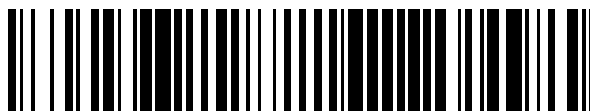


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 027**

51 Int. Cl.:

A61K 31/05 (2006.01)

A61K 31/145 (2006.01)

A61K 31/4035 (2006.01)

A61K 31/5513 (2006.01)

A61K 31/44 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.08.2011** **PCT/US2011/048472**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2012** **WO12024616**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2011** **E 11818848 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018** **EP 2605655**

54 Título: **Métodos de tratamiento del deterioro cognitivo leve (DCL) y trastornos relacionados**

30 Prioridad:

19.08.2010 US 401907 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.03.2019

73 Titular/es:

BUCK INSTITUTE FOR AGE RESEARCH (100.0%)
8001 Redwood Boulevard
Novato, CA 94945, US

72 Inventor/es:

JOHN, VARGHESE y
BREDESEN, DALE E.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 705 027 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

Métodos de tratamiento del deterioro cognitivo leve (DCL) y trastornos relacionados

5 Antecedentes de la invención

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo progresivo que se caracteriza por un rápido deterioro cognitivo y funcional en pacientes diagnosticados con la enfermedad. En las etapas tempranas de la enfermedad, los pacientes generalmente padecen deterioro cognitivo leve (DCL) que puede convertirse con el tiempo en EA completa. En términos generales, la enfermedad se divide en dos categorías: a) EA de aparición tardía, que generalmente se produce en sujetos de 65 años de edad o más y que con frecuencia se correlaciona con numerosos factores de riesgo, incluyendo la presencia de un alelo APOE $\epsilon 4$; y b) EA de aparición temprana, se desarrolla de forma temprana en sujetos de entre 30 y 60 años de edad y generalmente se asocia a mutaciones de la enfermedad de Alzheimer familiar (EAF) en el gen de la proteína precursora amiloide (APP, por sus siglas en inglés) o en el gen de la presenilina. En ambos tipos de enfermedad, la patología es la misma, pero las anomalías tienden a ser más graves y generalizadas en casos que comienzan a una edad más temprana.

La EA se caracteriza generalmente por al menos dos tipos de lesiones en el cerebro, las placas seniles compuestas por el péptido A β (y otros componentes, normalmente en concentraciones más bajas que el péptido A β) y ovillos neurofibrilares compuestas principalmente por depósitos intracelulares de la proteína tau asociada a microtúbulos (especialmente la tau hiperfosforilada). La medición de los niveles de péptido A β y Tau/Tau fosforilada en el líquido cefalorraquídeo (LCR) junto con el análisis de imágenes y los ensayos cognitivos/funcionales pueden usarse clínicamente para determinar la progresión de la enfermedad y la conversión a la EA completa.

La enfermedad de Alzheimer (EA) se ha considerado en gran medida una enfermedad de toxicidad, mediada por la recolección de un pequeño péptido (el péptido A β) que daña las células cerebrales por propiedades físicas y químicas, tales como la unión de metales dañinos, la producción de especies reactivas de oxígeno y el daño directo a las membranas celulares. Si bien dichos efectos de A β se han demostrado claramente, no ofrecen un papel fisiológico para el péptido.

En este sentido, se observa que en las terapias que mostraron una reducción marcada de los niveles de β -amiloide en la EA, se observó una mejoría cognitiva limitada o ninguna mejoría. Gran parte de la comunidad investigadora esperaba esto, ya que la EA se ha considerado en gran medida una enfermedad de toxicidad química y física del β -amiloide (por ejemplo, generación de especies reactivas de oxígeno, unión a metales, etc.).

Callahan et al ((2003) *Society for Neuroscience Abstract Viewer and Itinerary Planner*) describen la "Caracterización de agonistas del receptor nicotínico alfa7 en modelos animales de cognición". Hashimoto et al. ((2006) *European Journal of Pharmacology*, 553: 191-195) describen que los déficits cognitivos inducidos por fenciclidina en ratones mejoran con la posterior administración subcrónica de tropisetron y el papel de los receptores nicotínicos alfa7.

Investigaciones recientes en ratones transgénicos han demostrado que el bloqueo de la escisión C terminal de la proteína precursora de amiloide ("APP", por sus siglas en inglés) en el resto de ácido aspártico (D664 de APP₆₉₅) intracelularmente conduce a la anulación de las anomalías fisiopatológicas características y los síntomas de comportamiento asociados a la enfermedad de Alzheimer. Los métodos que se describen en el presente documento se basan, en parte, en la identificación de moléculas que modulan el procesamiento de APP a partir de los fragmentos pro-EA (por ejemplo, sAPP β , A β , Jcasp y C-31 (pueden determinarse los niveles de Jcasp y C-31 midiendo los niveles de APPneo, un fragmento de longitud completa de APP sin los 31 aminoácidos C terminales)) hasta los fragmentos anti-EA (por ejemplo, sAPPa, p3 y AICD).

50 Sumario de la invención

La presente invención proporciona el compuesto tropisetron, o su sal farmacéuticamente aceptable, para su uso en un método para retrasar la aparición y/o ralentizar la progresión del deterioro cognitivo leve (DCL) caracterizado por el procesamiento de APP por vía amiloidogénica en un mamífero, en el que dicho retraso de la aparición y/o ralentización de la progresión comprende una reducción en el LCR de los niveles de uno o más componentes seleccionados entre el grupo que consiste en Tau total (tTau), fosfo-Tau (pTau), APPneo, A β 40 soluble, relación pTau/A β 42 y relación tTau/A β 42, y/o un aumento en el LCR de los niveles de uno o más componentes seleccionados entre el grupo que consiste en la relación A β 42/A β 40, relación A β 42/A β 38, sAPPa, relación sAPPa/sAPP β , relación sAPP α /A β 40 y relación sAPP α /A β 42. En el presente documento se describen métodos para mitigar en un mamífero uno o más síntomas asociados al deterioro cognitivo leve (DCL) (por ejemplo, el DCL asociado a depósitos de amiloide en el cerebro). En el presente documento se describe un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en tropisetron, disulfiram, honokiol y nimetazepam, o una sal farmacéuticamente aceptable (u otra forma farmacéuticamente aceptable) de los mismos, para su uso en un método para mitigar un síntoma de deterioro cognitivo leve (DCL) asociado a depósitos de amiloide en el cerebro. En determinadas realizaciones, el mamífero es un ser humano, mientras que en otras realizaciones, el mamífero es un mamífero no humano. En diversas realizaciones, el mamífero corre el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer. En

determinadas realizaciones, el mamífero tiene un riesgo familiar de tener la enfermedad de Alzheimer. En determinadas realizaciones, el mamífero tiene una mutación de la enfermedad de Alzheimer familiar (EAF). En determinadas realizaciones, el mamífero tiene el alelo APOE $\epsilon 4$. En determinadas realizaciones, la administración del compuesto o compuestos retrasa o previene la progresión del DCL a la enfermedad de Alzheimer. En determinadas realizaciones, el mamífero está libre de y no tiene factores de riesgo genéticos de la enfermedad de Parkinson o la esquizofrenia y/o no se diagnostica que tenga o corra el riesgo de padecer la enfermedad de Parkinson o la esquizofrenia. En determinados aspectos, el mamífero no tiene ninguna enfermedad o trastorno neurológico distintos de la enfermedad de Alzheimer. En diversas realizaciones, retrasar la aparición, y/o ralentizar la progresión comprende una reducción en el LCR de los niveles de uno o más componentes seleccionados entre el grupo que consiste en Tau total (tTau), fosfo-Tau (pTau), APPneo, A β 40 soluble, relación pTau/A β 42 y relación tTau/A β 42 y/o un aumento en el nivel en LCR de uno o más componentes seleccionados entre el grupo que consiste en la relación A β 42/A β 40, relación A β 42/A β 38, sAPP α , relación sAPP α /sAPP α , relación sAPP α /A β 40 y relación sAPP α /A β 42, y/o una reducción de la carga de placa en el cerebro del mamífero, y/o una reducción de la velocidad de formación de placa en el cerebro del mamífero, y/o una mejora y/o una estabilización, y/o una reducción de la velocidad de deterioro de la clasificación de demencia clínica (CDC) del mamífero.

En diversas realizaciones, el compuesto o compuestos pueden administrarse en cualquier modalidad que permita que el compuesto o compuestos alcancen el cerebro (por ejemplo, para cruzar o eludir la barrera hematoencefálica). En determinadas realizaciones, el compuesto se administra por vía oral. En algunos aspectos, la administración es durante un período de al menos 3 semanas, por ejemplo, durante un período de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 semanas o más, según corresponda. En algunos aspectos, la administración se realiza durante un período de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses o más, según corresponda. En algunos aspectos, la administración es durante el resto de la vida del sujeto. En determinados aspectos, la administración comprende administrar una, dos, tres o cuatro veces al día durante el período de tratamiento. En determinados aspectos, el compuesto o compuestos se formulan para la administración a través de una vía seleccionada entre el grupo que consiste en administración isofórica, administración transdérmica, administración en aerosol, administración a través de inhalación, administración oral, administración intravenosa y administración rectal. En determinados aspectos, el compuesto o el compuesto o compuestos se administran a través de una vía seleccionada entre el grupo que consiste en administración isofórica, administración transdérmica (por ejemplo, a través de un parche transdérmico), administración en aerosol, administración a través de inhalación, administración oral, administración intravenosa y administración rectal. En determinados aspectos, el compuesto o compuestos son un inhibidor de la acetilcolinesterasa (por ejemplo, tacrina, ipidacrina, galantamina, donepezilo, icopezilo, zanapezilo, rivastigmina, huperzina A, fenserina, fisostigmina, neostigmina, piridostigmina, ambenonio, demarcario, edrofonio, ladostigil, ungeremina y similares) que no se administra junto con dicho compuesto. En determinados aspectos, el tropisetron, disulfiram, honokiol y nimetazepam o una sal farmacéuticamente aceptable (u otra forma farmacéuticamente aceptable) de los mismos, son los únicos agentes que se administran al sujeto que tienen un efecto neurofisiológico. En determinados aspectos, estos compuestos son los únicos agentes activos que se prescriben al sujeto para la mitigación de un síntoma de DCL o para inhibir o detener la progresión del DCL a la EA.

También se describen métodos para disminuir la gravedad o disminuir la progresión de una enfermedad caracterizada por depósitos de amiloide en el cerebro en un mamífero. Se describen métodos "terapéuticos" y "profilácticos". En determinados aspectos, se describen uno o más compuestos seleccionados entre el grupo que consiste en tropisetron, disulfiram, honokiol y nimetazepam, o su sal farmacéuticamente aceptable, para su uso en un método para disminuir la gravedad o retrasar la progresión de una enfermedad caracterizada por depósitos de amiloide en el cerebro en un mamífero (por ejemplo, un uso terapéutico), y/o para su uso en un método para reducir el riesgo o retrasar la aparición de una enfermedad caracterizada por depósitos de amiloide en el cerebro en un mamífero (por ejemplo, un uso profiláctico). En determinados aspectos, el compuesto es tropisetron y/o una sal farmacéuticamente aceptable (u otra forma farmacéuticamente aceptable) del mismo, o disulfiram o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y/o honokiol o una sal farmacéuticamente aceptable (u otra forma farmacéuticamente aceptable) del mismo y/o nimetazepam o una sal farmacéuticamente aceptable (u otra forma farmacéuticamente aceptable) del mismo. En determinados aspectos, el mamífero es un ser humano o un mamífero no humano. En determinados aspectos, la enfermedad es un deterioro cognitivo leve (DCL) y/o al mamífero se le diagnostica un deterioro cognitivo leve (DCL). En determinados aspectos, la administración del compuesto o los compuestos retrasa o previene la progresión del DCL a la enfermedad de Alzheimer. En determinados aspectos, la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer (por ejemplo, EA en etapa temprana, EA en etapa media, EA en etapa avanzada). En determinados aspectos al mamífero se le diagnostica la enfermedad de Alzheimer. En determinados aspectos, el mamífero corre el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer. En determinados aspectos, el mamífero tiene un riesgo familiar de tener la enfermedad de Alzheimer. En determinados aspectos, el mamífero tiene una mutación de la enfermedad de Alzheimer familiar (EAF). En determinados aspectos el mamífero tiene el alelo APOE $\epsilon 4$. En determinados aspectos, la administración del compuesto o los compuestos retrasa o previene la progresión de la etapa temprana de la EA a la etapa media de la EA, retrasa o previene la progresión de la etapa media de la EA a la etapa avanzada de la EA. En determinados aspectos, el mamífero está libre de factores genéticos de riesgo de enfermedad de Parkinson o esquizofrenia. En determinados aspectos, no se diagnostica que el mamífero tenga o corra el riesgo de desarrollar enfermedad de Parkinson o esquizofrenia. En determinados aspectos, el mamífero no tiene y/o no se diagnostica que tenga o corra el riesgo de padecer una enfermedad o trastorno neurológico distinto de la enfermedad de Alzheimer. En determinados aspectos, la reducción del riesgo, la

disminución de la gravedad, o el retraso de la progresión, o la aparición de la enfermedad comprenden una reducción en el LCR de los niveles de uno o más componentes seleccionados entre el grupo que consiste en Tau, fosfo-Tau (pTau), APPneo, A β 40 soluble y A β 42 soluble, y/o comprende una reducción de la carga de placa en el cerebro del mamífero, y/o comprende una reducción de la velocidad de formación de placa en el cerebro del mamífero, y/o comprende una mejora en las capacidades cognitivas del mamífero, y/o la mejora, y/o la estabilización, y/o la reducción de la velocidad de deterioro de la clasificación de demencia clínica (CDC) del mamífero, y/o comprende una mejora percibida en la calidad de vida por el ser humano. En determinados aspectos, el mamífero es un ser humano y se previene o retrasa la progresión de un estado asintomático a un estado sintomático. En diversos aspectos, el compuesto o compuestos pueden administrarse en cualquier modalidad que permita que el compuesto o compuestos alcancen el cerebro (por ejemplo, para cruzar o eludir la barrera hematoencefálica). En determinados aspectos el compuesto se administra por vía oral. En algunos aspectos, la administración es durante un período de al menos 3 semanas, por ejemplo, durante un período de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 semanas o más, según corresponda. En algunos aspectos, la administración se realiza durante un período de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses o más, según corresponda. En algunos aspectos, la administración es durante el resto de la vida del sujeto. En determinados aspectos, la administración comprende la administración una, dos, tres o cuatro veces al día durante el período de tratamiento. En determinados aspectos, el compuesto o compuestos se formulan para la administración a través de una vía seleccionada entre el grupo que consiste en administración isofórica, administración transdérmica, administración en aerosol, administración a través de inhalación, administración oral, administración intravenosa y administración rectal. En determinados aspectos, el compuesto o compuestos se administran a través de una vía seleccionada entre el grupo que consiste en administración isofórica, administración transdérmica (por ejemplo, a través de un parche transdérmico), administración en aerosol, administración a través de inhalación, administración oral, administración intravenosa y administración rectal. En determinados aspectos, un inhibidor de la acetilcolinesterasa (por ejemplo, tacrina, ipidacrina, galantamina, donepezilo, icopezilo, zanapezilo, rivastigmina, huperzina A, fenserina, fisostigmina, neostigmina, piridostigmina, ambenonio, demarcario, edrofonio, ladostigil, ungeremina y similares) que no se administra junto con dicho compuesto. En determinados aspectos, el tropisetron, disulfiram, honokiol y nimetazepam o una sal farmacéuticamente aceptable (u otra forma farmacéuticamente aceptable) de los mismos, son los únicos agentes que se administran al sujeto que tienen un efecto neurofisiológico. En determinados aspectos, estos compuestos son los únicos agentes activos que se prescriben al sujeto para la terapia o la profilaxis de una patología amiloidogénica (por ejemplo, EA).

En otro aspecto, en el presente documento se describen métodos de prevención o tratamiento de una enfermedad caracterizada por depósitos de amiloide o un aumento de la concentración de péptido A β en un individuo que lo necesite. Dichos métodos implican administrar o hacer que se administre, una dosis eficaz de un compuesto (por ejemplo, tropisetron, disulfiram, honokiol y/o nimetazepam o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos) o su sal farmacéuticamente aceptable al individuo. Dichos métodos son en particular útiles para prevenir o tratar la enfermedad de Alzheimer, en cuyo caso el depósito de amiloide puede comprender A β . Los métodos pueden usarse tanto en sujetos asintomáticos (por ejemplo, pacientes) como en aquellos que actualmente muestran síntomas de enfermedad.

En un aspecto adicional, en el presente documento se describen métodos para promover el procesamiento de la proteína precursora de amiloide (APP) mediante la vía no amiloidogénica (por ejemplo, "anti-EA") y reducir o inhibir el procesamiento de APP mediante la vía amiloidogénica (por ejemplo, "por-EA"). En algunos aspectos, los métodos comprenden poner en contacto una célula que expresa APP (o hacer que dicha célula se ponga en contacto) con un compuesto (por ejemplo, tropisetron, disulfiram, honokiol y/o nimetazepam o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos), en una cantidad suficiente para aumentar el procesamiento de APP por la vía no amiloidogénica. En algunos aspectos, la célula se pone en contacto *in vivo*. En algunos aspectos, la isoforma de APP es APP695, la isoforma predominante de APP en el cerebro.

En algunas realizaciones, el mamífero es un ser humano.

En algunas realizaciones, la enfermedad es un deterioro cognitivo leve (DCL). En algunas realizaciones, se diagnostica que el mamífero tiene deterioro cognitivo leve (DCL). En algunas realizaciones, la administración de tropisetron retrasa o previene la progresión del DCL a la enfermedad de Alzheimer.

En algunos aspectos, la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, puede diagnosticarse al mamífero como que tiene la enfermedad de Alzheimer o el mamífero puede correr el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer. El riesgo de desarrollar una enfermedad puede deberse a factores ambientales, de estilo de vida o genéticos. Los factores de riesgo ilustrativos incluyen, sin limitación, por ejemplo, el Compuesto B positivo para Pittsburgh ("PiB")-TEP, una o más mutaciones genéticas asociadas a EA, pérdida de volumen del hipocampo o un perfil pro-EA de líquido cefalorraquídeo (niveles elevados de sAPP β , A β , Jcasp y C-31 y/o APPneo). El mamífero puede tener un riesgo familiar de tener la enfermedad de Alzheimer, por ejemplo, tener un padre, abuelo o hermano con enfermedad de Alzheimer. En algunas realizaciones, el mamífero tiene una mutación de la enfermedad de Alzheimer familiar (EAF). En algunas realizaciones, el mamífero tiene el alelo APOE ϵ 4.

En algunos aspectos, el mamífero no tiene, no se diagnostica que tenga y/o no corre el riesgo de padecer una enfermedad o trastorno neurológico que no sea la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el mamífero está libre de y/o no se diagnostica que tenga, y/o no corre el riesgo, y/o no tiene factores de riesgo genéticos de enfermedad de Parkinson o esquizofrenia.

