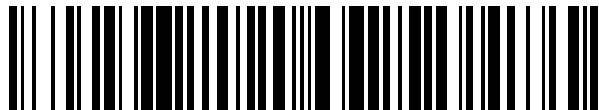


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 924**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/4725** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.04.2013 PCT/EP2013/057241**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.10.2013 WO2013150150**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2013 E 13714652 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016 EP 2833887**

54 Título: **Un antagonista del receptor H3 para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

**06.04.2012 EP 12305415**  
**15.03.2013 US 201361792635 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.06.2017**

73 Titular/es:

**SANOFI (100.0%)**  
**54, rue La Boétie**  
**75008 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**BARNEOUD, PASCAL;**  
**BLANCHARD-BREGEON, VÉRONIQUE;**  
**DELAY-GOYET, PHILIPPE;**  
**MARY, VÉRONIQUE;**  
**MENAGER, JEAN;**  
**LOPEZ GRANCHA, MATHILDE;**  
**ROONEY, THOMAS y**  
**SCHUSSLER, NATHALIE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 618 924 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**

Un antagonista del receptor H3 para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

La presente invención se refiere al compuesto 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida para uso en una terapia modificadora de la enfermedad para la enfermedad de Alzheimer (AD), otras taupatías y enfermedades neurodegenerativas relacionadas.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Las taupatías son un grupo de enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por la acumulación de proteína tau ( $\tau$ ) en el cerebro. La AD es la más frecuente de las taupatías y la forma más común de demencia. Otras taupatías y enfermedades neurodegenerativas relacionadas incluyen la enfermedad de Pick, la parálisis supranuclear progresiva, la degeneración corticobasal, la demencia fronto-temporal hereditaria, y el parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17).

La demencia es un trastorno del cerebro que afecta seriamente a la capacidad de una persona para realizar sus actividades diarias normales. La AD implica partes del cerebro que controlan el pensamiento, la memoria, y el lenguaje. A pesar de la intensa investigación realizada por todo el mundo, las causas de la AD, excepto para los raros casos publicados de mutaciones de genes en la AD familiar, todavía son desconocidas y no hay curación.

Existen varios tratamientos actualmente disponibles para los síntomas cognitivos de la AD. De los cinco fármacos que se utilizan actualmente en Estados Unidos de América para el tratamiento de la AD, cuatro de ellos son inhibidores de la acetilcolinesterasa. Otro fármaco, memantina, un antagonista del receptor de NMDA, está disponible para tratar la AD moderada a grave. Los fármacos utilizados actualmente para tratar los síntomas cognitivos de la AD, incluyendo la memantina y los inhibidores de la acetilcolinesterasa, son ligeramente eficaces, y no se ha demostrado que reduzcan ni detengan de modo efectivo la progresión de la enfermedad. Hay un interés creciente en el desarrollo de terapias que impidan la progresión patológica de la AD porque se cree que el proceso patofisiológico que lleva a la neurodegeneración en la AD empieza mucho antes de que se desarrollen los síntomas clínicos. Por lo tanto, existe una gran necesidad no satisfecha de fármacos que puedan reducir o detener la progresión patológica de la AD, y otras taupatías y enfermedades neurodegenerativas.

Los receptores H3 de histamina se encuentran en los sistemas nerviosos central y periférico. La administración de ligandos del receptor H3 de histamina puede influir en la secreción de neurotransmisores en el cerebro y en la periferia, y se ha considerado útil en el tratamiento de trastornos cognitivos, incluyendo la AD y otras demencias. Brioni et al. señalan que los antagonistas H3 posiblemente se podrían usar para terapia modificadora de la enfermedad en la AD (The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Vol. 336, No. 1, 38-46 (2011)).

La presente invención se basa en el nuevo resultado obtenido en estudios preclínicos de que el tratamiento con 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida puede hacer más lenta la progresión de la patología tau en un modelo de animal transgénico a dosis concordantes con las usadas en la población humana.

**SUMARIO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere al compuesto 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en la ralentización o detención de la progresión de la enfermedad de AD y otras taupatías y enfermedades neurodegenerativas relacionadas.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La Figura 1 ilustra los resultados de un análisis de transferencia Western de la fosforilación de tau sobre el epítipo AD2 (pSer396-pSer404) en el hipocampo (izquierda) y en la corteza (derecha) de ratones THY-Tau2 después de 6 meses de tratamiento con el ingrediente activo.

La Figura 2 ilustra la actividad protectora del ingrediente activo en la corteza de ratones THY-Tau22 frente a la hiperfosforilación anormal de tau (AT8 IHC) después de 6 meses de tratamiento.

La Figura 3 ilustra la actividad protectora del ingrediente activo en la corteza, en la subárea hipocámpica CA1, y en la amígdala de ratones THY-Tau22 frente a la formación de NFTs (ovillos neurofibrilares) (tinción de Gallyas) después de 6 meses de tratamiento.

La Figura 4 ilustra la actividad protectora del ingrediente activo frente al gen MIP-1 $\alpha$  sobre la expresión en el hipocampo de ratones THY-Tau22 después de 6 meses de tratamiento.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

Definiciones y abreviaturas

Tal como se han usado anteriormente, y a lo largo de la descripción de la invención, debe entenderse que las siguientes abreviaturas y símbolos, salvo que se indique otra cosa, tienen los siguientes significados:

	AD	Enfermedad de Alzheimer
	ADAS	Escala de evaluación de la enfermedad de Alzheimer
5	BSA	Seroalbúmina bovina
	CSF	Líquido cefalorraquídeo
	DSM-IV	Manual de diagnóstico y estadística de trastornos mentales (cuarta edición)
	MIP-1 $\alpha$	Proteína 1- $\alpha$ inflamatoria de macrófagos
	MRI	Obtención de imágenes por resonancia magnética
10	NFTs	Ovillos neurofibrilares
	PHF	Filamentos helicoidales apareados
	PBS	Disolución salina amortiguada con fosfato
	ROI	Regiones de interés
	Tg	Transgénico
15	WT	Tipo natural
	Veh	Vehículo

Como se ha usado anteriormente, y a lo largo de la descripción de la invención, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

20 “Ingrediente activo”, como se usa aquí, se refiere a 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, uno de sus hidratos o solvatos, o un solvato o hidrato de una sal farmacéuticamente aceptable.

25 “Impacto sobre la enfermedad subyacente” significa una mejora en la medida de uno o más biomarcadores u otros parámetros asociados con el proceso de la enfermedad que incluyen, por ejemplo, un marcador bioquímico en CSF o plasma, un cambio en el volumen del cerebro (o parte del cerebro), un cambio en la función cerebral tal como se mide mediante análisis de imagen funcional, cambios en histopatología o bioquímica, o un cambio en la cognición o la discapacidad. Los biomarcadores típicos que se pueden usar en los ensayos clínicos y en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer incluyen los analitos medidos en el CSF, tales como tau, fosfoTau, o beta-amiloide, por ejemplo.

