructura estable" pretenden dar a entender un compuesto que es lo suficientemente robusto como para sobrevivir al aislamiento hasta un grado útil de pureza de una mezcla de reacción, y la formulación en un agente terapéutico eficaz.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en esta memoria para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del criterio médico, adecuados para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin una excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

20 Las expresiones "temperatura ambiente" y "temperatura del recinto" tal como se utilizan en esta memoria, se entiende en la técnica, y se refieren generalmente a una temperatura, p. ej., una temperatura de reacción, que es aproximadamente la temperatura del recinto en el que se lleva a cabo la reacción, por ejemplo una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 30°C.

25 Realizaciones de la presente invención también incluyen sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en esta memoria. Tal como se utiliza en esta memoria, "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos descritos, en donde el compuesto parental se modifica mediante la conversión de un resto ácido o base existente o en su forma de sal. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a sales de ácidos minerales u orgánicas de residuos de carácter básico tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos de carácter ácido tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención incluyen las sales no tóxicas convencionales del compuesto parental formado, por ejemplo, de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden sintetizarse a partir del compuesto parental que contiene un resto de carácter básico o ácido mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, sales de este tipo se pueden preparar haciendo reaccionar las formas ácido o base libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos; generalmente, se prefieren medios no acuosos tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo (ACN). Listas de sales adecuadas se encuentran en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, pág 1418 y *Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 2 (1977).

ACONDICIONAMIENTO QUÍMICO

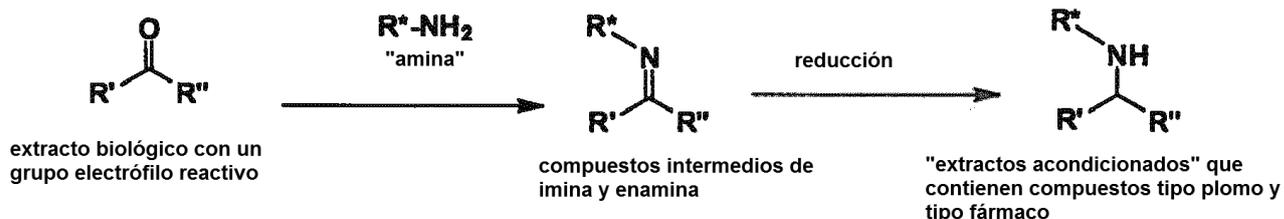
40 En algunas formas de realización, se proporciona un método de preparación de un conjunto de compuestos químicos de un extracto biológico, tales como aceite de cúrcuma.

45 El método de la invención, denominado "acondicionamiento químico" es aplicable en general a todos los extractos biológicos, en particular, extractos de plantas naturales, comunes o medicinales. Véanse, p. ej., los documentos US20080193574 y WO2008042755. El acondicionamiento químico es un método que produce nuevos compuestos similares a fármacos no naturales a partir de materiales naturales fácilmente disponibles. En general, el "acondicionamiento químico" de extractos naturales junto con el pre-fraccionamiento de los extractos químicamente acondicionados facilita el rastreo bioquímico con éxito de los extractos mediante la destrucción de compuestos naturales reactivos que generan resultados falsos positivos en ensayos bioquímicos. El acondicionamiento químico produce nuevos compuestos de tipo plomo y de tipo fármaco, y el protocolo de la aminación reductora y de reducción descrito aquí puede producir estructuralmente diversos productos que contienen nitrógeno y productos alcohólicos que son particularmente de tipo plomo y de tipo fármaco.

50 En determinadas realizaciones de la presente invención, un método de preparar compuestos químicos a partir de un extracto biológico se ejemplifica en el Esquema 1 que figura más adelante. De acuerdo con el método, primero se

5 proporciona un extracto biológico, p. ej., un extracto vegetal, el extracto biológico tiene uno o más compuestos biológicos, teniendo cada uno de los compuestos biológicos uno o más grupos electrófilos reactivos. A continuación, los compuestos biológicos en el extracto biológico se hacen reaccionar con una amina para incorporar la amina en los compuestos biológicos. A continuación, los compuestos biológicos con la amina incorporada se hacen reaccionar con un agente reductor para reducir los compuestos de imina y enamina intermedios y formar uno o más compuestos químicos nitrogenados. Por lo tanto, los compuestos químicos nitrogenados resultantes son derivados de los compuestos biológicos en el extracto biológico.

ESQUEMA 1

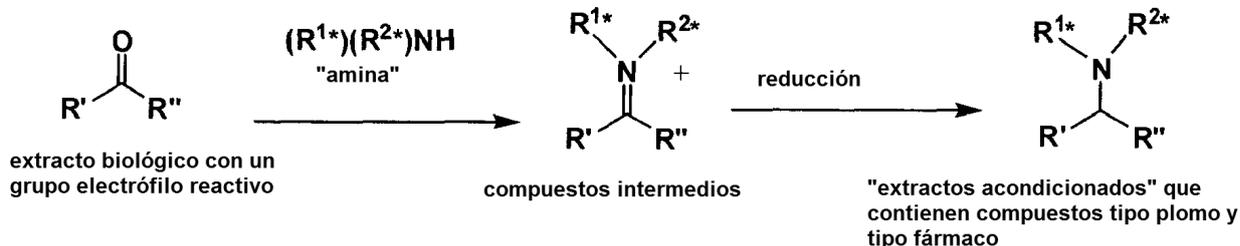


R' y R'' representan una diversidad de sustituyentes que constituyen un compuesto biológico; y

10 R^* representa una diversidad de sustituyente(s) que, junto con el nitrógeno, constituyen un compuesto de amina.

De manera similar, en otras determinadas realizaciones de la presente invención, un método de preparación de compuestos químicos a partir de un extracto biológico se ejemplifica en el Esquema 1a que figura más adelante. Una amina secundaria (en donde cada uno de R^{1*} y R^{2*} puede ser alquilo o similares; o R^{1*} y R^{2*} , junto con el átomo de N al que están unidos, forman una amina cíclica tal como pirrolidina) se utiliza en los extractos acondicionados.

ESQUEMA 1a



15

R' y R'' representan una diversidad de sustituyentes que constituyen un compuesto biológico; y

R^* representa una diversidad de sustituyente(s) que, junto con el nitrógeno, constituyen un compuesto de amina.

20 En algunas realizaciones, los compuestos en la extracción acondicionada son productos de reacción de compuestos que tienen cetonas y aldehídos con diversas aminas. Esta reacción es seguida por la reducción tal como reducción con hidruro de las iminas y enaminas intermedias para proporcionar aminas secundarias y terciarias. La reacción de cetonas y aldehídos con aminas, seguido de la reducción de las iminas y enaminas formadas para proporcionar aminas, es conocida en la técnica.

25 En algunas realizaciones, los compuestos en la extracción acondicionada son productos de reacción de compuestos que tienen cetonas y aldehídos con un reactivo reductor tal como un reactivo de hidruro reductor (p. ej., borohidruro de sodio, hidruro de litio y aluminio, triacetoxiborohidruro de sodio). En algunas realizaciones, las cetonas y los aldehídos se reducen a alcoholes. En algunas realizaciones, los compuestos en el extracto acondicionado son compuestos que tienen otros grupos funcionales reactivos que pueden reducirse en presencia de un reactivo reductor tal como un reactivo de hidruro reductor (p. ej., borohidruro de sodio, hidruro de litio y aluminio, triacetoxiborohidruro de sodio).

30 En algunas realizaciones, el método de acondicionamiento químico descrito en esta memoria emplea un extracto biológico (tal como aceite de cúrcuma), utilizando muchos reactivos diferentes, para producir eficientemente un

conjunto de compuestos químicos nitrogenados. La disponibilidad comercial de muchos aminos de bajo peso molecular para su uso como entradas en la secuencia de animación reductora permite el desarrollo de muchas mezclas de tipo fármaco del sistema nervioso central diferentes y estructuralmente diversas del mismo extracto natural. Aminas adecuadas para su uso en el presente método se seleccionan del grupo que consiste en aminas primarias, aminas secundarias, aminas cíclicas, pirrolidina y aminoácidos. Agentes reductores adecuados para uso en el presente método se seleccionan del grupo de agentes reductores de hidruro, que incluyen pero no se limitan a borohidruro de sodio, triacetoxiborohidruro de sodio e hidruro de litio y aluminio.

En algunas realizaciones, el método de acondicionamiento químico descrito en esta memoria emplea un extracto biológico (tal como aceite de cúrcuma), utilizando uno o más reactivos reductores, para producir eficientemente un conjunto de compuestos químicos que contienen alcohol (derivados de alcohol). Agentes reductores adecuados para su uso en el presente método se seleccionan del grupo de agentes reductores de hidruro que incluyen pero no se limitan a borohidruro de sodio, triacetoxiborohidruro de sodio e hidruro de litio y aluminio.

El método puede comprender, además, enfriar rápidamente la reacción utilizando un agente de extinción, en el que el agente de extinción se selecciona, pero no se limita al grupo que consiste en bicarbonato de sodio, carbonato de sodio, sulfato de sodio, sulfato de sodio decahidrato. El método también puede comprender, además, aislar uno o más de los compuestos químicos nitrogenados, en una forma purificada o no purificada. El compuesto químico nitrogenado resultante puede ser entonces rastreado o sometido a ensayo en cuanto a la actividad biológica.

El procedimiento de acondicionamiento químico por reducción o animación reductora descrito en esta memoria destruye electrófilos reactivos en el extracto natural, incluyendo cetonas, tales como en los aceites de cúrcuma, y los convierte en compuestos químicamente estables tales como aminas o alcoholes. Los extractos acondicionados resultantes contienen tanto compuestos naturales como nuevos productos de amina nitrogenados no naturales o productos alcohólicos que son potenciales candidatos a fármacos. En algunas realizaciones, en el procedimiento de acondicionamiento químico por aminación reductora descrito en esta memoria, reactivos electrófilos en el extracto natural, incluyendo cetonas, tales como en los aceites de la cúrcuma, son destruidos y los compuestos cetónicos se convierten en otros compuestos químicos, tales como aminas. En algunas otras realizaciones, en el procedimiento de acondicionamiento químico por reducción descrito en esta memoria, reactivos electrófilos en el extracto natural, incluyendo cetonas, tales como en los aceites de cúrcuma, son destruidos y los compuestos cetónicos se convierten en otros compuestos químicos tales como alcoholes.

En el caso de los extractos de aceite de cúrcuma, los derivados de amina nitrogenados y los derivados de alcoholes son potenciales fármacos para el sistema nervioso central.

Para los fines de esta descripción, los siguientes términos y expresiones tienen los siguientes significados.

La expresión "compuesto biológico", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un compuesto químico que se produce en la naturaleza.

La expresión "extracto biológico", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un extracto de una muestra biológica, tal como un extracto vegetal, u otro extracto de materia orgánica, que contiene compuestos químicos que se producen en la naturaleza.

La expresión "grupo electrófilo reactivo", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un átomo o grupo de átomos que tiene la capacidad de reaccionar con un nucleófilo.

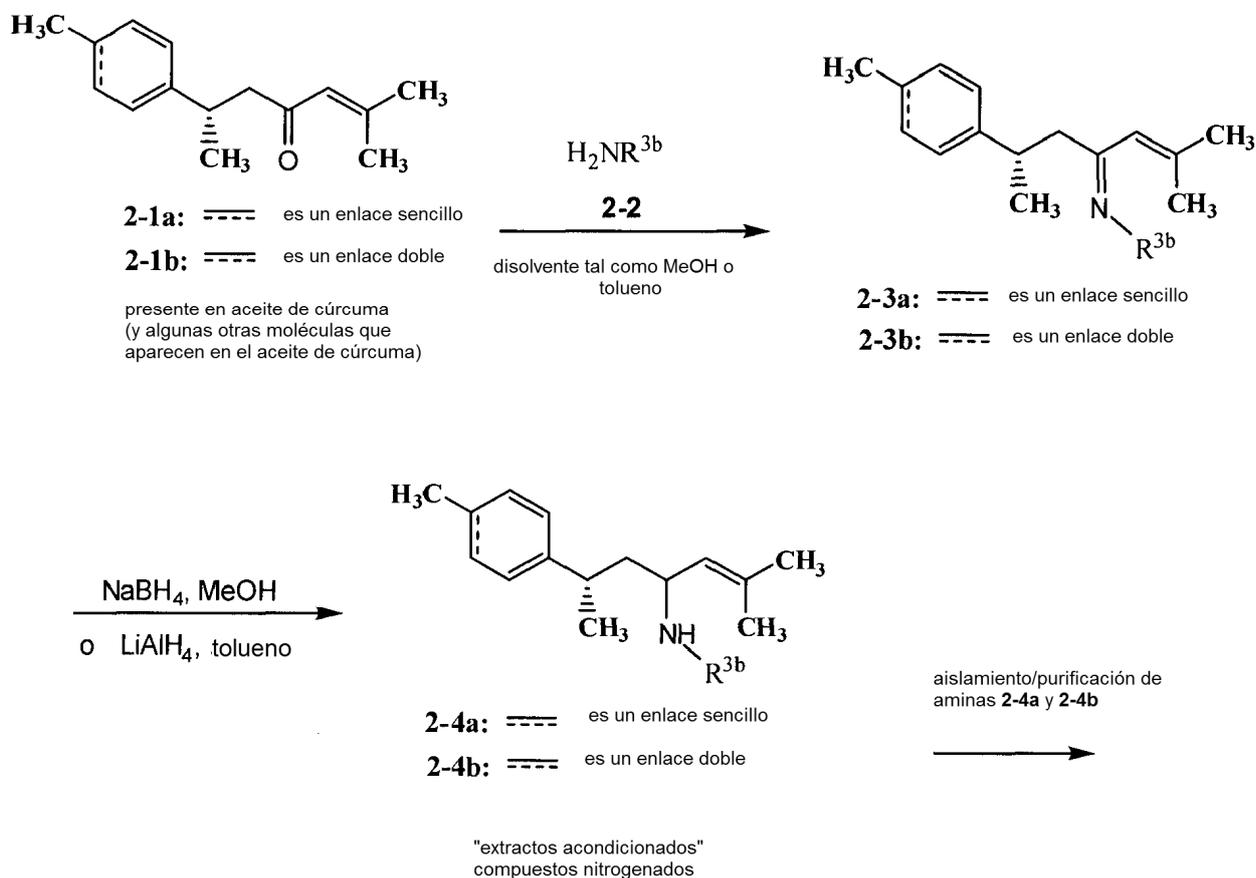
La expresión "derivado nitrogenado", tal como se utiliza en esta memoria, representa los derivados que contienen un átomo de nitrógeno, en donde el átomo de nitrógeno es una sustitución de otro átomo tal como oxígeno en el compuesto parental.

La expresión "derivado de alcohol", tal como se utiliza en esta memoria, representa los derivados que contienen un grupo hidroxilo, en donde el grupo hidroxilo se reduce de un grupo carbonilo en el compuesto parental (tal como un compuesto parental cetona o aldehído).