5 En algunos aspectos, el mamífero es asintomático. En dichos casos, la administración del compuesto (por ejemplo, tropisetron, disulfiram, honokiol y/o nimetazepam o sus sales farmacéuticamente aceptables) puede retrasar o prevenir la progresión de DCL asintomático o de DCL a EA, o de asintomático a EA. En algunos aspectos, se evita o retrasa la progresión de un estado asintomático a un estado sintomático. En algunos aspectos, la progresión de un
10 estado sintomático a un estado más sintomático se previene o se retrasa (por ejemplo, de DCL a EA, de DCL leve a DCL, o de EA leve a EA más severa).

En algunos aspectos, la mitigación, la reducción del riesgo, la disminución de la gravedad o el retraso en la progresión o la aparición de la enfermedad comprenden una reducción en el LCR de los niveles de uno o más
15 componentes seleccionados entre el grupo que consiste en Tau total (tTau), fosfo-Tau (pTau), APPneo, A β 40 soluble, relación pTau/A β 42 y relación tTau/A β 42, y/o un aumento en el nivel en el LCR de uno o más componentes seleccionados entre el grupo que consiste en la relación A β 42/A β 40, relación A β 42/A β 38, sAPPa, relación sAPPa/sAPP β , relación sAPPa/A β 40 y relación sAPPa/A β 42. En algunos aspectos, la mitigación y/o la reducción del riesgo, y/o la disminución de la gravedad, y/o el retraso de la progresión y/o la aparición de la enfermedad
20 comprenden una reducción de la carga de placa en el cerebro del mamífero. En algunos aspectos, la mitigación, la reducción del riesgo, la disminución de la gravedad o el retraso en la progresión o la aparición de la enfermedad comprenden una reducción de la velocidad de formación de placa en el cerebro del mamífero, por ejemplo, según se determina por TC, TEP, PIB-TEP y/o RM. En algunos aspectos, la mitigación, la reducción del riesgo, la disminución de la gravedad o el retraso en la progresión o la aparición de la enfermedad comprenden una mejora en las
25 capacidades cognitivas del mamífero. En algunos aspectos, el mamífero es un ser humano y la disminución de la gravedad o el retraso de la progresión de la enfermedad comprende una mejora percibida en la calidad de vida por parte del ser humano.

En algunos aspectos, el compuesto (por ejemplo, tropisetron, disulfiram, honokiol y/o nimetazepam o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos) se formula para su administración a través de una vía seleccionada
30 entre el grupo que consiste en administración isoforética, administración transdérmica, administración en aerosol, administración a través de inhalación, administración oral, administración intravenosa y administración rectal. En algunos aspectos, el compuesto se administra a través de una vía seleccionada entre el grupo que consiste en administración isoforética, administración transdérmica, administración en aerosol, administración a través de
35 inhalación, administración oral, administración intravenosa y administración rectal. En algunos aspectos, el compuesto (por ejemplo, tropisetron, disulfiram, honokiol y/o nimetazepam o sus sales farmacéuticamente aceptables) se administra por vía oral. En algunos aspectos, el compuesto (por ejemplo, tropisetron, disulfiram, honokiol y/o nimetazepam o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos) se administra por vía transdérmica, por ejemplo, a través de un parche transdérmico.

40 En algunos aspectos, la administración es durante un período de al menos 3 semanas, por ejemplo, durante un período de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 semanas o más, según corresponda. En algunos aspectos, la administración se realiza durante un período de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses o más, según corresponda. En algunos aspectos, la administración es durante el resto de la vida del sujeto. En determinados
45 aspectos, la administración comprende la administración una, dos, tres o cuatro veces al día durante el período de tratamiento.

En algunos aspectos, no se administra un inhibidor de la acetilcolinesterasa junto con dicho compuesto (por ejemplo, tropisetron, y/o disulfiram, y/o honokiol, y/o nimetazepam, o las sales farmacéuticamente aceptables). En algunos
50 aspectos, el tropisetron no se administra junto con un inhibidor de la acetilcolinesterasa.

Definiciones

Como se usa en el presente documento, "administrar" se refiere a la administración local y sistémica, por ejemplo, incluyendo la administración enteral, parenteral, pulmonar y tópica/transdérmica. Las vías de administración para los
55 compuestos (por ejemplo, tropisetron, disulfiram, honokiol y/o nimetazepam) que encuentran un uso en los métodos que se describen en el presente documento incluyen, por ejemplo, la administración oral (vía oral (V.O.)), administración nasal o por inhalación, la administración como supositorio, el contacto tópico, la entrega transdérmica (por ejemplo, a través de un parche transdérmico), la administración intratecal (IT), la administración intravenosa
60 ("iv"), la administración intraperitoneal ("ip"), la administración intramuscular ("im"), la administración intralesional o la administración subcutánea ("sc"), o la implantación de un dispositivo de liberación lenta, por ejemplo, una bomba mini-osmótica, una formulación de depósito, etc., a un sujeto. La administración puede ser por cualquier vía, incluyendo la parenteral y la transmucosa (por ejemplo, oral, nasal, vaginal, rectal o transdérmica). La administración parenteral incluye, por ejemplo, la intravenosa, intramuscular, intraarterial, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal,
65 intraventricular, ionoforética e intracraneal. Otros modos de entrega incluyen, pero no se limitan a, el uso de formulaciones liposómicas, infusión intravenosa, parches transdérmicos, etc.

Las expresiones "administración sistémica" y "administrados por vía sistémica" se refieren a un método de administración de un compuesto o composición a un mamífero de manera que el compuesto o la composición se entregue a sitios del cuerpo, incluyendo el sitio de acción farmacéutica diana, a través del sistema circulatorio. La administración sistémica incluye, pero no se limita a, la administración oral, intranasal, rectal y parenteral (por ejemplo, que no sea a través del tracto alimentario, como la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, transdérmica y subcutánea).

La expresión "coadministración" o "administración simultánea", cuando se usa, por ejemplo, con respecto a los compuestos (por ejemplo, tropisetron, disulfiram, honokiol y/o nimetazepam) y otro agente activo (por ejemplo, un potenciador de la cognición), se refiere a la administración del compuesto y el agente activo de manera que ambos puedan conseguir simultáneamente un efecto fisiológico. Sin embargo, los dos agentes no necesitan administrarse juntos. En determinados aspectos, la administración de un agente puede anteceder a la administración del otro. El efecto fisiológico simultáneo no necesariamente requiere la presencia de ambos agentes en la circulación al mismo tiempo. Sin embargo, en determinados aspectos, la administración conjunta generalmente da como resultado que ambos agentes estén presentes simultáneamente en el cuerpo (por ejemplo, en el plasma) en una fracción significativa (por ejemplo, el 20 % o más, preferentemente el 30 % o el 40 % o más, más preferentemente el 50 % o el 60 % o más, mucho más preferentemente el 70 % o el 80 % o el 90 % o más) de su concentración sérica máxima para cualquier dosis dada.

La expresión "cantidad eficaz" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad y/o dosis, y/o pauta de dosificación de uno o más compuestos necesarios para lograr el resultado deseado, por ejemplo, una cantidad suficiente para mitigar en un mamífero uno o más síntomas asociados al deterioro cognitivo leve (DCL) o una cantidad suficiente para disminuir la gravedad o retrasar la progresión de una enfermedad caracterizada por depósitos de amiloide en el cerebro en un mamífero (por ejemplo, cantidades terapéuticamente eficaces), una cantidad suficiente para reducir el riesgo o retrasar la aparición, y/o reducir la gravedad en última instancia de una enfermedad caracterizada por depósitos de amiloide en el cerebro en un mamífero (por ejemplo, cantidades profilácticamente eficaces).

La frase "causa de la administración" se refiere a las acciones tomadas por un profesional de la medicina (por ejemplo, un médico) o una persona que controla la atención médica de un sujeto, que controla y/o permite la administración del agente o agentes/compuesto o compuestos en cuestión al sujeto. La causa de la administración puede implicar el diagnóstico y/o la determinación de una pauta terapéutica o profiláctica apropiada, y/o la prescripción de agente o agentes/compuesto o compuestos particulares para un sujeto. Dicha prescripción puede incluir, por ejemplo, redactar un formulario de prescripción, anotar un registro médico y similares.

La frase "junto con" cuando se usa en referencia al uso del agente o agentes activos descrito que se describen en el presente documento (por ejemplo, uno o más de entre tropisetron, disulfiram, honokiol y nimetazepam, un enantiómero, una mezcla de enantiómeros, una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptables de dicho compuesto o compuestos junto con uno o más fármacos que se describen en el presente documento (por ejemplo, un inhibidor de la acetilcolinesterasa), el agente o agentes activos y el otro fármaco o fármacos se administran de manera que haya al menos algunos solapamientos cronológicos en su actividad fisiológica sobre el organismo. Cuando no se administran conjuntamente entre sí, no hay un solapamiento cronológico en la actividad fisiológica del organismo. En determinados aspectos preferidos, el "otro fármaco o fármacos" no se administran en absoluto (por ejemplo, no se administran conjuntamente) en el organismo.

Como se usan en el presente documento, los términos "tratar" y "tratamiento" se refieren a retrasar la aparición, retardar o revertir el progreso de, reducir la gravedad, aliviar o prevenir la enfermedad o afección a la que se aplica el término o uno o más síntomas de dicha enfermedad o afección.

El término "mitigar" se refiere a la reducción o eliminación de uno o más síntomas de esa patología o enfermedad, y/o una reducción de la velocidad o retraso de la aparición o gravedad de uno o más síntomas de esa patología o enfermedad, y/o la prevención de esa patología o enfermedad. En determinados aspectos, la reducción o eliminación de uno o más síntomas de patología o enfermedad puede incluir, pero no se limita a, la reducción o eliminación de uno o más marcadores que son característicos de la patología o enfermedad (por ejemplo, de Tau total (tTau), fosfo-Tau (pTau), APPneo, A β 40 soluble, relación pTau/A β 42 y relación tTau/A β 42, y/o un aumento en el LCR del nivel de uno o más componentes seleccionados entre el grupo que consiste en la relación A β 42/A β 40, relación A β 42/A β 38, relación sAPPA, sAPPA/sAPP β , relación sAPPA/A β 40, relación sAPPA/A β 42, etc.) y/o reducción, estabilización o reversión de uno o más criterios de diagnóstico (por ejemplo, clasificación de demencia clínica (CDC)).

Como se usa en el presente documento, la frase "que consiste esencialmente en" se refiere a los géneros o especies de agentes farmacéuticos activos enumerados en un método o composición, y puede incluir adicionalmente otros agentes que, por sí solos, no tienen actividad sustancial para la indicación o el propósito enumerados. En algunos aspectos, la frase "que consiste esencialmente en" excluye expresamente la inclusión de uno o más agentes adicionales que tengan una actividad neurofarmacológica distinta de la de los compuestos enumerados (por ejemplo, que no sean tropisetron, disulfiram, honokiol y/o nimetazepam). En algunos aspectos, la

frase "que consiste esencialmente en" excluye expresamente la inclusión de uno o más agentes activos adicionales distintos de los compuestos (por ejemplo, que no sean tropisetron, disulfiram, honokiol y/o nimetazepam). En algunos aspectos, la frase "que consiste esencialmente en" excluye expresamente la inclusión de uno o más inhibidores de acetilcolinesterasa.

5 Los términos "sujeto", "individuo" y "paciente" se refieren de manera indistinta a un mamífero, preferentemente un primate humano o no humano, pero también mamíferos domesticados (por ejemplo, caninos o felinos), mamíferos de laboratorio (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster, cobaya) y mamíferos agrícolas (por ejemplo, equinos, bovinos, porcinos, ovinos). En diversas realizaciones, el sujeto puede ser un ser humano (por ejemplo, hombre
10 adulto, mujer adulta, hombre adolescente, mujer adolescente, niño, niña) bajo el cuidado de un médico u otro profesional de la salud en un hospital, centro de atención psiquiátrica, como un paciente ambulatorio o en otro contexto clínico. En determinadas realizaciones, el sujeto puede no estar bajo el cuidado o la prescripción de un médico u otro profesional de la salud.

15 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra un ensayo de detección usando células 7W transfectadas de manera estable con APP de tipo silvestre y expuestas a los compuestos (por ejemplo, tropisetron (Navo), disulfiram (Disulf), honokiol (Hono) y nimetazepam (Nimetz)).

20 Las Figuras 2A-B ilustran el efecto de los compuestos (por ejemplo, tropisetron, disulfiram, honokiol y nimetazepam) en cultivos neuronales primarios. Tropisetron se identifica como Navoban.

La Figura 3 ilustra un análisis de dispersión de rayos X de eAPP₂₃₀₋₂₆₄ en presencia de sulfiram o disulfiram.

25 La Figura 4 ilustra un análisis farmacocinético de los niveles en el cerebro y el plasma de clorhidrato de tropisetron (identificado como Navoban, F03) en ratones después del tratamiento subcutáneo (sc).

30 La Figura 5 ilustra que el tratamiento de ratones en el modelo de ratón de EA con clorhidrato de tropisetron (identificado como Navoban) 0,3 mg/kg (mpk) durante 5 días produce un aumento en los niveles de sAPPα en el hipocampo (Hip) y la corteza entorrinal (CE).

35 La Figura 6 ilustra que el tratamiento de ratones en el modelo de ratón de EA con clorhidrato de tropisetron (identificado como Navoban) 0,3 mg/kg (mpk) durante 5 días da como resultado una disminución en los niveles de Aβ40 en el hipocampo (Hip) y la corteza entorrinal (CE).

40 La Figura 7 ilustra que el tratamiento de ratones en el modelo de ratón de EA con clorhidrato de tropisetron (identificado como Navoban) 0,3 mg/kg (mpk) durante 5 días da como resultado una disminución en los niveles de Aβ42 en el hipocampo (Hip) y la corteza entorrinal (CE).

La Figura 8 ilustra que el tratamiento de ratones en el modelo de ratón de EA con nimetazepam (Nim) 10 mg/kg (mpk) durante 5 días produce un aumento en los niveles de sAPPα en el hipocampo (Hip) y la corteza entorrinal (CE).

45 Descripción detallada

1. Introducción

50 Los métodos que se describen en el presente documento se basan, en parte, en el sorprendente descubrimiento de que determinados compuestos (por ejemplo, tropisetron, disulfiram, honokiol y nimetazepam y diversas formas farmacéuticas de los mismos) promueven el procesamiento de proteína precursora amiloide beta (A4) ("APP") por la vía no amiloidogénica ("anti-EA") y reduce o inhibe el procesamiento de APP por la vía amiloidogénica ("pro-EA"). Se cree que esto da como resultado una producción reducida de Ap, que puede depositarse en placas amiloides en el cerebro y en los otros fragmentos proamiloidogénicos que se sabe que dan como resultado neurotoxicidad.

55 Además, se cree que estos compuestos pueden usarse para mitigar o mejorar en un mamífero uno o más síntomas asociados al deterioro cognitivo leve (DCL), en particular el DCL asociado a depósitos de amiloide en el cerebro.

60 En consecuencia, en diversos aspectos se proporcionan métodos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades caracterizadas por un proceso amiloidogénico (por ejemplo, DCL o la progresión del DCL a la enfermedad de Alzheimer). Los métodos implican la administración de uno o más compuestos (por ejemplo, tropisetron, disulfiram, honokiol y/o nimetazepam) para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades caracterizadas por depósitos de amiloide en el cerebro, en particular el DCL o la progresión del DCL a una Enfermedad de Alzheimer de etapa temprana. En determinados aspectos, los compuestos pueden usarse para
65 mejorar uno o más síntomas de la enfermedad de Alzheimer como se describe en el presente documento.

2. Sujetos que pueden beneficiarse de los métodos actuales

Si bien los métodos que se describen en el presente documento se detallan principalmente en el contexto del deterioro cognitivo leve (DCL) y la enfermedad de Alzheimer (EA), se cree que pueden aplicarse igualmente a otras patologías caracterizadas por la amiloidosis. En la Tabla 1 se muestra una lista ilustrativa, pero no limitante, de afecciones caracterizadas por la formación de placa amiloide.

TABLA 1

Patologías ilustrativas caracterizadas por la formación/deposición de amiloide.		
Enfermedad	Proteína característica	Abreviatura
Enfermedad de Alzheimer	Amiloide beta	A β
Diabetes mellitus de tipo 2	Proteína amiloide del islote (Amilina)	IAPP
Enfermedad de Parkinson	Alfa-sinucleína	SNCA
Encefalopatía espongiforme transmisible, por ejemplo, encefalopatía espongiforme bovina	Prion	PrP
Enfermedad de Huntington	Huntingtina	HTT
Carcinoma medular de la tiroides	Calcitonina	ACAL
Arritmias cardíacas, Amiloidosis auricular aislada	Factor natriurético auricular	AANF
Aterosclerosis	Apolipoproteína AI	AApoA1
Artritis reumatoide	Amiloide sérico A	AA
Amiloide medial aórtico	Medina	Amed
Prolactinomas	Prolactina	APro
Polineuropatía amiloide familiar	Transtiretina	ATTR
Amiloidosis sistémica no neuropática hereditaria	Lisozima	ALys
Amiloidosis relacionada con la diálisis	Microglobulina beta 2	A β 2M
Amiloidosis finlandesa	Gelsolina	AGel
Distrofia corneal de la red	Queratoepitelina	AKer
Angiopatia amiloide cerebral	Amiloide beta ^[1b]	A β
Angiopatia amiloide cerebral (tipo islandés)	Cistatina	ACys
Amiloidosis AL sistémica	Cadena ligera de inmunoglobulina AL	AL
Miositis de cuerpos de inclusión esporádicos	S-IBM	ninguno
Degeneración macular relacionada con la edad (DME)	Amiloide beta	A β
Demencia cerebrovascular	Amiloide cerebrovascular	CVA

Los sujetos/pacientes susceptibles de tratamiento usando los métodos que se describen en el presente documento incluyen individuos en riesgo de enfermedad (por ejemplo, una patología caracterizada por la formación de placa amiloide tal como DCL) pero que no muestran síntomas, así como sujetos que presentan síntomas en la actualidad. Se sabe que el riesgo de DCL y posteriormente de enfermedad de Alzheimer generalmente aumenta con la edad. En consecuencia, en sujetos asintomáticos sin otros factores de riesgo conocidos, en determinados aspectos, se contempla la aplicación profiláctica para sujetos mayores de 50 años de edad, o sujetos mayores de 55 años de edad, o sujetos mayores de 60 años de edad, o sujetos mayores de 65 años de edad, o sujetos mayores de 70 años de edad, o sujetos mayores de 75 años de edad, o sujetos mayores de 80 años de edad, en particular para prevenir o ralentizar la aparición o la gravedad final del deterioro cognitivo leve (DCL), y/o ralentizar la velocidad o prevenir la progresión del DCL a la enfermedad de Alzheimer (EA) de etapa temprana.

