

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 539**

51 Int. Cl.:

A01N 43/16 (2006.01)

A61K 31/35 (2006.01)

A61K 31/7016 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61K 31/366 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013 PCT/US2013/032481**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013 WO13142370**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013 E 13763620 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 2827711**

54 Título: **Inhibidores de BACE específicos de APP (ASBI) y uso de los mismos**

30 Prioridad:

19.03.2012 US 201261612848 P

20.11.2012 US 201261728688 P

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

02.03.2020

73 Titular/es:

**BUCK INSTITUTE FOR RESEARCH ON AGING
(100.0%)**

**8001 Redwood Boulevard
Novato, CA 94945, US**

72 Inventor/es:

**JOHN, VARGHESE y
BREDESEN, DALE E.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 745 539 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de BACE específicos de APP (ASBI) y uso de los mismos

Antecedentes

5 El péptido beta amiloide (A β) es un componente principal de las fibrillas y placas beta amiloides, que se considera que desempeñan un papel en un número creciente de patologías. Ejemplos de tales patologías incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, enfermedad de Parkinson, pérdida de memoria (incluida la pérdida de memoria asociada con la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson), síntomas de déficit de atención (incluidos los síntomas de déficit de atención asociados con la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y síndrome de Down), demencia (incluida la demencia presenil, demencia senil, demencia asociada con la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y síndrome de Down), parálisis supranuclear progresiva, degeneración basal cortical, neurodegeneración, deterioro olfativo (incluido el deterioro olfativo asociado con enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y síndrome de Down), angiopatía β -amiloide (incluida la angiopatía amiloide cerebral), hemorragia cerebral hereditaria, deterioro cognitivo leve ("MCI"), glaucoma, amiloidosis, diabetes tipo II, hemodiálisis (microglobulinas β 2 y complicaciones derivadas de las mismas), enfermedades neurodegenerativas tales como tembladera, encefalitis espongiiforme bovina, enfermedad de Creutzfeldt Jakob, lesión cerebral traumática y similares.

10 Los péptidos A β son péptidos cortos que se producen por proteólisis de la proteína transmembrana llamada proteína precursora amiloide ("APP"). Los péptidos A β se obtienen a partir de la escisión de APP por la actividad de la β -secretasa en una posición cerca del terminal N de A β , y por la actividad de la α -secretasa en una posición cerca del terminal C de A β . (La APP también se escinde por la actividad de la α -secretasa, lo que da como resultado el fragmento secretado no amiloidogénico conocido como APP α soluble). La Enzima de Escisión de APP del sitio beta ("BACE-1") es considerada como la principal proteasa de aspartilo responsable de la producción de A β por la actividad de la β -secretasa. Se ha demostrado que la inhibición de BACE-1 inhibe la producción de A β .

15 Se estima que la enfermedad de Alzheimer (AD) afecta a más de 20 millones de personas en todo el mundo y se cree que es la causa más común de demencia. A medida que la población mundial envejece, el número de personas con enfermedad de Alzheimer (AD), actualmente aproximadamente 5,4 millones en los Estados Unidos) continuará aumentando. La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa asociada con demencia progresiva y pérdida de memoria. Dos características clave de la AD son acumulación de depósitos extracelulares que contienen péptido A β agregado y pérdida sináptica neuronal en la AD en regiones cerebrales específicas. Aunque la patogénesis de la AD es compleja, la evidencia genética y bioquímica convincente sugiere que la sobreproducción de A β , o la falta de eliminación de este péptido es el evento más temprano en la cascada amiloide que conduce a la AD principalmente a través del depósito de amiloide, el cual se presume que está involucrado en la formación de ovillos neurofibrilares, disfunción neuronal y activación de la microglía, que caracteriza los tejidos cerebrales afectados por la AD.

20 La acumulación de A β se considera el evento más temprano en una cascada compleja que conduce a la neurodegeneración, según se desprende de la evidencia genética y bioquímica convincente. La hipótesis de la cascada amiloide (Hardy and Allsop (1991) Trends Pharmacol. Sci., 12: 383-388; Selkoe (1996) J. Biol. Chem., 271: 18295-18298; Hardy (1997) Trends Neurosci., 20: 154-159; Hardy and Selkoe (2002) Science, 297: 353-356) afirma que la sobreproducción de A β , o la incapacidad de eliminar este péptido, conduce a AD, principalmente a través del depósito de amiloide, el cual se presume que está involucrado en la formación de ovillos neurofibrilares, disfunción neuronal y activación de microglía, que son características de los tejidos cerebrales afectados por AD (Busciglio *et al.* (1995) Neuron, 14: 879-888; Gotz *et al.* (1995) EMBOJ., 14: 1304-1313; Lewis *et al.* (2001) Science, 293: 1487-1491; Hardy *et al.* (1985) Nat Neurosci., 1: 355-358).

25 Teniendo en cuenta el papel causal de A β en la etiología de la AD, se han sugerido novedosas estrategias terapéuticas que reducen los niveles de A β o evitan la formación de las especies neurotóxicas de A β como un procedimiento para prevenir o retrasar la progresión de la enfermedad. De hecho, el enfoque principal durante la última década ha sido inhibir la producción y agregación de A β cerebral, aumentar el aclaramiento de A β parenquimal e interferir con la muerte celular inducida por A β .

30 La escisión secuencial de APP por proteasas unidas a membrana β -secretasa y γ -secretasa da como resultado la formación de A β . Una ruta proteolítica competitiva hacia la ruta de la β -secretasa, la ruta de la α -secretasa, da como resultado la escisión de la APP dentro del dominio A β , lo que impide la generación de A β (Selkoe (2001) Physiol. Rev., 81: 741-766; Hussain *et al.* (1999) Mol. Cell. Neurosci., 14: 419-427; Sinha *et al.* (1999) Nature, 402: 537-540; Vassar *et al.* (1999) Science, 286: 735-741). La enzima de escisión de APP del sitio β -1 (BACE1) se identificó como la actividad principal de β -secretasa que media la primera escisión de APP en la ruta β -amiloidogénica (Id.).

35 BACE1 es una proteína de 501 aminoácidos que porta homología con las proteasas aspárticas eucariotas, especialmente de la familia de las pepsinas (Yan *et al.* (1999) Nature, 402: 533-537). Al igual que otras proteasas aspárticas, BACE1 se sintetiza como un zimógeno con un prodominio que es escindido por furina para liberar la proteína madura. BACE1 es una proteína transmembrana de tipo I con un sitio activo luminal que escinde APP para liberar un ectodominio (sAPP β) en el espacio extracelular. El fragmento del terminal C restante (CTF) sufre una

escisión adicional por la γ -secretasa, lo que conduce a la liberación de A β y el dominio del terminal C intracelular de APP (AICD).

Se ha propuesto que las presenilinas son el componente enzimático principal de la γ -secretasa, cuya escisión imprecisa de APP produce un espectro de péptidos A β que varían en longitud en unos pocos aminoácidos en el terminal C. La mayoría de A β normalmente termina en el aminoácido 40 (A β 40), pero se ha demostrado que la variante del aminoácido 42 (A β 42) es más susceptible a la agregación, y se ha planteado la hipótesis de que nuclea la formación de placa senil. La modulación de la γ -secretasa también puede conducir a un aumento en la variante del aminoácido 38 (A β 38). La ruta competitiva de la α -secretasa es el resultado de divisiones secuenciales por α - y γ -secretasa. Se han propuesto tres metaloproteasas de la familia de desintegrina y metaloproteasa (ADAM 9, 10 y 17) como candidatas para la actividad de α -secretasa, la cual escinde APP en la posición 16 dentro de la secuencia A β . Utilizando experimentos de sobreexpresión, se ha demostrado que ADAM-10 es la α -secretasa probable para la escisión de APP (Vassar (2002) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54: 1589-1602; Buxbaum *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.*, 273: 27765-27767; Koike *et al.* (1999) *Biochem. J.*, 343(Pt 2): 371-375). Esta escisión también libera un ectodominio (sAPP α), que muestra funciones neuroprotectoras (Lammich *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 3922-3927). La escisión subsecuente del CTF del aminoácido 83 (C83) libera p3, que no es amiloidogénico, y AICD (Furukawa *et al.* (1996) *J. Neurochem.*, 67: 1882-1896). Las funciones de estos fragmentos no están completamente dilucidadas, aunque la hipótesis de AICD es mediar en la señalización intracelular.

La investigación que clarifica las rutas metabólicas que regulan la producción de A β a partir de la Proteína Precursora Amiloide (APP) indica que las secretasas que producen A β son buenos objetivos terapéuticos, ya que la inhibición de la β - o γ -secretasa limita la producción de A β . El hecho de que la β -secretasa inicia el procesamiento de APP y, por lo tanto, sirve como el paso limitante de la tasa en la producción de A β , su inhibición ha atraído esfuerzos de muchos grupos de investigación. Los ejemplos de la literatura de patentes están creciendo e incluyen, por ejemplo, WO2005/058311, WO2006/065277, WO2006/014762, WO2006/014944, WO2006/138195, WO2006/138264, WO2006/138192, WO2006/138217, WO2007/050721, WO2007/053506, WO2007/146225, WO2006/146225, WO2007/146225, WO2007/138265, WO2006/138266, WO2007/053506, WO2007/146225, WO2008/073365, WO2008/073370, WO2008/103351, US2009/041201, US2009/041202 y WO2010/047372

Una limitación de las estrategias inhibitoras de la proteasa es la inhibición de la escisión de todos los sustratos de una proteasa direccionada determinada, tal como BACE o el complejo γ -secretasa. En el caso de la γ -secretasa, los sustratos que no sean APP, tales como Notch, generan preocupación por los posibles efectos secundarios de la inhibición de la γ -secretasa y el reciente fracaso del inhibidor de la γ -secretasa. Semagacestat, sirve para reforzar tales preocupaciones.

BACE es una enzima clave involucrada en el procesamiento de APP que conduce a la producción de A β 42 y la patología de la enfermedad de Alzheimer (AD). BACE-1 (también llamado BACE) se ha convertido en un área de investigación popular desde su descubrimiento, y quizás ha superado a la γ -secretasa como el objetivo más prometedor para la investigación farmacéutica. Un problema con la γ -secretasa como objetivo es su escisión conocida de Notch que cumple funciones importantes en el desarrollo neuronal. Los ratones con eliminación de presenilina demostraron somitogénesis anormal y desarrollo esquelético axial con longitud corporal acortada, así como hemorragias cerebrales (Shen *et al.* (1997) *Cell*, 89: 629-639; Wong *et al.* (1997) *Nature*, 387: 288-292). En contraste, varios grupos informaron que los ratones con eliminación de BACE1 son saludables y no muestran signos de efectos adversos (Luo *et al.* (2001) *Nat. Neurosci.*, 4: 231-232; Roberds *et al.* (2001) *Hum. Mol. Genet.*, 10: 1317-1324), mientras que un grupo notó sutiles déficits neuroquímicos y cambios de comportamiento en ratones de otro modo fértiles y viables (Harrison *et al.* (2003) *Mol. Cell Neurosci.*, 24: 646-655). Aunque los estudios recientes han demostrado que los ratones con eliminación de BACE1 exhiben hipomielinización de los nervios periféricos (Willem *et al.* (2006) *Science*, 314: 664-666), las consecuencias de la inhibición de BACE1 en animales adultos, donde la mielinización ya ha tenido lugar, no están claras. Recientemente se ha informado que BACE1 escinde múltiples sustratos, incluidos ST6Gal 1, PSGL-1, subunidades de canales de sodio dependientes de voltaje, proteínas similares a APP (APLP), proteína relacionada con el receptor de LDL (LRP) y, más recientemente, neuregulina tipo III (NRG1) (Willem *et al.* (2006) *Science*, 314: 664-666; Hu *et al.* (2006) *Nat. Neurosci.*, 9: 1520-1525). Por lo tanto, las consecuencias de inhibir directamente BACE1 aún no se entienden completamente.

El modelado molecular (Sauder *et al.* (2000) *J. Mol. Biol.*, 300: 241-248) y subsecuente cristalografía de rayos X (Hong *et al.* (2000) *Science*, 290: 150-153; Maillard *et al.* (2007) *J. Med. Chem.*, 50: 776-781) del sitio activo BACE-1 complejo con un inhibidor del estado de transición proporcionó información crucial sobre las interacciones del sustrato de BACE-1. Estructuralmente, el sitio activo de BACE-1 es más abierto y menos hidrófobo que otras aspartil proteasas, lo que dificulta el desarrollo de candidatos eficaces de inhibidores de BACE *in vivo*. Si bien existe un gran esfuerzo de descubrimiento de fármacos centrado en el desarrollo de inhibidores directos de BACE, ninguno hasta ahora ha avanzado significativamente en las pruebas clínicas.

Algunos inhibidores de BACE tales como LY2811376 y CTS21166 ingresaron a las pruebas clínicas, pero no avanzaron más allá de la Fase 1 debido a razones de seguridad. El descubrimiento de otros sustratos fisiológicos de BACE plantea una gran preocupación en el desarrollo clínico de los inhibidores de BACE o los moduladores de BACE y podría ser un obstáculo significativo en el avance de estos inhibidores como terapia para la enfermedad.

Daniel Paris *et al.* en la revista Bioinformation 6(6): páginas 229-236 (2011) plantea la hipótesis de que los flavonoides reducen la producción de A β de Alzheimer a través de un mecanismo dependiente de NFKB.

GUO A J Y *et al.* en la revista Chemico-Biological Interactions vol. 187, no. 1-3, 6 de septiembre de 2010, páginas 246-248 plantea la hipótesis de que la galangina, un flavonol derivado de *Rhizoma Alpiniae Officinarum*, inhibe la actividad de la acetilcolinesterasa *in vitro*.

El documento US2007/191330 A1 divulga compuestos aromáticos polihidroxlados y composiciones que los contienen para el tratamiento de la amiloidosis, especialmente la enfermedad de Alzheimer, y para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por la formación de fibrillas de alfa-sinucleína, especialmente la enfermedad del cuerpo de Lewy y la enfermedad de Parkinson.

10 Sumario

La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. La presente descripción general se proporciona solo con fines ilustrativos y las realizaciones que no caen bajo las reivindicaciones son solo para fines de referencia.

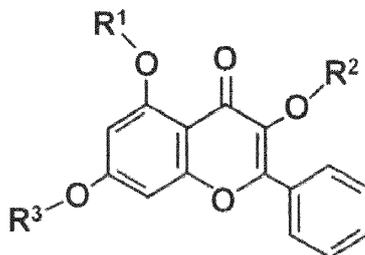
En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un inhibidor de BACE específico de APP para su uso en

15 prevenir o retrasar la aparición de una afección pre-Alzheimer y/o disfunción cognitiva, o prevenir o retrasar la progresión de una afección pre-Alzheimer o disfunción cognitiva a la enfermedad de Alzheimer; y/o

revertir la enfermedad de Alzheimer y/o reducir la tasa de progresión de la enfermedad de Alzheimer; en la que

dicho inhibidor de BACE específico de APP es galangina; o

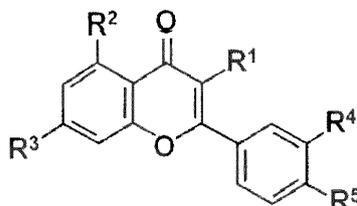
20 dicho inhibidor de BACE específico de APP es un profármaco de galangina que se procesa en galangina cuando se administra a un mamífero, en el que dicho profármaco de galangina se caracteriza por la fórmula:



en la cual:

25 R¹, R² y R³ son H, o un grupo protector que se elimina *in vivo* en un mamífero, en el que al menos uno de R¹, R² y R³ no es H; y en el que dicho profármaco inhibe parcial o completamente el procesamiento BACE de APP cuando se administra a un mamífero.

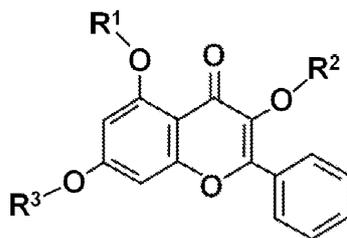
En ciertas realizaciones, se identifican flavonoides y derivados o análogos de los mismos (y profármacos de los mismos) que se cree que actúan como inhibidores de BACE específicos de APP (ASBI) (o selectivos de APP). En diversas realizaciones, los flavonoides pueden caracterizarse por la fórmula:



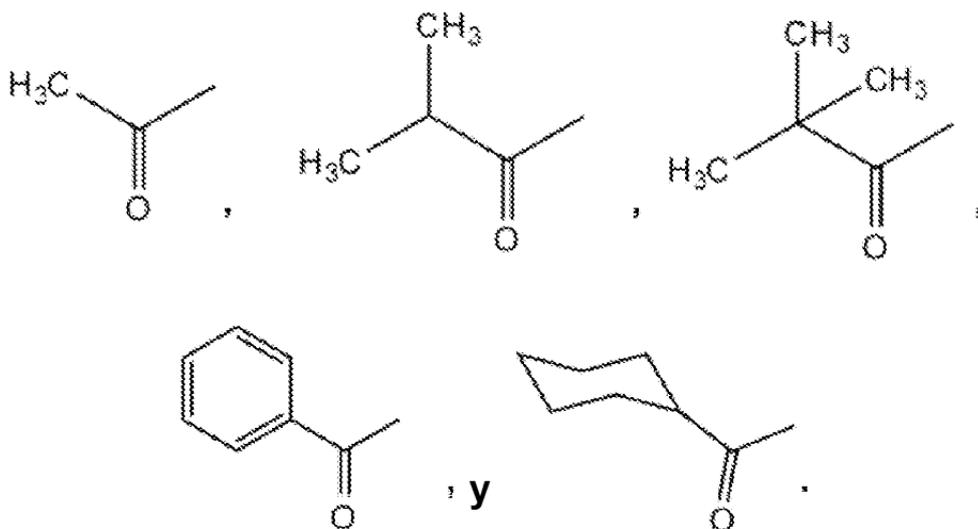
en la que R¹ se selecciona del grupo que consiste en OH, O-sacárido, O-alquilo, O-trifluorometilo, O-arilo, O-heteroarilo y carbamato; R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, OH, NH₂, O-alquilo, O-trifluorometilo, S-alquilo, S-arilo, carboxilato, halógeno, NH-alquilo, N,N-dialquilo, NHCO-alquilo, y heteroarilo, alquilurea y carbamato; y R² y R³ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, OH, NH₂, O-alquilo, O-trifluorometilo, S-alquilo, S-arilo, carboxilato, halógeno, NH-alquilo, N,N-dialquilo, NHCO-alquilo, heteroarilo, alquilurea y carbamato. En ciertas realizaciones, R² y/o R³ es OH. En ciertas realizaciones, R² es OH y R³ es OH. En ciertas realizaciones, R² y/o R³ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo y NHCO-alquilo. En ciertas realizaciones, R² y R³ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo y NHCO-alquilo (por ejemplo, donde el componente alquilo

de dicho O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo y NHCO-alquilo es un alquilo C₁₋₁₂, o un alquilo C₁₋₉, o un alquilo C₁₋₆, o un alquilo C₁₋₃). En ciertas realizaciones, R² y/o R³ es halógeno (por ejemplo, Cl, Br, Fl, I, etc.). En ciertas realizaciones, R² es halógeno y R³ es halógeno. En ciertas realizaciones, R² y/o R³ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en Cl, Br, Fl e I. En ciertas realizaciones, R² y/o R³ se seleccionan del grupo que consiste en S-arilo y heteroarilo. En ciertas realizaciones, R² y R³ son independientemente S-arilo seleccionado. En ciertas realizaciones, R² y R³ son heteroarilo independientemente seleccionado. En ciertas realizaciones donde R⁴ y/o R⁵ es OH. En ciertas realizaciones, R⁴ es H y R⁵ es OH. En ciertas realizaciones, R⁴ es OH y R⁵ es H. En ciertas realizaciones, R⁴ es OH y R⁵ es OH. En ciertas realizaciones, R⁴ y/o R⁵ es H. En ciertas realizaciones, R⁴ es H y R⁵ es H. En ciertas realizaciones cuando R⁴ y/o R⁵ es OH, R¹ es O-sacárido. En ciertas realizaciones en las que R⁴ y/o R⁵ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo y NHCO-alquilo. En ciertas realizaciones, R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo y NHCO-alquilo (por ejemplo, donde el componente alquilo de dicho O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo y NHCO-alquilo es un alquilo C₁₋₁₂, o un alquilo C₁₋₉, o un alquilo C₁₋₆, o un alquilo C₁₋₃). En ciertas realizaciones, R⁴ y/o R⁵ es halógeno. En ciertas realizaciones, R⁴ es halógeno y R⁵ es halógeno. En ciertas realizaciones, R⁴ y/o R⁵ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en Cl, Br, Fl e I. En ciertas realizaciones, R⁴ y/o R⁵ se seleccionan del grupo que consiste en S-arilo y heteroarilo. En ciertas realizaciones, R⁴ y R⁵ son independientemente S-arilo seleccionado. En ciertas realizaciones, R⁴ y R⁵ son heteroarilo independientemente seleccionado. En ciertas realizaciones, R¹ es O-sacárido (por ejemplo, O-monosacárido, O-disacárido, O-trisacárido). En ciertas realizaciones, R¹ es O-alquilo, O-trifluorometilo, O-arilo u O-heteroarilo. En ciertas realizaciones, el inhibidor de BACE específico (o selectivo) de APP es galangina o un derivado del mismo. En ciertas realizaciones, el inhibidor de BACE específico de APP es galangina. En ciertas realizaciones, el inhibidor de BACE específico de APP es rutina. En ciertas realizaciones, el inhibidor de BACE específico de APP es rutina.

En diversas realizaciones, se proporcionan profármacos ASBI. En ciertas realizaciones, el profármaco es un profármaco de galangina que se procesa en galangina cuando se administra a un mamífero. Los profármacos de galangina ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, un profármaco de galangina caracterizado por la fórmula:



en la que R¹, R² y R³ son H, o un grupo protector que se elimina *in vivo* en un mamífero, donde al menos uno de R¹, R² y R³ no es H; y donde el profármaco inhibe parcial o completamente el procesamiento BACE de APP cuando se administra a un mamífero. En ciertas realizaciones, al menos uno de R¹, R² y R³ se selecciona independientemente del grupo que consiste en



En ciertas realizaciones, R^1 es H y R^2 y R^3 son iguales o diferentes y comprenden cualquier combinación de los grupos mostrados anteriormente. En ciertas realizaciones, el profármaco tiene una fórmula que se muestra en la Figura 1 y/o la Figura 2.

- 5 En ciertas realizaciones, el ASBI y/o profármaco ASBI se proporciona como una formulación farmacéutica en la que el ASBI y/o profármaco ASBI es el componente activo principal. En ciertas realizaciones, el ASBI y/o profármaco ASBI es el único componente farmacéuticamente activo (por ejemplo, donde la actividad farmacéutica es la inhibición de BACE). En ciertas realizaciones, el ASBI y/o profármaco ASBI se proporciona en una formulación farmacéutica en la que no se proporciona ningún otro componente para la actividad neurofarmacológica o neuropsiquiátrica.
- 10 En ciertas realizaciones, se proporcionan procedimientos para prevenir o retrasar la aparición de una afección pre-Alzheimer y/o disfunción cognitiva, y/o mejorar uno o más síntomas de una afección pre-Alzheimer y/o disfunción cognitiva, o prevenir o retrasar la progresión de una afección pre-Alzheimer o disfunción cognitiva a la enfermedad de Alzheimer. Los procedimientos típicamente comprenden administrar (o hacer que se administre) a un sujeto que lo necesite un inhibidor de BACE específico de APP (ASBI) y/o un profármaco de ASBI en una cantidad suficiente para prevenir o retrasar la aparición de una disfunción cognitiva pre-Alzheimer, y/o para mejorar uno o más síntomas de una disfunción cognitiva pre-Alzheimer, y/o para prevenir o retrasar la progresión de una disfunción cognitiva pre-Alzheimer a la enfermedad de Alzheimer. En ciertas realizaciones, el ASBI y/o profármaco ASBI comprende un flavonoide ASBI y/o un profármaco ASBI como se describe en la presente memoria (por ejemplo, como se describe anteriormente). En ciertas realizaciones, el ASBI es galangina y/o el profármaco ASBI es un profármaco de galangina. En ciertas realizaciones, el ASBI y/o profármaco ASBI (por ejemplo, galangina y/o profármaco de galangina) se administra en una formulación farmacéutica en la que el ASBI es el componente activo principal. En ciertas realizaciones, el ASBI y/o profármaco ASBI (por ejemplo, el profármaco de galangina y/o galangina) se administra en una formulación farmacéutica en la que el ASBI y/o profármaco ASBI es el único componente farmacéuticamente activo. En ciertas realizaciones, el ASBI y/o profármaco ASBI (por ejemplo, galangina y/o profármaco de galangina) se administra en una formulación farmacéutica y no se proporciona ningún otro agente para la actividad neurofarmacológica o neuropsiquiátrica. En ciertas realizaciones, el procedimiento es un procedimiento para prevenir o retrasar la transición de una afección pre-Alzheimer cognitivamente asintomática a una disfunción cognitiva de pre-Alzheimer. En ciertas realizaciones, el procedimiento es un procedimiento para prevenir o retrasar la aparición de una disfunción cognitiva de pre-Alzheimer. En ciertas realizaciones, el procedimiento comprende mejorar uno o más síntomas de una disfunción cognitiva de pre-Alzheimer. En ciertas realizaciones, el procedimiento comprende prevenir o retrasar la progresión de una disfunción cognitiva de pre-Alzheimer a la enfermedad de Alzheimer. En ciertas realizaciones, el sujeto exhibe positividad de biomarcador de A β en un sujeto humano clínicamente normal de 50 años o más, o 55 o más, o 60 o más, o 65 o más, o 70 o más, o 75 o más, u 80 o más. En ciertas realizaciones, el sujeto exhibe amiloidosis cerebral asintomática. En ciertas realizaciones, el sujeto exhibe amiloidosis cerebral en combinación con neurodegeneración corriente abajo. En ciertas realizaciones, el sujeto exhibe amiloidosis cerebral en combinación con neurodegeneración corriente abajo y deterioro cognitivo/conductual sutil. En ciertas realizaciones, la neurodegeneración corriente abajo está determinada por uno o más marcadores elevados de lesión neuronal seleccionados del grupo que consiste en tau y absorción de FDG. En ciertas realizaciones, la amiloidosis cerebral se determina mediante PET, o análisis de LCR, y/o MRI estructural (sMRI). En ciertas realizaciones, el sujeto es un sujeto diagnosticado con deterioro cognitivo leve. En ciertas realizaciones, el sujeto muestra una clasificación de demencia clínica por encima de cero y por debajo de aproximadamente 1,5. En ciertas realizaciones, el sujeto es humano. En ciertas realizaciones, el sujeto está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene un riesgo familiar de tener la enfermedad de Alzheimer. En ciertas realizaciones, tiene una mutación familiar de la enfermedad de Alzheimer (FAD). En ciertas realizaciones, el sujeto tiene el alelo APOE ϵ 4. En ciertas realizaciones, la administración del ASBI y/o profármaco ASBI retrasa o previene la progresión de MCI a la enfermedad de Alzheimer. En ciertas realizaciones, el sujeto no tiene factores genéticos de riesgo de enfermedad de Parkinson o esquizofrenia. En ciertas realizaciones, no se diagnostica que el sujeto tenga o esté en riesgo de enfermedad de Parkinson o esquizofrenia. En ciertas realizaciones, el sujeto no se diagnostica como en riesgo de una enfermedad o trastorno neurológico distinto de la enfermedad de Alzheimer. En ciertas realizaciones, la administración produce una reducción en el CSF de los niveles de uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en Tau total (tTau), fosfo-Tau (pTau), APPneo, A β 40 soluble, relación pTau/A β 42 y tTau/A β 42, y/o un aumento en el CSF de los niveles de uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en relación A β 42/A β 40, relación A β 42/A β 38, sAPP α , relación sAPP α /sAPP β , relación sAPP α /A β 40, y relación sAPP α /A β 42. En ciertas realizaciones, la administración produce una reducción de la carga de placa en el cerebro del sujeto. En ciertas realizaciones, la administración produce una reducción en la tasa de formación de placa en el cerebro del sujeto. En ciertas realizaciones, la administración produce una mejora en las capacidades cognitivas del sujeto.

- 60 En diversas realizaciones, se proporcionan procedimientos para mejorar uno o más síntomas de la enfermedad de Alzheimer, y/o revertir la enfermedad de Alzheimer, y/o reducir la tasa de progresión de la enfermedad de Alzheimer. Los procedimientos típicamente comprenden administrar a un sujeto que lo necesite (o hacer que se administre) un inhibidor de BACE específico de APP (ASBI) y/o un profármaco de ASBI en una cantidad suficiente para mejorar uno o más síntomas de la enfermedad de Alzheimer, y/o para revertir la enfermedad de Alzheimer y/o reducir la tasa de progresión de la enfermedad de Alzheimer. En ciertas realizaciones, el ASBI y/o profármaco ASBI comprende un

flavonoide ASBI y/o un profármaco ASBI como se describe en la presente memoria (por ejemplo, como se describe anteriormente). En ciertas realizaciones, el ASBI es galangina y/o el profármaco ASBI es un profármaco de galangina (por ejemplo, un profármaco que se muestra en la Figura 1 y/o la Figura 2). En ciertas realizaciones, el profármaco ASBI y/o ASIB se administra en una formulación farmacéutica en la que el ASBI y/o profármaco ASBI es el componente activo principal. En ciertas realizaciones, el ASBI y/o profármaco ASBI se administra en una formulación farmacéutica en la que el ASBI y/o profármaco ASBI es el único componente farmacéuticamente activo. En ciertas realizaciones, el ASBI y/o profármaco ASBI se administra en una formulación farmacéutica, no se proporciona ningún otro componente para la actividad neurofarmacológica o neuropsiquiátrica. En ciertas realizaciones, el sujeto es un humano (o un mamífero no humano). En ciertas realizaciones, el sujeto es un humano de 50 años o más, o 55 o más, o 60 o más, o 65 o más, o 70 o más, o 75 o más, u 80 o más. En ciertas realizaciones, el sujeto es diagnosticado con enfermedad de Alzheimer en etapa temprana. En ciertas realizaciones, el sujeto es diagnosticado con la enfermedad de Alzheimer en etapa intermedia. En ciertas realizaciones, el sujeto es diagnosticado con enfermedad de Alzheimer en etapa tardía. En ciertas realizaciones, la administración reduce la gravedad de la enfermedad de Alzheimer. En ciertas realizaciones, la administración mejora uno o más síntomas de la enfermedad de Alzheimer. En ciertas realizaciones, la administración reduce la tasa de progresión de la enfermedad de Alzheimer. En ciertas realizaciones, la administración da como resultado una reducción en el CSF de los niveles de uno o más componentes seleccionados del 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 CSF de los niveles de uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en relación A β 42/A β 40, relación A β 42/A β 38, sAPP α , relación sAPP α /sAPP β , relación sAPP α /A β 40 y relación sAPP α /A β 42, es un procedimiento para prevenir o retrasar la transición de una afección de pre-Alzheimer cognitivamente asintomática a una disfunción cognitiva de pre-Alzheimer. En ciertas realizaciones, la administración produce una reducción de la carga de placa en el cerebro del sujeto. En ciertas realizaciones, la administración produce una reducción en la tasa de formación de placa en el cerebro del sujeto. En ciertas realizaciones, la administración produce una mejora en las capacidades cognitivas del sujeto. En ciertas realizaciones, la administración produce una mejora en, una estabilización de, o una reducción en la tasa de disminución de la clasificación de demencia clínica (CDR) del sujeto. En ciertas realizaciones, el sujeto es un humano y dicha administración produce una mejora percibida en la calidad de vida por el humano. En ciertas realizaciones, la administración da como resultado una reducción de la amiloidosis cerebral y/o neurodegeneración corriente abajo. En ciertas realizaciones, la neurodegeneración corriente abajo está determinada por uno o más marcadores de lesión neuronal seleccionados del grupo que consiste en tau, captación de FDG, disminución en sAPP α , aumento en sAPP β y A β . En ciertas realizaciones, la amiloidosis cerebral se determina mediante PET, análisis de CSF y MRI estructural (sMRI). En ciertas realizaciones, el sujeto muestra una clasificación de demencia clínica indicativa de la enfermedad de Alzheimer. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene un riesgo familiar de tener la enfermedad de Alzheimer. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene una mutación familiar de la enfermedad de Alzheimer (FAD). En ciertas realizaciones, el sujeto tiene el alelo APOE ϵ 4. En ciertas realizaciones, el sujeto no tiene factores genéticos de riesgo de enfermedad de Parkinson o esquizofrenia. En ciertas realizaciones, no se diagnostica que el sujeto tenga o esté en riesgo de enfermedad de Parkinson o esquizofrenia. En ciertas realizaciones, el sujeto no tiene una enfermedad o trastorno neurológico distinto de la enfermedad de Alzheimer. En ciertas realizaciones, no se diagnostica que el sujeto tenga o esté en riesgo de una enfermedad o trastorno neurológico distinto de la enfermedad de Alzheimer. En ciertas realizaciones, el ASBI y/o profármaco ASBI se administra a través de una ruta seleccionada del grupo que consiste en administración oral, administración isofóretica, suministro transdérmico, administración parenteral, administración por aerosol, administración a través de inhalación, administración intravenosa, administración subcutánea, administración tópica al ojo, inyección intraocular y administración rectal. En ciertas realizaciones, el ASBI y/o profármaco ASBI se formula para la administración a través de una ruta seleccionada del grupo que consiste en administración oral, administración isofóretica, suministro transdérmico, administración parenteral, administración por aerosol, administración a través de inhalación, administración intravenosa y administración rectal. En ciertas realizaciones, el ASBI y/o profármaco ASBI se administra por vía oral. En ciertas realizaciones, la administración es durante un período de al menos tres semanas, o durante un período de al menos 6 meses, o durante un período de al menos un año. En ciertas realizaciones, un inhibidor de la acetilcolinesterasa (por ejemplo, tacrinepidacrina, galantamina, donepezil, icopezil, zanapezil, rivastigmina, Namenda, huperzina A, fenserina, fisostigmina, neostigmina, piridostigmina, ambenonio, demarcarium, edrofonium, ladostigil y ungeremina, metrifonato, y similares) no se administra junto con dicho ASBI y/o profármaco ASBI. En ciertas realizaciones, el ASBI y/o profármaco ASBI se administra a través de una ruta seleccionada del grupo que consiste en administración oral, administración isofóretica, suministro transdérmico, suministro parenteral, administración en aerosol, administración a través de inhalación, administración intravenosa y administración rectal.