30 “Paciente que necesita tratamiento” o “paciente que tiene una taupatía o enfermedad neurodegenerativa relacionada”, como se usa aquí, incluye pacientes 1) ya diagnosticados con una taupatía, por ejemplo AD, o enfermedad neurodegenerativa relacionada, en cualquier etapa clínica, incluyendo los pacientes que tienen desde una disfunción cognitiva leve hasta una demencia avanzada; y/o 2) los que tienen síntomas y signos precoces o prodrómicos de una taupatía, por ejemplo AD, o enfermedad neurodegenerativa relacionada; y/o 3) los que han sido diagnosticados como susceptibles a una taupatía, por ejemplo AD, o enfermedad neurodegenerativa relacionada, debida a la edad, hereditaria, un biomarcador medible, u otros factores, para 35 los que se recomienda médicamente un tratamiento para retrasar el inicio o la progresión o empeoramiento o deterioro de los síntomas o signos de enfermedad.

40 “Paciente” o “sujeto” incluye cualquier mamífero. Un “mamífero”, para los fines de tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, y similares. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

Como se usa aquí, los pacientes con “enfermedad de Alzheimer preclínica” son aquellos para los que el diagnóstico se basa en un biomarcador medible de la enfermedad de Alzheimer o en la detección de signos débiles de déficit cognitivos, sin deterioro funcional.

45 Tal como se usa en la presente memoria, pacientes con “disfunción cognitiva leve” son aquellos en los que está presente un déficit cognitivo, pero sin deterioro suficiente para constituir una demencia.

Como se usa aquí, los pacientes con “enfermedad de Alzheimer leve a moderada” son aquellos para los que el diagnóstico se basa en los criterios de DSM-IV para la Demencia tipo Alzheimer y en los criterios de

NINCDS/ADRDA para la AD probable (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke/AD and Related Disorders Association) con una puntuación del Examen Mental Breve (MMSE)  $\geq 10$  y  $\leq 25$ , y una puntuación global en la Investigación de Fármacos Cognitivos = 0,5, 1, o 2.

5 Como se usa aquí, los pacientes con “enfermedad de Alzheimer moderada a severa” son aquellos para los que el diagnóstico se basa en los criterios de DSM-IV para la Demencia tipo Alzheimer y en los criterios de NINCDS/ADRDA para la AD probable (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke/AD and Related Disorders Association) con una puntuación del Examen Mental Breve (MMSE) inferior a 19 y una puntuación global en la Investigación de Fármacos Cognitivos = 2 o 3.

10 Como se usa aquí, la frase “enfermedad neurodegenerativa relacionada” incluye, pero no se limita a, síndrome de Down, distrofia miotónica, y enfermedad de Niemann-Pick tipo C.

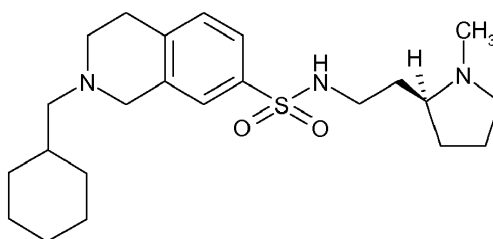
15 El término “taupatía”, como se usa aquí, es cualquier forma de enfermedad neurodegenerativa que se asocia con una patología tau. La enfermedad de Alzheimer y ciertas formas de demencia fronto-temporal (enfermedad de Pick, demencia fronto-temporal esporádica y demencia fronto-temporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17) son las formas más comunes de taupatía. Otras taupatías incluyen, pero no se limitan a, parálisis supranuclear progresiva, demencia pugilística (encefalopatía traumática crónica), enfermedad de Lytico-Bodig (complejo de Guam de Parkinson con demencia), demencia predominante con ovillos neurofibrilares, enfermedad de granos argirofílicos, ganglioglioma y gangliocitoma, meningioangiomas, panencefalitis esclerosante subaguda, encefalopatía plúmbica, esclerosis tuberosa, enfermedad de Hallervorden-Spatz y lipofuscinosis.

20 Los términos “tratar”, “tratamiento”, y similares se usan aquí para referirse a la obtención de un efecto farmacológico y fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir o prevenir parcialmente una enfermedad, síntoma o condición de la misma, y/o puede ser terapéutico en términos de una curación parcial o completa de una enfermedad, condición, síntoma o efecto adverso atribuido a la enfermedad. El término “tratamiento”, como se usa aquí, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) evitar que la enfermedad aparezca en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que no ha sido diagnosticado todavía que la tiene, esto es, hacer que los síntomas clínicos de la enfermedad no se desarrollen en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que todavía no experimenta ni presenta los síntomas de la enfermedad; (b) inhibir la enfermedad, esto es, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o sus síntomas clínicos; o (c) aliviar la enfermedad, esto es, producir la regresión de la enfermedad y/o de sus síntomas o condiciones.

30 Como se usa aquí, la expresión “2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida para uso ...” se debe entender como equivalente a la expresión “uso de 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida para ...” o “uso de 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida para la preparación de un medicamento para uso en ...”.

35 Para los fines de la presente invención, las referencias a 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida incluyen las sales, hidratos y solvatos farmacéuticamente aceptables de la misma, y los solvatos e hidratos de las sales farmacéuticamente aceptables. En un aspecto, la 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida es el difumarato de 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida monohidratado.

40 La 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida, que tiene la estructura de la fórmula (I):



(I),

45 es un antagonista del receptor 3 (H3) de histamina, potente, específico, no imidazólico. Una preparación y las propiedades físicas y las propiedades farmacológicas beneficiosas de la 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida se describen, por ejemplo, en el documento WO2005/118547 (también US2007/0105834). La sal de monohidratado de difumarato de 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida se describe en el documento WO2010/151611.

La proteína tau es una proteína asociada a los microtúbulos expresada en las neuronas. La hiperfosforilación de la proteína tau, la formación de ovillos neurofibrilares (NFTs) y la neuroinflamación son señales patológicas del cerebro en AD y otras taupatías (por ejemplo, enfermedad de Pick, parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, demencia fronto-temporal hereditaria y parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17)), que se acumulan o progresan con la progresión de las enfermedades.

La inflamación es también una característica de la AD. Se ha publicado el aumento de la aparición de células T en los cerebros de los pacientes de AD. Las células T periféricas de los pacientes de AD sobreexpresan la proteína 1- $\alpha$  inflamatoria de los macrófagos (MIP-1 $\alpha$ ), que se une al receptor CCR5 de quimiocinas en las células endoteliales del cerebro, y la interacción MIP-1 $\alpha$ -CCR5 promueve que las células T migren a través de la fuerte unión endotelial hasta el cerebro. El aumento de CCR5 desempeña también un papel en el reclutamiento y acumulación de microglías en placas seniles.

El modelo de ratón transgénico THY-Tau22 se desarrolló para estudiar el papel de la proteína tau en AD y otras taupatías. (Véase Schindowski et al., The American Journal of Pathology, Vol. 169, No. 2, p. 599-616 (2006)). Los ratones THY-Tau22 presentan hiperfosforilación de tau e inclusiones tipo ovillos neurofibrilares (Gallyas positivo). Estos ratones también presentan déficit de memoria a los 6 meses de edad. El THY-Tau22 presenta hiperfosforilación de tau en varios epítomos tau relevantes de la AD: AT8, AT100, AT180, AT270, 12E8, tau-pSer396, y AP422.

Los solicitantes han encontrado ahora que, a dosis clínicamente relevantes, 6 meses de tratamiento con difumarato de 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida monohidratado en un modelo de ratones transgénicos THY-Tau22 reduce la hiperfosforilación de tau, reduce el número de ovillos neurofibrilares (NFTs), reduce la neuroinflamación, y reduce los déficit cognitivos, que son señales patológicas de la AD y otras taupatías y enfermedades neurodegenerativas relacionadas.

