

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 480**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/519** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2012 E 16169411 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 3081568**

54 Título: **Composiciones y métodos para tratar la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

**09.05.2011 US 201161483919 P**

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

**13.07.2020**

73 Titular/es:

**EIP PHARMA, LLC (100.0%)  
11 Channing Street  
Cambridge, MA 02138, US**

72 Inventor/es:

**ALAM, JOHN, JAHANGIR**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 773 480 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**

Composiciones y métodos para tratar la enfermedad de Alzheimer

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

5 La enfermedad de Alzheimer es la causa más común de demencia, y se caracteriza por la pérdida de capacidades intelectuales y sociales lo suficientemente grave como para interferir con el funcionamiento diario. En la enfermedad de Alzheimer, el tejido cerebral sano se degenera, causando una disminución constante de la memoria y las capacidades mentales. La enfermedad de Alzheimer no forma parte del envejecimiento normal, pero el riesgo del trastorno aumenta con la edad. Alrededor de 5 por ciento de las personas entre las edades de 65 y 74 años tienen la enfermedad de Alzheimer, mientras que casi la mitad de las personas mayores de 85 años tienen la enfermedad de Alzheimer.

10 Dos tipos de patología neuronal, placas y ovillos, son comunes en pacientes con enfermedad de Alzheimer. Las placas extracelulares son agrupamientos de una proteína normalmente inofensiva denominada beta-amiloide ( $A\beta$ ), que puede interferir con la comunicación entre las células cerebrales. Los ovillos son la estructura interna de soporte para las células cerebrales que dependen del funcionamiento normal de una proteína denominada tau. En las personas afectadas con la enfermedad de Alzheimer, las hebras de la proteína tau sufren alteraciones que las hacen retorcerse. Muchos investigadores creen que esto puede dañar seriamente las neuronas, causando su muerte y provocando un déficit de memoria.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

20 Las FIGURAS 1A y 1B resumen los efectos de VX-745 sobre el porcentaje de área de placas amiloides en la corteza (Figura 1A) y el hipocampo (Figura 1B) tras la administración de VX-745 (3 mg/kg BID) durante dos semanas.

La FIGURA 2 resume los efectos de VX-745 sobre IL-1 $\beta$  en comparación con los controles de tipo salvaje y de vehículo.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE CIERTAS REALIZACIONES DE LA INVENCION****25 Definiciones**

Portador: El término "portador" se refiere a cualquier entidad química que se puede incorporar en una composición que contiene un agente activo (por ejemplo, un inhibidor de p38) sin interferir significativamente con la estabilidad y/o actividad del agente (por ejemplo, con una actividad biológica del agente). En ciertas realizaciones, el término "portador" se refiere a un portador farmacéuticamente aceptable. Un portador ejemplar aquí es el agua.

30 Combinación. Como se usa aquí, el término "combinación", "combinado", y los términos relacionados, se refieren a la exposición simultánea de un sujeto a dos o más agentes terapéuticos según esta invención. Por ejemplo, un agente de la presente invención (por ejemplo, un inhibidor de p38) puede administrarse con otro agente terapéutico, simultánea o secuencialmente, en formas de dosificación unitarias separadas, o juntas en una única forma de dosificación unitaria. Por consiguiente, la presente invención proporciona, entre otros, regímenes de dosificación que implican administrar al menos un agente de la presente invención (por ejemplo, un inhibidor de p38), un agente terapéutico adicional y un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable (estando el portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable típicamente asociado con uno o ambos del inhibidor de p38 y el agente terapéutico adicional).

40 Formulación. El término "formulación" se refiere a una composición que incluye al menos un agente activo (por ejemplo, un inhibidor de p38) junto con uno o más portadores, excipientes u otros aditivos farmacéuticos para la administración a un paciente. En general, los portadores, excipientes y/u otros aditivos farmacéuticos particulares se seleccionan según el conocimiento en la técnica para lograr la estabilidad, liberación, distribución y/o actividad deseadas del agente o agentes activos y que son apropiadas para la ruta particular de administración.

45 Dosis baja. La expresión "dosis baja", como se usa aquí, se refiere a una dosis que está por debajo de la cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de p38 de referencia cuando se administra para tratar una enfermedad distinta de la enfermedad de Alzheimer. En algunas realizaciones, la expresión "dosis baja" se refiere a una dosis que es uno o más órdenes de magnitud inferior a la cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de p38 de referencia cuando se administra para tratar una enfermedad distinta de la enfermedad de Alzheimer. En algunas realizaciones, la expresión "dosis baja" se refiere a una dosis que es la mitad, un tercio, un cuarto, un quinto, un sexto, un séptimo, un octavo o menos que la cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de p38 de referencia cuando se administra para tratar una enfermedad distinta de la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, una dosis unitaria terapéuticamente eficaz de VX-745 para el tratamiento de la artritis reumatoide en seres humanos es 250 mg. En algunas realizaciones, una "dosis baja" de VX-745 está dentro del intervalo de alrededor de 1 mg a alrededor de 100 mg. En algunas realizaciones, una "dosis baja" de VX-745 está dentro del intervalo de alrededor de 1 mg a alrededor de 50 mg. En algunas realizaciones, una "dosis baja" de VX-745 está dentro del intervalo de alrededor de 1 mg a

alrededor de 30 mg. En algunas realizaciones, una “dosis baja” de VX-745 está dentro del intervalo de alrededor de 1 mg a alrededor de 10 mg. En algunas realizaciones, una “dosis baja” de VX-745 está dentro del intervalo de alrededor de 1 mg a alrededor de 5 mg. En algunas realizaciones, una “dosis baja” de VX-745 es de alrededor de 3 mg. En algunas realizaciones, una “dosis baja” de VX-745 está dentro del intervalo de 5-10 mg. En algunas realizaciones, una “dosis baja” de VX-745 está dentro del intervalo de 10-20 mg. En algunas realizaciones, una “dosis baja” de VX-745 está dentro del intervalo de 20-30 mg.

Formación de neuroimágenes. Como se usa aquí, la expresión “formación de neuroimágenes” se refiere a una técnica que forma directa o indirectamente imágenes de la estructura o función del cerebro. En algunas realizaciones, la expresión “formación de neuroimágenes” se refiere a una técnica seleccionada de tomografía axial computarizada (CAT o CT), tomografía computarizada de emisión de fotón único (SPECT), tomografía por emisión de positrones (PET), formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) o formación de imágenes por resonancia magnética funcional (fMRI). En algunas realizaciones, una técnica de formación de imágenes emplea uno o más agentes de formación de imágenes, tales como ligandos radioactivos, fluorescentes u otros ligandos detectables. En algunas realizaciones, un ligando fluorescente es el compuesto B de Pittsburg ([N-metil-<sup>11</sup>C]<sub>2</sub>-(4'-metilaminofenil)-6-hidroxibenzotiazol), un análogo fluorescente de tioflavina T. En algunas realizaciones, un ligando radiactivo es Amyvid® (florbetapir F18) o 18F-flutemetamol. En algunas realizaciones, la técnica de formación de neuroimágenes es el barrido mediante PET que usa el compuesto B de Pittsburgh como agente formador de imágenes. En algunas realizaciones, la técnica de formación de neuroimágenes es el barrido mediante PET que usa Amyvid® como agente formador de imágenes. En algunas realizaciones, la técnica de formación de neuroimágenes es el barrido mediante PET que usa 18F-flutemetamol como agente de formador de imágenes.

Neuroimagen. Como se usa aquí, el término “neuroimagen” se refiere a una imagen o foto generada por una técnica de formación de neuroimágenes. En algunas realizaciones, una “neuroimagen” se refiere a uno o más barridos de CAT (o CT), SPECT, PET, MRI o fMRI.

Parenteral. El término “parenteral”, como se usa aquí, incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal. Preferiblemente, las composiciones se administran por vía oral, intraperitoneal o intravenosa. Las formas inyectables estériles de las composiciones de esta invención pueden ser suspensiones acuosas u oleaginosas. Estas suspensiones pueden formularse según técnicas conocidas en la técnica, usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están el agua, disolución de Ringer y disolución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites estériles fijos se emplean convencionalmente como un disolvente o medio de suspensión.

Paciente. El término “paciente”, como se usa aquí, significa un mamífero al que se administra una formulación o composición que comprende una formulación, y en algunas realizaciones incluye seres humanos.

Portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión “portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a un portador, adyuvante o vehículo no tóxico que no destruye la actividad farmacológica del compuesto con el que se formula. Los portadores, adyuvantes o vehículos farmacéuticamente aceptables que se pueden usar en las composiciones de esta invención incluyen, pero no se limitan a, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como seroalbúmina humana, sustancias amortiguadoras tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas parciales de glicéridos de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloques de polietileno-polioxiopropileno, polietilenglicol y grasa de lana.

Inhibidor selectivo de p38. Como se usa aquí, la frase “inhibidor selectivo de p38” se refiere a un agente que provoca un efecto biológico (es decir, un efecto inhibidor o antagonista) sobre la proteína cinasa activada por mitógeno p38 (también denominada p38 MAPK), que es al menos un orden de magnitud mayor que otra cinasa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un inhibidor selectivo de p38 es un inhibidor que es selectivo para p38 MAPK con respecto a otras proteínas cinasas o tirosina cinasas. En algunas realizaciones, un inhibidor selectivo de p38 es selectivo para una isoforma de p38 MAPK con respecto a otra. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un inhibidor selectivo de p38 se refiere a un inhibidor que tiene mayor efecto antagonista frente a una de las isoformas de p38 MAPK alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gamma ( $\gamma$ ) o delta ( $\delta$ ) con respecto a otra isoforma. En algunas realizaciones, un inhibidor selectivo de p38 se refiere a un inhibidor que tiene mayor efecto antagonista frente a la isoforma p38 $\alpha$  de MPAK en comparación con las isoformas p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  y/o p38 $\delta$ . Los inhibidores de p38 selectivos representativos incluyen, pero no se limitan a, RWJ 67657, SCIO 469, EO 1428, Org 48762-0, SD 169, SB 203580, SB 202190, SB 239063, SB 220025, VX 745, SB 242235, VX 702, SD-282, PH-797804 y otros. El documento WO98/27098 también describe inhibidores de p38.

Agente terapéutico. Como se usa aquí, la frase “agente terapéutico” se refiere a cualquier agente que provoca un efecto biológico o farmacológico deseado cuando se administra a un organismo.