En diversas realizaciones, se proporcionan procedimientos para ralentizar la progresión, detener o revertir la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y/o el glaucoma en un mamífero. Los procedimientos típicamente implican administrar al mamífero un ASBI y/o un profármaco ASBI en una cantidad suficiente para retrasar la progresión, detener o revertir, y/o mejorar uno o más síntomas y/o marcadores de dicha DMAE y/o glaucoma. En ciertas realizaciones, el ASBI y/o profármaco ASBI comprende un flavonoide ASBI y/o un profármaco ASBI como se describe en la presente memoria (por ejemplo, como se describe anteriormente). En ciertas realizaciones, el ASBI es galangina y/o el profármaco ASBI es un profármaco de galangina (por ejemplo, un profármaco que se muestra en la Figura 1 y/o la Figura 2). En ciertas realizaciones, el ASBI y/o profármaco ASBI se administra a través de una ruta seleccionada del grupo que consiste en administración oral, administración

isoforética, suministro transdérmico, administración parenteral, administración por aerosol, administración a través de inhalación, administración intravenosa, administración subcutánea, administración tópica al ojo, inyección intraocular y administración rectal. En ciertas realizaciones, el ASBI y/o profármaco ASBI se formula para la administración a través de una ruta seleccionada del grupo que consiste en administración oral, administración isoforética, suministro transdérmico, administración parenteral, administración de aerosol, administración por inhalación, administración intravenosa y administración rectal. En ciertas realizaciones, el ASBI y/o profármaco ASBI se administra al ojo (por ejemplo, mediante gotas para los ojos, inyección intraocular y similares). En ciertas realizaciones, la administración es durante un período de al menos tres semanas, o durante un período de al menos 6 meses, o durante un período de al menos un año.

10 Definiciones

En general, la referencia a un determinado elemento tal como el hidrógeno o H debe incluir todos los isótopos de ese elemento. Por ejemplo, si un grupo R se define por incluir hidrógeno o H, también incluye deuterio y tritio. Por consiguiente, los compuestos marcados isotópicamente están dentro del ámbito de esta invención.

En general, "sustituido" se refiere a un grupo orgánico como se define a continuación (por ejemplo, un grupo alquilo) en el que uno o más enlaces a un átomo de hidrógeno contenido en el mismo se reemplazan por un enlace a átomos que no son de hidrógeno o que no son carbono. Los grupos sustituidos también incluyen grupos en los que uno o más enlaces a un átomo de carbono(s) o hidrógeno(s) se reemplazan por uno o más enlaces, incluidos enlaces dobles o triples, a un heteroátomo. Por lo tanto, un grupo sustituido estará sustituido con uno o más sustituyentes, a menos que se especifique otra cosa. En algunas realizaciones, un grupo sustituido está sustituido con 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituyentes. Ejemplos de grupos sustituyentes incluyen: halógenos (es decir, F, Cl, Br e I); hidroxilos; grupos alcoxi, alquenoxi, alquinoxil, ariloxil, aralquiloxi, heterociclioxil y heterociclihalcoxi; carbonilos (oxo); carboxilos; ésteres; uretanos; oximas; hidroxilaminas; alcoxiaminas; aralcoxiaminas; tioles; sulfuros; sulfóxidos; sulfonas; sulfonilos; sulfonamidas; aminas; N-óxidos; hidrazinas; hidrazidas; hidrazonas; azidas; amidas; ureas amidinas; guanidinas; enaminas; imidas; isocianatos; isotiocianatos; cianatos; tiocianatos; iminas grupos nitro; nitrilos (es decir, CN) y similares.

El término "alquilo" se refiere a y cubre todos y cada uno de los grupos que se conocen como alquilo normal, alquilo de cadena ramificada, cicloalquilo y también cicloalquil-alquilo. Los grupos alquilo ilustrativos incluyen, pero no se limitan a metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, t-butilo, octilo y decilo. El término "cicloalquilo" se refiere a grupos hidrocarbilo saturados cíclicos, incluidos los policíclicos. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a ciclopentilo, ciclohexilo, dicitlopentilo, norbornilo, octahidronaptilo y espiro[3.4]octilo. En ciertas realizaciones, los grupos alquilo contienen 1-12 átomos de carbono (alquilo C₁₋₁₂), o 1-9 átomos de carbono (alquilo C₁₋₉), o 1-6 átomos de carbono (alquilo C₁₋₆), o 1-5 carbonos átomos (alquilo C₁₋₅), o átomos de carbono (alquilo C₁₋₄), o 1-3 átomos de carbono (alquilo C₁₋₃), o 1-2 átomos de carbono (alquilo C₁₋₂).

A modo de ejemplo, el término "grupo alquilo C₁₋₆" se refiere a un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, y puede ejemplificarse por un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-butilo, un grupo isobutilo, un grupo tert-butilo, un grupo sec-butilo, un grupo n-pentilo, un grupo tert-amilo, un grupo 3-metilbutilo, un grupo neopentilo y un grupo n-hexilo.

El término "alcoxi" como se usa en la presente memoria significa un grupo alquilo unido a través de un único átomo de oxígeno terminal. Un grupo "alcoxi" puede representarse como -O-alquilo en el que alquilo es como se definió anteriormente. El término "ariloxi" se usa de manera similar, y puede representarse como -O-arilo, con arilo como se define a continuación. El término "hidroxi" se refiere a -OH.

De manera similar, el término "alquiltio" como se usa en la presente memoria significa un grupo alquilo unido a través de un único átomo de azufre terminal. Un grupo "alquiltio" puede representarse como -S-alquilo en el que alquilo es como se definió anteriormente. El término "ariltio" se usa de manera similar, y puede representarse como -S-arilo, con arilo como se define a continuación. El término "mercapto" se refiere a --SH.

Los grupos arilo son hidrocarburos aromáticos cíclicos que no contienen heteroátomos. Los grupos arilo incluyen sistemas de anillos monocíclicos, bicíclicos y policíclicos. Por lo tanto, los grupos arilo incluyen, pero no se limitan a, grupos fenilo, azulenilo, heptalenilo, bifenilenilo, indacenilo, fluorenilo, fenantrenilo, trifenilenilo, pirenilo, naftacenilo, crisenilo, bifenilo, antracenilo, indenilo, indanilo, pentalenilo y naftilo. En algunas realizaciones, los grupos arilo contienen 6-14 carbonos, y en otros de 6 a 12 o incluso 6-10 átomos de carbono en las porciones de anillo de los grupos. Aunque la expresión "grupos arilo" incluye grupos que contienen anillos fusionados, tales como sistemas de anillos aromáticos alifáticos fusionados (por ejemplo, indanilo, tetrahidronaftilo y similares), no incluye grupos arilo que tienen otros grupos, tales como grupos alquilo o halo, unido a uno de los miembros del anillo. Por el contrario, los grupos tales como el toluilo se denominan grupos arilo sustituidos. Los grupos arilo sustituidos representativos pueden estar monosustituidos o sustituidos más de una vez. Por ejemplo, los grupos arilo monosustituidos incluyen, pero no se limitan a, grupos fenilo o naftilo sustituidos con 2, 3, 4, 5 o 6, que pueden estar sustituidos con sustituyentes tales como los listados anteriormente.

El término "grupo heteroarilo" se refiere a un grupo heterocíclico aromático monocíclico o de anillo condensado que contiene uno o más heteroátomos seleccionados de O, S y N. Si el grupo heterocíclico aromático tiene un anillo

condensado, puede incluir un grupo monocíclico parcialmente hidrogenado. Ejemplos de tal grupo heteroarilo incluyen un grupo pirazolilo, un grupo tiazolilo, un grupo isotiazolilo, un grupo tiadiazolilo, un grupo imidazolilo, un grupo furilo, un grupo tienilo, un grupo oxazolilo, un grupo isoxazolilo, un grupo pirrolilo, un grupo imidazolilo, un grupo (1,2,3)- y (1,2,4)-triazolilo, un grupo tetrazolilo, un grupo piranilo, un grupo piridilo, un grupo pirimidinilo, un grupo pirazinilo, un grupo piridazinilo, un grupo quinolilo, un grupo isoquinolilo, un grupo benzofuranilo, un grupo isobenzofuranilo, un grupo indolilo, un grupo isoindolilo, un grupo indazolilo, un grupo benzoimidazolilo, un grupo benzotriazolilo, un grupo benzoxazolilo, un grupo benzotiazolilo, un grupo benzo [b]tiofenilo, un grupo tieno[2,3-b]tiofenilo, un grupo (1,2)- y (1,3)-benzoxatiol, un grupo cromenilo, un grupo 2-oxocromenilo, un grupo benzotiadiazolilo, un grupo quinolizinilo, un grupo ftalazinilo, un grupo naftiridinilo, un grupo quinoxalinilo, un grupo quinazolinilo, un grupo cinolinilo y un grupo carbazolilo.

Un "derivado" de un compuesto significa un compuesto modificado químicamente en el que la modificación química tiene lugar en uno o más grupos funcionales del compuesto. Sin embargo, se espera que el derivado retenga o mejore la actividad farmacológica del compuesto del cual se deriva.

Como se usa en la presente memoria, "administrar" se refiere a la administración local y sistémica, por ejemplo, que incluye la administración enteral, parenteral, pulmonar y tópica/transdérmica. Rutas de administración para agentes (por ejemplo, ASBI tales como galangina, rutina y análogos, derivados o profármacos de los mismos, o tautómeros o estereoisómeros de los mismos, o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de dichos ASBI, dichos estereoisómeros, o dichos tautómeros, o análogos, derivados o profármacos de los mismos) que encuentran uso en los procedimientos descritos en la presente memoria incluyen, por ejemplo, administración oral (*por os* (po)), administración nasal o inhalación, administración como un supositorio, contacto tópico, suministro transdérmico (por ejemplo, a través de un parche transdérmico), administración intratecal (IT), administración intravenosa ("iv"), administración intraperitoneal ("ip"), administración intramuscular ("im"), administración intralesional, o administración subcutánea ("sc"), o la implantación de un dispositivo de liberación lenta, por ejemplo, una minibomba osmótica, una formulación de depósito, etc., a un sujeto. La administración puede ser por cualquier ruta, incluida la parenteral y la transmucosa (por ejemplo, oral, nasal, vaginal, rectal o transdérmica). La administración parenteral incluye, por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular, ionofórica e intracraneal. Otros modos de suministro incluyen, pero no se limitan a, el uso de formulaciones liposomales, infusión intravenosa, parches transdérmicos, etc.

Los términos "administración sistémica" y "administrado sistémicamente" se refieren a un procedimiento para administrar los agentes descritos en la presente memoria o la composición a un mamífero para que los agentes o composiciones se suministren a sitios en el cuerpo, incluido el sitio objetivo de acción farmacéutica, a través del sistema circulatorio. La administración sistémica incluye, pero no se limita a, administración oral, intranasal, rectal y parenteral (por ejemplo, que no sea a través del tracto alimentario, tal como la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, transdérmica y subcutánea).

El término "coadministración" o "administración concurrente" o "administración en conjunto con" cuando se usa, por ejemplo con respecto a los agentes activos descritos en este documento, por ejemplo, ASBIs tales como galangina, rutina y análogos, derivados o profármacos de los mismos) y un segundo agente activo (por ejemplo, un potenciador de la cognición), se refiere a la administración del agente o agentes y/o el segundo agente activo de tal manera que ambos puedan lograr simultáneamente un efecto fisiológico. Los dos agentes, sin embargo, no necesitan administrarse juntos. En ciertas realizaciones, la administración de un agente puede preceder 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 ciertas realizaciones, la coadministración típicamente da como resultado que ambos agentes estén presentes simultáneamente en el cuerpo (por ejemplo, en el plasma) en una fracción significativa (por ejemplo, 20 % o más, preferiblemente 30 % o 40 % o más, más preferiblemente 50 % o 60 % o más, lo más preferiblemente 70 % u 80 % o 90 % o más) de su concentración sérica máxima para cualquier dosis dada.

El término "cantidad efectiva" o "cantidad farmacéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad y/o dosificación, y/o régimen de dosificación de uno o más agentes necesarios para lograr el resultado deseado, por ejemplo, una cantidad suficiente para mitigar en mamífero uno o más síntomas asociados con deterioro cognitivo leve (MCI), o una cantidad suficiente para disminuir la gravedad o retrasar la progresión de una enfermedad caracterizada por depósitos amiloides en el cerebro en un mamífero (por ejemplo, cantidades terapéuticamente efectivas), una cantidad suficiente para reducir el riesgo o retrasar la aparición, y/o reducir la gravedad final de una enfermedad caracterizada por depósitos de amiloide en el cerebro en un mamífero (por ejemplo, cantidades profilácticamente efectivas).

La expresión "hacer que sea administrado" 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 en cuestión al sujeto. Hacer que se administre puede implicar el diagnóstico y/o la determinación de un régimen terapéutico o profiláctico apropiado, y/o la prescripción de agentes particulares para un sujeto. Tal prescripción puede incluir, por ejemplo, redactar un formulario de prescripción, anotar un registro médico y similares.

Como se usa en este documento, los términos "tratar" y "tratamiento" se refieren a retrasar el inicio de, retrasar o revertir el progreso de, reducir la gravedad de, o aliviar o prevenir la enfermedad o afección a la que se aplica el término, o uno o más síntomas de tal 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 en la tasa o retraso del inicio o la gravedad de uno o más síntomas de esa patología o enfermedad, y/o la prevención de esa patología o enfermedad. En ciertas realizaciones, la reducción o eliminación de uno o más síntomas de patología o enfermedad puede incluir, pero no se limita a, 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 CSF de los niveles de uno o más componentes seleccionados del 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, 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 (CDR)).

Como se usa en la presente memoria, la expresión "que consiste esencialmente en" se refiere a los géneros o especies de agentes farmacéuticos activos citados en un procedimiento o composición, y además puede incluir otros agentes que, por sí solos, no tienen una actividad sustancial para la indicación o el propósito citados. En algunas realizaciones, la expresión "que consiste esencialmente en" excluye expresamente la inclusión de uno o más agentes adicionales que tienen actividad neurofarmacológica distinta de los agentes mencionado (por ejemplo, diferentes de ASBI tales como galangina, rutina y análogos, derivados o profármacos de los mismos). En algunas realizaciones, la expresión "que consiste esencialmente en" excluye expresamente la inclusión de uno o más agentes activos adicionales distintos de los agentes activos descritos en la presente memoria (por ejemplo, diferentes de ASBI tales como galangina, rutina y análogos, derivados o profármacos de los mismos). En algunas realizaciones, la expresión "que consiste esencialmente en" excluye expresamente la inclusión de uno o más inhibidores de acetilcolinaesterasa.

Los términos "sujeto", "individuo" y "paciente" se refieren indistintamente a un mamífero, preferiblemente 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, un hombre adulto, una mujer adulta, un hombre adolescente, una mujer adolescente, un niño, una niña) bajo el cuidado de un médico u otro trabajador de la salud en un hospital, centro de atención psiquiátrica, como paciente externo u otro contexto clínico. En ciertas realizaciones, el sujeto puede no estar bajo el cuidado o la prescripción de un médico u otro trabajador de la salud.

El término "formulación" o "formulación de fármaco" o "forma de dosificación" o "formulación farmacéutica" como se usa en la presente memoria se refiere a una composición que contiene al menos un agente terapéutico o medicamento para administración a un sujeto. En ciertas realizaciones, la forma de dosificación comprende una "formulación" o "formulación de fármaco" dada y puede administrarse a un paciente en forma de pastilla, píldora, comprimido, cápsula, supositorio, membrana, tira, líquido, parche, película, gel, spray u otra forma.

El término "membrana mucosa" se refiere generalmente a cualquiera de las membranas biológicas recubiertas de moco en el cuerpo. En ciertas realizaciones, los agentes activos descritos en la presente memoria pueden administrarse en la presente memoria a través de cualquier membrana mucosa encontrada en el cuerpo, que incluye, pero no se limita a, mucosa bucal, perlingual, nasal, sublingual, pulmonar, rectal y vaginal. La absorción a través de las membranas mucosas de la cavidad oral y las del intestino son de interés. Por lo tanto, la absorción peroral, bucal, sublingual, gingival y palatina se contempla en la presente memoria.

El término suministro "transmucosa" de un fármaco y similares pretende abarcar todas las formas de administración por toda o a través de una membrana mucosa.

El término "bioadhesión" como se usa en la presente memoria se refiere al proceso de adhesión de las formas de dosificación a una superficie biológica, por ejemplo, membranas mucosas.

"Suministro controlado de fármaco" se refiere a la liberación o administración de un fármaco desde una forma de dosificación dada de manera controlada para lograr el perfil farmacocinético deseado *in vivo*. Un aspecto del suministro "controlado" de fármacos es la capacidad de manipular la formulación y/o la forma de dosificación para establecer la cinética deseada de liberación del fármaco.

"Suministro sostenido de fármacos" se refiere a la liberación o administración de un fármaco desde una fuente (por ejemplo, una formulación de fármaco) de manera sostenida durante un período de tiempo prolongado pero específico, que puede extenderse de varios minutos a unas pocas horas, días, semanas o meses. En diversas realizaciones, el término "sostenido" se usará para referirse al suministro de niveles consistentes y/o sustancialmente constantes de fármaco durante un período de tiempo que varía de unos pocos minutos a un día, con un perfil caracterizado por la ausencia de una fase de liberación inmediata, tal como el obtenido de la administración IV.

El término " $T_{m\acute{a}x}$ " como se usa en la presente memoria significa el punto de tiempo de la concentración plasmática máxima observada.

El término " $C_{m\acute{a}x}$ " como se usa en la presente memoria significa la concentración plasmática máxima observada.

5 El término "plasma $t_{1/2}$ " como se usa en la presente memoria significa la "semivida plasmática observada" y representa el tiempo requerido para que la concentración plasmática del fármaco alcance el 50 % de su valor máximo ($C_{m\acute{a}x}$). Esto facilita la determinación de la duración media de los efectos farmacológicos. Además, facilita las comparaciones directas y significativas de la duración de diferentes artículos de prueba después del suministro a través de la misma o diferentes rutas.

10 El término "Relación de Direccionamiento Terapéutico óptimo" u "OTTR" representa el tiempo promedio que el fármaco está presente a niveles terapéuticos, definido como el tiempo dentro del cual la concentración plasmática del fármaco se mantiene por encima del 50 % de la $C_{m\acute{a}x}$ normalizada por la semivida de eliminación del fármaco multiplicada por la relación de la $C_{m\acute{a}x}$ obtenida en la forma de dosificación de interés sobre la $C_{m\acute{a}x}$ después de la administración IV de dosis equivalentes y se calcula mediante la fórmula:

$$\text{OTTR} = (C_{m\acute{a}x}^{IV} / C_{m\acute{a}x}) \times (\text{Dosis} / \text{Dosis}^{IV}) (\text{Tiempo por encima del 50\% de } C_{m\acute{a}x}) / (\text{Semivida de eliminación terminal}^{IV} \text{ del fármaco}).$$

15 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la estructura de rutina, galangina y progalangina-1.

La figura 2 ilustra galangina y diversas pro-galantinas.

20 La Figura 3A ilustra la identificación de Rutina en el ensayo AlphaLisa como se muestra en el diagrama de dispersión del cribado de una pequeña biblioteca clínica. La figura 3B ilustra esquemáticamente el ensayo primario AlphaLisa utilizado para la detección de la escisión de BACE de MBP-C125.

La Figura 4 muestra los resultados del cribado de una familia de bioflavonoides en la escisión MBP-C125 y P5-P5' por BACE para identificar ASBIs.

La Figura 5A muestra la inhibición de sAPPp en SH-SY5Y por rutina y galangina. 5B muestra la unión de galangina a fragmentos de APP por resonancia de plasmón de superficie (SPR).

25 La Figura 6A muestra que la galangina inhibe la producción de β -CTF. Las células de Ovario de Hámster Chino (CHO) que sobreexpresaron de manera estable la APP humana se trataron con Galangina 10 μ M o DMSO durante 24 h, luego se recolectaron los lisados celulares y los medios condicionados. La inmunotransferencia Western detectó los niveles de APP de longitud completa y β -CTF en los lisados celulares y los niveles de sAPP α en los medios condicionados. La Fig. 6B muestra que la galangina no inhibe la escisión de BACE1 de la neuregulina1. La escisión dependiente de BACE1 de SEAP-NRG1- β 1 se evaluó mediante ensayos SEAP con sobrenadantes de células 293 (HEK293) de riñón embrionario humano de control (SEAP-NRG1- β 1) o células HEK293 que coexpresan BACE1 (SEAP-NRG1- β 1+BACE1), tratados con DMSO o Galangina (10 μ M). Se midió un aumento en el desprendimiento de la proteína de fusión SEAP-NRG1-b1 tras la coexpresión de BACE1. El derramamiento en las células que coexpresan no fue desprendido por Galangina. Las barras de error indican SEM. (N.S., $p > 0,05$; $n = 4$, prueba t de Student).

30

35

Las Figuras 7A y 7B ilustran la inhibición de la transactivación de APP-Gal4 y APLP2-Gal4 por galangina. Fig. 7A: Se logró la transactivación potencial de la transcripción con APP fusionada al dominio de unión al ADN de Gal4 cuando estaban presentes tanto Mint3 como TAZ. Esta transactivación fue inhibida por Galangina e inhibidor de BACE IV. Fig. 7B: La transactivación potencial de la transcripción también se logró con APLP2 fusionado al dominio de unión al ADN de Gal4 cuando estaban presentes tanto Mint3 como TAZ. Esta transactivación fue inhibida por Galangina e inhibidor de BACE IV. Los diagramas muestran experimentos en los que las células se cotransfectaron con un plásmido indicador de Gal4-luciferasa (para medir la transactivación), un plásmido de β -galactosidasa (para normalizar la eficacia de la transfección) y los plásmidos de prueba (Mint3, TAZ y APP-Gal4 o APLP2 -Gal4). La actividad de luciferasa normalizada se expresa como un porcentaje del control tratado con DMSO (Figs. 7A, 7B). Las barras de error indican SEM. (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; $n = 3$, prueba de la t de Student).

40

45

La figura 8 ilustra la farmacocinética de galangina y progalangina (PG-1). Los niveles plasmáticos fueron mayores que los niveles de tejido cerebral tanto para galangina como para PG-1, pero los niveles de galangina fueron mucho más altos después de la inyección de PG-1 que la galangina misma.

50

La Figura 9, paneles A-D, muestra los niveles de A β 1-40 y A β 1-42. Los niveles de A β 1-40 fueron ligeramente más bajos en los cerebros de los ratones tratados con galangina (panel A) y A β 1-42 no cambió. Tanto A β 1-40 como A β 1-42 se redujeron ligeramente en los cerebros de ratones tratados con pro-galangina I. A β 1-40 (panel A) baja ligeramente y A β 1-42 (panel B) permanece igual. Tanto A β 1-40 (panel C) como A β 1-42 (panel D) bajan con pro-galangina-1. Para los hermanos solo todos N = 3.

La Figura 10 ilustra un modelo de pinza molecular para la actividad de ASBI.

La Figura 11 ilustra un esquema de síntesis para progalangina (compuesto 2).

Descripción detallada

En ciertas realizaciones, se identifican análogos bioflavonoides que inhiben el procesamiento de APP mediada por β -secretasa mediante un mecanismo novedoso. En particular, se cree que estas moléculas inhiben la escisión de BACE del sustrato de APP MBP-C125, lo que da como resultado la inhibición de la producción de C99 pero no del sustrato del péptido del sitio β (P5-P5'). Además, diversos bioflavonoides y análogos de los mismos identificados en este documento inhiben sAPP β en células SHSY5Y de neuroblastoma. Además, se demostró que la actividad inhibidora está asociada con la unión al sustrato MBP-C125. En consecuencia, estas moléculas parecen ser inhibidores de BACE específicas de APP (ASBI) y proporcionan un nuevo mecanismo para modular el procesamiento de APP. Estos ASBI se pueden usar en el tratamiento y/o profilaxis de patologías caracterizadas por el procesamiento patológico de APP (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, condiciones de pre-Alzheimer tales como MCI o MCI pre-sintomática, y similares).

Los ASBI son al menos selectivos y parecen ser específicos para el sustrato de APP y se cree que muestran menos efectos colaterales no deseados porque los ASBI típicamente no son activos en otros sustratos para la enzima. Con respecto a los inhibidores de la γ -secretasa, los sustratos que no sean APP, tales como Notch, generan preocupación por los posibles efectos colaterales de la inhibición de la γ -secretasa, y el reciente fracaso del inhibidor de la γ -secretasa, semagacestat, sirve para reforzar tales preocupaciones. De manera similar, en el caso de BACE, por ejemplo, la inhibición de sustratos que no son APP tales como PSGL1 o LRP puede producir efectos colaterales adversos. Por lo tanto, el inhibidor óptimo de BACE sería uno que no se uniera a BACE sino a APP, lo que llevaría a la inhibición de BACE específica de APP (ASBI).

Sin estar vinculado a una teoría particular, se cree que tales ASBI interactuarían con APP o el complejo APP-BACE (complejo "inactivo") en la membrana y evitarían su transición al complejo "activo" en los endosomas tempranos, donde a pH < 5 BACE está completamente activo (véase, por ejemplo, Fig. 10). Se ha demostrado que algunos anticuerpos de unión al sitio β bloquean la división de APP por BACE y también funcionan en modelos animales de AD, sin embargo, para un desarrollo farmacéutico efectivo, se prefieren las moléculas orgánicas pequeñas a las biomoléculas relativamente grandes, tales como los anticuerpos.

Los datos descritos en este documento sobre la identificación de los primeros ASBI demuestran que tal enfoque es factible. Los inhibidores de BACE específicos de APP (ASBI) inhiben la escisión de BACE de la proteína precursora amiloide (APP) pero no la escisión proteolítica de otros sustratos. Se cree que tales terapias representan una nueva clase de terapias para la enfermedad de Alzheimer (u otra enfermedad amiloidogénica).

Inicialmente, se cribó una biblioteca clínica de 448 compuestos y este ensayo condujo a la identificación de un único bioflavonoide que inhibía específicamente el sustrato MBP-C125 de BACE mientras que no impide la escisión del sustrato P5-P5'. Este bioflavonoide rutina (véase, por ejemplo, la figura 1) es un suplemento nutricional que también inhibe la sAPP β en las células. Luego se analizó un panel de bioflavonoides en el ensayo ASBI y sAPP β en cultivo celular. Esta prueba identificó un segundo bioflavonoide Galangina (véase, por ejemplo, la Fig. 1) otro suplemento nutricional con uso humano conocido que fue efectivo en el ensayo ASBI y en las células para prevenir la escisión de BACE de APP. También se ha informado que la galangina es un inhibidor de la acetilcolina esterasa (AChE). Utilizando un filtro de nitrocelulosa simple, se demostró la unión inicial en el ensayo de unión al ligando de diversos bioflavonoides al sustrato MBP-C125. Se cribó un panel de bioflavonoides en el ensayo ASBI. Rutina y galangina se identificaron como efectivos en la modulación de los niveles de sAPP β en las células y muestra la unión al sustrato de la APP (véase Ejemplo 1).

Se demostró que los bioflavonoides podrían inhibir la escisión de BACE de APP y APLP2. Un ensayo HEK-293 transfectado con APP o APLP2-Gal4 para obtener estos datos. Este sistema de ensayo está descrito por Orcholski *et al.* (2011) *J. Alzheimers Dis.*, 23 (4): 689-699. La transactivación se logra tras la transfección con Mint3 y Taz. Se esperaba que el ASBI inhibiera solo la transactivación de APP-Gal4, no la de APLP2-Gal4. Para estos experimentos, las células se cotransfectaron con un plásmido informador de Gal4-luciferasa (para medir la transactivación), un plásmido beta-galactosidasa (para normalizar la eficiencia de la transfección), y se identificaron los plásmidos de prueba. La actividad de luciferasa normalizada se expresó como la inducción de plegamiento sobre la transcripción por APP-Gal4 solo (Fig. 7A), o como la inducción de plegamiento sobre APLP2-Gal4 solo (Fig. 7B). Las pruebas preliminares de galangina a 10 μ M en este ensayo mostraron que inhibe APP-Gal4 y APLP2-Gal4.

La evaluación farmacocinética inicial de estos dos bioflavonoides en el ensayo de captación cerebral usando ratones NTg mostró que Rutin no tiene ningún nivel cerebral a 10mpk después de una dosis sc, mientras que Galangina sí

mostró niveles cerebrales significativos (40 ng/g a 1h) permitiendo así su evaluación para estudios de prueba de concepto en el modelo de ratón transgénico (Tg). El tratamiento de los ratones Tg se realizó por ruta sc a 100 mpk durante 5 días. Luego se evaluó el efecto de Galangina sobre sAPPA, y A β 40 y A β 42 (véase Ejemplo 1). La reducción de los niveles de A β fue muy alentadora en este estudio. El aumento adicional en los niveles cerebrales de galangina fue posible usando un profármaco de galangina (véase, por ejemplo, la figura 1).

Los ejemplos proporcionados en la presente memoria indican que ciertos bioflavonoides tienen la capacidad de unirse a APP e inhibir la escisión de BACE de APP y APLP2, por lo tanto, sugieren que son inhibidores de BACE específicos de APP. Estas moléculas representan una nueva clase de terapéutica para la enfermedad de Alzheimer que carecería de la toxicidad potencial a partir de la inhibición directa de BACE. También se demostró que Galangina es eficaz para reducir A β 40 y A β 42 en el modelo de ratón AD.

Si bien Rutin no fue eficaz en el modelo de ratón, se cree que esto se debe a la dificultad para pasar la barrera hematoencefálica. Sin embargo, esto no significa que rutina y sus derivados o análogos no sean adecuados para su uso en los procedimientos descritos en este documento. Los expertos en la técnica conocen numerosos procedimientos para transportar una molécula a través de la barrera hematoencefálica y/o para eludir la barrera hematoencefálica.

Típicamente, los mecanismos para el direccionamiento de fármacos en el cerebro implican ya sea pasar "a través" o "detrás" de la BBB. En diversas realizaciones, las modalidades para el suministro de fármacos a través de la BBB conlleva su interrupción por medios osmóticos; bioquímicamente mediante el uso de sustancias vasoactivas tales como la bradiquinina; o incluso por exposición localizada a ultrasonido focalizado de alta intensidad (HIFU) (véase, por ejemplo, McDannold *et al.* (2008) *Ultrasound in Medicine and Biology*, 34 (5): 834-840). Otros procedimientos utilizados para atravesar la BBB puede conllevar el uso de sistemas de transporte endógeno, incluidos los transportadores mediados por portadores, tales como los portadores de glucosa y aminoácidos; transcitosis mediada por receptor; y el bloqueo de los transportadores de flujo activos, tales como la p-glicoproteína. Los procedimientos para el suministro de fármacos detrás de la BBB también incluyen implantación intracerebral (tal como con agujas) y distribución mejorada por convección. En ciertas realizaciones, se puede usar mMannitol para evitar la BBB. Las nanopartículas también pueden ayudar en la transferencia de medicamentos a través de la BBB (véase, por ejemplo, Silva, (2008). *BMC Neuroscience*, 9: S4, y similares).

En vista del descubrimiento de la actividad del ASBI en Galangina y Rutin, se cree que existe una actividad similar en varios análogos de bioflavonoides adicionales descritos en la presente memoria. La actividad ASBI particular de cualquiera de estos análogos se puede confirmar fácilmente además usando, por ejemplo, los ensayos descritos anteriormente e ilustrados en los Ejemplos proporcionados en la presente memoria.

La escisión secuencial de APP por proteasas β -secretasa y γ -secretasa unidas a la membrana da como resultado la formación de A β . La enzima de escisión de APP de sitio β -1 (BACE1) se identificó como la principal actividad de secretasa β que media la primera escisión de APP en la ruta de β -amiloidogénica. En vista de la capacidad de los compuestos ASBI descritos en la presente memoria para bloquear específicamente la actividad de BACE1 en APP, se cree (y los datos presentados en la presente memoria muestran) que estos compuestos ASBI pueden reducir los niveles de A β o prevenir la formación de las especies A β neurotóxicas. Por consiguiente, se cree que estos compuestos previenen o retrasan la progresión de la enfermedad y/o previenen o retrasan la progresión de manifestaciones preclínicas de la ruta de la enfermedad amiloidogénica.

Por consiguiente, se cree que estos agentes pueden usarse para prevenir o retrasar la aparición de una disfunción cognitiva pre-Alzheimer, y/o para mejorar uno o más síntomas de una disfunción cognitiva pre-Alzheimer, y/o para prevenir o retrasar la progresión de una afección pre-Alzheimer o disfunción cognitiva a la enfermedad de Alzheimer, y/o para promover el procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP) por la ruta no amiloidogénica. En ciertas realizaciones, estos agentes se pueden usar en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (por ejemplo, para disminuir la gravedad de la enfermedad y/o para mejorar uno o más síntomas de la enfermedad, y/o para retrasar la progresión de la enfermedad).

Procedimientos terapéuticos y profilácticos.

En diversas realizaciones, se proporcionan procedimientos terapéuticos y/o profilácticos que utilizan los agentes activos, (por ejemplo, ASBI tales como galangina, rutina y análogos, derivados o profármacos de los mismos, o tautómeros o estereoisómeros de los mismos, o se proporcionan sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de tales ASBI, dichos estereoisómeros, o dichos tautómeros, o análogos, derivados o profármacos de los mismos). Típicamente, los procedimientos implican administrar uno o más agentes activos a un sujeto (por ejemplo, a un humano que lo necesite) en una cantidad suficiente para obtener el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

Profilaxis

En ciertas realizaciones, los agentes activos, (por ejemplo, ASBI tales como galangina, rutina y análogos, derivados o profármacos de los mismos, o tautómeros o estereoisómeros de los mismos, o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de dichos ASBI, dichos estereoisómeros, o dichos tautómeros, o análogos, derivados o profármacos de los mismos) se utilizan en diversos contextos profilácticos. Así, por ejemplo, en ciertas realizaciones, los agentes

activos pueden usarse para prevenir o retrasar la aparición de una disfunción cognitiva pre-Alzheimer y/o para mejorar uno o más síntomas de una afección pre-Alzheimer y/o disfunción cognitiva, y/o para prevenir o retrasar la progresión de una afección pre-Alzheimer y/o disfunción cognitiva a la enfermedad de Alzheimer.

5 Por consiguiente, en ciertas realizaciones, los procedimientos profilácticos descritos en la presente memoria se contemplan para sujetos identificados como "en riesgo" y/o que tienen evidencia de cambios patológicos tempranos de la enfermedad de Alzheimer (AD), pero quienes no cumplen los criterios clínicos para MCI o demencia. Sin limitarse a una teoría particular, se cree que incluso esta etapa "preclínica" de la enfermedad representa una
10 continuidad en individuos completamente asintomáticos con evidencia de biomarcadores que sugieren procesos fisiopatológicos AD (abreviados como AD-P, véase, por ejemplo, Sperling et al. (2011) *Alzheimer's & Dementia*, 1-13) en riesgo de progresión a demencia por AD a individuos con biomarcadores positivos quienes ya están demostrando una disminución muy sutil pero que aún no cumplen con los criterios estandarizados para MCI (véase, por ejemplo, Albert et al. (2011) *Alzheimer's and Dementia*, 1-10 (doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.008).