En determinados aspectos, los métodos que se describen en el presente documento son especialmente útiles para individuos que tienen un riesgo genético conocido de desarrollar la enfermedad de Alzheimer (u otras patologías amiloidogénicas), ya sean asintomáticos o que presenten síntomas de la enfermedad. Dichos individuos incluyen aquellos que tienen parientes que han experimentado DCL o EA (por ejemplo, un padre o madre, un abuelo o abuela, un hermano o hermana) y aquellos cuyo riesgo está determinado por el análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo hacia la enfermedad de Alzheimer incluyen, por ejemplo, mutaciones en el gen APP, en particular mutaciones en la posición 717 y las posiciones 670 y 671 denominadas mutaciones Hardy y Swedish respectivamente (véase Hardy (1997) *Trends. Neurosci.*, 20: 154-159). Otros marcadores de riesgo incluyen mutaciones en los genes de presenilina (PS1 y PS2), antecedentes familiares de EA, que tienen la mutación de la enfermedad de Alzheimer familiar (EAF), el alelo APOE ϵ 4, hipercolesterolemia o aterosclerosis. Se revisan genes adicionales de susceptibilidad para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, por ejemplo, en Sleegers, et al. (2010) *Trends Genet.* 26 (2): 84-93.

En algunas realizaciones, el sujeto es asintomático, pero tiene factores de riesgo familiares y/o genéticos para desarrollar DCL o enfermedad de Alzheimer. En pacientes asintomáticos, el tratamiento puede comenzar a cualquier

edad (por ejemplo, 20, 30, 40, 50 años de edad). Por lo general, sin embargo, no es necesario comenzar el tratamiento hasta que el paciente alcance al menos unos 40, 50, 60 o 70 años de edad.

En algunos aspectos, el sujeto presenta síntomas, por ejemplo, de deterioro cognitivo leve (DCL) o enfermedad de Alzheimer (EA). Los individuos que actualmente padecen la enfermedad de Alzheimer pueden reconocerse por la demencia característica, así como por la presencia de factores de riesgo descritos anteriormente. Además, existe una serie de ensayos de diagnóstico disponibles para identificar los individuos que tienen EA. Estos incluyen la medición de los niveles en LCR de Tau, fosfo-tau (pTau), A β 42 y el fragmento de APP escindido en el extremo C (APPneo). Tau total (tTau), fosfo-Tau (pTau), APPneo, A β 40 soluble, relación pTau/A β 42 y relación tTau/A β 42 y niveles disminuidos de A β 42, relación A β 42/A β 40, relación A β 42/A β 38, niveles de sAPP α , relación sAPP α /sAPP β , relación sAPP α /A β 40 y relación sAPP α /A β 42 significan la presencia de EA. En algunas realizaciones, al sujeto o paciente se le diagnostica DCL. Los niveles aumentados de proteína de la hebra neural (NTP) en la orina y/o los niveles aumentados de macroglobulina α 2 (α 2M) y/o factor de complemento H (CFH) en plasma también son biomarcadores de DCL y/o EA. Véase, Anoop, et al., *Int J Alzheimers Dis.* (2010) 23 de junio; 2010. pii:606802 (documento PMID 20721349). En algunos aspectos, al sujeto o paciente se le diagnostica enfermedad de Alzheimer (por ejemplo, de etapa temprana, de etapa media o de etapa avanzada).

En determinados aspectos, los sujetos susceptibles de tratamiento pueden tener un deterioro de la memoria asociado a la edad (AAMI) o un deterioro cognitivo leve (DCL). Los métodos que se describen en el presente documento son particularmente adecuados para el tratamiento del DCL. En dichos casos, los métodos pueden reducir uno o más síntomas característicos del DCL y/o retrasar o prevenir la progresión del DCL a la enfermedad de Alzheimer temprana o reducir la gravedad final de la enfermedad.

Deterioro cognitivo leve (DCL)

El deterioro cognitivo leve (DCL, también conocido como demencia incipiente o deterioro de la memoria aislada) es un diagnóstico que se da a individuos con deterioros cognitivos más allá de los esperados para su edad y educación, pero que normalmente no interfieren significativamente con sus actividades diarias (véase, por ejemplo, Petersen et al. (1999) *Arch. Neurol.* 56 (3): 303-308). En muchos casos, se considera que es una etapa límite o de transición entre el envejecimiento normal y la demencia. Aunque el DCL puede presentar una diversidad de síntomas, cuando la pérdida de memoria es el síntoma predominante, se denomina "DCL amnésico" y se ve con frecuencia como un factor de riesgo para la enfermedad de Alzheimer (véase, por ejemplo, Grundman et al. (2004) *Arch. Neurol.* 61 (1): 59-66; y en Internet en es.wikipedia.org/wiki/Mild_cognitive_impairment-cite_note-Grundman-1). Cuando los individuos tienen deficiencias en dominios distintos de la memoria, con frecuencia se clasifican como DCL simple o no amnésico y se cree que es más probable que el deterioro de estos individuos se convierta en otras demencias (por ejemplo, demencia con cuerpos de Lewy). Existen pruebas que indican que, si bien los pacientes con DCL amnésicos pueden no cumplir con los criterios neuropatológicos para la enfermedad de Alzheimer, los pacientes pueden estar en una etapa de transición de la enfermedad de Alzheimer en evolución; los pacientes en este hipotético estadio de transición mostraron amiloide difuso en el neocórtex y frecuentes ovillos neurofibrilares en el lóbulo medio interno median (véase, por ejemplo, Petersen et al. (2006) *Arch. Neurol.* 63 (5): 665-72).

El diagnóstico de DCL normalmente implica una evaluación clínica integral que incluye la observación clínica, la formación de neuroimágenes, análisis de sangre y ensayos neuropsicológicos. Una evaluación similar se proporciona por lo general para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Existen pruebas emergentes de que la resonancia magnética puede observar un deterioro, incluyendo la pérdida progresiva de materia gris en el cerebro, desde un deterioro cognitivo leve hasta una enfermedad de Alzheimer completa (véase, por ejemplo, Whitwell et al. (2008) *Neurology* 70 (7): 512-520). Se usa una técnica conocida como formación de imágenes por TEP de PiB para mostrar claramente los sitios y las formas de los depósitos de amiloide beta en sujetos vivos usando un marcador C11 que se une selectivamente a dichos depósitos (véase, por ejemplo, Jack et al. (2008) *Brain* 131 (Parte 3): 665-680).

Actualmente, el DCL se diagnostica normalmente cuando existen 1) Pruebas de deterioro de la memoria; 2) Conservación de las capacidades cognitivas y funcionales generales; y 3) Ausencia de demencia diagnosticada.

El DCL y las etapas de la enfermedad de Alzheimer pueden identificarse/clasificarse, en parte por las puntuaciones de la Clasificación de Demencia Clínica (CDC). La CDC es una escala de cinco puntos utilizada para caracterizar seis dominios de rendimiento cognitivo y funcional aplicables a la enfermedad de Alzheimer y a demencias relacionadas: memoria, orientación, juicio y resolución de problemas, asuntos comunitarios, hogar y pasatiempos y cuidado personal. La información necesaria para hacer cada calificación se obtiene a través de una entrevista semiestructurada del paciente y un informante fiable o fuente colateral (por ejemplo, miembro de la familia).

La tabla de CDC proporciona anclajes descriptivos que guían al médico en la realización de clasificaciones apropiadas basadas en los datos de la entrevista y el criterio clínico. Además de las calificaciones para cada dominio, puede calcularse una puntuación de CDC general mediante el uso de un algoritmo. Esta puntuación es útil para caracterizar y rastrear el nivel de deterioro/demencia de un paciente: 0 = Normal; 0,5 = Demencia muy leve; 1 = Demencia leve; 2 = Demencia moderada; y 3 = Demencia grave. En la Tabla 2 se muestra una tabla de CDC

ilustrativa.

TABLA 2.

Tabla de clasificación de demencia clínica (CDC) ilustrativa.					
Deterioro: CDC:	Ninguna 0	Cuestionable 0,5	Ligera 1	Moderada 2	Grave 3
Memoria	Sin pérdida de memoria o pequeños olvidos no uniformes	Pequeños olvidos uniformes; recogida parcial de olvidos "benignos" del evento	Pérdida de memoria moderada; más marcada para eventos recientes; el defecto interfiere con las actividades diarias	Pérdida grave de memoria; solo se retiene material altamente aprendido; nuevo material se pierde rápidamente	Pérdida grave de memoria; solo permanecen fragmentos
Orientación	Totalmente orientado	Totalmente orientado excepto por una ligera dificultad con las relaciones temporales	Dificultad moderada con las relaciones temporales; orientado para el lugar en el examen; puede tener una desorientación geográfica en otro lugar	Dificultad grave con las relaciones temporales; por lo general desorientado con respecto al tiempo, con frecuencia con respecto al lugar.	Orientado solo con respecto a personas
Juicio y resolución de problemas	Resuelve problemas cotidianos y gestiona negocios y asuntos financieros bien; buen juicio en relación con el rendimiento pasado	Leve deterioro en la solución de problemas, similitudes y diferencias	Dificultad moderada frente a problemas, similitudes y diferencias; el juicio social por lo general se mantiene	Gravemente alterado en la gestión de problemas, similitudes y diferencias; juicio social por lo general impedido	No puede emitir juicios o resolver problemas
Asuntos comunitarios	Actuación independiente a nivel habitual en trabajo, compras, voluntariado y grupos sociales	Ligero deterioro en estas actividades	Incapaz de actuar de manera independiente en estas actividades, aunque todavía pueden participar en algunas; parece normal a la inspección informal	Sin pretensión de actuación independiente fuera del hogar Aparenta estar lo suficientemente bien como para realizar funciones fuera de la casa familiar	Aparenta estar demasiado enfermo para realizar funciones fuera de la casa familiar.
Hogar y pasatiempos	Vida en casa, pasatiempos e intereses intelectuales bien mantenidos	Vida en casa, pasatiempos e intereses intelectuales levemente deteriorados	Deterioro leve de la actuación en el hogar; tareas más difíciles abandonadas; aficiones e intereses más complicados abandonados	Solo se conservan tareas simples; intereses muy restringidos, mal mantenidos	No existe una función significativa en el hogar
Cuidado personal	Totalmente capaz de cuidarse a sí mismo		Necesita ayuda	Requiere asistencia para vestirse, para a higiene, para mantener los efectos personales	Requiere mucha ayuda con el cuidado personal; incontinencia frecuente

- 5 Una calificación de una CDC de $\sim 0,5$ o $\sim 0,5$ a 1,0 con frecuencia se considera DCL clínicamente pertinente. Las calificaciones más altas de CDC pueden ser indicativas de progresión hacia la enfermedad de Alzheimer.

- 10 En diversos aspectos, la administración de uno o más agentes que se describen en el presente documento (por ejemplo, tropisetron, disulfiram, honokiol y nimetazepam o las formas farmacéuticamente aceptables de los mismos) se considera eficaz cuando hay una reducción en el LCR de los niveles de uno o más componentes seleccionados entre el grupo que consiste en Tau, fosfo-Tau (pTau), APPneo, A β 40 soluble, A β 42 soluble y/o relación A β 42/A β 40, y/o cuando hay una reducción de la carga de placa en el cerebro del sujeto, y/o cuando hay una reducción de la velocidad de formación de placa en el cerebro del sujeto, y/o cuando hay una mejora en las capacidades cognitivas del sujeto, y/o cuando se percibe una mejora en la calidad de vida del sujeto, y/o cuando hay una reducción significativa en la calificación de la demencia clínica (CDC), y/o cuando la velocidad de aumento en la calificación de la demencia clínica se ralentiza o se detiene y/o cuando la progresión del DCL a la EA de etapa temprana se ralentiza o se detiene.

En algunas realizaciones, un diagnóstico de DCL puede determinarse considerando los resultados de varios ensayos clínicos. Por ejemplo, Grundman, et al., *Arch. Neurol* (2004) 61: 59-66 informan que puede establecerse un diagnóstico de DCL con eficiencia clínica usando un ensayo de memoria simple (recuperación de párrafos) para establecer un déficit de memoria objetivo, una medida de cognición general (Miniexamen del estado mental (MMSE), que se analiza con mayor detalle a continuación) para excluir un deterioro cognitivo más amplio más allá de la memoria y una entrevista clínica estructurada (CDC) con pacientes y cuidadores para verificar la queja y la pérdida de memoria del paciente y para garantizar que el paciente no sea demente. Los pacientes con DCL tienen un rendimiento, en promedio, menos de 1 desviación típica (DT) por debajo de lo normal en medidas no memorísticocognitivas incluidas en la batería. Los ensayos de aprendizaje, atención, velocidad perceptiva, fluidez de la categoría y función ejecutiva pueden verse afectados en los pacientes con DCL, pero son mucho menos importantes que el déficit de memoria.

Enfermedad de Alzheimer (EA).

En determinados aspectos, los métodos que se describen en el presente documento son útiles para prevenir o ralentizar la aparición de la enfermedad de Alzheimer (EA), para reducir la gravedad de la EA cuando el sujeto ha pasado al diagnóstico clínico de EA, y/o para mitigar uno o más síntomas de la enfermedad de Alzheimer.

En particular, cuando la enfermedad de Alzheimer se encuentra en la etapa temprana, los métodos pueden reducir o eliminar uno o más síntomas característicos de la EA y/o retrasar o prevenir la progresión del DCL a la etapa temprana o posterior de la enfermedad de Alzheimer.

Los individuos que actualmente padecen la enfermedad de Alzheimer pueden reconocerse por la demencia característica, así como por la presencia de factores de riesgo descritos anteriormente. Además, existe una serie de ensayos de diagnóstico disponibles para identificar a las personas que tienen EA. Las personas que actualmente padecen la enfermedad de Alzheimer pueden reconocerse por la demencia característica, así como por la presencia de factores de riesgo descritos anteriormente. Además, existe una serie de ensayos de diagnóstico disponibles para identificar a las personas que tienen EA. Estos incluyen la medición en el LCR de los niveles de Tau, fosfo-tau (pTau), sAPPA, sAPP β , A β 40, A β 42 y/o fragmento de APP escindido en el extremo C terminal (APPneo). Los niveles elevados de Tau, pTau, sAPP β y/o APPneo, y/o niveles disminuidos de sAPPA, A β 40 soluble y/o A β 42 soluble, en particular en el contexto de un diagnóstico diferencial, pueden significar la presencia de EA.

En determinados aspectos, los sujetos susceptibles de tratamiento pueden tener la enfermedad de Alzheimer. A los individuos que padecen la enfermedad de Alzheimer también se les pueden diagnosticar con los criterios de la Asociación de la enfermedad de Alzheimer y trastornos relacionados (ADRDA, por sus siglas en inglés). Los criterios para la enfermedad de Alzheimer de NINCDS-ADRDA fueron propuestos en 1984 por el Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Comunicativos e Ictus y la Enfermedad de Alzheimer y Trastornos Relacionados (ahora conocida como Asociación del Alzheimer) y están entre los más utilizados en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (EA). McKhann, et al. (1984) *Neurology* 34 (7): 939-44. De acuerdo con estos criterios, la presencia de deterioro cognitivo y la sospecha de síndrome de demencia deben confirmarse mediante ensayos neuropsicológicos para un diagnóstico clínico de EA posible o probable. Los Criterios de enfermedad de Alzheimer de NINCDS-ADRDA especifican ocho dominios cognitivos que pueden verse afectados en la EA: memoria, lenguaje, habilidades de percepción, atención, habilidades constructivas, orientación, resolución de problemas y habilidades funcionales). Estos criterios han demostrado buena confiabilidad y validez.

Las evaluaciones iniciales de la función del paciente pueden realizarse usando medidas psicométricas clásicas, tales como el Miniexamen de estado mental (MMSE, por sus siglas en inglés) (Folstein et al. (1975) *J. Psychiatric Research* 12 (3): 189-198) y la Escala de Evaluación de la Enfermedad de Alzheimer (ADAS, por sus siglas en inglés), que es una escala integral para evaluar a los pacientes con el estado y la actuación de la enfermedad de Alzheimer (véase, por ejemplo, Rosen, et al. (1984) *Am. J. Psychiatr.*, 141: 1356-1364). Estas escalas psicométricas proporcionan una medida de la progresión de la enfermedad de Alzheimer. También pueden utilizarse escalas de vida cualitativas adecuadas para controlar el tratamiento. La extensión de la progresión de la enfermedad puede determinarse usando un Miniexamen de estado mental (MMSE) (véase, por ejemplo, Folstein, et al. citado anteriormente). Cualquier puntuación mayor o igual a 25 puntos (de 30) es eficazmente normal (intacto). Por debajo de esto, las puntuaciones pueden indicar enfermedad de Alzheimer grave (≤ 9 puntos), moderada (10-20 puntos) o leve (21-24 puntos).

La enfermedad de Alzheimer puede dividirse en diversas etapas, incluyendo: 1) Deterioro cognitivo moderado (enfermedad de Alzheimer leve o en etapa temprana), 2) Deterioro cognitivo gravemente moderado (enfermedad de Alzheimer en etapa moderada o media), 3) Deterioro cognitivo grave (moderadamente grave o enfermedad de Alzheimer en etapa intermedia) y 4) deterioro cognitivo muy grave (enfermedad de Alzheimer grave o en etapa tardía) como se muestra en la Tabla 3.

TABLA 3.

Etapas ilustrativas de la enfermedad de Alzheimer.	
Disminución cognitiva moderada (EA leve o en etapa temprana)	
	En esta etapa, una entrevista médica cuidadosa detecta deficiencias claras en las siguientes áreas: Disminución del conocimiento de eventos recientes. Deterioro de la capacidad para realizar aritmética mental desafiante. Por ejemplo, contar hacia atrás desde 100 de 7 en 7. Disminución de la capacidad para realizar tareas complejas, tales como compras, planificación de la cena para los invitados o pago de facturas y administración de las finanzas. Memoria reducida de la historia personal. El individuo afectado puede parecer moderado y retraído, especialmente en situaciones de desafío social o mental.
Deterioro cognitivo moderadamente grave (Enfermedad de Alzheimer moderada o en etapa media)	
	Surgen brechas importantes en la memoria y en la función cognitiva. Alguna ayuda con las actividades cotidianas se vuelve esencial. En esta etapa, las personas: Pueden ser incapaces, durante una entrevista médica, de recordar detalles tan importantes como su dirección actual, su número de teléfono o el nombre de la universidad o escuela secundaria de la que se graduaron. Pueden confundirse acerca de dónde están o sobre la fecha, el día de la semana o la temporada. Pueden tener problemas con la aritmética mental menos desafiante; por ejemplo, contando hacia atrás desde 40 de 4 en 4 o desde 20 de 2 en 2.
	Necesita ayuda para elegir la ropa adecuada para la temporada o la ocasión. Por lo general, conservan un conocimiento sustancial sobre ellos mismos y conocen su propio nombre y los nombres de su cónyuge o hijos. Por lo general, no requieren ayuda para comer o usar el baño.
Deterioro cognitivo grave (enfermedad de Alzheimer moderadamente grave o en etapa media)	
	Las dificultades con la memoria continúan empeorando, pueden surgir cambios significativos en la personalidad y las personas afectadas necesitan mucha ayuda con las actividades diarias. En esta etapa, los individuos: Pueden perder la mayor parte de la conciencia de experiencias y eventos recientes, así como de su entorno. Pueden recordar su historia personal de manera imperfecta, aunque en general recuerdan su propio nombre. Ocasionalmente, pueden olvidar el nombre de su cónyuge o cuidador principal, pero generalmente pueden distinguir las caras familiares de las desconocidas. Necesita ayuda para vestirse adecuadamente; sin supervisión, puede cometer errores tales como colocar el pijama sobre la ropa o los zapatos durante el día en pies equivocados. Pueden experimentar la interrupción de su ciclo normal de sueño/vigilia. Pueden necesitar ayuda con la gestión de los detalles del uso del inodoro (tirar de la cadena, eliminar el papel higiénico de forma adecuada). Puede tener episodios crecientes de incontinencia urinaria o fecal. Pueden experimentar cambios significativos en la personalidad y síntomas de comportamiento, incluyendo desconfianza y delirios (por ejemplo, creer que su cuidador es un impostor); alucinaciones (ver o escuchar cosas que realmente no existen); o conductas compulsivas y repetitivas tales como el retorcimiento de la mano o la destrucción de papel. Tiende a vagar y perderse.
Deterioro cognitivo muy grave (enfermedad de Alzheimer grave o tardía)	
	Esta es la etapa final de la enfermedad cuando los individuos pierden la capacidad de responder a su entorno, la capacidad de hablar y, en última instancia, la capacidad de controlar el movimiento. Con frecuencia, los individuos pierden su capacidad para hablar de manera reconocible, aunque ocasionalmente pueden pronunciarse palabras o frases. Los individuos necesitan ayuda para ir al baño, hay incontinencia general. Los individuos pierden la capacidad de caminar sin ayuda, después la capacidad de sentarse sin apoyo, la capacidad de sonreír y la capacidad de mantener la cabeza erguida. Los reflejos se vuelven anormales y los músculos se vuelven rígidos. La deglución está deteriorada.