En una realización, un ejemplo específico del procedimiento de acondicionamiento químico se muestra a continuación en el Esquema 2. El Esquema 2 muestra el protocolo de acondicionamiento químico de aminación reductora de dos etapas realizado en aceite de cúrcuma de acuerdo con una realización del método, en el que las cetonas **2-1a** y **2-1b** que comprenden aceite de cúrcuma se convierten en aminas **2-4a** y **2-4b**, respectivamente. De acuerdo con el método mostrado en el Esquema 2, el aceite de cúrcuma (que contiene las cetonas **2-1a** y **2-1b** y otras moléculas que se producen en la cúrcuma) se hace reaccionar con la amina **2-2** [en donde R^{3b} puede ser alquilo (p. ej., isobutilo) o similar] para formar compuestos **2-3a** y **2-3b**, respectivamente. Luego, los compuestos **2-**

3a y **2-3b** resultantes se reducen con un agente reductor tal como un borohidruro, para formar los compuestos nitrogenados **2-4a** y **2-4b**, respectivamente (el producto bruto de reacción también incluye otros compuestos químicos).

ESQUEMA 2



5

En la siguiente etapa del método, las aminas **2-4a** y **2-4b** se aíslan/purifican a partir del extracto (el producto de reacción bruto del proceso de aminación reductiva de 2 etapas). Los extractos acondicionados pueden fraccionarse por cromatografía de resolución instantánea. Las fracciones que contienen aminas **2-4a** o **2-4b** pueden someterse a purificación/aislamiento adicional según los métodos conocidos en la técnica. Puede seguir el aislamiento y la caracterización adicionales de la fracción que contiene las aminas **2-4a** o **2-4b**. En algunas realizaciones, la amina **2-4a** puede someterse a una separación adicional (tal como utilizando cromatografía en columna) para aislar cada uno de los diastereoisómeros. En algunas realizaciones, la amina **2-4b** puede someterse a una separación adicional (tal como utilizando cromatografía en columna) para aislar cada uno de los diastereoisómeros. Las aminas **2-4a** y **2-4b** aisladas son sometidas a ensayo en cuanto a sus actividades biológicas tal como por los métodos descritos en esta memoria.

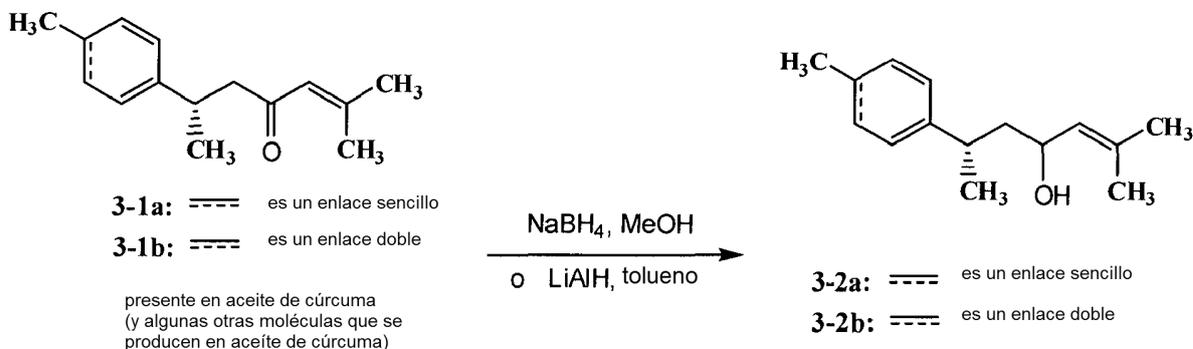
Algunos ejemplos de amina **2-2** utilizados en el procedimiento de acondicionamiento químico de la invención mostrado en el Esquema 2 incluyen alquilaminas tales como metilamina, etilamina, n-propilamina, isopropilamina, n-butilamina, 2-butilamina, isobutilamina, y *tert.*-butilamina; fenilamina y bencilamina.

En otra realización, un ejemplo específico del procedimiento de acondicionamiento químico se muestra en el Esquema 3 que figura a continuación. El Esquema 3 muestra un protocolo de acondicionamiento químico reductivo (o un protocolo de acondicionamiento químico de reducción) realizado en aceite de cúrcuma de acuerdo con una realización del método, en el que las cetonas **3-1a** y **3-1b** que comprenden aceite de cúrcuma se reducen/convierten en alcoholes **3-2a** y **3-2b**, respectivamente. En algunas realizaciones, el alcohol **3-2a** puede someterse a una separación adicional (tal como utilizando cromatografía en columna) para aislar cada uno de los diastereoisómeros. En algunas realizaciones, el alcohol **3-2b** puede someterse a una separación adicional (tal como utilizando

25

cromatografía en columna) para aislar cada uno de los diastereoisómeros. Los derivados de alcohol **3-2a** y **3-2b** son sometidos a ensayo en cuanto a sus actividades biológicas tal como por los métodos descritos en esta memoria.

ESQUEMA 3



- 5 En algunas realizaciones, los derivados de aceite de cúrcuma, tales como los derivados de aminas **2-4a** y **2-4b** y los derivados de alcohol **3-2a** y **3-2b** poseen actividad inhibitoria de beta-secretasa, y/o inhiben la producción de amiloide, el ensamblaje de amiloide, la actividad/efecto de oligómeros de Abeta sobre las neuronas (tales como las neuronas en el cerebro), la agregación de amiloide, la unión de amiloide (incluyendo el oligómero amiloide) o la deposición de amiloide. Estos compuestos son agentes terapéuticos útiles para el tratamiento y la prevención del deterioro cognitivo, la producción de amiloide, la neurodegeneración y la enfermedad de Alzheimer.
- 10 Nuevos compuestos de plomo generados por este método de acondicionamiento químico también se pueden preparar por los métodos de síntesis descritos en esta memoria.

SÍNTESIS

- 15 Compuestos de realizaciones de la invención, incluyendo sus sales, se pueden preparar utilizando técnicas de síntesis orgánica conocidas y pueden ser sintetizados de acuerdo con cualquiera de las numerosas vías sintéticas posibles.

- 20 Las reacciones para preparar compuestos de la invención pueden llevarse a cabo en disolventes adecuados que pueden seleccionarse fácilmente por un experto en la técnica de la síntesis orgánica. Disolventes adecuados pueden ser sustancialmente no reactivos con los materiales de partida (reaccionantes), los compuestos intermedios o productos a las temperaturas a las que se llevan a cabo las reacciones, p. ej., temperaturas que pueden oscilar entre la temperatura de congelación del disolvente a la temperatura de ebullición del disolvente. Una reacción dada puede llevarse a cabo en un disolvente o una mezcla de más de un disolvente. Dependiendo de la etapa de reacción particular, los disolventes adecuados para una etapa de reacción particular pueden ser seleccionados por el experto en la materia.

- 25 La preparación de los compuestos de la invención puede implicar la protección y desprotección de diversos grupos químicos. La necesidad de protección y desprotección, y la selección de grupos protectores apropiados, se puede determinar fácilmente por un experto en la técnica. La química de grupos protectores se puede encontrar, por ejemplo, en T. W. Greene y P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3ª Ed., Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1999).

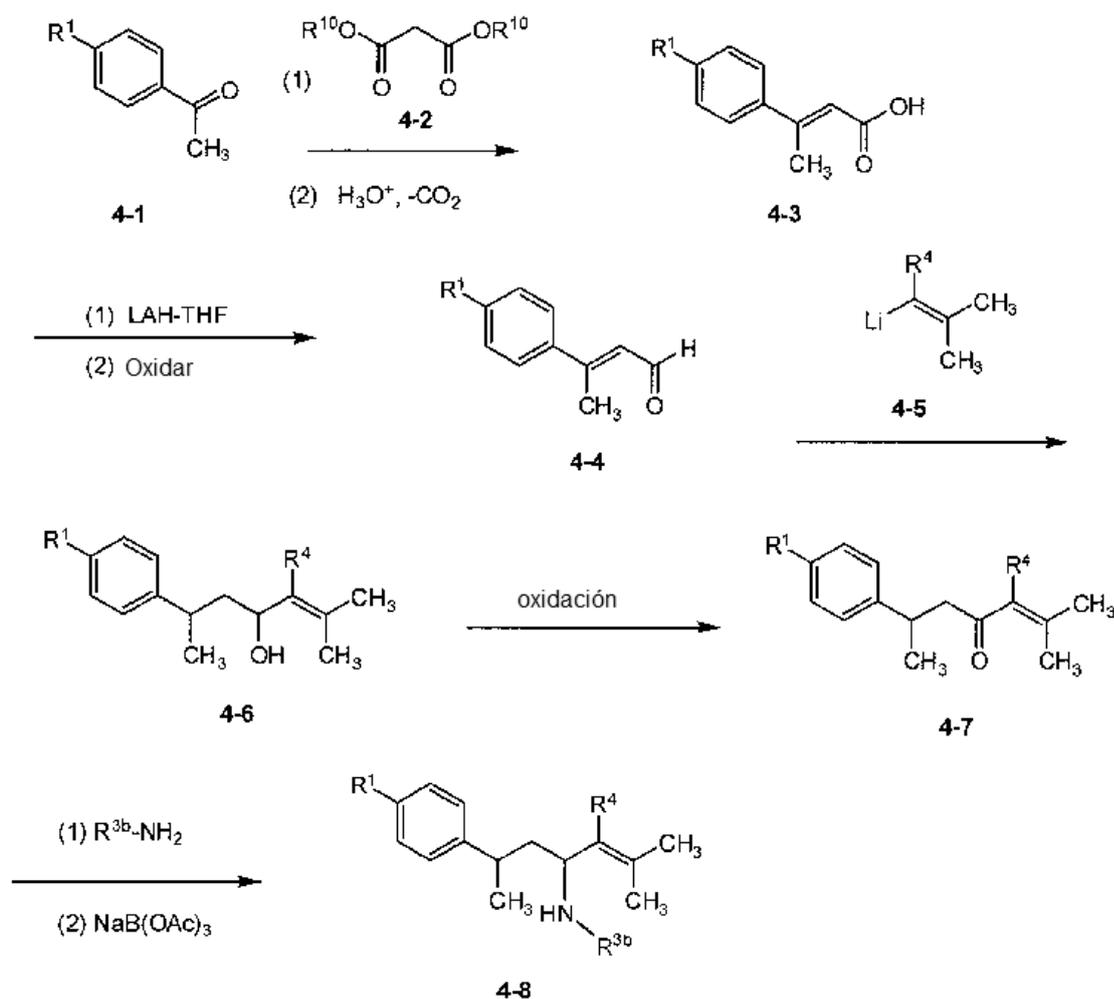
- 30 Las reacciones pueden ser controladas de acuerdo con cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la formación de producto puede controlarse por medios espectroscópicos, tales como espectroscopia de resonancia magnética nuclear (p. ej., ^1H o ^{13}C), espectroscopia infrarroja, espectrofotometría (p. ej., UV-visible), espectrometría de masas o por métodos cromatográficos tales como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o cromatografía de capa fina (TLC).

- 35 Los compuestos de realizaciones de la invención se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con las vías de reacción, procesos sintéticos y técnicas descritos más adelante.

Tal como se muestra en el Esquema 4, la cetona **4-1** puede hacerse reaccionar con el 1,3-diéster **4-2** [en donde cada uno de R^{10} puede ser independientemente alquilo (p. ej. metilo) o similar] en presencia de un catalizador de carácter ácido o básico (a través de un enolato), seguido por hidrólisis (por ejemplo, bajo condiciones ácidas) y la

5 pérdida de CO_2 , para proporcionar el ácido **4-3**. La reacción del ácido **4-3** (o su éster tal como éster metílico) con un reactivo reductor tal como LAH, seguido de oxidación del alcohol intermedio con un reactivo de oxidación tal como peryodinano de *Dess-Martin*, puede proporcionar el aldehído **4-4**. La reacción del aldehído **4-4** con un compuesto organometálico tal como un compuesto de organolitio **4-5** puede formar el alcohol **4-6**. Diferentes diastereómeros del alcohol **4-6** se pueden separar por métodos conocidos por los expertos en la técnica tales como cromatografía en columna. Véase, p. ej., A. Li, et. al., "Total asymmetric synthesis of (7S,9R)-(+)-bisacumol", *Tetrahedron: Asymmetry* (2003), 14(1), 75-78. La oxidación del alcohol **4-6** con un reactivo de oxidación adecuado tal como MnO_2 puede proporcionar la cetona **4-7**. La aminación reductora de la cetona **4-7** con una amina adecuada R^{3b}NH_2 en presencia de un hidruro adecuado tal como borohidruro de sodio puede proporcionar la amina **4-8**. Diferentes diastereoisómeros de la amina **4-8** se pueden separar por métodos conocidos por los expertos en la técnica tal como cromatografía en columna.