15 Este último grupo de individuos podría clasificarse como "No normal, no MCI", pero podría denominarse "pre-sintomático" o "preclínico" o "asintomático" o "premanifiesto"). En diversas realizaciones, este continuo de AD pre-sintomática también puede abarcar (1) individuos que portan uno o más alelos de apolipoproteína E (APOE) $\epsilon 4$ que se sabe o se cree que tienen un mayor riesgo de desarrollar demencia por AD, en el momento en que son positivos en biomarcador de AD-P, y (2) portadores de mutaciones autosómicas dominantes, que se encuentran en la etapa presintomática de positivos en biomarcador de su enfermedad, y quienes casi con certeza manifestarán síntomas clínicos y progresarán a demencia.

20 Se ha propuesto un modelo de biomarcadores en el que los biomarcadores de AD-P más ampliamente validados se vuelven anormales y también alcanzan un techo de manera ordenada (véase, por ejemplo, Jack et al. (2010) *Lancet NeuroL*, 9: 119-128.). Este modelo de biomarcador es paralelo a la secuencia fisiopatológica propuesta de (pre-AD/AD), y es relevante para el seguimiento de las etapas preclínicas (asintomáticas) de AD (véase, por ejemplo, Figura 3 en Sperling et al. (2011) *Alzheimer & Dementia*, 1-13) Los biomarcadores de la amiloidosis cerebral incluyen, pero no se limitan a, reducciones en CSF $A\beta_{42}$ y una mayor retención del rastreador amiloide en la
25 generación de imágenes por tomografía por emisión de positrones (PET). La tau elevada del CSF no es específica de la AD y se cree que es un biomarcador de lesión neuronal. La disminución de la captación de fluorodeoxiglucosa 18F (FDG) en PET con un patrón temporoparietal de hipometabolismo es un biomarcador de la disfunción sináptica relacionada con AD. La atrofia cerebral en la generación de imágenes por resonancia magnética estructural (MRI) en un patrón característico que involucra los lóbulos temporales mediales, las cortezas paralímbica y temporoparietal es un biomarcador de neurodegeneración relacionada con AD. Otros marcadores incluyen, pero no se limitan a, MRI volumétrica, FDG-PET o biomarcadores de plasma (véase, por ejemplo, Vemuri et al. (2009) *Neurology*, 73: 294-301; Yaffe et al. (2011) *JAMA* 305: 261 -266).

35 En ciertas realizaciones, los sujetos adecuados para los procedimientos profilácticos contemplados en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, sujetos caracterizados por tener amiloidosis cerebral asintomática. En diversas realizaciones, estos individuos tienen evidencia de biomarcadores de acumulación de $A\beta$ con retención elevada del rastreador en generación de imágenes amiloides por PET y/o $A\beta_{42}$ baja en el ensayo de CSF, pero típicamente no hay evidencia detectable de alteraciones cerebrales adicionales que sugieran neurodegeneración o sintomatología cognitiva y/o conductual sutil.

40 Se observa que los biomarcadores de $A\beta$ de imágenes de CSF y PET disponibles actualmente proporcionan principalmente evidencia de acumulación y depósito amiloide de formas fibrilares de amiloide. Los datos sugieren que las formas solubles u oligoméricas de $A\beta$ probablemente estén en equilibrio con las placas, que pueden servir como reservorios. En ciertas realizaciones, se contempla que hay una etapa preplaca identificable en la que solo están presentes formas solubles de $A\beta$. En ciertas realizaciones, se contempla que las formas oligoméricas de
45 amiloide pueden ser críticas en la cascada patológica y proporcionar marcadores útiles. Además, los cambios sinápticos tempranos pueden estar presentes antes de la evidencia de acumulación de amiloide.

50 En ciertas realizaciones, los sujetos adecuados para los procedimientos profilácticos contemplados en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, sujetos caracterizados como amiloides positivos con evidencia de disfunción sináptica y/o neurodegeneración temprana. En diversas realizaciones, estos sujetos tienen evidencia de positividad amiloide y presencia de uno o más marcadores de lesión neuronal relacionada con AD-P "corriente abajo". Los marcadores ilustrativos, pero no limitantes, de lesión neuronal incluyen, pero no se limitan a (1) tau o fosfo-tau elevados en CSF, (2) hipometabolismo en un patrón similar a la AD (es decir, cortical cingulado posterior, precuneo y/o temporoparietal) en FDG-PET, y (3) adelgazamiento cortical/pérdida de materia gris en una distribución anatómica específica (es decir, cortical parietal lateral y medial, cingulado posterior y temporal lateral) y/o atrofia del
55 hipocampo en MRI volumétrica. Otros marcadores incluyen, pero no se limitan a, medidas de fMRI de conectividad de red predeterminada. En ciertas realizaciones, la disfunción sináptica temprana, evaluada mediante técnicas de generación de imágenes funcional tales como FDG-PET y fMRI, puede ser detectable antes de la pérdida volumétrica. Sin limitarse a una teoría particular, se cree que los individuos con amiloide positivo con evidencia de neurodegeneración temprana pueden estar más abajo en la trayectoria (es decir, en etapas posteriores de AD preclínica (asintomática)).

60

En ciertas realizaciones, los sujetos adecuados para los procedimientos profilácticos contemplados en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, sujetos caracterizados como amiloides positivos con evidencia de neurodegeneración y deterioro cognitivo sutil. Sin limitarse a una teoría particular, se cree que aquellos individuos con evidencia de biomarcadores de acumulación de amiloide, neurodegeneración temprana y evidencia de deterioro cognitivo sutil se encuentran en la última etapa de la AD preclínica (asintomática) y se están acercando a la zona fronteriza con criterios clínicos para el deterioro cognitivo leve (MCI). Estos individuos pueden demostrar evidencia de disminución desde su propia línea de base (particularmente si se toman en consideración los indicadores de reserva cognitiva), incluso si todavía se desempeñan dentro del rango "normal" en las medidas cognitivas estándar. Sin limitarse a una teoría particular, se cree que las medidas cognitivas más sensibles, particularmente con medidas de memoria episódica desafiantes, pueden detectar un deterioro cognitivo muy sutil en individuos con amiloide positivo. En ciertas realizaciones, los criterios incluyen, pero no se limitan a, autoqueja de deterioro de la memoria u otros cambios neuroconductuales sutiles.

Como se indicó anteriormente, los sujetos/pacientes susceptibles de los procedimientos profilácticos descritos en este documento incluyen individuos en riesgo de enfermedad (por ejemplo, una patología caracterizada por la formación de placa amiloide tal como MCI) pero que no muestran síntomas, así como los sujetos que actualmente muestran ciertos síntomas o marcadores. Se sabe que el riesgo de MCI y más tarde la enfermedad de Alzheimer generalmente aumenta con la edad. Por consiguiente, en sujetos asintomáticos sin otros factores de riesgo conocidos, en ciertas realizaciones, se contempla la aplicación profiláctica para sujetos mayores de 50 años, o sujetos mayores de 55 años, o sujetos mayores de 60 años, o sujetos mayores de 65 años. edad, o sujetos mayores de 70 años, o sujetos mayores de 75 años, o sujetos mayores de 80 años, en particular para prevenir o retrasar la aparición o la gravedad final del deterioro cognitivo leve (MCI), y/o disminuir o prevenir la progresión de MCI a la enfermedad de Alzheimer (AD) en etapa temprana.

En ciertas realizaciones, los procedimientos descritos en la presente memoria son especialmente útiles para individuos que tienen un riesgo genético conocido de la enfermedad de Alzheimer (u otras patologías amiloidogénicas), ya sean asintomáticos o muestren síntomas de la enfermedad. Tales individuos incluyen aquellos que tienen familiares que han experimentado MCI o AD (por ejemplo, un padre, un abuelo, un hermano) y aquellos cuyo riesgo se determina mediante el análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo para la enfermedad de Alzheimer incluyen, por ejemplo, mutaciones en el gen APP, particularmente mutaciones en la posición 717 y en las posiciones 670 y 671 denominadas mutaciones Hardy y sueca 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 AD, que tienen la mutación familiar de la enfermedad de Alzheimer (FAD), el alelo APOE ϵ 4, hipercolesterolemia o aterosclerosis. Se revisan otros genes 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 MCI o enfermedad de Alzheimer. En pacientes asintomáticos, el tratamiento puede comenzar a cualquier edad (por ejemplo, 20, 30, 40, 50 años de edad). Usualmente, sin embargo, no es necesario comenzar el tratamiento hasta que el paciente alcance al menos aproximadamente 40, 50, 60 o 70 años de edad.

En algunas realizaciones, el sujeto presenta síntomas, por ejemplo, de deterioro cognitivo leve (MCI) o enfermedad de Alzheimer (AD). Las personas que actualmente padecen la enfermedad de Alzheimer pueden ser reconocidas por la demencia característica, así como por la presencia de factores de riesgo descritos anteriormente. Además, está disponible un número de pruebas de diagnóstico para identificar a las personas que tienen AD. Estas incluyen la medición de CSF Tau, fosfo-tau (pTau), niveles de A β 42 y fragmento de APP escindido en el terminal C (APPneo). Elevación total de Tau (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 la relación sAPP α /A β 42 significan la presencia de AD. En algunas realizaciones, el sujeto o paciente es diagnosticado con MCI. Los niveles aumentados de proteína del hilo neural (NTP) en orina y/o niveles aumentados de α 2-macroglobulina (α 2M) y/o factor de complemento H (CFH) en plasma también son biomarcadores de MCI y/o AD (véase, por ejemplo, Anoop *et al.* (2010) Int. J. Alzheimer's Dis.2010: 606802).

En ciertas realizaciones, los sujetos susceptibles de tratamiento pueden tener un deterioro de la memoria asociado con la edad (AAMI) o un deterioro cognitivo leve (MCI). Los procedimientos descritos en la presente memoria son particularmente adecuados para la profilaxis y/o el tratamiento de MCI. En tales casos, los procedimientos pueden retrasar o prevenir la aparición de MCI, y/o reducir uno o más síntomas característicos de MCI y/o retrasar o prevenir la progresión de MCI a la enfermedad de Alzheimer en etapa temprana, media o tardía o reducir la severidad final de la enfermedad.

Deterioro cognitivo leve (MCI)

El deterioro cognitivo leve (MCI, también conocido como demencia incipiente o deterioro de la memoria aislada) es un diagnóstico que se brinda a las personas que tienen un deterioro cognitivo más allá de lo esperado para su edad y educación, pero que típicamente no interfieren significativamente con sus actividades diarias (véase, por ejemplo,

Petersen *et al.* (1999) Arch. Neurol. 56 (3): 303-308). Se considera en muchos casos como una etapa límite o de transición entre el envejecimiento normal y la demencia. Aunque el MCI puede presentarse con una variedad de síntomas, cuando la pérdida de memoria es el síntoma predominante, se denomina "MCI amnésico" y con frecuencia se considera 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 en.wikipedia.org/wiki/Mild_cognitive_impairment - cite_note-Grundman-1). Cuando los individuos tienen impedimentos en dominios distintos de la memoria, frecuentemente se clasifica como MCI de dominio único o múltiple no amnésico y se cree que estos individuos tienen más probabilidades de pasarse a otras demencias (por ejemplo, demencia con cuerpos de Lewy). Hay evidencia que sugiere que si bien los pacientes con MCI amnésico 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 esta etapa de transición hipotética demostraron amiloide difuso en la neocorteza y ovillos neurofibrilares frecuentes en el lóbulo temporal medial (véase, por ejemplo, Petersen *et al.* (2006) Arch. Neurol. 63 (5): 665-72).

El diagnóstico de MCI típicamente implica una evaluación clínica integral que incluye observación clínica, neuroimagen, pruebas de sangre y pruebas neuropsicológicas. En ciertas realizaciones, los criterios de diagnóstico para MIC incluyen, pero no se limitan a, los descritos por Albert *et al.* (2011) *Izheimer's & Dementia*. 1-10. Como se describe en este documento, los criterios de diagnóstico incluyen (1) criterios clínicos centrales que podrían ser utilizados por los proveedores de atención médica sin acceso a técnicas de imagen avanzadas o análisis de líquido cefalorraquídeo presente, memoria de reciente, y (2) criterios de investigación que podrían utilizarse en entornos de investigación clínica, incluidos los ensayos clínicos. El segundo conjunto de criterios incorpora el uso de biomarcadores basados en imágenes y medidas de líquido cefalorraquídeo presente de memoria reciente. El conjunto final de criterios para el deterioro cognitivo leve debido a AD tiene cuatro niveles de certeza, dependiendo de la presencia y la naturaleza de los hallazgos de biomarcadores.

En ciertas realizaciones, la evaluación clínica/diagnóstico de MCI implica: (1) Preocupación que refleja un cambio en la cognición informado por el paciente o informante o clínico (es decir, evidencia histórica u observada de disminución con el tiempo); (2) Evidencia objetiva de Deterioro en uno o más dominios cognitivos, típicamente incluyendo memoria (es decir, pruebas formales o de cabecera para establecer el nivel de función cognitiva en múltiples dominios); (3) Preservación de la independencia en las habilidades funcionales; (4) No demente; y en ciertas realizaciones, (5) Una etiología de MCI consistente con procesos fisiopatológicos de AD. Típicamente se descartan causas médicas vasculares, traumáticas y médicas de deterioro cognitivo, siempre que sea posible. En ciertas realizaciones, se identifica evidencia de disminución longitudinal en la cognición, cuando es factible. El diagnóstico se ve reforzado por una historia consistente con factores genéticos AD, donde sea relevante.

Con respecto al deterioro en los dominios cognitivos, debe existir evidencia de preocupación por un cambio en la cognición, en comparación con el nivel anterior de la persona. Debe haber evidencia de un rendimiento más bajo en uno o más dominios cognitivos que sea mayor de lo que se esperaría para la edad y los antecedentes educativos del paciente. Si hay evaluaciones repetidas disponibles, entonces una disminución en el rendimiento debería ser evidente con el tiempo. Este cambio puede ocurrir en una variedad de dominios cognitivos, que incluyen memoria, función ejecutiva, atención, lenguaje y habilidades visoespaciales. Un deterioro en la memoria episódica (es decir, la capacidad de aprender y retener nueva información) se observa con mayor frecuencia en pacientes con MCI quienes subsecuentemente progresan a un diagnóstico de demencia por AD.

Con respecto a la preservación de la independencia en las capacidades funcionales, se observa que las personas con MCI comúnmente tienen problemas leves para realizar tareas funcionales complejas las cuales utilizaban para realizar compras. Pueden tomar más tiempo, ser menos eficientes y cometer más errores al realizar tales actividades que en el pasado. Sin embargo, generalmente mantienen su independencia de función en la vida diaria, con ayudas o asistencia mínimas.

Con respecto a la demencia, los cambios cognitivos deberían ser lo suficientemente leves como para que no haya evidencia de un deterioro significativo en el funcionamiento social u ocupacional. Si un individuo solo ha sido evaluado una vez, el cambio se deducirá de la historia y/o evidencia de que el rendimiento cognitivo se ve afectado más allá de lo que se hubiera esperado para ese individuo.

Las pruebas cognitivas son óptimas para evaluar objetivamente el grado de deterioro cognitivo de un individuo. Los puntajes en las pruebas cognitivas para individuos con MCI son típicamente de 1 a 1,5 desviaciones estándar por debajo de la media para sus pares de edad y educación igualados en datos normativos culturalmente apropiados (es decir, para los dominios deteriorados, cuando estén disponibles).

La memoria episódica (es decir, la capacidad de aprender y retener nueva información) se observa con mayor frecuencia en pacientes con MCI que subsecuentemente progresan a un diagnóstico de demencia por AD. Hay una variedad de pruebas de memoria episódica que son útiles para identificar a aquellos pacientes con MCI quienes tienen una alta probabilidad de progresar a la demencia por AD en unos pocos años. Estas pruebas típicamente evalúan tanto el recuerdo inmediato como el retardado, de tal manera que es posible determinar la retención durante un retardo. Muchas, aunque no todas, las pruebas que han demostrado ser útiles a este respecto son pruebas de aprendizaje de listas de palabras con múltiples ensayos. Tales pruebas revelan la tasa de aprendizaje a lo largo del tiempo, así como la cantidad máxima adquirida durante transcurso de las pruebas de aprendizaje. También son

útiles para demostrar que el individuo, de hecho, está prestando atención a la tarea de recuerdo inmediato, el cual luego puede usarse como línea de base para evaluar la cantidad relativa de material retenido en el recuerdo retardado. Ejemplos de tales pruebas incluyen (pero no se limitan a: la Prueba de Recuerdo Selectivo Libre y con Clave, la Prueba de Aprendizaje Verbal Auditivo de Rey y la Prueba de Aprendizaje Verbal de California. Otras medidas de memoria episódica incluyen, pero no se limitan a: recuerdo inmediato y retardado de un párrafo tal como la Memoria lógica I y II de la Escala de memoria de Wechsler revisada (u otras versiones) y el recuerdo inmediato y retardado de materiales no verbales, tales como las subpruebas de Reproducción Visual de la Escala de memoria de Wechsler-Revisada I y II.

Debido a que otros dominios cognitivos pueden verse afectados entre las personas con MCI, es deseable examinar dominios además de la memoria. Estos incluyen, pero no se limitan a funciones ejecutoras (por ejemplo, desplazamiento de conjunto, razonamiento, resolución de problemas, planificación), lenguaje (por ejemplo, Nomenclatura, fluidez, habla expresiva y comprensión), habilidades visoespaciales y control de atención (por ejemplo, atención simple y dividida). Se encuentran disponibles muchas medidas neuropsicológicas clínicas para evaluar estos dominios cognitivos, que incluyen (pero no se limitan a, la prueba Trail Making (función ejecutora), la prueba de Boston Naming, la fluidez de letras y categorías (lenguaje), la copia de figuras (habilidades espaciales) y la amplitud de dígitos adelante (atención).

Como se indicó anteriormente, se pueden incorporar factores genéticos en el diagnóstico de MCI. Si se sabe que está presente una forma autosómica dominante de AD (es decir, mutación en APP, PS1, PS2), entonces el desarrollo de MCI es probablemente el precursor de la demencia por AD. La gran mayoría de estos casos desarrollan AD de inicio temprano (es decir, inicio por debajo de los 65 años de edad).

Además, existen influencias genéticas en el desarrollo de la demencia por AD de inicio tardío. Por ejemplo, la presencia de uno o dos alelos $\epsilon 4$ en el gen de la apolipoproteína E (APOE) es una variante genética ampliamente aceptada como un riesgo creciente de demencia por AD de inicio tardío. La evidencia sugiere que un individuo que cumple con los criterios clínicos, cognitivos y etiológicos para MCI, y que también es APOE $\epsilon 4$ positivo, tiene más probabilidades de progresar a demencia por AD en unos pocos años que un individuo sin esta característica genética. Se cree que los genes adicionales juegan un papel importante, pero más pequeño que el APOE y también confieren cambios en el riesgo de progresión a la demencia por AD (véase, por ejemplo, Bertram *et al.* (2010) *Neuron*, 21: 270-281).

En ciertas realizaciones, los sujetos adecuados para los procedimientos profilácticos descritos en este documento incluyen, pero no se limitan a, sujetos identificados que tienen uno o más de los criterios clínicos centrales descritos anteriormente y/o sujetos identificados con uno o más "criterios de investigación" para MCI, por ejemplo, como se describe más adelante.

Los "criterios de investigación" para la identificación/pronóstico de MCI incluyen, pero no se limitan a biomarcadores que aumentan la probabilidad de que el síndrome de MCI se deba a los procesos fisiopatológicos de la AD. Sin limitarse a una teoría particular, se cree que la aplicación conjunta de criterios clínicos y biomarcadores puede dar como resultado diversos niveles de certeza de que el síndrome de MCI se debe a procesos fisiopatológicos de la AD. En ciertas realizaciones, se contemplan dos categorías de biomarcadores que han sido las más estudiadas y aplicadas a los resultados clínicos. Estos incluyen "A β " (que incluye CSF A β_{42} y/o imágenes de amiloide PET) y "biomarcadores de lesión neuronal" (que incluyen, pero no se limitan a, CSF tau/p-tau, hipocampo o atrofia del lóbulo temporal medial en la MRI, e hipometabolismo temporoparietal/precuneus o hipoperfusión en PET o SPECT).

Sin pretender limitarse a una teoría particular, se cree que la evidencia tanto de A β como de daño neuronal (ya sea un aumento en tau/p-tau o biomarcadores de imagen en un patrón topográfico característico de AD), en conjunto confiere la mayor probabilidad de que el proceso fisiopatológico de la AD está presente. Por el contrario, si estos biomarcadores son negativos, esto puede proporcionar información concerniente a la probabilidad de un diagnóstico alternativo. Se reconoce que los hallazgos de los biomarcadores pueden ser contradictorios y, en consecuencia, cualquier combinación de biomarcadores es indicativa (un indicador) utilizada en el contexto de un diagnóstico diferencial y no en el mismo dispositivo. Se reconoce que la gravedad variable de una anomalía puede conferir diferentes probabilidades o pronósticos, que son difíciles de cuantificar con precisión para una aplicación amplia.

Para aquellos sujetos potenciales de MCI cuyo síndrome clínico y cognitivo de MCI es consistente con la AD como la etiología, la adición del análisis de biomarcadores afecta los niveles de certeza en el diagnóstico. En el ejemplo más típico en el que se ha establecido el síndrome clínico y cognitivo de MCI, incluida la evidencia de un trastorno de memoria episódica y una presunta etiología degenerativa, la causa más probable es el proceso neurodegenerativo de AD. Sin embargo, el resultado eventual todavía tiene grados variables de certeza. La probabilidad de progresión a demencia por AD variará con la gravedad del deterioro cognitivo y la naturaleza de la evidencia que sugiere que la fisiopatología de AD es la causa subyacente. Sin pretender limitarse a una teoría en particular, se cree que los biomarcadores positivos que reflejan la lesión neuronal aumentan la probabilidad de que ocurra progresión a la demencia dentro de unos años y que los hallazgos positivos que reflejan la acumulación de Ab y la lesión neuronal juntos confieren la mayor probabilidad de que el diagnóstico sea MCI debido a AD.

Un biomarcador Aβ positivo y un biomarcador positivo de lesión neuronal proporcionan una indicación de que el síndrome de MCI se debe a procesos de AD y el sujeto es muy adecuado para los procedimientos descritos en este documento.

5 Un biomarcador Aβ positivo en una situación en la que los biomarcadores de lesión neuronal no se han probado o no se pueden probar o un biomarcador positivo de lesión neuronal en una situación en la que los biomarcadores Aβ no se han probado o no se pueden probar indican una probabilidad intermedia de que el síndrome de MCI se deba a AD. Se cree que tales sujetos son adecuados para los procedimientos descritos en la presente memoria

10 Los biomarcadores negativos tanto para Aβ como para lesión neuronal sugieren que el síndrome de MCI no se debe a AD. En tales casos, los sujetos pueden no ser adecuados para los procedimientos descritos en la presente memoria.

15 Existe evidencia de que la generación de imágenes por resonancia magnética puede observar el deterioro, incluida la pérdida progresiva de materia gris en el cerebro, desde un deterioro cognitivo leve hasta la enfermedad de Alzheimer en toda regla (véase, por ejemplo, Whitwell *et al.* (2008) *Neurology* 70 (7): 512 -520). Una técnica conocida como generación de imágenes por PET PiB se usa para mostrar claramente los sitios y las formas de los depósitos de beta amiloide en sujetos vivos usando un rastreador C11 que se une selectivamente a tales depósitos (véase, por ejemplo, Jack *et al.* (2008) *Brain* 131 (Pt 3): 665-680).

En ciertas realizaciones, el MCI típicamente se diagnostica cuando hay 1) Evidencia de deterioro de la memoria; 2) Preservación de las habilidades cognitivas y funcionales generales; y 3) Ausencia de demencia diagnosticada.

20 En ciertas realizaciones, el MCI y las etapas de la enfermedad de Alzheimer pueden identificarse/categorizarse, en parte por los puntajes de la Clasificación de Demencia Clínica (CDR). La CDR es una escala de cinco puntos utilizada para caracterizar seis dominios del rendimiento cognitivo y funcional aplicables a la enfermedad de Alzheimer y las demencias relacionadas: memoria, orientación, juicio y resolución de problemas, asuntos comunitarios, hogar y pasatiempos y cuidado personal. La información necesaria para realizar cada calificación se obtiene mediante una entrevista semiestructurada del paciente y un informante confiable o una fuente colateral (por ejemplo, un miembro de la familia).

25 La tabla de la CDR proporciona anclas descriptivas que guían al clínico en la realización de clasificaciones apropiadas basadas en los datos de la entrevista y el juicio clínico. Además de las calificaciones para cada dominio, se puede calcular una puntuación general de CDR mediante el uso de un algoritmo. Este puntaje es útil para caracterizar y rastrear el nivel de discapacidad/demencia de un paciente: 0 = Normal; 0,5 = Demencia muy leve; 1 = demencia leve; 2 = demencia moderada; y 3 = demencia severa. Una tabla ilustrativa de la CDR se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Tabla ilustrativa de clasificación de demencia clínica (CDR).

Incapacidad:	Ninguna	Cuestionable	Leve	Moderada	Grave
CDR:	0	0,5	1	2	3
Memoria	Sin pérdida de memoria o leve olvido inconsistente	Olvido leve constante; recuerdo parcial del olvido "benigno" de los acontecimientos	Pérdida moderada de memoria; más marcado para eventos recientes; defecto interfiere con las actividades cotidianas	Pérdida severa de memoria; solo se retiene material altamente aprendido; nuevo material perdido rápidamente	Pérdida severa de memoria; solo permanecen fragmentos
Orientación	Totalmente orientado	Totalmente orientado excepto por una ligera dificultad con las relaciones de tiempo	Dificultad moderada con las relaciones de tiempo; orientado para lugar en el examen; puede tener desorientación geográfica en otro lugar	Dificultad severa con las relaciones de tiempo; usualmente desorientado al tiempo, a menudo al lugar	Orientado solo a persona

(continuación)

Incapacidad:	Ninguna	Cuestionable	Leve	Moderada	Grave
CDR:	0	0,5	1	2	3
Juicio y resolución de problemas	Resuelve problemas cotidianos y maneja bien los negocios y asuntos financieros; buen juicio en relación con el desempeño pasado	Deterioro leve en la resolución de problemas, similitudes y diferencias	Dificultad moderada en el manejo de problemas, similitudes y diferencias; juicio social generalmente mantenido	Gravemente impedido en el manejo de problemas, similitudes y diferencias; juicio social usualmente deteriorado	Incapaz de hacer juicios o resolver problemas
Asuntos de comunidad	Función independiente al nivel habitual en trabajo, compras, voluntariado y grupos sociales.	Deterioro leve en estas actividades	Incapaz de funcionar de manera independiente en estas actividades, aunque todavía puede participar en algunas; parece normal a la inspección casual	Sin pretensiones de función independiente fuera del hogar	Parece lo suficiente bien como para ser llevado a funciones fuera de un hogar familiar
Hogar y pasatiempos	Vida en el hogar, pasatiempos e intereses intelectuales bien mantenidos	La vida en el hogar, los pasatiempos y los intereses intelectuales están ligeramente deteriorados	Deterioro definitivo poco leve de la función en el hogar; tareas más difíciles abandonadas; aficiones e intereses más complicados abandonados	Solo se conservan las tareas simples; intereses muy restringidos, mal mantenidos	Sin función significativa en el hogar
Cuidado personal	Totalmente capaz de autocuidado		Necesita indicaciones	Requiere asistencia para vestirse, higiene, mantenimiento de efectos personales	Requiere mucha ayuda con el cuidado personal; incontinencia frecuente

Una calificación de CDR de $\sim 0,5$ o $\sim 0,5$ a 1,0 frecuentemente se considera MCI clínicamente relevante. Las calificaciones de la CDR más altas pueden ser indicativas de progresión a la enfermedad de Alzheimer.

- 5 En ciertas realizaciones, la administración de uno o más agentes descritos en la presente memoria (por ejemplo, ASBI tales como galangina, rutina y análogos, derivados o profármacos de los mismos, o tautómeros o estereoisómeros de los mismos, o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de dichos ASBI, dichos estereoisómeros, o dichos tautómeros, o análogos, derivados o profármacos de los mismos) se considera efectivo cuando hay una reducción en el CSF de los niveles de uno o más componentes seleccionados del grupo que
- 10 consiste de 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 en la tasa de formación de placa en el cerebro del sujeto, y/o cuando hay una mejora en las habilidades cognitivas del sujeto, y/o cuando el sujeto percibe una mejora en la calidad de vida, y/o cuando hay una reducción significativa en la calificación de demencia clínica (CDR), y/o cuando la tasa de aumento en la calificación de demencia clínica se ralentiza o se
- 15 detiene y/o cuando la progresión de MCI a la etapa temprana de AD se ralentiza o detiene.

En algunas realizaciones, se puede determinar un diagnóstico de MCI considerando los resultados de varias pruebas clínicas. Por ejemplo, Grundman, *et al.*, Arch Neurol (2004) 61: 59-66, informan que se puede establecer un

diagnóstico de MCI con eficiencia clínica utilizando una prueba de memoria simple (recuperación de párrafo) para establecer un déficit de memoria objetivo, una medida de cognición general (Mini-Mental State Exam (MMSE), discutido en mayor detalle a continuación) para excluir un deterioro cognitivo más amplio más allá de la memoria, y una entrevista clínica estructurada (CDR) con pacientes y cuidadores para verificar la queja de memoria del paciente y la pérdida de memoria y para asegurarse de que el paciente no estaba demente. Los pacientes con MCI realizan, en promedio, menos de 1 desviación estándar (DE) por debajo de lo normal en mediciones cognitivas sin memoria incluidas en la batería. Las pruebas de aprendizaje, atención, velocidad de percepción, fluidez de categoría y función ejecutora pueden verse afectadas en pacientes con MCI, pero son mucho menos prominentes que el déficit de memoria.

10 **Enfermedad de Alzheimer (AD).**

En ciertas realizaciones, los agentes activos, por ejemplo, ASBI tales como galangina, rutina y análogos, derivados o profármacos de los mismos, o tautómeros o estereoisómeros de los mismos, o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de dichos ASBI, dichos estereoisómeros, o dichos tautómeros, o análogos, derivados o profármacos de los mismos) y/o formulaciones de los mismos se contemplan para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. En tales casos, los procedimientos descritos en la presente memoria son útiles para prevenir o retrasar la aparición de la enfermedad de Alzheimer (AD), para reducir la gravedad de la enfermedad de Alzheimer cuando el sujeto ha pasado al diagnóstico clínico de enfermedad de Alzheimer y/o para mitigar uno o más síntomas de la enfermedad de Alzheimer .

En particular, cuando la enfermedad de Alzheimer se encuentra en una etapa temprana, los procedimientos pueden reducir o eliminar uno o más síntomas característicos de la AD y/o retrasar o prevenir la progresión de MCI a la enfermedad de Alzheimer en etapa temprana o tardía.

Las personas que actualmente padecen de la enfermedad de Alzheimer pueden ser reconocidas por la demencia característica, así como por la presencia de factores de riesgo descritos anteriormente. Además, hay varias pruebas de diagnóstico disponibles para identificar a las personas quienes tienen AD. Las personas que actualmente padecen la enfermedad de Alzheimer pueden ser reconocidas por la demencia característica, así como por la presencia de factores de riesgo descritos anteriormente. Además, hay varias pruebas de diagnóstico disponibles para identificar a las personas que tienen AD. Estas incluyen la medición de CSF Tau, phospho-tau (pTau), sAPPa, sAPPβ, Aβ40, niveles de Aβ42 y/o fragmento de APP escindido terminalmente en C (APPneo). Los niveles elevados de Tau, pTau, sAPPp y/o APPneo, y/o disminución de sAPPa, Aβ40 soluble y/o Aβ42 soluble, particularmente en el contexto de un diagnóstico diferencial, pueden significar la presencia de AD.

En ciertas realizaciones, los sujetos susceptibles de tratamiento pueden tener la enfermedad de Alzheimer. Las personas que padecen la enfermedad de Alzheimer también pueden ser diagnosticadas por la enfermedad de Alzheimer y los criterios de la Asociación de Trastornos Relacionados (ADRDA). Los Criterios de Alzheimer de NINCDS-ADRDA fueron propuestos en 1984 por el National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease y Related Disorders Association (ahora conocida como la Alzheimer's Association) y se encuentran entre los más utilizados en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (AD). McKhann y col. (1984) *Neurology* 34 (7): 939-44. De acuerdo con estos criterios, la presencia de deterioro cognitivo y un síndrome de demencia sospechoso debe confirmarse mediante pruebas neuropsicológicas para un diagnóstico clínico de AD posible o probable. Sin embargo, la confirmación histopatológica (examen microscópico del tejido cerebral) se usa generalmente para un diagnóstico dispositivo. Los Criterios de Alzheimer de NINCDS-ADRDA especifican ocho dominios cognitivos que pueden verse afectados en la AD: memoria, lenguaje, habilidades perceptivas, atención, habilidades constructivas, orientación, resolución de problemas y habilidades funcionales). Estos criterios han demostrado una buena fiabilidad y validez.

Las evaluaciones de línea de base de la función del paciente se pueden realizar utilizando mediciones psicométricas clásicas, tales como el Mini-Mental State Exam (MMSE) (Folstein *et al.* (1975) *J. Psychiatric Research* 12 (3): 189-198) y la Escala de Evaluación de la Enfermedad de Alzheimer (ADAS), la cual es una escala integral para evaluar a los pacientes con el estado y la función 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 afección de Alzheimer. Las escalas de vida cualitativas adecuadas también se pueden utilizar para monitorizar el tratamiento. La extensión de la progresión de la enfermedad se puede determinar usando un Mini-Mental State Exam (MMSE) (véase, por ejemplo, Folstein, *et al. supra*). Cualquier puntaje mayor o igual a 25 puntos (de 30) es efectivamente normal (intacto). Por debajo de esto, los puntajes pueden indicar enfermedad de Alzheimer grave (≤ 9 puntos), moderada (10-20 puntos) o leve (21-24 puntos).

La enfermedad de Alzheimer se puede partir en diversas etapas, que incluyen: 1) Deterioro cognitivo moderado (enfermedad de Alzheimer leve o en etapa temprana), 2) Deterioro cognitivo moderadamente grave (Enfermedad de Alzheimer en etapa moderada o intermedia), 3) Deterioro cognitivo severo (Enfermedad de Alzheimer en etapa intermedia o moderadamente grave), y 4) Deterioro cognitivo muy severo (Enfermedad de Alzheimer en etapa severa o tardía) como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Etapas ilustrativas de la enfermedad de Alzheimer.