En diversos aspectos, la administración de uno o más agentes que se describen en el presente documento a sujetos diagnosticados con enfermedad de Alzheimer se considera eficaz cuando existe una reducción en el LCR de los niveles de uno o más componentes seleccionados entre el grupo que consiste en Tau, fosfo-Tau (pTau), APPneo, A β 40 soluble, A β 42 soluble y/o relación A β 42/A β 40, y/o cuando hay una reducción de la carga de placa en el cerebro del sujeto, y/o cuando hay una reducción de la velocidad de formación de placa en el cerebro del sujeto, y/o cuando hay una mejora en las capacidades cognitivas del sujeto, y/o cuando se percibe una mejora en la calidad de vida del sujeto, y/o cuando hay una reducción significativa en la calificación de la demencia clínica (CDC) del sujeto

y/o cuando la velocidad de aumento en la calificación de la demencia clínica se reduce o se detiene y/o cuando la progresión de la EA se ralentiza o se detiene (por ejemplo, cuando la transición de una etapa a otra como se indica en la Tabla 3 se ralentiza o se detiene).

- 5 En determinados aspectos, los sujetos susceptibles de experimentar los presentes métodos generalmente están libres de una enfermedad o trastorno neurológico distinto de la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, en determinados aspectos, el sujeto no tiene ni corre el riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno neurológico como la enfermedad de Parkinson y/o la esquizofrenia y/o la psicosis.

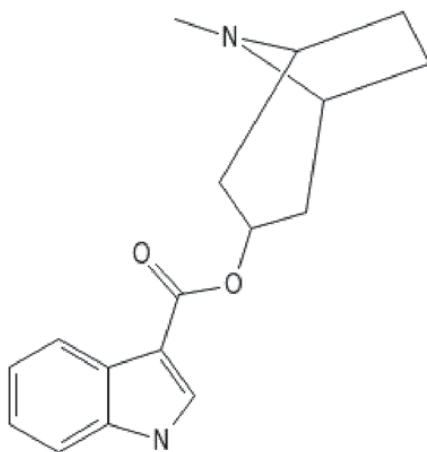
10 3. Compuestos para la administración

Los métodos que se describen en el presente documento se basan, en parte, en el descubrimiento de que la administración de uno o más compuestos (por ejemplo, tropisetron, disulfiram, honokiol y/o nimetazepam o sus formas farmacéuticamente aceptables), encuentra un uso en el tratamiento y la prevención de enfermedades

15 caracterizadas por depósitos de amiloide en el cerebro, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer.

El tropisetron, (ADDN-F03) también se conoce como 1-metil-indol-3-carboxilato de (1R,5S)-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo y se referencia como el número de CAS 89565-68-4 o el número de CAS 105826-92-4. El clorhidrato de tropisetron y otras sales farmacéuticamente aceptables, como se describen en el presente documento,

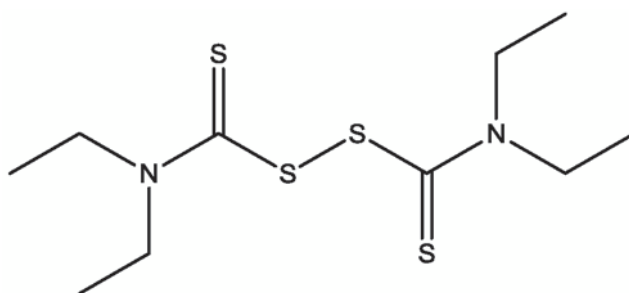
20 actúan como un antagonista selectivo del receptor 5-HT₃ y un agonista parcial del receptor nicotínico $\alpha 7$. Macor, et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2001) 11 (3): 319-21; y Cui, et al., *European Journal of Pharmacology* (2009) 609 (1-3): 74-7. La estructura química del tropisetron se representa a continuación en la Fórmula I:



I

25 En la técnica se conocen análogos del tropisetron. Los análogos ilustrativos de tropisetron se describen, por ejemplo, en las Patentes de los EE.UU. N.º 4.789.673 y 5.998.429. Algunos análogos promueven el procesamiento de APP por la vía no amiloidogénica. Se conocen en la técnica y se describen en el presente documento ensayos para someter a ensayo la capacidad funcional de un análogo de tropisetron para promover el procesamiento de APP por la vía no amiloidogénica.

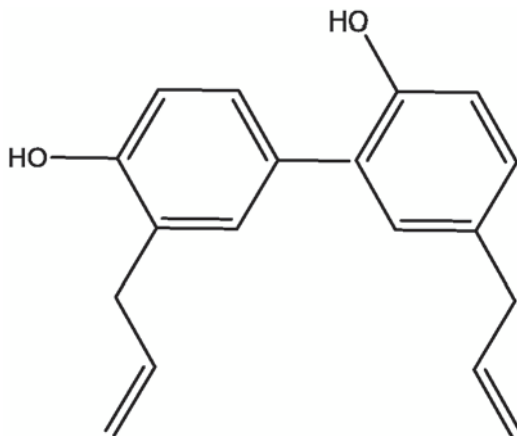
30 El disulfiram (que no forma parte de la invención), también conocido como 1,1',1'',1'''-[disulfanodibis(carbonotioilnitrilo)]tetraetano o 1-(dietiltiocarbamoildisulfanil)-N,N-dietil-metanotioamida y referenciado como el número de CAS 97-77-8, previene la descomposición de la dopamina y tiene actividad antiprotozoaria. Se usa para apoyar el tratamiento del alcoholismo crónico produciendo una sensibilidad aguda al alcohol. La estructura química del disulfiram se describe a continuación en la Fórmula II:



Disulfiram (ADDN-F01); PM: 295,3

En la técnica se conocen análogos del disulfiram. Se describen análogos ilustrativos de disulfiram, por ejemplo, en Kitson, *Biochem J* (1976) 155: 445-448 y Fowler, et al., *Biochem. J.* (1993) 289: 853-859. Los análogos de disulfiram adicionales incluyen disulfuro de metilentiuram (Labar, et al., *ChemBioChem* (2007) 8 (11): 1293-1297); disulfuro de tetrametiltiuram, (Strömme, et al., *Biochemical Pharmacology* (1965) 14 (4): 381-391); y ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC) (Wickström, et al., *Biochemical Pharmacology* (2007) 73 (1): 25-33.

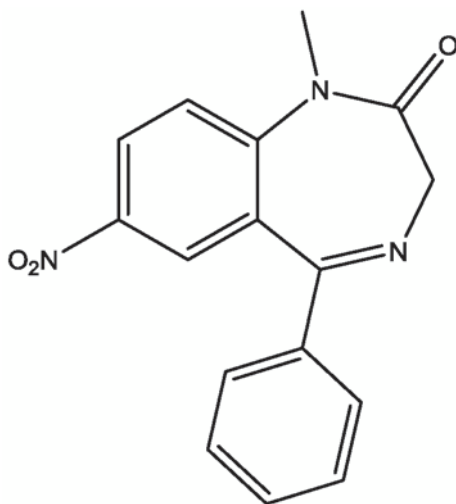
Honokiol (que no forma parte de la invención), también conocido como 2-(4-hidroxi-3-prop-2-enil-fenil)-4-prop-2-enil-fenol y referenciado con el número de CAS 35354-74-6, es un compuesto bifenílico que tiene actividades ansiolíticas, antitrombóticas, antidepresivas, antieméticas, antibacterianas, carcinogénicas y neurotróficas. La estructura química del honokiol se describe a continuación en la Fórmula III:



Honokiol (ADDN-F02); PM: 266,3
III

En la técnica se conocen análogos de honokiol. Los análogos ilustrativos de honokiol se describen, por ejemplo, en Kuribara, et al., *Pharmacol Biochem Behav.* (2000) 67 (3): 597-601; Luo, et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, (2009) 19 (16) :4702-4705; Esumi, et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2004) 14 (10): 2621-2625; Ahn, et al., *Mol Cancer Res* (2006) 4: 621; Fried, et al., *Antioxid Redox Signal.* (2009) 11 (5): 1139-1148 y el documento WO 2008/137420.

El nimetazepam (que no forma parte de la invención), también conocido como 2-metil-9-nitro-6-fenil-2,5-diazabicyclo[5.4.0]undeca-5,8,10,12-tetraen-3-ona y referenciado como el número de CAS 2011-67-8, es un derivado de la benzodiazepina que posee propiedades hipnóticas, ansiolíticas, sedantes, relajantes de los músculos esqueléticos y anticonvulsivantes. La estructura química del nimetazepam se describe a continuación en la Fórmula IV:



Nimetazepam (ADDN-F04); PM: 295,3
IV

En la técnica se conocen análogos de nimetazepam. Los análogos ilustrativos de nimetazepam incluyen otras benzodiazepinas. Las diazepinas que tienen un grupo nitro en la posición 7 en la estructura de la 1,4-

benzodiazepina, por ejemplo, nitrazepam, clonazepam y flunitrazepam son de particular interés. Otras benzodiazepinas, incluyen sin limitación, oxazepam, diazepam y clordiazepóxido.

4. Métodos de prevención

Con fines de profilaxis, el sujeto puede ser asintomático, pero puede tener uno o más factores de riesgo ambientales, de estilo de vida o genéticos, como se describe en el presente documento, y/o tiene una edad umbral definida. Los sujetos también pueden ser asintomáticos, pero considerarse que tienen un alto riesgo de EA según los ensayos genéticos (por ejemplo, ApoE4 u otras mutaciones asociadas a EA), ensayos de formación de imágenes (por ejemplo, la detección del Compuesto B de Pittsburgh (detección por PIB) u otros ensayos) u otros ensayos predictivos conocidos en la técnica. Como alternativa, el sujeto puede presentar síntomas de etapas tempranas de la enfermedad, por ejemplo, puede presentar síntomas de deterioro cognitivo leve (DCL) o puede tener diagnóstico de DCL. En dichos casos, la administración del compuesto (por ejemplo, tropisetron, disulfiram, honokiol y/o nimetazepam) puede prevenir o retrasar la aparición de la enfermedad o la progresión del DCL en etapas posteriores de la enfermedad, por ejemplo, progresión a enfermedad de Alzheimer, y/o puede reducir la gravedad de la enfermedad una vez presente.

Los parámetros medibles para evaluar la eficacia de la pauta de prevención son los que se analizan en el presente documento para la terapia y el control.

5. Métodos de tratamiento

En diversos métodos de tratamiento, el sujeto ya puede presentar síntomas de enfermedad o puede haberse diagnosticado como que tiene una enfermedad. Por ejemplo, el sujeto puede presentar síntomas de DCL o puede haber recibido un diagnóstico de DCL. En algunos aspectos, el sujeto puede presentar síntomas de la enfermedad de Alzheimer o puede haberse diagnosticado como que tiene la enfermedad de Alzheimer. En dichos casos, la administración del compuesto (por ejemplo, tropisetron, disulfiram, honokiol y/o nimetazepam) puede revertir o retrasar la progresión y/o reducir la gravedad de los síntomas de la enfermedad.

Los parámetros medibles para evaluar la eficacia de la pauta de tratamiento son los que se analizan en el presente documento para la terapia y el control.

6. Formulación y administración

a. Formulación

El compuesto (por ejemplo, Tropisetron, disulfiram, honokiol y/o nimetazepam) puede administrarse por vía oral, parenteral, por vía intravenosa (IV), por vía intramuscular (IM), depósito IM, por vía subcutánea (SC) y depósito SC), por vía sublingual, por vía intranasal (inhalación), por vía intratecal, por vía transdérmica (por ejemplo, a través de un parche transdérmico), por vía tópica, por vía ionofórica o por vía rectal. Normalmente, la forma de dosificación se selecciona para facilitar la entrega al cerebro (por ejemplo, el paso a través de la barrera hematoencefálica). En este contexto, se observa que los compuestos que se describen en el presente documento se entregan fácilmente al cerebro. Las formas de dosificación conocidas por los expertos en la materia son adecuadas para la administración del compuesto.

Se proporcionan composiciones que contienen cantidades terapéuticamente eficaces del compuesto. Los compuestos se formulan preferentemente en preparaciones farmacéuticas adecuadas tales como comprimidos, cápsulas o elixires para la administración oral o en soluciones o suspensiones estériles para la administración parenteral. Normalmente, los compuestos descritos anteriormente se formulan en composiciones farmacéuticas usando técnicas y procedimientos bien conocidos en la técnica.

Estos agentes activos (por ejemplo, tropisetron, disulfiram, honokiol y/o nimetazepam) pueden administrarse en forma "nativa" o, si se desea, en forma de sales, ésteres, amidas, profármacos, derivados y similares, siempre que la sal, éster, amida, profármaco o derivado sea farmacológicamente eficaz, por ejemplo, eficaz en el método o métodos presentes. Las sales, los ésteres, las amidas, los profármacos y otros derivados de los agentes activos pueden prepararse usando procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia de la química orgánica sintética y se describen, por ejemplo, en March (1992) *Advanced Organic Chemistry; Reactions, Mechanisms and Structure*, 4ª ed. NY Wiley-Interscience.

Los expertos en la materia conocen métodos de formulación de dichos derivados. Por ejemplo, las sales disulfuro de varios agentes de entrega se describen en la publicación PCT WO 2000/059863. De forma similar, las sales ácidas de péptidos terapéuticos, peptoides u otros miméticos pueden prepararse a partir de la base libre usando una metodología convencional que normalmente implica la reacción con un ácido adecuado. Generalmente, la forma de base del fármaco se disuelve en un disolvente orgánico polar tal como metanol o etanol y se le añade el ácido. La sal resultante precipita o puede sacarse de la solución mediante la adición de un disolvente menos polar. Los ácidos adecuados para preparar sales de adición de ácido incluyen, pero no se limitan a ácidos orgánicos, por ejemplo,

ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico, ácido orótico y similares, así como a ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. Una sal de adición de ácido puede reconvertirse a la base libre por tratamiento con una base adecuada. Determinadas sales de adición de ácido particularmente preferidas de los agentes activos en el presente documento incluyen sales de haluro, tales como las que pueden prepararse usando ácidos clorhídrico o bromhídrico. Por el contrario, la preparación de sales básicas de los agentes activos de la presente invención se prepara de una forma similar usando una base farmacéuticamente aceptable tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio, trimetilamina o similares. En determinadas realizaciones, las sales básicas incluyen sales de metales alcalinos, por ejemplo, la sal de sodio y las sales de cobre.

Para la preparación de formas salinas de fármacos básicos, el pKa del contraión es preferentemente al menos aproximadamente 2 pH más bajo que el pKa del fármaco. De forma similar, para la preparación de formas salinas de fármacos ácidos, el pKa del contraión es preferentemente al menos aproximadamente 2 pH más alto que el pKa del fármaco. Esto permite que el contraión lleve el pH de la solución a un nivel más bajo que el pH máximo para alcanzar la meseta de la sal, a la cual la solubilidad de la sal prevalece sobre la solubilidad del ácido o base libre. La regla generalizada de diferencia en las unidades de pKa del grupo ionizable en el ingrediente farmacéutico activo (IFA) y en el ácido o la base pretende hacer que la transferencia de protones sea energéticamente favorable. Cuando el pKa del IFA y el contraión no son significativamente diferentes, puede formarse un complejo sólido, pero puede desproporcionarse rápidamente (por ejemplo, descomponerse en las entidades individuales del fármaco y el contraión) en un entorno acuoso.

Preferentemente, el contraión es un contraión farmacéuticamente aceptable. Las formas de sales aniónicas adecuadas incluyen, pero no se limitan a acetato, benzoato, bencilato, bitartrato, bromuro, carbonato, cloruro, citrato, edetato, edisilato, estolato, fumarato, gluceptato, gluconato, bromhidrato, clorhidrato, yoduro, lactobionato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, bromuro de metilo, sulfato de metilo, mucato, napsilato, nitrato, pamoato (embonato), fosfato y difosfato, salicilato y disalicilato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tosilato, triioduro y similares, mientras que las formas de sales catiónicas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, aluminio, benzatina, calcio, etilendiamina, lisina, magnesio, meglumina, potasio, procaína, sodio, trometamina, zinc y similares.

En diversos aspectos, la preparación de ésteres implica normalmente la funcionalización de grupos hidroxilo y/o carboxilo que están presentes dentro de la estructura molecular del agente activo. En determinados aspectos, los ésteres son normalmente derivados sustituidos con acilo de grupos de alcohol libre, por ejemplo, restos que derivan de ácidos carboxílicos de fórmula RCOOH en la que R es alquilo y preferentemente es alquilo inferior. Los ésteres pueden reconvertirse en ácidos libres, si se desea, mediante el uso de procedimientos convencionales de hidrogenólisis o hidrólisis.

También pueden prepararse amidas usando técnicas conocidas por los expertos en la materia o descritas en la bibliografía pertinente. Por ejemplo, las amidas pueden prepararse a partir de ésteres, usando reactivos de amina adecuados o pueden prepararse a partir de un anhídrido o un cloruro de ácido por reacción con amoniaco o una alquilamina inferior.