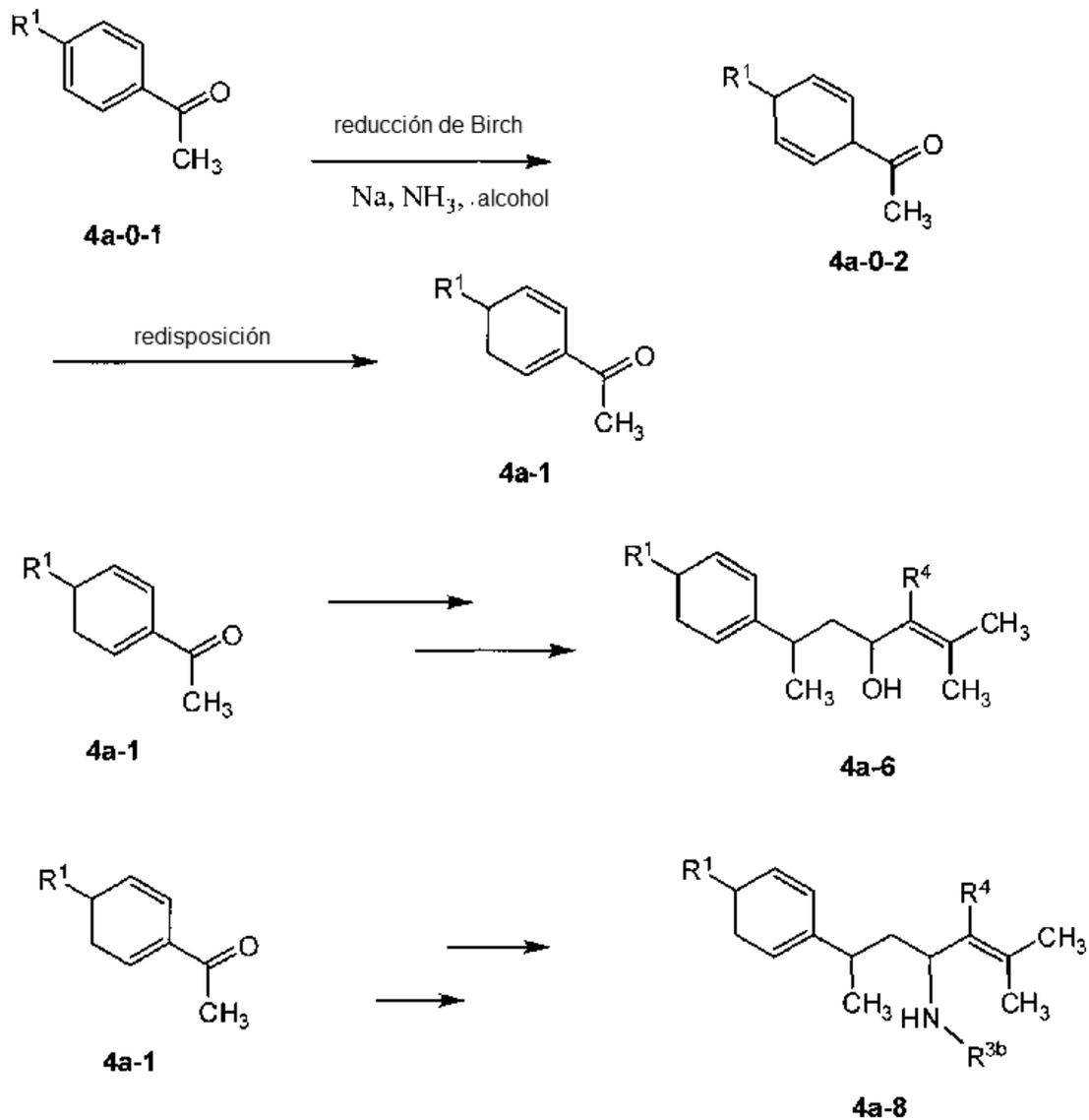
ESQUEMA 4



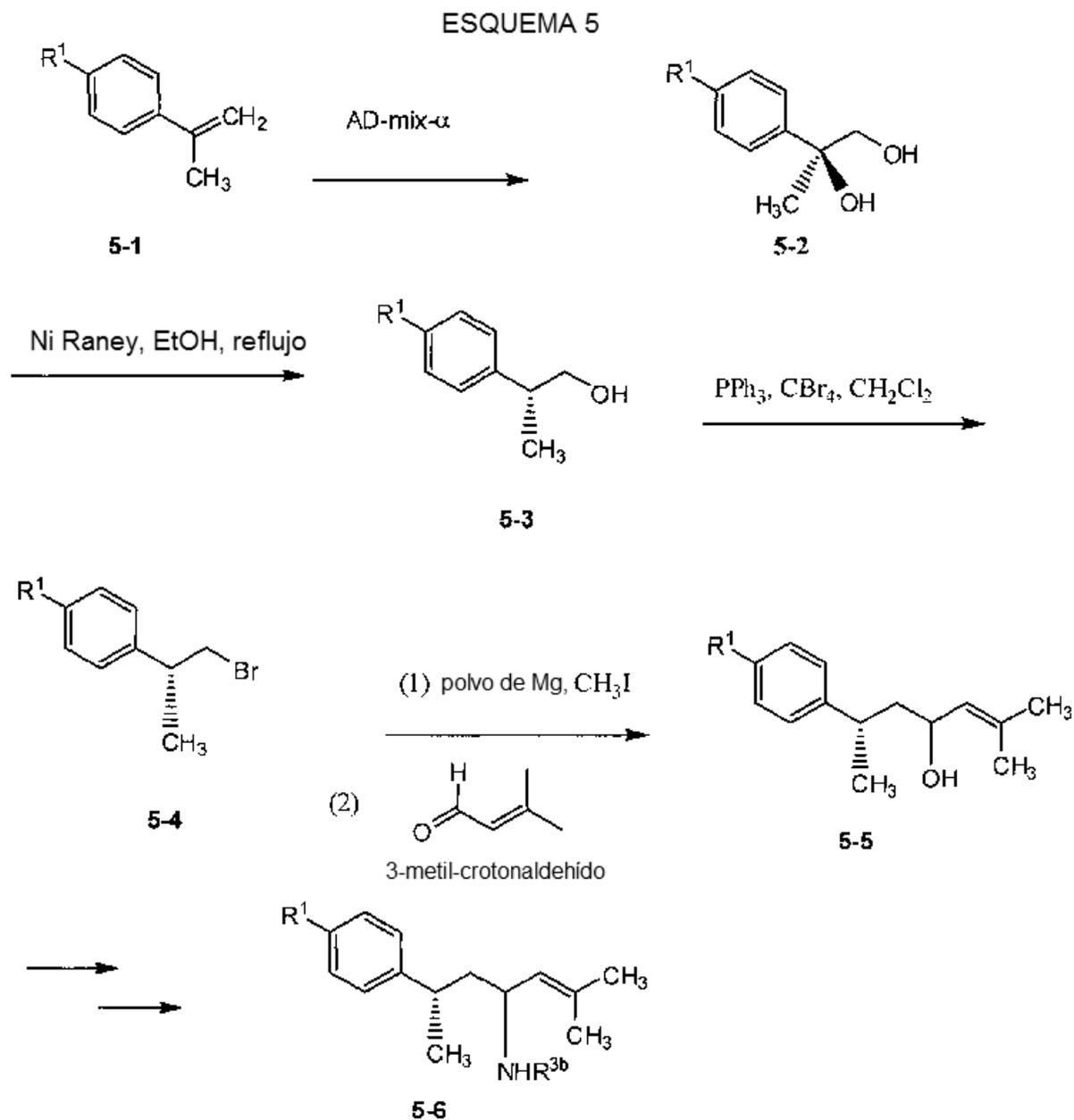
15 Tal como se muestra en el Esquema 4a, el compuesto aromático **4a-0-1** se puede reducir a ciclohexa-1,4-dieno **4a-02** bajo condiciones de reducción de Birch. Véase, p. ej., Rabideau, P. W., "The metal-ammonia reduction of aromatic compounds", *Tetrahedron*, Volumen 45, Número 6, 1989, páginas 1579-1603. Bajo condiciones ácidas (tal como en presencia de una cantidad catalítica de HCl o ácido acético), ciclohexa-1,4-dieno **4a-02** se puede redistribuir en el ciclohexa-1,3-dieno **4a-1** termodinámicamente más estable. El ciclohexa-1,3-dieno **4a-1** se puede convertir en el alcohol **4a-6** o amina **4a-8** de acuerdo con métodos similares a los descritos en el Esquema 4.

20

ESQUEMA 4a



Tal como se muestra el Esquema 5, el tratamiento del derivado de estireno **5-1** con AD-mix- α (véase, p. ej., Sharpless, K. B.; Amberg, W.; Bennani, Y. L.; Crispino, G. A.; et al. J. Org. Chem. 1992, 57, 2771) proporciona el diol **5-2**. Véase A. Li, et. al, "Total asymmetric synthesis of (7S,9R)-(+)-bisacumol", Tetrahedron: Asymmetry (2003), 14(1), 75-78. educación estereoselectiva del OH bencílico de diol **5-2** con níquel Raney da el alcohol **5-3**. Véase *id.* El tratamiento de alcohol **5-3** con PPh₃ y CBr₄ en un disolvente adecuado tal como cloruro de metileno proporciona el bromuro **5-4**. La conversión del bromuro **5-4** en el correspondiente reactivo de Grignard en presencia de polvo de magnesio y CH₃I (por intercambio de metal-halógeno), seguido de la reacción con 3-metil.crotonaldehído proporciona el alcohol **5-5**. Diferentes diastereoisómeros de alcohol **5-5** se pueden separar por métodos conocidos por los expertos en la técnica tales como cromatografía en columna. Véase *id.* El alcohol **5-5** se puede transformar en su correspondiente compuesto de amina **5-6** utilizando métodos similares a los esbozados en el Esquema 4.



Los expertos en la técnica puede reconocer que en todos los Esquemas descritos en esta memoria, si hay grupos funcionales (reactivos) presentes en un grupo sustituyente tal como R^1 , R^2 , R^3 y R^4 , etc., se puede hacer una modificación adicional si es apropiado y/o deseado. Por ejemplo, un grupo OH se puede convertir en un grupo lábil mejor tal como mesilato que, a su vez, es adecuado para la sustitución nucleófila tal como mediante Br. Por lo tanto, un compuesto de Fórmula I (tal como el compuesto 4-8 del Esquema 4) que tiene un sustituyente que contiene un grupo funcional se puede convertir en otro compuesto de fórmula I que tiene un grupo sustituyente diferente.

5

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "hacer reaccionar" se refiere a la reunión de los reaccionantes químicos designados de modo que tiene lugar una transformación química que genera un compuesto diferente de cualquier introducido inicialmente en el sistema. La reacción puede tener lugar en presencia o ausencia de disolvente.

10

MÉTODOS

- En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención inhiben, tratan o reducen (inhiben parcialmente) la unión de amiloide (incluyendo oligómeros de Abeta) a las neuronas (tales como neuronas en el cerebro) y son útiles para la inhibición, tratamiento y reducción del deterioro cognitivo y/o la enfermedad de Alzheimer. En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención inhiben, tratan o reducen (inhiben parcialmente) uno o más de la agregación amiloide, la unión a oligómero amiloide y la deposición de amiloide. En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención inhiben, tratan o reducen (inhiben parcialmente) la deposición de amiloide. En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención inhiben, tratan o reducen (inhiben parcialmente) la actividad/efecto de oligómeros de Abeta en las neuronas (tales como las neuronas en el cerebro) y son útiles para la inhibición, el tratamiento y la reducción del deterioro cognitivo y/o la enfermedad de Alzheimer. En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención inhiben, tratan o reducen (inhiben parcialmente) la actividad/efecto de oligómeros de Abeta en las neuronas (tales como las neuronas en el cerebro) a través de la interrupción de oligómeros de Abeta, la inhibición de la unión de oligómeros de Abeta a las neuronas, y/o la neutralización de los mecanismos de transducción de señales de la acción iniciada por la unión al oligómero de Abeta.
- En algunas realizaciones, los compuestos muestran actividad en un ensayo de beta-secretasa y son útiles para la inhibición, el tratamiento y la reducción del deterioro cognitivo y la enfermedad de Alzheimer. En algunas realizaciones, el derivado de aceite de jengibre es un compuesto en forma purificada y aislada (por ejemplo, con una pureza mayor que 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% en peso). Los compuestos y métodos descritos en esta memoria pueden utilizarse para tratar uno o más síntomas del deterioro cognitivo y/o la enfermedad de Alzheimer tales como pérdida de memoria, confusión, deterioro del juicio, cambios de personalidad, desorientación y pérdida de habilidades lingüísticas. Además, los compuestos y métodos descritos en esta memoria pueden ser útiles en la inhibición, tratamiento y/o reducción del deterioro cognitivo y/o la enfermedad de Alzheimer mediante la restauración de la potenciación a largo plazo y/o la inhibición, tratamiento o reducción de una o ambas de la neurodegeneración y amiloidosis en general, más específicamente mediante la inhibición, tratamiento o reducción de uno o más de la producción de amiloide, el ensamblaje de amiloide, la agregación amiloide, la unión a amiloide (incluyendo el oligómero amiloide) y la deposición de amiloide.
- En algunas realizaciones, los compuestos de la invención pueden inhibir, tratar o reducir uno o más de la producción de amiloide, el ensamblaje de amiloide, la agregación amiloide, la unión de oligómero amiloide y la deposición de amiloide. En algunas realizaciones, los compuestos de la invención pueden restaurar la potenciación a largo plazo, inhibir, tratar o reducir uno o ambos de la neurodegeneración y la amiloidosis en general.
- En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención inhiben, tratan o reducen (inhiben parcialmente) uno o más de la agregación amiloide, la unión de oligómero amiloide y la deposición de amiloide. En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención inhiben (o inhiben parcialmente) la deposición de amiloide. En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención inhiben, tratan o reducen (inhiben parcialmente) la unión de amiloide (incluyendo oligómeros de Abeta) a las neuronas (tales como las neuronas en el cerebro). En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención son útiles para la inhibición, el tratamiento y la reducción del deterioro cognitivo y/o la enfermedad de Alzheimer.
- En algunas realizaciones, los compuestos de la invención pueden inhibir la actividad de beta secretasa. En algunas realizaciones, los compuestos de la invención pueden utilizarse en métodos para inhibir la actividad de beta-secretasa, poniendo en contacto la beta-secretasa con uno cualquiera o más de los compuestos o composiciones descritos en esta memoria.
- Otro aspecto de la presente invención pertenece a métodos para tratar el deterioro cognitivo y/o la enfermedad de Alzheimer en un individuo (p. ej., paciente) mediante la administración al individuo de una cantidad o dosis terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención o una composición farmacéutica del mismo.
- El tratamiento de las enfermedades/trastornos en esta memoria incluye el tratamiento de uno o más síntomas asociados con las enfermedades/trastornos, por ejemplo, síntomas del deterioro cognitivo y/o la enfermedad de Alzheimer.
- Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "poner en contacto" se refiere a la reunión de los restos indicados en un sistema *in vitro* o en un sistema *in vivo*. Por ejemplo, "poner en contacto" una beta- secretasa o una célula neuronal (o una célula neuronal en presencia de uno o más oligómeros de beta-amiloide) con un compuesto de la invención incluye la administración de un compuesto de la presente invención a un individuo o paciente tal como un ser humano, que tiene una beta-secretasa o una célula neuronal, así como, por ejemplo, introducir un compuesto de la invención en una muestra que contiene una preparación celular o purificada que contiene la beta-secretasa o una célula neuronal (o una célula neuronal en presencia de uno o más de oligómeros de beta-amiloide).

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "individuo" o "paciente", que se utiliza indistintamente, se refiere a cualquier animal, incluyendo mamíferos, preferiblemente ratones, ratas, otros roedores, conejos, perros, gatos, cerdos, vacas, ovejas, caballos o primates, y lo más preferiblemente seres humanos.

5 Tal como se utiliza en esta memoria, la frase "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o medicinal que está siendo buscada en un tejido, sistema, animal, individuo o ser humano por un investigador, veterinario, doctor médico u otro médico.

10 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "tratar" o "tratamiento" se refiere a uno o más de (1) prevenir la enfermedad; por ejemplo prevenir una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que puede estar predispuesto a la enfermedad, afección o trastorno, pero que aún no experimenta o muestra la patología o sintomatología de la enfermedad; (2) inhibir/retardar la enfermedad; por ejemplo, inhibir/retardar una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que está experimentando o mostrando la patología o sintomatología de la enfermedad, afección o trastorno; y (3) mejorar la enfermedad; por ejemplo mejorar una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que está experimentando o mostrando la patología o sintomatología de la enfermedad, afección o trastorno (es decir, revirtiendo la patología y/o sintomatología) tal como disminuyendo la gravedad de la enfermedad o eliminando por completo/curando la enfermedad. Tal como se utiliza en esta memoria, tratar una enfermedad incluye, además, tratar uno o más síntomas asociados con la enfermedad.

TERAPIAS DE COMBINACIÓN

20 En determinadas realizaciones, se pueden utilizar uno o más agentes farmacéuticos adicionales para el tratamiento del deterioro cognitivo y/o la enfermedad de Alzheimer en combinación con los compuestos de la presente invención para el tratamiento del deterioro cognitivo y/o la enfermedad de Alzheimer. El uno o más agentes farmacéuticos adicionales se pueden administrar a un paciente simultánea o secuencialmente.

FORMULACIONES FARMACÉUTICAS Y FORMAS DE DOSIFICACIÓN

25 En determinadas realizaciones, los compuestos de la invención se pueden administrar en forma de composiciones farmacéuticas. Estas composiciones se pueden preparar de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica, y se pueden administrar por una diversidad de vías, dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y de la zona a tratar. La administración puede ser tópica (incluyendo transdérmica, epidérmica, oftálmica y a las membranas mucosas, incluyendo administración intranasal, vaginal y rectal), pulmonar (p. ej., por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo por nebulizador; intratraqueal o intranasal), oral o parenteral. La administración parenteral incluye la administración intravenosa, intra-arterial, subcutánea, intraperitoneal intramuscular o por inyección o infusión; o administración intracraneal, p. ej., intratecal o intraventricular. La administración parenteral puede estar en forma de una sola dosis de bolo, o puede ser, por ejemplo, mediante una bomba de perfusión continua. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para la administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, sprays, líquidos y polvos. Soportes farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares pueden ser necesarios o deseables. También pueden ser útiles preservativos recubiertos, guantes y similares.