Disminución cognitiva moderada (AD leve o en etapa temprana)	
	<p>En esta etapa, una cuidadosa entrevista médica detecta deficiencias bien definidas en las siguientes áreas:</p> <p>Disminución del conocimiento de eventos recientes.</p> <p>Capacidad deteriorada para realizar aritmética mental desafiante. Por ejemplo, para contar hacia atrás desde 100 por 7s.</p> <p>Disminución de la capacidad para realizar tareas complejas, tales como mercadotecnia, planificación de cenas para invitados o pago de facturas y administración de finanzas.</p> <p>Memoria reducida de la historia personal.</p> <p>El individuo afectado puede parecer sometido y retraído, especialmente en situaciones de desafío social o mental.</p>
Deterioro cognitivo moderadamente severo (enfermedad de Alzheimer moderada o en etapa media)	
	<p>Surgen brechas importantes en la memoria y déficits en la función cognitiva. Alguna asistencia con las actividades diarias se vuelve esencial. En esta etapa, los individuos pueden:</p> <p>Durante una entrevista médica, no podrá recordar detalles tan importantes como su dirección actual, su número de teléfono o el nombre de la universidad o escuela secundaria de la cual se graduó.</p> <p>Confundirse sobre dónde están o sobre la fecha, día de la semana o temporada.</p> <p>Tener problemas con la aritmética mental menos desafiante; por ejemplo, contando hacia atrás desde 40 por 4s o desde 20 por 2s.</p> <p>Necesitar ayuda para elegir la ropa adecuada para la temporada o la ocasión.</p> <p>Usualmente, conservan un conocimiento sustancial sobre sí mismos y conocen su propio nombre y los nombres de su cónyuge o hijos.</p> <p>Usualmente no requieren asistencia para comer o usar el baño.</p>
Deterioro cognitivo grave (enfermedad de Alzheimer moderadamente grave o en etapa media)	
	<p>Las dificultades de memoria continúan empeorando, pueden surgir cambios significativos de personalidad y las personas afectadas necesitan una amplia ayuda con las actividades diarias. En esta etapa, los individuos pueden:</p> <p>Perder la mayor conciencia de las experiencias y eventos recientes, así como de su entorno.</p> <p>Recordar su historia personal imperfectamente, aunque generalmente recuerdan su propio nombre.</p> <p>Ocasionalmente olvidan el nombre de su cónyuge o cuidador principal, pero generalmente puede distinguir rostros familiares de desconocidos.</p> <p>Necesitar ayuda para vestirse adecuadamente; sin supervisión, pueden cometer errores como ponerse el pijama sobre la ropa o los zapatos durante el día con los pies equivocados.</p> <p>Experimentar la interrupción de su ciclo normal de sueño / vigilia.</p> <p>Necesitar ayuda para manejar los detalles del uso del inodoro (descarga del inodoro, limpieza y eliminación de pañuelos desechables apropiadamente).</p> <p>Tener episodios crecientes de incontinencia urinaria o fecal.</p>

(continuación)

Deterioro cognitivo grave (enfermedad de Alzheimer moderadamente grave o en etapa media)	
	<p>Experimentar cambios significativos de personalidad y síntomas de comportamiento, incluyendo sospechas y delirios (por ejemplo, creer que su cuidador es un impostor); alucinaciones (ver u oír cosas que realmente no existen); o comportamientos compulsivos y repetitivos como retorcerse las manos o triturar tejidos.</p> <p>Tender a vagar y perderse.</p>
Deterioro cognitivo muy grave (enfermedad de Alzheimer grave o en etapa tardía)	
	<p>Esta es la etapa final de la enfermedad cuando las personas pierden la capacidad de responder a su entorno, la capacidad de hablar y, en última instancia, la capacidad de controlar el movimiento.</p> <p>Con frecuencia, las personas pierden su capacidad de hablar reconocible, aunque ocasionalmente se pueden pronunciar palabras o frases.</p> <p>Las personas necesitan ayuda para comer e ir al baño y hay incontinencia general.</p> <p>Las personas pierden la capacidad de caminar sin ayuda, luego la capacidad de sentarse sin apoyo, la capacidad de sonreír y la capacidad de mantener la cabeza erguida.</p> <p>Los reflejos se vuelven anormales y los músculos se vuelven rígidos. La deglución está deteriorada.</p>

5 En diversas realizaciones, la administración de uno o más agentes descritos en la presente memoria a sujetos diagnosticados con enfermedad de Alzheimer se considera efectiva cuando hay una reducción en el CSF de los niveles de uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en Tau, fosfo-Tau (pTau), APPneo, A β 40 soluble, A β 42 soluble, y/o una 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 en la tasa de formación de placa en el cerebro del sujeto, y/o cuando hay una mejora en las habilidades cognitivas del sujeto, y/o cuando hay una mejora percibida en la calidad de vida por el sujeto, y/o cuando hay una reducción significativa en la Clasificación de Demencia Clínica (CDR) del sujeto, y/o cuando la tasa de aumento en la clasificación de demencia clínica se ralentiza o se detiene y/o cuando la progresión de la AD se ralentiza o se detiene (por ejemplo, cuando la transición de una etapa a otra como se lista en la Tabla 3 es lenta o se ha detenido).

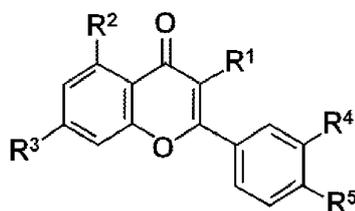
15 En ciertas realizaciones, los Sujetos susceptibles a los presentes procedimientos generalmente están libres de una enfermedad o trastorno neurológico distinto de la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el sujeto no tiene y no está en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno neurológico tal como la enfermedad de Parkinson, y/o esquizofrenia, y/o psicosis.

Agente(s) activo(s).

20 Los procedimientos descritos en este documento se basan, en parte, en el descubrimiento de que la administración de uno o más agentes activos, por ejemplo, ASBIs tales como galangina, rutina y análogos, derivados o profármacos de los mismos, encuentran uso en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades caracterizadas por depósitos de amiloide en el cerebro, por ejemplo, deterioro cognitivo leve, enfermedad de Alzheimer, degeneración macular y similares.

Bioflavonoides.

25 En ciertas realizaciones, los agentes activos utilizados en los procedimientos descritos en la presente memoria comprenden un flavonoide tal como galangina o rutina o un derivado y/o análogo del mismo. En ciertas realizaciones, el flavonoide se caracteriza por la Fórmula I:



I

en la que R¹ se selecciona del grupo que consiste en OH, O-sacárido, O-alquilo, O-trifluorometilo, O-arilo, O-heteroarilo; R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, OH, NH₂, O-alquilo, O-trifluorometilo, S-alquilo, S-arilo, carboxilato, halógeno, NH-alquilo, N,N-dialquilo, NHCO-alquilo y heteroarilo, alquilurea y carbamato; y R² y R³ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, OH, NH₂, O-alquilo, O-trifluorometilo, S-alquilo, S-arilo, carboxilato, halógeno, NH-alquilo, N,N-dialquilo, NHCO-alquilo, heteroarilo, alquilurea y carbamato.

En ciertas realizaciones, R² y/o R³ es OH. En ciertas realizaciones, R² es OH y R³ es OH. En ciertas realizaciones, R² y/o R³ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo y NHCO-alquilo. En ciertas realizaciones, el componente alquilo del O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo y NHCO-alquilo es un alquilo C₁₋₁₂, o un alquilo C₁₋₉, o un alquilo C₁₋₆, o un alquilo C₁₋₃. En ciertas realizaciones, R² y/o R³ es halógeno. En ciertas realizaciones, R² es halógeno y R³ es halógeno. En ciertas realizaciones, R² y/o R³ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en Cl, Br, Fl, e I. En ciertas realizaciones, R² y/o R³ se seleccionan del grupo que consiste en S-arilo y heteroarilo. En ciertas realizaciones, R² y R³ son independientemente S-arilo seleccionado. En ciertas realizaciones, R² y R³ son heteroarilo independientemente seleccionado. En ciertas realizaciones, R⁴ y/o R⁵ es OH. En ciertas realizaciones, R⁴ es H y R⁵ es OH o R⁴ es OH y R⁵ es H. En ciertas realizaciones, R⁴ es OH y R⁵ es OH. En ciertas realizaciones, R⁴ y/o R⁵ es H. En ciertas realizaciones, R⁴ es H y R⁵ es H. En ciertas realizaciones cuando R⁴ y/o R⁵ es OH, R¹ es O-sacárido. En ciertas realizaciones, R⁴ y/o R⁵ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo y NHCO-alquilo. En ciertas realizaciones, R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo y NHCO-alquilo. En ciertas realizaciones, el componente alquilo de dicho O-alquilo, S-alquilo, NH-alquilo y NHCO-alquilo es un alquilo C₁₋₁₂, o un alquilo C₁₋₉, o un alquilo C₁₋₆, o un alquilo C₁₋₃. En ciertas realizaciones, R⁴ y/o R⁵ es halógeno. En ciertas realizaciones, R⁴ es halógeno y R⁵ es halógeno. En ciertas realizaciones, R⁴ y/o R⁵ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en Cl, Br, Fl, e I. En ciertas realizaciones, R⁴ y/o R⁵ se seleccionan del grupo que consiste en S-arilo y éter. En ciertas realizaciones, R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de heteroarilo. En ciertas realizaciones, R¹ es O-sacárido (por ejemplo, O-monosacárido, O-disacárido, O-trisacárido, etc.). En ciertas realizaciones, R¹ es O-alquilo, O-trifluorometilo, O-arilo u O-heteroarilo.

En ciertas realizaciones, el inhibidor de BACE específico de APP es galangina o un derivado del mismo. En ciertas realizaciones, el inhibidor de BACE específico de APP es rutina o un derivado del mismo.

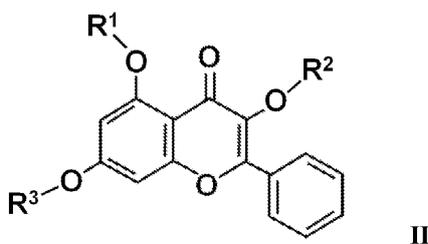
Los expertos en la técnica conocen procedimientos para preparar galangina y/o rutina y/o los diversos derivados de los mismos contemplados en la presente memoria. Tanto galangina como rutina están disponibles comercialmente al igual que ciertos derivados.

Estos compuestos pueden funcionalizarse adicionalmente para preparar los diversos derivados y análogos descritos en la presente memoria usando procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el procedimiento descrito en el ejemplo 2 se usaría en la síntesis de análogos usando diversos Dihidroxi-2-fenil-4H-cromen-4-onos disponibles comercialmente. La conversión a los grupos acetoxi se haría como se describe en el ejemplo 2. El tratamiento con dimetildioxirano se usaría para convertir a la 3-hidroxiflavona. Se puede realizar una hidrólisis adicional con base suave para eliminar los grupos protectores de acetoxi, la mezcla cruda de los derivados de flavona se puede purificar por cromatografía instantánea y recristalización para obtener los análogos de flavona deseados.

40 **Profármacos flavonoides.**

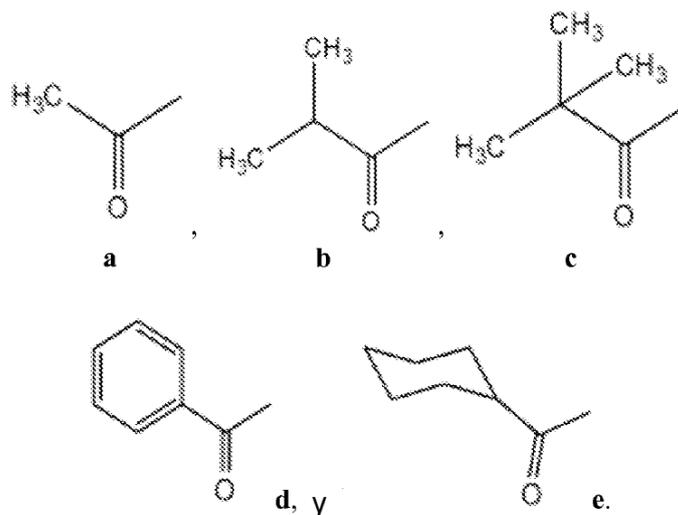
En ciertas realizaciones, se contempla que los diversos flavonoides descritos en la presente memoria pueden proporcionarse como profármacos flavonoides. Los profármacos ilustrativos de galangina se muestran en la Figura 2.

En ciertas realizaciones, el profármaco es un profármaco de galangina que se caracteriza por la Fórmula II:



en la que R¹, R² y R³ son H, o un grupo protector que se elimina *in vivo* en un mamífero, en el que al menos uno de R¹, R² y R³ no es H; y en el que dicho profármaco inhibe parcial o completamente el procesamiento BACE de APP cuando se administra a un mamífero.

En ciertas realizaciones, al menos uno de R¹, R² y R³ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en al menos uno de R¹, R² y R³ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en



En ciertas realizaciones, R^1 es H. En ciertas realizaciones, R^2 es el Grupo a, anterior y R^3 es el Grupo a, b, c, d, o e, arriba. En ciertas realizaciones, R^3 es el Grupo a, anterior y R^2 es el Grupo a, b, c, d o e, anterior. En ciertas realizaciones, R^2 y R^3 son ambos del grupo a anterior.

- 5 En ciertas realizaciones, R^1 es H. En ciertas realizaciones, R^2 es el Grupo b, anterior y R^3 es el Grupo a, b, c, d o e, anterior. En ciertas realizaciones, R^3 es el Grupo b, anterior y R^2 es el Grupo a, b, c, do e, anterior. En ciertas realizaciones, R^2 y R^3 son ambos del grupo b anterior.

- 10 En ciertas realizaciones, R^1 es H. En ciertas realizaciones, R^2 es el Grupo c, anterior y R^3 es el Grupo a, b, c, d o e, anterior. En ciertas realizaciones, R^3 es el Grupo c, anterior y R^2 es el Grupo a, b, c, d o e, anterior. En ciertas realizaciones, R^2 y R^3 son ambos del grupo c anterior.

En ciertas realizaciones, R^1 es H. En ciertas realizaciones, R^2 es el Grupo d, anterior y R^3 es el Grupo a, b, c, d o e, anterior. En ciertas realizaciones, R^3 es el Grupo d, anterior y R^2 es el Grupo a, b, c, d o e, anterior. En ciertas realizaciones, R^2 y R^3 son ambos el grupo d anterior.

- 15 En ciertas realizaciones, R^1 es H. En ciertas realizaciones, R^2 es el Grupo e, anterior, y R^3 es el Grupo a, b, c, d o e, anterior. En ciertas realizaciones, R^3 es el Grupo e, anterior y R^2 es el Grupo a, b, c, d o e, anterior. En ciertas realizaciones, R^2 y R^3 son ambos del grupo e anterior.

Los expertos en la técnica conocen procedimientos para preparar profármacos de galangina tales como los descritos en la presente.

- 20 Uno de tales protocolos se ilustra en el Ejemplo 2 (véase el esquema de síntesis en la Figura 11 para la síntesis del compuesto 2.

Los diversos agentes activos y esquemas de síntesis pretenden ser ilustrativos y no limitativos. Utilizando las enseñanzas proporcionadas en la presente memoria, un experto en la técnica puede sintetizar e identificar numerosos otros compuestos ASBI de flavonoides, derivados de flavonoides y profármacos de flavonoides.

Formulaciones farmacéuticas.

- 25 En ciertas realizaciones, uno o más agentes activos descritos en este documento (por ejemplo, ASBI tales como galangina, rutina y análogos, derivados o profármacos de los mismos, o tautómeros o estereoisómeros de los mismos, o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de dichos ASBI, dichos estereoisómeros, o dichos tautómeros, o análogos, derivados o profármacos de los mismos) se administran a un mamífero que lo necesita, por ejemplo, a un mamífero en riesgo o que padece una patología caracterizada por procesamiento anormal de proteínas precursoras de amiloide, un mamífero en riesgo de progresión de MCI a enfermedad de Alzheimer, etc. En
- 30 En ciertas realizaciones, los agentes activos se administran para prevenir o retrasar la aparición de una afección y/o disfunción cognitiva pre-Alzheimer, y/o para mejorar uno o más síntomas de una disfunción cognitiva pre-Alzheimer, y/o para prevenir o retrasar la progresión de una afección pre-Alzheimer o disfunción cognitiva a la enfermedad de Alzheimer, y/o promover el procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP) por una ruta no amiloidogénica.

- 35 Los agentes activos se pueden administrar 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 adecuado, es decir, eficaz en los presentes procedimientos. Las sales, ésteres, amidas, profármacos y otros

derivados de los agentes activos pueden prepararse utilizando procedimientos estándar conocidos por los expertos en la técnica de la química orgánica sintética y descritos, por ejemplo, en March (1992) *Advanced Organic Chemistry; Reactions, Mechanisms and Structure*, 4th Ed. N.Y. Wiley-Interscience, y como se describió anteriormente.

- 5 Por ejemplo, se puede preparar una sal farmacéuticamente aceptable para cualquiera de los agentes descritos en la presente memoria que tienen una funcionalidad capaz de formar una sal. Una sal farmacéuticamente aceptable es cualquier sal que retiene la actividad del compuesto original y no imparte ningún efecto nocivo o inapropiado sobre el sujeto al que se administra y en el contexto en el cual se administra.

10 En diversas realizaciones, las sales farmacéuticamente aceptables pueden derivarse de bases orgánicas o inorgánicas. La sal puede ser un ion mono o polivalente. De particular interés son los iones inorgánicos, litio, sodio, potasio, calcio y magnesio. Las sales orgánicas pueden prepararse con aminas, particularmente sales de amonio tales como mono-, di- y trialkilaminas o etanol aminas. Las sales también se pueden formar con cafeína, trometamina y moléculas similares.

15 Los expertos en la técnica conocen bien los procedimientos para formular agentes farmacéuticamente activos como sales, ésteres, amidas, profármacos y similares. Por ejemplo, las sales se pueden preparar a partir de la base libre utilizando una metodología convencional que típicamente implica la reacción con un ácido adecuado. Generalmente, la forma básica del fármaco se disuelve en un solvente orgánico polar tal como metanol o etanol y el ácido se agrega al mismo. La sal resultante bien sea precipita o se puede sacar 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 tanto
 20 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 y similares, así como 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 mediante
 25 tratamiento con una base adecuada. Ciertas sales de adición de ácido particularmente preferidas de los agentes activos en la presente memoria incluyen sales de haluro, tales como se pueden preparar usando ácidos clorhídrico o bromhídrico. Por el contrario, la preparación de sales básicas de los agentes activos de esta invención se preparan de manera similar usando una base farmacéuticamente aceptable tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio, trimetilamina o similares. Las sales básicas particularmente preferidas
 30 incluyen sales de metales alcalinos, por ejemplo, la sal de sodio y sales de cobre.

Para la preparación de formas de sal de fármacos básicos, el pKa del contraión es preferiblemente al menos aproximadamente 2 unidades de pH más bajo que el pKa del fármaco. De manera similar, para la preparación de formas de sal de fármacos ácidos, el pKa del contraión es preferiblemente al menos aproximadamente 2 unidades
 35 de pH más alto que el pKa del fármaco. Esto permite que el contraión lleve el pH de la solución a un nivel inferior al $pH_{m\acute{a}x}$ para alcanzar la meseta de la sal, en 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 (API) y en el ácido o la base está destinada a hacer que la transferencia de protones sea energéticamente favorable. Cuando el pKa del API y el contraión no son significativamente diferentes, puede formarse un complejo sólido, pero puede desproporcionarse rápidamente (es decir, descomponerse en las entidades
 40 individuales del fármaco y el contraión) en un entorno acuoso.

Preferiblemente, el contraión es un contraión farmacéuticamente aceptable. Las formas de sal aniónica adecuadas incluyen, pero no se limitan a acetato, benzoato, bicilato, bitartrato, bromuro, carbonato, cloruro, citrato, edetato, edisilato, estolato, fumarato, gluceptato, gluconato, hidrobromuro, hidrocloreuro, yoduro, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, bromuro de metilo, sulfato de metilo, mucato, napsilato, nitrato, pamoato (embonato),
 45 fosfato y difosfato, salicilato y disalicilato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tosilato, trietyoduro, valerato y similares, mientras que las formas de sal catiónica adecuadas incluyen, pero sin limitación, aluminio, benzatina, calcio, etilendiamina, lisina, magnesio, meglumina, potasio, procaína, sodio, trometamina, zinc y similares.

La preparación de ésteres típicamente implica la funcionalización de grupos hidroxilo y/o carboxilo que están presentes dentro de la estructura molecular del agente activo. En ciertas realizaciones, los ésteres son típicamente
 50 derivados sustituidos con acilo de grupos alcohol libres, es decir, fracciones que se derivan de ácidos carboxílicos de la fórmula RCOOH en la que R es alquilo, y preferiblemente es alquilo inferior. Los ésteres se pueden reconvertir en ácidos libres, si se desea, utilizando procedimientos convencionales de hidrogenólisis o hidrólisis.

Las amidas también se pueden preparar usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica o descritas en la literatura pertinente. Por ejemplo, las amidas pueden prepararse a partir de ésteres, usando reactivos de amina
 55 adecuados, o pueden prepararse a partir de un anhídrido o un cloruro de ácido por reacción con amoniaco o una alquilamina inferior.

En diversas realizaciones, los agentes activos identificados en la presente memoria (por ejemplo, ASBIs tales como galangina, rutina y análogos, derivados o profármacos de los mismos, o tautómeros o estereoisómeros de los mismos, o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de dichos ASBI, dichos estereoisómeros, o dichos
 60 tautómeros, o análogos, derivados o profármacos de los mismos) son útiles para administración parenteral,

administración tópica, administración oral, administración nasal (o de otro modo inhalada), administración rectal o administración local, tal como mediante aerosol o por ruta transdérmica, para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de una o más de las patologías/indicaciones descritas en este documento (por ejemplo, patologías caracterizadas por exceso de formación y/o deposición de placa amiloide o procesamiento no deseado amiloide o pre-amiloide).

Los agentes activos descritos en la presente memoria también se pueden combinar con un vehículo (excipiente) farmacéuticamente aceptable para formar una composición farmacológica. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden contener uno o más compuestos fisiológicamente aceptables que actúan, por ejemplo, para estabilizar la composición o para aumentar o disminuir la absorción de los agentes activos. Los compuestos fisiológicamente aceptables pueden incluir, por ejemplo, carbohidratos, tales como glucosa, sacarosa o dextranos, antioxidantes, tales como ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular, potenciadores de la protección y la absorción, tales como lípidos, composiciones que reducen el aclaramiento o hidrólisis de los agentes activos, o excipientes u otros estabilizadores y/o tampones.

Otros compuestos fisiológicamente aceptables, particularmente de uso en la preparación de comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel y similares incluyen, pero no se limitan a, aglutinantes, diluyentes/agentes de carga, desintegrantes, lubricantes, agentes de suspensión y similares.

En ciertas realizaciones, para fabricar una forma de dosificación oral (por ejemplo, un comprimido), un excipiente (por ejemplo, lactosa, sacarosa, almidón, manitol, etc.), un desintegrador opcional (por ejemplo, carbonato de calcio, carboximetilcelulosa de calcio, almidón glicolato de sodio, crospovidona etc.), un aglutinante (por ejemplo, almidón alfa, goma arábica, celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulosa, ciclodextrina, etc.) y un lubricante opcional (por ejemplo, talco, estearato de magnesio, polietilenglicol 6000, etc.), por ejemplo, se añaden al componente o componentes activos (por ejemplo, ASBI tales como galangina, rutina y análogos, derivados o profármacos de los mismos, o tautómeros o estereoisómeros de los mismos, o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de dichos ASBI, dichos estereoisómeros o dichos tautómeros, o análogos, derivados o profármacos de los mismos) y la composición resultante se comprime. Cuando es necesario, el producto comprimido se recubre, por ejemplo, utilizando procedimientos conocidos para enmascarar el sabor o para la disolución entérica o la liberación sostenida. Los materiales de recubrimiento adecuados incluyen, pero no se limitan a etilcelulosa, hidroximetilcelulosa, POLYOX@etilenglicol, ftalato de acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa y Eudragit (Rohm & Haas, Alemania; copolímero metacrílico-acrílico).

Otros compuestos fisiológicamente aceptables incluyen agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes o conservantes que son particularmente útiles para prevenir el crecimiento o la acción de microorganismos. Diversos conservantes son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, fenol y ácido ascórbico. Un experto en la técnica apreciaría que la elección de los vehículos farmacéuticamente aceptables, que incluye un compuesto fisiológicamente aceptable, depende, por ejemplo, de la ruta de administración de los agentes activos y de las características fisicoquímicas particulares de los agentes activos.

En ciertas realizaciones, los excipientes son estériles y generalmente sin materia indeseable. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales y bien conocidas. Para diversos excipientes de forma de dosificación oral, tales como comprimidos y cápsulas, no se requiere esterilidad. El estándar USP/NF suele ser suficiente.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en una variedad de formas de dosificación unitarias dependiendo del procedimiento de administración. Las formas de dosificación unitaria adecuadas incluyen, pero no se limitan a, polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, pastillas, supositorios, parches, aerosoles nasales, inyectables, formulaciones implantables de liberación sostenida, películas mucoadherentes, barnices tópicos, complejos lipídicos, etc.

Composiciones farmacéuticas que comprenden los agentes activos descritos en este documento (por ejemplo, ASBI tales como galangina, rutina y análogos, derivados o profármacos de los mismos, o tautómeros o estereoisómeros de los mismos, o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de dichos ASBI, dichos estereoisómeros, o dichos tautómeros, o análogos, derivados o profármacos de los mismos) se pueden fabricar mediante procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de manera convencional usando uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente aceptables que facilitan el procesamiento de los agentes activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la ruta de administración escogida.

En ciertas realizaciones, los agentes activos descritos en este documento están formulados para administración oral. Para la administración oral, las formulaciones adecuadas se pueden formular fácilmente combinando los agentes activos con vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para administración oral bien conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten que los agentes activos descritos en la presente memoria se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, capsuletas, grageas, cápsulas de gel, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, soluciones, suspensiones y similares, para ingestión oral por un paciente que va a ser tratado. Para formulaciones orales sólidas tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas y tabletas, los excipientes adecuados pueden incluir agentes de cargas

tales como azúcares (por ejemplo, lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol), preparaciones de celulosa (por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio), polímeros sintéticos (por ejemplo, polivinilpirrolidona (PVP)), agentes de granulación; y agentes aglutinantes. Si se desea, se pueden agregar agentes desintegrantes, tales como la polivinilpirrolidona entrecruzada, agar o ácido algínico o una sal de los mismos, tal como alginato de sodio. Si se desea, las formas de dosificación sólidas pueden recubrirse con azúcar o con recubrimiento entérico utilizando técnicas estándar. La preparación de partículas con recubrimiento entérico se describe, por ejemplo, en la patente U.S. Nos. 4.786.505 y 4.853.230.

Para la administración por inhalación, los agentes activos se suministran convenientemente en forma de aspersión de aerosol de paquetes presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de por ejemplo gelatina para usar en un inhalador o insuflador que contiene una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

En diversas realizaciones, los agentes activos pueden formularse en composiciones rectales o vaginales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos. Los expertos en la técnica conocen bien los procedimientos de formulación de agentes activos para el suministro rectal o vaginal (véase, por ejemplo, Allen (2007) Suppositories, Pharmaceutical Press) y típicamente implican la combinación de los agentes activos con una base adecuada (por ejemplo, hidrófilo (PEG), materiales lipofílicos tales como manteca de cacao o Witepsol W45), materiales anfífilos tales como Suppocire AP y glicéridos poliglicolizados, y similares). La base se selecciona y combina para un perfil de fusión/suministro deseado.

Para la administración tópica, los agentes activos descritos en la presente memoria (por ejemplo, ASBI tales como galangina, rutina y análogos, derivados o profármacos de los mismos, o tautómeros o estereoisómeros de los mismos, o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de dichos ASBI, dichos estereoisómeros, o dichos tautómeros, o análogos, derivados o profármacos de los mismos) pueden formularse como soluciones, geles, ungüentos, cremas, suspensiones y similares como son bien conocidos en la técnica.

En ciertas realizaciones, los agentes activos descritos en la presente memoria están formulados para administración sistémica (por ejemplo, como un inyectable) de acuerdo con procedimientos estándar bien conocidos por los expertos en la técnica. Las formulaciones sistémicas incluyen, pero no se limitan a, aquellas diseñadas para administración por inyección, por ejemplo inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal o intraperitoneal, así como aquellas diseñadas para suministro transdérmico, transmucosa oral o pulmonar. Para inyección, los agentes activos descritos en la presente memoria pueden formularse en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hanks, solución de Ringer o tampón salino fisiológico y/o en ciertas formulaciones de emulsión. Las soluciones pueden contener agentes formuladores tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. En ciertas realizaciones, los agentes activos pueden proporcionarse en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso. Para la administración transmucosa, y/o para el paso de la barrera hematoencefálica, se pueden usar en la formulación penetrantes apropiados para la barrera que va a ser permeada. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica. Las formulaciones inyectables y las formulaciones inhalables generalmente se proporcionan como una formulación estéril o sustancialmente estéril.

Además de las formulaciones descritas anteriormente, los agentes activos también pueden formularse como preparaciones de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los agentes activos se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble.

En ciertas realizaciones, los agentes activos en la presente memoria descrito también pueden suministrarse a través de la piel usando sistemas de suministro de fármacos transdérmicos convencionales, es decir, "parches" transdérmicos en los que los agentes activos están típicamente contenidos dentro de una estructura laminada que sirve como dispositivo de suministro de fármacos para ser fijado a la piel. En tal estructura, la composición de fármaco está típicamente contenida en una capa, o "reservorio", subyacente a una capa de respaldo superior. Se apreciará que el término "reservorio" en este contexto se refiere a una cantidad de "ingrediente (s) activo (s)" que está finalmente disponible para su suministro a la superficie de la piel. Así, por ejemplo, el "reservorio" puede incluir el ingrediente o ingredientes activos en un adhesivo en una capa de respaldo del parche, o en cualquiera de una variedad de formulaciones de matriz diferentes conocidas por los expertos en la técnica. El parche puede contener un solo reservorio, o puede contener múltiples reservorios.

En una realización ilustrativa, el reservorio comprende una matriz polimérica de un material adhesivo de contacto farmacéuticamente aceptable que sirve para fijar el sistema a la piel durante el suministro del fármaco. Ejemplos de

materiales adhesivos de contacto con la piel adecuados incluyen, pero no se limitan a, polietilenos, polisiloxanos, poliisobutilenos, poliacrilatos, poliuretanos y similares. Alternativamente, el reservorio que contiene el fármaco y el adhesivo de contacto con la piel están presentes como capas separadas y distintas, con el adhesivo subyacente al reservorio el cual, en este caso, puede ser bien sea una matriz polimérica como se describió anteriormente, o puede ser un reservorio de líquido o hidrogel, o puede tomar alguna otra forma. La capa de respaldo en estos laminados, que sirve como la superficie superior del dispositivo, funciona preferiblemente como un elemento estructural primario del "parche" y proporciona al dispositivo mucha de su flexibilidad. El material seleccionado para la capa de respaldo es preferiblemente sustancialmente impermeable a los agentes activos y a cualquier otro material que esté presente.

Alternativamente, se pueden emplear otros sistemas de suministro farmacéutico. Por ejemplo, los liposomas, emulsiones y microemulsiones/nanoemulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos de suministro que pueden usarse para proteger y suministrar compuestos farmacéuticamente activos. También se pueden emplear ciertos solventes orgánicos tales como el dimetilsulfóxido, aunque usualmente a costa de una mayor toxicidad.

En ciertas realizaciones, los agentes activos descritos en la presente memoria (por ejemplo, ASBI tales como galangina, rutina y análogos, derivados o profármacos de los mismos, o tautómeros o estereoisómeros de los mismos, o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de dichos ASBI, dichos estereoisómeros o dichos tautómeros, o análogos, derivados o profármacos de los mismos) se formulan en una nanoemulsión. Las nanoemulsiones incluyen, entre otras, nanoemulsiones de aceite en agua (OW) y nanoemulsiones de agua en aceite (W/O). Las nanoemulsiones pueden definirse como emulsiones con diámetros medios de gota que varían de aproximadamente 20 a aproximadamente 1000 nm. Usualmente, el tamaño promedio de gota está entre aproximadamente 20 nm o 50 nm y aproximadamente 500 nm. Los términos emulsión submicrométrica (SME) y miniemulsión se usan como sinónimos.

Las nanoemulsiones ilustrativas de aceite en agua (OW) incluyen, pero no se limitan a: micelas tensioactivas: micelas compuestas de pequeñas moléculas de tensioactivos o detergentes (por ejemplo, SDS/PBS/2-propanol); Micelas poliméricas: micelas compuestas de polímeros, copolímeros o tensioactivos de copolímero de bloque (por ejemplo, Pluronic L64/PBS/2-propanol); Micelas mezcladas: micelas en las que hay más de un componente tensioactivo o en las que una de las fases líquidas (generalmente un compuesto de alcohol o ácido graso) participa en la formación de la micela (por ejemplo, ácido octanoico/PBS/EtOH); Micelas integrales: micelas combinadas en las que los agentes activos sirven como tensioactivo auxiliar, formando una parte integral de la micela; y emulsiones Pickering (fase sólida): emulsiones en las que los agentes activos están asociados con el exterior de una nanopartícula sólida (por ejemplo, nanopartículas de poliestireno/PBS/sin fase oleosa).

Las nanoemulsiones ilustrativas de agua en aceite (W/O) incluyen, pero no se limitan a: micelas tensioactivas: micelas compuestas de moléculas pequeñas de tensioactivos o detergentes (por ejemplo, diocilsulfosuccinato/PBS/2-propanol, isopropilmidirista/PBS/2-propanol, etc.); Micelas de polímeros: micelas compuestas de polímeros, copolímeros o tensioactivos de copolímero de bloque (por ejemplo, PLURONIC® L121/PBS/2-propanol); Micelas mezcladas: micelas en las que hay más de un componente tensioactivo o en las que una de las fases líquidas (generalmente un compuesto de alcohol o ácido graso) participa en la formación de la micela (por ejemplo, diglicérido cáprico/caprílico/PBS/EtOH); Micelas integrales: micelas combinadas en las que los agentes activos sirven como tensioactivo auxiliar, formando una parte integral de la micela (por ejemplo, agente activo/PBS/polipropilenglicol); y emulsiones Pickering (fase sólida): emulsiones en las que los agentes activos están asociados con el exterior de una nanopartícula sólida (por ejemplo, nanopartículas de quitosano/sin fase acuosa/aceite mineral).

Como se indicó anteriormente, en ciertas realizaciones, las nanoemulsiones comprenden uno o más tensioactivos o detergentes. En algunas realizaciones, el tensioactivo es un detergente no aniónico (por ejemplo, un tensioactivo de polisorbato, un éter de polioxietileno, etc.). Los tensioactivos que encuentran uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a tensioactivos tales como las familias de compuestos TWEEN®, TRITON® y TYLOXAPOL®.

En ciertas realizaciones, las emulsiones comprenden además uno o más compuestos que contienen halógeno catiónico, que incluyen, pero no se limitan a, cloruro de cetilpiridinio. En otras realizaciones adicionales, las composiciones comprenden además uno o más compuestos que aumentan la interacción ("potenciadores de la interacción") de la composición con microorganismos (por ejemplo, agentes quelantes como ácido etilendiaminotetraacético o ácido etilénbis(oxietilénitrilo)tetraacético en un tampón).