El efecto de la administración de larga duración del difumarato de 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida monohidratado sobre estas diversas señales patológicas de la AD y taupatías indica que la 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida se podría usar como un agente modificador de la enfermedad en estas enfermedades.

La falta de efecto de la administración a corto plazo (2 semanas, Ejemplo 2) de difumarato de 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida monohidratado sobre la fosforilación de tau, medida por transferencia Western sobre el epítomo AD-2 en el hipocampo, está en contraste con el efecto en los estudios histopatológicos de un tratamiento de 2 semanas de un antagonista del receptor H3 diferente, ABT-239, sobre la hiperfosforilación de la proteína tau en la médula espinal y en el hipocampo de ratones transgénicos TAPP (tau x APP (proteína precursora de  $\beta$ -amiloide)) publicada por Bitner et al. (Neuropharmacology, 60 (2011) p. 460-466). Este hallazgo inesperado indica que el efecto de la 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida tiene un mecanismo de acción diferente al efecto observado con ABT-239 y publicado por Bitner (Id.).

El modo más importante y directo de demostrar el efecto modificador de la enfermedad de un tratamiento para la AD debería ser demostrar que ha sido modificada una característica patológica importante de la enfermedad. Puesto que el signo patológico per se solo se puede tener mediante la autopsia o por una biopsia del cerebro, en el ámbito clínico son necesarios métodos para obtener más indirectamente dicho signo. Los métodos para demostrar los efectos modificadores de la enfermedad de fármacos para la AD, esto es, un impacto sobre la enfermedad subyacente, incluyen el uso de diseños clínicos (por ejemplo, diseño de estudio aleatorio de retirada, diseño de estudio aleatorio de inicio), marcadores bioquímicos (por ejemplo, péptidos beta-amiloides, proteína tau), medidas de resultados por imágenes cerebrales (por ejemplo, obtención de imágenes por resonancia magnética volumétrica, espectroscopia de resonancia magnética, tomografía por emisión positrónica, tomografía computerizada por emisión de un único fotón) y medidas cognitivas y de discapacidad.

Otro aspecto de la invención es el compuesto 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para uso en la prevención o retraso de la progresión de la enfermedad de una taupatía o enfermedad neurodegenerativa relacionada en un paciente.

El compuesto 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida o una de sus sales farmacéuticamente aceptables permite la inhibición de la hiperfosforilación o agregación anormal de tau en un paciente que tiene una taupatía o enfermedad neurodegenerativa relacionada.

El compuesto 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida o una de sus sales farmacéuticamente aceptables permite la reducción del nivel de la proteína tau fosforilada en un paciente que tiene una taupatía o enfermedad neurodegenerativa relacionada.

El compuesto 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida o una de sus sales farmacéuticamente aceptables permite la inhibición de la formación de ovillos neurofibrilares en un paciente con una taupatía o enfermedad neurodegenerativa relacionada.

5 El compuesto 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida o una de sus sales farmacéuticamente aceptables permite la inhibición del nivel y/o la extensión de los ovillos neurofibrilares en las células neuronales en un paciente con una taupatía o enfermedad neurodegenerativa relacionada.

En un aspecto particular, se reduce el nivel de tau y de tau fosforilada en el líquido cefalorraquídeo del paciente.

10 En aspectos particulares de la invención, la taupatía es la enfermedad de Alzheimer. En un aspecto más particular, el tratamiento retrasa la transición desde una etapa de la AD a una etapa más severa de la enfermedad de Alzheimer en dicho paciente.

El compuesto 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida o una de sus sales farmacéuticamente aceptables permite destruir o causar la disolución de agregados tau en un paciente con una taupatía o enfermedad neurodegenerativa relacionada.

15 En algunas realizaciones de la invención, la taupatía o enfermedad neurodegenerativa relacionada es enfermedad de Alzheimer.

En otras realizaciones de la invención, la taupatía o enfermedad neurodegenerativa relacionada es la enfermedad de Alzheimer leve a moderada.

20 En otras realizaciones de la invención, la taupatía o enfermedad neurodegenerativa relacionada es la enfermedad de Alzheimer moderada a severa.

En otras realizaciones de la invención, la taupatía o enfermedad neurodegenerativa relacionada es la enfermedad de Alzheimer preclínica.

En otras realizaciones de la invención, la taupatía o enfermedad neurodegenerativa relacionada es disfunción cognitiva leve.

25 En algunas realizaciones de la invención, la 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se administra al menos una vez al día durante un período prolongado.

30 En un aspecto, el tratamiento de la AD comprende además el tratamiento de uno o más síntomas de la AD. Por ejemplo, el tratamiento de la AD comprende el tratamiento de uno o más síntomas seleccionados del grupo que consiste en trastornos de memoria, trastornos de praxis, trastornos de atención, confusión, irritabilidad y agresión, cambios de humor, alteraciones del lenguaje, pérdida de la memoria a largo plazo, retirada del sufridor, y pérdida del control motor.

35 En otro aspecto, el tratamiento de la AD comprende además uno o más factores seleccionados del grupo que consiste en el mantenimiento o reducción de la cognición (que se puede medir por la subescala cognitiva ADAS; el mantenimiento o reducción de las actividades de la vida diaria (que se puede medir por la subescala ADCS-ADL); el mantenimiento o reducción de la puntuación total del Examen Mental Breve (MMSE); el mantenimiento o reducción de los cinco factores de la evaluación computerizada del Sistema de Investigación de Fármacos Cognitivos (CDR-S); el mantenimiento o reducción de la puntuación del Inventario Neuropsiquiátrico (NPI); el mantenimiento o reducción de la puntuación de apatía del NPI y de la puntuación en la Escala de Evaluación de la Apatía - Informante (AES-I).

40 En algunos aspectos de la invención, la administración del ingrediente activo retrasa la transición desde una etapa de la AD a una etapa más severa de la AD en un paciente. Por ejemplo, una realización de la invención incluye el retraso del cambio en la escala de demencia clínica de uno a dos en un paciente con AD. Otra realización comprende el retraso de la transición de la AD leve a moderada a la AD moderada a severa en un paciente. Otra realización comprende el retraso de la transición de la AD preclínica a una disfunción cognitiva leve debido a la enfermedad de Alzheimer. Otra realización comprende el retraso de la transición desde una disfunción cognitiva leve debido a la enfermedad de Alzheimer a la AD leve a moderada.

50 Los modos de administración incluyen, pero no se limitan a, administración oral, parenteral (por ejemplo, vías de administración subcutánea, subdural, intravenosa, intramuscular, intratecal, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial, o intralesional), tópica, localizada (por ejemplo, aplicación quirúrgica o supositorios quirúrgicos), rectal, y pulmonar (por ejemplo, aerosoles, inhalación, o polvo). La vía de administración se debe basar en la composición a ser administrada, en el tejido diana, y similares, como es conocido por los expertos ordinarios en la técnica. La vía de administración se puede variar en cualquier caso, limitada por las propiedades físicas de los fármacos y la conveniencia del paciente y de la persona que le cuida.