Cantidad terapéuticamente eficaz y cantidad eficaz. Como se usa aquí, y a menos que se especifique lo contrario, las expresiones “cantidad terapéuticamente eficaz” y “cantidad eficaz” de un agente se refieren a una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico en el tratamiento, prevención y/o manejo de una enfermedad, trastorno o afección, por ejemplo, para retrasar el comienzo o minimizar (por ejemplo, reducir la incidencia y/o magnitud de) uno o más síntomas asociados con la enfermedad, trastorno o afección a tratar. En algunas realizaciones, se puede afirmar que una composición contiene una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un agente si contiene una cantidad que es eficaz cuando se administra como una dosis única dentro del contexto de un régimen terapéutico. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que, cuando se administra como parte de un régimen de dosificación, es estadísticamente probable que retrase el comienzo o minimice (reduzca la incidencia y/o magnitud de) uno o más síntomas o efectos secundarios de un enfermedad, trastorno o afección. En algunas realizaciones, una “cantidad terapéuticamente eficaz” es una cantidad que mejora la eficacia terapéutica de otro agente con el que la composición se administra en combinación. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz para administración a un ser humano corresponde a una cantidad de referencia (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz en un modelo animal tal como un modelo de ratón) ajustada para el área de superficie corporal de un ser humano en comparación con el área de superficie corporal del modelo animal, como se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, Reagan-Shaw et al., “Dose translation from animal to human studies revisited,” *The FASEB Journal* 22: 659-661 (2007)). En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de referencia es una cantidad que es terapéuticamente eficaz en un modelo de ratón, por ejemplo, como se describe aquí. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de referencia está dentro del intervalo de alrededor de 0,0001 mg/kg a alrededor de 500 mg/kg. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de referencia está dentro del intervalo de alrededor de 0,0001 mg/kg a alrededor de 0,001 mg/kg. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de referencia está dentro del intervalo de alrededor de 0,001 mg/kg a alrededor de 0,01 mg/kg. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de referencia está dentro del intervalo de alrededor de 0,01 mg/kg a alrededor de 0,1 mg/kg. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de referencia está dentro del intervalo de alrededor de 0,1 mg/kg a alrededor de 0,5 mg/kg. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de referencia está dentro del intervalo de alrededor de 0,5 mg/kg a alrededor de 1 mg/kg. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de referencia está dentro del intervalo de alrededor de 1 mg/kg a alrededor de 2,5 mg/kg. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de referencia está dentro del intervalo de alrededor de 2,5 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de referencia está dentro del intervalo de alrededor de 10 mg/kg a alrededor de 50 mg/kg. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de referencia está dentro del intervalo de alrededor de 50 mg/kg a alrededor de 100 mg/kg. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de referencia está dentro del intervalo de alrededor de 100 mg/kg a alrededor de 250 mg/kg. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de referencia está dentro del intervalo de alrededor de 250 mg/kg a alrededor de 500 mg/kg.

Tratar o tratando. Los términos “tratar” o “tratando”, como se usan aquí, se refieren a aliviar parcial o completamente, inhibir, retrasar el comienzo de, reducir la incidencia de, producir profilaxis de, mejorar y/o aliviar un trastorno, enfermedad o afección, o uno o más síntomas o manifestaciones del trastorno, enfermedad o afección.

Dosis unitaria. La expresión “dosis unitaria”, como se usa aquí, se refiere a una unidad físicamente discreta de una formulación apropiada para un sujeto a tratar (por ejemplo, para una dosis única); conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de un agente activo seleccionado para producir un efecto terapéutico deseado cuando se administra según un régimen terapéutico (entendiéndose que pueden requerirse múltiples dosis para lograr un efecto deseado u óptimo), opcionalmente junto con un portador farmacéuticamente aceptable, que puede proporcionarse en una cantidad predeterminada. La dosis unitaria puede ser, por ejemplo, un volumen de líquido (por ejemplo, un portador aceptable) que contiene una cantidad predeterminada de uno o más agentes terapéuticos, una cantidad predeterminada de uno o más agentes terapéuticos en forma sólida, una formulación de liberación sostenida, o dispositivo de suministro de fármacos que contiene una cantidad predeterminada de uno o más agentes terapéuticos, etc. Se apreciará que una dosis unitaria puede contener una variedad de componentes, además del agente o agentes terapéuticos. Por ejemplo, los portadores aceptables (por ejemplo, portadores farmacéuticamente aceptables), diluyentes, estabilizadores, amortiguadores, conservantes, etc., pueden incluirse como se describe más abajo. Sin embargo, se entenderá que el uso diario total de una formulación de la presente invención será decidido por el médico tratante dentro del alcance del buen juicio médico. El nivel de dosis eficaz específico para cualquier sujeto u organismo particular puede depender de una variedad de factores, que incluyen el trastorno que se esté tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto activo específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del sujeto; el tiempo de administración y la velocidad de excreción del compuesto activo específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos y/o terapias adicionales usados en combinación o coincidencia con el compuesto o compuestos específicos empleados, y factores similares bien conocidos en las artes médicas. En algunas realizaciones, una dosis unitaria de un inhibidor de p38 es alrededor de 1 mg, 3 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg o 50 mg.

60 Patología de la enfermedad de Alzheimer

La patología de la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por el depósito de placas amiloides extracelulares en el parénquima cerebral, y ovillos neurofibrilares en las neuronas.

El componente principal de las placas amiloides extracelulares que se encuentran en los cerebros de los pacientes con enfermedad de Alzheimer es la proteína beta-amiloide ( $A\beta$ ) anormalmente plegada, un péptido de 36 a 43 aminoácidos producido por la proteólisis de la proteína precursora amiloide (APP) por enzimas conocidas como secretasas. La APP es una proteína de membrana integral expresada en muchos tejidos y concentrada en las sinapsis de las neuronas. Se desconoce su función principal, aunque se ha implicado como un regulador de la formación de la sinapsis, la plasticidad neural y la exportación de hierro. Las isoformas más comunes de  $A\beta$  son  $A\beta_{40}$  y  $A\beta_{42}$ ; la forma más corta se produce típicamente por escisión que ocurre en el retículo endoplásmico, mientras que la forma más larga se produce por escisión en la red trans-Golgi. La forma  $A\beta_{40}$  es la más común de las dos, pero  $A\beta_{42}$  es la más fibrillogénica y, de este modo, está asociada con estados de enfermedad. Se ha observado que las mutaciones en la APP asociadas con la enfermedad de Alzheimer de inicio temprano aumentan la producción relativa de  $A\beta_{42}$  y, de este modo, un camino sugerido para la terapia de Alzheimer implica modular la actividad de las secretasas  $\beta$  y  $\gamma$  para producir principalmente  $A\beta_{40}$ .

Por el contrario, los ovillos neurofibrilares son agregados intracelulares de la proteína tau asociada a microtúbulos (MAPT). Las proteínas tau, abundantes en las neuronas del sistema nervioso central, pero menos comunes en otros lugares, estabilizan los microtúbulos. La tau hiperfosforilada (hTau) se asocia con otras hebras de tau, formando eventualmente ovillos neurofibrilares dentro de los cuerpos de las células nerviosas. Cuando esto ocurre, los microtúbulos se desintegran, colapsando el sistema de transporte de la neurona, lo que da como resultado un mal funcionamiento en la comunicación bioquímica entre las neuronas y, finalmente, la muerte celular.

Las pruebas recientes sugieren que los procesos neuroinflamatorios también contribuyen a la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer. Véase, por ejemplo, Hull et al., "Pathways of Inflammatory Activation in Alzheimer's Disease: Potential Targets for Disease Modifying Drugs," *Curr. Med. Chem.* 2002, 9, 83-88. La microglía, las células inflamatorias residentes del cerebro, se encuentran en un estado altamente activado en el cerebro de la enfermedad de Alzheimer, incluyendo alteraciones morfológicas, proliferación, aumento de la expresión de los receptores de la superficie celular, y secreción de citocinas y quimiocinas inflamatorias. La microglía cumple numerosas tareas diferentes dentro del sistema nervioso central (SNC) relacionadas tanto con la respuesta inmune como con el mantenimiento de la homeostasis. El papel principal de la microglía es la fagocitosis, o el engullimiento de diversos materiales. Los materiales engullidos incluyen neuronas dañadas, placas, restos celulares, y agentes infecciosos tales como virus y bacterias. La microglía se acumula en el sitio de los depósitos de  $A\beta$  recién formados en el cerebro de la enfermedad de Alzheimer, y puede ayudar a restringir el crecimiento de placas al degradar  $A\beta$ .

Estudios recientes también han mostrado que la sobreexpresión de IL-1 $\beta$ , una citocina inflamatoria, conduce a una patología de  $A\beta$  reducida en modelos de ratón de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, las microglías activadas crónicamente también se asocian con citocinas inflamatorias, incluyendo TNF $\alpha$ , que pueden bloquear sustancialmente la capacidad de la microglía para eliminar o degradar  $A\beta$ . De este modo, el papel de la microglía en la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer es complejo, ejerciendo la activación microglial un efecto beneficioso o perjudicial según las condiciones locales.

Una ruta de señalización a través de la cual se comunican las neuronas y la microglía es la fractalquina (CX3CL1) y su receptor relacionado (CX3CR1), un par único de ligando-receptor de quimiocinas uno a uno. Se ha demostrado que la señalización de CX3CL1-CX3CR1 desempeña un papel importante en la neuroinflamación y neuroprotección. Principalmente, CX3CL1 se expresa altamente en neuronas, mientras que CX3CR1 se expresa exclusivamente en microglía. Un estudio reciente demostró que la inhibición o delección del receptor microglial CX3CR1 conduce a una mejora de la patología amiloidea en modelos de ratón transgénico de inicio rápido y de inicio gradual de la enfermedad de Alzheimer. Véase Lee et al., "CX3CR1 Deficiency Alters Microglial Activation and Reduces Beta-Amyloid Deposition in Two Alzheimer's Disease Mouse Models", *The American Journal of Pathology*, 177(5): 2549-2562 (2010). De hecho, los ratones deficientes en CX3CR1 exhibieron una reducción, dependiente de la dosis, en la deposición de  $A\beta$  en el modelo de ratón APPPS1 de la enfermedad de Alzheimer, sugiriendo que la deficiencia de CX3CR1 aprovecha los efectos beneficiosos de la activación microglial en respuesta a  $A\beta$ . Además, el número de microglías asociadas a placas disminuyó en los ratones genosuprimidos en comparación con el control. Sin embargo, a pesar de la reducción en el número de microglía alrededor de los depósitos de  $A\beta$  en los animales con deficiencia de CX3CR1, se observó una reducción significativa en la deposición de  $A\beta$ , consistente con una mayor capacidad de la microglía para eliminar  $A\beta$ . De este modo, la señalización de CX3CR1 parece inhibir la fagocitosis microglial y prevenir el aclaramiento eficaz de  $A\beta$ . Estos resultados sugieren que las alteraciones en la señalización de CX3CL1-CX3CR1 pueden conducir a capacidades fagocíticas alteradas de la microglía.

La neuroinflamación microglial también promueve la fosforilación y agregación de MAPT a través de la sobreexpresión de IL-1. Recientemente, se ha mostrado que la deficiencia de CX3CR1 da como resultado una activación microglial mejorada y una fosforilación/agregación de MAPT en ratones tau humanizados. Los investigadores observaron que los ratones tau humanizados transgénicos desarrollan primero MAPT hiperfosforilada a los 3 meses de edad, agregados de MAPT a los 9 meses de edad, y pérdida neuronal a los 15 meses de edad. Significativamente, a los 12 meses de edad, los ratones tau humanizados exhibieron microglía en el hipocampo con procesos más cortos y cuerpos celulares más redondos compatibles con la activación microglial.

Sin desear estar limitados por ninguna teoría particular, se cree que la activación de la microglía en respuesta a tales señales inflamatorias, particularmente procesos neuroinflamatorios, retrasa la acumulación de placas de beta amiloide asociadas con la enfermedad de Alzheimer. De este modo, es probable que la inhibición o supresión de las cascadas inflamatorias evite la activación microglial, lo que lleva a un aumento en la acumulación de placas beta amiloides y la progresión de la enfermedad de Alzheimer.

Inhibidores de p38 MAPK

Muchos estímulos extracelulares, incluyendo las citocinas proinflamatorias y otros mediadores inflamatorios, provocan respuestas celulares específicas a través de la activación de las rutas de señalización de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK). Las MAPKs son serina-treonina cinasas dirigidas a prolina que transducen los estímulos ambientales al núcleo. Una vez activadas, las MAPKs activan otras cinasas o proteínas nucleares a través de la fosforilación, incluyendo posibles factores de transcripción y sustratos. Las nuevas MAPKs de la proteína cinasa reactivante de mamíferos (p38/RK) son proteínas cinasas activadas por el estrés que median las respuestas al estrés celular y a señales inflamatorias.