Aproximadamente de 1 a 1000 mg de un compuesto o mezcla del compuesto (por ejemplo, tropisetron, disulfiram, honokiol y/o nimetazepam) o una sal o éster fisiológicamente aceptable forman un compuesto con un vehículo, material de soporte, excipiente, aglutinante, conservante fisiológicamente aceptable, estabilizante, aromatizante, etc., en una forma de dosificación unitaria como lo exige la práctica farmacéutica aceptada. La cantidad de sustancia activa en esas composiciones o preparaciones es de manera que se obtiene una dosificación adecuada en el intervalo indicado. Las composiciones se formulan preferentemente en una forma de dosificación unitaria, conteniendo cada dosis aproximadamente 1-1000 mg, 2-800 mg, 5-500 mg, 10-400 mg, 50-200 mg, por ejemplo, aproximadamente 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, 700 mg, 800 mg, 900 mg o 1000 mg del principio activo. La expresión "dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado.

Para preparar composiciones, el compuesto se mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado. Tras la mezcla o adición del compuesto o los compuestos, la mezcla resultante puede ser una solución, suspensión, emulsión o similar. Las suspensiones liposómicas también pueden ser adecuadas como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la materia. La forma de la mezcla resultante depende de varios factores, incluyendo el modo de administración previsto y la solubilidad del compuesto en el vehículo o excipiente seleccionado. La concentración eficaz es suficiente para disminuir o mejorar al menos un síntoma de la enfermedad, trastorno o afección tratada y puede determinarse empíricamente.

Los excipientes o vehículos farmacéuticos adecuados para la administración de los compuestos proporcionados en el presente documento incluyen cualquiera de dichos vehículos conocidos por los expertos en la materia como adecuados para el modo particular de administración. Además, los materiales activos también pueden mezclarse con otros materiales activos que no afecten a la acción deseada o con materiales que complementen la acción deseada o que tengan otra acción. Los compuestos pueden formularse como el único ingrediente farmacéuticamente activo en la composición o pueden combinarse con otros principios activos.

Cuando los compuestos presentan solubilidad insuficiente, pueden usarse métodos para solubilizar. Dichos métodos son conocidos e incluyen, pero no se limitan a, el uso de codisolventes tales como dimetilsulfóxido (DMSO), el uso de tensioactivos tales como Tween™ y la disolución en bicarbonato de sodio acuoso. Los derivados de los compuestos, tales como sales o profármacos, también pueden usarse en la formulación de composiciones farmacéuticas eficaces.

La concentración del compuesto es eficaz para la entrega de una cantidad durante la administración que disminuye o mejora al menos un síntoma del trastorno para el cual se administra el compuesto y/o que es eficaz en un contexto profiláctico. Normalmente, las composiciones se formulan para la administración de una dosis única (por ejemplo, diariamente).

Los compuestos pueden prepararse con vehículos que los protejan contra la eliminación rápida del cuerpo, tales como formulaciones o recubrimientos de liberación prolongada. Dichos vehículos incluyen formulaciones de liberación controlada, tales como, pero no limitados a, sistemas de administración microencapsulados. El compuesto activo se incluye en el vehículo farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil en ausencia de efectos secundarios indeseables en el paciente tratado. La concentración terapéuticamente eficaz puede determinarse empíricamente sometiendo a ensayo los compuestos conocidos en sistemas de modelos *in vitro* e *in vivo* para el trastorno tratado. Una dosis terapéutica o profilácticamente eficaz puede determinarse administrando primero una dosis baja y después incrementándola gradualmente hasta alcanzar una dosis que consiga el efecto deseado con efectos secundarios mínimos o nulos.

En diversos aspectos, los compuestos pueden estar incluidos en recipientes de dosis única o múltiples dosis. Los compuestos y composiciones incluidos pueden proporcionarse en kits, por ejemplo, incluyendo partes componentes que pueden ensamblarse para su uso. Por ejemplo, un compuesto inhibidor en forma liofilizada y un diluyente adecuado pueden proporcionarse como componentes separados para su combinación antes de su uso. Un kit puede incluir un compuesto inhibidor y un segundo agente terapéutico para la administración conjunta. El inhibidor y el segundo agente terapéutico pueden proporcionarse como partes componentes separadas. Un kit puede incluir una pluralidad de recipientes, cada recipiente contiene una o más dosis unitarias de los compuestos. Los recipientes se adaptan preferentemente para el modo de administración deseado, que incluye, entre otros, comprimidos, cápsulas de gel, cápsulas de liberación sostenida y similares para la administración oral; productos de depósito, jeringas precargadas, ampollas, viales y similares para la administración parenteral; y parches, apósitos, cremas y similares para la administración tópica.

La concentración y/o la cantidad de compuesto activo en la composición del fármaco dependerá de la tasa de absorción, inactivación y excreción del compuesto activo, la pauta de dosificación y la cantidad administrada, así como de otros factores conocidos por los expertos en la materia.

El principio activo puede administrarse de una vez o puede dividirse en varias dosis más pequeñas para administrar a intervalos de tiempo. Se entiende que la dosis precisa y la duración del tratamiento es una función de la enfermedad que se está tratando y puede determinarse empíricamente usando protocolos de ensayo conocidos o por extrapolación de datos de ensayo *in vivo* o *in vitro*. Se debe tener en cuenta que las concentraciones y los valores de dosificación también pueden variar con la gravedad de la afección que se ha de aliviar. Ha de entenderse adicionalmente que, para cualquier sujeto en particular, las pautas de dosificación específicas deben ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones y que los intervalos de concentración establecidos en el presente documento son solo de ejemplo y no pretenden limitar el alcance o la práctica de las composiciones reivindicadas.

Si se desea la administración oral, el compuesto puede proporcionarse en una formulación que lo proteja del entorno ácido del estómago. Por ejemplo, la composición puede formularse en un recubrimiento entérico que mantenga su integridad en el estómago y libere el compuesto activo en el intestino. La composición también puede formularse en combinación con un antiácido u otro ingrediente similar.

Las composiciones orales generalmente incluirán un diluyente inerte o un vehículo comestible y pueden comprimirse en comprimidos o incluirse en cápsulas de gelatina. Para los fines de la administración terapéutica oral, el compuesto o compuestos activos pueden incorporarse con excipientes y pueden usarse en forma de comprimidos, cápsulas o trociscos. Pueden incluirse agentes de unión farmacéuticamente compatibles y materiales adyuvantes como parte de la composición.

En diversos aspectos, los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como, pero no limitado a, goma de tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; un excipiente tal como celulosa microcristalina, almidón o lactosa; un agente disgregante tal como, pero no limitado a, ácido algínico y almidón de maíz; un lubricante tal como, pero no limitado a, estearato de magnesio; un deslizante, tal como, pero no limitado a, dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; y un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aromatizante de frutas.

Cuando la forma de unidad de dosificación es una cápsula, puede contener, además del material del tipo anterior, un vehículo líquido tal como un aceite graso. Además, las formas unitarias de dosificación pueden contener diversos otros materiales, que modifican la forma física de la unidad de dosificación, por ejemplo, recubrimientos de azúcar y otros agentes entéricos. Los compuestos también pueden administrarse como un componente de un elixir, suspensión, jarabe, oblea, chicle o similares. Un jarabe puede contener, además de los compuestos activos, sacarosa como agente edulcorante y determinados conservantes, tintes y colorantes y aromas.

Los materiales activos también pueden mezclarse con otros materiales activos que no alteren la acción deseada o con materiales que complementen la acción deseada.

Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica, subcutánea o tópica pueden incluir cualquiera de los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceite no volátil, un aceite vegetal natural tal como el aceite de sésamo, aceite de coco, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón y similares, o un vehículo graso sintético tal como oleato de etilo y similares, polietilenglicol, glicerina, propilenglicol u otro disolvente sintético; agentes antimicrobianos tales como alcohol bencílico y metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico y bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); tampones tales como acetatos, citratos y fosfatos; y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio y dextrosa. Las preparaciones parenterales pueden incluirse en ampollas, jeringuillas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio, plástico u otro material adecuado. Se pueden incorporar tampones, conservantes, antioxidantes y similares según se requiera.

Cuando se administran por vía intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, solución salina tamponada con fosfato (PBS) y soluciones que contienen agentes espesantes y solubilizantes, tales como glucosa, polietilenglicol, polipropilenglicol y mezclas de los mismos. Las suspensiones liposómicas que incluyen liposomas dirigidos a tejidos también pueden ser adecuadas como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo, como se describe en la Patente de los EE.UU. N.º 4.522.811.

Los compuestos activos pueden prepararse con vehículos que protejan el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tales como formulaciones o recubrimientos de liberación prolongada. Dichos vehículos incluyen formulaciones de liberación controlada, tales como, pero no limitados a, implantes y sistemas de administración microencapsulados y polímeros biocompatibles biodegradables tales como colágeno, vinil acetato de etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, poliortoésteres, ácido poliláctico y similares. Los expertos en la materia conocen los métodos para la preparación de dichas formulaciones.

b. Vías de administración y dosificación

En diversos aspectos, los compuestos pueden administrarse por vía oral, por vía parenteral (IV, IM, depósito IM, SC y depósito SC), por vía, por vía intranasal (inhalación), por vía intratecal, por vía transdérmica (por ejemplo, a través de un parche transdérmico), por vía tópica o rectal. Las formas de dosificación conocidas por los expertos en la materia son adecuadas para la administración de los compuestos.

En diversos aspectos, los compuestos pueden administrarse por vía enteral o por vía parenteral. Cuando se administran por vía oral, los compuestos pueden administrarse en formas de dosificación habituales para la administración oral como es bien sabido por los expertos en la materia. Estas formas de dosificación incluyen las formas de dosificación unitarias sólidas habituales de comprimidos y cápsulas, así como formas de dosificación líquidas tales como soluciones, suspensiones y elixires. Cuando se usan las formas de dosificación sólidas, se prefiere que sean del tipo de liberación sostenida, por lo que el compuesto debe administrarse solo una o dos veces al día.

Las formas de dosificación oral pueden administrarse al paciente 1, 2, 3 o 4 veces al día. Se prefiere que el compuesto se administre tres veces o menos, más preferentemente una o dos veces al día. Por tanto, se prefiere que el compuesto se administre en forma de dosificación oral. Se prefiere que cualquiera que sea la forma de dosificación oral que se use, esté diseñada para proteger el compuesto del entorno ácido del estómago. Los comprimidos con recubrimiento entérico son bien conocidos por los expertos en la materia. Además, los expertos en la materia también conocen bien las cápsulas rellenas con pequeñas esferas, cada una recubierta para protegerla del estómago ácido.

Cuando se administra por vía oral, una cantidad administrada terapéuticamente eficaz para inhibir el procesamiento amiloidogénico de APP, promover el procesamiento no amiloidogénico de APP o para tratar o prevenir la EA es de aproximadamente 0,1 mg/día a aproximadamente 200 mg/día, por ejemplo, de aproximadamente 1 mg/día a aproximadamente 100 mg/día, por ejemplo, de aproximadamente 5 mg/día a aproximadamente 50 mg/día. En algunos aspectos, al sujeto se le administra el compuesto en una dosis de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,50 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,05 mg/kg, 0,10 mg/kg, 0,20 mg/kg, 0,33 mg/kg, 0,50 mg/kg. Se entiende que, si bien un paciente puede iniciarse con una dosis, esa dosis puede variarse (aumentarse o disminuirse, según corresponda) a lo largo del tiempo a medida que cambien las condiciones del paciente. Dependiendo de las evaluaciones de los resultados, pueden usarse dosis más altas. Por ejemplo, en determinados aspectos, pueden administrarse hasta 1000 mg/día, por ejemplo, 5 mg/día, 10 mg/día, 25 mg/día, 50 mg/día, 100 mg/día, 200 mg/día, 300 mg/día, 400 mg/día, 500 mg/día, 600 mg/día, 700 mg/día, 800 mg/día, 900 mg/día o 1000 mg/día.

Los compuestos y/o análogos de los mismos también pueden administrarse ventajosamente en una formulación de dispersión nanocristalina. La preparación de dichas formulaciones se describe, por ejemplo, en la patente de los EE.UU. N.º 5.145.684. Se describen dispersiones nanocristalinas de los inhibidores de la proteasa del VIH y su método de uso en la patente de los EE.UU. N.º 6.045.829. Las formulaciones nanocristalinas normalmente proporcionan una mayor biodisponibilidad de los compuestos farmacológicos.

En diversos aspectos, los compuestos pueden administrarse por vía parenteral, por ejemplo, por vía IV, IM, depósito IM, SC o depósito SC. Cuando se administra por vía parenteral, debe administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 mg/día, preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg al día. Cuando se usa una formulación de depósito para inyección una vez al mes o una vez cada dos semanas, la dosis debe ser de aproximadamente 0,5 mg/día a aproximadamente 50 mg/día o una dosis mensual de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 1.500 mg. En parte debido al olvido de los pacientes con enfermedad de Alzheimer, se prefiere que la forma de dosificación parenteral sea una formulación de depósito.

En diversos aspectos, los compuestos pueden administrarse por vía sublingual. Cuando se administran por vía sublingual, los compuestos y/o análogos de los mismos pueden administrarse de una a cuatro veces al día en las cantidades descritas anteriormente para la administración IM.

En diversos aspectos, los compuestos pueden administrarse por vía intranasal. Cuando se administran por esta vía, las formas de dosificación apropiadas son un aerosol nasal o de polvo seco, como es sabido por los expertos en la materia. La dosis del compuesto y/o su análogo para la administración intranasal es la cantidad descrita anteriormente para la administración IM.

En diversos aspectos, el compuesto puede administrarse por vía intratecal. Cuando se proporciona por esta vía, la forma de dosificación apropiada puede ser una forma de dosificación parenteral como es sabido por los expertos en la materia. La dosis de compuesto y/o análogo del mismo para la administración intratecal es la cantidad descrita anteriormente para la administración IM.

En determinados aspectos, el compuesto puede administrarse por vía tópica. Cuando se administra por esta vía, la forma de dosificación adecuada es una crema, pomada o parche. Cuando se administra por vía tópica, la dosis es de aproximadamente 1,0 mg/día a aproximadamente 200 mg/día. Debido a que la cantidad que puede entregarse por un parche es limitada, pueden usarse dos o más parches. El número y el tamaño del parche no es importante, lo importante es que se entregue una cantidad terapéuticamente eficaz de compuesto, como saben los expertos en la materia. El compuesto puede administrarse por vía rectal mediante supositorio, como es sabido por los expertos en la materia. Cuando se administra por supositorio, la cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 500 mg.

En diversos aspectos, el compuesto puede administrarse mediante implantes, como saben los expertos en la materia. Cuando se administra el compuesto por implante, la cantidad terapéuticamente eficaz es la cantidad descrita anteriormente para la administración en depósito.

Para un experto en la materia debe ser evidente que la dosis exacta y la frecuencia de administración dependerán de la afección particular que se esté tratando, de la gravedad de la afección que se trata, de la edad, el peso, la condición física general del paciente en particular y de otra medicación que el individuo pueda estar tomando, como es bien sabido para los médicos tratantes expertos en la materia.

7. Terapias de combinación

En determinados aspectos, los compuestos (por ejemplo, tropisetron, disulfiram, honokiol y/o nimetazepam) pueden usarse en combinación con otros agentes terapéuticos o tratamientos utilizados para tratar o prevenir enfermedades caracterizadas por depósitos de amiloide en el cerebro, incluyendo DCL y/o EA. Dichos agentes o tratamientos incluyen: inhibidores de la acetilcolinesterasa (incluyendo sin limitación, *por ejemplo*, enantiómero de (-)-fenserina, tacrina, ipidacrina, galantamina, donepezilo, icopezilo, zanapezilo, rivastigmina, huperzina A, fenserina, fisostigmina,

neostigmina, piridostigmina, ambenonio, demarcario, edrofonio, ladostigil y ungeremina); antagonista del receptor de NMDA (incluyendo sin limitaciones, por ejemplo, memantina); agonistas de receptores muscarínicos (incluyendo, sin limitación, por ejemplo, talsaclidina, AF-102B, AF-267B (NGX-267)); agonistas del receptor nicotínico (incluyendo, sin limitación, por ejemplo, isproniclina (AZD-3480)); Inhibidores de la beta-secretasa (incluyendo sin limitaciones, por ejemplo, tiazolidinadionas, incluyendo rosiglitazona y pioglitazona); inhibidores de gamma-secretasa (incluyendo sin limitación, por ejemplo, MK-0752, E-2012, BMS-708163, PF-3084014, begacestat (GSI-953) y NIC5-15); inhibidores de la agregación de A β (incluyendo sin limitación, por ejemplo, clioquinol (PBT1), PBT2, tramiprosato (homotaurina), escilo-inositol (también conocido como escilociclohexanohecol, AZD-103 y ELND-005), inmunoterapia pasiva con fragmentos de A β (incluso sin limitaciones, por ejemplo, Bapineuzemab) y Epigallocatequina-3-galato (EGCg)); agentes antiinflamatorios tales como inhibidores de la ciclooxigenasa II; antioxidantes tales como la vitamina E y los ginkgólidos; tratamientos inmunológicos, tales como, por ejemplo, inmunización con péptido A β o administración de anticuerpos anti-péptido A β ; estatinas; y agentes neurotróficos directos o indirectos como Cerebrolysin™, AIT-082 (Emilieu, 2000, *Arch. Neurol.* 57: 454), Netrin (Luorenco, 2009, *Cell Death Differ* 16, 655-663), miméticos de Netrin, NGF, miméticos de NGF, BDNF y otros agentes neurotróficos del futuro, agentes que promueven la neurogénesis, por ejemplo, la terapia con células madre y/o la terapia génica. Se describen otros agentes farmacológicos útiles en combinación con tropisetron, disulfiram, honokiol y/o nimetazepam para tratar o prevenir enfermedades caracterizadas por depósitos de amiloide en el cerebro, incluyendo DCL y/o EA, por ejemplo, en Mangialasche, et al., *Lancet Neurol* (2010) 9: 702-16.

En diversos aspectos, la terapia de combinación con tropisetron, disulfiram, honokiol y/o nimetazepam excluye expresamente la administración de tropisetron, disulfiram, honokiol y/o nimetazepam junto con un inhibidor de acetilcolinesterasa. En algunos aspectos, el tropisetron no se administra junto con un inhibidor de la acetilcolinesterasa.

8. Sistemas de ensayo para evaluar el procesamiento de APP

Sin quedar ligado a una teoría particular, se cree que los compuestos (por ejemplo, tropisetron, disulfiram, honokiol y/o nimetazepam) promueven el procesamiento de APP por la vía no amiloidogénica y/o reducen o inhiben el procesamiento de APP por la vía amiloidogénica. En la vía no amiloidogénica, APP se escinde primero por una secretasa dentro de la secuencia A β , liberando el ectodominio APP α ("sAPP α "). Por el contrario, la vía amiloidogénica se inicia cuando la β -secretasa escinde APP en el extremo amino del A β , liberando de este modo el ectodominio APP β ("sAPP β "). El procesamiento de APP por las vías no amiloidogénicas y amiloidogénicas es conocido en la técnica y fue revisado, por ejemplo, por Xu, *J Alzheimers Dis* (2009) 16 (2): 211-224 y De Strooper, et al., *Nat Rev Neurol* (2010) 6 (2): 99-107.