El ingrediente activo de la presente invención se administra normalmente en forma de composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas contienen el ingrediente activo asociado con uno o más portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

5 Los excipientes empleados son típicamente los adecuados para la administración a sujetos humanos o a otros mamíferos. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen al menos un componente seleccionado del grupo que comprende portadores, diluyentes, recubrimientos, adyuvantes, excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como agentes conservantes, cargas, agentes disgregantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes de suspensión, agentes isotónicos, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes perfumantes, agentes colorantes, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, otros agentes terapéuticos, agentes lubricantes, agentes para retrasar o promover la adsorción y agentes de dispensación, dependiendo de la naturaleza del modo de administración y de las formas farmacéuticas.

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar utilizando técnicas convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

15 En un aspecto de la invención, las composiciones farmacéuticas contienen una cantidad terapéuticamente eficaz del ingrediente activo. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa aquí, se refiere a una cantidad del ingrediente activo presente en la composición farmacéutica a administrar que es suficiente para producir el efecto o efectos farmacológicos o terapéuticos deseados. Para determinar la cantidad o dosis eficaz, el clínico asistente considerará una serie de factores, que incluyen, pero no se limitan a: la especie de mamífero, su tamaño, edad, y salud general; la enfermedad específica implicada; el grado de complicación o la gravedad de la enfermedad; la respuesta del paciente individual; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen posológico seleccionado; el uso de medicación concomitante; y otras circunstancias relevantes.

25 En un aspecto, el uso comprende administrar a un paciente aproximadamente 0,25 a aproximadamente 10 mg por día de 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida, o aproximadamente 0,25 a aproximadamente 10 mg por día de una sal farmacéuticamente aceptable de 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida medida en forma de base. En realizaciones particulares, los métodos de la invención comprenden administrar al paciente entre aproximadamente 0,5 mg y aproximadamente 5 mg (por ejemplo, aproximadamente 0,5, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 1,5 mg, aproximadamente 2 mg, aproximadamente 2,5 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 3,5 mg, aproximadamente 4 mg, aproximadamente 4,5 mg, o aproximadamente 5 mg) al día de 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables medida en forma de base. En otra realización, los métodos de la invención comprenden administrar al paciente entre aproximadamente 0,25 mg y aproximadamente 2,5 mg por día de 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables medida en forma de base.

35 En algunos aspectos de la invención, la 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida se administra durante un período prolongado, por ejemplo, durante al menos seis meses. En otro aspecto, la 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida se administra durante un período prolongado seleccionado de al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, y al menos 12 meses. En realizaciones particulares, la 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida se administra al menos una vez al día durante un período prolongado.

45 Otro aspecto de la invención es el uso de 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables para hacer más lenta o detener la progresión de la enfermedad en la AD y otras taupatías y enfermedades neurodegenerativas relacionadas. Todos los aspectos, realizaciones, y características descritas antes se aplican también a dicho uso.

Los siguientes ejemplos describen el efecto de la administración de difumarato de 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida monohidratado en ratones transgénicos THY-Tau22 sobre:

- la hiperfosforilación de la proteína tau sobre el epítipo AD-2 (pSer396-pSer404) por análisis de transferencia Western;
- la hiperfosforilación de la proteína tau sobre el epítipo AT-8 (pSer199-202/Thr205), por inmunohistoquímica, en la corteza, el hipocampo, y la amígdala;
- 55 - la formación de NFTs en la corteza, el hipocampo, y las amígdalas por tinción de Gallyas; y
- la neuroinflamación (expresión de ARNm de MIP $\alpha$ ) en el hipocampo, por reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa en tiempo real (QPCR).

**Ejemplo 1**

Una única administración de difumarato de 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida monohidratado (3 y 10 mg/kg por boca (en suspensión en metilcelulosa/Tween 80)) en ratones THY-Tau22 (9 ratones por grupo de tratamiento) no produjo ningún efecto sobre la fosforilación de la proteína tau en el epítipo AD-2 en la corteza, por análisis de transferencia Western.

**Ejemplo 2**

La administración durante dos semanas de difumarato de 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida monohidratado (0,002% y 0,02% en agua de bebida) en ratones THY-Tau22 (9 ratones por grupo de tratamiento) no produjo ningún efecto sobre la fosforilación de la proteína tau en el epítipo AD-2 en el hipocampo, por análisis de transferencia Western.

Las exposiciones a las dosis de 0,002% y 0,02% en agua son del mismo orden de magnitud que las exposiciones a las dosis de 0,0034% y 0,034% en alimentos utilizadas en el estudio descrito en el Ejemplo 3.

**Ejemplo 3**

Se administró difumarato de 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida monohidratado como un suplemento en los alimentos a dosis de 0,00034%, 0,0034% y 0,034% durante seis meses a ratones THY-Tau22 y ratones tipo natural como sigue:

Vehículo en ratones transgénicos (n = 17)

Ingrediente activo en transgénicos - 0,034% (n = 17)

Ingrediente activo en transgénicos - 0,0034% (n = 17)

Ingrediente activo en transgénicos - 0,00034% (n = 17)

Vehículo en ratones tipo natural (n = 17)

Ingrediente activo en ratones tipo natural - 0,034% (n = 17)

Ingrediente activo en ratones tipo natural - 0,0034% (n = 17)

Ingrediente activo en ratones tipo natural- 0,00034% (n = 17)

Los grupos de tipo natural tratados con ingrediente activo no se usan en los estudios bioquímicos e histológicos.

Se observaron los siguientes efectos en comparación con los ratones THY-Tau22 tratados con vehículo (es decir, alimento no suplementado):

- disminución estadísticamente significativa de la fosforilación de la proteína tau sobre el epítipo AD-2 en el hipocampo a dosis de 0,0034% (Figura 1);
- disminución estadísticamente significativa de la fosforilación de la proteína tau sobre el epítipo AT-8 en la corteza a dosis de 0,0034% y 0,034% (n = 9) (Figura 2);
- disminución estadísticamente significativa de la formación de ovillos neurofibrilares en la corteza, subárea CA1 del hipocampo a dosis de 0,0034% y 0,034% y en la amígdala a dosis de 0,034% (n = 9) (Figura 3);
- disminución estadísticamente significativa de la expresión del gen MIP-1 $\alpha$  en el hipocampo a dosis de 0,00034% y 0,0034% (Figura 4).

Después de 6 meses de tratamiento con difumarato de 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida monohidratado en ratones transgénicos THY-Tau22, se observó una disminución significativa del número de neuronas patológicas [esto es, ovillos neurofibrilares (NFTs) puestos en evidencia por impregnación de plata de Gallyas] en la corteza (-48% a 0,0034% y -41% a 0,034%). Se observó también una disminución significativa del número de ovillos en la subárea hipocámpica CA1 (-25% a 0,0034% y -22% a 0,034%). Dentro de la amígdala, la disminución de NFTs (-31%) fue significativa a la dosis más alta (0,034%) y fue una disminución estadísticamente no significativa (-19%) a la dosis de 0,0034%. No hubo ningún efecto protector frente a las neuronas patológicas (esto es, número de ovillos) a la dosis más baja (0,00034%) en todas las regiones de interés del cerebro analizadas.