40 Realizaciones de esta invención incluyen también composiciones farmacéuticas que contienen, como ingrediente activo, uno o más de los compuestos de la invención de arriba en combinación con uno o más soportes farmacéuticamente aceptables (excipientes). Al preparar las composiciones de la invención, el ingrediente activo se mezcla típicamente con un excipiente, se diluye mediante un excipiente o se encierra dentro de un soporte en forma de, por ejemplo, una cápsula, bolsita, papel u otro recipiente. Cuando el excipiente sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semi-sólido o líquido que actúa como un vehículo, soporte o medio para el ingrediente activo. Por lo tanto, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, pastillas, sobres, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, disoluciones, jarabes, aerosoles (en forma de un sólido o en un medio líquido), ungüentos que contienen, por ejemplo, hasta 10% en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina blandas y duras, supositorios, disoluciones inyectables estériles y polvos envasados estériles.

50 En la preparación de una formulación, el compuesto activo puede molerse para proporcionar el tamaño de partícula apropiado antes de combinarlo con los otros ingredientes. Si el compuesto activo es sustancialmente insoluble, puede molerse hasta un tamaño de partícula inferior a malla 200. Si el compuesto activo es sustancialmente soluble en agua, el tamaño de partícula se puede ajustar mediante molienda para proporcionar una distribución sustancialmente uniforme en la formulación, p. ej. de aproximadamente malla 40.

Los compuestos de la invención pueden molerse utilizando procesos de molienda conocidos tales como molienda en húmedo para obtener un tamaño de partícula apropiado para la formación de comprimidos y para otros tipos de formulación. Preparados finamente divididos (material en nano-partículas) de los compuestos de la invención se

pueden producir mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, véase la Solicitud de Patente Internacional N° WO 2002/000196.

5 Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma de acacia, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe y metilcelulosa. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente: agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; emulsionantes y agentes de suspensión; agentes conservantes tales como hidroxibenzoatos de metilo y propilo; agentes edulcorantes; y agentes aromatizantes. Las composiciones de la invención pueden formularse de modo que proporcionen una liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo tras la administración al paciente
10 empleando procesos conocidos en la técnica.

15 Las composiciones se pueden formular en una forma de dosificación unitaria, conteniendo cada una de las dosis de aproximadamente 5 a aproximadamente 1000 mg (1 g), más habitualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo. La expresión "formas de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas, adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada una de las unidades una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado.

20 El compuesto activo puede ser eficaz en un amplio intervalo de dosificaciones y puede ser administrado generalmente en una cantidad farmacéuticamente eficaz. Por ejemplo, la dosificación de los compuestos activos de la invención, tal como se emplean para el tratamiento de un paciente en necesidad del mismo (tal como un ser humano adulto), puede variar de 0,1 a 3000 mg por día, dependiendo de la vía y frecuencia de administración. Una dosificación de este tipo corresponde a 0,001 hasta 50 mg/kg por día. En algunas realizaciones, la dosificación de los compuestos activos de la invención, tal como se emplea para el tratamiento de un paciente en necesidad del mismo (tal como un ser humano adulto), puede variar de 1 a 2000 mg por día, de 1 a 1000 mg por día, de 10 a 1000 mg por día o de 10 a 500 mg por día. Se entenderá, sin embargo, que la cantidad de compuesto realmente
25 administrada será normalmente determinada por un médico, de acuerdo con las circunstancias relevantes, incluyendo la afección a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto real administrado, la edad, peso y la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente, y similares.

30 Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, el ingrediente activo principal se puede mezclar con un excipiente farmacéutico para formar una composición de pre-formulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención. Cuando se hace referencia a estas composiciones de pre-formulación como homogéneas, el ingrediente activo está dispersado típicamente de manera uniforme por toda la composición, de manera que la composición puede subdividirse fácilmente en formas de dosificación unitarias igualmente eficaces tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. Esta pre-formulación sólida se subdivide después en formas de dosificación unitarias del tipo descrito anteriormente que contienen, por ejemplo, de aproximadamente
35 0,1 a aproximadamente 1000 mg del ingrediente activo de la presente invención.

40 Los comprimidos o píldoras de la presente invención pueden recubrirse o mezclarse de otra manera para proporcionar una forma de dosificación que proporcione la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender una dosificación interna y un componente de dosificación externo, estando este último en forma de una envoltura sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permitir que el componente interno pase intacto al duodeno o que se retrase su liberación. Se puede utilizar una diversidad de materiales para este tipo de capas o recubrimientos entéricos, incluyendo estos materiales un cierto número de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

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

50 Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen disoluciones y suspensiones en disolventes farmacéuticamente aceptables, acuosos u orgánicos, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados según se describe arriba. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por vía respiratoria oral o nasal para un efecto local o sistémico. Las composiciones se pueden nebulizar mediante el uso de gases inertes. Las disoluciones nebulizadas pueden ser inhaladas directamente desde el dispositivo de nebulización o el dispositivo de nebulización se puede
55 unir a una máscara de la cara, o respirador intermitente de presión positiva. Composiciones en disolución,

suspensión o en polvo se pueden administrar por vía oral o nasal a partir de dispositivos que suministran la formulación de una manera apropiada.

5 La cantidad de compuesto o composición administrada a un paciente variará dependiendo de lo que está siendo administrado, del fin de la administración tal como profilaxis o terapia, del estado del paciente, de la forma de administración, y similares. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se pueden administrar a un paciente que ya padece una enfermedad en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Las dosis eficaces dependerán del estado de la enfermedad que se esté tratando, así como del juicio del médico que atiende dependiendo de factores tales como la gravedad de la enfermedad, la edad, peso y estado general del paciente, y similares.

10 Las composiciones administradas a un paciente pueden estar en forma de composiciones farmacéuticas arriba descritas. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales, o pueden filtrarse en condiciones estériles. Las disoluciones acuosas se pueden envasar para su uso como tal, o liofilizar, combinándose el preparado liofilizado con un soporte acuoso estéril antes de la administración. El pH de los preparados de compuesto típicamente estará entre 3 y 11, más preferiblemente de 5 a 9 y lo más preferiblemente de 7 a 8. Se entenderá que el uso de determinados de los excipientes, soportes o estabilizantes anteriores dará lugar a la formación de sales farmacéuticas.

20 La dosificación terapéutica de los compuestos de la presente invención puede variar, por ejemplo, de acuerdo con el uso particular para el cual se hace el tratamiento, la manera de administración del compuesto, la salud y el estado del paciente, y el juicio de la prescripción por parte del médico. La proporción o concentración de un compuesto de la invención en una composición farmacéutica puede variar dependiendo de un cierto número de factores, incluyendo la dosificación, características químicas (p. ej., hidrofobicidad) y la vía de administración. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden proporcionarse en una disolución tampón fisiológica acuosa que contiene aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10% p/v del compuesto para administración parenteral. Algunos intervalos de dosis típicos son de aproximadamente 1 g/kg a aproximadamente 1 g/kg de peso corporal por día. En algunas realizaciones, el intervalo de dosis es de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día. Es probable que la dosificación dependa de variables tales como el tipo y grado de progreso de la enfermedad o trastorno, el estado de salud general del paciente particular, la eficacia biológica relativa del compuesto seleccionado, la formulación del excipiente, y su vía de administración. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba modelo *in vitro* o animales.

30 Las composiciones de la invención pueden incluir, además, uno o más agentes farmacéuticos adicionales tales como un agente quimioterapéutico, un esteroide, un compuesto anti-inflamatorio, o inmunosupresor, ejemplos de los cuales se enumeran en lo que antecede.

COMPUESTOS MARCADOS Y MÉTODOS DE ENSAYO

35 Otro aspecto de la presente invención se refiere a compuestos marcados de la invención (radio-marcados, marcados por fluorescencia, etc.) que serían útiles no sólo en la radio-formación de imágenes, sino también en ensayos, tanto *in vitro* como *in vivo*, para localizar y cuantificar la enzima en muestras de tejidos, incluyendo el ser humano, y para identificar ligandos por inhibición de la unión de un compuesto marcado. Por consiguiente, la presente invención incluye ensayos enzimáticos que contienen estos compuestos marcados.

40 Realizaciones de la presente invención incluyen, además, compuestos marcados con isótopos de la invención. Un compuesto "marcado con isótopos" o "radio-marcado" es un compuesto de la invención en el que uno o más átomos están reemplazados o sustituidos por un átomo que tiene una masa atómica o un número másico diferente de la masa atómica o número másico que típicamente se encuentra en la naturaleza (es decir, se produce de forma natural). Radionucleidos adecuados que pueden incorporarse en compuestos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a ^2H (también escrito como D de deuterio), ^3H (también escrito como T de tritio), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{18}F , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{82}Br , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I y ^{131}I . El radionucleido que se incorpora en los compuestos radio-marcados dependerá de la aplicación específica de ese compuesto radio-marcado. Por ejemplo, para ensayos *in vitro* de marcaje del receptor y de competición, los compuestos que incorporan ^3H , ^{14}C , ^{82}Br , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o serán generalmente más útiles. Para aplicaciones de radio-formación de imágenes, ^{11}C , ^{18}F , ^{125}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I , ^{75}Br , ^{76}Br o ^{77}Br serán generalmente más útiles.

50 Se entiende que un "compuesto radio-marcado" es un compuesto que ha incorporado al menos un radionucleido. En algunas realizaciones, el radionucleido se selecciona de ^3H , ^{14}C , ^{125}I , ^{35}S y ^{82}Br .

En algunas realizaciones, los compuestos marcados de la presente invención contienen un marcador fluorescente.

Los métodos sintéticos para la incorporación de radioisótopos y marcadores fluorescentes en compuestos orgánicos son bien conocidos en la técnica.

Un compuesto marcado de la invención (radio-marcado, marcado por fluorescencia, etc.) puede ser utilizado en un ensayo de rastreo para identificar/evaluar compuestos. Por ejemplo, un compuesto recién sintetizado o identificado (es decir, un compuesto de ensayo) que está marcado puede ser evaluado en cuanto a su capacidad de unirse a una beta-secretasa o una célula neuronal (o una célula neuronal en presencia de uno o más oligómeros de beta-amiloide) vigilando su variación de la concentración al ponerse en contacto con la beta-secretasa o la célula neuronal (o la célula neuronal en presencia de uno o más oligómeros de beta-amiloide), a través de seguimiento del marcado. Para otro ejemplo, un compuesto de ensayo (marcado) puede evaluarse en cuanto a su capacidad para reducir la unión de otro compuesto que se sabe que se une a la beta-secretasa o célula neuronal (es decir, compuesto estándar). Por consiguiente, la capacidad de un compuesto de ensayo para competir con el compuesto estándar por la unión a la beta-secretasa o la célula neuronal se correlaciona directamente con su afinidad de unión. A la inversa, en algunos otros ensayos de rastreo, el compuesto estándar está marcado y los compuestos de ensayo están no marcados. Por consiguiente, la concentración del compuesto estándar marcado se vigila con el fin de evaluar la competencia entre el compuesto estándar y el compuesto de ensayo y, de este modo, se verifica la afinidad de unión relativa del compuesto de ensayo.

KITS

Realizaciones de la presente invención también incluyen kits farmacéuticos útiles, por ejemplo, en el tratamiento o prevención del deterioro cognitivo y/o la enfermedad de Alzheimer, que incluyen uno o más recipientes que contienen una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención. Kits de este tipo pueden incluir, además, si se desea, uno o más de los diversos componentes del kit farmacéuticos convencionales tales como, por ejemplo, recipientes con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, recipientes adicionales, etc., como resultará fácilmente evidente para los expertos en la técnica. También pueden incluirse en el kit instrucciones, ya sea como insertos o como etiquetas, que indican cantidades de los componentes a administrar, directrices para la administración y/o directrices para mezclar los componentes.

La invención se describirá con mayor detalle por medio de ejemplos específicos. Los siguientes ejemplos se ofrecen con fines ilustrativos, y no pretenden limitar la invención de modo alguno. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente una diversidad de parámetros no críticos que pueden cambiarse o modificarse para proporcionar esencialmente los mismos resultados. Se encontró que determinados compuestos de los Ejemplos inhiben, tratan o reducen uno o más de la producción de amiloide, el ensamblaje de amiloide, la actividad/efecto de oligómeros de Abeta en las neuronas (tales como las neuronas en el cerebro), la agregación amiloide, la unión de oligómeros de amiloide y la deposición de amiloide de acuerdo con uno o más de los ensayos proporcionados en esta memoria. En algunas realizaciones adicionales, se encontró que determinados compuestos de los Ejemplos inhiben, tratan o reducen uno o más de la actividad/efecto de oligómeros de Abeta en las neuronas (tales como las neuronas en el cerebro), la agregación amiloide, la unión a amiloide (incluyendo oligómero de amiloide) y la deposición de amiloide de acuerdo con uno o más de los ensayos proporcionados en esta memoria.

En algunas realizaciones, el compuesto de la invención tiene un valor CI_{50} menor que 100 μ M, 50 μ M, 20 μ M, 15 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M, 500 nM, 100 nM, 50 nM o 10 nM con respecto a la inhibición de una o más de la actividad/efecto de oligómeros de Abeta en las neuronas (tales como las neuronas en el cerebro), la agregación amiloide, la unión a amiloide (incluyendo oligómero de amiloide) y la deposición de amiloide. En algunas realizaciones, el compuesto de la invención tiene un valor de CI_{50} menor que 100 μ M, 50 μ M, 20 μ M, 15 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M, 500 nM, 100 nM, 50 nM o 10 nM con respecto a la inhibición de la actividad/efecto de oligómeros de Abeta en las neuronas (tales como las neuronas en el cerebro).

En algunas realizaciones, se midió el porcentaje de inhibición del compuesto de la invención a una o más de la actividad/efecto de oligómeros de Abeta en las neuronas (tales como las neuronas en el cerebro), la agregación amiloide, la unión a amiloide (incluyendo oligómero de amiloide) y la deposición de amiloide en una concentración de 10 nM a 10 μ M. En algunas realizaciones, el porcentaje de inhibición medido es de aproximadamente 1% a aproximadamente 20%, de aproximadamente 20% a aproximadamente 50%, de aproximadamente 1% a aproximadamente 50% o de aproximadamente 1% a aproximadamente 80%.

La invención puede apreciarse en determinados aspectos con referencia a los siguientes ejemplos, que se ofrecen a modo de ilustración, no a modo de limitación. Los materiales, reactivos y similares a los que se hace referencia en los siguientes ejemplos se pueden obtener de fuentes comerciales, a menos que se indique lo contrario.

EJEMPLOS

Materiales y Métodos**Aceite de cúrcuma**

El extracto de aceite ligero de raíz de cúrcuma se obtiene por extracción de CO₂ supercrítico.