En algunas realizaciones, la nanoemulsión comprende además un agente emulsionante para ayudar en la formación de la emulsión. Los agentes emulsionantes incluyen compuestos que se agregan en la interfaz aceite/agua para formar una especie de membrana continua que evita el contacto directo entre dos gotas adyacentes. Ciertas realizaciones de la presente invención presentan composiciones de emulsión de aceite en agua que pueden diluirse fácilmente con agua a una concentración deseada sin perjudicar sus propiedades antipatógenas.

Además de las gotas de aceite discretas dispersas en una fase acuosa, ciertas emulsiones de aceite en agua también pueden contener otras estructuras lipídicas, tales como pequeñas vesículas lipídicas (por ejemplo, esferas lipídicas que frecuentemente consisten en varias bicapas lipídicas sustancialmente concéntricas separadas entre sí por capas en fase acuosa), micelas (por ejemplo, moléculas anfífilicas en pequeños grupos de 50-200 moléculas dispuestas de manera que los grupos de la cabeza polar miren hacia la fase acuosa y las colas apolares se separen

dimetil octadecil amonio; trimetoxisilil quats, cloruro de trimetil dodecilbencil amonio; cloruro de n-dodecil dimetil etil bencil amonio; cloruro de n-hexadecil dimetil bencil amonio; cloruro de n-tetradecil dimetil bencil amonio; cloruro de n-tetradecil dimetil etil bencil amonio; y cloruro de n-octadecil dimetil bencil amonio.

5 Las formulaciones de nanoemulsión y los procedimientos para prepararlos son bien conocidos por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes U.S. Nos. 6.335.022, 6.274.150, 6.120.778, 6.039.936, 5.925.341, 5.753.241, 5.698.219, un d5,152,923 y en Fanun *et al.* (2009) Microemulsiones: propiedades y Solicitudes (Surfactant Science), CRC Press, Boca Ratan Fl.

10 En ciertas realizaciones, uno o más agentes activos descritos en este documento pueden proporcionarse como un "concentrado", por ejemplo, en un recipiente de almacenamiento (por ejemplo, en un volumen previamente medido) listo para la dilución, o en una cápsula soluble lista para la adición a un volumen de agua, alcohol, peróxido de hidrógeno u otro diluyente.

Formulaciones de liberación prolongada (liberación sostenida).

15 En ciertas realizaciones, se contemplan formulaciones de "liberación prolongada" del agente o agentes activos descritos en la presente memoria. En diversas realizaciones, tales formulaciones de liberación prolongada están diseñadas para evitar los altos picos plasmáticos máximos de las formas de dosificación intravenosa y oral de liberación inmediata convencional.

20 Las formulaciones ilustrativas de liberación sostenida incluyen, por ejemplo, matrices semipermeables de polímeros sólidos que contienen el agente terapéutico. Se han establecido diversos usos de materiales de liberación sostenida y son bien conocidos por los expertos en la técnica. Las cápsulas de liberación sostenida pueden, dependiendo de su naturaleza química, liberar los compuestos durante algunas semanas hasta más de 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y la estabilidad biológica del reactivo terapéutico, se pueden emplear estrategias adicionales para la estabilización.

25 En ciertas realizaciones, tales formulaciones de "liberación prolongada" utilizan la mucosa y pueden controlar independientemente la desintegración (o erosión) de la tableta y/o la disolución del fármaco y la liberación del comprimido con el tiempo para proporcionar un perfil de suministro más seguro. En ciertas realizaciones, las formulaciones orales de los agentes activos en la presente memoria descritas (por ejemplo, ASBI tales como galangina, rutina y análogos, derivados o profármacos de los mismos, o tautómeros o estereoisómeros de los mismos, o sales farmacéuticamente aceptables o solvatos de dichos ASBI, dichos estereoisómeros o dichos tautómeros, o análogos, derivados o profármacos de los mismos) proporcionan dosis individuales repetitivas que incluyen una cantidad definida del agente activo que se administra durante un período definido cantidad de tiempo.

35 Una formulación ilustrativa de liberación sostenida es una composición sustancialmente homogénea que comprende aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 99 % p/p, o aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 95 %, o aproximadamente 0,1 %, o aproximadamente 1 %, o aproximadamente 2 %, o aproximadamente 5 %, o aproximadamente 10 %, o aproximadamente 15 %, o aproximadamente 20 % a aproximadamente 80 %, o aproximadamente 90 %, o aproximadamente 95 %, o aproximadamente 97 %, o aproximadamente 98 %, o aproximadamente 99 % 1 de los ingredientes activos (por ejemplo, ASBI tales como galangina, rutina y análogos, derivados o profármacos de los mismos, o tautómeros o estereoisómeros de los mismos, o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de dichos ASBI, dichos estereoisómeros, o dichos tautómeros, o análogos, derivados o profármacos de los mismos) y uno o más mucoadhesivos (también denominados en la presente memoria como "bioadhesivos") que proporcionan adherencia a la mucosa objetivo del sujeto (paciente) y que puede comprender además uno o más de los siguientes: uno o más aglutinantes que proporcionan la unión de los excipientes en un solo comprimido; uno o más excipientes formadores de hidrogel; uno o más agentes a granel; uno o más lubricantes; uno o más deslizantes; uno o más solubilizantes; uno o más tensioactivos; uno o más sabores; uno o más desintegrantes; uno o más excipientes tamponantes; uno o más recubrimientos; uno o más modificadores de liberación controlada; y uno o más excipientes y factores que modifican y controlan el tiempo de disolución o desintegración del fármaco y la cinética o protegen el fármaco activo de la degradación.

45 En diversas realizaciones, una forma de dosificación farmacéutica de liberación sostenida para suministro transmucosal oral puede ser sólida o no sólida. En una realización preferente, la forma de dosificación es un sólido que se convierte en un hidrogel después del contacto con la saliva.

50 Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a sustancias añadidas a las formulaciones que se requieren para producir un producto comercial y pueden incluir, pero no se limitan a: agentes a granel, aglutinantes, tensioactivos, bioadhesivos, lubricantes, desintegrantes, estabilizadores, solubilizantes, deslizantes, y aditivos o factores que afectan el tiempo de disolución o desintegración. Los excipientes adecuados no se limitan a los anteriores, y se pueden encontrar otros portadores farmacéuticamente aceptables no tóxicos adecuados para su uso en formulaciones orales en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª edición, 1985.

55 En ciertas realizaciones, las formulaciones de liberación prolongada de los agentes activos descritos en la presente memoria para el suministro oral de fármacos transmucosa incluyen al menos un agente bioadhesivo (mucoadhesivo) o una mezcla de varios bioadhesivos para promover la adhesión a la mucosa oral durante el suministro del fármaco.

Además, los agentes bioadhesivos también pueden ser efectivos para controlar el tiempo de erosión de la forma de dosificación y/o la cinética de disolución del fármaco con el tiempo cuando la forma de dosificación se humedece. Tales sistemas de suministro de fármacos mucoadhesivos son muy beneficiosos, ya que pueden prolongar el tiempo de residencia del fármaco en el sitio de absorción y aumentar la biodisponibilidad del fármaco. Los polímeros mucoadhesivos que forman hidrogeles son típicamente hidrófilos e hinchables, y contienen numerosos grupos formadores de enlaces de hidrógeno, como hidroxilo, carboxilo o amina, los cuales favorecen la adhesión. Cuando se usan en forma seca, atraen agua de la superficie de la mucosa y se hinchan, lo que conduce a la interacción polímero/moco a través de enlaces de hidrógeno, electrostática, hidrófoba o interacción de van der Waals.

Los materiales mucoadhesivos o bioadhesivos adecuados ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, polímeros naturales, sintéticos o biológicos, lípidos, fosfolípidos y similares. Ejemplos de polímeros naturales y/o sintéticos incluyen derivados celulósicos (tales como metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxietilmetilcelulosa, etc.), gomas naturales (tales como goma guar, goma xantano, goma de algarrobo, goma karaya, goma vee, etc.), poliacrilatos (tales como CARBOPOL®, policarbofilo, etc.), alginatos, polímeros que contienen tiol, POLYOX® etilenos, polietilenglicoles (PEG) de todos los pesos moleculares (preferiblemente entre 1000 y 40.000 Da, de cualquier química, lineal o ramificada), dextranos de todos los pesos moleculares (preferiblemente entre 1000 y 40.000 Da de cualquier fuente), copolímeros de bloque, tales como los preparados por combinaciones de ácido láctico y glicólico (PLA, PGA, PLGA de diversas viscosidades, pesos moleculares y relaciones de ácido láctico a glicólico) copolímeros de bloques de polietilenglicol-polipropilenglicol de cualquier número y combinación de unidades repetitivas (tales como copolímeros de bloques PLURONICS®, TEKTRONIX® o GENAPOL®), combinación de los copolímeros anteriores bien sea unidades enlazadas física o químicamente (por ejemplo, copolímeros PEG-PLA o PEG-PLGA). Preferiblemente, el excipiente bioadhesivo se selecciona del grupo de polietilenglicoles, POLYOX® etilenos, polímeros de ácido poliacrílico, tales como CARBOPOL® (tales como CARBOPOL® 71G, 934P, 971P, 974P y similares) y policarbofilos (tales como NOVEON® AA -1, NOVEON® CA-1, NOVEON® CA-2 y similares), celulosa y sus derivados y lo más preferiblemente es polietilenglicol, carbopol y/o un derivado celulósico o una combinación de los mismos.

En ciertas realizaciones, el excipiente mucoadhesivo/bioadhesivo está presente típicamente a 1-50 % p/p, preferiblemente 1-40 % p/p o lo más preferiblemente entre 5-30 % p/p. Una formulación particular puede contener uno o más bioadhesivos diferentes en cualquier combinación.

En ciertas realizaciones, las formulaciones para el suministro oral de fármacos transmucosales también incluyen un aglutinante o mezcla de dos o más aglutinantes que facilitan la unión de los excipientes en una única forma de dosificación. Los aglutinantes ejemplares se seleccionan del grupo que consiste en derivados celulósicos (tales como metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxietilmetilcelulosa, etc.), poliacrilatos (tales como CARBOPOL®, policarbofilo, etc.), POVIDONE® (todos los grados), POLYOX® de cualquier peso molecular o grado, irradiado o no, almidón, polivinilpirrolidona (PVP), AVICEL® y similares. En ciertas realizaciones, el aglutinante está presente típicamente a 0,5-60 % p/p, preferiblemente 1-30 % p/p y lo más preferiblemente 1,5-15 % p/p.

En ciertas realizaciones, las formulaciones también incluyen al menos un excipiente formador de hidrogel. Los excipientes formadores de hidrogel ejemplares se seleccionan del grupo que consiste en polietilenglicoles y otros polímeros que tienen una cadena principal de etilenglicol, ya sean homopolímeros o heteropolímeros entrecruzados, copolímeros de bloques que usan unidades de etilenglicol, tales como homopolímeros de etileno POLYOX® (tales como POLYOX® N10/MW = 100.000 POLYOX®-80/MW = 200.000; POLYOX® 1105/MW = 900.000; POLYOX®-301/MW = 4.000.000; POLYOX®-303/MW = 7.000.000, POLYOX® WSR-N-60K, todos los cuales son nombres comerciales de Union Carbide), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) de todos los pesos y grados moleculares (tales como METOLOSE® 90SH50000, METOLOSE® 90SH30000, todos los cuales son nombres comerciales de Shin-Etsu Chemical Company), Poloxámeros (tales como LUTROL® F-68, LUTROL® F-127, F-105, etc., todos los nombres comerciales de BASF Chemicals), GENAPOL®, polietilenglicoles (PEG, tales como PEG-1500, PEG-3500, PEG-4000, PEG-6000, PEG-8000, PEG-12000, PEG-20.000, etc.), gomas naturales (goma xantano, goma de algarrobo, etc.) y derivados de celulosa (HC, HMC, HMPC, HPC, CP, CMC), polímeros a base de ácido poliacrílico ya sea como libres o entrecruzados y combinaciones de los mismos, polímeros biodegradables tales como ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y cualquier combinación de los mismos, ya sea una mezcla física o entrecruzada. En ciertas realizaciones, los componentes de hidrogel pueden estar entrecruzados. Los excipientes formadores de hidrogel están típicamente presentes a 0,1-70 % p/p, preferiblemente 1-50 % p/p o lo más preferiblemente 1-30 % p/p.

En ciertas realizaciones, las formulaciones también pueden incluir al menos un modificador de liberación controlada el cual es una sustancia que, tras la hidratación de la forma de dosificación, se adherirá preferentemente a las moléculas del fármaco y, por lo tanto, reducirá la tasa de su difusión desde la forma de dosificación oral. Tales excipientes también pueden reducir la tasa de absorción de agua por la formulación y, por lo tanto, permiten una disolución y liberación más prolongada del fármaco del comprimido. En general, los excipientes seleccionados son lipófilos y capaces de formar complejos de forma natural con los fármacos hidrófobos o lipófilos. El grado de asociación del modificador de liberación y el fármaco se puede variar alterando la relación de modificador a fármaco en la formulación. Además, tal interacción se puede potenciar adecuadamente mediante la combinación apropiada del modificador de liberación con el fármaco activo en el proceso de fabricación. Alternativamente, el modificador de

liberación controlada puede ser un polímero cargado ya sea sintético o biopolímero que porta una carga neta, ya sea positiva o negativa, y que sea capaz de unirse al activo mediante interacciones electrostáticas, modificando así su difusión a través del comprimido y/o la cinética de su permeación a través de la superficie mucosa. De manera similar a los otros compuestos mencionados anteriormente, tal interacción es reversible y no implica enlaces químicos permanentes con el activo. En ciertas realizaciones, el modificador de liberación controlada puede estar presente típicamente a 0-80 % p/p, preferiblemente 1-20 % p/p, lo más preferiblemente 1-10 % p/p.

En diversas realizaciones, las formulaciones de liberación prolongada también pueden incluir otros componentes convencionales requeridos para el desarrollo de formas de dosificación oral, las cuales son conocidas por los expertos en la técnica. Estos componentes pueden incluir uno o más agentes a granel (tales como lactosa USP, Starch 1500, manitol, sorbitol, malitol u otros azúcares no reductores; celulosa microcristalina (por ejemplo, AVICEL®), deshidrato de fosfato de calcio dibásico, sacarosa y mezclas de los mismos), al menos uno o varios agentes solubilizantes (tales como ciclodextrinas, ajustadores de pH, sales y tampones, tensioactivos, ácidos grasos, fosfolípidos, metales de ácidos grasos, etc.), sales metálicas y tampones orgánicos (tales como acetato, citrato, tartrato, etc.) o inorgánicos (fosfato, carbonato, bicarbonato, borato, sulfato, sulfito, bisulfito, metabisulfito, cloruro, etc.), sales de metales como tales sodio, potasio, calcio, magnesio, etc.), al menos un lubricante (tales como ácido esteárico y cationes divalentes de, tales como estearato de magnesio, estearato de calcio, etc., talco, monoestearato de glicerol y similares), uno o más deslizantes (tales como dióxido de silicio coloidal, dióxido de silicio precipitado, sílica ahumada (CAB-O -SIL® M-5P, marca registrada de Cabot Corporation), stearowet y sterotex, sílicas (tales como sílicas SILOID® y SILOX® - marcas registradas de Grace Davison Products, Aerosil - marca registrada de Degussa Pharma), ácidos grasos superiores, sus sales metálicas, aceites vegetales hidrogenados y similares), sabores o edulcorantes y colorantes (tales como aspartamo, manitol, lactosa, sacarosa, otros edulcorantes artificiales; óxidos férricos y lacas FD&C), aditivos para ayudar a estabilizar la sustancia farmacológica de la productos químicos de degradación física (tales como antioxidantes, agentes antihidrolíticos, bloqueadores de agregación, etc. Los antioxidantes pueden incluir BHT, BHA, vitaminas, ácido cítrico, EDTA, bisulfato de sodio, metabisulfato de sodio, tiourea, metionina, tensioactivos, aminoácidos, tales como arginina, glicina, histidina, sales de metionina, ajustadores de pH, agentes quelantes y tampones en forma seca o en solución), uno o más excipientes que pueden afectar la cinética de desintegración del comprimido y la liberación del fármaco del comprimido, y por lo tanto la farmacocinética (desintegrantes tales como los conocidos por los expertos en la técnica y pueden seleccionarse de un grupo que consiste en almidón, tipo de carboximetilcelulosa o polivinil pirrolidona entrecruzado (tal como povidona cruzada, PVP-XL), alginatos, desintegrantes a base de celulosa (tal como celulosa purificada, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio entrecruzada (Ac-Di-Sol) y carboximetilcelulosa), éteres de hidroxipropil celulosa de baja sustitución, celulosa microcristalina (tales como AVICEL®), resinas de intercambio iónico (tales como AMBRELITE® IPR 88), gomas (tales como agar, algarroba, karaya, pectina y tragacanto), gomas guar, goma karaya, quitina y quitosano, smecta, goma gellan, cáscara de isapghula, polacrilina potásica (Tulsion³³⁹), desintegrantes que evolucionan con gases (tales como ácido cítrico y ácido tartárico junto con bicarbonato de sodio, carbonato de sodio, bicarbonato de potasio o calcio carbonato), almidón glicolato de sodio (tal como EXPLOTAB® y PRIMOGEL®), almidón DC y similares, al menos un polímero biodegradable de cualquier tipo útil para la liberación prolongada de fármacos. Las composiciones poliméricas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, polianhídridos y copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico, poli(dl-lactida-co-glicólido) (PLGA), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poliortoésteres, proteínas y polisacáridos.

En ciertas realizaciones, los agentes activos pueden modificarse químicamente para modificar significativamente la farmacocinética en plasma. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante conjugación con poli(etilenglicol) (PEG), incluida la PEGilación específica del sitio. PEGilación, que puede mejorar el rendimiento del fármaco optimizando la farmacocinética, disminuyendo la inmunogenicidad y la frecuencia de dosificación.

También se proporcionan procedimientos para hacer una formulación de los agentes activos descritos en la presente memoria (por ejemplo, ASBI tales como galangina, rutina y análogos, derivados o profármacos de los mismos) para suministro GI o transmucosal oral. Un procedimiento incluye las etapas de molienda de polvo, mezcla de polvo seco y formación de comprimidos mediante compresión directa. Alternativamente, se puede usar un proceso de granulación en húmedo. Tal procedimiento (tal como el proceso de granulación de alto cizallamiento) implica mezclar el ingrediente activo y posiblemente algunos excipientes en un mezclador. El aglutinante puede ser uno de los excipientes añadidos en estado de mezcla seca o disuelto en el fluido utilizado para la granulación. La solución o suspensión de granulación se agrega a los polvos secos en el mezclador y se mezcla hasta lograr las características deseadas. Esto usualmente produce un gránulo que tendrá características adecuadas para producir formas de dosificación con un tiempo de disolución adecuado, uniformidad de contenido y otras características físicas. Después de la etapa de granulación en húmedo, el producto se seca con mayor frecuencia y/o luego se muele después del secado para obtener un porcentaje importante del producto dentro de un rango de tamaño deseado. A veces, el producto se seca después de un tamaño húmedo utilizando un dispositivo tal como un granulador oscilante o un molino. La granulación en seco puede procesarse para obtener un rango de tamaño aceptable mediante el primer cribado con un dispositivo de tamizado y luego moliendo las partículas de gran tamaño.

Además, la formulación puede fabricarse mediante procesos de granulación alternativos, todos conocidos por los expertos en la técnica, tales como granulación en lecho fluido por aspersión, extrusión y esferonización o granulación por rotor en lecho fluido.

Adicionalmente, la forma de dosificación de tableta de la invención puede prepararse recubriendo el comprimido primario fabricado como se describe anteriormente con recubrimientos adecuados conocidos en la técnica. Tales recubrimientos están destinados a proteger los núcleos activos contra daños (abrasión, rotura, formación de polvo) contra las influencias a las que están expuestos los núcleos durante el transporte y el almacenamiento (humedad atmosférica, fluctuaciones de temperatura), y naturalmente estos recubrimientos de película también se pueden colorear. El efecto de sellado de los recubrimientos de película contra el vapor de agua se expresa por la permeabilidad al vapor de agua. El recubrimiento se puede realizar mediante uno de los procesos disponibles, tales como recubrimiento Wurster, recubrimiento en seco, recubrimiento de película, recubrimiento de lecho fluido, recubrimiento de bandeja, etc. Los materiales de recubrimiento típicos incluyen polivinilpirrolidona (PVP), copolímero de polivinilpirrolidona y acetato de vinilo (PVPVA), alcohol polivinilo (PVA), copolímero de alcohol polivinílico/polietilenglicol (PVA/PEG), ftalato de acetato de celulosa, etilcelulosa, goma gellan, maltodextrina, metacrilatos, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC de todos los grados y pesos moleculares), carragenano, goma laca y similares.

En ciertas realizaciones, el núcleo del comprimido que comprende los agentes activos descritos en la presente memoria puede recubrirse con un material bioadhesivo y/o resistente al pH para permitir que el material, tal como los definidos anteriormente, mejore la bioadhesión del comprimido en la cavidad sublingual.

En ciertas realizaciones, los agentes activos descritos en la presente memoria (por ejemplo, ASBI tales como galangina, rutina y análogos, derivados o profármacos de los mismos) se formulan como complejos de inclusión. Si bien no se limita a los complejos de inclusión de ciclodextrina, se observa que la ciclodextrina es el agente más utilizado para formar complejos de inclusión farmacéuticos. Las ciclodextrinas (CD) son oligómeros cíclicos de glucosa, que típicamente contienen 6, 7 u 8 monómeros de glucosa unidos por enlaces α -1,4. Estos oligómeros se denominan comúnmente α -CD, β -CD y γ -CD, respectivamente. Se conocen oligómeros superiores que contienen hasta 12 monómeros de glucosa, y se contemplan en las formulaciones descritas en la presente memoria. También se contemplan complejos de inclusión de ciclodextrina funcionalizada. Las ciclodextrinas funcionalizadas ilustrativas pero no limitantes incluyen, pero no se limitan a sulfonatos, sulfonatos y sulfinatos, o disulfonatos de hidroxibutenil ciclodextrina; sulfonatos, sulfonatos y sulfinatos, o disulfonatos de éteres mixtos de ciclodextrinas donde al menos uno de los sustituyentes éter es hidroxibutenil ciclodextrina. Las ciclodextrinas ilustrativas incluyen un éter de polisacárido que comprende al menos un sustituyente de 2-hidroxibutenilo, en el que el al menos un sustituyente de hidroxibutenilo es sulfonado y sulfinado, o disulfonado, y un éter de alquilpoliglicósido el cual comprende al menos un sustituyente de 2-hidroxibutenilo, en el que el al menos un sustituyente hidroxibutenilo está sulfonado y sulfinado, o disulfonado. En diversas realizaciones, se contemplan complejos de inclusión formados entre hidroxibutenil ciclodextrinas sulfonadas y uno o más de los agentes activos descritos en este documento. Los procedimientos para preparar ciclodextrinas y los complejos de inclusión de ciclodextrina se encuentran, por ejemplo, en la publicación de patente U.S. No: 2004/0054164 y las referencias citadas en la misma y en la publicación de patente U.S. No: 2011/0218173 y las referencias citadas en la misma.

Farmacocinética (PK) y atributos de formulación

Una ventaja de las formulaciones orales de liberación prolongada (controlada) (GI o transmucosal) descritas en la presente memoria es que pueden mantener la concentración de fármaco en plasma dentro de una ventana terapéutica dirigida durante un tiempo más largo que con las formulaciones de liberación inmediata, ya sean formas de dosificación sólidas o formas de dosificación a base de líquido. Los altos niveles plasmáticos pico típicamente observados para tales formulaciones convencionales de liberación inmediata se verán reducidos por la liberación prolongada del fármaco durante 1 a 12 horas o más. Además, se evitará una disminución rápida en los niveles plasmáticos ya que el fármaco se cruzará continuamente desde la cavidad oral hacia el torrente sanguíneo durante el período de tiempo de disolución del comprimido, proporcionando así a la farmacocinética plasmática una meseta más estable. Además, las formas de dosificación descritas en la presente memoria pueden mejorar la seguridad del tratamiento al minimizar los efectos secundarios potencialmente perjudiciales debido a la reducción de los picos y valles en la farmacocinética del fármaco en plasma, que comprometen la seguridad del tratamiento.

En diversas realizaciones, las formulaciones transmucosas orales de los agentes activos descritos en la presente memoria diseñadas para evitar los niveles plasmáticos pico elevados de las formas de dosificación oral intravenosa y de liberación inmediata convencional utilizando la mucosa y controlando independientemente tanto la desintegración (o erosión) del comprimido como la disolución del fármaco y liberación del comprimido con el tiempo para proporcionar un perfil de suministro más seguro. Las formulaciones orales descritas en la presente memoria proporcionan dosis individuales repetitivas que incluyen una cantidad definida del agente activo.

Una ventaja de las formulaciones transmucosas orales bioadhesivas descritas en la presente memoria es que exhiben una biodisponibilidad altamente consistente y pueden mantener la concentración de fármaco en plasma dentro de una ventana terapéutica dirigida con una variabilidad significativamente menor durante una duración más larga que las formas de dosificación disponibles actualmente, ya sean formas de dosificación sólidas o formas de dosificación IV. Además, se evita una disminución rápida de los niveles plasmáticos, ya que el fármaco cruza continuamente desde la cavidad oral o el tracto GI hacia el torrente sanguíneo durante el período de tiempo de disolución del comprimido o más, proporcionando así la farmacocinética plasmática con una fase de meseta extendida en comparación con las formas de dosificación oral de liberación inmediata convencionales. Además, las

formas de dosificación descritas en la presente memoria pueden mejorar la seguridad del tratamiento al minimizar los efectos colaterales potencialmente nocivos debido a la reducción relativa de los picos y valles en la farmacocinética del fármaco en plasma, lo que compromete la seguridad del tratamiento y es típico de las formas de dosificación disponibles actualmente.

- 5 En diversas realizaciones, las formulaciones bioadhesivas descritas en la presente memoria pueden diseñarse para manipular y controlar el perfil farmacocinético de los agentes activos descritos en la presente memoria. Como tal, las formulaciones se pueden ajustar para lograr tiempos de desintegración "lentos" (y perfiles cinéticos de erosión) y una liberación lenta del fármaco y, por lo tanto, permitir perfiles farmacocinéticos muy prolongados que proporcionan una acción farmacológica sostenida. Aunque tales formulaciones pueden estar diseñadas para proporcionar un inicio
- 10 rápido, su objetivo principal es permitir la farmacocinética y el efecto sostenidos del fármaco, manteniendo los otros atributos de rendimiento de la tableta, tal como la bioadhesión, la reproducibilidad de la acción, la $C_{m\acute{a}x}$ disminuida, etc.

- El rendimiento y los atributos de las formulaciones transmucosas bioadhesivas de esta invención son independientes del proceso de fabricación. Se puede usar un número de procesos convencionales, bien establecidos y conocidos en la técnica para fabricar las formulaciones de la presente invención (tales como granulación en húmedo y en seco, compresión directa, etc.) sin afectar las propiedades fisicoquímicas de la forma de dosificación o el rendimiento *in vivo*.
- 15

- Una relación matemática ilustrativa que demuestra la fase de meseta prolongada de los niveles de plasma sanguíneo medidos de los agentes activos descritos en la presente memoria, después de la administración de las formas de dosificación de la invención es el término "Relación de Direccionamiento Terapéutico Óptimo" u "OTTR", que representa el tiempo promedio que el fármaco está presente a niveles terapéuticos, definido como el tiempo dentro del cual la concentración plasmática del fármaco se mantiene por encima del 50 % de la $C_{m\acute{a}x}$ normalizada por la semivida de eliminación del fármaco multiplicada por la relación de la $C_{m\acute{a}x}$ obtenida en la forma de dosificación de interés sobre la $C_{m\acute{a}x}$ normalizada después de la administración IV de dosis equivalentes. En ciertas realizaciones, la OTTR puede calcularse mediante la fórmula:
- 20
- 25

$$\text{OTTR} = (C_{m\acute{a}x}^{IV}/C_{m\acute{a}x}) \times (\text{Dosis}/\text{Dosis}^{IV}) (\text{Tiempo por encima del 50\% de } C_{m\acute{a}x}) / (\text{Semivida de eliminación terminal}^{IV} \text{ del fármaco}).$$

En ciertas realizaciones, la OTTR es mayor que aproximadamente 15, o mayor que aproximadamente 20, o mayor que aproximadamente 25, o mayor que aproximadamente 30, o mayor que aproximadamente 40, o mayor que aproximadamente 50.

30 **Administración**

- En ciertas realizaciones, uno o más agentes activos descritos en la presente memoria (por ejemplo, ASBI tales como galangina, rutina y análogos, derivados o profármacos de los mismos) se administran a un mamífero que lo necesita, por ejemplo, a un mamífero en riesgo o que padece un patología caracterizada por el procesamiento anormal de proteínas precursoras de amiloide, un mamífero en riesgo de progresión de MCI a la enfermedad de Alzheimer, y así sucesivamente. En ciertas realizaciones, los agentes activos se administran para prevenir o retrasar la aparición de una disfunción cognitiva pre-Alzheimer, y/o para mejorar uno o más síntomas de una disfunción cognitiva pre-Alzheimer, y/o para prevenir o retrasar la progresión de una afección pre-Alzheimer o disfunción cognitiva a la enfermedad de Alzheimer, y/o para promover el procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP) por una ruta no amiloidogénica. En ciertas realizaciones, se administran uno o más agentes activos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en etapa temprana, etapa media o etapa tardía, por ejemplo, para reducir la gravedad de la enfermedad y/o para mejorar uno o más síntomas de la enfermedad, y/o para retrasar la progresión de la enfermedad.
- 35
- 40

- En diversas realizaciones, los agentes activos descritos en la presente memoria (por ejemplo, ASBI tales como galangina, rutina y análogos, derivados o profármacos de los mismos) puede administrarse por cualquiera de un número de rutas. Así, por ejemplo, se pueden administrar por ruta oral, parenteral (intravenosa (IV), intramuscular (IM), depo-IM, por vía subcutánea (SQ) y depo-SQ), sublingual, intranasal (inhalación), intratecal, transdérmica (por ejemplo, a través del parche transdérmico), tópicamente, ionofóricamente o rectalmente. Típicamente, la forma de dosificación se selecciona para facilitar el suministro al cerebro (por ejemplo, paso a través de la barrera hematoencefálica). En este contexto, se observa que los compuestos descritos en la presente memoria se suministran fácilmente al cerebro. Las formas de dosificación conocidas por los expertos en la técnica son adecuadas para el suministro del compuesto.
- 45
- 50

- Los agentes activos se administran en una cantidad/régimen de dosificación suficiente para ejercer un efecto profiláctico y/o terapéuticamente útil en ausencia de efectos colaterales indeseables sobre el sujeto tratado. La cantidad específica/régimen de dosificación variará dependiendo del peso, el sexo, la edad y la salud del individuo; la formulación, la naturaleza bioquímica, la bioactividad, la biodisponibilidad y los efectos colaterales del compuesto particular.
- 55

En ciertas realizaciones, la cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva puede determinarse empíricamente probando los agentes en sistemas modelo *in vitro* e *in vivo* conocidos para el trastorno tratado. Se puede determinar una dosis terapéutica o profilácticamente efectiva administrando primero una dosis baja, y luego aumentando gradualmente hasta alcanzar una dosis que logre el efecto deseado con efectos colaterales mínimos o no deseados.

5 En ciertas realizaciones, cuando se administra por vía oral, una cantidad administrada de los agentes descritos en la presente memoria es efectiva para prevenir o retrasar la aparición de una disfunción cognitiva pre-Alzheimer y/o para mejorar uno o más síntomas de una disfunción cognitiva pre-Alzheimer y/o para prevenir o retrasar la progresión de una afección pre-Alzheimer o disfunción cognitiva a la enfermedad de Alzheimer, y/o para promover el procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP) por una ruta no amiloidogénica, y/o para tratar o prevenir
10 AD varía de aproximadamente 0,1 mg/día a aproximadamente 500 mg/día o aproximadamente 1.000 mg/día, o 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 algunas realizaciones, al sujeto se le administra el compuesto a una dosis de aproximadamente 0,05 a
15 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 comenzar con una dosis, esa dosis puede variar (aumentarse o disminuirse, según corresponda) con el tiempo a medida que cambia la afección del paciente. Dependiendo de las evaluaciones de resultados, se pueden usar dosis más altas. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se pueden administrar 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.

20 En diversas realizaciones, los agentes activos descritos en este documento pueden administrarse por vía parenteral, por ejemplo, por IV, IM, depo-IM, SC o depo-SC. Cuando se administra parenteralmente, debe administrarse una cantidad terapéuticamente efectiva de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 mg/día, preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg diarios. 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
25 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 depo.

En diversas realizaciones, los agentes activos descritos en este documento pueden administrarse sublingualmente. Cuando se administran por vía sublingual, los compuestos y/o análogos de los mismos se pueden administrar de una a cuatro veces al día en las cantidades descritas anteriormente para la administración IM.
30

En diversas realizaciones, los agentes activos descritos en este documento pueden administrarse por vía intranasal. Cuando se administran por esta ruta, las formas de dosificación apropiadas son un aerosol nasal o polvo seco, como saben los expertos en la técnica. La dosificación del compuesto y/o análogo del mismo para administración intranasal es la cantidad descrita anteriormente para administración IM.

35 En diversas realizaciones, los agentes activos descritos en la presente memoria se pueden administrar intratecalmente. Cuando se administra por esta ruta, la forma de dosificación apropiada puede ser una forma de dosificación parenteral, como saben los expertos en la técnica. La dosificación del compuesto y/o análogo del mismo para administración intratecal es la cantidad descrita anteriormente para administración IM.

40 En ciertas realizaciones, los agentes activos descritos en la presente memoria puede administrarse tópicamente. Cuando se administra por esta ruta, la forma de dosificación apropiada es una crema, ungüento o parche. Cuando se administra tópicamente, la dosificación es de aproximadamente 1,0 mg/día a aproximadamente 200 mg/día. Debido a que la cantidad que puede suministrar un parche es limitada, se pueden usar dos o más parches. El número y el tamaño del parche no es importante, lo que es importante es que se suministre una cantidad terapéuticamente efectiva de compuesto como es conocido por los expertos en la técnica. El compuesto puede
45 administrarse por vía rectal mediante supositorio como es conocido por los expertos en la técnica. Cuando se administra mediante supositorio, la cantidad terapéuticamente efectiva es de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 500 mg.

50 En diversas realizaciones, los agentes activos descritos en la presente memoria pueden administrarse mediante implantes como es conocido por los expertos en la técnica. Cuando se administra el compuesto por implante, la cantidad terapéuticamente efectiva es la cantidad descrita anteriormente para la administración por depósito.

En diversas realizaciones, las formas de dosificación pueden administrarse al sujeto 1, 2, 3 o 4 veces al día. Se prefiere que el compuesto se administre tres o menos veces, más preferiblemente una o dos veces al día. Se prefiere que los agentes se administren en forma de dosificación oral.