Dentro de la corteza, se observó una disminución significativa del número de células neuronales AT8-positivas (indicativo de una hiperfosforilación anormal de la proteína TAU) a las dos dosis más altas (-47% a 0,0034% y -32% a 0,034%). Además, se observó cualitativamente una disminución en la intensidad de la inmunotinción AT8 dentro



de los cuerpos y fibras de las células neuronales en la corteza de ratones tratados con la dosis de 0,0034%. No se observó ninguna disminución significativa del número de células neuronales AT8-positivas en otras regiones de interés analizadas (esto es, la amígdala y las dos subáreas hipocámpicas, CA1 y circunvolución dentada).

5 La comparación de las exposiciones alcanzadas por la administración durante 6 meses de difumarato de 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida monohidratado en el alimento de ratones, con las esperadas en el estado de equilibrio después de 6 meses de administración oral en pacientes con AD, da a entender que las dosis de 0,00034% y 0,0034% en ratones corresponden a dosis que son seguras para los pacientes (dosis humanas de aproximadamente 0,25 y aproximadamente 2,5 mg, respectivamente).

10 Análisis histopatológico

Secciones de tejido cerebral

Una vez que fueron decapitados los ratones, se retiraron los cerebros y un hemiserebro (usado para estudios histopatológicos) fue post-fijado por inmersión durante siete días a 4°C con formaldehído al 4% (Carlo Erba/código 415691). El otro hemiserebro se preparó para medidas bioquímicas cuantitativas.

15 Los hemiserebros post-fijados se incubaron en disolución salina amortiguada con fosfato (PBS, P 3813 - 10PAK, Sigma), se transfirieron a una disolución de sacarosa al 20% (código 27480.294 - Prolabo) durante 48 horas a 4°C para asegurar una buena crioconservación de los tejidos durante la posterior congelación. Para la congelación, se sumergieron los hemiserebros durante un minuto en disolución de isopentano (Ref. No. 24872-323 - Prolabo) enfriada con hielo seco entre -25°C y -30°C, y después se conservaron a -25°C.

20 Los hemiserebros enteros se cortaron con un criostato (Microm, HM560). Se recogieron cortes sagitales de tejido cerebral en serie sobre portaobjetos de vidrio para microscopio Superfrost plus (VWR) y después se conservaron a -20°C (cortes de 20 µm de grosor), o se colocaron pocillos que contienen PBS-azida de sodio 0,1% (S-2002, Sigma) para evitar cualquier contaminación y se conservaron a 4°C (cortes de 30 µm de grosor).

Tinción de plata de Gallyas

25 Los NFTs son una importante característica neuropatológica definitoria de la patología tau en la AD. Consisten en haces de filamentos helicoidales apareados y filamentos rectos y su principal constituyente es la proteína tau hiperfosforilada asociada con los microtúbulos. La tinción de Gallyas se usa generalmente para teñir la patología neurofibrilar (Sun A. et al., J. Histochem Cytochem, 2002, 50, 4, p. 463-472).

30 Para la tinción de Gallyas se usó una serie de secciones de hemiserebro de 20 µm (directamente montadas en portaobjetos) por ratones (Braak and Braak, 1991, Brain Pathology, 1, p. 213-216). El protocolo detallado es como sigue:

35 Se usan los siguientes reactivos: ácido peryódico (Sigma Ref. No. P 7875); hidróxido de sodio (Prolabo Ref. No. 1737-1000); yoduro de potasio (Merck Ref. No. 1.05043.1000); nitrato de plata (Sigma Ref. No. S.8157); ácido acético al 100% (Prolabo Ref. No. 20 104.298); carbonato de sodio, anhidro (Merck Ref. No. 1.06392-0500); nitrato de amonio (Prolabo Ref. No. 21280-293); ácido silicotúngstico (Sigma Ref. No. T 2786); formaldehído al 40% (Carlo Erba Ref. No. 415661); tiosulfato de sodio (Sigma Ref. No. 21724 - 500 g).

40 Se preparó una primera disolución madre (No. I) disolviendo 50 g de carbonato de sodio anhidro en 1000 ml de agua desionizada. Se preparó una segunda disolución madre (No. II) disolviendo 2 g de nitrato de amonio, 2 g de nitrato de plata, y 10 g de ácido silicotúngstico en 1000 ml de agua desionizada. Se preparó una tercera disolución madre (No. III) disolviendo 2 g de nitrato de amonio, 2 g de nitrato de plata, 10 g de ácido silicotúngstico, y 7,3 ml de disolución de formaldehído al 37% comercial en 1000 ml de agua desionizada. Las disoluciones madre son estables y se pueden conservar en recipientes opacos.

Cada una de las siguientes etapas del método se lleva a cabo con agitación.

45 1. Pretratamiento: Las secciones sobre los portaobjetos se sumergieron en una disolución de ácido peryódico al 5% en agua durante 5 minutos, y después se aclararon dos veces durante 5 minutos en agua desionizada.

50 2. Plateado: La disolución de yoduro de plata se prepara recientemente disolviendo 4 g de hidróxido de sodio en 50 ml de agua destilada, y añadiendo 10 g de yoduro de potasio, que se mezcla y se deja disolver completamente. Se añaden con agitación 3,5 ml de una disolución de nitrato de plata al 1% en agua. Se añade agua destilada hasta un volumen final de 100 ml, y la disolución se mezcla enérgicamente hasta que sea transparente. Las secciones de hemiserebro se sumergen en la disolución alcalina de yoduro de plata durante 1 minuto. Se aclaran entonces con una disolución de ácido acético al 0,5% en agua durante aproximadamente 10 minutos.

3. Detección: El agente de detección se prepara recientemente mezclando 10 volúmenes (50 ml) de disolución madre I, 3 volúmenes (15 ml) de disolución madre II, 7 volúmenes (35 ml) de disolución madre III, que se mezclan enérgicamente hasta que la disolución es transparente. La detección tarda de 5 a 30 minutos. Si aparece un color marrón pálido, la detección es suficiente. El grado de detección se comprueba observando los portaobjetos al microscopio.
- 5
4. Las secciones se aclaran rápidamente con agua desionizada.
5. Fijación: Las secciones se fijan en tiosulfato de sodio al 1% durante 5 minutos, y después se aclaran rápidamente en agua desionizada.
6. Las secciones se deshidratan sobre una placa caliente.
- 10
7. Se pone una gota de medio de montaje (Pertex® Mounting Media) sobre el portaobjetos y se coloca suavemente un cubreobjetos por encima.

#### Inmunohistoquímica para AT8

La proteína tau hiperfosforilada asociada a microtúbulos es el principal componente del filamento helicoidal apareado. Se pueden usar anticuerpos anti-tau dependientes de la fosforilación para identificar aminoácidos específicos que están fosforilados en tau en el cerebro normal y en el cerebro con AD. Por ejemplo, se usa ampliamente el anticuerpo monoclonal AT8. El anticuerpo puede detectar los epitopos de la tau fosforilada en la serina 202 fosforilada y en la treonina 205 fosforilada (epitopo AT8 (M. Goedert et al., Neuroscience Letters, (1995) 189, 3, p. 167-169)).