Ejemplo 1

5 **A. Extracción Acondicionada de Aceite de Cúrcuma (aminación reductora): Reacción del aceite de cúrcuma con isobutilamina seguido de reducción con borohidruro de sodio en metanol y mediante fraccionamiento utilizando cromatografía en columna**

10 Aceite de cúrcuma (10 g) se disolvió en metanol (250 mL) y se añadió isobutilamina (4,0 mL). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 16 horas. En este momento la mezcla de reacción se enfrió a 0°C en un baño de hielo. Una disolución de borohidruro de sodio (5 g) en metanol (50 mL) se añadió en porciones a lo largo de 30 minutos con agitación vigorosa. Cuando se completó la adición, la mezcla resultante se mantuvo a reflujo durante 16 horas. En este momento, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se vertió en una disolución de bicarbonato de sodio acuoso saturado (300 mL). La mezcla resultante se concentró por evaporación rotatoria y el residuo acuoso se repartió entre agua y cloroformo. La capa de cloroformo se secó sobre sulfato de sodio anhidro y después se filtró y se concentró. Los productos fueron entonces fraccionados utilizando cromatografía en columna de gel de sílice empleando un gradiente de 100% de cloroformo a cloroformo:metanol (4:1). Se recogieron y concentraron veinte fracciones desde relativamente no polares a polares. Cada una de las fracciones se sometió a un ensayo biológico. Las fracciones que contenían el producto activo eran las fracciones relativamente polares.

20 Una fracción que contenía el producto activo (Fracción 1A) se sometió a una separación adicional mediante cromatografía en columna y se aislaron dos componentes principales: Componente 1A-1 y Componente 1A-2.

La relación ponderal de aceite de cúrcuma a isobutilamina utilizado en la aminación reductora es de aproximadamente 3:1 (de 2 a 4:1).

DETERMINACIÓN DE LA PUREZA

25 La pureza de 1A fue medida por HPLC. Sólo estaban presentes dos picos principales (dos componentes). Las condiciones de HPLC utilizadas son las siguientes.

CONDICIONES DE HPLC

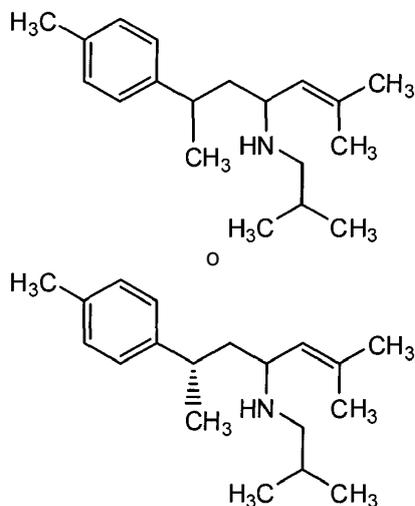
30 **Fase Móvil A:** formiato de amonio 13,3 mM/ácido fórmico 6,7 mM en agua
Fase móvil B: formiato de amonio 6 mM/ácido fórmico 3 mM en agua/CH₃CN (1/9, v/v)
Columna 1: Synergi Fusion-RP 100A Mercury, 2 x 20 mm, 2,5 micras (Phenomenex Parte N° 00M-4423-B0_CE)
Columna 2: Synergi Max-RP 80, 2 x 50 mm, 4 micras (Phenomenex Parte N° 00B-4337-B0)
Programa Gradiente: (el mismo para las dos columnas I y II)

Tiempo, minuto	% de Fase B	Caudal, ml/min
0	20	0,5
1	20	0,5
2,5	100	0,5
3,4	100	0,5
3,5	20	0,5
4,5	20	0,5

Componente Número	RT en Columna 1 (minuto)	RT en Columna 1 (minuto)
1A-1	2,15	2,46
1A-2	2,24	2,55

35 **Componente 1A-1:** ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,11, 7,09, 5,23, 3,72, 2,94, 2,51, 2,34, 2,31, 1,92, 1,72, 1,71, 1,58, 1,29, 1,27, 0,92. ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) 144,50, 135,37, 135,03, 129,03, 126,89, 126,70, 66,97, 49,25, 46,39, 35,05, 32,46, 25,83, 20,96, 20,67 y 18,36.- **MS** (M+H⁺) m/z 274,3.

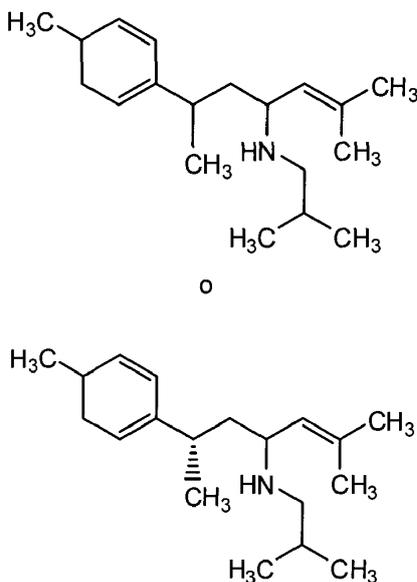
Se determina que la estructura de la Fracción 1A, Componente 1A-1 es como sigue.



5

Component 1A-2: $^1\text{H RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 5,77, 5,65, 5,45, 5,23, 3,96, 2,94, 2,93, 2,51, 2,31, 2,30, 2,05, 1,92, 1,72, 1,71, 1,58, 1,29, 1,27, 0,92. $^{13}\text{C RMN}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 144,50, 135,37, 130,96, 127,86, 126,70, 120,80, 66,72, 49,25, 46,39, 35,05, 32,46, 25,83, 21,79, 21,79, 20,67 y 18,36. **MS** ($\text{M}+\text{H}^+$) m/z 276,3.

Se determina que la estructura de la Fracción 1A, Componente 1A-2 es como sigue.



10

La medida del desplazamiento químico mediante $^1\text{H RMN}$ puede variar, por ejemplo, hasta 0,3 ppm. La medida del desplazamiento químico mediante $^{13}\text{H RMN}$ puede variar, por ejemplo, hasta 0,6 ppm. El espectro de masas analítico puede tener un error experimental de +/- 0,4.

15

Ejemplo 2

Extracción Acondicionada de Aceite de Cúrcuma (Reducción): Reacción de aceite de cúrcuma con borohidruro de sodio en metanol y mediante fraccionamiento utilizando cromatografía en columna

Aceite de cúrcuma (10 g) se disolvió en metanol (250 mL). La mezcla se enfrió hasta 0°C en un baño de hielo. Se añadió en porciones una disolución de borohidruro de sodio (5 g) en metanol (50 mL) a lo largo de 30 minutos con

20

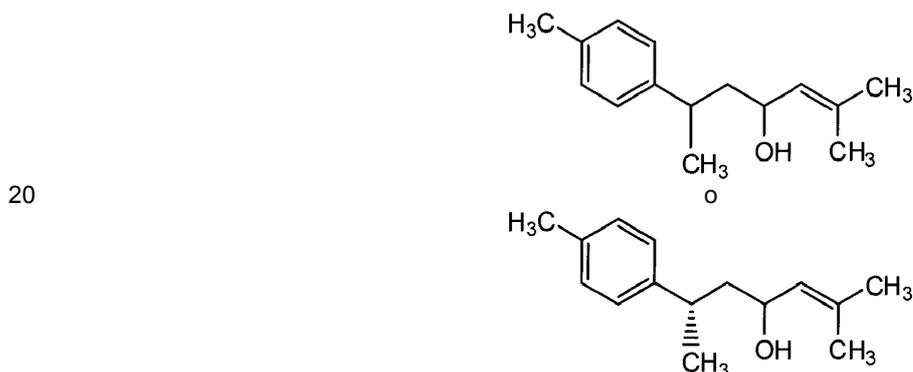
5 agitación vigorosa. Cuando se completó la adición, la mezcla se mantuvo a reflujo durante 16 h. En este momento la mezcla de reacción se enfrió a la temperatura ambiente y se vertió en una disolución de bicarbonato de sodio acuosa saturada (300 mL). La mezcla resultante se concentró mediante evaporación rotatoria y el residuo acuoso se repartió entre agua y cloroformo. La capa de cloroformo se secó sobre sulfato de sodio anhidro y después se filtró y se concentró. El producto se fraccionó entonces utilizando cromatografía en columna de gel de sílice empleando un gradiente de 100% de cloroformo a cloroformo:metanol (4:1). Se recogieron y concentraron veinte fracciones desde relativamente no polares a polares. Cada una de las fracciones se sometió a un ensayo biológico. Las fracciones que contenían el producto activo eran las fracciones relativamente polares.

10 La relación molar de borohidruro de sodio a aceite de cúrcuma (las cetonas y aldehídos en el mismo) es mayor que 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 o 6:1 para asegurar esa reducción de cetonas y aldehídos a alcoholes. En algunas realizaciones, la relación ponderal de borohidruro de sodio a aceite de cúrcuma es aproximadamente 0,5:1 (de 0,3:1 a aproximadamente 0,8:1).

Una fracción que contenía el producto activo (Fracción 2A) se sometió a una separación adicional mediante cromatografía en columna y se aislaron dos componentes principales: Componente 2A-1 y Componente 2A-2.

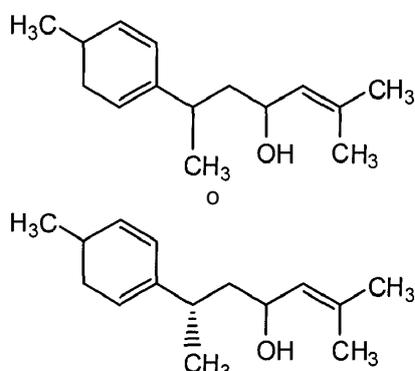
15 **Componente 2A-1:** $^1\text{H RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7,11, 7,09, 5,17, 4,45, 2,32, 2,76, 1,75, 1,58, 1,52 y 1,26, $^{13}\text{C RMN}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 144,3, 135,37, 135,03, 129,11, 128,32, 126,90, 67,10, 42,05, 39,64, 25,81, 23,00, 21,01 y 18,12. **MS** ($\text{M}+\text{H}^+$) m/z 219,2.

Se determina que la estructura de la Fracción 2A, Componente 2A-1 es como sigue.



Componente 2A-2: $^1\text{H RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 6,18, 5,70, 5,56, 5,17, 4,24, 2,32, 2,80, 2,29, 2,15, 1,95, 1,68, 1,75, 1,58, 1,42, 1,27. $^{13}\text{C RMN}$ δ 144,10, 135,00, 134,10, 129,58, 128,32, 125,3, 66,90, 46,18, 41,17, 39,55, 37,14, 25,81, 24,50, 23,00 y 18,12. **MS** ($\text{M}+\text{H}^+$) m/z 221,1.

25 Se determina que la estructura de la Fracción 2A, Componente 2A-2 es como sigue.



La medida del desplazamiento químico mediante ^1H RMN puede variar, por ejemplo, hasta 0,3 ppm. La medida del desplazamiento químico mediante ^{13}H RMN puede variar, por ejemplo, hasta 0,6 ppm. El espectro de masas analítico puede tener un error experimental de +/- 0,4.

DETERMINACIÓN DE LA PUREZA

- 5 La pureza de la Fracción 2A fue medida por HPLC. Sólo estaban presentes dos picos principales (dos componentes).

Ejemplo AA: Ensayo de exocitosis / ensayo de MTT

10 Neuronas primarias de embriones de rata E18 Sprague-Dawley se colocaron en placas a concentraciones optimizadas en placas de 384 pocillos en medio NB (Invitrogen). Las neuronas se mantienen en cultivos durante 3 semanas, con el doble de la alimentación semanal de los medios NB con suplemento de N_2 (Invitrogen). Un compuesto de ensayo se añade a las células, seguido de la adición de vehículo o preparados de oligómeros de Abeta (1,5 μM), y se incubaron durante 1 a 24 h a 37°C en 5% de CO_2 . Reactivo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Roche Molecular Biochemicals) se reconstituye en solución salina tamponada con fosfato a 5 mg/mL. 10 μL de reactivo de marcaje MTT se añade a cada uno de los pocillos y se incuba a 37°C durante 1 h y, a continuación, se representa en imágenes.

Cada una de las placas de ensayo se formatea de manera que los compuestos se ensayen con y sin Abeta en cada una de las placas. Este diseño elimina compuestos tóxicos o metabólicamente activos en una fase temprana en la cascada de rastreo (al nivel del rastreo primario).

20 Procesos similares para los ensayos de exocitosis/ensayos de MTT se pueden encontrar en la bibliografía. Véase, *p. ej.*, Liu Y, et. al., Detecting bioactive amyloid beta peptide species in Alzheimer's disease. J Neurochem. Nov. de 2004; 91 (3): 648-56; Liu Y, y Schubert D. "Cytotoxic amyloid peptides inhibit cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction by enhancing MTT formazan exocytosis" J Neurochem. Dic. de 1997; 69(6):2285-93; y Liu Y y Schubert D. "Treating Alzheimer's disease by inactivating bioactive amyloid beta peptide" Curr. Alzheimer Res. Abr. de 2006; 3(2):129-35.

25 CONTROLES EXPERIMENTALES

Oligómeros de Abeta 1-42 hechos de acuerdo con los métodos publicados [Véase, *p. ej.*, Dahlgren et al., "Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability" J Biol Chem. 30 de agosto de 2002;277(35):32046-53. Epub 10 de junio de 2002; LeVine H 3°. "Alzheimer's beta-peptide oligomer formation at physiologic concentrations" Anal Biochem. 1 de diciembre de 2004; 335(1):81-90; Shrestha et.al., "Amyloid beta peptide adversely affects spine number and motility in hippocampal neurons" Mol Cell Neurosci. Nov. de 2006; 33(3):274-82. Epub 8 de septiembre de 2006; Puzzo et al., "Amyloid-beta peptide inhibits activation of the nitric oxide/cGMP/cAMP-responsive element-binding protein pathway during hippocampal synaptic plasticity" J Neurosci. 20 de julio de 2005;25(29):6887-97; Barghorn et al., "Globular amyloid betapeptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease" J Neurochem. Nov. de 2005;95(3):834-47. Epub 31 de agosto de 2005; Johansson et al., Physicochemical characterization of the Alzheimer's disease related peptides A beta 1-42 Arctic and A beta 1-42wt. FEBS J. Junio de 2006;273(12):2618-30] así como oligómeros de Abeta derivados del cerebro (Véase, *p. ej.*, Walsh et al., Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. Nature (2002). 416, 535-539; Lesne et al., A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. Nature. 16 de marzo de 2006;440(7082):352-7; Shankar et al, Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. Nat Med. Agosto de 2008;14(8):837-42. Epub 22 de junio de 2008) constituyen los controles positivos. Los controles negativos incluyen neuronas tratadas con vehículo, así como neuronas tratadas con concentraciones 28 μM de memantina. La memantina produce una inhibición del 50% de los efectos de oligómeros a esta dosis. Estos controles, en cada una de las placas, sirven como herramientas de normalización para calibrar el rendimiento del ensayo sobre una base de placa por placa.

CULTIVOS NEURONALES PRIMARIOS

La densidad celular óptima se determina basándose en la respuesta celular a oligómeros de Abeta utilizando el ensayo de exocitosis como una lectura, y el análisis inmunohistoquímico de la proporción relativa de glía a neuronas en los cultivos. Los cultivos se controlan sobre una base semanal con la cuantificación basada en inmunohistoquímica y el procesamiento de la imagen para vigilar el porcentaje de los cultivos que son neuronas frente a glía (células gliales). Se rechazan los cultivos que contienen más de 20% de glia (positiva para GFAP) frente a neuronas (tinción positiva con anticuerpos dirigidos contra MAP2) a la edad de rastreo de 21 días in vitro (21 DIV).