Un método para evaluar la eficacia de los compuestos y/o análogos de los mismos es determinar una reducción o eliminación en el nivel de procesamiento de APP por la vía amiloidogénica, por ejemplo, una reducción o eliminación en el nivel de procesamiento de APP por escisión de β -secretasa en respuesta a la administración del compuesto o los compuestos de interés. Se conocen bien en la técnica ensayos para determinar el alcance de la escisión de APP en el sitio de escisión de la β -secretasa. Se describen ensayos ilustrativos, por ejemplo, en las patentes de los EE.UU. N.º 5.744.346 y 5.942.400. Existen kits para determinar la presencia y los niveles en una muestra biológica de sAPP α y sAPP β , así como APPneo y A β disponibles en el mercado, por ejemplo, de PerkinElmer.

a. Ensayos libres sin células

Se describen ensayos ilustrativos que pueden usarse para demostrar la actividad inhibidora del compuesto y/o sus análogos, por ejemplo, en los documentos WO 00/17369, WO 00/03819 y la patente de los EE.UU. N.º 5.942.400 y 5.744.346. Dichos ensayos pueden realizarse en incubaciones sin células o en incubaciones celulares usando células que expresen una alfa-secretasa y/o beta-secretasa y un sustrato de APP que tenga sitios de escisión de alfa-secretasa y beta-secretasa.

En un aspecto ilustrativo, el compuesto o los compuestos de interés se ponen en contacto con un sustrato de APP que contiene alfa-secretasa y sitios de escisión de beta-secretasa de APP, por ejemplo, una APP completa o variante, un fragmento de APP o un sustrato de APP recombinante o sintético que contiene la secuencia de aminoácidos: KM-DA o NL-DA (APP-SW), se incuba en presencia de una enzima alfa-secretasa y/o beta-secretasa, un fragmento de la misma o una variante polipeptídica sintética o recombinante que tenga actividad alfa-secretasa o beta-secretasa y que sea eficaz para escindir los sitios de escisión de alfa-secretasa o beta-secretasa de APP, en condiciones de incubación adecuadas para la actividad de escisión de la enzima. Los compuestos que tienen la actividad deseada reducen o previenen la escisión del sustrato de APP. Los sustratos adecuados incluyen opcionalmente derivados que pueden ser proteínas de fusión o péptidos que contengan el péptido sustrato y una modificación útil para facilitar la purificación o detección del péptido o sus productos de escisión de alfa-secretasa y/o beta-secretasa. Las modificaciones útiles incluyen la inserción de un epítopo antigénico conocido para la unión del anticuerpo; la unión de un marcador o resto detectable, la unión de un sustrato de unión y similares.

Las condiciones de incubación adecuadas para un ensayo sin células *in vitro* incluyen, por ejemplo: de aproximadamente 200 nanomolar a 10 micromolar de sustrato, de aproximadamente 10 a 200 picomolar de enzimas

y de aproximadamente 0,1 nanomolar a 10 micromolar del compuesto, en solución acuosa, a un pH aproximado de 4-7, a aproximadamente 37 °C, durante un período de tiempo de aproximadamente 10 minutos a 3 horas. Estas condiciones de incubación son solo de ejemplo y pueden variar según sea necesario para los componentes del ensayo en particular y/o el sistema de medición deseado. La optimización de las condiciones de incubación para los componentes de ensayo particulares debe tener en cuenta la enzima alfa-secretasa y/o beta-secretasa específica utilizada y su pH óptimo, cualquier enzima y/o marcadores adicionales que puedan usarse en el ensayo y similares. Dicha optimización es habitual y no requerirá experimentación indebida.

Otro ensayo ilustrativo utiliza un péptido de fusión que tiene una proteína de unión a maltosa (MBP) fusionada a los 125 aminoácidos C terminales de APP-SW. La porción de MBP se captura en un sustrato de ensayo mediante un anticuerpo de captura anti-MBP. La incubación de la proteína de fusión capturada en presencia de alfa-secretasa y/o beta-secretasa provoca la escisión del sustrato en los sitios de escisión de alfa-secretasa y/o beta-secretasa, respectivamente. Este sistema puede usarse para detectar la actividad inhibidora de los compuestos de interés. El análisis de la actividad de escisión puede ser, por ejemplo, mediante inmunoensayo de productos de escisión. Uno de dichos inmunoensayos detecta un epítipo único expuesto en el extremo carboxilo de la proteína de fusión escindida, por ejemplo, usando el anticuerpo SW192. Este ensayo se describe, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N.º 5.942.400.

b. Ensayos celulares

Pueden usarse numerosos ensayos celulares para evaluar la actividad del compuesto o los compuestos de interés en la actividad alfa-secretasa relativa a la actividad de la beta-secretasa y/o el procesamiento de APP para liberar oligómeros de A β amiloidogénicos frente a no amiloidogénicos. El contacto de un sustrato de APP con una enzima alfa-secretasa y/o beta-secretasa dentro de la célula y en presencia o ausencia del compuesto y/o análogo del mismo puede usarse para demostrar la actividad de promoción de la alfa-secretasa y/o la actividad inhibidora de la beta-secretasa del compuesto o análogo del mismo. Preferentemente, el ensayo en presencia del compuesto o análogo del mismo proporciona al menos aproximadamente el 30 %, mucho más preferentemente al menos aproximadamente el 50 % de inhibición de la actividad enzimática beta-secretasa, en comparación con un control no inhibido. En otros aspectos, el ensayo en presencia del compuesto o su análogo proporciona al menos aproximadamente el 30 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 50 % de aumento de la actividad enzimática alfa-secretasa, en comparación con un ensayo de control en ausencia del compuesto.

En un aspecto, se usan células que expresan de forma natural alfa-secretasa y/o beta-secretasa. Como alternativa, las células se modifican para expresar una alfa-secretasa y/o beta-secretasa recombinante o enzimas variantes sintéticas, como se ha analizado anteriormente. El sustrato de APP puede añadirse al medio de cultivo y se expresa preferentemente en las células. Pueden usarse células que expresen naturalmente APP, formas variantes o mutantes de APP o células transformadas para expresar una isoforma de APP, APP mutante o variante, APP recombinante o sintética, fragmento de APP o péptido de APP sintético o proteína de fusión que contenga los sitios de escisión de APP de alfa-secretasa y/o beta-secretasa, a condición de que se permita que APP expresada entre en contacto con la enzima y pueda analizarse la actividad de escisión enzimática.

Las estirpes celulares humanas que normalmente procesan A β a partir de APP proporcionan un medio útil para someter a ensayo las actividades inhibidoras de los compuestos. La producción y liberación de A β y/u otros productos de escisión en el medio de cultivo pueden medirse, por ejemplo, mediante inmunoensayo, tal como transferencia Western o inmunoensayo ligado a enzimas (EIA), tal como por ELISA.

Las células que expresan un sustrato de APP y una alfa-secretasa y/o beta-secretasa activa pueden incubarse en presencia del compuesto para demostrar la actividad enzimática relativa de la alfa-secretasa y/o beta-secretasa en comparación con un control. La actividad relativa de la alfa-secretasa con respecto a la beta-secretasa puede medirse mediante el análisis de uno o más productos de escisión del sustrato de APP. Por ejemplo, se esperaría que la inhibición de la actividad de la beta-secretasa contra APP sustrato disminuya la liberación de productos específicos de escisión de APP inducidos por la beta-secretasa, tales como A β , sAPP β y APPneo. Se espera que la promoción o la potenciación de la actividad alfa-secretasa contra APP sustrato aumenten la liberación de productos específicos de escisión de APP inducidos por la alfa-secretasa, tales como el péptido sAPPA y p3.

Aunque tanto las células neurales como las no neurales procesan y liberan A β , los niveles de actividad beta-secretasa endógena son bajos y, con frecuencia, difíciles de detectar por EIA. Por tanto, se prefiere el uso de tipos celulares que se sabe que tienen una actividad de beta-secretasa potenciada, un procesamiento potenciado de APP a A β y/o una producción potenciada de A β . Por ejemplo, la transfección de células con la forma Mutante Sueca de APP (APP-SW); con la forma de Mutante de Indiana (APP-IN); o con APP-SW-IN proporciona células que tienen una actividad beta-secretasa potenciada y producen cantidades de A β que pueden medirse fácilmente.

En dichos ensayos, por ejemplo, las células que expresan APP, alfa-secretasa y/o beta-secretasa se incuban en un medio de cultivo en condiciones adecuadas para la actividad enzimática alfa-secretasa y/o beta-secretasa en su sitio de escisión en el sustrato de APP. En la exposición de las células al compuesto, la cantidad de A β liberada en el medio y/o la cantidad de fragmentos CTF99 de APP en los lisados celulares se reduce en comparación con el

control. Los productos de escisión de APP pueden analizarse, por ejemplo, mediante reacciones inmunitarias con anticuerpos específicos, como se ha analizado anteriormente.

Las células preferidas para el análisis de la actividad alfa-secretasa y/o beta-secretasa incluyen células neuronales humanas primarias, células neuronales animales transgénicas primarias en las que el transgén es APP y otras células tales como aquellas de una estirpe celular estable 293 que expresa APP, por ejemplo, APP-SW.

c. Ensayos *in vivo*: modelos animales

Pueden usarse diversos modelos animales para analizar la actividad del compuesto o compuestos de interés en la actividad relativa de alfa-secretasa y/o beta-secretasa y/o el procesamiento de APP para liberar A β . Por ejemplo, pueden usarse animales transgénicos que expresen sustrato de APP, enzima alfa-secretasa y/o beta-secretasa para demostrar la actividad inhibidora del compuesto. Se han descrito determinados modelos de animales transgénicos, por ejemplo, en las patentes de los EE.UU. N.º 5.877.399; 5.612.486; 5.387.742; 5.720.936; 5.850.003; 5.877.015 y 5.811.633 y en Ganes et al., 1995, *Nature* 373: 523. Se prefieren los animales que presentan características asociadas a la fisiopatología de la EA. La administración del compuesto a los ratones transgénicos que se describen en el presente documento proporciona un método alternativo para demostrar la actividad inhibidora del compuesto. También se prefiere la administración del compuesto en un vehículo farmacéuticamente eficaz y mediante una vía de administración que alcance el tejido diana en una cantidad terapéutica apropiada.

La inhibición de la escisión mediada por beta-secretasa de APP en el sitio de escisión de la beta-secretasa y de la liberación de A β puede analizarse en estos animales mediante la medición de fragmentos de escisión en los fluidos corporales del animal, tales como el fluido o los tejidos cerebrales. Análogamente, la promoción o potenciación de la escisión mediada por alfa-secretasa de APP en el sitio de escisión de la alfa-secretasa y de la liberación de sAPPa puede analizarse en estos animales mediante la medida de fragmentos de escisión en los fluidos corporales del animal, tales como el fluido o los tejidos cerebrales. En determinados aspectos, se prefiere el análisis de tejidos cerebrales para detectar depósitos o placas de A β .

Poniendo en contacto un sustrato de APP con una enzima alfa-secretasa y/o beta-secretasa en presencia del compuesto y/o su análogo en condiciones suficientes para permitir la escisión enzimática de APP y/o la liberación de A β del sustrato, los compuestos deseables y/o sus análogos son eficaces para reducir la escisión mediada por beta-secretasa de APP en el sitio de escisión de la beta-secretasa y/o son eficaces para reducir las cantidades liberadas de A β . El compuesto o compuestos y/o análogo o análogos de los mismos también son preferentemente eficaces para potenciar la escisión mediada por alfa-secretasa de APP en el sitio de escisión de la alfa-secretasa y para aumentar las cantidades liberadas de sAPPa. Cuando dicha puesta en contacto es la administración del compuesto y/o análogo del mismo a un modelo animal, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, el compuesto y/o análogo del mismo es eficaz para reducir la deposición de A β en los tejidos cerebrales del animal y para reducir el número y/o el tamaño de las placas amiloide betas. Cuando dicha administración es a un sujeto humano, el compuesto es eficaz para inhibir o retardar la progresión de la enfermedad caracterizada por cantidades potenciadas de A β , para ralentizar la progresión de la EA en el paciente y/o para prevenir la aparición o el desarrollo de la EA en un paciente en riesgo de padecer la enfermedad.

9. Métodos de control de la eficacia clínica

En diversos aspectos, la eficacia del tratamiento puede determinarse comparando una medida basal de un parámetro de la enfermedad antes de comenzar la administración del compuesto (por ejemplo, tropisetron, disulfiram, honokiol y/o nimetazepam) con el mismo parámetro uno o más puntos temporales después de que se haya administrado el compuesto. Un parámetro ilustrativo que puede medirse es un biomarcador (por ejemplo, un oligómero peptídico) del procesamiento de APP. Dichos biomarcadores incluyen, entre otros, niveles elevados de sAPPa, p3 (A β 17-42 o A β 17-40), sAPP β , A β 40 soluble y/o A β 42 soluble en sangre, plasma, suero, orina, mucosa o líquido cefalorraquídeo (LCR). La detección de niveles aumentados de sAPPa y/o p3, y niveles disminuidos de sAPP β y/o APPneo es un indicador de que el tratamiento es eficaz. A la inversa, la detección de niveles disminuidos de sAPPa y/o p3, y/o niveles aumentados de sAPP β , APPneo, Tau o fosfo-Tau (pTau) es un indicador de que el tratamiento no es eficaz.

Otro parámetro para determinar la eficacia del tratamiento es el nivel de depósitos de placa amiloide en el cerebro. Las placas de amiloide pueden determinarse usando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, según se determina por TC, TEP, PIB-TEP y/o RM. La administración del compuesto (por ejemplo, tropisetron, disulfiram, honokiol y/o nimetazepam) puede dar como resultado una reducción de la velocidad de formación de placa, e incluso una retracción o reducción de los depósitos de placa en el cerebro. La eficacia del tratamiento también puede determinarse mediante la observación de una estabilización y/o mejora de las capacidades cognitivas del sujeto. Las habilidades cognitivas pueden evaluarse usando cualquier método aceptado en la materia, incluyendo, por ejemplo, la Clasificación de Demencia Clínica (CDC), el minexamen de estado mental (MMSE) o el ensayo de Folstein, criterios evaluativos enumerados en el DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, Cuarta Edición) o DSM-V y similares.

La eficacia clínica puede controlarse usando cualquier método conocido en la técnica. Los biomarcadores medibles para controlar la eficacia incluyen, entre otros, el control de los niveles de sAPP α , sAPP β , A β 42, A β 40, APPneo y p3 en sangre, plasma, suero, mucosa o líquido cefalorraquídeo (por ejemplo, A β 17-42 o A β 17-40). La detección del aumento de los niveles de sAPP α y/o p3 y la disminución de los niveles de sAPP β y/o APPneo son indicadores de que la pauta de tratamiento o prevención es eficaz. A la inversa, la detección de niveles disminuidos de sAPP α y/o p3 y niveles aumentados de sAPP β y/o APPneo son indicadores de que la pauta de tratamiento o prevención no es eficaz. Otros biomarcadores incluyen Tau y fosfo-Tau (pTau). La detección de niveles disminuidos de Tau y pTau son indicadores de que la pauta de tratamiento o prevención es eficaz.

La eficacia también puede determinarse midiendo la carga de placa amiloide en el cerebro. La pauta de tratamiento o prevención se considera eficaz cuando la carga de placa amiloide en el cerebro no aumenta o se reduce. Por el contrario, la pauta de tratamiento o prevención se considera ineficaz cuando aumenta la carga de la placa amiloide en el cerebro. La carga de la placa de amiloide puede determinarse usando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, incluyendo TC, TEP, PIB-TEP y/o RM.

La eficacia también puede determinarse midiendo las capacidades cognitivas del sujeto. Las habilidades cognitivas pueden medirse usando cualquier método conocido en la técnica. Los ensayos ilustrativos incluyen asignar una puntuación de la Clasificación de Demencia Clínica (CDC) o aplicar el miniexamen del estado mental (MMSE) (Folstein, et al., *Journal of Psychiatric Research* 12 (3): 189-98). Los sujetos que mantienen la misma puntuación o que consiguen una puntuación mejorada, por ejemplo, cuando aplican la CDC o el MMSE, indican que la pauta de tratamiento o prevención es eficaz. Por el contrario, los sujetos que reciben una puntuación que indica habilidades cognitivas disminuidas, por ejemplo, cuando aplican la CDC o el MMSE, indican que la pauta de tratamiento o prevención no ha sido eficaz.

En determinados aspectos, los métodos de control pueden implicar determinar un valor basal de un biomarcador o parámetro medible (por ejemplo, carga de placa amiloide o habilidades cognitivas) en un sujeto antes de administrar una dosis del compuesto y comparar éste con un valor para el mismo biomarcador o parámetro medible después del tratamiento.

En otros métodos, se determina un valor de control (por ejemplo, una desviación media y típica) del biomarcador o parámetro medible para una población de control. En determinados aspectos, los individuos en la población de control no han recibido tratamiento previo y no tienen EA, DCL, ni corren el riesgo de desarrollar EA o DCL. En dichos casos, si el valor del biomarcador o el parámetro clínico medible se aproximan al valor de control, el tratamiento se considera eficaz. En otros aspectos, los individuos en la población de control no han recibido tratamiento previo y se les ha diagnosticado con EA o DCL. En dichos casos, si el valor del biomarcador o el parámetro clínico medible se aproxima al valor de control, el tratamiento se considera ineficaz.

En otros métodos, un sujeto que no está recibiendo tratamiento actualmente pero que se ha sometido a un curso previo de tratamiento se controla para uno o más de los biomarcadores o parámetros clínicos para determinar si se requiere una reanudación del tratamiento. El valor medido de uno o más de los biomarcadores o parámetros clínicos en el sujeto puede compararse con un valor alcanzado anteriormente en el sujeto después de un curso de tratamiento previo. Como alternativa, el valor medido en el sujeto puede compararse con un valor de control (media más desviación típica/ANOVA) determinado en la población de sujetos después de someterse a un curso de tratamiento. Como alternativa, el valor medido en el sujeto puede compararse con un valor de control en poblaciones de sujetos tratados profilácticamente que permanecen sin síntomas de enfermedad o poblaciones de sujetos tratados terapéuticamente que muestran una mejora de las características de la enfermedad. En dichos casos, si el valor del biomarcador o el parámetro clínico medibles se aproxima al valor de control, entonces el tratamiento se considera eficaz y no es necesario reanudar. En todos estos casos, una diferencia significativa con respecto al nivel de control (por ejemplo, más que una desviación típica) es un indicador de que el tratamiento debe reanudarse en el sujeto.

La muestra de tejido para el análisis normalmente es sangre, plasma, suero, orina, mucosa o líquido cefalorraquídeo del sujeto.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar la invención reivindicada.

Ejemplo 1

Ensayos ALPHALISA® en células transfectadas con 7W APP

Este ejemplo proporciona métodos experimentales para la medición de sAPP α , A β 42 y APPneo.