15

Se aplicó sobre secciones de 30  $\mu$ m flotantes un protocolo inmunohistoquímico que utiliza el anticuerpo AT8 y que se basa en el método de la peroxidasa de rábano picante con avidina-biotina. El protocolo detallado es como sigue:

20

Se usan los siguientes reactivos: amortiguador de PBS 0,1 M en 1 litro de H<sub>2</sub>O (2,23 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O (Prolabo Ref. No. 33 616.262), 29 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12 H<sub>2</sub>O (Prolabo Ref. No. 28 028.298), 9 g de NaCl (Prolabo Ref. No. 27 810.295)); amortiguador de PBS-Triton (0,15%) Triton x 100 (Sigma Ref. No. 23 479-9) (PBS-T) (1 l de amortiguador de PBS 0,1M, 1,5 ml de Triton); amortiguador de PBS 0,2M en 1 litro de H<sub>2</sub>O (4,46 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O, 58 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12H<sub>2</sub>O, 18 g de NaCl); 30% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma Ref. No. H 1009); tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina (Sigma Ref. No. D9015, 100 mg almacenados a - 20°C); Vectastain® ABC Kit (Ref. No. PK 4000, Vector); BSA: seroalbúmina bovina (Sigma Ref. No. A8022).

25

Las secciones se preincubaron durante 3 x 10 minutos en disolución de PBS 0,1 M-Triton al 0,15% y después en peróxido de hidrógeno al 1,5%-metanol al 50% en PBS 0,1 M a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de 3 lavados con Triton al 0,15% en PBS 0,1 M, se incubaron adicionalmente en amortiguador de bloqueo [esto es, en BSA diluida al 10% en PBS 0,01 M] durante 30 minutos. Se incubaron a temperatura ambiente durante la noche con anticuerpo monoclonal anti-PHF-Tau humana de ratón (clon AT8, Thermo Science, MN1020, dilución 1/500 en Triton al 0,05% - PBS 0,1 M) y después con el anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra completo biotinilado anti-IgG de ratón, Amersham, RPN1177, dilución 1/500 en Triton al 0,05% - PBS 0,1 M) durante 1 h 30. Finalmente se incubaron en complejo de avidina acoplado a peroxidasa (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, dilución 1/400 en PBS 0,1 M) durante 30 minutos. Las secciones se incubaron brevemente en una disolución de sustrato de peroxidasa (que contiene peróxido de hidrógeno al 0,003%, tetrahidrocloruro de diaminobenzidina al 0,05% en PBS 0,1 M), y se aclararon con disolución de NaCl al 0,9%. Finalmente, se montaron sobre portaobjetos y se secaron a temperatura ambiente, se deshidrataron y se cubrieron con un cubreobjetos utilizando Eukitt.

30

35

#### 40 Análisis cuantitativo de imagen por tinción de Gallyas e inmunotinción de AT8

Se determinaron cuantitativamente dos marcadores de la patología tau (esto es, tinción de Gallyas e inmunotinción de AT8) utilizando un sistema de análisis de imagen. Se aplicó la tecnología microscópica de portaobjetos virtual (utilizando un sistema de barrido Olympus dotslide) para adquirir, a gran aumento (esto es, objetivo x10) y resolución, imágenes de secciones de hemiserebro totalmente teñidas. Estas secciones se tomaron en diferentes posiciones a lo largo del eje lateromedial de las diferentes regiones de interés (ROI).

45

Todas las imágenes se analizaron cuantitativamente en una estación de trabajo computerizada (Mercator system/Explora Nova utilizando software Dotslide). Los esbozos de las diferentes regiones de interés se definieron en primer lugar manualmente para cada imagen. Para la tinción de Gallyas, se analizaron tres regiones de interés: (corteza, subárea CA1 del hipocampo, y amígdala). Para la inmunotinción de AT8, se analizaron cuatro regiones de interés: corteza, amígdala, sub-áreas CA1 y circunvolución dentada del hipocampo y la circunvolución dentada.

50

Se estimó el número total de células Gallyas-positivas o AT8-positivas en las diferentes regiones de interés procedentes de 8 secciones del eje lateromedial del hemiserebro (en el que se puede encontrar taupatía en los animales THY-TAU22 a la edad del sacrificio, esto es, 8 meses de edad). Se usó este parámetro para calcular la media  $\pm$  SEM del número total de células Gallyas-positivas o AT8-positivas en un grupo dado.

Todos los datos se guardaron por el software y se recuperaron por extracción en una hoja de Excel.

Protocolo de expresión de ARNm de MIP1 $\alpha$ .

### 1. Preparación de ARN:

5 Se puso un hemi-hipocampo de cada ratón en un tubo Precellys CK14 que incluye 50 perlas de cerámica de 1,4 mm y 0,5 ml de disolución de lisis para purificación de ácido nucleico de Applied Biosystems (1X). El tejido se homogeneizó utilizando un homogeneizador Precellys 24 (Bertin technology) durante 2 ráfagas x 10 segundos. El ARN total se aisló utilizando la 6100 PrepStation (Applied Biosystems), según las instrucciones del fabricante, incluyendo un tratamiento de ADNasa (Protocolo Aislamiento de ARN Total de Tejidos Vegetales y Animales). Para evaluar la calidad y concentración del ARN total, se analizó 1  $\mu$ l en un RNA LabChip (Agilent) utilizando un 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies).

### 2. PCR en tiempo real

15 2  $\mu$ g de ARN total de cada ratón se sometieron a transcripción inversa con cebador oligo (dT) 16 y cebadores aleatorios utilizando un kit High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El molde de reacción de transcripción inversa final incluido era de 100  $\mu$ l. Las muestras se incubaron después durante 10 min. a 25°C, seguido de 120 min. a 37°C, y después se calentaron a 95°C para desnaturalizar las enzimas y detener la reacción. Para la PCR en tiempo real, el gen constitutivo R.L37A se amplificó utilizando QuantiTect Primer Assay de Qiagen (QT00252266), y el MIP1 alfa se amplificó utilizando los siguientes cebadores (5'-TGCCCTTGCTGTTCTTCTCT-3'); (5'-GTGGAATCTCCGGCTGTAG-3'). Se realizó la amplificación según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems), utilizando un detector de secuencias ABI Prism 7900.

### 20 3. Expresión de resultados

Para la qPCR, los valores umbrales del ciclo (Ct) se convirtieron en cantidad relativa (RQ) utilizando la ecuación  $2^{-Ct(L37A)-Ct(MIP1\ \alpha)}$  para cada muestra de hipocampo dividido entre  $2^{-Ct(L37A)-Ct(MIP1\ \alpha)}$  de una muestra de cerebro total de referencia.

Análisis por transferencia Western de la fosforilación de tau sobre homogenizados de corteza e hipocampo

25 Para análisis de inmunotransferencia, se homogeneizaron los tejidos congelados de ratones (hipocampo o corteza) utilizando un homogeneizador de tejidos Precellys 24 en 350  $\mu$ l de amortiguador RIPA de Cell Signaling (Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NP-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 1%, pirofosfato de sodio 2,5 mM, beta-glicerofosfato 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, 1  $\mu$ g/ml de leupeptina) al cual se añadieron inhibidores de proteasas (Sigma cocktail 1% v/v) e inhibidores de fosfatasa (ácido okadaico 1  $\mu$ M, fluoruro de sodio 100 mM).  
30 Después de centrifugar, 16000 x g a 4°C durante 10 minutos, se determinó el contenido de proteína en los sobrenadantes con el kit BioRad DC Protein Assay, utilizando BSA como patrón. Se cargaron cantidades iguales de proteína (5  $\mu$ g) sobre geles de Bis-Tris al 4-12% en 15 pocillos (NuPAGE, Invitrogen), y se llevó a cabo la electroforesis a 200V durante 50 minutos en amortiguador MOPS según las instrucciones del fabricante. Se transfirieron entonces las proteínas a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Invitrogen) a 30 V durante 2  
35 horas en amortiguador de transferencia (Invitrogen) que contenía metanol al 20%. Después de bloquear en leche seca desnatada al 5% en TBS (disolución salina amortiguada con Tris)-Tween al 0,1%, las transferencias se incubaron durante la noche a 4°C en anticuerpos primarios diluidos en BSA al 5% en TBS-Tween al 0,1%. La proteína tau se detectó utilizando el siguiente anticuerpo de ratón: AD-2 1/20.000<sup>e</sup> (Biorad, 56484) que reconoce la proteína tau fosforilada sobre Ser396 y Ser404. Cada transferencia se sondó de nuevo también con un anticuerpo  
40 anti  $\beta$ -actina 1/5.000<sup>e</sup> (Sigma, A-5316) para normalizar la cantidad de proteína total.