PREPARADOS DE OLIGÓMEROS DE ABETA

Péptido amiloide humano 1-42 se obtiene de California Peptide, con elección del lote supeditada al análisis de control de calidad. Los controles de calidad de los preparados de oligómeros consisten en transferencias Western para determinar intervalos de tamaño y concentraciones relativas de oligómeros, y el ensayo de MTT para confirmar la aceleración de la exocitosis sin toxicidad. La toxicidad se vigila en cada uno de los ensayos basado en imágenes a través de la cuantificación de la morfología del núcleo visualizada con el colorante DAPI de unión a ADN (Invitrogen). Los núcleos que son fragmentados se consideran que se encuentran en apoptosis de etapa tardía (Majno y Joris '95). Se rechazan lotes de péptidos que producen intervalos de tamaños de péptidos inusuales o una toxicidad significativa a una concentración estándar de 1,5 μM en neuronas. Controles basados en placas - La optimización del ensayo será completa cuando las placas reformateadas alcanzan un mínimo de separación doble estadísticamente significativa entre vehículo y neuronas tratadas con oligómeros de Abeta ($p < 0,01$, ensayo-t de Student, varianza desigual) sobre una base rutinaria, con no más de un 10% de CV entre las placas, equivalente a su comportamiento actual.

SOFTWARE DE ESTADÍSTICA Y ANÁLISIS:

La manipulación y el análisis de datos se realizan mediante el software de análisis de imágenes Cellomics VTI y el software de base de datos automatizado STORE. Debido al intervalo dinámico bajo y a la variabilidad neuronal de pocillo a pocillo después de tres semanas en cultivo, las comparaciones estadísticas se hacen a través del análisis de Tukey-Kramer por pares para determinar la significancia de la separación entre el compuesto + oligómeros de Abeta de Abeta solo, y entre compuesto solo de vehículo. Estas estadísticas son más afines a lo que se ve en las pruebas de comportamiento animal que la estadística z' que se ha utilizado durante las últimas dos décadas en el rastreo de alto rendimiento. La capacidad de las neuronas primarias maduras de aproximarse más estrechamente a la red de transducción de señales mediada por electrofisiológica del cerebro adulto justifica esta estrategia de rastreo. El análisis de la potencia se establecerá para un cierto número de pocillos de detección de réplica que minimizará falsos negativos (p. ej., $N = 4$) y desplazará la carga de distinguir los falsos positivos de aciertos reales al rastreo de confirmación de dosis-respuesta. La clasificación de rango de los compuestos se realiza sobre la base del mecanismo de ensayo de acción secundario y propiedades físico-químicas de las estructuras de los compuestos. Determinados compuestos de ensayo invierten de manera significativa los efectos de oligómeros de Abeta, pero no afectan al metabolismo neuronal.

La Fracción 1A se dosificó en el ensayo de MTT y demostró que bloquea la aceleración de la exocitosis inducida por oligómeros de Abeta con una CE_{50} de 10,5 μM , lo que indica que tanto el Componente 1A-1 como el Componente 1A-2 bloquean/reducen la actividad/efecto de oligómeros de Abeta sobre las células neuronales.

La Fracción 2A se dosificó en el ensayo MTT y se demostró que bloquea la aceleración de la exocitosis inducida por oligómeros de Abeta con una CE_{50} de 25,4 μM , lo que indica que tanto el Componente 2A-1 como el Componente 2A-2 bloquean/reducen la actividad/efecto de oligómeros de Abeta sobre las células neuronales.

35 Ejemplo BB: Ensayo de unión

Cada uno de los compuestos de ensayo se añadió a una placa, seguido de una adición de uno o más oligómeros de Abeta 1-42. Las placas se fijaron con paraformaldehído al 3,7% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 15 min. A continuación, la placa se lavó 3 veces con PBS durante 5 min en cada caso. Las placas se bloquearon a temperatura ambiente durante 1 hora en suero de cabra al 5% y Triton X-100 al 0.5% (número CAS: 9002-93-1) en PBS. Los anticuerpos primarios (anti-MAP 2 policlonal, Millipore n° AB5622 y anti-beta-amiloide monoclonal 6E10, Convance n° SIG-39300) se diluyeron en la relación 1:1000 en suero de cabra al 5% con PBS. Los anticuerpos primarios se incubaron durante la noche a 4°C o durante 1 hora a TA. A continuación, la placa se lavó 3 veces con PBS durante 5 min cada vez. Los anticuerpos secundarios (Alexa Fluor 488 policlonaes, Invitrogen n° A11008 y Alexa Fluor 647 monoclonal, Invitrogen n° A21235) se diluyeron en la relación 1:1000 en suero de cabra al 5% con PBS. Los anticuerpos secundarios se incubaron a TA durante 1 h. Las placas se lavaron una vez con PBS. A continuación, se aplicó DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Invitrogen) a razón de 0,03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se incubó a TA durante 5 min, y luego se lavó con PBS. Se llevó a cabo un proceso de formación de imágenes para el análisis.

Procesos similares para los ensayos de unión se pueden encontrar en la bibliografía. Véase, p. ej., Look GC, et al. Discovery of ADDL – targeting small molecule drugs for Alzheimer's disease. Curr Alzheimer Res. diciembre de 2007; 4(5):562-7. Review.

Se determinó que la CE_{50} de la Fracción 2A era 14,5 μM de acuerdo con el ensayo de unión.

Preparados de oligómeros de Abeta:

Péptido amiloide humano 1-42 se obtiene de California Peptide, con elección del lote supeditada al análisis de control de calidad. Oligómeros de Abeta 1-42, hechos de acuerdo con los métodos publicados [Véase, p. ej., Dahlgren et al., "Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability" J Biol Chem. 30 de agosto de 2002;277(35):32046-53. Epub 10 de junio de 2002; LeVine H 3º. "Alzheimer's beta-peptide oligomer formation at physiologic concentrations" Anal Biochem. 1 de diciembre de 2004;335(1):81-90; Shrestha et al., "Amyloid beta peptide adversely affects spine number and motility in hippocampal neurons" Mol Cell Neurosci. noviembre de 2006;33(3):274-82. Epub 8 de septiembre de 2006; Puzzo et al., "Amyloid-beta peptide inhibits activation of the nitric oxide/cGMP/cAMP-responsive element-binding protein pathway during hippocampal synaptic plasticity" J Neurosci. 20 de Julio de 2005;25(29):6887-97; Barghorn et al., "Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease" J Neurochem. noviembre de 2005;95(3):834-47. Epub 31 de agosto de 2005; Johansson et al., Physicochemical characterization of the Alzheimer's disease related peptides A beta 1-42 Arctic and A beta 1-42wt. FEBS J. Junio de 2006;273(12):2618-30], así como oligómeros de Abeta derivados del cerebro (Véase, p. ej., Walsh et al., Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potentially inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. Nature (2002). 416, 535-539; Lesne et al., A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. Nature. 16 de marzo de 2006;440(7082):352-7; Shankar et al, Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. Nat Med. agosto de 2008;14(8):837-42. Epub 22 de junio de 2008) servirán como controles positivos. Los controles de calidad de los preparados de oligómeros consisten en transferencias Western para determinar intervalos de tamaño y concentraciones relativas de oligómeros, y el ensayo de MTT para confirmar la aceleración de la excitotoxicidad sin toxicidad. La toxicidad se vigila en cada uno de los ensayos basado en imágenes a través de la cuantificación de la morfología del núcleo visualizada con el colorante DAPI de unión a ADN (Invitrogen). Los núcleos que son fragmentados se consideran que se encuentran en apoptosis de etapa tardía (Majno y Joris Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. Am J Pathol 1995; 146:3-16)). Se rechazan lotes de péptidos que producen intervalos de tamaños de péptidos inusuales o una toxicidad significativa a concentraciones estándares en neuronas.

PROCESAMIENTO DE IMÁGENES

Las imágenes fueron capturadas y analizadas con la plataforma de microscopio automatizado Cellomics VTI, utilizando el algoritmo Neuronal Profiling. Para el análisis estadístico se utilizó una comparación por pares de Tukey-Kramer con varianza desigual.

30 BORRONES DE TRANSFERENCIA WESTERN

Muestras que contienen Abeta 1-42 se diluyeron (1:5) en tampón de muestra marcador de pista no reductor (Pierce nº 1859594). Una muestra de 30 microlitros (µL) se cargó en un gel de Tris-HCl al 4-15% prefabricado de dieciocho pocillos (BIORAD nº 345-0028). La electroforesis se realizó en un sistema de gel prefabricado BIO-RAD Criterion utilizando tampón de Tris-glicina a 125 voltios (V) durante 90 minutos. Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa 0,2 µM en Tris-glicina/tampón metanol al 10% a 30V durante 120 minutos. Las membranas se hirvieron durante 5 minutos en una disolución de PBS y se bloquearon durante la noche con disolución de TBS/leche al 5% a 4°C. La membrana se sondeó con 6E10-HRP (Covance nº SIG-39345) diluida a 10 µg/ml en disolución de TBS/leche al 1% durante una hora a temperatura ambiente. La membrana se lavó tres veces durante 40 minutos en cada caso con una disolución de TBS/tween-20 al 0,05% y se desarrolló con reactivo ECL (BIO-RAD nº 162-0112) durante 5 minutos. La adquisición de imágenes se realizó en un sistema de formación de imágenes Alpha Innotech FluorChem Q cuantitativo y se analizó con el software AlphaView Q.

Se demostró que la Fracción 1A bloquea parcialmente la unión del ligando oligómero de Abeta a neuronas en un 33% de acuerdo con el ensayo de unión (utilizando el algoritmo de procesamiento de imágenes).

45 Se demostró que la Fracción 2A bloquea parcialmente la unión del ligando oligómero de Abeta a neuronas en un 35% de acuerdo con el ensayo de unión (utilizando el algoritmo de procesamiento de imágenes).

ESTUDIOS DE PK:

Estudios de PK se realizan en CEREP Inc de Redmond WA, de acuerdo con sus protocolos estándares: Las muestras de plasma fueron procesadas utilizando la precipitación de acetonitrilo y se analizaron mediante HPLC-MS o HPLC-MS/MS. Se registraron las áreas de los picos, y las concentraciones del compuesto de ensayo en las muestras de plasma desconocidas se determinaron utilizando la curva de calibración respectiva. Se determinó el intervalo lineal reportable del ensayo, junto con el límite inferior de cuantificación (LLQ).

ESPECTROSCOPÍA DE RMN Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS:

Las fracciones activas fueron analizadas mediante ^1H RMN (espectrómetro de RMN Varian 500 MHz) y los compuestos purificados se caracterizaron utilizando una combinación 1D y 2D de experimentos de ^1H RMN y experimentos de ^{13}C RMN. La prueba de la estructura se obtuvo utilizando estas técnicas de RMN en combinación con espectrometría de masas de baja resolución para determinar el peso molecular y la espectrometría de masas de alta resolución (Thermo Finnigan LCQ Ion trap) para determinar la composición de materia.

Ejemplo CC: Estudios farmacocinéticos

Los estudios farmacocinéticos se realizaron de acuerdo con los siguientes protocolos: Las muestras de plasma fueron procesadas utilizando la precipitación de acetonitrilo y se analizaron mediante HPLC-MS o HPLC-MS/MS. Se registraron las áreas de los picos, y las concentraciones de compuesto de ensayo en las muestras de plasma desconocidas se determinaron utilizando la curva de calibración respectiva. Se determinó el intervalo lineal reportable del ensayo, junto con el límite inferior de cuantificación (LLQ). Por ejemplo, se determinó que el Componente 1A-1 tiene una vida media de 50 minutos en el plasma de ratas cuando se inyectó por vía intravenosa a 1 mg/kg. Se determinó que el Componente 1A-2 tiene una vida media de 70 minutos en el plasma de ratas cuando se inyectó por vía intravenosa a 1 mg/kg y se determinó que el Componente 2A-1 tiene una vida media de 180 minutos en el plasma de ratas cuando se inyectó por vía intravenosa a 1 mg/kg. Sin embargo, la condición experimental utilizada no dio una semi-elevación detectable para el Componente 2A-2.

Ejemplo DD: Ensayo de Inhibición de la Formación de Oligómeros de Abeta

La formación de oligómeros de Abeta 42 se puede ensayar fácilmente en un formato de múltiples pocillos y se utiliza para determinar la capacidad de un compuesto de ensayo de bloquear la formación oligómeros solubles de peso molecular alto (> 20 kDa). Véase, p. ej., ensayos descritos en Harry Le Vine III, "Biotin-avidin interaction-based screening assay for Alzheimer's β -peptide oligomer inhibitors", *Analytical Biochemistry* 356 (2006) 265-272.

100 μL de diferentes concentraciones de un compuesto de ensayo en NaP; 50 mM, NaCl 150 mM y NaN_3 al 0,02% (p/v) pH 7,5 se añadió a los pocillos de una placa de 96 pocillos que contenía 2 μL de HFIP (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol) despolimerizado reciente 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bio-Abeta42 en DMSO, dando una concentración total de 50 ng/ml (11 nM) de péptido y DMSO al 2% (v/v). Después de 30 min a temperatura ambiente, partes alícuotas de 50 μL se transfirieron a una placa de ensayo de un solo sitio NA/SA-HRP (NeutrAvidin / anticuerpo secundario y estreptavidina-peroxidasa de rábano picante). Se añaden 100 μL de disolución de sustrato de tetrametilbencidina/ H_2O_2 y la placa se incuba a temperatura ambiente durante 2-30 min, dependiendo de la concentración de péptido bio-Abeta 42 en el ensayo. La $\text{DO}_{450\text{nm}}$ se determina en un lector de placas Biotech Synergy HT después de detener la reacción con 100 μL de H_2SO_4 al 1% (v/v). La capacidad de un compuesto de ensayo de bloquear la formación oligómeros solubles de alto peso molecular (> 20 kDa) se determina mediante la concentración del péptido bio-Abeta 42 formado. Véase *id.*

De acuerdo con el ensayo, la Fracción 1A no inhibe la formación de oligómeros de Abeta. Por lo tanto, la Fracción 1A inhibe probablemente la unión del oligómero Abeta a las neuronas actuando directamente sobre los receptores neuronales para prevenir la unión del oligómero o provocando que se desensamblen los oligómeros de Abeta.

Ejemplo EE: Un ensayo de rastreo funcional basado en neuronas primarias para detectar bloqueadores de oligómeros de Abeta de moléculas pequeñas.