Ensayo de pruebas de compuesto in vitro: Se sembraron células 7W CHO a 50.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos durante 24 h. Después, su medio se cambió por medio recién preparado complementado con

compuestos 1 μM (por ejemplo, tropisetron, disulfiram, honokiol y/o nimetazepam). Después de 24 h, se añadieron 20 μl del medio a 2 μl del inhibidor de proteasa completo con EDTA 1 μM y se mantuvieron a 4 °C hasta el análisis. Se trataron 2 μl de ese medio con el kit de A β de Perkin Elmer (PE) ALPHALISA® para determinar la cantidad de A β 42 secretado por las células en 24 h usando el lector PE-Enspire. Otra parte alícuota de 2 μl del medio se diluyó con 50 μl de tampón de la PE ALPHALISA® y se trató con el kit de sAPP α de PE ALPHALISA® para determinar la cantidad de sAPP α secretada por las células en 24 h. Para el ensayo, se trataron 2 μl de la mezcla final con la perla aceptora y el anticuerpo donador seguido de la adición de las perlas donadoras y se midió la señal ALPHALISA® usando un lector de PE-Enspire. Para la medición de APPneo, las 50.000 células se trataron después de sembrar con medio recién preparado complementado con o sin el compuesto, pero sin suero bovino fetal (FBS), para inducir la formación del fragmento de APPneo. Después de 24 h, se retiró el medio, las células del fondo de los pocillos se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y después se lisaron con 50 μl del tampón de Perkin Elmer ALPHALISA® y con el 10 % del inhibidor de proteasa completo con EDTA. Las células se congelaron después a -20 °C durante 1 h. Después de descongelar, las células se mantuvieron a 4 °C hasta el análisis. Se trataron partes alícuotas de 2 μl del lisado celular con el kit de APPneo de PE ALPHALISA® (personalizado) preparado con el anticuerpo APPneo (Galavan, 2006, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 7130-7135) para determinar la cantidad de APPneo secretada por las células en 24 h. Los resultados se muestran en la Figura 1.

Ejemplo 2

Células neuronales primarias J20 (Modelo de ratón PDAPP)

Este ejemplo proporciona métodos experimentales para la medición de sAPP α , A β 42 y APPneo en células neuronales primarias.

Ensayo de pruebas de compuesto de cultivo primario in vitro: Los cultivos neuronales primarios se realizaron a partir de hipocampos J20 de ratones embrionarios de 18 días. Los embriones se produjeron criando machos J20 y hembras J20 (ambos heterocigotos), lo que proporciona un cultivo transgénico al 50-75 %. Las células se mezclaron de todos los embriones y se colocaron en placas en 2×10^5 en 6 o más pocillos (dependiendo del número de embriones) de una placa de cultivo de 48 pocillos previamente recubierta con Poli-L-lisina. Se dejó que las células se fijaran durante la noche y los compuestos (por ejemplo, tropisetron, disulfiram, honokiol y/o nimetazepam) se añadieron 24 horas después de que se preparara el cultivo. Se usaron tres pozos para cada compuesto y siempre se hace un control solo para vehículos. Los compuestos se añadieron a las células todos los días durante 3 días; el tercer día se recogieron los medios, se añadieron inhibidores de la proteasa y se almacenaron los medios. Después de un lavado con PBS, se añadió tampón RIP A a las células, se agitaron durante 1 minuto y después se congelaron. Se inmunoprecipitó A β 42 en los medios celulares usando anticuerpo 4G8, se inmunoprecipitó APPneo en las células usando el anticuerpo APPneo (Galavan, 2006, citado anteriormente) y se determinó sAPP α directamente en los medios. Para algunos experimentos, también se inmunoprecipitó A β 42 en sobrenadante de células IP post-APPneo. Los resultados se muestran en la Figura 2.

Ejemplo 3

Estudios de captación de cerebro de ratón y biomarcadores

Este ejemplo proporciona métodos experimentales para la medición *in vivo* de la penetración cerebral compuesta y del efecto sobre sAPP α , A β 40/42 y APPneo en el modelo de ratón PDAPP.

Métodos

Análisis por ALPHALISA: Se usaron kits ALPHALISA® de Perkin Elmer (PE) para cuantificar sAPP α (n.º de cat.: AL254C), sAPP β (n.º de cat.: AL232C), A β 40 (n.º de cat.: AL275C), A β 42 (n.º de cat.: AL276C) y Tau (n.º de cat.: AL271C) de homogeneizados de cerebro. Las muestras se añaden a un AlphaPlate-384 (n.º de cat.: 6005350). Se añadieron veinte microlitros (μl) de mezcla de anticuerpos y perlas aceptoras a cada muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) de cinco μl y se dejaron incubar durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 25 μl de perlas de donador y se dejaron incubar en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se midió la fluorescencia después en un lector de placas de 96 pocillos Enspire (Perkin-Elmer).

Ensayos ELISA: También se usaron kits ELISA de Invitrogen también para cuantificar A β 1-40 (KHB3481) y A β 1-42 (KHB3544) por duplicado de las muestras de LCR almacenadas a -80 °C. Para el ensayo, las muestras se descongelaron en hielo y se tomaron precauciones BSL-2 en todo momento. Para el ELISA ultrasensible de A β 1-42 humano, las muestras se diluyeron 1:2 (50 μl de LCR más 50 μl de tampón diluyente patrón proporcionado con el kit). Para el ELISA de A β 1-40 humano, las muestras se diluyeron 1:15 (6,7 μl de LCR más 93,8 μl de tampón diluyente patrón). Los ensayos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se añadieron patrones y muestras a una placa recubierta con un anticuerpo monoclonal de captura específico para el extremo amino de Hu A β . Las muestras se incubaron conjuntamente con un anticuerpo de detección de conejo (Ab) específico para el extremo carboxilo de la especie A β que se sometió a ensayo durante 3 horas a temperatura ambiente (A β 1-40) hasta la noche a 4 °C (A β 1-42) con un balanceo suave. Después del lavado, se detectó Ab de

conejo unido usando un Ab secundario anti-conejo marcado con peroxidasa de rábano picante. Después de lavar de nuevo, se detectó colorimétricamente el Ab anti-conejo HRP unido (Spectramax 190, Molecular Devices) mediante la adición de una solución de sustrato. Se añadió inhibidor de proteasa de clorhidrato de fluoruro de 4-(2-aminoetil)bencenosulfonilo (AEBSF) 1 mM (101500, Calbiochem) a los patrones y muestras.

Ensayo de captación cerebral (PK): En general, los estudios de exposición al SNC consistieron en la recogida de plasma y cerebro heparinizados después del tratamiento con tropisetron, nimetazepam, disulfiram y honokiol después de la administración subcutánea (sc) de las moléculas a 10 mg/kg. Los niveles plasmáticos y cerebrales de los compuestos se determinaron mediante la metodología de CL/EM/EM cuantitativa, realizada en Integrated Analytical Solutions (en Internet en ianalytical.net). Las muestras de plasma se precipitaron con cóctel de acetonitrilo:metanol (1:1) que contenía un patrón interno. Las muestras de cerebro se homogeneizaron directamente en acetato de etilo o se extrajeron de homogeneizados de guanidina 5 M usando el método líquido-líquido. El sobrenadante resultante se evaporó a sequedad y se sometió al análisis por CL/EM/EM. Para cada compuesto se utilizaron 3 ratones para el análisis. Las relaciones de cerebro a plasma y los niveles cerebrales se calcularon para identificar el mejor o los mejores candidatos para realizar ensayos adicionales.

Niveles de A β 40/42, sAPP α y APPneo en el cerebro (PD): En general, como parte de los estudios de exposición al SNC en ratones transgénicos (Tg) con enfermedad de Alzheimer (por ejemplo, el modelo de ratón PDAPP de la enfermedad de Alzheimer), también se midieron los efectos de tropisetron, nimetazepam, disulfiram y honokiol sobre los biomarcadores. En el caso de tropisetron, el ensayo se realizó a 0,3 mpk, mientras que en el caso de los otros compuestos (por ejemplo, nimetazepam, disulfiram y honokiol) se realizó a 10 mpk. De los cerebros recogidos se diseccionaron los hipocampos. Los niveles de sAPP α y A β 1-40, A β 1-42 y APPneo se midieron mediante el ensayo ALPHALISA (ALPHALISA Perkin-Elmer) y A β 1-40, A β 1-42 (Invitrogen, kit ELISA sensible) en homogeneizados de cerebro de ratones Tg. Todos los procedimientos implicados se han descrito (Galavan 2006, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 7130-7135). Para cada compuesto, se usaron 3 ratones y el tratamiento se realizó mediante inyección subcutánea (sc) o intraperitoneal (ip) a 10 mpk/día durante 4 días para este análisis. Después se determinó la relación cerebro-plasma (PK) de tropisetron y relaciones sAPP α /A β 42 (PD).

Recogida de datos de dispersión de rayos X: Se incubaron 100 μ g de MBP-eAPP₂₃₀₋₆₂₄ purificado con Disulfiram 50 μ M o Sulfiram 50 μ M en fosfato de sodio 20 mM pH 7,4, cloruro de sodio 137 mM, sulfóxido de dimetilo al 0,05 % a 4 °C durante 1 hora. La muestra de control se incubó en el tampón solo. Las muestras se concentraron a aproximadamente 1,5 mg/ml usando concentradores NML de 5000 kDa. Los datos de dispersión de rayos X de ángulo pequeño se recogieron usando concentraciones de proteínas en el intervalo de 0,25-1,5 mg/ml y una longitud de onda de rayos X de 1,11 Å en la línea del haz 12.3.1 (Advanced Light Source). Se usaron muestras del filtrado para la sustracción del tampón. Los datos se integraron con un software personalizado para la línea del haz y se procesaron con el programa PRIMUS (Konarev (2003) *Journal of Appll Crystallography* 36, 1277-1282). El programa GNOM (Svergun, (1992) *J. Appl. Crystallogr.* 25, 495-503) se usó para calcular la dimensión máxima y el radio de giro y para estimar la intensidad de la dispersión en ángulo cero para muestras de mayor concentración. El peso molecular de cada proteína se calculó comparando con la dispersión de proteínas de peso molecular conocido. Los datos dimensionales para cada muestra se resumen en la Tabla 4. Aunque las diluciones de cada muestra se analizaron a concentraciones de aproximadamente 0,25 mg/ml, no se observaron diferencias significativas en los datos dimensionales a través de los intervalos de concentración que se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4

		Dm α (Å) $\pm$ 10	Rg (Å) $\pm$ 2	PMcalc/PMsec $\pm$ 0,2
MBP-eAPP ₂₃₀₋₆₂₄	-na-	190	55	2,0
	Sulfiram	170	53	1,7
	Disulfiram	160	51	1,5

Como se muestra en la Figura 3, la incubación tanto con disulfiram como con sulfiram produjo cambios significativos en la dispersión de rayos x de ángulo pequeño de MBP-e-APP₂₃₀₋₆₂₄ que indica que ambas moléculas se unen a MBP-e-APP₂₃₀₋₆₂₄ y alteran la conformación de la proteína. La aparente disminución en el peso molecular y la dimensión máxima (Dm α) son coherentes tanto con sulfiram como con disulfiram rompiendo los dímeros MBP-e-APP₂₃₀₋₆₂₄. El mayor efecto del disulfiram que del sulfiram sugiere que el disulfiram tiene una mayor afinidad de unión.

Resultados

Clorhidrato de tropisetron: Los ensayos de captación cerebral en ratones demostraron que el clorhidrato de tropisetron penetra la barrera hematoencefálica bien, con una relación cerebro/plasma de aproximadamente 3 a niveles máximos de fármaco. Los ensayos en APP de ratones transgénicos (Tg) a 0,3 miligramos por kilogramo (mpk) por vía subcutánea (sc) durante un período de 5 días dan como resultado un aumento significativo de los niveles de sAPP α en el hipocampo (Hip) y la corteza entorrinal (CE) de ratón y una disminución significativa en los niveles de A β 40 y A β 42. Esta dosis de tropisetron es aproximadamente equivalente a la dosis humana de 5

miligramos por día para un adulto normal. Los resultados se muestran en las Figuras 4-7.

- 5 *Nimetazepam*: Nitmetazepam es una benzodiazepina y se sabe que atraviesa bien la barrera hematoencefálica. Los ensayos en ratones transgénicos (Tg) a 10 mpk por vía subcutánea (sc) durante un período de 5 días dieron como resultado un aumento significativo de los niveles de sAPP α en el hipocampo (Hip) y la corteza entorrinal (CE) de ratón. No se observaron cambios significativos en los niveles de A β 40 o A β 42 en estos experimentos. Véase la Figura 8.
- 10 *Honokiol*: El ensayo de captación cerebral con honokiol demuestra que el compuesto penetra bien en el cerebro, con una relación cerebro/plasma de aproximadamente 1. Los ensayos en ratones transgénicos (Tg) a 10 mpk por vía subcutánea (sc) durante un período de 5 días no mostraron un aumento significativo en los niveles de sAPP α en el hipocampo (Hip) y la corteza entorrinal (CE) del ratón. No se observaron cambios significativos en los niveles de A β 40 o A β 42 en estos experimentos. Los ensayos crónicos en ratones Tg no se completaron.
- 15 *Disulfiram*: El ensayo de captación cerebral con Disulfiram demostró que tiene una penetración de barrera hematoencefálica baja, con una relación cerebro/plasma de aproximadamente 0,1. Los ensayos adicionales muestran que el disulfiram se degrada rápidamente en el tejido cerebral, probablemente reduciéndose en el enlace disulfuro. Como era de esperar, no hubo cambios en los niveles de sAPP α o A β . El tratamiento de células 7W transfectadas de manera estable con APP con disulfiram muestra un aumento en los niveles de sAPP α (Figura 1).
- 20 Usando un análisis de dispersión de rayos X, los inventores han demostrado que el disulfiram puede unirse a APP e interrumpir la dimerización de APP (Tabla 4) y esto da como resultado un aumento de la escisión por α -secretasa de APP y de los niveles de sAPP α .

REIVINDICACIONES

1. El compuesto tropisetron, o su sal farmacéuticamente aceptable, para su uso en un método para retrasar la aparición de y/o ralentizar la progresión del deterioro cognitivo leve (DCL) **caracterizado por** el procesamiento de APP por la vía amiloidogénica en un mamífero, en el que dicho retraso en la aparición y/o ralentización de la progresión comprende una reducción en el LCR de los niveles de uno o más componentes seleccionados entre el grupo que consiste en Tau total (tTau), fosfo-Tau (pTau), APPneo, A β 40 soluble, la relación pTau/A β 42 y la relación tTau/A β 42, y/o un aumento en el LCR de los niveles de uno o más componentes seleccionados entre el grupo que consiste en la relación A β 42/A β 40, la relación A β 42/A β 38, sAPPa, la relación sAPPa/sAPP β , la relación sAPPa/A β 40 y la relación sAPPa/A β 42.
2. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en el que dicho uso comprende mitigar un síntoma de deterioro cognitivo leve, en el que dicha mitigación de un síntoma comprende:
 - una mejora, una estabilización o una reducción de la velocidad de deterioro de la clasificación de demencia clínica (CDC) del mamífero; y/o
 - una reducción de la carga de placa en el cerebro del mamífero; y/o
 - una reducción de la velocidad de formación de placa en el cerebro del mamífero.
3. El compuesto para el uso de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho uso comprende retrasar o prevenir la progresión del DCL a la enfermedad de Alzheimer.
4. El compuesto para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el compuesto es tropisetron.
5. El compuesto para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable de tropisetron.
6. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho compuesto está formulado para la administración oral.
7. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho compuesto se proporciona como una sal de HCl farmacéuticamente aceptable.
8. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el mamífero es humano.
9. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el mamífero corre el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer.
10. El compuesto para el uso de la reivindicación 9, en el que el mamífero tiene un riesgo familiar de tener la enfermedad de Alzheimer, tiene una mutación de la enfermedad de Alzheimer familiar (EAF) y/o tiene el alelo APOE ϵ 4.
11. El compuesto para el uso de la reivindicación 9, en el que el mamífero es asintomático.
12. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:
 - el mamífero está libre y no tiene factores de riesgo genéticos de enfermedad de Parkinson o esquizofrenia; y/o
 - no se ha diagnosticado que el mamífero tiene o corre el riesgo de desarrollar enfermedad de Parkinson o esquizofrenia.

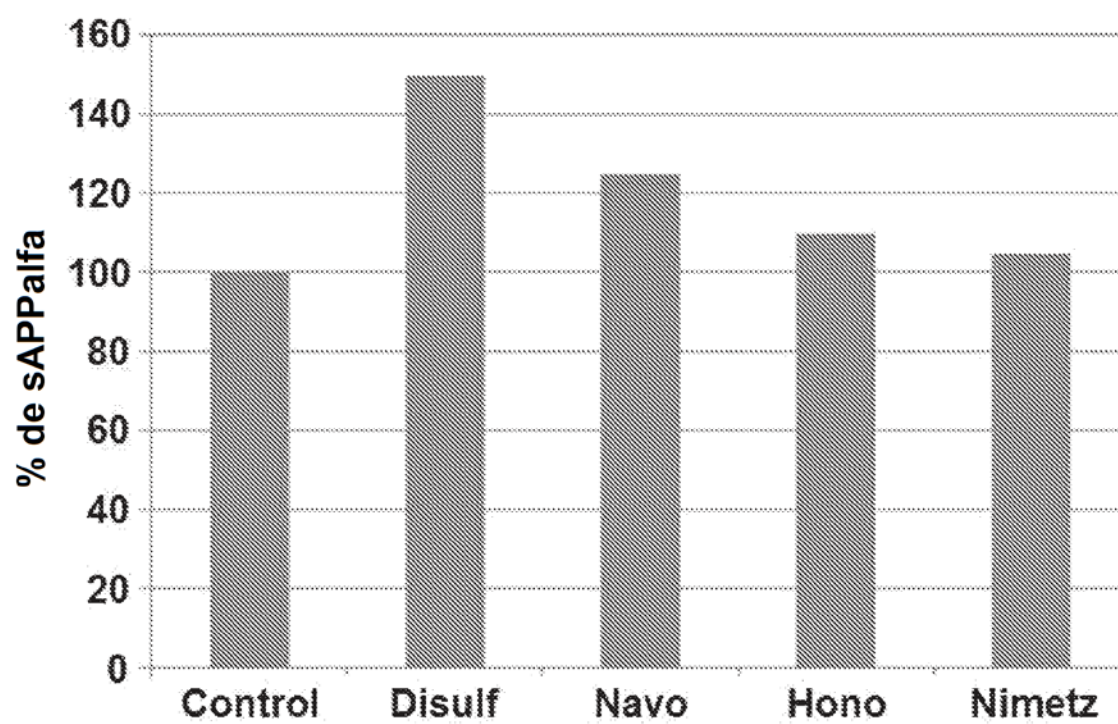
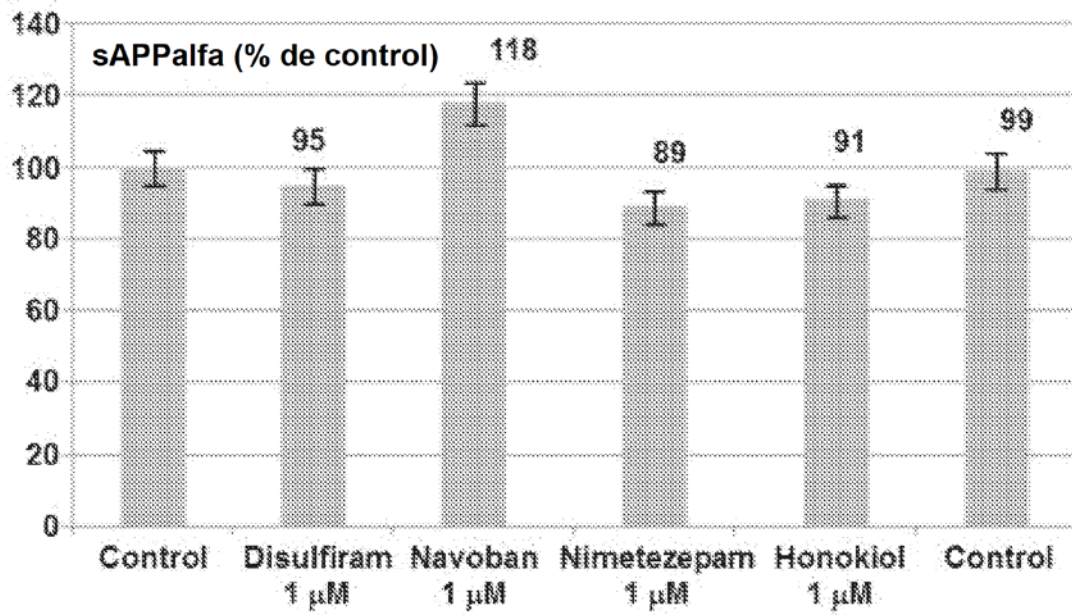