55 Debería ser evidente para un experto en la técnica que la dosificación exacta y la frecuencia de administración dependerán de la afección particular que se esté tratando, la gravedad de la afección que se esté tratando, la edad, el peso, la condición física general del paciente particular y otros medicamentos que el individuo puede estar tomando, como es bien sabido por los médicos administradores quienes son expertos en esta técnica.

Si bien las composiciones y los procedimientos se describen en la presente memoria con respecto al uso en humanos, también son adecuados para animales, por ejemplo, uso veterinario. Por lo tanto, ciertos organismos preferidos incluyen, pero no se limitan a humanos, primates no humanos, caninos, equinos, felinos, porcinos, ungulados, largomorfos y similares.

- 5 Las formulaciones y procedimientos de administración anteriores pretenden ser ilustrativos y no limitativos. Se apreciará que, utilizando las enseñanzas proporcionadas en la presente memoria, se pueden diseñar fácilmente otras formulaciones y modos de administración adecuados.

Terapias de combinación

10 En ciertas realizaciones, los agentes activos descritos en la presente memoria (por ejemplo, ASBIs tales como galangina, rutina y análogos, derivados o profármacos de los mismos) se pueden usar en combinación con otros agentes terapéuticos o enfoques utilizados para tratar o prevenir enfermedades caracterizadas por depósitos de amiloide en el cerebro, incluidos MCI y/o AD. Tales agentes o enfoques incluyen: inhibidores de acetilcolinesterasa (que incluyen sin limitación, por ejemplo, enantiómero de (-)-fenerina, tacrina, ipidacrina, galantamina, donepezil, icopezil, zanapezil, rivastigmina, huperzina A, fenserina, fisostigmina, neostigmina, piridostigmina, marmarina, ambenonium, demarcarium, edrofonio, ladostigilo y ungeremina); Antagonista del receptor de NMDA (que incluyen sin limitación, por ejemplo, Memantina); agonistas de los receptores muscarínicos (que incluye sin limitación, por ejemplo Talsaclidina, AF-102B, AF-267B (NGX-267)); agonistas del receptor nicotínico (que incluyen sin limitación, por ejemplo Ispronidina (AZD-3480)); inhibidores de beta-secretasa (que incluyen sin limitación, por ejemplo, tiazolidinedionas, que incluyen rosiglitazona y pioglitazona); inhibidores de la gamma-secretasa (que incluyen sin limitación, por ejemplo, semagacestat (LY-450139), MK-0752, E-2012, BMS-708163, PF-3084014, begacestat (GSI-953) y NIC₅₋₁₅); inhibidores de la agregación de A β (que incluyen sin limitación, por ejemplo clioquinol (PBT1), PBT2, tramiprosato (homotaurina), Scyllo-inositol (también conocido como scyllo-cyclohexanehexol, AZD-103 y ELND-005), inmunoterapia pasiva con fragmentos A β (que incluyen sin limitación, por ejemplo, Bapineuzemab) y Epigallocatequina-3-galato (EGCg)); agentes antiinflamatorios tales como inhibidores de la ciclooxigenasa II; antioxidantes tales como vitamina E y ginkólidos; enfoques 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 tales como Cerebrolysin™, AIT-082 (Emilieu (2000) Arch. Neurol. 57: 454), Netrin (Luorenco (2009) Cell Death Differ 16: 655-663), Netrin mimetics, NGF, NGF miméticos, BDNF y otros agentes neurotróficos del futuro, agentes que promueven la neurogénesis, por ejemplo terapia con células madre. Agentes farmacológicos adicionales útiles en combinación con tropisetron, disulfiram, honokiol y/o nimetazepam para tratar o prevenir enfermedades caracterizadas por depósitos amiloides en el cerebro, incluyendo MCI y/o AD, se describen, por ejemplo, en Mangialasche, *et al.*, Lancet Neurol (2010) 9: 702-716.

En diversas realizaciones, la terapia de combinación con uno o más de los agentes activos descritos en la presente memoria excluye expresamente la administración de estos agentes junto con un inhibidor de acetilcolinaesterasa.

Uso de los ASBI en la degeneración macular relacionada con la edad y el glaucoma.

Mientras que en diversas formas de realización, se contempla el uso de los ASBI para prevenir o retrasar la aparición de una afección pre-Alzheimer y/o disfunción cognitiva, y/o mejorar uno o más síntomas de una afección pre-Alzheimer y/o disfunción cognitiva, o para prevenir o retrasar la progresión de una afección pre-Alzheimer o disfunción cognitiva a la enfermedad de Alzheimer, y/o para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, también se contemplan otros usos de los ASBI. En particular, en ciertas realizaciones, se contempla el uso de los ASBI para el tratamiento y/o la profilaxis de la degeneración macular relacionada con la edad y/o el glaucoma.

Sin estar ligado a una teoría particular, se cree que el depósito extracelular anormal de proteínas puede contribuir a la patogénesis y progresión de la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE), lo cual también es el caso en la enfermedad de Alzheimer y la aterosclerosis. En ambas condiciones, los depósitos de proteínas contienen muchos constituyentes compartidos tales como apoE, complemento y péptidos A β . Por ejemplo, en la AMD humana, la deposición del péptido A β está asociada con drusas, donde se acumula y colocaliza con componentes del complemento activados (Anderson *et al.* (2004) Exp. Eye. Res., 78:243-256; Dentchev *et al.* (2003) Mol. Vis., 9: 184-190; Johnson *et al.* (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99: 11830-11835.). Luibl *et al.* (2006) J. Clin. Invest., 116: 378-385, mostraron la presencia de oligómeros amiloides potencialmente tóxicos en drusas, depósitos basales sub-RPE y RPE de ojos de donantes humanos usando un anticuerpo que reconoce específicamente la forma oligomérica de A β . Estos oligómeros A β no se detectaron en los ojos de donantes de control de edad coincidente sin drusas. Isas *et al.* (2010) Invest. Ophthalmol Vis. Sci., 51: 1304-1310, también detectaron fibrillas A β tanto solubles como maduras en drusas. Colectivamente, estos hallazgos implican a A β en la patogénesis de la AMD. Además, se ha detectado el péptido A β en depósitos basales sub-RPE y lesiones neovasculares en un modelo murino de AMD (Ding *et al.* (2008) Vision Res., 48: 339-345; Malek *et al.* (2005) Proc Natl Acad Sci USA, 102: 11900-11905). En este modelo, los ratones de reemplazo direccionados a APOE4 humanos envejecidos (ratones APOE4) alimentados con una dieta rica en grasas y rica en colesterol (HFC) (ratones APOE4-HFC) exhiben características morfológicas observadas tanto en la AMD húmeda como en la seca. Estas características incluyen depósitos sub-RPE gruesos difusos, depósitos focales similares a drusas que contienen lípidos y proteínas, engrosamiento de la membrana de Bruch, regiones irregulares de atrofia de RPE opuestas a áreas de degeneración de fotorreceptores y CNV (Malek *et al.*

(2005) Proc Natl Acad Sci USA, 102: 11900-11905). Se cree que, en el modelo de ratón APOE4-HFC de AMD, la acumulación de A β provoca daños a nivel de RPE/coroides y se ha demostrado previamente que la administración sistémica de anticuerpos anti-A β 40 específicos puede atenuar parcialmente la disminución de la función visual exhibido en este modelo (Ding *et al.* (2008) Vision Res., 48: 339-345). También se ha demostrado que la inmunoterapia anti-A β direccionada simultáneamente tanto a A β 40 como a A β 42 bloquea los cambios histopatológicos y protege completamente la función visual en ratones APOE4-HFC (Ding *et al.* (2011) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 108 (28): E279-E287).

Sin estar ligado a una teoría particular, se cree que el procesamiento de APP a A β en el ojo ocurre por las actividades de BACE y γ -secretasa en la retina y las capas de células epiteliales pigmentadas de la retina (RPE) y que sAPP α y A β se secretan en el humor vítreo (véase, por ejemplo, (Prakasam *et al.* (2008) J. Alzh. Dis., 20: 1243-1253). A β se transporta adicionalmente al humor acuoso donde se mide fácilmente.

En vista de estos hallazgos, se cree que los ASBI, por ejemplo, como se describe en este documento, pueden encontrar uso en el tratamiento o la profilaxis de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y/o el glaucoma. En consecuencia, se cree que los ASBI se pueden administrar a un sujeto para disminuir o prevenir la aparición de AMD (y/o glaucoma), y/o para reducir uno o más síntomas de AMD, y/o para disminuir, detener o revertir la progresión de la enfermedad. En diversas realizaciones, uno o más ASBI (por ejemplo, uno o más de los agentes activos descritos en este documento) se administran a un sujeto (por ejemplo, un humano, un mamífero no humano) para estos fines. Como se describió anteriormente, en diversas realizaciones, el ASBI se administra a través de una ruta seleccionada del grupo que consiste en administración oral, administración isofóretica, suministro transdérmico, administración parenteral, administración en aerosol, administración por inhalación, administración intravenosa y administración rectal.

En ciertas realizaciones, la administración es directamente al ojo. Así, por ejemplo, en ciertas realizaciones, los agentes pueden administrarse al ojo en forma de gotas para los ojos, mediante inyección intraocular, y similares.

Típicamente, los ASBI se administran en una cantidad efectiva para el tratamiento y/o la profilaxis de AMD o glaucoma, donde la cantidad efectiva variará según la modalidad de administración. En ciertas realizaciones, la cantidad efectiva es una cantidad suficiente para mitigar en un mamífero uno o más síntomas asociados con la degeneración macular relacionada con la edad (AMD). En ciertas realizaciones, la cantidad efectiva es una cantidad, una cantidad suficiente para reducir el riesgo o retrasar la aparición, y/o reducir la gravedad final de una enfermedad de AMD (o glaucoma) caracterizada por la reducción de A β en el humor vítreo y/o acuoso y/o los depósitos de amiloide en la retina y/o la capa de células RPE.

Sistemas de ensayo para evaluar el procesamiento de APP

Sin estar limitado a una teoría particular, se cree que los agentes activos descritos en este documento (por ejemplo, ASBIs tales como galangina, rutina y análogos, derivados o profármacos de los mismos) promueven el procesamiento de APP por la ruta no amiloidogénica y/o reduce o inhibe el procesamiento de APP por la ruta amiloidogénica. En la ruta no amiloidogénica, la APP se escinde primero por la α -secretasa dentro de la secuencia A β , liberando el ectodominio de APP α ("sAPP α "). En contraste, la ruta amiloidogénica se inicia cuando la β -secretasa escinde la APP en el terminal amino del A β , liberando así el ectodominio de APP β ("sAPP β "). El procesamiento de APP por las rutas no amiloidogénicas y amiloidogénicas es conocido en la técnica y revisado, por ejemplo, por Xu (2009) J Alzheimers Dis., 16 (2): 211-224, y De Strooper, *et al.* (2010 Nat Rev Neurol 6 (2): 99-107).

Un procedimiento para evaluar la eficacia de los agentes activos es determinar una reducción o eliminación en el nivel de procesamiento de APP por la ruta amiloidogénica, por ejemplo, una reducción o eliminación en el nivel de procesamiento de APP por escisión de la β -secretasa en respuesta a la administración de los agentes de interés. Los ensayos para determinar el grado de escisión de APP en el sitio de escisión de β -secretasa son bien conocidos en la técnica. Se describen ensayos ilustrativos, por ejemplo, en la patente U.S. Nos. 5.744.346 y 5.942.400. Kits para determinar la presencia y los niveles en una muestra biológica de sAPP α y sAPP β , así como APPneo y A β comercialmente disponibles, por ejemplo, de PerkinElmer.

Ensayo ASBI.

La actividad ASBI de cualquiera de los compuestos descritos en la presente memoria puede verificarse fácilmente usando, por ejemplo, ensayos ilustrados en los ejemplos proporcionados en la presente memoria. Básicamente, en ciertas realizaciones se utilizan un par de ensayos para identificar compuestos que inhiben la escisión de BACE del sustrato de APP MBP-C125, lo que da como resultado la inhibición de la producción de C99 pero no del sustrato del péptido del sitio β (P5-P5').

Como se ilustra en los Ejemplos, en una realización, una proteína de fusión MBP-C125 APP695wt puede usarse como uno de los sustratos. El segundo sustrato puede ser el sustrato de fluorescencia P5-P5' disponible comercialmente. Cada uno de estos sustratos se incuba con BACE recombinante (R&D (cat # 931-AS-050) en, por ejemplo, un formato de placa de 96 pocillos. Para el sustrato MBP-C125, el producto C-99 de la escisión de BACE se puede medir usando un ensayo AlphaLisa como lectura. Para el sustrato P5-5', la pérdida de fluorescencia tras la

escisión de BACE se puede usar como lectura. Un ASBI inhibiría la escisión de BACE del sustrato MBP-C125 sin inhibir el sustrato de fluorescencia.

Otros ensayos sin células

5 Los ensayos ilustrativos que se pueden usar para demostrar la actividad inhibitoria de los agentes activos se describen, por ejemplo, en los documentos WO 00/17369, WO 00/03819 y U.S. Pat. Nos. 5.942.400 y 5.744.346. Tales ensayos pueden realizarse en incubaciones sin células o en incubaciones celulares usando células que expresan una alfa-secretasa y/o beta-secretasa y un sustrato de APP que tiene sitios de escisión de alfa-secretasa y beta-secretasa.

10 En una realización ilustrativa, los agentes de interés se ponen en contacto con un sustrato de APP que contiene sitios de escisión de alfa-secretasa y 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 de polipéptido sintético o recombinante que tiene actividad de alfa-secretasa o beta-secretasa y eficaz para escindir los sitios de escisión de alfa-secretasa o beta-secretasa de APP, bajo condiciones de incubación adecuadas para la actividad de escisión de la enzima. Los agentes que tienen la actividad deseada reducen o evitan la escisión del sustrato de APP. Los sustratos adecuados incluyen opcionalmente derivados que pueden ser proteínas de fusión o péptidos que contienen 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 epítipo antigénico conocido para la unión de anticuerpos; la unión de un marcador o fracción detectable, el enlazamiento de un sustrato de unión y similares.

15 Las condiciones de incubación adecuadas para un ensayo *in vitro* libre de células incluyen, por ejemplo: aproximadamente sustrato 200 nanomolar a 10 micromolar, aproximadamente enzima 10 a 200 picomolar, y aproximadamente 0,1 nanomolar a 10 micromolar de los agentes, 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 ejemplares, y se pueden variar según sea necesario para los componentes de ensayo particulares y/o el sistema de medición deseado. La optimización de las condiciones de incubación de los componentes del ensayo en particular debe tener en cuenta la enzima alfa-secretasa y/o beta-secretasa específica utilizada y su pH óptimo, cualquier enzima y/o marcador adicional que pueda usarse en el ensayo, y similares. Tal optimización es rutinaria y no requerirá una experimentación indebida.

20 Otro ensayo ilustrativo utiliza un péptido de fusión que tiene proteína de unión a maltosa (MBP) fusionada a los 125 aminoácidos del terminal C 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 da como resultado la escisión del sustrato en los sitios de escisión de alfa-secretasa y/o beta-secretasa, respectivamente. Este sistema se puede usar para cribar la actividad inhibitoria de los agentes de interés. El análisis de la actividad de escisión puede ser, por ejemplo, por inmunoensayo de productos de escisión. Uno de tales inmunoensayos detecta un epítipo único expuesto en el terminal carboxi de la proteína de fusión escindida, por ejemplo, usando el anticuerpo SW192. Este ensayo se describe, por ejemplo, en la patente U.S. No. 5.942.400.

Ensayos celulares

25 Se pueden usar numerosos ensayos basados en células para evaluar la actividad de los agentes de interés en la actividad alfa-secretasa relativa a la actividad beta-secretasa y/o el procesamiento de APP para liberar oligómeros A β amiloidogénicos versus 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 de los agentes puede usarse para demostrar la actividad promotora de alfa-secretasa y/o inhibitoria de beta-secretasa del agente(). Preferiblemente, el ensayo en presencia de los agentes proporciona al menos aproximadamente 30 %, lo más preferiblemente al menos aproximadamente 50 % de inhibición de la actividad enzimática, en comparación con un control no inhibido.

30 En una realización, se usan células que expresan naturalmente alfa-secretasa y/o beta-secretasa. Alternativamente, las células se modifican para expresar una alfa-secretasa y/o beta-secretasa recombinante o enzimas variantes sintéticas, como se discutió anteriormente. El sustrato de APP se puede agregar al medio de cultivo y se expresa preferiblemente en las células. Se pueden usar células que expresan 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 APP sintético o proteína de fusión que contiene la alfa-secretasa y/o sitios de escisión de APP de beta-secretasa, siempre que se permita que la APP expresada entre en contacto con la enzima y se pueda analizar la actividad de escisión enzimática.

35 Las líneas celulares humanas que normalmente procesan A β a partir de APP proporcionan un medio útil para analizar las actividades inhibitorias de los agentes. La producción y liberación de A β y/u otros productos de escisión en el medio de cultivo se pueden medir, por ejemplo, por inmunoensayo, tal como inmunotransferencia Western o inmunoensayo enlazado a enzimas (EIA), tales como por ELISA.

Las células que expresan un sustrato de APP y una alfa-secretasa y/o beta-secretasa activa pueden incubarse en presencia de los agentes para demostrar la actividad enzimática relativa de la alfa-secretasa y/o la beta-secretasa en comparación con un control. La actividad relativa de la alfa-secretasa con respecto a la beta-secretasa se puede medir 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 beta-secretasa contra la APP de sustrato disminuya la liberación de productos de escisión de APP inducidos por beta-secretasa específicos tales como A β , sAPP β y APPneo. Se esperaría que la promoción o mejora de la actividad de alfa-secretasa contra la APP de sustrato aumente la liberación de productos de escisión de APP inducidos por alfa-secretasa específicos tales como sAPP α y péptido 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 frecuentemente difíciles de detectar por EIA. Por lo tanto, se prefiere el uso de tipos celulares que se sabe que tienen actividad beta-secretasa mejorada, procesamiento mejorado de APP a A β y/o producción mejorada de A β . Por ejemplo, la transfección de células con la forma Sueca mutante de APP (APP-SW); con la forma mutante de Indiana (APP-IN); o con APP-SW-IN proporciona células que tienen una actividad beta-secretasa mejorada y producen cantidades de A β que pueden medirse fácilmente.

En tales ensayos, por ejemplo, las células que expresan APP, alfa-secretasa y/o beta-secretasa se incuban en un medio de cultivo bajo condiciones adecuadas para la actividad enzimática de alfa-secretasa y/o beta-secretasa en su sitio de escisión en el sustrato de APP. En la exposición de las células a los agentes, 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 se pueden analizar, por ejemplo, mediante reacciones inmunes con anticuerpos específicos, como se discutió 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 donde el transgén es APP y otras células tales como las de una línea celular estable 293 que expresa APP, por ejemplo, APP-SW.

Ensayos *in vivo*: modelos animales

Se pueden usar diversos modelos animales para analizar la actividad de los agentes 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, los animales transgénicos que expresan sustrato de APP, alfa-secretasa y/o enzima beta-secretasa se pueden usar para demostrar la actividad inhibitoria de los agentes. Ciertos modelos animales transgénicos se han descrito, por ejemplo, en la patente U.S. Nos. 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 exhiben características asociadas con la fisiopatología de la AD. La administración de los agentes a los ratones transgénicos descritos en este documento proporciona un procedimiento alternativo para demostrar la actividad inhibitoria de los agentes. También se prefiere la administración de los agentes en un vehículo farmacéuticamente efectivo y a través de una ruta administrativa que alcanza el tejido objetivo en una cantidad terapéutica apropiada.

La inhibición de la escisión mediada por beta-secretasa de APP en el sitio de escisión de beta-secretasa y de la liberación de A β se puede analizar en estos animales mediante la medición de fragmentos de escisión en los fluidos corporales del animal, tales como fluidos o tejidos cerebrales. Del mismo modo, la promoción o la mejora de la escisión mediada por alfa-secretasa de APP en el sitio de escisión de alfa-secretasa y la liberación de sAPP α se pueden analizar en estos animales mediante la medición de fragmentos de escisión en los fluidos corporales del animal, tales como fluido o tejidos cerebrales. En ciertas realizaciones, se prefiere el análisis de tejidos cerebrales para depósitos o placas de A β .

Al poner en contacto un sustrato de APP con una enzima alfa-secretasa y/o beta-secretasa en presencia de los agentes bajo condiciones suficientes para permitir la escisión mediada enzimáticamente de APP y/o la liberación de A β del sustrato, los agentes deseables son efectivos para reducir la escisión mediada por beta-secretasa de APP en el sitio de escisión de beta-secretasa y/o efectivos para reducir las cantidades liberadas de A β . Los agentes también son preferiblemente efectivos para mejorar la escisión de APP mediada por alfa-secretasa en el sitio de escisión de alfa-secretasa y para aumentar las cantidades liberadas de sAPP α . Cuando tal contacto es la administración de los agentes a un modelo animal, por ejemplo, como se describe anteriormente, los agentes son efectivos para reducir la deposición de A β en los tejidos cerebrales del animal y para reducir el número y/o tamaño de las placas beta amiloides. Cuando tal administración es a un sujeto humano, los agentes son efectivos para inhibir o ralentizar la progresión de la enfermedad caracterizada por cantidades potenciadas de A β , ralentizar la progresión de AD en el, y/o prevenir el inicio o desarrollo de AD en un paciente en riesgo de la enfermedad.

Procedimientos de monitorización de la eficacia clínica

En diversas realizaciones, la efectividad del tratamiento se puede determinar comparando una medida de línea base de un parámetro de la enfermedad antes de comenzar la administración de los agentes (por ejemplo, ASBIs tales como galangina, rutina y análogos, derivados o profármacos de los mismos) al mismo parámetro uno o más puntos de tiempo después de que se hayan administrado los agentes o análogos. Un parámetro ilustrativo que se puede medir es un biomarcador (por ejemplo, un péptido oligómero) del procesamiento de APP. Tales biomarcadores incluyen, pero no se limitan a, niveles aumentados de sAPP α , 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 fluido cerebroespinal (CSF). La detección de niveles aumentados de sAPP α y/o p3, y niveles disminuidos de sAPP β y/o APPneo es un indicador de que el tratamiento es efectivo. Por el contrario, la detección de niveles reducidos de sAPP α y/o p3, y/o niveles elevados de sAPP β , APPneo, Tau o fosfo-Tau (pTau) es un indicador de que el tratamiento no es efectivo.

5 Otro parámetro para determinar la efectividad del tratamiento es el nivel de depósitos de placa amiloide en el cerebro. Las placas de amiloide se pueden determinar usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, como se determina por CT, PET, PIB-PET y/o MRI. La administración de los agentes (por ejemplo, ASBIs como galangina, rutina y análogos, derivados o profármacos de los mismos) puede dar como resultado una reducción en la tasa de formación de placa, e incluso una retracción o reducción de depósitos de placa en el cerebro. La efectividad del tratamiento también se puede determinar observando una estabilización y/o mejora de las capacidades cognitivas del sujeto. Las habilidades cognitivas se pueden evaluar utilizando cualquier procedimiento aceptado en la técnica, que incluye, por ejemplo, la Clasificación de Demencia Clínica (CDR), el miniexamen del estado mental (MMSE) o la prueba de Folstein, los criterios de evaluación listados en el DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Cuarta edición) o DSM-V, y similares.

15 La eficacia clínica se puede monitorizar utilizando cualquier procedimiento conocido en la técnica. Los biomarcadores medibles para monitorizar la eficacia incluyen, pero no se limitan a, monitorización de los niveles de sangre, plasma, suero, orina, mucosa o fluido cerebroespinal (CSF) de sAPP α , sAPP β , A β 42, A β 40, APPneo y p3 (por ejemplo, A β 17-42 o A β 17-40). La detección de niveles aumentados de sAPP α y/o p3, y niveles disminuidos de sAPP β y/o APPneo son indicadores de que el régimen de tratamiento o prevención es eficaz. Por el contrario, la detección de niveles disminuidos de sAPP α y/o p3, y niveles elevados de sAPP β y/o APPneo son indicadores de que el tratamiento o el régimen de 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 el régimen de tratamiento o prevención es eficaz.

25 La eficacia también se puede determinar midiendo la carga de placa amiloide en el cerebro. El régimen de tratamiento o prevención se considera eficaz cuando la carga de placa amiloide en el cerebro no aumenta o se reduce. Por el contrario, el régimen de tratamiento o prevención se considera ineficaz cuando aumenta la carga de placa amiloide en el cerebro. La carga de placa amiloide se puede determinar usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, incluyendo CT, PET, PIB-PET y/o MRI.

30 La eficacia también se puede determinar midiendo las habilidades cognitivas del sujeto. Las habilidades cognitivas se pueden medir utilizando cualquier procedimiento conocido en la técnica. Las pruebas ilustrativas incluyen la asignación de un puntaje de Clasificación de Demencia Clínica (CDR) o la aplicación del miniexamen del estado mental (MMSE) (Folstein, *et al.*, Journal of Psychiatric Research 12 (3): 189-98). Los sujetos que mantienen el mismo puntaje o quienes logran un puntaje mejorado, por ejemplo, cuando aplican la CDR o MMSE, indican que el tratamiento o el régimen de prevención es eficaz. Por el contrario, los sujetos que reciben un puntaje que indica capacidades cognitivas disminuidas, por ejemplo, al aplicar la CDR o MMSE, indican que el tratamiento o el régimen de prevención no ha sido eficaz.

40 En ciertas realizaciones, los procedimientos de monitorización pueden implicar determinar un valor de línea base de un biomarcador o parámetro medible (por ejemplo, carga de placa amiloide o habilidades cognitivas) en un sujeto antes de administrar una dosificación de los agentes y compararlo con un valor para el mismo biomarcador o parámetro medible después del tratamiento.

45 En otros procedimientos, se determina un valor de control (por ejemplo, una media y una desviación estándar) del biomarcador o parámetro medible para una población de control. En ciertas realizaciones, los individuos en la población de control no han recibido tratamiento previo y no tienen AD, MCI, ni corren el riesgo de desarrollar AD o MCI. En tales casos, si el valor del biomarcador medible o el parámetro clínico se aproxima al valor de control, entonces el tratamiento se considera eficaz. En otras realizaciones, los individuos en la población de control no han recibido tratamiento previo y han sido diagnosticados con AD o MCI. En tales casos, si el valor del biomarcador medible o el parámetro clínico se aproxima al valor de control, entonces el tratamiento se considera ineficaz.

50 En otros procedimientos, un sujeto que actualmente no recibe tratamiento pero que se sometió a un curso previo de tratamiento es monitorizado por uno o más de los biomarcadores o parámetros clínicos para determinar si se requiere reanudar el tratamiento. El valor medido de uno o más de los biomarcadores o parámetros clínicos en el sujeto puede compararse con un valor alcanzado previamente en el sujeto después de un curso previo de tratamiento. Alternativamente, el valor medido en el sujeto puede compararse con un valor de control (media más desviación estándar/ANOVA) determinado en la población de sujetos después de someterse a un curso de tratamiento. Alternativamente, el valor medido en el sujeto puede compararse con un valor de control en poblaciones de sujetos tratados profilácticamente quienes permanecen sin síntomas de enfermedad, o poblaciones de sujetos tratados terapéuticamente quienes muestran una mejora de las características de la enfermedad. En tales casos, si el valor del biomarcador medible o el parámetro clínico se aproxima al valor de control, entonces el tratamiento se considera eficaz y no necesita reanudarse. En todos estos casos, una diferencia significativa en relación con el nivel de control (por ejemplo, más de una desviación estándar) es un indicador de que el tratamiento debe reanudarse en el sujeto.

En ciertas realizaciones, la muestra de tejido para análisis es típicamente sangre, plasma, suero, orina, mucosa o fluido cerebroespinal del sujeto.

Kits.

5 En diversas realizaciones, los agentes activos (por ejemplo, Inhibidor de BACE específico de APP (ASBI) tales como galangina, rutina y análogos, derivados, un tautómero o estereoisómero del mismo, o profármaco del mismo como se describe en la presente memoria) puede incluirse en recipientes de dosis múltiples o individuales. Los agentes incluidos se pueden proporcionar en kits, por ejemplo, que incluyen partes componentes que se pueden ensamblar para su uso. Por ejemplo, un agente activo en forma liofilizada y un diluyente adecuado pueden proporcionarse como componentes separados para la combinación antes de su uso. Un kit puede incluir un agente activo y un
 10 segundo agente terapéutico para la coadministración. El agente activo y el segundo agente terapéutico pueden proporcionarse como partes componentes separadas. Un kit puede incluir una pluralidad de recipientes, cada recipiente con una o más dosis unitarias de los compuestos. Los recipientes se adaptan preferiblemente para el modo de administración deseado, que incluye, pero no se limita a comprimidos, cápsulas de gel, cápsulas de liberación sostenida y similares para administración oral; productos de depósito, jeringas precargadas, ampollas, viales y similares para administración parenteral; y parches, plantillas médicas, cremas y similares para administración tópica, por ejemplo, como se describe en la presente memoria.

En ciertas realizaciones, se proporciona un kit en el que el kit comprende: uno o más compuestos ASBI descritos en la presente memoria, o profármaco, un tautómero o estereoisómero del mismo, o sal o solvato farmacéuticamente aceptable de dicho compuesto, dicho estereoisómero, o dicho tautómero o profármaco preferiblemente
 20 proporcionado como una composición farmacéutica y en un recipiente o recipientes adecuados y/o con un empaque adecuado; opcionalmente uno o más agentes activos adicionales, los cuales si están presentes se proporcionan preferiblemente como una composición farmacéutica y en un recipiente o recipientes adecuados y/o con un empaque adecuado; y opcionalmente instrucciones de uso, por ejemplo instrucciones escritas sobre cómo administrar el compuesto o las composiciones.

25 En otra realización, se proporciona un kit que comprende un recipiente individual o recipientes múltiples: (a) una composición farmacéuticamente aceptable que comprende uno o más compuestos ASBI descritos y/o reivindicados en la presente memoria, o un tautómero o estereoisómero de los mismos, o sal o solvato farmacéuticamente aceptable de dicho compuesto, dicho estereoisómero o dicho tautómero, opcionalmente una composición farmacéuticamente aceptable que comprende uno o más agentes terapéuticos adicionales; y opcionalmente
 30 instrucciones para usar su uso. El kit puede comprender opcionalmente el etiquetado (por ejemplo, materiales de instrucción) apropiado para el uso o usos previstos.

Como con cualquier producto farmacéutico, los materiales de empaque y/o recipientes están diseñados para proteger la estabilidad del producto durante el almacenamiento y el envío. Además, los kits pueden incluir instrucciones de uso u otro material informativo que pueda aconsejar al usuario, tal como, por ejemplo, un médico,
 35 técnico o paciente, con respecto a cómo administrar adecuadamente las composiciones como tratamiento profiláctico, terapéutico o de mejora de la enfermedad de interés. En algunas realizaciones, las instrucciones pueden indicar o sugerir un régimen de dosificación que incluye, pero no se limita a, dosis reales y procedimientos de monitorización.

En algunas realizaciones, las instrucciones pueden incluir material informativo que indica que la administración de las composiciones puede dar como resultado reacciones adversas que incluyen, pero no se limitan a, reacciones alérgicas tales como, por ejemplo, anafilaxia. El material informativo puede indicar que las reacciones alérgicas pueden presentarse solo como erupciones cutáneas pruriginosas leves o pueden ser graves e incluyen eritrodermia, vasculitis, anafilaxia, síndrome de Steven-Johnson y similares. En ciertas realizaciones, los materiales informativos pueden indicar que la anafilaxia puede ser fatal y puede ocurrir cuando se introduce cualquier proteína extraña en el
 45 cuerpo. En ciertas realizaciones, el material informativo puede indicar que estas reacciones alérgicas pueden manifestarse como urticaria o erupción cutánea y convertirse en reacciones sistémicas letales y pueden ocurrir poco después de la exposición, tal como, por ejemplo, dentro de los 10 minutos. El material informativo puede indicar además que una reacción alérgica puede causar que un sujeto experimente parestesia, hipotensión, edema laríngeo, cambios de estado mental, angioedema facial o faríngeo, obstrucción de las vías respiratorias, broncoespasmo, urticaria y prurito, enfermedad del suero, artritis, nefritis alérgica, glomerulonefritis, artritis temporal, eosinofilia, o una combinación de los mismos.

Si bien los materiales de instrucción típicamente comprenden materiales escritos o impresos, no se limitan a tales. La presente invención contempla cualquier medio capaz de almacenar tales instrucciones y comunicarlas a un usuario final. Tales medios incluyen, pero no se limitan a medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM) y similares. Tales medios pueden incluir direcciones de sitios de Internet que proporcionan tales materiales de instrucción.

En algunas realizaciones, los kits pueden comprender uno o más materiales de empaque tales como, por ejemplo, una caja, botella, tubo, vial, recipiente, aspersor, insuflador, bolsa intravenosa (I.V.), sobre y similares; y al menos una forma de dosificación unitaria de un agente que comprende los agentes activos descritos en la presente

memoria y un material de empaque. En algunas realizaciones, los kits también incluyen instrucciones para usar la composición como tratamiento profiláctico, terapéutico o de mejora para la enfermedad de interés.

5 En algunas realizaciones, los kits pueden comprender uno o más materiales de empaque tales como, por ejemplo, una caja, botella, tubo, vial, recipiente, aspersor, insuflador, bolsa intravenosa (I.V.), sobre y similares; y una primera composición que comprende al menos una forma de dosificación unitaria de un agente que comprende uno o más agentes activos (por ejemplo, inhibidor de BACE específico de APP (ASBI) tal como galangina, rutina y análogos, derivados, un tautómero o estereoisómero del mismo, o profármaco del mismo como se describe en la presente memoria) dentro del material de empaque, junto con una segunda composición que comprende un segundo agente tal como, por ejemplo, un agente usado en el tratamiento y/o profilaxis de la enfermedad de Alzheimer (por ejemplo, como se describe en la presente memoria), o cualesquier profármacos, cofármacos, metabolitos, análogos, homólogos, congéneres, derivados, sales y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, los kits también pueden incluir instrucciones para usar la composición como un tratamiento profiláctico, terapéutico o de mejora para la enfermedad de interés.

15 En ciertas realizaciones, las instrucciones/materiales de instrucción, cuando están presentes, enseñan dosificaciones y/o regímenes de tratamiento y/o contraindicaciones para los agentes activos contenidos en el kit. Si bien los materiales de instrucción, cuando están presentes, típicamente comprenden materiales escritos o impresos, no se limitan a tales. La presente invención contempla cualquier medio capaz de almacenar tales instrucciones y comunicarlas a un usuario final. Tales medios incluyen, pero no se limitan a medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM) y similares. Tales medios pueden incluir direcciones de sitios de Internet que proporcionan tales materiales de instrucción.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

Ejemplo 1

Inhibidores de BACE específicos de APP (ASBI):

25 Una nueva clase de agentes terapéuticos para la enfermedad de Alzheimer

Una limitación crítica de las estrategias inhibitoras de la proteasa (por ejemplo, Inhibidores de BACE) en el tratamiento de diversas patologías es la promiscuidad de los efectos objetivo del sustrato, es decir, la inhibición de la escisión de todos los sustratos de una proteasa direccionada dada, tal como BACE o el complejo γ -secretasa. En el caso de la γ -secretasa, los sustratos que no sean APP, tales como Notch, generan preocupación por los posibles efectos colaterales de la inhibición de la γ -secretasa, y el reciente fracaso del inhibidor de la γ -secretasa, Semagacestat, sirve para reforzar tales preocupaciones. En el caso de BACE, la inhibición de sustratos no APP tales como PSGL1 o LRP plantea preocupaciones similares.