Neuronas de rata primarias, cultivadas durante al menos 3 semanas *in vitro* fueron elegidas como la base para este ensayo de rastreo. Estas neuronas expresan el complemento completo de proteínas sinápticas características de las neuronas en el cerebro maduro, y exhiben una compleja red de señalización eléctrica dependiente de la actividad. Las neuronas y glía en cultivos de este tipo tienen redes de señalización molecular que exhiben un excelente registro con un circuitaría del cerebro intacto, y por esta razón se han utilizado durante más de dos décadas como un sistema modelo para el aprendizaje y la memoria (Véase, p. ej., Kaech S, Banker G. Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc.* 2006;1(5):2406-15. Epub 11 de enero de 2007; véase también Craig AM, Graf ER, Linhoff MW. How to build a central synapse: clues from cell culture. *Trends Neurosci.* enero de 2006;29(1):8-20. Epub 7 de diciembre de 2005. Review). Sistemas más complejos tales como cortes de cerebro agudos u organotípicos son muy útiles, pero no son susceptibles a un rastreo de alto rendimiento. Líneas de células neuronales inmortalizadas o transformadas son susceptibles a un rastreo de alto rendimiento, pero no replican la señalización dependiente del estado electrofisiológico de cultivos neuronales primarios y es improbable que modelen adecuadamente las alteraciones sutiles en esta señalización que son provocadas por oligómeros durante las manifestaciones más tempranas del estado patológico (Véase, p. ej., Görtz P, Fleischer W, Rosenbaum C, Otto F, Siebler M. Neuronal network properties of human teratocarcinoma cell line-derived neurons. *Brain Res.* 20 de agosto de 2004;1018(1):18-25). Por esta razón, los cultivos neuronales primarios fueron escogidos debido a su capacidad para ser utilizados en rastreos de gran rendimiento y a la fidelidad de lo que ocurre *in vivo*.

Formazán reducido era primero visible en vesículas intracelulares (Figura 1A). Ejemplo de neuronas llenas de vesículas marcadas después de la endocitosis del colorante y la reducción en un producto púrpura insoluble. (Barra de escala = 20 micras en la Figura 1A). La exocitosis con formazán final fue acelerada a través de oligómeros de Abeta en las neuronas del hipocampo maduras *in vitro* (Figura 1B). Microfotografía de ejemplo de neuronas cubiertas con colorante púrpura insoluble que han sido extrudidas mediante exocitosis. El colorante precipitó en el entorno acuoso del cultivo y se formaron cristales en forma de aguja en la superficie de la neurona. (Figura 1B). La tasa de endocitosis fue alterada en presencia de oligómeros de Abeta. (Figura 1C) La tasa de exocitosis fue alterada en presencia de oligómeros de Abeta (Figura 1D).

Dado que los déficits sinápticos y de memoria, y no la muerte celular generalizada, predominan en las etapas más tempranas de la enfermedad de Alzheimer, se pueden utilizar ensayos que miden estos cambios para descubrir inhibidores de moléculas pequeñas de la actividad de los oligómeros. El ensayo de MTT se puede utilizar como una medida de la toxicidad en cultivos. Sales de tetrazolio amarillas fueron endocitosadas por las células y reducidas a formazán púrpura insoluble en la vía endosomal. El nivel de formazán púrpura era un reflejo del número de células que se metabolizan activamente en el cultivo, y la reducción en la cantidad de formazán se tomó como una medida de la muerte celular o la toxicidad metabólica en cultivo. Cuando se observa a través de un microscopio, el formazán púrpura era primero visible en vesículas intracelulares que llenan la célula (Figura 1A). Con el tiempo, las vesículas se exocitaron y el formazán precipitó como cristales en forma de aguja sobre la superficie externa de la membrana plasmática a medida que el formazán insoluble era expuesto al entorno de los medios acuosos (Figura 1B). Las células responden a niveles subletales de oligómeros de Abeta selectivamente acelerando la tasa de exocitosis de formazán reducido, al tiempo que no afectan a la tasa de endocitosis, que se puede ver en neuronas primarias maduras *in vitro* y se cuantifican estos cambios morfológicos a través de microscopía automatizada y procesamiento de imágenes. En un punto dado en el tiempo después de la adición de sal de tetrazolio al pocillo del cultivo, las células tratadas con vehículo tenían la apariencia de las de la Figura 1A, mientras que las células tratadas con oligómeros de Abeta tenían la apariencia de las de la Figura 1B. Bajo estas circunstancias, no se produjo un cambio global en la cantidad total de formazán reducido, simplemente un desplazamiento en su morfología. Este ensayo es sensible a niveles bajos de oligómeros que no provocan la muerte celular.

La evidencia sugiere que la reducción mediada por oligómeros de Abeta en la expresión del receptor de la superficie neuronal mediada por el tráfico de membrana son la base para la inhibición de oligómeros de medidas electrofisiológicas de plasticidad sináptica (LTP) y, por lo tanto, del aprendizaje y la memoria (Véase Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R. APP processing and synaptic function. *Neuron*. 27 de marzo de 2003;37(6):925-37; y Hsieh H, Boehm J, Sato C, Iwatsubo T, Tomita T, Sisodia S, Malinow R. AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron*. 7 de diciembre de 2006;52(5):831-43). Los cambios en la medición de la tasa de tráfico de la membrana inducida por oligómeros a través de desplazamientos morfológicos de formazán han sido utilizados en líneas celulares para descubrir fármacos que bloquean oligómeros de Abeta [Maezawa I, Hong HS, Wu HC, Battina SK, Rana S, Iwamoto T, Radke GA, Pettersson E, Martin GM, Hua DH, Jin LW. A novel tricyclic pyrone compound ameliorates cell death associated with intracellular amyloid-beta oligomeric complexes. *J Neurochem*. Julio de 2006;98(1):57-67; Liu Y, Schubert D. Cytotoxic amyloid peptides inhibit cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction by enhancing MTT formazan exocytosis. *J Neurochem*. diciembre de 1997;69(6):2285-93; Liu Y, Dargusch R, Banh C, Miller CA, Schubert D. Detecting bioactive amyloid beta peptide species in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. noviembre de 2004;91(3):648-56; Liu Y, Schubert D. Treating Alzheimer's disease by inactivating bioactive amyloid beta peptide. *Curr Alzheimer Res*. abril de 2006;3(2):129-35; Rana S, Hong HS, Barrigan L, Jin LW, Hua DH. Syntheses of tricyclic pyrones and pyridinones and protection of Abeta-peptide induced MC65 neuronal cell death. *Bioorg Med Chem Lett*. 1 de febrero de 2009;19(3):670-4. Epub 24 de diciembre de 2008; y Hong HS, Maezawa I, Budamagunta M, Rana S, Shi A, Vassar R, Liu R, Lam KS, Cheng RH, Hua DH, Voss JC, Jin LW. Candidate anti-Abeta fluorine compounds selected from analogs of amyloid imaging agents. *Neurobiol Aging*. 18 de noviembre de 2008 (Epub antes de la impresión)] that lower Abeta brain levels in rodents in vivo [Hong HS, Rana S, Barrigan L, Shi A, Zhang Y, Zhou F, Jin LW, Hua DH. Inhibition of Alzheimer's amyloid toxicity with a tricyclic pyrone molecule in vitro and in vivo. *J Neurochem*. febrero de 2009;108(4):1097-1108].

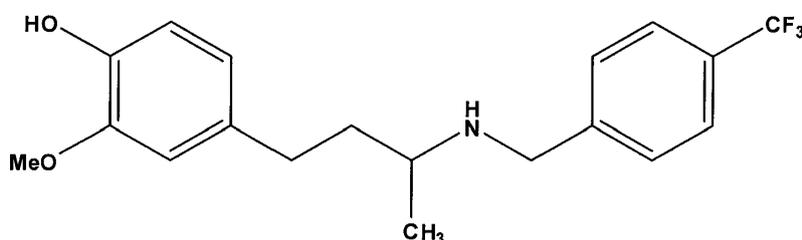
El ensayo de exocitosis fue adaptado para uso con cultivos neuronales primarios maduros cultivados durante 3 semanas *in vitro*. Los oligómeros de Abeta provocaron una disminución dependiente de la dosis en la cantidad de vesículas intracelulares (puntos lagrimales) llenos de formazán púrpura reducido (Figura 2A, cuadrados; la dosis de 3 μ M corresponde a la imagen en la Figura 2C), medida a través del procesamiento de imágenes utilizando un sistema de microscopía automatizada Celloomics VT1. El aumento de la cantidad de oligómeros de Abeta resultó finalmente en una toxicidad manifiesta. Por lo tanto, la concentración de oligómeros de Abeta neuroactivos era mucho menor que la que provocaba la muerte de las células. Esta disminución puede ser bloqueada por la adición de cantidades estequiométricas de anticuerpo monoclonal anti-Abeta 6E10 (IgG) a los cultivos antes de la adición del oligómero (Figura 2A, círculo; el círculo corresponde a la imagen en la Figura 2D; anticuerpo solo [triángulo de abajo] no tiene efecto alguno sobre las neuronas). Se han sometido a ensayo varios compuestos de los que se ha informado que bloquean los efectos de oligómeros de Abeta, incluyendo el azúcar-alcohol escilo-inositol (AZD-103),

el antagonista de nAChR bromuro de hexametonio y los antagonistas de NMDAR MK-801 y ninguno era activo (Fenili et al., '07, Calabrese et al., '06, LeCor et al., '07).

El ensayo fue optimizado para el comportamiento en placas de microtitulación de 384 pocillos con la robótica automatizada de manipulación de líquidos para el formateado del compuesto y la estampación de la placa de ensayo, logrando rutinariamente una separación doble estadísticamente significativa entre el vehículo y las neuronas tratados con oligómeros de Abeta (test-t de Student, varianza desigual). Los compuestos se añadieron a las neuronas primero, y luego se añadieron oligómeros. Cuando se configura de esta manera el ensayo era capaz de detectar compuestos que actúan a través de la interrupción de oligómeros, la inhibición de la unión de oligómeros a las neuronas o la neutralización de los mecanismos de transducción de señales de acción iniciada por la unión de oligómeros.

Los compuestos se consideraron activos si bloquean significativamente cambios mediados por Abeta en el tráfico de membrana, pero no afectan de manera significativa el tráfico de membrana cuando se dosifica por su cuenta. Un ejemplo se muestra en la Figura 2B; CT0109 inhibe los efectos de oligómeros en el tráfico de membrana con una CE_{50} de 7 μ M.

CT0109 es is 4-(3-(4-(trifluorometil)bencilamino)butil)-2-metoxifenol, cuya estructura es:



La Figura 2A muestra una disminución dependiente de la dosis de vesículas llenas de formazán intracelulares (puntos lagrimales) provocada por la aceleración del tratamiento del oligómero Abeta 42 de exocitosis (cuadrados). Los efectos de oligómeros fueron bloqueados por IgG anti-Abeta (círculo y triángulo arriba; círculo se refiere a cantidad esteoica de IgG, es decir, 3 μ M de A β y 1,5 μ M de IgG; triángulo arriba se refiere a IgG sub-esteoica, es decir, 3 μ M de A β y 0,5 μ M de IgG). La propia IgG (triángulo abajo) no tiene efecto alguno. La Figura 2B muestra CT0109, que inhibe los efectos de oligómeros en el tráfico de membrana. La figura 2C muestra micrografías representativas de las neuronas del hipocampo 21 DIV *in vitro* que muestran los efectos de oligómeros en el tráfico de membrana (que corresponde a punto de datos 3 μ M en la Figura 2A); y la Figura 2D muestra el bloqueo por parte de anticuerpos anti-Abeta (correspondientes al círculo en la Figura 2A). Los datos eran la media de 3 experimentos. Barra de escala = 20 micras en la Figura 2D.

Ejemplo FF: Ensayo de Acondicionamiento al Miedo

CT0109 se sometió a ensayo en un modelo animal de una tarea de comportamiento dependiente de la memoria, conocida como acondicionamiento al miedo. El protocolo de estudio fue diseñado en base a los protocolos publicados (Véase, p. ej. Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fa M, Staniszewski A, Palmeri A, Arancio O. Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci.* 31 de diciembre de 2008;28(53):14537-45). La formación de recuerdos contextuales depende de la integridad de las estructuras del lóbulo temporal medio tales como el hipocampo. En este ensayo los ratones fueron entrenados para recordar que un contexto particular saliente (estímulo condicionado; CS) se asocia con un evento aversivo, en este caso un leve choque en la pata (el estímulo no condicionado, US). Los animales que muestren un buen aprendizaje expresarán un aumento en el comportamiento de congelación cuando se coloca de nuevo en el mismo contexto. Esta congelación está ausente en un contexto nuevo. El aumento de la congelación en el contexto indica una fuerte formación de la memoria dependiente del hipocampo en animales. La memoria ensayada en el Acondicionamiento al Miedo es sensible a las elevaciones de A β soluble. La Figura 3 muestra los resultados de la administración de oligómeros de Abeta (barra marcada con "a") durante el entrenamiento resulta en déficits de memoria cuando los animales se someten a ensayo 24 más tarde, en comparación con la administración del vehículo (barra marcada con "b"). CT0109 era efectivo para detener los efectos mediados por oligómeros de Abeta en el tráfico de membrana (Figura 3). Cuando se administra a los animales antes de la administración de oligómeros de Abeta, CT0109 bloqueaba los efectos de oligómeros en la memoria de una manera dependiente de la dosis. El compuesto bloqueó completamente los déficits de memoria mediados por oligómeros a la dosis 2 pmol (Figura 3, barra marcada con "d"). Esta eficacia del comportamiento demuestra que el ensayo de tráfico de membrana es capaz de predecir qué compuestos serán eficaces en el tratamiento de la pérdida de la memoria del comportamiento provocada por oligómeros. El modelo de estado de miedo para la memoria se realizó como se describe en esta memoria.

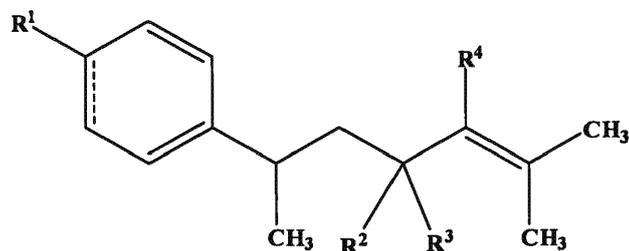
5 La Figura 3 muestra que Abeta produce déficits significativos en la formación de la memoria la frente a vehículo ($p < 0,05$) en la tarea de memoria acondicionada al miedo contextual. La Figura 3 muestra que la dosis de 2 pmol de CT0109 + Abeta (200 nM) bloqueó completamente el efecto de Abeta en la memoria ($p < 0,05$, ANOVA de una vía, comparación post hoc con corrección de Bonferroni). No se observó efecto alguno del compuesto (datos no mostrados). No se observaron cambios en el comportamiento adversos a cualquier dosis.