Después de la incubación con anticuerpos primarios, se las transferencias aclararon con TBS-Tween al 0,1% y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón ligado a peroxidasa de rábano picante (HRP) 1/10.000<sup>e</sup> (GE healthcare, NA9310) diluido en leche seca desnatada al 5% en TBS-Tween al 0,1%. Después del lavado, las transferencias se desarrollaron con quimioluminiscencia aumentada (ECL advance, GE Healthcare), y las imágenes se obtuvieron utilizando un analizador de imágenes luminiscentes LAS 3000 (FUJIFILM). La cuantificación de la señal inmunorreactiva se realizó utilizando el software Multigauge V3.0 (FUJIFILM). Cada señal se normalizó a  $\beta$ -actina (el mismo gel, el mismo pocillo). Para análisis estadístico, se utilizó una prueba no paramétrica (prueba de comparaciones de Kruskal-Wallis de dos colas frente a vehículo).

50 La actividad inhibitoria del ingrediente activo en el hipocampo de ratones THY-Tau22 frente a la hiperfosforilación de tau anormal se muestra mediante análisis de transferencia Western en la Figura 1.

Hubo una inhibición significativa (-37%, p = 0,0229) de la fosforilación de tau en el epítipo AD-2 a la dosis de 0,0034%, pero solo una tendencia hacia la inhibición en el epítipo AT-8 (-22%, ns). También se observó en la corteza un efecto similar pero no significativo (-57%, p = 0,1807).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SANOFI *et al.*

<120> UN ANTAGONISTA DEL RECEPTOR H3 PARA USO EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

5 <130> US2012/023 WO PCT

<140> PCT/EP2013/057241

<141> 05-04-2013

<150> EP 12305415.7

<151> 06-04-2012

10 <150> US 61/792635

<151> 15-03-2013

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

15 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador para MIP1 alfa

20 <400> 1

tgcccttgct gttcttctct 20

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador para MIP1 alfa

<400> 2

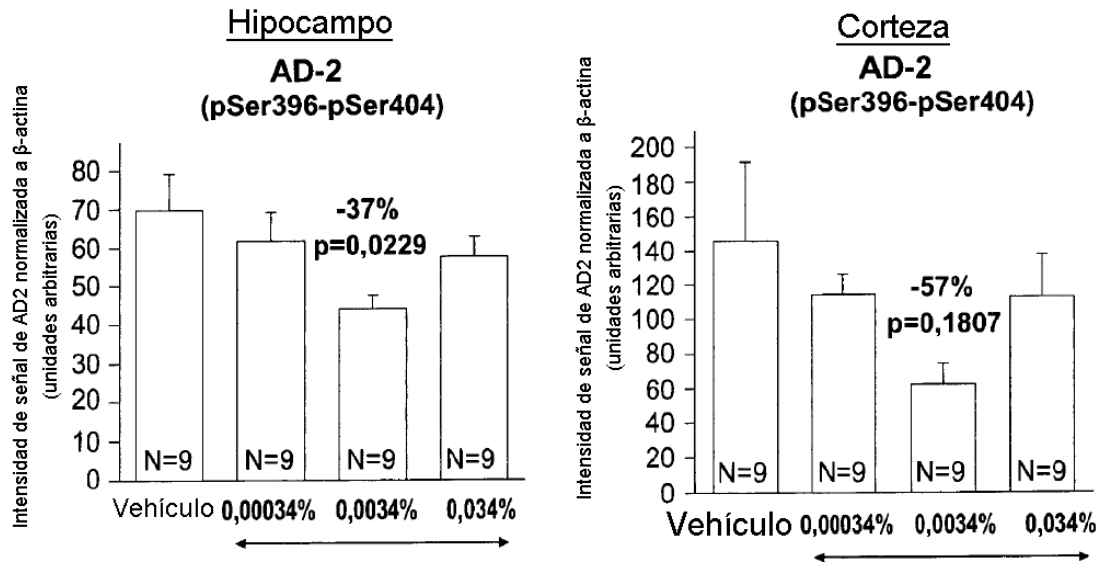
gtggaatctt ccggctgtag 20

30

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para uso en la prevención o retraso de la progresión de la enfermedad de una taupatía o enfermedad neurodegenerativa relacionada en un paciente.
- 5 2. Compuesto para uso según la reivindicación 1, en el que se inhibe la hiperfosforilación anormal de tau o la agregación anormal de tau en un paciente.
3. Compuesto para uso según la reivindicación 1, en el que el nivel de proteína tau fosforilada se reduce en dicho paciente que tiene una taupatía o enfermedad neurodegenerativa relacionada.
- 10 4. Compuesto para uso según la reivindicación 1, en el que se inhibe la formación de ovillos neurofibrilares en dicho paciente.
5. Compuesto para uso según la reivindicación 1, en el que se inhibe el nivel de ovillos neurofibrilares en una célula neuronal en dicho paciente.
6. Compuesto para uso según la reivindicación 1, en el que la disfunción del citoesqueleto o la perturbación de otras funciones dependientes de tau se hacen más lentas o se detienen.
- 15 7. Compuesto para uso según la reivindicación 1, en el que se reduce el nivel de tau fosforilada y de tau en el líquido cefalorraquídeo del paciente.
8. Compuesto para uso según la reivindicación 1, en el que los agregados de tau en dicho paciente se rompen o se disuelven.
- 20 9. Compuesto para uso según la reivindicación 1, en el que se inhibe o se reduce la fosforilación de la proteína tau en una neurona, célula glial o cuerpo de Lewy en dicho paciente.
10. Compuesto para uso según la reivindicación 9, en el que la proteína tau es una proteína tau asociada a microtúbulos.
11. Compuesto para uso según la reivindicación 10, en el que la proteína tau está en un ovillo neurofibrilar.
- 25 12. Compuesto para uso según la reivindicación 1, en el que se inhibe o se evita la hiperfosforilación de la proteína tau.
13. Compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la taupatía o enfermedad neurodegenerativa relacionada es enfermedad de Alzheimer.
14. Compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la taupatía o enfermedad neurodegenerativa relacionada es enfermedad de Alzheimer leve a moderada.
- 30 15. Compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la taupatía o enfermedad neurodegenerativa relacionada es enfermedad de Alzheimer moderada a severa.
16. Compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la taupatía o enfermedad neurodegenerativa relacionada es enfermedad de Alzheimer preclínica.
- 35 17. Compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la taupatía o enfermedad neurodegenerativa relacionada es disfunción cognitiva leve.
18. Compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que la 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se administra al menos una vez al día durante un período prolongado.
- 40 19. Compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida o su sal farmacéuticamente aceptable es el difumarato de 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida monohidratado.
- 45 20. Compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en el que la 2-(ciclohexilmetil)-N-{2-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il]etil}-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonamida o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se administra al menos una vez al día durante un período prolongado.