La activación de p38 MAPK ocurre en las etapas muy tempranas de la enfermedad de Alzheimer, y es un contribuyente importante a la inflamación del cerebro. Véase, por ejemplo, Bhasker et al., "Regulation of Tau Pathology by the Microglial Fractalkine Receptor", *Neuron* 68:19-31 (2010). De hecho, las fibrillas beta-amiloides en la microglía estimulan la activación rápida y transitoria de p38 MAPK, dando como resultado la expresión de genes inflamatorios y el aumento de citocinas proinflamatorias. De este modo, la activación de la ruta de p38 MAPK atenúa la acumulación de placas y estimula la degradación de la placa microglial.

Además, los investigadores confirmaron que la mejora de la fosforilación de MAPT podría bloquearse preincubando las neuronas *in vitro* con un inhibidor de MAPK específico, SB203580, indicando que la mejora de la fosforilación de MAPT se produjo a través de una ruta dependiente de p38 MAPK. De este modo, la investigación demuestra que el papel de p38 MAPK en la enfermedad de Alzheimer es complejo, ya que estimula tanto la degradación microglial de placas A $\beta$  como al mismo tiempo promueve la fosforilación de MAPT, un proceso que puede provocar ovillos neurofibrilares y pérdida de la función neuronal. Véase, por ejemplo, Muñoz, et al., "Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease", *Neuropharmacology*, 58(3):561-568 (2010).

El papel de p38 MAPK en las diversas etapas de la inflamación ha llevado al descubrimiento de varios compuestos capaces de inhibir p38 (SB203580, RWJ 67657, L-167307, VX-745, RPR200765A, y otros). Véase, por ejemplo, Kumar et al., "p38 MAP Kinases: Key Signaling Molecules as Therapeutic Targets for Inflammatory Diseases", *Nature Reviews*, 2: 717-726 (2003); Brown et al., "p38 MAP kinase inhibitors as potential therapeutics for the treatment of joint degeneration and pain associated with osteoarthritis", *J. Inflammation* 5:22 (2008). Estos inhibidores farmacológicos son fármacos antiinflamatorios supresores de citocinas, responsables de la inhibición *in vitro* e *in vivo* de la expresión del factor  $\alpha$  de necrosis tumoral inducido por lipopolisacárido (TNF- $\alpha$ ). Aunque los inhibidores de p38 MAPK han alcanzado el punto máximo de interés de los investigadores de la enfermedad de Alzheimer, la complejidad de la enfermedad ha limitado el uso de dichos agentes. Más particularmente, mientras que los inhibidores de p38 bloquean la fosforilación de tau, se espera que la disminución resultante en las cascadas inflamatorias aumente la acumulación de placas A $\beta$  debido a la falta de activación microglial.

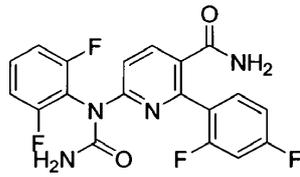
Ahora se ha encontrado sorprendentemente que los inhibidores de p38 MAPK reducen la carga de placas amiloides dentro del sistema nervioso central (SNC). Por consiguiente, la presente invención abarca el reconocimiento de que los inhibidores de p38 MAPK son eficaces para reducir la carga de placas amiloides asociada con la enfermedad de Alzheimer. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en la reducción de la carga de placas amiloides dentro del sistema nervioso central (SNC). En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en la reducción de la carga de placas amiloides asociada con la enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar a un paciente que lo necesita un inhibidor de p38 MAPK.

Inhibidores de p38 MAPK ejemplares

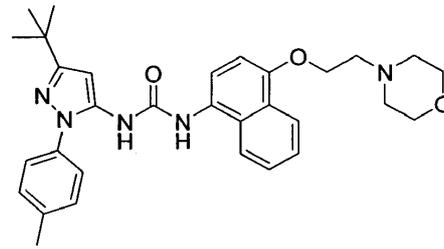
Como se describió generalmente más arriba, ha habido una amplia investigación dirigida al descubrimiento de inhibidores de p38 MAPK para el tratamiento de las diversas etapas de la inflamación.

Los inhibidores de p38 MAPK ejemplares pueden encontrarse, por ejemplo, en Mayer et al., "p38 MAP kinase inhibitors: A future therapy for inflammatory diseases", *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* 3(1): 49-54 (2006); y Regan et al., "Pyrazole Urea-Based Inhibitors of p38 MAP Kinase: from Lead Compound to Clinical Candidate", *J. Med. Chem* 2002, 45, 2994-3008. La Tabla 1 enumera inhibidores de MAPK p38 representativos.

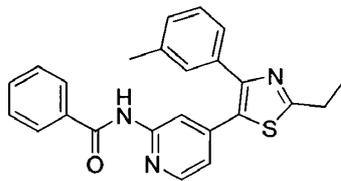
Tabla 1.



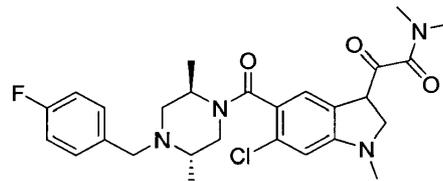
VX-702



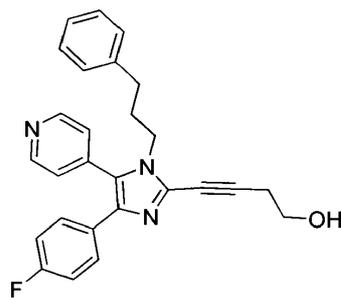
BIRB 796 (Doramapimod)



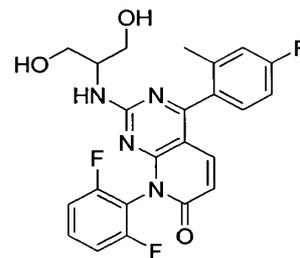
TAK-715



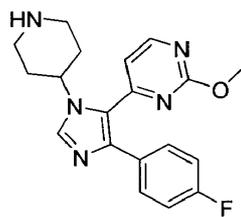
SCIO 469



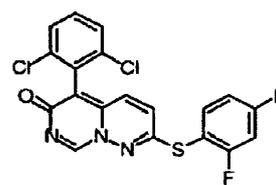
RWJ 67657



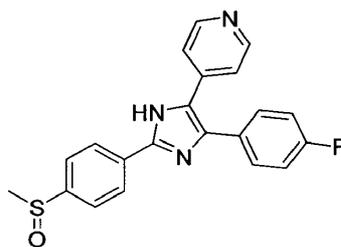
SB-681323



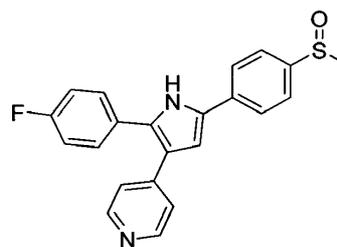
SB-242235



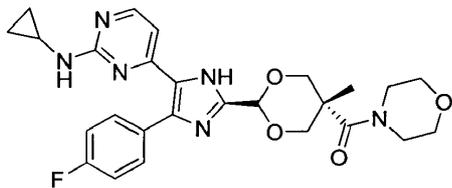
VX-745



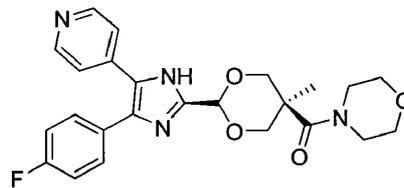
SB-203580



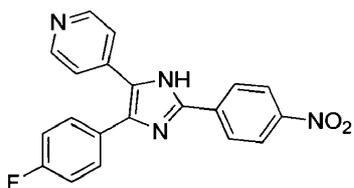
L-167307



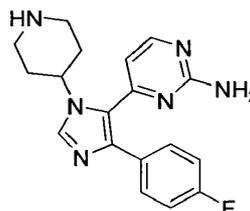
RPR-203494



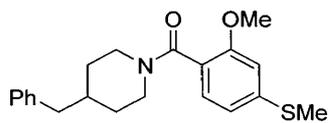
RPR-200765A



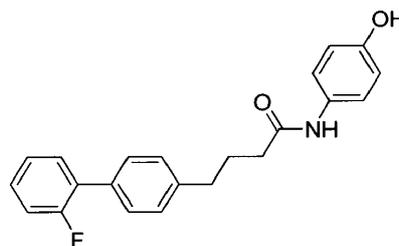
PD 169316



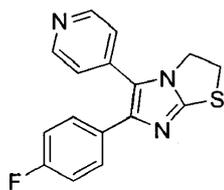
SB-200025



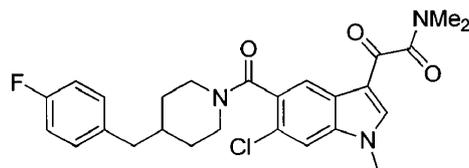
JX 401



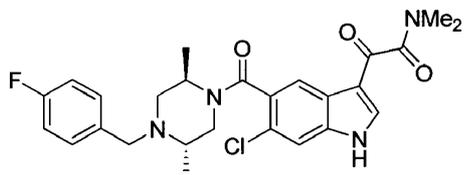
CMPD1



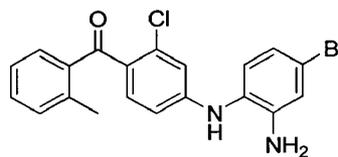
SKF 86002



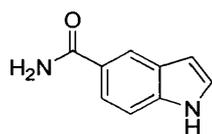
SX 011



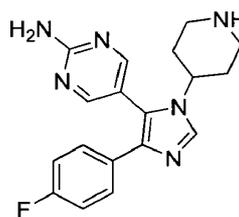
SD 282



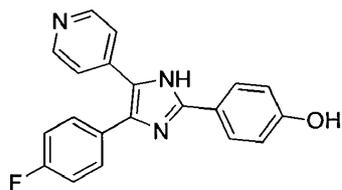
EO 1428



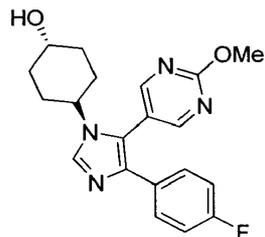
SD 169



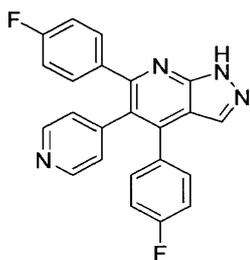
SB 220025



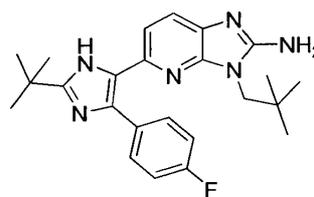
SB 202190



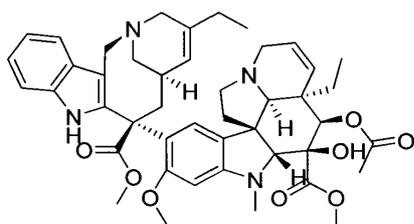
SB 239063



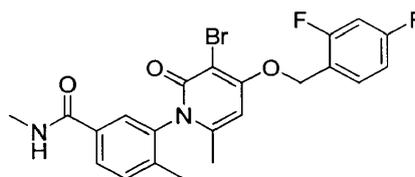
Org 48762-0



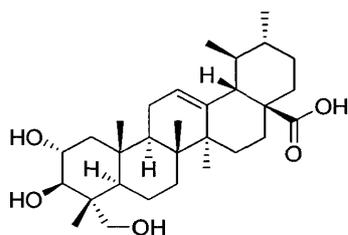
LY2228820



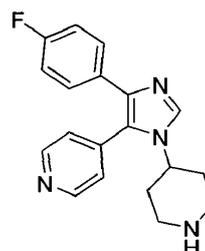
Vinorelbina



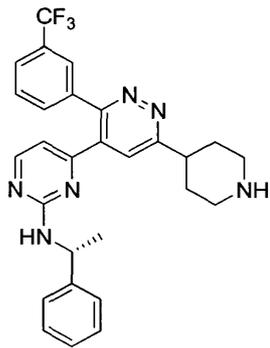
PH-797804



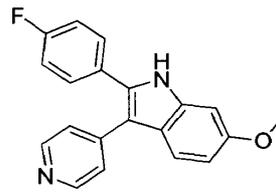
Ácido asiático



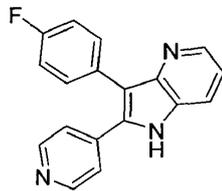
4-(4-(4-fluorofenil)-1-(piperidin-4-il)-1H-imidazol-5-il)piridina