10 Todas las características descritas en la memoria descriptiva, incluyendo el resumen y los dibujos, y todas las etapas de cualquier método o procedimiento descrito, pueden combinarse en cualquier combinación, excepto combinaciones en las que al menos algunas de tales características y/o etapas son mutuamente excluyentes. Cada una de las características descritas en la memoria descriptiva, incluyendo resumen y los dibujos, se puede sustituir por características alternativas que sirvan el mismo, equivalente o similar propósito, a menos que se indique expresamente lo contrario. Por lo tanto, a menos que se indique expresamente lo contrario, cada una de las características descritas es un ejemplo solamente de una serie genérica de características equivalentes o similares. Diversas modificaciones de la invención, además de las descritas en esta memoria, resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción que antecede. Tales modificaciones también pretenden caer dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

15

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula de I-0:



I-0

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

5 ----- es un enlace sencillo o un doble enlace

R¹ es H, CH₃, CF₃, F, Cl, Br o -OCF₃;

10 R² es H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇ o arilo C₆₋₁₀, en donde cada uno de los alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇ o arilo C₆₋₁₀ está sustituido con 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituyentes cada uno independientemente seleccionado de OH, amino, halo, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ y haloalcoxi C₁₋₆;

R³ es NR^{3a}R^{3b}, en donde

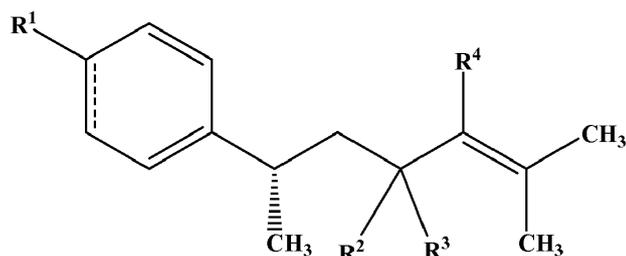
15 R^{3a} es H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilalquilo, cicloalquilo C₃₋₇, arilalquilo o arilo C₆₋₁₀, en donde cada uno de los alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilalquilo, cicloalquilo C₃₋₇, arilalquilo o arilo C₆₋₁₀, está sustituido con 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituyentes cada uno independientemente seleccionado de OH, amino, halo, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ y haloalcoxi C₁₋₆; y

20 R^{3b} es H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilalquilo, cicloalquilo C₃₋₇, arilalquilo o arilo C₆₋₁₀, en donde cada uno de los alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilalquilo, cicloalquilo C₃₋₇, arilalquilo o arilo C₆₋₁₀, está sustituido con 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituyentes cada uno independientemente seleccionado de OH, amino, halo, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ y haloalcoxi C₁₋₆;

o R^{3a} y R^{3b}, junto con el átomo de N al que están unidos, forman un grupo heterocicloalquilo de 4, 5, 6 ó 7 miembros que está sustituido con 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituyentes cada uno independientemente seleccionado de OH, amino, halo, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, haloalcoxi C₁₋₆, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, cicloalquilo y heterocicloalquilo; y

25 R⁴ es H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇ o arilo C₆₋₁₀, en donde cada uno de los alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇ o arilo C₆₋₁₀ está sustituido con 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituyentes cada uno independientemente seleccionado OH, amino, halo, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ y haloalcoxi C₁₋₆.

30 2. El compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es un compuesto de Fórmula I:



I

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y en donde R¹, R², R³ y R⁴ son como se definen en la reivindicación 1.

- 5 3. El compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R¹ es CH₃.
4. El compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R² es H.
5. El compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R^{3a} es H; y R^{3b} es alquilo C₁₋₆.
6. El compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R⁴ es H.
- 10 7. El compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el compuesto se selecciona de:

N-isobutil-2-metil-6-*p*-tolilhept-2-en-4-amina;

N-isobutil-2-metil-6-(4-metilciclohexa-1,5-dienil)hept-2-en-4-amina,

(6*S*)-*N*-isobutil-2-metil-6-*p*-tolilhept-2-en-4-amina;

- 15 (6*S*)-*N*-isobutil-2-metil-6-(4-metilciclohexa-1,5-dienil)hept-2-en-4-amina;

(6*R*)-*N*-isobutil-2-metil-6-*p*-tolilhept-2-en-4-amina; y

(6*R*)-*N*-isobutil-2-metil-6-(4-metilciclohexa-1,5-dienil)hept-2-en-4-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 20 8. Un método de formar un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, comprendiendo el método:

(a) hacer reaccionar un aceite de cúrcuma con 4-isobutilamina bajo condiciones de aminación reductora para producir un producto bruto, en donde la relación del aceite de cúrcuma a 4-isobutilamina es 3,4 : 1 en peso; y

- 25 (b) aislar una composición que comprende al menos 80% en peso de un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en donde el compuesto tiene un pico del espectro de masas analítico de [M+H⁺] a 274,3.

9. El método de la reivindicación 8, en el que el espectro de ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto comprende los picos de los siguientes desplazamientos químicos: δ 7,11, 7,09, 5,23, 3,72, 2,94, 2,51, 2,34, 2,31, 1,92, 1,72, 1,71, 1,58, 1,29, 1,27, 0,92 y en el que el espectro de ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) del compuesto comprende los picos de los siguientes desplazamientos químicos: δ 144,3, 135,4, 135,0, 129,0, 126,9, 126,7, 67,0, 49,3, 46,4, 35,1, 32,5, 25,8, 21,0, 20,7, 18,4.
- 30

10. Un método de formar un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, comprendiendo el método:

(a) hacer reaccionar un aceite de cúrcuma con 4-isobutilamina bajo condiciones de aminación reductora para producir un producto bruto, en donde la relación del aceite de cúrcuma a 4-isobutilamina es 3,4 : 1 en peso; y

5 (b) aislar una composición que comprende al menos 80% en peso de un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en donde el compuesto tiene un pico del espectro de masas analítico de $[M+H]^+$ a 276,3.

10 11. El método de la reivindicación 10, en el que el espectro de 1H RMN (500 MHz, $CDCl_3$) del compuesto comprende los picos de los siguientes desplazamientos químicos: δ 5,77, 5,65, 5,45, 5,23, 3,96, 2,94, 2,93, 2,51, 2,31, 2,30, 2,05, 1,92, 1,72, 1,71, 1,58, 1,29, 1,27, 0,92 y en el que el espectro de ^{13}C RMN (125 MHz, $CDCl_3$) del compuesto comprende los picos de los siguientes desplazamientos químicos: δ 144,5, 135,4, 131,0, 127,9, 126,7, 120,8, 66,7, 49,3, 46,4, 35,1, 32,5, 25,8, 21,8, 21,79, 20,7, 18,4.

12. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un soporte farmacéuticamente aceptable.

15 13. 2-metil-6-*p*-tolilhept-2-en-4-ol, (6*S*)-2-metil-6-*p*-tolilhept-2-en-4-ol, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o el compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en un método de inhibir, tratar y/o reducir el deterioro of cognitivo y/o la enfermedad de Alzheimer.

20 14. 2-metil-6-*p*-tolilhept-2-en-4-ol, (6*S*)-2-metil-6-*p*-tolilhept-2-en-4-ol, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o el compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el método de inhibir, tratar y/o reducir el deterioro of cognitivo y/o la enfermedad de Alzheimer comprende inhibir, tratar o reducir uno o más de los síntomas de pérdida de memoria, confusión, deterioro del juicio, cambios de personalidad, desorientación y pérdida de habilidades lingüísticas.

25 15. 2-metil-6-*p*-tolilhept-2-en-4-ol, (6*S*)-2-metil-6-*p*-tolilhept-2-en-4-ol, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o el compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el método de inhibir, tratar y/o reducir el deterioro of cognitivo y/o la enfermedad de Alzheimer comprende uno o más de

- 30 (i) restaurar la potenciación a largo plazo, y/o
 (ii) inhibir, tratar o reducir la neurodegeneración;
 (iii) inhibir, tratar o reducir la amiloidosis general,
 (iv) inhibir, tratar o reducir uno o más de la producción de amiloide, el ensamblaje de amiloide, la agregación de amiloide, la unión de oligómero de amiloide y la deposición de amiloide; y/o
 (v) inhibir, tratar o reducir la actividad/efecto de uno o más oligómeros de Abeta en una célula neuronal.

16. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el compuesto se selecciona de:

2-metil-6-(4-metilciclohexa-1,5-dienil)hept-2-en-4-ol;

35 (6*S*)-2-metil-6-(4-metilciclohexa-1,5-dienil)hept-2-en-4-ol; y

(6*R*)-2-metil-6-(4-metilciclohexa-1,5-dienil)hept-2-en-4-ol.

Figura 1

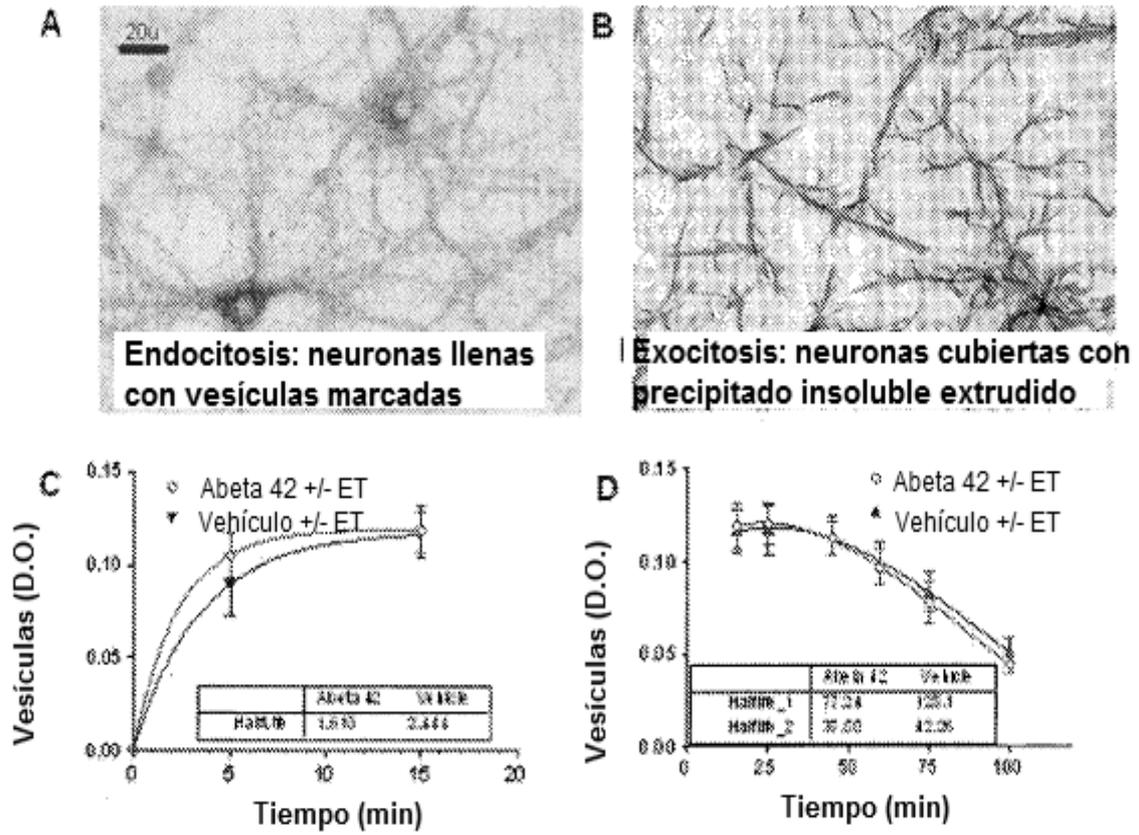


Figura 2

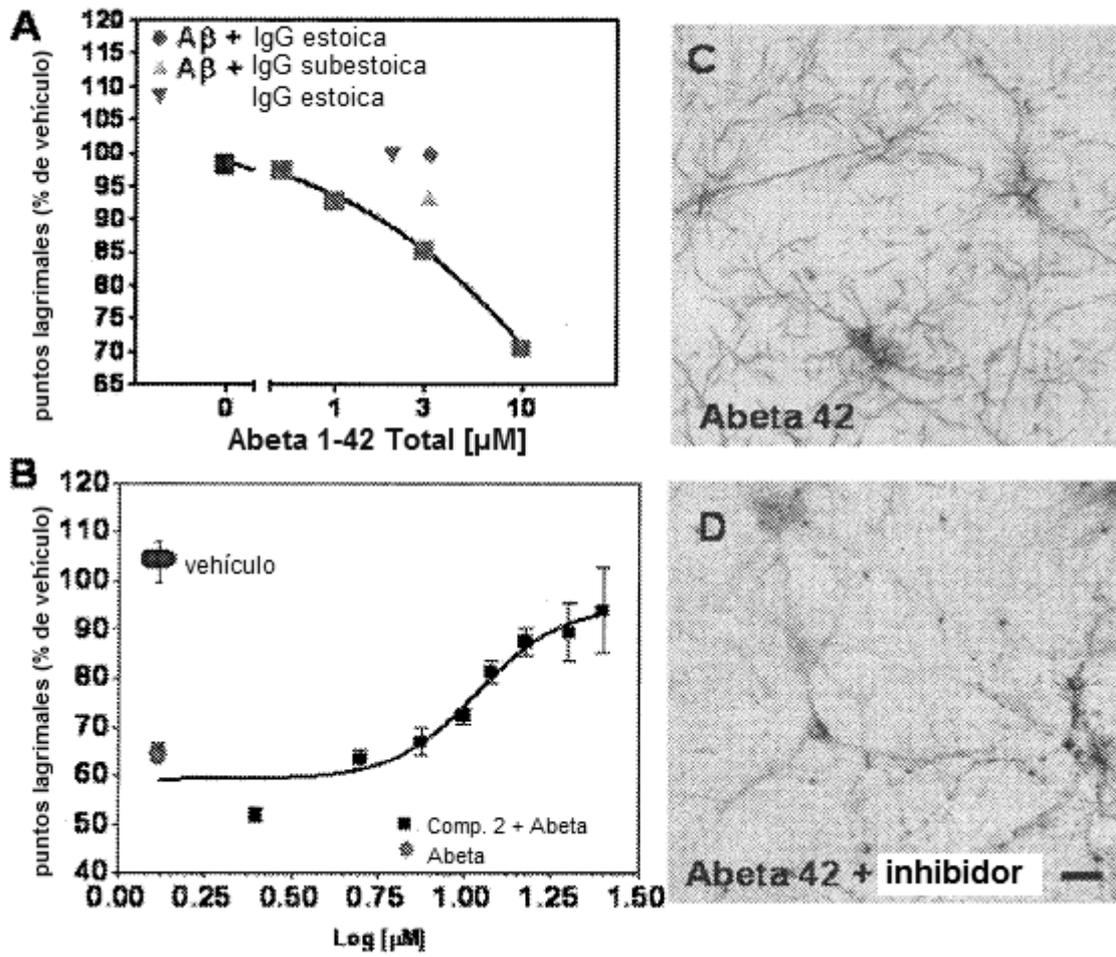
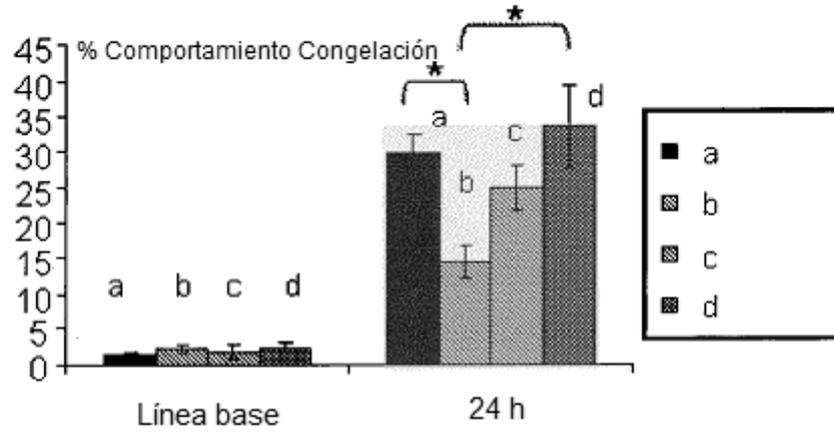


Figura 3

Acondicionamiento de Miedo Contextual



- a. Vehículo (N=10)
- b. Abeta (N = 10)
- c. Compuesto Ejemplo 2 (1 pmol) + Abeta (N = 12)
- d. Compuesto Ejemplo 2 (2 pmol) + Abeta (N = 9)