FIG. 1



Media  $\pm$ sem

Análisis estadístico no paramétrico (comparaciones de Kruskal-Wallis de dos colas frente a vehículo).

FIG. 2

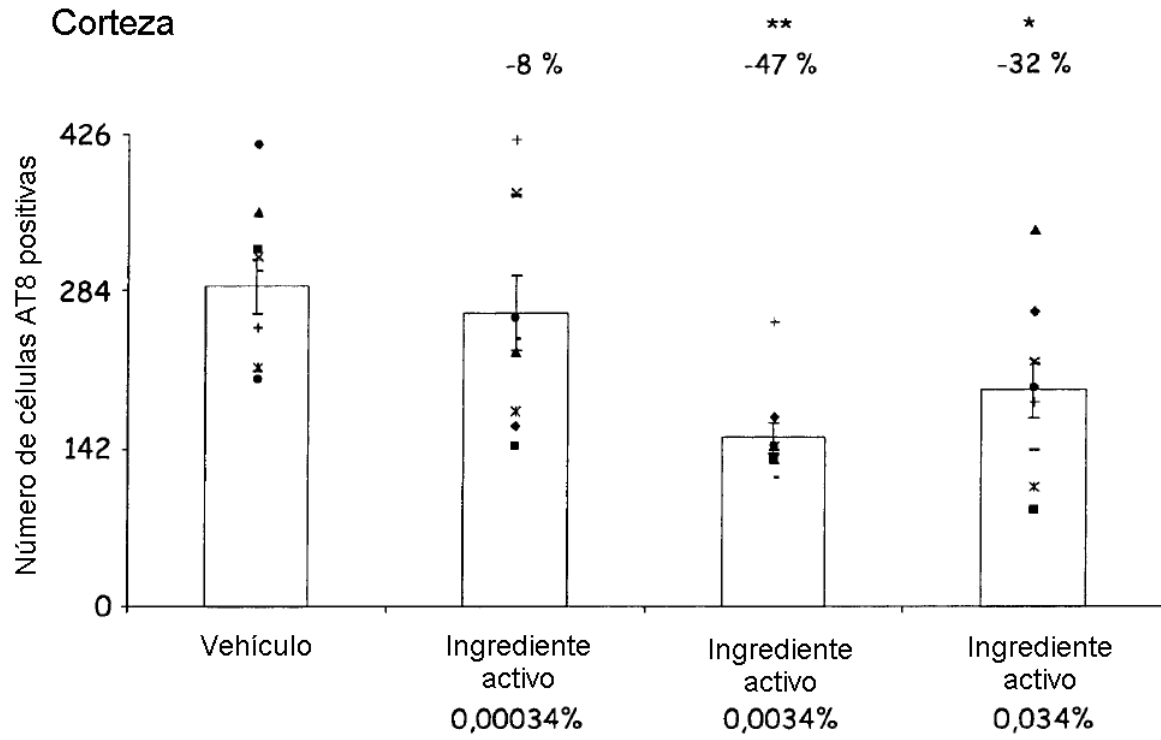


FIG. 3

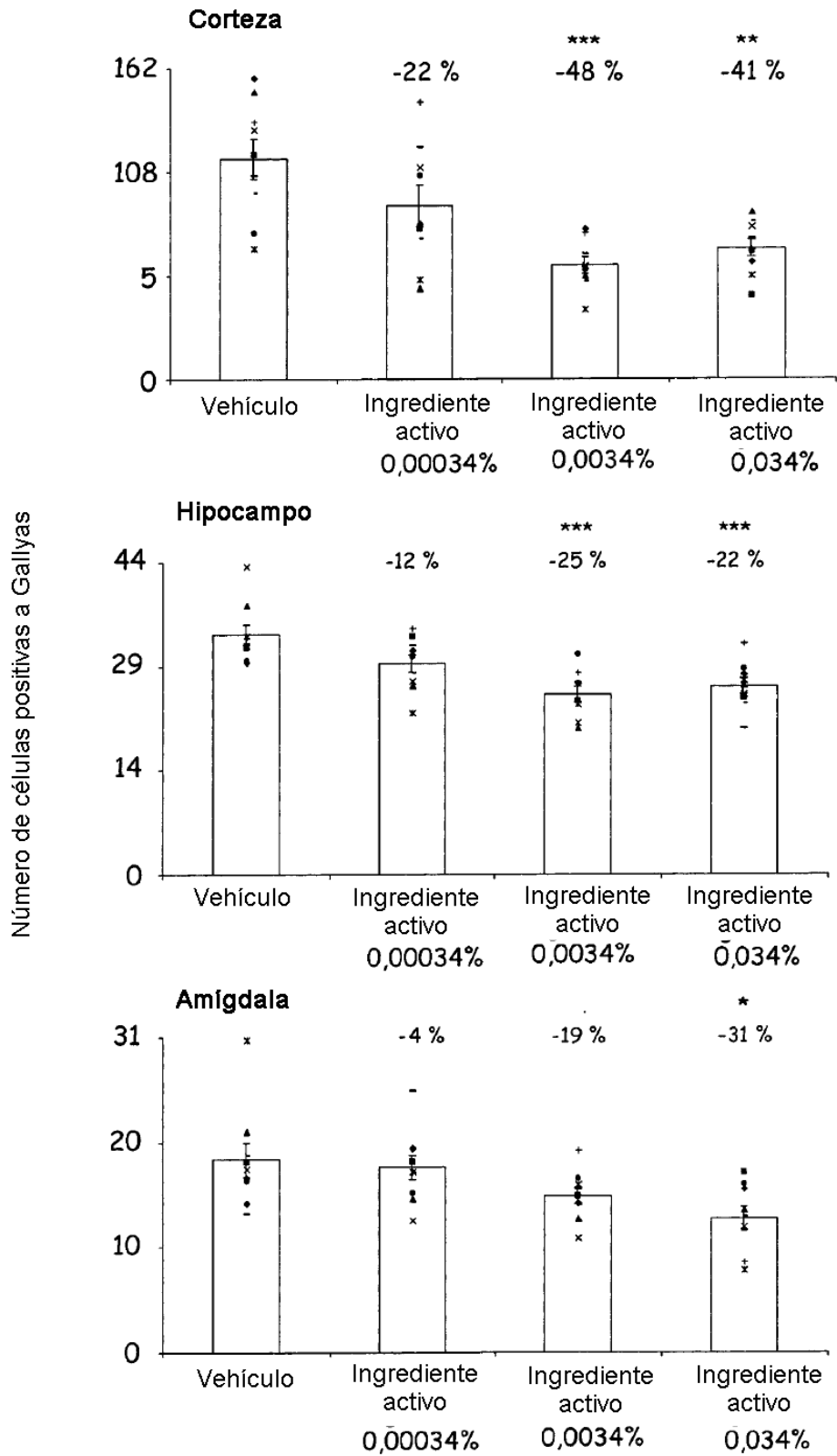




FIG. 4