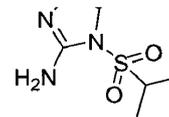
(R)-N-(1-feniletil)-4-(6-(piperidin- 4-il)-3-(3-(trifluorometil)fenil)piridazin-4-il)pirimidin-2-amina



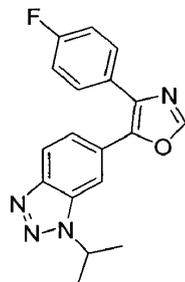
2-(4-fluorofenil)-6-metoksi-3-(piridin-4-il)-1H-indol



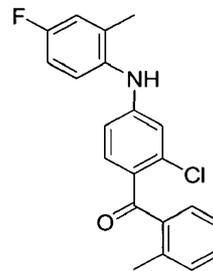
3-(4-fluorofenil)-2-(piridin-4-il)-1H-pirolo[3,2-b]piridina



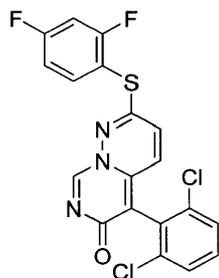
6-(2-(2,6-difluorofenil)-4-fenil-1H-imidazol-5-il)-1-(isopropilsulfonil)-1H-benzo[d]imidazol-2-amina



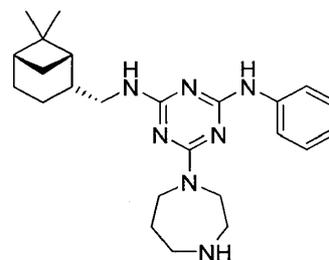
4-(4-fluorofenil)-5-(1-isopropil-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-6-il)oxazol



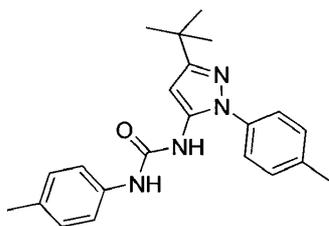
(2-cloro-4-(4-fluoro-2-metilfenilamino)fenil)(o-tolil)metanona



5-(2,6-diclorofenil)-2-(2,4-difluorofeniltio)-6H-pirimido[1,6-b]piridazin-6-ona



6-(1,4-diazepan-1-il)-N2-(((1S,2R,5S)-6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]heptan-2-il)metil)-N4-fenil-1,3,5-triazina-2,4-diamina



1-(3-tert-butyl-1-p-tolil-1H-pirazol-5-il)-3-p-tolilurea

5 VX-745 es un inhibidor selectivo de tipo molécula pequeña de p38 MAPK desarrollado por Vertex Pharmaceuticals para el tratamiento de la artritis reumatoide (AR). La inhibición de MAPK por VX-745 bloquea la síntesis aguas abajo de citocinas inflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Debido a que VX-745 exhibió una actividad antiinflamatoria significativa en los modelos de artritis de roedores, Vertex inició un ensayo clínico en artritis reumatoide humana (AR). Sin embargo, los pacientes tratados con 250 mg de VX-745 b.i.d. experimentaron sucesos adversos, incluyendo efectos gastrointestinales tales como diarrea y dolor abdominal, y elevaciones en las transaminasas hepáticas. Además, se sabe que VX-745 penetra la barrera hematoencefálica (BBB) en animales. De hecho, los animales sometidos a altas dosis de VX-745 experimentaron efectos neurológicos adversos, aunque estos eventos adversos no se observaron en seres humanos. A pesar de validar la prueba de concepto para la inhibición de p38 MAPK como tratamiento para AR, VX-745 se suspendió debido a la posibilidad de sucesos adversos graves.

Otro estudio que utilizó VX-745 como compuesto de referencia en un modelo de artritis demostró que una dosis de 10 mg/kg de VX-745 no era tan eficaz para inhibir la hinchazón de la pata como otros compuestos analizados. Véase Chopra et al., "Pharmacological profile of AW-814141, a novel, potent, selective and orally active inhibitor of p38 MAP kinase", *International Immunopharmacology*, 10: 467-473 (2010).

15 En un modelo de osteoartritis, VX-745 mostró una inhibición estadísticamente significativa de la degeneración de la rodilla en comparación con animales de control cuando se administró a ratas a 50 mg/kg. VX-745 también se evaluó en un modelo de hiperalgesia, y mostró inhibición significativa de la respuesta hiperalgésica cuando se administró a ratas a dosis de 30 mg/kg, 10 mg/kg y 3 mg/kg. Los investigadores descubrieron que los ratones exhibían hiperalgesia a las dosis de 3 mg/kg, 10 mg/kg y 30 mg/kg. Sin embargo, los investigadores observaron un efecto mínimo a la dosis de 3 mg/kg. Véase Brown et al., "p38 MAP kinase inhibitors as potential therapeutics for the treatment of joint degeneration and pain associated with osteoarthritis", *J. Inflamm.*, 5:22 (2008). Sin desear estar limitados por la teoría, se cree que los fallos clínicos de los inhibidores de p38 para tratar afecciones crónicas tales como la artritis reumatoide se deben a la redundancia de la ruta inflamatoria. Dicha redundancia da como resultado el aumento de los bucles de retroalimentación cuando p38 se inhibe crónicamente, conduciendo a una falta general de eficacia.

#### Usos de un compuesto o composición farmacéutica de la invención

Como se describió anteriormente, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en la reducción de la carga de placas amiloides dentro del SNC. En algunas realizaciones, el uso de un compuesto o composición farmacéutica para reducir la carga de placas amiloides comprende administrar a un paciente que lo necesite un inhibidor de p38 MAPK.

En algunas realizaciones, el uso de un compuesto o composición farmacéutica para reducir la carga de placas amiloides comprende administrar a un paciente que lo necesite un inhibidor selectivo de p38 MAPK.

35 En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en la reducción de la carga de placas amiloides mediante la administración a un paciente que lo necesite de una dosis baja de un inhibidor de p38 MAPK. En algunas realizaciones, el uso de un compuesto o composición farmacéutica para reducir la carga de placas amiloides comprende administrar VX-745 a un paciente que lo necesite. En algunas de tales realizaciones, el uso de un compuesto o composición farmacéutica para reducir la carga de placas amiloides comprende administrar una dosis baja de VX-745 a un paciente que lo necesite.

40 La eficacia terapéutica de un agente se ve afectada por el grado en el que se une a las proteínas del plasma sanguíneo. Solamente la fracción de agente no unido exhibe algún efecto farmacológico debido a que los agentes unidos a proteínas no pueden atravesar las membranas celulares ni difundirse por todo el cuerpo. De este modo, cuanto más unido esté un agente terapéutico, menor será la concentración del agente disponible para provocar la respuesta farmacológica deseada. Sin embargo, debido a que hay menos proteína en el cerebro, un agente terapéutico que sea capaz de atravesar la barrera hematoencefálica tendrá una mayor concentración de agente libre disponible para obtener la respuesta farmacológica deseada. De hecho, aunque se sabe que VX-745 es un agente altamente unido a proteínas, sus niveles cerebrales en perros son el doble que los niveles sistémicos.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en la reducción de la carga de placas amiloides asociada con la enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar

a un paciente que lo necesite una dosis baja de un inhibidor de p38 MAPK. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en la reducción de la carga de placas amiloides asociada con la enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar VX-745 a un paciente que lo necesite. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en la reducción de la carga de placas amiloides asociada con la enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar una dosis baja de VX-745 a un paciente que lo necesite.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en (i) reducir la carga de placas e (ii) inhibir la fosforilación de MAPT. En algunas realizaciones, el uso de un compuesto o composición farmacéutica en (i) reducir la carga de placas e (ii) inhibir la fosforilación de MAPT comprende administrar a un paciente que lo necesite un inhibidor de p38 MAPK. En ciertas realizaciones, el uso de un compuesto o composición farmacéutica en (i) reducir la carga de placas e (ii) inhibir la fosforilación de MAPT comprende administrar a un paciente que lo necesite una dosis baja de un inhibidor de p38 MAPK. En algunas realizaciones, el uso de un compuesto o composición farmacéutica en (i) reducir la carga de placas e (ii) inhibir la fosforilación de MAPT comprende administrar VX-745 a un paciente que lo necesite. En ciertas realizaciones, el uso de un compuesto o composición farmacéutica en (i) reducir la carga de placas e (ii) inhibir la fosforilación de MAPT comprende administrar a un paciente que lo necesite una dosis baja de VX-745.

Como se discutió anteriormente, mientras que la sobreexpresión de IL-1 $\beta$  aumenta el aclaramiento de A $\beta$ , la activación crónica de la microglía reduce la capacidad de la microglía para degradar A $\beta$ . De este modo, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en la reducción de la carga de placas sin inducir neuroinflamación. En algunas realizaciones, el uso de un compuesto o composición farmacéutica para reducir la carga de placas sin inducir neuroinflamación comprende administrar a un paciente que lo necesite un inhibidor de p38 MAPK. En algunas realizaciones, el uso de un compuesto o composición farmacéutica para reducir la carga de placas sin inducir neuroinflamación comprende administrar a un paciente que lo necesite una dosis baja de un inhibidor de p38 MAPK. En algunas realizaciones, el uso de un compuesto o composición farmacéutica para reducir la carga de placas sin inducir neuroinflamación comprende administrar VX-745 a un paciente que lo necesite. En algunas realizaciones, el uso de un compuesto o composición farmacéutica para reducir la carga de placas sin inducir neuroinflamación comprende administrar a un paciente que lo necesite una dosis baja de VX-745.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en la reducción de la carga de placas sin aumentar la expresión y/o los niveles de citocinas inflamatorias. En algunas realizaciones, el uso de un compuesto o composición farmacéutica para reducir la carga de placas sin aumentar la expresión y/o los niveles de citocinas inflamatorias comprende administrar a un paciente que lo necesite un inhibidor de p38 MAPK. En algunas realizaciones, el uso de un compuesto o composición farmacéutica para reducir la carga de placas sin aumentar la expresión y/o los niveles de citocinas inflamatorias comprende administrar a un paciente que lo necesite una dosis baja de un inhibidor de p38 MAPK. En algunas realizaciones, el uso de un compuesto o composición farmacéutica para reducir la carga de placas sin aumentar la expresión y/o los niveles de citocinas inflamatorias comprende administrar VX-745 a un paciente que lo necesite. En algunas realizaciones, el uso de un compuesto o composición farmacéutica para reducir la carga de placas sin aumentar la expresión y/o los niveles de citocinas inflamatorias comprende administrar a un paciente que lo necesite una dosis baja de VX-745.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en la reducción de la carga de placas sin aumentar la expresión y/o los niveles de IL-1 $\beta$ . En algunas realizaciones, el uso de un compuesto o composición farmacéutica para reducir la carga de placas sin aumentar la expresión y/o los niveles de IL-1 $\beta$  comprende administrar a un paciente que lo necesite un inhibidor de p38 MAPK. En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en la reducción de la carga de placas sin aumentar la expresión y/o los niveles de IL-1 $\beta$  administrando a un paciente que lo necesite una dosis baja de un inhibidor de p38 MAPK. En algunas realizaciones, el uso de un compuesto o composición farmacéutica para reducir la carga de placas sin aumentar la expresión y/o los niveles de IL-1 $\beta$  comprende administrar VX-745 a un paciente que lo necesite. En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en la reducción de la carga de placas sin aumentar la expresión y/o los niveles de IL-1 $\beta$  administrando a un paciente que lo necesita una dosis baja de VX-745.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona la administración de un inhibidor de p38, por ejemplo VX-745, una vez al día, dos veces al día, una vez a la semana, dos veces a la semana o una vez al mes. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona la administración de un inhibidor de p38 a intervalos más frecuentes, tales como una, dos, tres o cuatro veces al día, durante hasta una, dos o tres o más semanas, seguido de un programa de reducción gradual de la dosificación para mantener el nivel deseado del inhibidor de p38. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona la administración de un inhibidor de p38 a intervalos de una, dos, tres o cuatro veces al día, durante un máximo de uno, dos o tres o más meses, seguido de un programa de reducción gradual de la dosificación para mantener el nivel deseado del inhibidor de p38. Más particularmente, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona un programa de dosificación para la administración de un inhibidor de p38 a intervalos suficientes para alcanzar niveles terapéuticos en el cerebro, seguido de una reducción gradual de la dosificación.