35 Por lo tanto, el inhibidor óptimo de BACE sería uno que no se uniera a BACE sino a APP, lo que llevaría a la inhibición de BACE específica de APP (ASBI). Tal terapéutica representaría una nueva clase de agentes terapéuticos para la enfermedad de Alzheimer: ASBIs.

40 Los datos informados en este ejemplo sobre la identificación de los primeros ASBI demuestran que tal enfoque es factible. Los inhibidores de BACE específicos de APP (ASBI) inhiben la escisión de BACE de la proteína precursora amiloide (APP) pero no la escisión proteolítica de otros sustratos. Mediante el cribado de una pequeña biblioteca de 448 compuestos clínicos (NCC 3364) en los ensayos ASBI, se identificó un bioflavonoide- rutina, un glucósido flavonoide cítrico- que fue eficaz como ASBI a una dosis de 1 μ M. Un análisis adicional de un grupo de bioflavonoides reveló una segunda molécula, galangina, un bioflavonoide del rizoma galangal, que actúa de manera similar como un ASBI a una dosis de 50 μ M. Estos bioflavonoides representan los primeros miembros de lo que se cree que es una nueva clase de agentes terapéuticos modificadores de la enfermedad para la AD.

45 Se cree que la aplicación sistemática del enfoque descrito en la presente memoria para identificar inhibidores de BACE específicos de APP y evaluar su capacidad *in vivo* para modular específicamente el procesamiento de APP, no se ha informado previamente. Se identifica un suplemento nutricional bioflavonoide que proporciona un compuesto guía molecular que actúa como un ASBI en modelos celulares. Se ha demostrado que el aumento de los niveles cerebrales de este bioflavonoide a través de un enfoque de profármacos conduce a la reducción de A β 42 en el modelo de ratón AD. Por lo tanto, los ASBI representan una novedosa clase de agentes terapéuticos para la AD.

50 Materiales y procedimientos

Compuestos.

La rutina (ASBI-1) se obtuvo de Sigma (cat # R5143, St. Louis, MO), Galangina (ASBI-2) se obtuvo de Sigma (cat # 282200, St. Louis, MO) y se sintetizó progalangina (PG-1).

Ensayo ASBI.

Consiste en dos partes a) evaluación de un compuesto para la inhibición de la escisión de BACE del sustrato MBP-C125 y b) evaluación del candidato para la inhibición de BACE del sustrato P5-P5'.

a) Ensayo de escisión de MBP-C125.

5 Se incubó un constructo proteico de Proteína de Unión a Maltosa que transportaba los 125 residuos del terminal C de APP (1 μ l de 1 mM en agua) con un flavonoide (100 μ M) durante 15 minutos. La mezcla se sometió luego a escisión por BACE (Sigma # B9059, 5 μ l de 3 unidades/ml en tampón BACE) durante 30 minutos. Después de 0, 10, 20 y 30 minutos, se congelaron 2 μ l de la mezcla de reacción y se cuantificaron simultáneamente los diferentes puntos de tiempo para la cantidad de APP-C99 creada. La cuantificación se realizó mediante el uso de un kit Beta amiloide Amiloide ALPHALisa Perkin Elmer (AL275C) modificado mediante la sustitución de las perlasceptoras anti-Abeta (AL275AC) con perlas anti-APP (AL275AC) y haciendo que el anticuerpo se mezcle con 2x tampón ALPHALisa.

b) Ensayo de escisión P5-P5'.

La inhibición de la escisión de BACE del sustrato de fluorescencia P5-P5' por los flavonoides a 100 μ M se midió usando el kit de detección de actividad de β -secretasa (BACE1) de Sigma-Aldrich (CS0010) y el protocolo estándar.

Plásmidos.

15 El constructo pAptag5-NRG1- β 1 fue amablemente proporcionado por el Dr. Carl Blobel (Horiuchi *et al.* (2005) Dev. Biol. 283: 459-471). El constructo BACE1 fue un regalo del Dr. Michael Willem y el Dr. Christian Haass (Willem *et al.* (2006) Science 314: 664-666). Los constructos pCMV5-Mint3, pMst-A β PP, pG5E1B-luc y pCMV-LacZ fueron generosamente proporcionados por el Dr. Thomas Südhof, el Dr. Patrick Mehlen y el Dr. Veronique Corset (Cao (2001) Science 293: 115-120). El constructo EF- N-FLAG-TAZ fue amablemente proporcionado por el Dr. Michael Yaffe y el Dr. Iain Farrance. El constructo pcDNA3.1-APLP2-Gal4 se describió anteriormente (Orcholski *et al.* (2011) J. Alzheimers Dis. 23: 689-699).

Cultivo celular e inmunotransferencia Western Blot.

25 El Dr. Edward Koo proporcionó amablemente la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) que sobreexpresaba A β PP humano (7W). Los constructos de plásmidos se transfectaron transitoriamente en células HEK293T o 7W con Lipofectamine 2000 (Invitrogen). El análisis de Inmunotransferencia Western se realizó como se describió previamente (Swistowski *et al.* (2009) J. Neurosci., 29: 15703-15712). En resumen, 48 horas después de la transfección, las células se recolectaron y se sometieron a lisis en tampón de lisis celular NP-40 (TrisHCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM y NP-40 al 1 %). Los lisados celulares se mezclaron con tampón de carga IX LDS (Invitrogen) y DTT 50 mM, y se hirvieron a 100 °C durante 10 minutos. Después de SDS-PAGE y electrotransferencia, la inmunotransferencia Western se realizó usando anticuerpos anti-APP (CT15, un obsequio amable del Dr. Edward Koo, para β -CTF; 6E10 (Covance) para APP de longitud completa y sAPPa). Treinta minutos de lavado TBS-Tween fueron seguidos por incubación con anticuerpos secundarios.

Ensayo de desprendimiento de Neuregulin1.

35 Un constructo de ADNc que codifica una proteína de fusión de fosfatasa alcalina secretada placentaria (SEAP) - NRG1 (pAptag5-NRG1- β 1) se transfectó en células HEK293 en un formato de 6 pocillos con o sin BACE1 de tipo silvestre de longitud completa usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) como se describió anteriormente (Vassar *et al.* (1999) Science, 286: 735-741). Después de la transfección, el medio se reemplazó con DMEM que contenía suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % y se incubó durante 24 h. La actividad de SEAP se midió en el medio acondicionado. Para las mediciones de la actividad de la fosfatasa alcalina, se agregaron 200 μ l de solución de reacción (glicina 0,1 M, pH 10,4, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 1 mM que contiene 1 mg/ml de hexahidrato de sal disódica de 4-nitrofenil fosfato, Sigma) a 20 μ l del medio acondicionado. La absorbancia se leyó a 405 nm. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando una prueba t de Student de dos colas.

Ensayo de transactivación.

45 Las células HEK293T se cotransfectaron con cinco plásmidos: (1) pG5E1B-luc, 0,3 μ g; (2) pCMV-LacZ, 0,1 μ g; (3) pMst-APP (APP-Gal4) o pcDNA3.1-APLP2-Gal4, 0,3 μ g; (4) pCMV5-Mint3, 1,0 μ g; (5) pEF-N-FLAG-TAZ, 1,0 μ g. Las células se recolectaron 48 horas después de la transfección en 0,2 ml por pocillo de tampón de lisis de cultivo celular (Promega), y sus actividades de luciferasa y β -galactosidasa se determinaron con el kit de ensayo de luciferasa Promega y el kit de ensayo de β -galactosidasa Promega, respectivamente. La actividad luciferasa fue estandarizada por la actividad β -galactosidasa para controlar la eficacia de la transfección y los efectos generales sobre la transcripción. Las transfecciones se realizaron al 80-90 % de confluencia en placas de seis pocillos utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen).

Prueba de resonancia de plasmón de Superficie (SPR).

55 Las superficies de cuatro celdas de flujo (FC1, FC2, FC3, FC4) de un chip de dextrano carboximetilado (CM-5) se lavaron secuencialmente con NaOH 50 mM, HCl 1 mM, H₃PO₄ al 0,05 % y fosfato de sodio 20 mM pH 7,4, cloruro de

sodio 125 mM en paralelo usando una tasa de flujo de 30 μ l/min durante 1 minuto usando un Biacore T-100 (GE Healthcare). Se inmovilizaron tres proteínas de fusión mediante acoplamiento de amina usando fosfato 20 mM, cloruro de sodio 125 mM, pH 7,4. Las tres proteínas eran MBP-eAPP₂₃₀₋₆₂₄, una proteína de fusión que contiene proteína de unión a maltosa (MBP) y los residuos 230-624 del ectodominio de APP (90-kDa) (FC4), eAPP₂₃₀₋₆₂₄, una proteína que contiene solo residuos 230-624 (45-kDa) (FC2) y TRX-eAPP₅₇₅₋₆₂₄: una proteína de fusión que contiene tioredoxina (TRX) y los residuos 575-624 del ectodominio (20-kDa) (FC3). Las proteínas se produjeron como se describe en Libeu, *et al.* (2011) *J. Alzheimers Dis.*, 25 (3): 547-566 Libeu *et al.* (2011). La celda de flujo FC1 se usó como control. Galangina se diluyó de soluciones 10 mM en DMSO a 50 μ M en DMSO al 1 %, fosfato de sodio 20 mM pH 7,4, cloruro de sodio 125 mM, Tween al 0,05 % y luego se diluyó en serie en 1,5 durante 10 etapas. Se registraron trazas de unión para cada dilución con una fase de unión de 60 segundos y una fase de disociación de 240 segundos. Cada ciclo se realizó a 20 °C con una tasa de flujo constante de 20 μ l/min. Se aplicaron 240 segundos adicionales de flujo de tampón a 60 μ l por minuto a través de las células como fase de regeneración para facilitar la disociación completa del compuesto de la proteína. Los sensogramas se obtuvieron restando las señales de referencia y de tampón utilizando el software de evaluación Biacore T100. Las curvas de unión se modelaron con el PRISM (Graphpad Inc).

Análisis farmacocinético (PK).

La penetración cerebral de galangina y progalangina se evaluó en una PK estándar que comprende la inyección subcutánea (Sub-Q) de 5 ratones adultos no transgénicos con 50 μ l de una solución madre de 5 mg/ml de compuesto en dimetilsulfóxido (DMSO) o una dosis de 10 mg/kg para un ratón de 25 g. Los ratones inyectados se anestesiaron con ketamina/xilazina a las 1, 2, 4, 6 y 8 horas y se recolectó sangre por punción cardíaca. Los ratones fueron perfundidos con solución salina y tejido cerebral diseccionado y congelado en forma instantánea en hielo seco. La sangre se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se recolectó el sobrenadante de plasma. Tanto el plasma como el hemiserebro derecho se enviaron a Integrated Analytical Solutions (IAS, Berkeley, CA) con una muestra de referencia de compuesto para análisis de nivel de compuesto en tejido y plasma. Los niveles de compuesto se determinaron usando un enfoque LC-MS/MS.

Prueba piloto de eficacia.

Se disolvieron galangina y progalangina (PG-1) en 10 % de soluto/15 % de DMSO/75 % de polietilenglicol (PEG). Se prepararon soluciones madre a 10 mg/ml para cada compuesto y se inyectaron 100 μ l por vía subcutánea diariamente durante 14 días a una dosis de 40 mg/kg. Hubo 5 ratones PDAPP AD modelo J20 tanto en los grupos galangina como progalangina, y 9 controles J20 tratados solo con vehículo. Los ratones se anestesiaron, se recogió sangre para plasma y se recogió tejido cerebral como se describe anteriormente 2 horas después de la inyección el último día de tratamiento. El hemiserebro derecho se microdisecionó además para aislar el hipocampo y la corteza entorrinal y este tejido combinado se usó para el análisis bioquímico. El tejido y el plasma restantes se enviaron a IAS para análisis de nivel de compuesto.

Bioquímica.

Los niveles de A β 1-42 y A β 1-40 se determinaron usando el tejido cortical hipocampal/entorrinal. En resumen, se pesaron muestras de tejido congeladas y se preparó un sonicado al 20 % p/v en guanidina-HCl 5 M/Tris 50 mM, pH 8. La sonicación se realizó con tubos de muestra en agua con hielo, 4 x 5 segundos a 60 Hz, luego 3 x 5 segundos a 80 Hz. Las muestras se rotaron entonces a temperatura ambiente durante 3 horas y se congelaron a -20 °C hasta el ensayo. Se utilizaron kits Invitrogen ELISA para A β 1-40 y A β 1-42 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resultados

Identificación de inhibidores de BACE específicos de APP (ASBIs)

Se estableció un ensayo primario de cribado de alto rendimiento (HTS) para la identificación de los ASBI utilizando un paradigma de prueba de doble sustrato (Fig. 3A y 3B). El sustrato BACE previamente informado (Sinha *et al.* (1999) *Nature*, 402: 537-540), la proteína de fusión MBP-C125 APP_{695wt} que consiste en proteína de unión a maltosa fusionada a los 125 aminoácidos carboxiterminales de la APP de tipo silvestre, se usó como el sustrato primario y el sustrato de fluorescencia P5-P5' disponible comercialmente, derivado de los residuos P5-P5' del sitio de escisión de BACE de APP, se usó como sustrato secundario. Cada uno de estos sustratos se incubó con BACE recombinante (R&D (cat # 931-AS-050) en un formato de placa de 96 pocillos. Para el sustrato MBP-C125, se midió el producto C-99 de la escisión de BACE usando un ensayo AlphaLISA como lectura (Fig. 3B). Para el sustrato P5-5', la pérdida de fluorescencia después de la escisión de BACE se usó como lectura. Se predeciría que un ASBI inhibiría la escisión de BACE del sustrato MBP-C125, aunque no necesariamente inhibición de la escisión del sustrato de fluorescencia, dependiendo de dónde se unió el ASBI al sustrato de APP.

Basado en el cribado preliminar de una biblioteca de compuestos clínicos de 448 compuestos, se anticipó que la tasa de aciertos fue muy baja, ya que solo se identificó un compuesto en el cribado inicial. A continuación, se realizaron curvas de respuesta a la dosis de posibles "aciertos" para identificar "aciertos" validados para un desarrollo adicional. El cribado HTS se realizó a una concentración inicial de 10 μ M para cada candidato. Se completó un cribado inicial de una pequeña biblioteca de compuestos clínicos de 448 compuestos clínicos

disponibles comercialmente. El cribado produjo un solo acierto (Fig. 3A), identificado como el bioflavonoide rutina (ASBI-1, también conocido como rutósido), el cual se deriva del glucósido flavonoide cítrico que se encuentra en el trigo sarraceno. Este bioflavonoide disminuyó la sAPP β en las células SH-SY5Y, y se demostró que era específico para APP, lo que respalda la noción de que la rutina actúa específicamente en la escisión de BACE de APP. A continuación, se probó un panel de bioflavonoides (Fig. 4), primero por sus capacidades para inhibir sAPP β en las células. Se identificó otro bioflavonoide, galangina, que también se comportó como un ASBI, inhibiendo la escisión del sustrato MBP por BACE (Fig. 4, diamantes) sin mostrar inhibición del sustrato P5-P5' (Fig. 4, círculos). Galangina (ASBI-2) es un flavanol que se encuentra en el rizoma galangal, y se usa comúnmente como un suplemento nutricional.

10 **Efecto de los ASBI bioflavonoides en el procesamiento de sAPP β y APP en las células.**

La APP se procesa a través de dos rutas principales: la ruta no amiloidogénica implica la escisión de la α -secretasa, proteolizando la APP en sAPP α y α -CTF (C83), mientras que la ruta amiloidogénica comienza con la escisión de la β -secretasa, escindiendo la APP en sAPP β y β -CTF (C99). El β -CTF es luego escindido por la γ -secretasa, que produce A β y AICD. La capacidad de los ASBI para inhibir el procesamiento de β -secretasa de APP se probó en células de neuroblastoma SH-SY5Y que expresan APP. El fragmento sAPP β formado a partir del producto de escisión de BACE se midió usando un ensayo AlphaLISA de Perkin-Elmer (Cat # A2132). Tras el descubrimiento de la rutina en el cribado inicial, se demostró que a 1 μ M inhibía ligeramente la producción de sAPP β por las células SH-SY5Y (Fig. 5A). La prueba de un panel de bioflavonoides condujo a la identificación de galangina como ASBI. El tratamiento de las células SH-SY5Y con galangina disminuyó de manera similar los niveles de sAPP β a 50 μ M. No se detectó ningún efecto sobre los niveles de APP.

15 **Los ASBI bioflavonoides inhiben la transactivación de APP-Gal4 y APLP2-Gal4**

Mientras que la escisión de APP-C31 está asociada con la muerte celular, el dominio intracelular de APP (AICD) creado después de la escisión de γ -secretasa se ha implicado en diversas rutas de señalización, y se ha demostrado que modula la expresión de muchos genes, incluidos KAI1, neprilisina, y APP misma (Hong *et al.* (2000) *Science*, 290: 150-153). Un ensayo de transactivación APP-Gal4/Mint3/TAZ (Maillard *et al.* (2007) *J. Med. Chem.*, 50: 776-781; Hardy *et al.* (1991) *Trends Pharmacol. Sci.*, 12: 383-388) se estableció, y usando este ensayo, se descubrió que los ASBI inhibían la transactivación de APP-Gal4 (Fig. 7). Para confirmar este efecto, se empleó el ensayo de transactivación APP-Gal4/Fe65. Se examinó el efecto de los ASBI en la transactivación APLP2-Gal4 (Fig. 7). Estos resultados indican que rutina (ASBI-1) y galangina (ASBI-2) inhiben tanto la APP como la transactivación de APLP2-Gal4 del miembro de familia relacionado.

20 **Interacción de ASBIs con APP**

Para explorar la interacción de ASBIs con APP, se usó una técnica de inmunotransferencia de ligando, donde la APP MBP-C125 se sometió a inmunotransferencia de mancha en una inmunotransferencia de nitrocelulosa y se detectó la unión a la proteína tras el tratamiento con los bioflavonoides. Se usó un ensayo de unión a filtro de nitrocelulosa con albúmina de suero bovino (BSA) como control. La unión de bioflavonoides se determinó utilizando análisis espectrométrico de masas tanto UV como MALDI. Esta es una medida cualitativa de la interacción de la molécula pequeña de la proteína, pero muestra que el ASBI se unió a la APP.

La resonancia de plasmón de superficie (SPR) se usó luego para demostrar la unión a APP y para determinar la afinidad de galangina por APP.

30 **Cribado de resonancia de plasmón de superficie (SPR):**

La afinidad de unión de los compuestos por el ectodominio de APP se determinó usando SPR. Se desarrolló una técnica para medir la afinidad de los compuestos con los fragmentos del ectodominio de APP. Para los experimentos de unión a galangina se usó TRX-eAPP575-624. El eAPP se enlazó entrecruzado con los chips CM5 Biacore (GE Healthcare). Se utilizó galangina a diversas concentraciones en el flujo a través del chip y se determinó la señal de resonancia de plasmón usando un Biacore T100 (Fig. 5B).

35 **El tratamiento con bioflavonoides ASBI reduce la A β en un modelo de ratón transgénico AD**

Se evaluó la permeabilidad cerebral de los bioflavonoides rutina y galangina en ratones y se encontró que después de una administración sc de 10 mpk no se detectó rutina en el cerebro, mientras que se podían detectar niveles bajos de galangina (C $_{\text{máx}}$ ~ 50 ng/g en 1 h) en el cerebro (Fig. 8). La relación cerebro/plasma fue de 1:10. Con el fin de ver si los niveles cerebrales de galangina podrían mejorarse, se probó el profármaco (PG-1) y dio como resultado un aumento en el suministro de galangina al cerebro (C $_{\text{máx}}$ ~ 100ng/g a 1 h). En base a estos análisis farmacocinéticos, se decidió probar galangina y progalangina (PG-1) en un modelo de ratón AD, los ratones PDAPP (J20).

El tratamiento de ratones J20 a 40 mpk con galangina muestra cierta reducción de A β 40 mientras que A β 42 no se modificó en el hipocampo y la corteza. Sin embargo, el tratamiento con progalangina muestra una reducción tanto de A β 40 como de A β 42 consistente con el aumento de los niveles cerebrales de galangina observados durante el

tratamiento con el profármaco. Estos resultados, tomados en conjunto, indican que el bioflavonoide galangina interactúa directamente con la APP, inhibe la escisión de BACE de la APP pero no la neuregulina o un péptido direccionado a BACE, inhibe la señalización nuclear de la APP dependiente de BACE y reduce A β 1-42 en un modelo de ratón transgénico de AD.

5 **Discusión**

Se identificaron dos análogos de bioflavonoides que se usan como suplementos nutricionales y que inhiben el procesamiento de APP mediada por β -secretasa mediante un mecanismo novedoso. Estas moléculas inhiben la escisión de BACE del sustrato de APP MBP-C125, lo que da como resultado la inhibición de la producción de C99, pero no inhiben la escisión del sustrato del péptido del sitio β (P5-P5'). Además, estos bioflavonoides reducen la sAPP β en las células SH-SY5Y del neuroblastoma, mientras que la galangina no logra reducir el desprendimiento dependiente de BACE neuregulina. Además, se demostró que la actividad está asociada con la unión al sustrato MBP-C125. Estos hallazgos definen un nuevo mecanismo para modular el procesamiento de la APP.

El enfoque descrito en este documento aborda una limitación crítica de las estrategias inhibitoras de la proteasa para la enfermedad de Alzheimer (AD), proporcionando un mecanismo mediante el cual se evita la inhibición de la escisión de todos los sustratos de una proteasa direccionada determinada, tal como BACE o el complejo γ -secretasa. Los sustratos de γ -secretasa que no sean APP, tales como Notch, generan preocupación por los posibles efectos secundarios de la inhibición de γ -secretasa, y el reciente fracaso del inhibidor de γ -secretasa, Semagacestat, sirve para reforzar tales preocupaciones. En el caso de BACE, los sustratos que no son APP tales como PSGL1 y LRP plantean preocupaciones similares. Por lo tanto, el inhibidor óptimo de BACE sería uno que se uniría a APP en lugar de BACE, lo que llevaría a la inhibición de BACE específica de APP (ASBI). Tal terapéutica, como se describe en la presente memoria, representa una nueva clase de agentes terapéuticos para la enfermedad de Alzheimer.

Es probable que dos sustratos BACE conocidos sean importantes en la función inmunológica: el ligando-1 de glicoproteína P-selectina (Lichtenthaler *et al.* (2003) *J. Biol. Chem.* 278: 48713-48719), que media la adhesión de leucocitos, y el sialilo-transferasa ST6Gal I (Kitazume *et al.* (2003) *J. Biol. Chem.*, 278: 14865-14871), una enzima que se secreta después de la escisión y participa en la regulación de las respuestas inmunes. La interacción de un residuo de galactosa sialil-alfa-2,6, que se sintetiza únicamente por ST6Gal I, con una lectina específica de células B, CD22/Siglec-2, es importante para la función de las células B (Id.). Es notable que los ratones deficientes en algunas enzimas de glicosilación parecen crecer normalmente pero muestran anomalías neurológicas sutiles con el aumento de la edad; los ratones con deficiencia de glucosfingolípidos muestran convulsiones audiogénicas letales inducidas por un estímulo sonoro. A este respecto, es importante tener en cuenta que todavía no se han publicado informes sobre la respuesta de ratones nulos BACE1 al desafío inmune. También se ha demostrado que BACE1 procesa el homólogo de APP, APLP2; Este homólogo tiene una especificidad de secuencia diferente a la de APP alrededor del supuesto sitio de escisión de BACE1, aunque la galangina también inhibió la escisión de APLP2 por BACE. Los niveles de productos proteolíticos APLP2 disminuyeron en ratones con deficiencia de BACE1 y aumentaron en ratones con sobreexpresión de BACE1 (Pastorino *et al.* (2004) *Mol. Cell Neurosci.*, 25: 642-649). Dada la gran necesidad de terapias modificadoras de la enfermedad en la AD, este enfoque de desarrollar un inhibidor de BACE específico del sustrato de la APP es novedoso y podría conducir a candidatos clínicos que sean efectivos contra la enfermedad.

Se estableció un ensayo HTS para identificar ASBIS. El cribado inicial de una biblioteca clínica de 448 compuestos en este ensayo condujo a la identificación de un bioflavonoide que inhibió específicamente el sustrato MBP-C125 de BACE mientras que no previene la escisión del sustrato P5-P5'. Este bioflavonoide, rutina, es un suplemento nutricional que también inhibe la producción de sAPP β en las células. Luego se probó un panel de bioflavonoides en los ensayos ASBI y sAPP β en cultivo celular. De esta prueba se identificó otro bioflavonoide, galangina. Galangina es otro suplemento nutricional que fue eficaz en el ensayo ASBI, así como en las células, para prevenir la escisión de BACE de APP. Utilizando un filtro de nitrocelulosa simple, se demostró la unión inicial en el ensayo de unión al ligando de diversos bioflavonoides al sustrato MBP-C125. Se cribó un panel de bioflavonoides en el ensayo ASBI. Sin embargo, solo rutina y galangina fueron efectivas como ASBIs (Fig. 4). Galangina modula los niveles de sAPP β en las células y demuestra la unión al sustrato de la APP (Fig. 5). De manera interesante, también se ha informado que la galangina es un inhibidor de la acetilcolina esterasa (AChE) (Guo *et al.* (2010) *Chemico-Biol. Interaction*, 187: 246-248) e induce autofagia (Wen *et al.* (2012) *Farmacología*, 89: 247-255).

Se demostró que los bioflavonoides inhiben la escisión de BACE de APP y APLP2, usando un ensayo HEK-293 transfectado con APP o APLP2 -Gal4 (véase, por ejemplo, Orcholski *et al.* (2011) *J. Alzheimers Dis.*, 23 (4): 689-99 para una descripción del ensayo). La transactivación se logra tras la transfección con Mint3 y Taz. Como se esperaba, el ASBI inhibe solo la transactivación de APP-Gal4, no la de APLP2-Gal4. Sin embargo, galangina inhibió tanto APP-Gal4 como APLP2-Gal4. Por lo tanto, galangina exhibe especificidad de familia de APP en lugar de especificidad de APP; sin embargo, dada la demostración de fragmentos similares a A β derivados de APLP2, la capacidad de inhibir la escisión de BACE tanto de APP como de APLP2 puede ser más deseable que inhibir la escisión de APP sola (Eggert *et al.* (2004) *J. Biol. Chem.* 279 (18): 18146-18156).

La evaluación farmacocinética inicial de estos dos bioflavonoides en los ensayos de captación cerebral usando ratones NTg mostró que la rutina no cruza la barrera hematoencefálica, mientras que la galangina mostró cierta

penetración cerebral, lo que permitió su evaluación para estudios de prueba de concepto en el modelo de ratón transgénico (Tg). Luego se evaluó su efecto *in vivo* de Galangina sobre A β 40 y A β 42 (Fig. 7). La reducción de los niveles de A β es muy alentadora en este estudio. Es posible un aumento adicional en los niveles cerebrales de galangina usando un profármaco de galangina (PG-1), y se demostró que PG-1 es más efectivo *in vivo* que galangina para reducir A β 40 y A β 42.

En conclusión, este estudio actual indica que ciertos bioflavonoides tienen la capacidad de unirse a APP e inhibir la escisión de BACE de APP y APLP2, lo que sugiere que funcionan como inhibidores de BACE específicos de APP. Estos representan una nueva clase de agentes terapéuticos para la enfermedad de Alzheimer que carecería de la toxicidad potencial de la inhibición directa de BACE. Galangina como su análogo de profármaco, progalangina-1 también demostró ser eficaz para reducir A β 40 y A β 42 en el modelo de ratón AD.

Ejemplo 2

Progalangina como un ASBI

Los estudios de exposición al CNS se realizaron y consistieron en un diseño de curso de tiempo para recolectar plasma y cerebros heparinizados. Después de la administración sc de galangina o progalangina (compuesto-2) a 10 mg/kg, los niveles plasmáticos y cerebrales de los compuestos se determinaron mediante metodología LC/MS/MS cuantitativa. Las muestras de plasma se precipitaron con un 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 homogenatos de guanidina 5 M con el procedimiento líquido-líquido. El sobrenadante resultante se evaporó hasta sequedad y se sometió al análisis LC/MS/MS. Para cada compuesto se usaron 5 ratones para el análisis. Luego se determinaron las relaciones cerebro a plasma y los niveles de C máx de plasma/cerebro (véase, por ejemplo, la Figura 8).

Procedimientos experimentales - Síntesis compuesta.

5,7-diacetoxiflavona:

Se añadió 5,7-dihidroxi-2-fenil-4H-cromen-4-ona (5,00 g, 19,67 mmol) a una solución de anhídrido acético en piridina (1:5, 42 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 60 °C. horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con éter dietílico (100 ml) y se filtró. Los sólidos se lavaron con éter dietílico adicional (3 x 50 ml) y se secaron bajo alto vacío para proporcionar diacetato de 4-oxo-2-fenil-4H-cromeno-5,7-diilo (6,40 g, 18,92 mmol, 96 %) como un sólido blanco cristalino.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 2,36 (s, 3H, CH_3COO), 2,45 (s, 3H, CH_3COO), 6,67 (s, 1H, H-3), 6,85 (d, $J = 2$ Hz, 1H, H-6), 7,36 (d, $J = 2$ Hz, 1H, H-8), 7,50 (m, 3H, H-3', 5', H-4'), 7,84 (dd, $J = 8$ Hz, 2H, H-2', 6');

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 21,2 (q, CH_3COO), 21,3 (q, $\text{CH}_3\text{-C=O}$), 108,7 (d, C-3), 109,1 (d, C-8), 113,7 (d, C-6), 115,1 (s, C-4a), 126,3 (2 x d, C-2', 6'), 129,2 (2 x d, C-3', 5'), 131,2 (d, C-4'), 131,9 (s, C-1'), 150,3 (s, C-5), 154,0 (s, C-7), 157,8 (s, C-8a), 162,6 (s, C-2), 168,1 (s, $\text{CH}_3\text{-C=O}$), 169,5 (s, CH_3COO), 176,5 (s, C-4).

Preparación de DMDO:

Un matraz de reacción de tres bocas, de fondo redondo de 3 litros se equipó con un agitador mecánico eficiente, un embudo de adición para sólidos y un condensador (30 cm), configurado para desplazamiento hacia abajo, unido a un matraz receptor de dos bocas, este último enfriado a -78 °C por medio de un baño de hielo seco/acetona. El matraz de reacción se cargó con una mezcla de agua (254 ml), acetona (192 ml) y NaHCO_3 (58 g) y se enfrió a 5-10 °C con la ayuda de un baño de hielo/agua. Mientras se agitaba y enfriaba vigorosamente, se añadió OXONE® sólido (120 g, 0,195 mol) en cinco porciones a intervalos de 3 minutos. Después de 3 minutos de la última adición, el embudo de adición se reemplazó con un tapón, y se aplicó un vacío moderado (80-100 mmHg) al matraz. El baño de enfriamiento (5-10 °C) se retiró del matraz de reacción, y mientras se agitaba vigorosamente la solución de DMDO/acetona se destiló y se recogió en el matraz receptor enfriado (-78 °C) durante un período de 90 minutos. El matraz receptor se calentó hasta -20 °C y se secó durante 3 horas sobre K_2CO_3 . La solución de DMDO se filtró en un matraz seco y se mantuvo a -20 °C hasta su uso. Se recolectaron aproximadamente 130 ml de solución de DMDO. La concentración de DMDO se determinó mediante RMN disolviendo una parte alícuota de 0,2 ml de la solución de DMDO seca en CDCl_3 y comparando la altura de la señal de protón de metilo del dimetildioxirano (a δ 1,65) con la del pico del satélite ^{13}C a la derecha de la acetona (0,5 %), dando como resultado una solución de DMDO 0,05 M. ¡Este análisis debe hacerse sin demora!

5,7-Diacetoxi-3-hidroxiflavona:

Se añadió diacetato de 4-oxo-2-fenil-4H-cromeno-5,7-diilo (1,80 g, 5,32 mmol) a una suspensión de tamices moleculares secos en polvo de 4 Å (1,80 g) en DCM (32 ml) y se enfrió hasta 0 °C. Se añadió gota a gota solución de DMDO (120 ml, 7,02 mmol, 1,32 equiv.). La solución resultante se agitó a 0 °C durante 3 horas y se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó a esa temperatura durante 48 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de una capa de sulfato de sodio anhidro en un lecho de CELITE® y los volátiles se eliminaron al vacío a temperatura

ambiente para proporcionar diacetato de 7-oxo-1 α -fenil-7,7 α -dihidro-1 α H-oxireno[2,3-b]cromeno-4,6-diilo crudo (ca. 1,90 g) como un aceite. Este aceite fue llevado a la siguiente etapa.

5 La mezcla de reacción cruda (aproximadamente 1,90 g) se agitó en DCM (32 ml) que contenía 15 mg de p-TSA. La mezcla de reacción se solidificó casi de inmediato. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (20 ml) y se agitó durante 2 días donde el análisis por TLC indicó el consumo de diacetato de 7-oxo-1 α -fenil-7,7 α -dihidro-1 α H-oxireno[2,3-b] cromeno-4,6-diilo. La mezcla de reacción se adsorbió sobre sílica gel y la cromatografía en columna instantánea repetida (cloroformo como eluyente) proporcionó diacetato de 3-hidroxi-4-oxo-2-fenil-4H-cromeno-5,7-diilo impuro (800 mg). Se logró una purificación adicional por recristalización a partir de mezclas de acetona/éter dietílico para proporcionar diacetato de 3-hidroxi-4-oxo-2-fenil-4H-cromeno-5,7-diilo (660 mg, 1,86 mmol, 35 % en 2 etapas) como una crema sólida. El material se aisló como un hidrato. Además, el éter dietílico de trazas no se pudo eliminar al vacío, incluso después de un secado prolongado bajo vacío.