Fig. 1

A



B

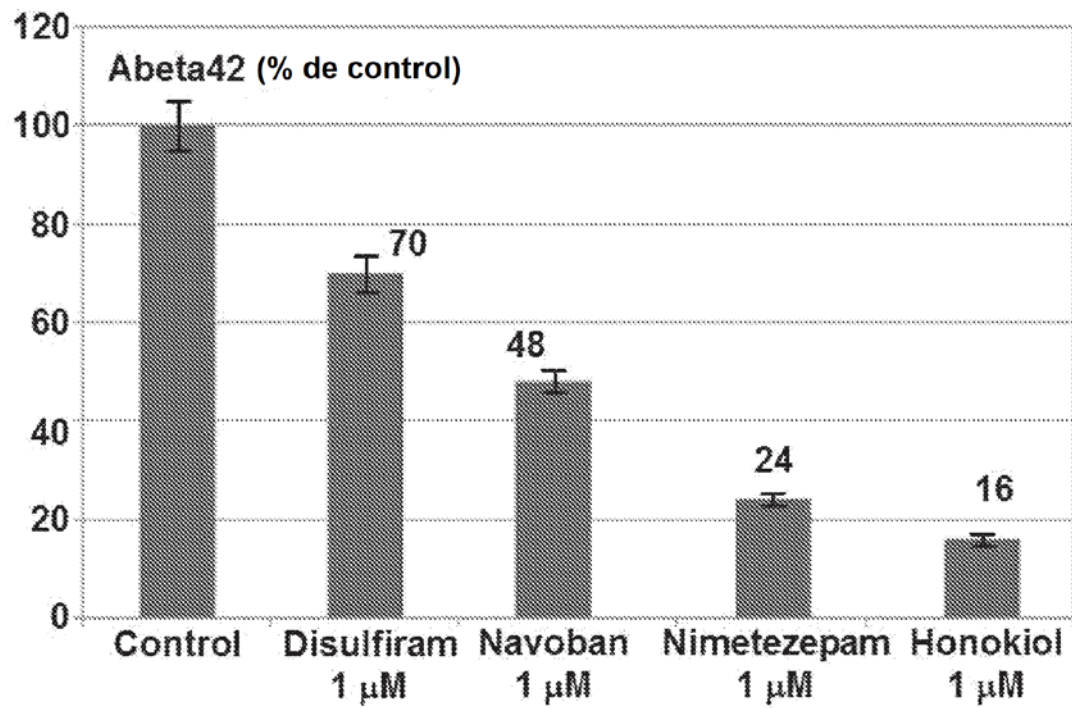


Fig. 2

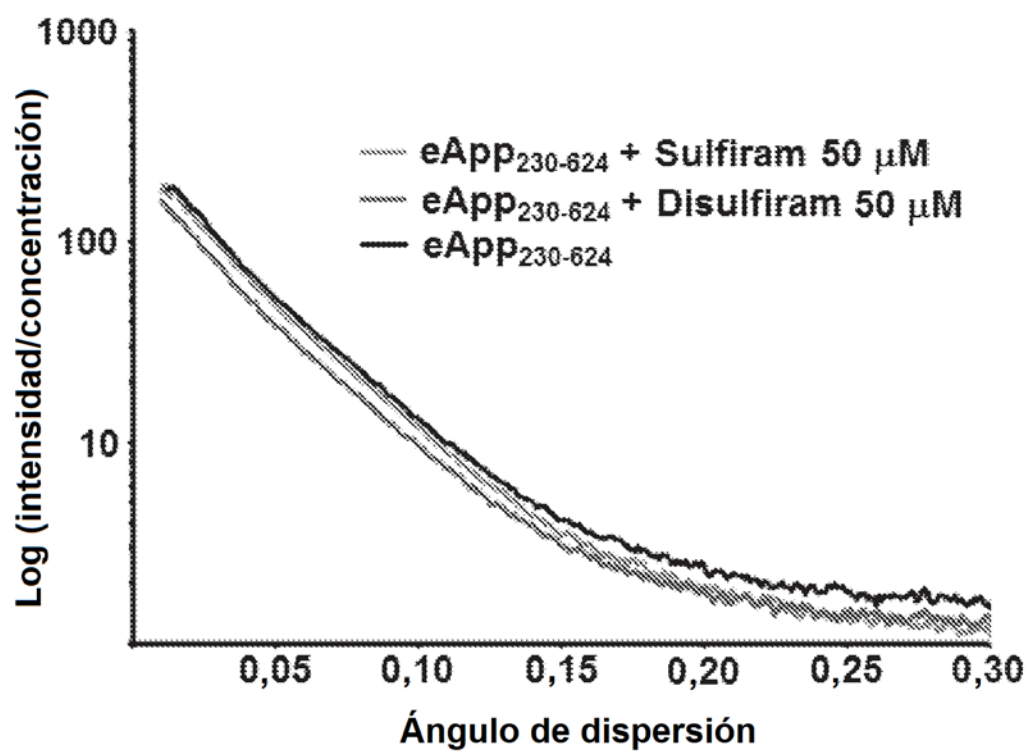


Fig. 3

Farmacocinética: Navoban

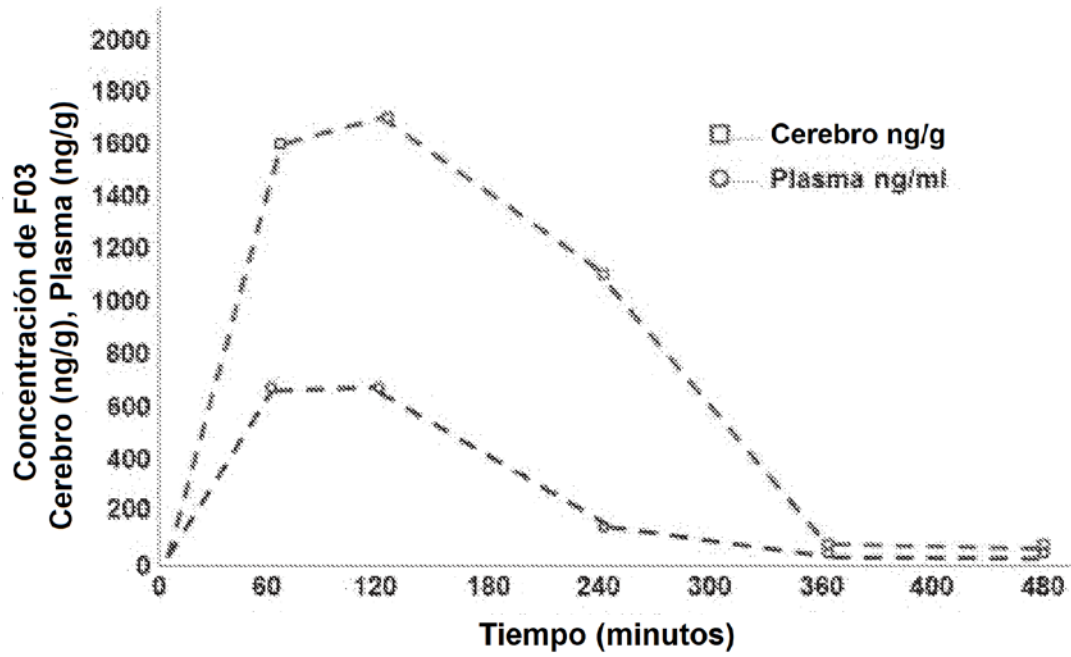


Fig. 4

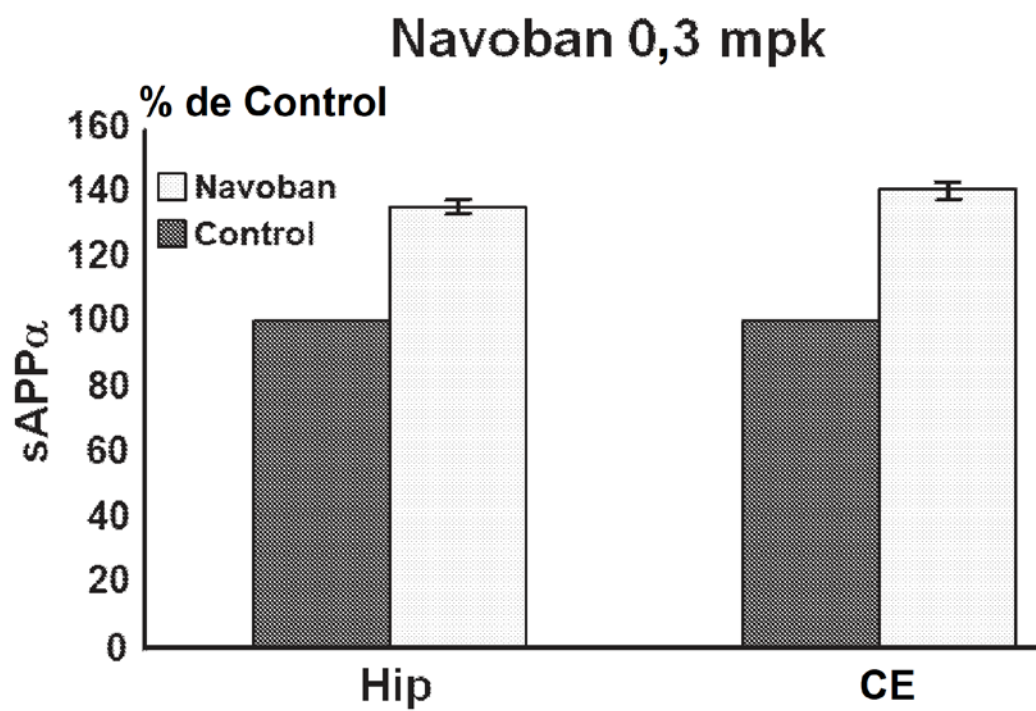


Fig. 5

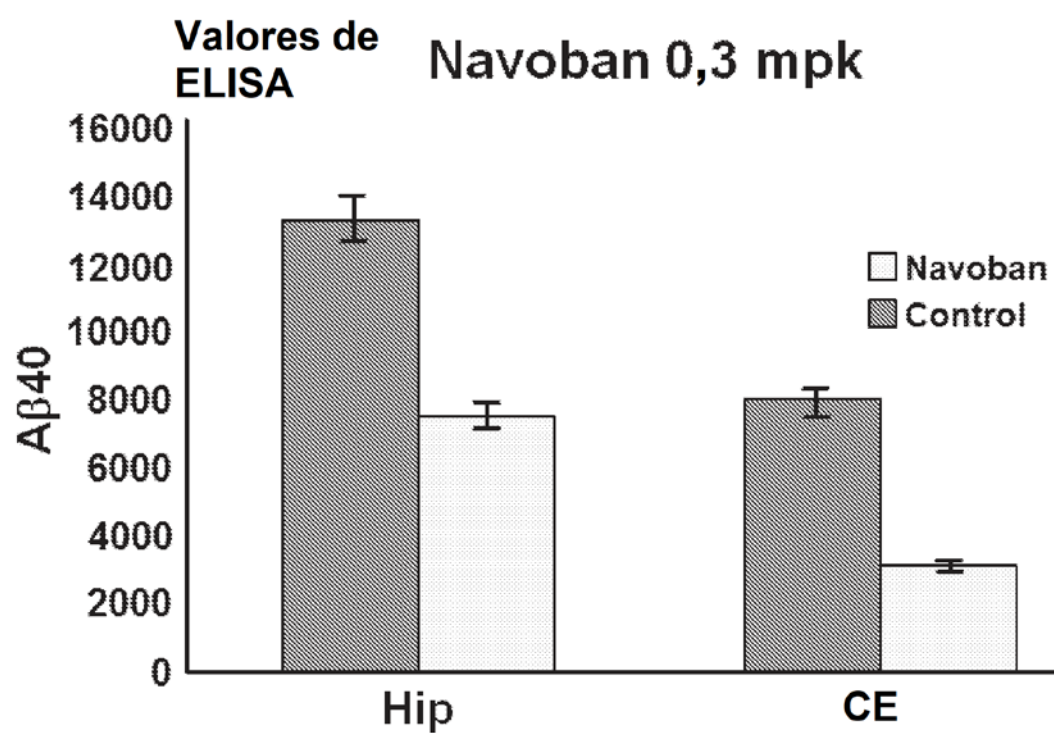


Fig. 6

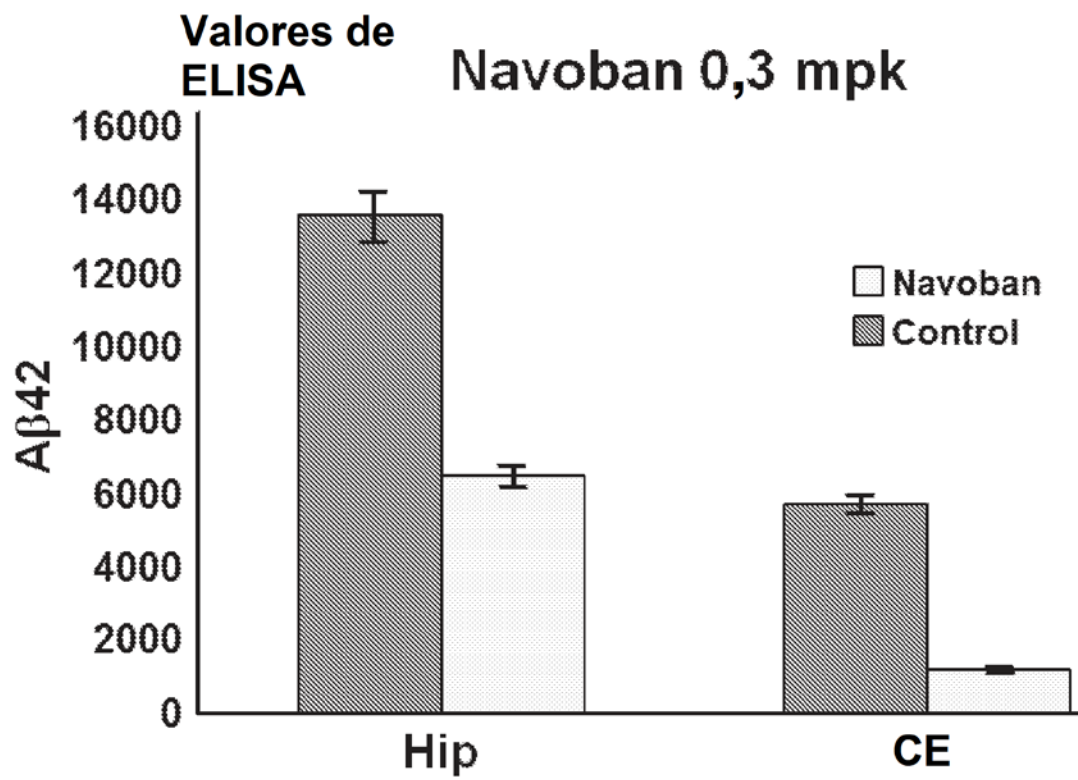


Fig. 7

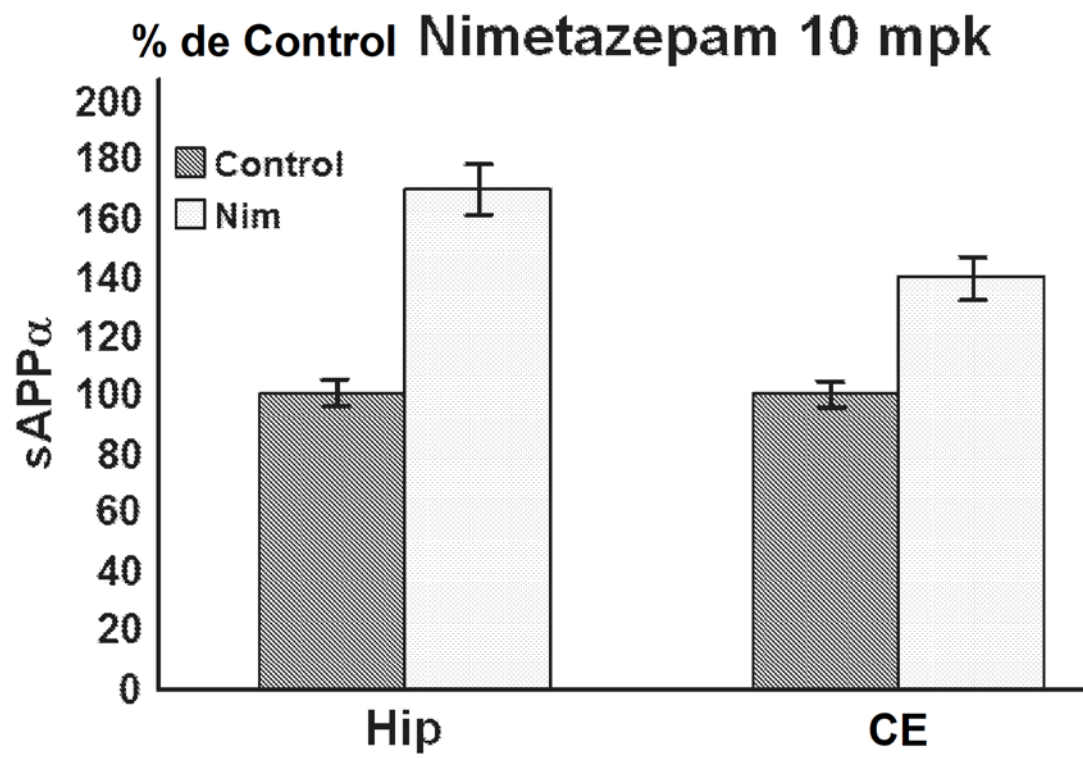


Fig. 8