paciente una dosis terapéuticamente eficaz de un inhibidor de p38, en el que la dosis terapéuticamente eficaz está entre alrededor de 5 mg y alrededor de 10 mg. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en la reducción del número y/o volumen de placas amiloides en un paciente que padece la enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar al paciente una dosis terapéuticamente eficaz de un inhibidor de p38, en el que la dosis terapéuticamente eficaz está entre alrededor de 10 mg y alrededor de 20 mg. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en la reducción del número y/o volumen de placas amiloides en un paciente que padece la enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar al paciente una dosis terapéuticamente eficaz de un inhibidor de p38, en el que la dosis terapéuticamente eficaz está entre alrededor de 20 mg y alrededor de 30 mg. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en la reducción del número y/o volumen de placas amiloides en un paciente que padece la enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar al paciente una dosis terapéuticamente eficaz de un inhibidor de p38, en el que la dosis terapéuticamente eficaz está entre alrededor de 30 mg y alrededor de 40 mg. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en la reducción del número y/o volumen de placas amiloides en un paciente que padece la enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar al paciente una dosis terapéuticamente eficaz de un inhibidor de p38, en el que la dosis terapéuticamente eficaz está entre alrededor de 40 mg y alrededor de 50 mg.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un mecanismo de aclaramiento de placas amiloides, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite un inhibidor de p38 MAPK.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en la reducción de la carga de placas en un paciente que lo necesite, comprendiendo dicho uso administrar a dicho paciente un inhibidor de p38 MAPK durante un período de menos de alrededor de 6 meses. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en la reducción de la carga de placas en un paciente que lo necesite, comprendiendo dicho uso administrar a dicho paciente un inhibidor de p38 MAPK durante un período de menos de alrededor de 4 meses. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en la reducción de la carga de placas en un paciente que lo necesite, comprendiendo dicho uso administrar a dicho paciente un inhibidor de p38 MAPK durante un período de menos de alrededor de 2 meses. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en la reducción de la carga de placas en un paciente que lo necesite, comprendiendo dicho uso administrar a dicho paciente un inhibidor de p38 MAPK durante un período de menos de alrededor de 1 mes. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en la reducción de la carga de placas en un paciente que lo necesite, comprendiendo dicho uso administrar a dicho paciente un inhibidor de p38 MAPK durante un período de menos de alrededor de 2 semanas.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en la reducción de la carga de placas amiloides, comprendiendo dicho uso:

(i) obtener imágenes del cerebro de un sujeto para producir una neuroimagen;

(ii) comparar la neuroimagen con una imagen de referencia, para determinar el número y/o el área de las placas amiloides; y

(iii) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de p38 si se determina que el sujeto tiene una mayor cantidad de placas amiloides en comparación con la imagen de referencia.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en la reducción de la carga de placas amiloides, comprendiendo dicho uso:

(i) obtener imágenes del cerebro de un sujeto;

(ii) determinar el número y/o área de las placas amiloides; y

(iii) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de p38 si el número y/o el área de las placas amiloides excede un umbral predeterminado.

En algunas realizaciones, la imagen de referencia es una imagen de un sujeto de control. En algunas realizaciones, la imagen de referencia es una imagen de un sujeto que tiene una función cognitiva normal. En algunas realizaciones, la imagen de referencia es una imagen de referencia del cerebro del sujeto. En algunas de tales realizaciones, la imagen de referencia es un barrido previo del cerebro del sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer.

En algunas realizaciones, las etapas de (i) formar imágenes, (ii) comparar placas amiloides con una imagen de referencia y/o determinar el número y/o área de placas amiloides y (iii) administrar un inhibidor de p38 se repiten en uno o más intervalos predeterminados. En algunas de tales realizaciones, un intervalo predeterminado es un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez

meses, once meses, doce meses. En algunas realizaciones, un intervalo predeterminado es un año, dos años, tres años, cuatro años o cinco años. En algunas realizaciones, el intervalo predeterminado es seis (6) meses.

En algunas realizaciones, el sujeto es un paciente en riesgo de desarrollar o sufrir la enfermedad de Alzheimer.

5 En algunas realizaciones, el cerebro de un sujeto es fotografiado usando una o más técnicas de formación de neuroimágenes. En algunas realizaciones, la técnica de formación de neuroimágenes se selecciona del grupo que consiste en tomografía axial computarizada (CAT o CT), tomografía computarizada de emisión de fotón único (SPECT), tomografía por emisión de positrones (PET), formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) o formación de imágenes por resonancia magnética funcional (fMRI). En algunas realizaciones, la técnica de formación de imágenes es la tomografía axial computarizada (CAT o CT). En algunas realizaciones, la técnica de formación de imágenes es la tomografía por emisión de positrones (PET). En algunas de tales realizaciones, el agente formador de imágenes usado en el barrido de PET se selecciona de amyvid o compuesto B de Pittsburgh. En algunas realizaciones, la técnica de formación de imágenes es la formación de imágenes por resonancia magnética (MRI). En algunas realizaciones, la técnica de formación de imágenes es la formación de imágenes por resonancia magnética funcional (fMRI).

15 Una persona de pericia normal entiende cómo determinar o medir el número y/o área de las placas amiloides en una neuroimagen. Por ejemplo, véase Zeman et al., "Diagnosis of Dementia Using Nuclear Medicine Imaging Modalities", Capítulo 8, 12 Chapters on Nuclear Medicine, Gholamrezaezhad, Ed., 199-229 (22 de diciembre de 2011), y Hsiao et al. "Correlation of early-phase <sup>18</sup>F-florbetapir (AV-45/Amyvid) PET images to FDG images: preliminary studies", European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 39(4), 613-620 (2012).

20 En algunas realizaciones, un inhibidor de p38 se administra durante un período de menos de seis (6) meses. En algunas realizaciones, un inhibidor de p38 se administra durante un período de menos de cuatro (4) meses. En algunas realizaciones, un inhibidor de p38 se administra durante un período de menos de dos (2) meses. En algunas realizaciones, un inhibidor de p38 se administra durante un período de menos de un (1) mes. En algunas realizaciones, un inhibidor de p38 se administra durante un período de menos de tres (3) semanas. En algunas realizaciones, un inhibidor de p38 se administra durante un período de menos de dos (2) semanas. En algunas realizaciones, un inhibidor de p38 se administra durante un período de menos de una (1) semana.

25 En algunas realizaciones, un umbral predeterminado es un valor de referencia para un sujeto particular. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se toma una imagen del cerebro de un sujeto en riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer, y se determina y/o mide el número y/o área de placas amiloides. El número y/o área de las placas es aquel valor de referencia o umbral predeterminado del sujeto frente al cual se comparan todas las imágenes cerebrales posteriores.

30 En algunas realizaciones, un umbral predeterminado se basa en el número y/o área de placas amiloides que se encuentran típicamente en un cerebro enfermo de Alzheimer. En algunas de tales realizaciones, un umbral predeterminado es un promedio del número y/o área de placas amiloides que se encuentran típicamente en un cerebro enfermo de Alzheimer.

35 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en la reducción de la carga de placas amiloides en un sujeto que padece o está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo dicho uso:

- (i) obtener imágenes del cerebro de un sujeto;
- 40 (ii) determinar el número y/o área de las placas amiloides; y
- (iii) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de p38 si el número y/o el área de las placas amiloides excede un umbral predeterminado.

45 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en el tratamiento de un sujeto que padece placas amiloides, en el que el número y/o área de las placas amiloides excede un umbral predeterminado, comprendiendo dicho uso administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de p38.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en el tratamiento de un sujeto que padece placas amiloides, en el que el número y/o el área de las placas amiloides excede un umbral predeterminado, comprendiendo dicho uso:

- 50 (i) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de p38 durante un período de menos de seis (6) meses;
- (ii) obtener imágenes del cerebro del sujeto a intervalos regulares; y
- (iii) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de p38 si el número y/o área de las placas amiloides excede el nivel de placas amiloides medido previamente.

En algunas de tales realizaciones, al sujeto se le administra un inhibidor de p38 durante un período de menos de cuatro (4) meses, menos de dos (2) meses, menos de un (1) mes, o menos de dos (2) semanas.

5 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en el tratamiento de un sujeto que padece placas amiloides, en el que el número y/o área de las placas amiloides excede un umbral predeterminado medido por una o más técnicas de formación de neuroimágenes, comprendiendo dicho uso administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de p38 durante un período de menos de seis (6) meses. En algunas de tales realizaciones, la técnica de formación de neuroimágenes es un barrido mediante PET. En algunas realizaciones, el uso comprende además (i) obtener imágenes del cerebro del sujeto a intervalos regulares; y (ii) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de p38 si el número y/o área de las  
10 placas amiloides excede el nivel de placas amiloides medido previamente.

#### Terapias de combinación

15 En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de p38 junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de p38 junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados de inhibidores de la colinesterasa, antagonistas de N-metil-D-aspartato, vitamina E, antidepresivos, ansiolíticos, antipsicóticos, estabilizadores del ánimo, y ayudas para dormir.

20 Los inhibidores representativos de la colinesterasa incluyen, sin limitación, donepezilo (Aricept®), rivastigmina (Exelon®), galantamina (Razadyne®) y tacrina (Cognex®).

Los antidepresivos representativos incluyen, sin limitación, bupropiona (Wellbutrin®), citalopram (Celexa®), fluoxetina (Prozac®), mirtazapina (Remeron®), paroxetina (Paxil®), sertralina (Zoloft®), trazodona (Desyrel®), venlafaxina (Effexor®), nortriptilina (Pamelor®) y desipramina (Norpramine®).

25 Los ansiolíticos representativos incluyen, sin limitación, lorazepam (Ativan®) y oxazepam (Serax®).

Los antipsicóticos representativos incluyen, sin limitación, aripiprazol (Abilify®), clozapina (Clozaril®), haloperidol (Haldol®), olanzapina (Zyprexa®), quetiapina (Seroquel®), risperidona (Risperdal®) y ziprasidona (Geodon®).

Los estabilizadores del estado de ánimo representativos incluyen, sin limitación, carbamazepina (Tegretol®) y divalproex (Depakota®).

30 Las ayudas para dormir representativas incluyen, sin limitación, zolpidem, zaleplón e hidrato de cloral.

Los antagonistas de N-metil-D-aspartato representativos incluyen, sin limitación, memantina (Namenda®).