10 Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en este documento son solo para fines ilustrativos y que diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos serán sugeridos a los expertos en la técnica y se incluirán dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

15

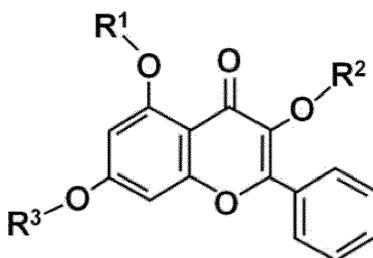
REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de BACE específico de APP para su uso en

prevenir o retrasar la aparición de una afección pre-Alzheimer y/o disfunción cognitiva, o prevenir o retrasar la progresión de una afección pre-Alzheimer o disfunción cognitiva a la enfermedad de Alzheimer; y/o

5 revertir la enfermedad de Alzheimer y/o reducir la tasa de progresión de la enfermedad de Alzheimer; en el que dicho inhibidor de BACE específico de APP es galangina; o

dicho inhibidor de BACE específico de APP es un profármaco de galangina que se procesa en galangina cuando se administra a un mamífero, en el que dicho profármaco de galangina **se caracteriza por** la fórmula:



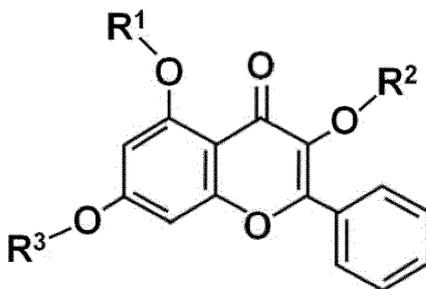
10 en la cual:

R¹, R² y R³ son H, o un grupo protector que se elimina *in vivo* en un mamífero, en la que al menos uno de R¹, R² y R³ no es H; y en la que dicho profármaco inhibe parcial o completamente el procesamiento BACE de APP cuando se administra a un mamífero.

2. El inhibidor de BACE específico de APP para el uso de la reivindicación 1, en el que dicho inhibidor es galangina.

15 3. El inhibidor de BACE específico de APP para el uso de la reivindicación 2, en el que dicha prevención o retraso de la aparición de una afección pre-Alzheimer y/o disfunción cognitiva, o la prevención o retraso de la progresión de una afección pre-Alzheimer o disfunción cognitiva a enfermedad de Alzheimer; y/o revertir la enfermedad de Alzheimer, y/o reducir la tasa de progresión de la enfermedad de Alzheimer **se caracteriza por** una reducción de Aβ40.

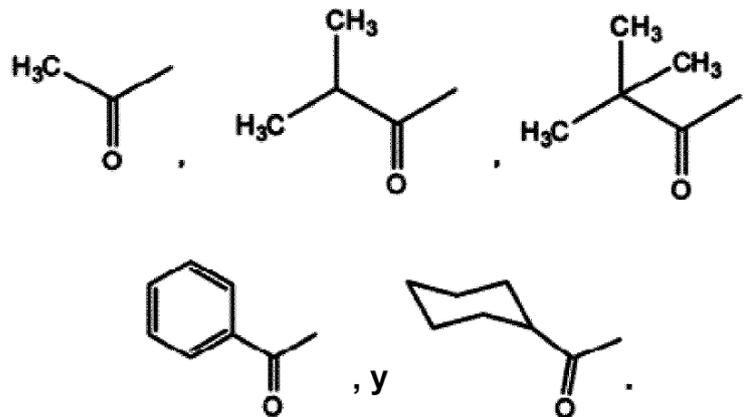
20 4. El inhibidor de BACE específico de APP para el uso de la reivindicación 1, en el que dicho inhibidor de BACE específico de APP es un profármaco de galangina **caracterizado por** la fórmula:



en la que:

R¹, R² y R³ son H, o un grupo protector que se elimina *in vivo* en un mamífero, en la que al menos uno de R¹, R² y R³ no es H; y en la que dicho profármaco inhibe parcial o completamente el procesamiento BACE de APP cuando se administra a un mamífero.

25 5. El inhibidor de BACE específico de APP (ASBI) para el uso de la reivindicación 4, en el que al menos uno de R¹, R² y R³ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en



- 5 6. El inhibidor de BACE específico de APP para el uso de las reivindicaciones 4 o 5, en el que dicha prevención o retraso de la aparición de una afección pre-Alzheimer y/o disfunción cognitiva, o la prevención o retraso de la progresión de una afección pre-Alzheimer o disfunción cognitiva a la enfermedad de Alzheimer; y/o revertir la enfermedad de Alzheimer, y/o reducir la tasa de progresión de la enfermedad de Alzheimer se **caracteriza por** una reducción de A β 40 y A β 42.

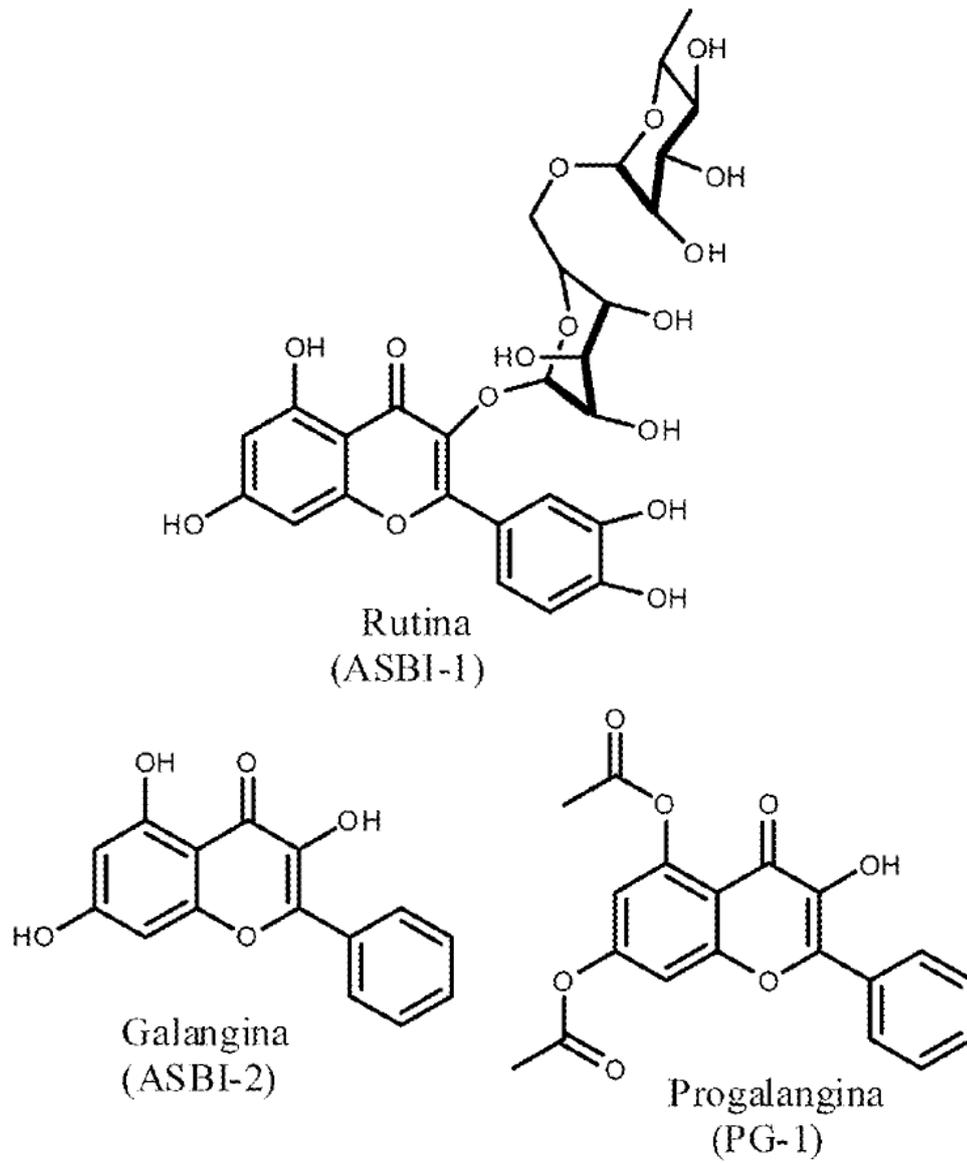
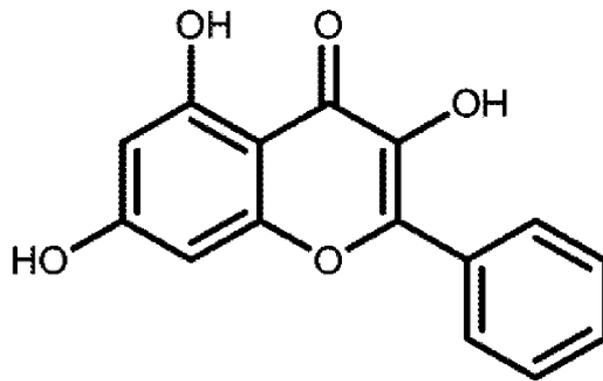
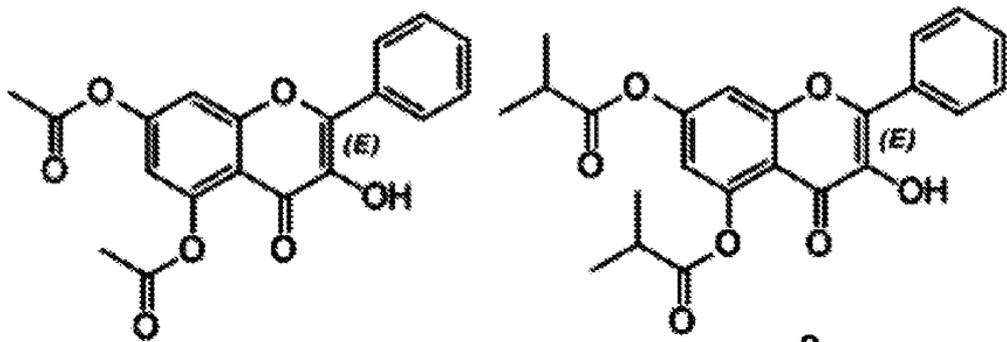


Fig. 1



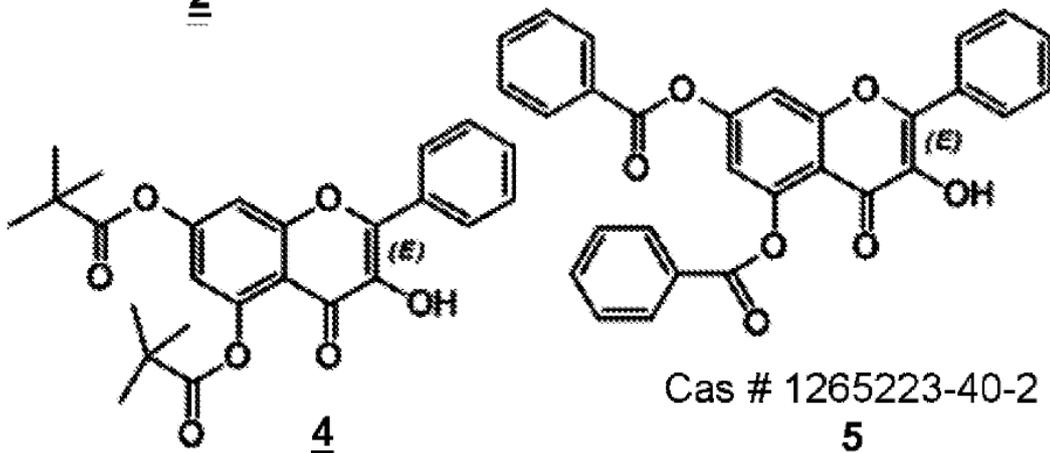
Cas # 548-83-4
Galangina 1



Cas # 1265223-39-9

2

3



Cas # 1265223-40-2

5

Fig. 2

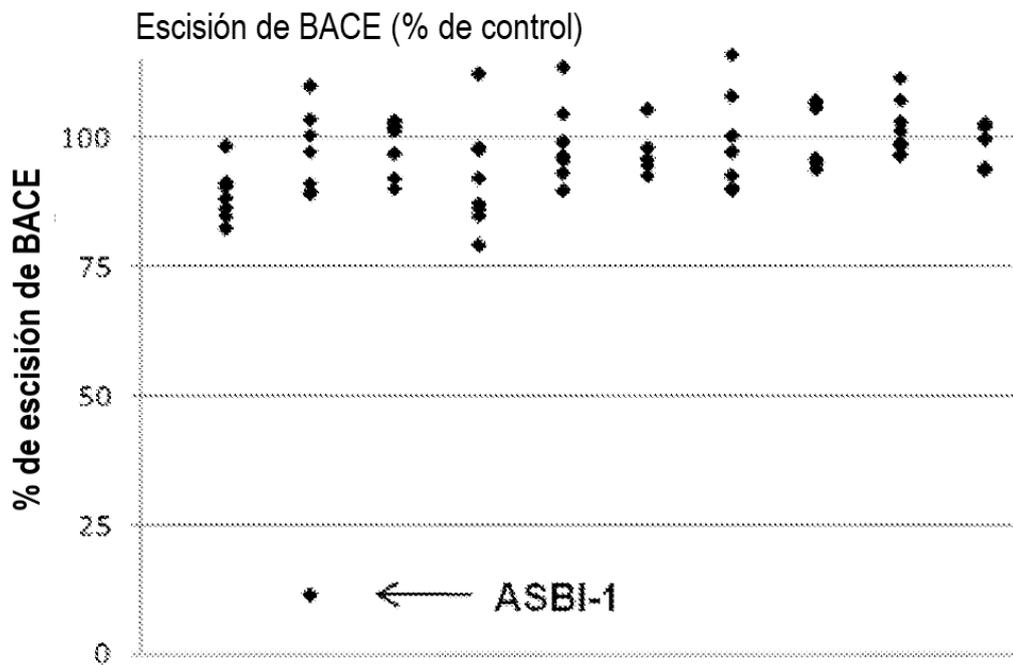


Fig. 3A

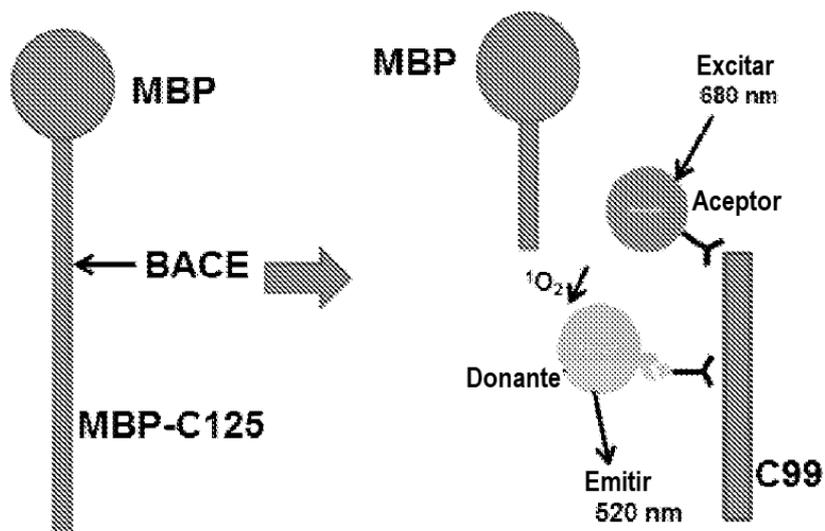


Fig. 3B

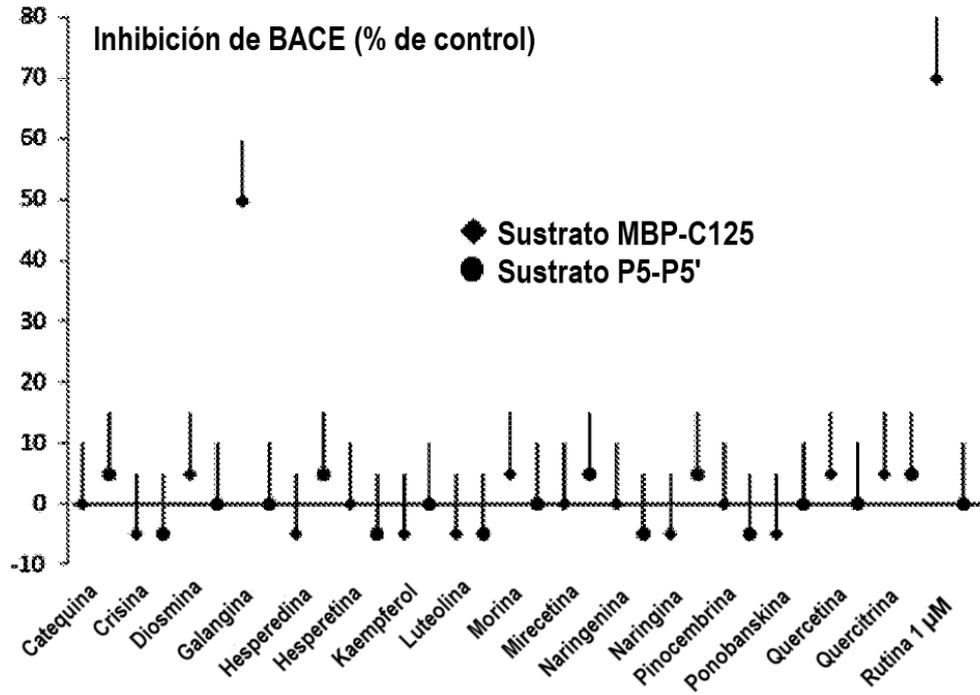


Fig. 4

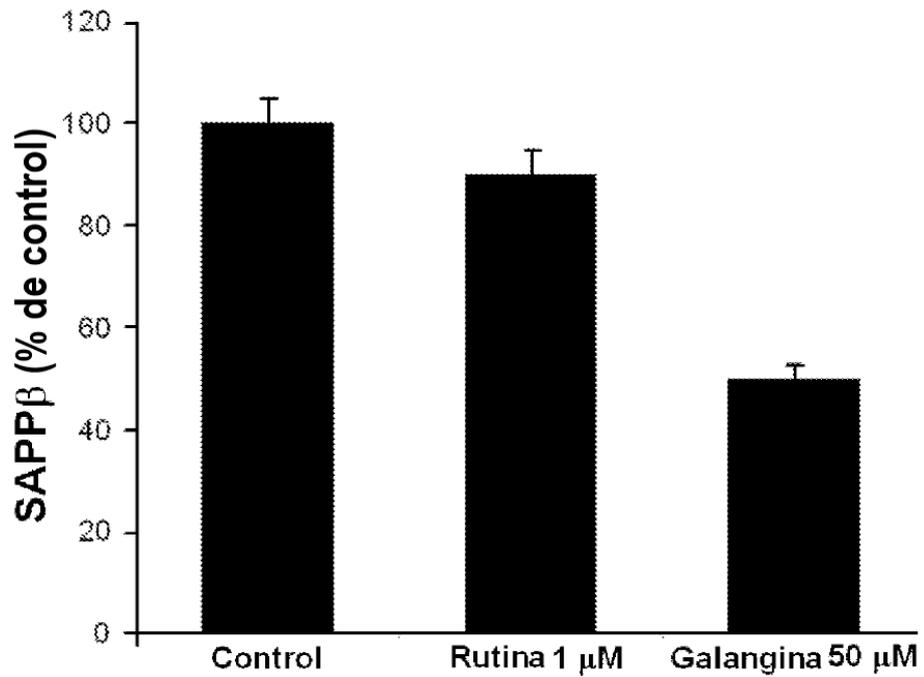


Fig. 5A

Unión a galangina a diferentes fragmentos de APP

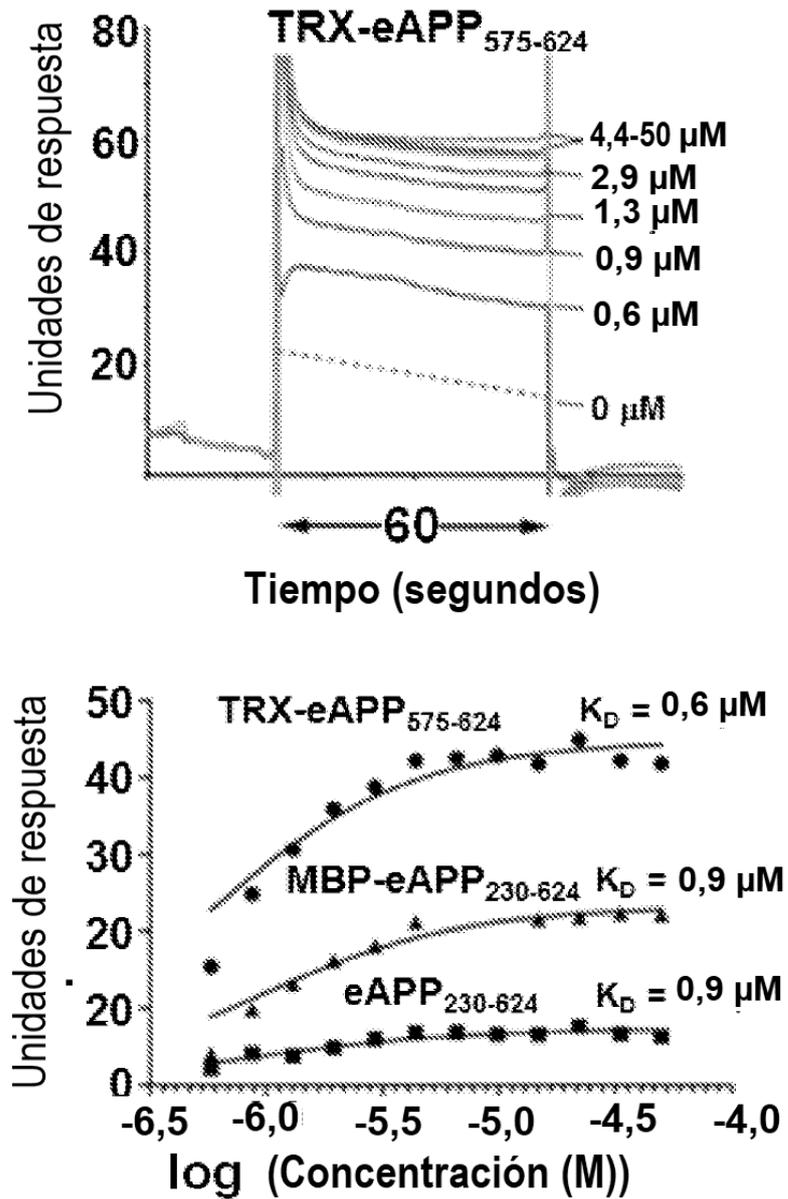


Fig. 5B

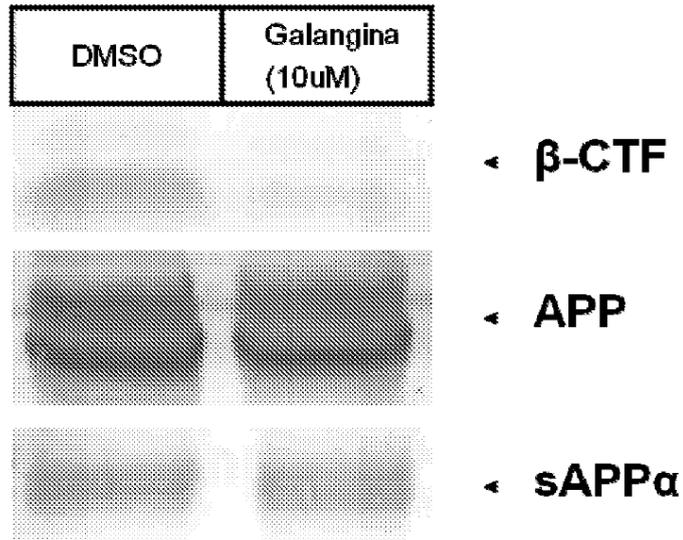


Fig. 6A

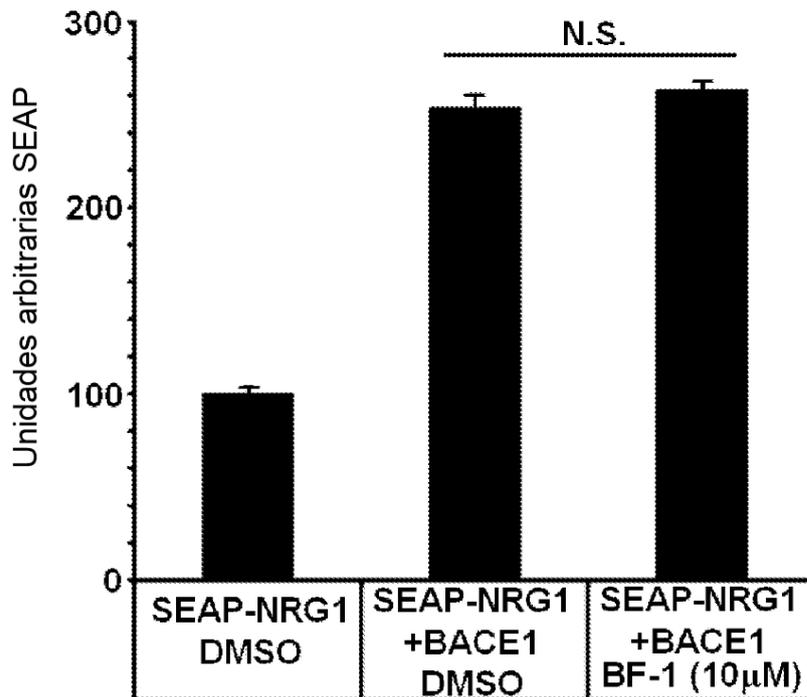


Fig. 6B

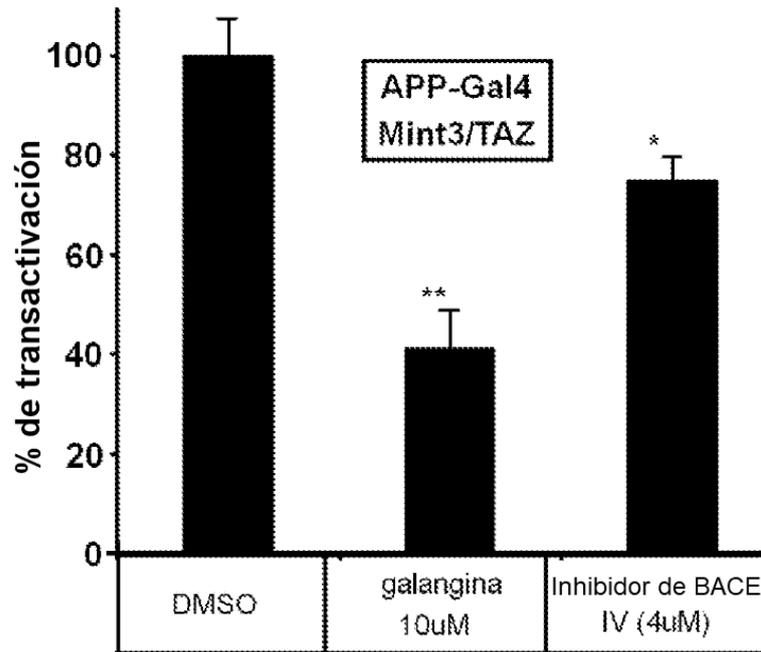


Fig. 7A

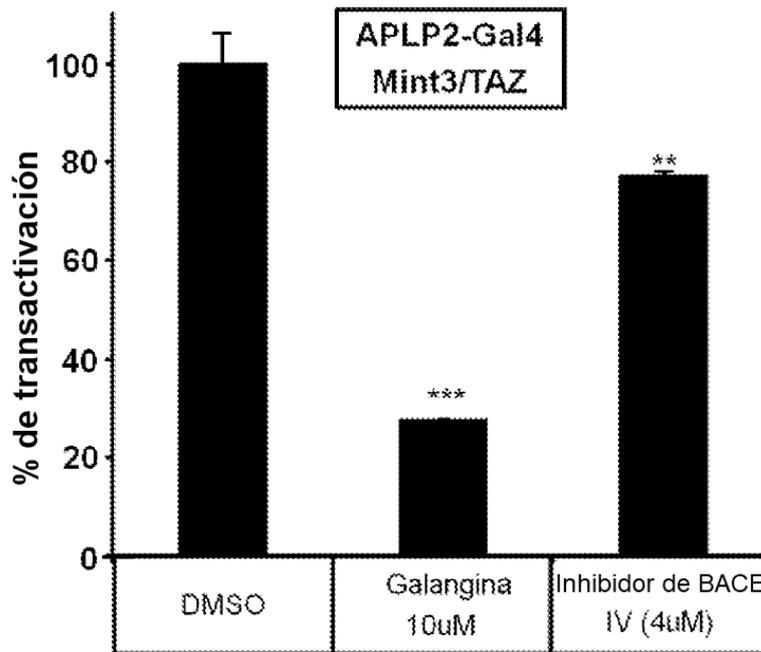


Fig. 7B

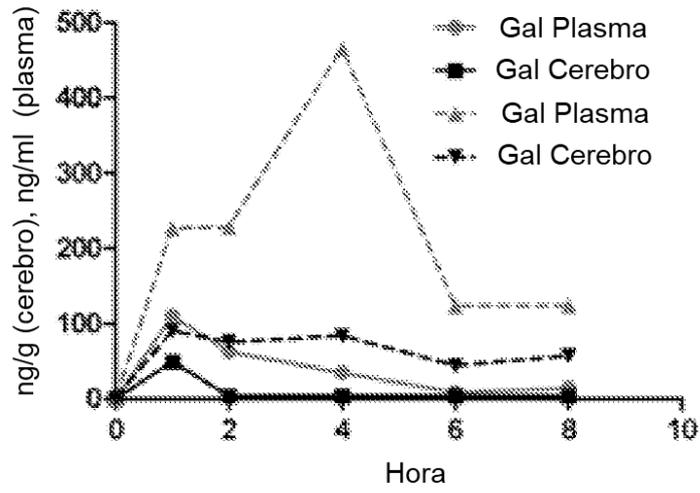


Fig. 8

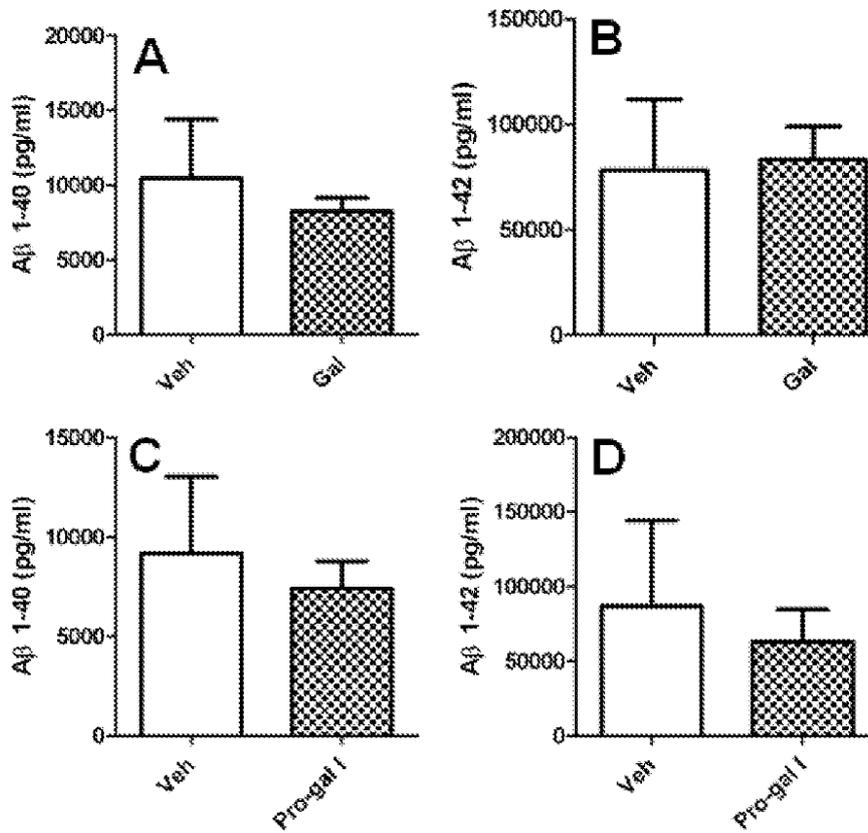


Fig. 9

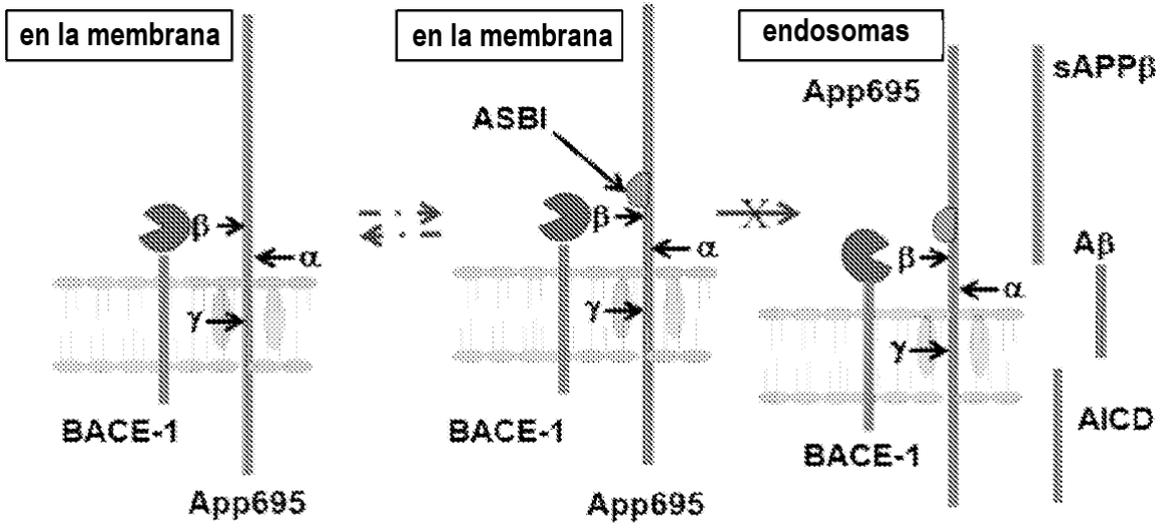
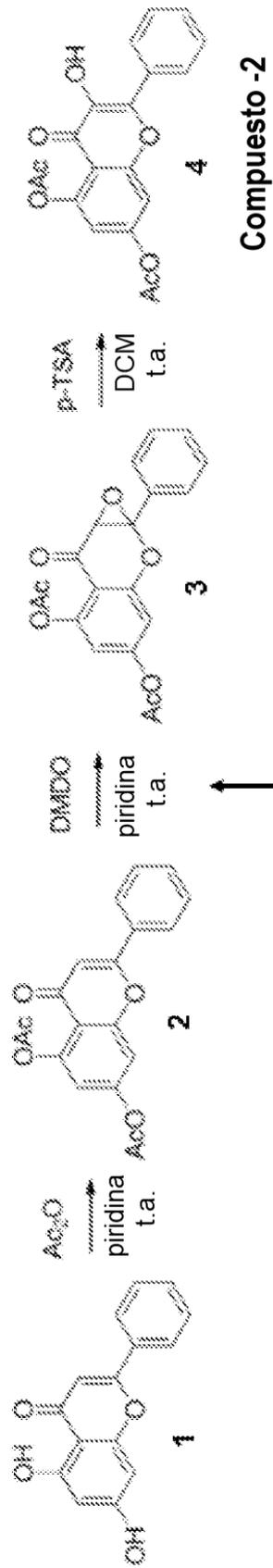


Fig. 10



Compuesto -2

oxona + acetona

Fig. 11