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de p38 junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados del grupo que consiste en exenatida (Byetta®), vareniclina, PF-04360365, rivastigmina, LY450139, ST101, briostatina, EVP-6124, atomoxetina, HF0220, resveratrol, galantamina, PF-01913539, semagacestat, 3APS, inmunoglobulina, dimebon, alfa-tocoferol, BAY85-8101, estrógeno, progesterona, ACC-001, ginko biloba, nicergolina, piracetam, NIC5-15, xaliproden (SR57746A), indometacina, DMXB-A, LY2062430, 11-C PIB, bapineuzumab, etanercept, ramiprilo, interferón beta-la, simvastatina, ácido lipoico, aceite de pescado, curcumina, PF-04447943, folato, vitamina B6, vitamina B12, leuprolida, INM-176, AH110690, triptófano, SK-PC-B70M, BMS-708163, escitalopram, TRx0014, BAY94-9172, cerebrolisina, galato de epigalocatequina, SB-742457, litio, rosiglitazona, divalproex, SAR110894D, PRX-03140, CX516 (Ampalex), nicotinamida, rasagilina, AC-1202 (Ketasyn®), enduramida, neramexano, razadina, NS 2330 (Tesofensine®), tamibaroteno, acitretina, metilfenidato, mifepristona, ZT-1, AFFITOPE AD01, AFFITOPE AD02, GSK239512, GSK933776, SR57667B, PPI-1019, MPC-7869, AZD3480, PAZ-417, solanezumab, masitinib (AB1010), BAY1006578, ácido docosahexenoico, QS-21, MNI-558, reminyl retard, flutemetamol, estradiol, medroxiprogesterona, valproato, T-817MA, AZD1446, AAB-003 (PF-05236812), modafinilo, raloxifeno, atorvastatina, doxiciclina, trazodona, oxibato de sodio, huperzina A, luteína, zeaxantina, AC-3933, dextroanfetamina, EPAX 1050TG, SRA-333, MNI-168, CAD106, SGS742, NP031112, SSR180711C, GSI-953, prazosina, MEM 1003, AndroGel, AVE1625, ciclofosfamato, TC-5619-238, MK0249, lecozotan, circadina, MEM 3454, PPI-1019, UB 311, PF-04494700, ABT-089, LY451395, E2020, Rofecoxib, PF-03654746, EHT 0202 etazolato, DCB-AD1, ONO-2506PO, EGb761®, gantenerumab, florbetapir, ELND005, prednisona, novasoy, ginseng, pioglitazona, caprilideno, ABT-288, ABT-384, nefiracetam, AQW051, Pitavastatina, naproxeno sódico (Aleve®), lormoxicam, AN-1792, SR57667B, melatonina, SAM-531, MK0952, MK0677, IFN-alfa2A, BAY 94-9172, PYM50028, lecozotan SR, talidomida, tramiprosato, FK962, IVIG, RO5313534, bifeprunox, LNK-754, ELND005, NSA-789, ramelteon, Florbetaben, SRA-444, VP4896, celecoxib, hidrocodona, GSI-136, Zolpidem, MK3328, metformina, CTS21166, elontril, ibuprofeno, tartrato de posifeno, JNJ-39393406, testosterona, BRL-049653, BMS-708163, SAM-315, ketoconazol, fluconazol, warfarina, E2609, AZD0328, LY2886721, CHF 5074, E2212, acetaminofeno,

LY2811376, ABT-126, melatonina, GSK1034702, armodafinilo, depakote, gemfibrozilo, AL-108, levetiracetam, y quinacrina.

#### Composiciones farmacéuticas

- 5 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de p38 MAPK junto con uno o más agentes terapéuticos y un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una dosis baja de un inhibidor de p38 MAPK junto con uno o más agentes terapéuticos y un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para tratar la enfermedad de Alzheimer que comprende un inhibidor de p38 y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para tratar la enfermedad de Alzheimer, que comprende un inhibidor de p38 seleccionado entre VX-702, VX-745, BIRB 796, TAK-715, SCIO 469, RWJ 67657, SB 681323, SB 242235, SB 203580, L-167307, RPR-203494, RPR-200765A, PD 169316, SB 200025, JX 401, CMPD1, SKF 86002, SX 011, SD 282, EO 1428, SD 169, SB 220025, SB 202190, SB 239063, Org 48762-0, LY2228820, vinorrelbina, PH-797804 y ácido asiático, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunas de tales realizaciones, una composición farmacéutica para tratar la enfermedad de Alzheimer comprende un inhibidor de p38 en dosis bajas. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para tratar la enfermedad de Alzheimer, que comprende VX-745. En algunas de tales realizaciones, una composición farmacéutica comprende una dosis baja de VX-745.
- 10
- 15
- 20 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende VX-745 junto con uno o más agentes terapéuticos y un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una dosis baja de VX-745, uno o más agentes terapéuticos, y un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una dosis baja de VX-745, uno o más agentes terapéuticos seleccionados de donepezilo (Aricept®), rivastigmina (Exelon®), galantamina (Razadyne®), tacrina (Cognex®), bupropiona (Wellbutrin®), citalopram (Celexa®), fluoxetina (Prozac®), mirtazapina (Remeron®), paroxetina (Paxil®), sertralina (Zoloft®), trazodona (Desyrel®), venlafaxina (Effexor®), nortriptilina (Pamelor®), desipramina (Norpramine®), lorazepam (Ativan®), oxazepam (Serax®), aripiprazol (Abilify®), clozapina (Clozaril®), haloperidol (Haldol®), olanzapina (Zyprexa®), quetiapina (Seroquel®), risperidona (Risperdal®), ziprasidona (Geodon®), carbamazepina (Tegretol®), divalproex (Depakota®), zolpidem, zaleplón, hidrato de cloral, memantina (Namenda®), exenatida (Byetta®), vareniclina, PF-04360365, rivastigmina, LY450139, ST101, briostatina, EVP-6124, atomoxetina, HF0220, resveratrol, galantamina, PF-01913539, semagacestat, 3APS, inmunoglobulina, dimebon, alfa-tocoferol, BAY85-8101, estrógeno, progesterona, ACC-001, ginko biloba, nicergolina, piracetam, NIC5-15, xaliproden (SR57746A), indometacina, DMXB-A, LY2062430, 11-C
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- PIB, bapineuzumab, etanercept, ramiprilo, interferón beta-1a, simvastatina, ácido lipoico, aceite de pescado, curcumina, PF-04447943, folato, vitamina B6, vitamina B12, leuprolida, INM-176, AH110690, triptófano, SK-PC-B70M, BMS-708163, escitalopram, TRx0014, BAY94-9172, cerebrolisina, galato de epigallocatequina, SB-742457, litio, rosiglitazona, divalproex, SAR110894D, PRX-03140, CX516 (Ampalex), nicotinamida, rasagilina, AC-1202 (Ketasyn®), enduramida, neramexano, razadina, NS 2330 (Tesofensine®), tamibaroteno, acitretina, metilfenidato, mifepristona, ZT-1, AFFITOPE AD01, AFFITOPE AD02, GSK239512, GSK933776, SR57667B, PPI-1019, MPC-7869, AZD3480, PAZ-417, solanezumab, masitinib (AB1010), BAY1006578, ácido docosahexenoico, QS-21, MNI-558, remnilyl retard, flutemetamol, estradiol, medroxiprogesterona, valproato, T-817MA, AZD1446, AAB-003 (PF-05236812), modafinilo, raloxifeno, atorvastatina, doxiciclina, trazadona, oxibato de sodio, huperzina A, luteína, zeaxantina, AC-3933, dextroanfetamina, EPAX 1050TG, SRA-333, MNI-168, CAD106, SGS742, NP031112, SSR180711C, GSI-953, prazosina, MEM 1003, AndroGel, AVE1625, ciclofosfamato, TC-5619-238, MK0249, lecozotan, circadina, MEM 3454, PPI-1019, UB 311, PF-04494700, ABT-089, LY451395, E2020, Rofecoxib, PF-03654746, EHT 0202 etazolato, DCB-AD1, ONO-2506PO, EGb761®, gantenerumab, florbetapir, ELND005, prednisona, novasoy, ginseng, pioglitazona, caprilideno, ABT-288, ABT-384, nefiracetam, AQW051, Pitavastatina, naproxeno sódico (Aleve®), lornoxicam, AN-1792, SR57667B, melatonina, SAM-531, MK0952, MK0677, IFN-alfa2A, BAY 94-9172, PYM50028, lecozotan SR, talidomida, tramiprosato, FK962, IVIG, RO5313534, bifeprunox, LNK-754, ELND005, NSA-789, ramelteon, Florbetaben, SRA-444, VP4896, celecoxib, hidrocodona, GSI-136, Zolpidem, MK3328, metformina, CTS21166, elontril, ibuprofeno, tartrato de posifeno, JNJ-39393406, testosterona, BRL-049653, BMS-708163, SAM-315, ketoconazol, fluconazol, warfarina, E2609, AZD0328, LY2886721, CHF 5074, E2212, acetaminofeno, LY2811376, ABT-126, melatonina, GSK1034702, armodafinilo, depakote, gemfibrozilo, AL-108, levetiracetam, y quinacrina, y un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticamente aceptables de esta invención se formulan para administración oral. Las composiciones farmacéuticamente aceptables de esta invención se pueden administrar por vía oral en cualquier forma de dosificación aceptable por vía oral, incluyendo, pero sin limitarse a, cápsulas, comprimidos oblongos, comprimidos, suspensiones o disoluciones acuosas. En el caso de los comprimidos para uso oral, los portadores comúnmente usados incluyen lactosa y almidón de maíz. También se suelen añadir agentes lubricantes, tal como estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, el ingrediente

activo se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, también se pueden añadir ciertos agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes.

5 Las cantidades de los compuestos de la presente invención que se combinan con los materiales portadores para producir una composición en una forma de dosificación individual variarán dependiendo del paciente y del modo particular de administración. Preferiblemente, las composiciones proporcionadas deben formularse de modo que se pueda administrar una dosis de entre 1-50 mg/día del inhibidor de p38 (es decir, VX-745 u otro inhibidor de p38) a un paciente que recibe estas composiciones. Los ejemplos de composiciones incluyen composiciones formuladas para administrar dosis de entre 1-10 mg, 10-25 mg o 25-50 mg por día del inhibidor de p38 al paciente que recibe estas composiciones. En otras realizaciones de la invención, las composiciones incluyen composiciones formuladas para administrar dosis de entre 3-5 mg, 5-10 mg, 10-20 mg, 20-30 mg, 30-40 mg o 40-50 mg, por día del inhibidor para el paciente que recibe estas composiciones. En algunas realizaciones, la composición se formula en dosis que contienen 1 mg, 3 mg, 5 mg, 10 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg o 50 mg de la composición activa. Los regímenes de dosificación para estas formulaciones pueden incluir, pero no se limitan a, una dosificación de administración única, una dosificación una, dos o tres veces al día, una dosificación semanal, y una dosificación mensual.

15 En algunos regímenes de tratamiento, los pacientes serán tratados inicialmente con dosis más grandes de los compuestos de la presente invención ("dosis de carga") durante un cierto período de tiempo ("período de carga") a fin de lograr una concentración tisular elevada del fármaco, antes de ser tratado con dosis más bajas de composición activa ("dosis de mantenimiento") durante un período de tiempo más prolongado ("período de mantenimiento") a fin de mantener la concentración sérica o tisular de la composición activa.

20 En algunos regímenes de tratamiento, la administración del inhibidor a un paciente se interrumpe temporalmente ("vacaciones farmacológicas"). En algunos ejemplos, un paciente puede recibir ciclos de dosis diarias de inhibidor durante un mes, seguidos de un mes de vacaciones. En otro ejemplo, un paciente puede recibir una dosis diaria de un inhibidor durante seis meses, seguida de un mes de vacaciones. En otro ejemplo, un paciente puede recibir dosis diarias de un inhibidor durante tres semanas, seguidas de una semana de vacaciones. En aún otro ejemplo, un paciente podría recibir dosis diarias de un fármaco durante una semana, seguidas de tres semanas de vacaciones. En otro ejemplo, un paciente puede recibir ciclos de dosis semanales de un fármaco durante 6 semanas, seguidos de tres semanas de vacaciones.

30 También debe entenderse que una dosificación específica y un régimen de tratamiento para un paciente particular dependerán de una variedad de factores, que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos y el juicio del médico tratante y la gravedad de la enfermedad particular que se está tratando. La cantidad de un compuesto de la presente invención en la composición también dependerá del compuesto particular en la composición.

## EJEMPLIFICACIÓN

### 35 Ejemplo 1

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto del tratamiento oral con VX-745 2 semanas dos veces al día sobre la acumulación de beta amiloide (A $\beta$ ) y la carga de placas e inflamación en el modelo de ratón transgénico Tg2576 de la enfermedad de Alzheimer (EA).

40 Animales. Los ratones transgénicos se trataron con vehículo o VX-745 durante 2 semanas a partir de los 26 meses de edad. Después de 2 semanas de tratamiento, los animales se eutanasiaron, y los cerebros se usaron para los análisis bioquímicos e inmunohistoquímicos para determinar los niveles de beta amiloide insoluble y carga de placas mediante ELISA de A $\beta$ 1-42 e inmunohistoquímica de A $\beta$ . La inflamación se analizó mediante ELISA de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  de la corteza ventral, y la microgliosis mediante inmunohistoquímica de CD11b. El plasma se recogió en el punto final y se envió al cliente para el análisis de PK.

45 Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo según las directrices del Instituto Nacional de Salud (NIH) para el cuidado y uso de animales de laboratorio, y fueron aprobados por la State Provincial Office of Southern Finland. Para el experimento, se usaron ratones hembra transgénicos Tg2576 (n = 12) y ratones de tipo salvaje (n = 5), adquiridos en Taconic. Los animales se enjaularon a una temperatura estándar (22 $\pm$ 1°C) y en un ambiente de luz controlada (luces encendidas de 7 am a 8 pm), con acceso a voluntad a alimentos y agua. La estirpe transgénica Tg2576 se desarrolló mediante la inserción del constructo hAPP695 con el vector cósmido de proteína de príon de hamster y doble mutación "sueca" en un hospedante C57B6/JxSJL; el promotor de priones limita la sobreexpresión de APP mutante a las neuronas del cerebro. En consecuencia, el ratón Tg2576 desarrolla niveles cerebrales elevados de A $\beta$ 1-40 y A $\beta$ 1-42 solubles a los 6-8 meses de edad, y placas neuríticas que contienen A $\beta$  en la neocorteza y el hipocampo a los 10-16 meses. Los ratones se dividieron en grupos de tratamiento de la siguiente manera:

- 5 ratones de control de tipo salvaje tratados con vehículo

- 6 ratones Tg2576 tratados con vehículo
- 6 ratones Tg2576 tratados con VX-745 (3 mg/kg)

Almacenamiento del compuesto e instrucciones para la formulación. VX-745 fue suministrado a Cerebricon como compuesto seco por el patrocinador. El vehículo a utilizar fue Pluronic F108 al 1%. Las instrucciones de almacenamiento y disolución se proporcionaron por el patrocinador. El patrocinador proporcionó la hoja de datos de seguridad del material o un documento similar del compuesto. Las disoluciones se almacenaron según las instrucciones proporcionadas por el patrocinador (condiciones de almacenamiento y día de vencimiento de la disolución). El vehículo fue proporcionado por el patrocinador/Cerebricon.

Suministro de fármacos. La administración oral de VX-745 o vehículo por sonda oral (10 ml/kg) se realizó BID (dos veces al día) a partir de los 26 meses y continuando durante 14 días. El día de la eutanasia, el tratamiento se administró 2 horas antes de la eutanasia.

Estado general de salud y criterios de valoración humanos. Los animales se monitorizaron dos veces al día por personal de laboratorio (8 am y 4 pm). En los casos en que el estado de salud general de un animal empeoró significativamente, el ratón se eutanasió mediante una sobredosis de CO<sub>2</sub>, se decapitó, y el cerebro se procesó como se detalla más abajo. Las definiciones de los criterios de valoración aceptables incluyeron: sin movimientos espontáneos e incapacidad para beber o comer en un período de observación de 24 h, sangrado masivo, inflamación espontánea, falta de anatomía, hinchazón o tumores.

Recogida de muestras de plasma y cerebro. Dos horas después de la última dosis, los ratones se anestesiaron profundamente con pentobarbital sódico (60 mg/kg de Mebunat, Orion Pharma, Finlandia). Los ratones se sometieron a punción cardíaca, y se recogieron muestras de sangre en tubos de EDTA preenfriados (baño de hielo). Los tubos se mantuvieron en hielo, y el plasma se separó por centrifugación a 2000 g (+4°C) lo antes posible. Se transfirieron 150-200 µl de plasma de cada ratón a tubos de polipropileno preenfriados, y se mantuvieron congelados a -80°C hasta que se enviaron al patrocinador para el análisis de PK.

Los cerebros se perfundieron con disolución salina no heparinizada. El hemisferio derecho se fijó posteriormente por inmersión en PFA al 4% en PB 0,1 M. Después de un breve lavado con amortiguador de fosfato, se crioprotegió en sacarosa al 30% en PB durante 2-3 días, después de lo cual se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C para su análisis posterior (inmunohistoquímica). El hemisferio izquierdo (disecado en hielo hasta el hipocampo, la corteza ventral y dorsal y las fracciones restantes) se congeló reciente en hielo seco, y se almacenó a -80°C para análisis bioquímico (ELISA). El cerebelo se congeló reciente, y se almacenó a -80°C para análisis PK/otro futuro opcional.

Inmunohistoquímica. Se prepararon secciones coronales de veinte µm de grosor con un criostato, y se montaron en portaobjetos de vidrio SuperFrost Plus a partir de los hemisferios fijados, crioprotegidos y congelados. Se usaron secciones seleccionadas para los análisis inmunohistoquímicos. La carga de placas y el grado de agregados amiloides en las estructuras corticales e hipocampales se analizaron con tinción inmunohistoquímica de beta amiloide.

De las secciones adyacentes, se analizó el grado de microgliosis con inmunohistoquímica de CD11b.

Inmunohistoquímica de Aβ y CD11b: De forma breve, secciones de tejido usadas en inmunohistoquímica se descongelaron y se secaron al aire. Después de bloquear la actividad de peroxidasa interna y la unión inespecífica, y de los lavados, las secciones se hicieron reaccionar toda la noche a temperatura ambiente con:

- anti-Aβ (anti-Aβ[4-10] de ratón, the Genetics Company AB02, 1:20.000, clon W0-2)
- anti-CD11b (anti-CD11b de rata, AbD Serotec Inc. MCA711, 1:500)

Posteriormente, las secciones se incubaron con anticuerpo secundario biotinilado apropiado y complejo de avidina-biotina (kit Vectastain Elite, Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 2 h cada una. El complejo de avidina-biotina que contiene peroxidasa se visualizó usando, como sustrato, DAB mejorado con níquel. Finalmente, las secciones se enjuagaron, se deshidrataron, se cubrieron y se examinaron con un microscopio Leica 3000RB.

Análisis de imágenes. El software ImagePro Plus analizó la intensidad de la inmunotinción de secciones coronales de tejido igualmente espaciadas a lo largo del eje anteroposterior del hipocampo (3-4 secciones de tejido de cada animal). Las imágenes de tinción inmunorreactiva se capturaron a ajustes definidos de luz y filtro en un microscopio de campo brillante equipado con una cámara CCD a color. Las imágenes capturadas de los depósitos de placas inmunorreactivas de Aβ y los agregados de Aβ intraneuronales, así como las imágenes inmunorreactivas de CD11b, se convirtieron en imágenes de escala de grises, procesadas con una función de delineación para afilar los bordes para permitir una segmentación precisa. Las imágenes se segmentaron con un comando de umbral automático (ImageProPlus, MediaCybernetics). Los resultados se expresaron como fracción de área (area<sub>tot</sub> teñida/area<sub>tot</sub> medida, expresada en%), y se presentaron como media ± SEM entre las secciones de tejido analizadas de cada

ratón transgénico individual. La corteza ventral y el hipocampo dorsal se analizaron a partir de las secciones coronales (a nivel AP del hipocampo dorsal).

ELISA de amiloide beta 1-42 insoluble y soluble. Se aplicaron análisis ELISA de amiloide beta 1-42 para detectar la forma insoluble y soluble de A $\beta$ <sub>1-42</sub> en la corteza ventral.

5 La muestra de tejido de la corteza ventral se homogeneizó, y las muestras se prepararon según las instrucciones detalladas del fabricante (the Genetics Company, Suiza, hAmyloid B42 Brain ELISA). Brevemente, los tejidos se homogeneizaron con un homogeneizador Dounce (2x10 golpes en hielo) en amortiguador de lisis en una relación de 1:10 (peso del tejido:amortiguador de lisis). El amortiguador de lisis fue disolución salina amortiguada con Tris (TBS; base de Tris 20 mM y NaCl 137 mM, pH 7,4) con inhibidores de proteasa. El homogenado se centrifugó durante 10 minutos a +4°C con 13.000 rpm, y el sobrenadante se dividió en alícuotas, y se almacenó congelado a -20°C antes de los análisis (=A $\beta$  soluble).

El pelete se volvió a homogeneizar en ácido fórmico frío al 70% en agua destilada, se sometió a ultrasonidos durante 10 minutos, se neutralizó con volumen 15x de Tris 1M pH 7,4, y se centrifugó durante 10 minutos a +4°C con 13.000 rpm. El sobrenadante se almacenó congelado a -20°C (= A $\beta$  insoluble).

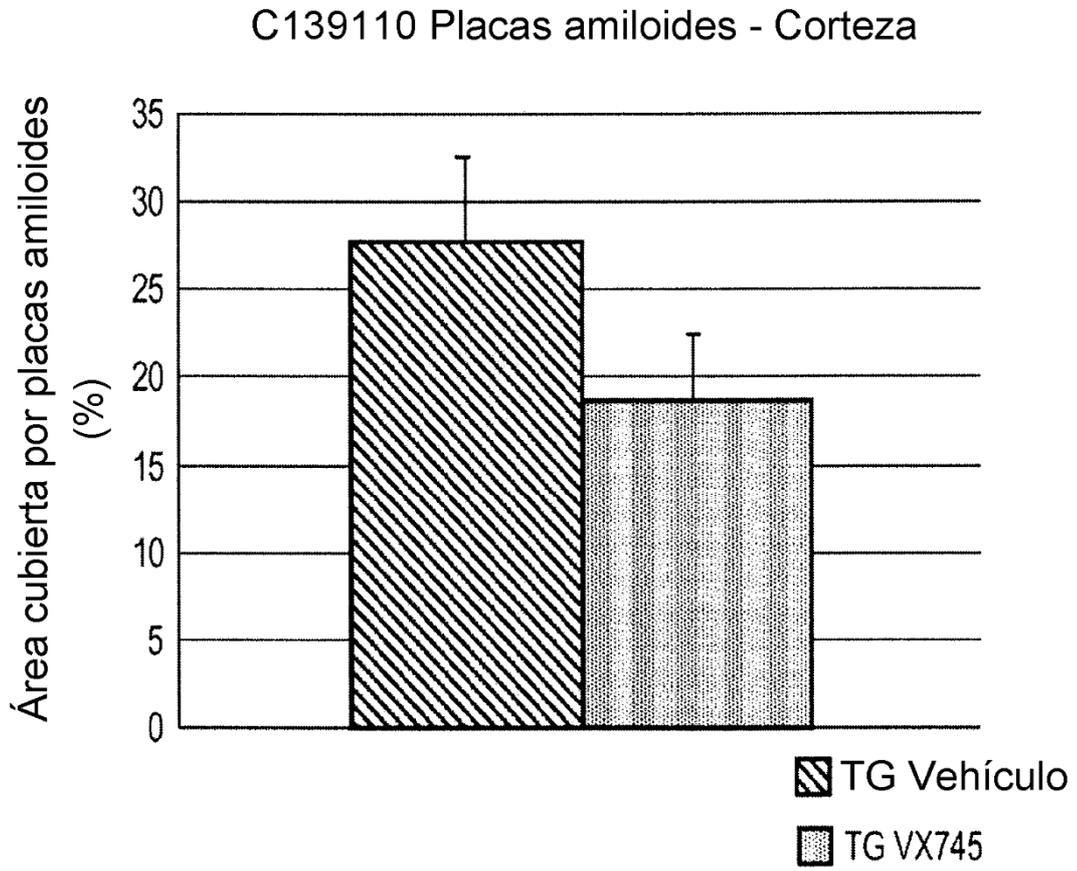
15 Los niveles de A $\beta$ <sub>1-42</sub> en las fracciones insolubles y solubles de muestras de tejido cerebral se analizaron con ELISA usando kits de ELISA de Amiloide Beta 1-42 (hAmyloid B42 Brain ELISAs, The Genetics Company, Suiza) según las instrucciones del fabricante. El intervalo de curva estándar fue de 25 a 500 pg/ml. Las Figuras 1A y 1B representan el porcentaje de área de placas amiloides A $\beta$ <sub>1-42</sub> de ratones transgénicos después de una administración de dos semanas de VX-745 3 mg/kg BID. Es de señalar particularmente que el presente estudio se realizó en ratones más mayores (26 meses de edad). Otros estudios intentan prevenir la acumulación de placas amiloides, y de este modo se realizan en ratones de alrededor de 4 y/u 8 meses de edad (véase, por ejemplo, Zhu et al., J. Neuroscience, 31(4): 1355-136 (2011). Los ratones Tg2576 de 26 meses de edad tienen niveles cerebrales elevados de placa amiloide soluble hacia los 6-8 meses de edad. Los presentes experimentos se diseñaron para evaluar la capacidad de aclaramiento de la placa amiloide de un inhibidor de p38 (es decir, VX-745). Significativamente, VX-745 mostró una disminución del 32,5% del área de la placa amiloide en la corteza en comparación con el vehículo (área promedio de la placa amiloide del 27,7% en el control frente al área promedio de la placa amiloide del 18,7% en los animales tratados con VX-745). VX-745 mostró una disminución del 61,8% del área de la placa amiloide en el hipocampo en comparación con el vehículo (área promedio de la placa amiloide del 13,6% en el control frente al área promedio de la placa amiloide del 5,2% en los animales tratados con VX-745).

30 ELISA de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . Los niveles de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  se analizaron a partir de la fracción soluble de tejido cerebral de la corteza dorsal con kits de ELISA de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  de ratón (Quantikine M Cytokine mouse IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  ELISA kits, RND-Systems, MLB00 y MTA00, R&D Systems, MN, USA) según las instrucciones del fabricante. La Figura 2 representa los niveles de IL-1 $\beta$  en ratones transgénicos tras una administración de dos semanas de VX-745 3 mg/kg BID. Se sabe que los incrementos en la inflamación, particularmente la neuroinflamación, desencadenan la fosforilación y agregación de MAPT a través de la sobreexpresión de IL-1. La Figura 2 representa los niveles de IL-1 $\beta$  en ratones tratados frente a ratones de control y de tipo salvaje. En particular, los ratones tratados con VX-745 no mostraron incrementos en los niveles de IL-1 $\beta$  en comparación con los animales de tipo salvaje o de control.

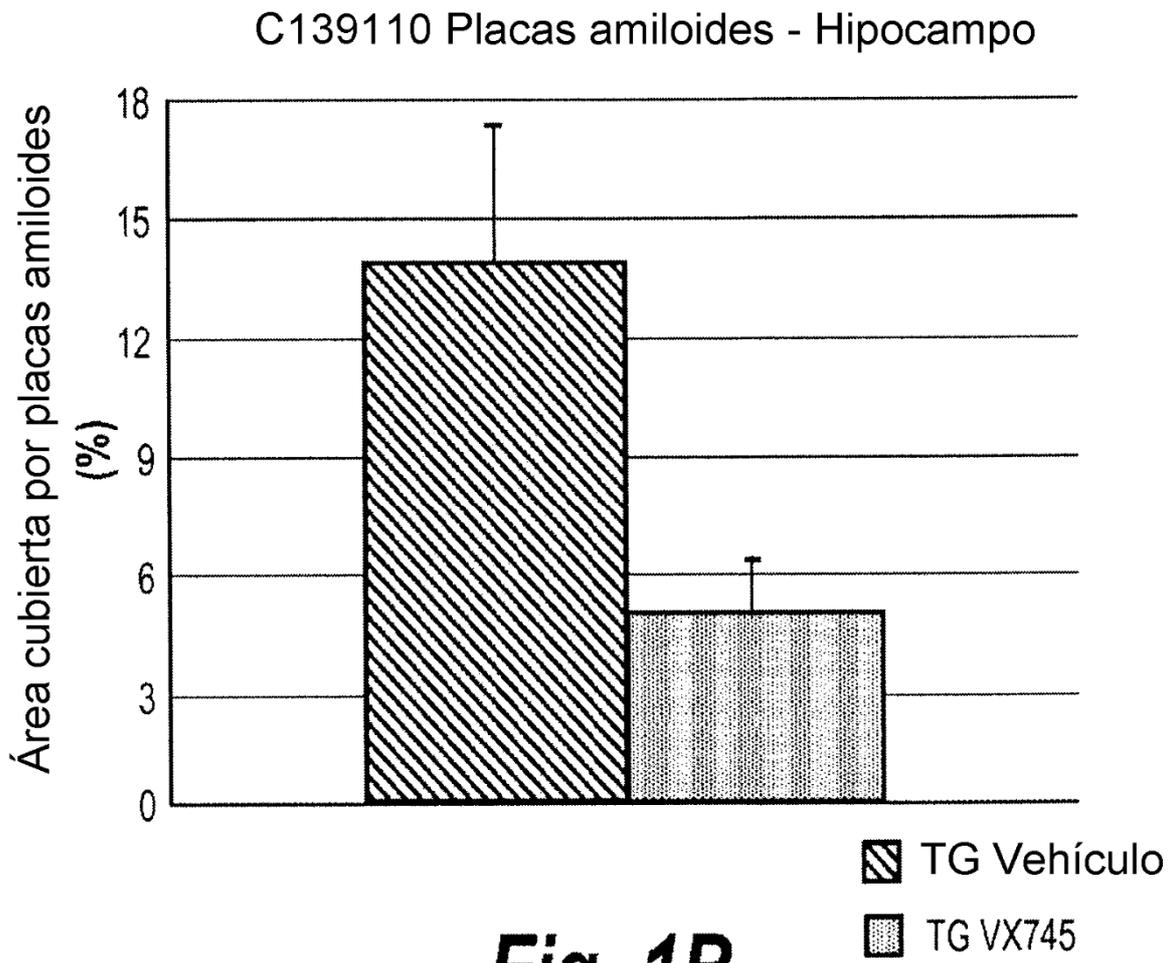
40 Análisis estadístico. Todos los datos se presentaron como media  $\pm$  desviación estándar (SD) o error estándar de media (SEM), y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a nivel de P<0,05. El análisis estadístico se realizó usando el software estadístico StatsDirect. Las diferencias entre las medias grupales se analizaron mediante la prueba de la t no pareada.

**REIVINDICACIONES**

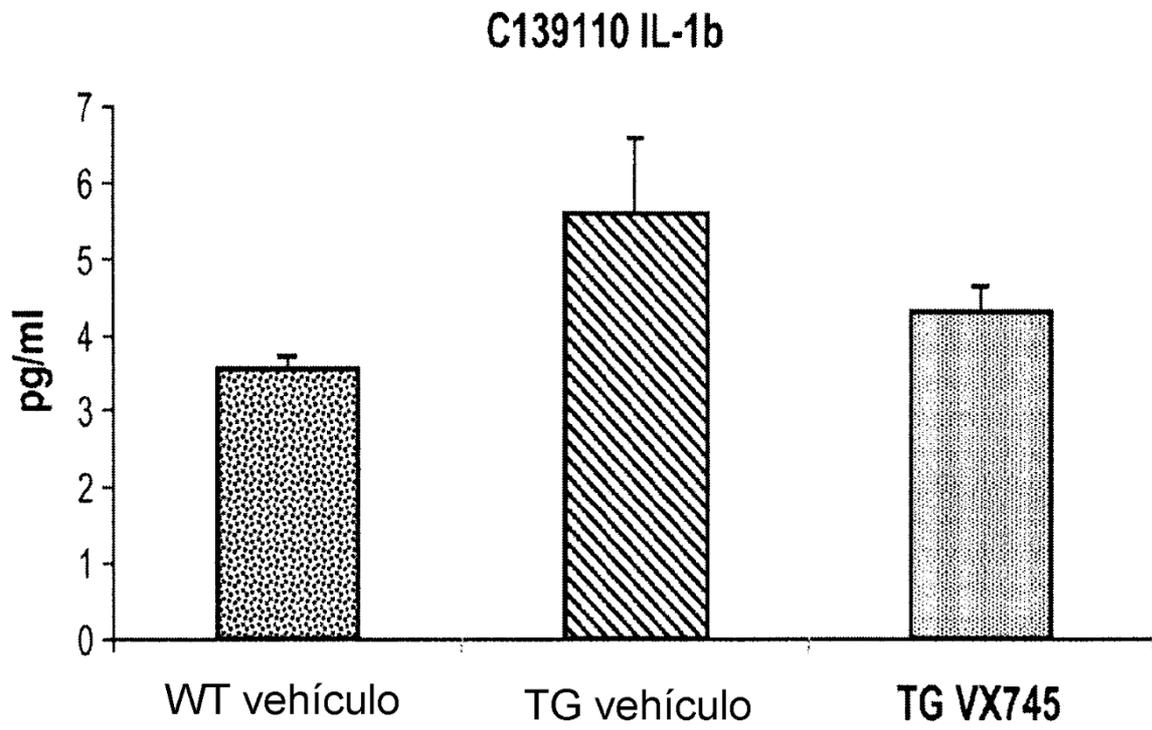
1. Una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de p38 y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, en la que dicho inhibidor de p38 es VX-745, para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
- 5 2. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1, en la que el paciente tiene placas amiloides cerebrales.
3. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1 o 2, en la que la composición farmacéutica comprende VX-745 en una dosis unitaria de 1 mg a 50 mg.
- 10 4. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1 o 2, en la que la composición farmacéutica comprende VX-745 en una dosis unitaria de alrededor de 1 mg, 3 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg o 50 mg.
5. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 4, en la que la composición farmacéutica comprende VX-745 en una dosis unitaria de alrededor de 40 mg.
6. La composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición farmacéutica se administra al paciente dos veces por día.
- 15 7. La composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la composición farmacéutica se administra al paciente una vez por día.
8. La composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición farmacéutica se formula para administración oral.
- 20 9. Compuesto VX-745 para uso en la reducción de la carga de placas amiloides, en el que el uso comprende administrar VX-745 a un paciente que lo necesite, y en el que VX-745 se administra a una dosis unitaria de alrededor de 1 mg, 3 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg o 50 mg.
10. Compuesto VX-745 para uso según la reivindicación 9, en el que la dosis unitaria es alrededor de 40 mg.



**Fig. 1A**



**Fig. 1B**



***Fig. 2***