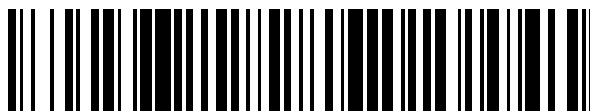


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 049**

51 Int. Cl.:

A61K 31/04 (2006.01)

A61K 31/5375 (2006.01)

A61K 31/438 (2006.01)

A61K 38/08 (2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.07.2013 PCT/US2013/050126**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14011917**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2013 E 13816713 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 2882428**

54 Título: **Un método para inhibir la fosforilación de tau**

30 Prioridad:

13.07.2012 US 201261671235 P
15.03.2013 US 201361789180 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.06.2019

73 Titular/es:

PAIN THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
2211 Bridgepointe Parkway Suite 500
San Mateo, CA 94404, US

72 Inventor/es:

WANG, HOAU-YAN y
BURNS BARBIER, LINDSAY

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 716 049 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).

DESCRIPCION

Un método para inhibir la fosforilación de tau

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención contempla un método de tratamiento del sistema nervioso central (SNC) para inhibir la formación de la proteína tau hiperfosforilada y el uso de un compuesto contemplado en la fabricación de un medicamento para inhibir la hiperfosforilación de la proteína tau que puede llevar a la formación patológica de ovillos neurofibrilares (NFT). El método y el uso también llevan a la mejora de la función de uno o más del receptor de acetilcolina alfa-7 nicotínico ($\alpha 7nAChR$), el receptor de insulina y el receptor *N*-metil-D-aspartato.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

La proteína tau asociada a los microtúbulos (MAPT) se encuentra principalmente en los axones y en cantidades menores en los astrocitos y oligodendrocitos, y estabiliza los microtúbulos neuronales para su papel en el desarrollo de los procesos celulares, estableciendo la polaridad celular y el transporte intracelular. Un solo gen codifica una proteína tau con un marco de lectura abierto que puede codificar 758 residuos de aminoácidos. La tau se enumera en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot con la designación P10636. Se reconocen por lo menos nueve isoformas de corte y empalme alternativas en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot.

Los primeros trabajos de Goedert y colaboradores identificaron seis isoformas que contienen de 352 a 441 residuos de aminoácidos [Mandelkow et al., Trends in Cell Biology, 8:425-427 (1998); ver también, Johnson et al., J. Cell Sci, 117(24): 5721-5729 (2004)]. La numeración de la secuencia de residuos de aminoácidos y las posiciones de fosforilación a las que se hace referencia en la presente se realiza de acuerdo con la isoforma de tau humana denominada "htau 40" en Goedert et al., Neuron 3: 519-526 (1989). Esa isoforma tau de 441 residuos también se conoce como Tau-4 o Tau-F en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot en la que se le da la designación P10636-8. La secuencia de residuos de aminoácidos de TAU-4 (P10636-8, htau 40) se muestra en la SEQ ID NO: 2.

Tau es un sustrato para una serie de enzimas quinasas [Johnson et al., J Cell Sci, 117 (24): 5721-5729 (2004)]. Se encuentra frecuentemente fosforilación en los residuos de serina y treonina en los motivos S-P o T-P por las proteínas quinasas dirigidas por la prolina (PDPK1: CDK1, CDK5, GSK3, MAPK) y en los residuos de serina en los motivos K-X-G-S por la quinasa reguladora de la afinidad MAP/microtúbulos (MARK1 o MARK2).

Una enzima de ese grupo, la glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK3 β), puede ser una tau quinasa predominante [Cho et al., J. Neurochem, 88:349-358 (2004)]. GSK3 β puede fosforilar los sitios no cebados que se encuentran en regiones ricas en prolina (Thr-181, Ser-184, Ser-262, Ser-356 y Ser-400) o sitios no cebados (Ser-195, Ser-198, Ser-199, Ser-202, Thr-205, Thr-231, Ser-235, Ser-262, Ser-356 y Ser-404) donde una serina o treonina está preposforilada por otra proteína quinasa (por ejemplo, A-quinasa) en un sitio que está localizado cuatro residuos de aminoácidos C-terminales al sitio GSK3 β [Cho et al., J. Neurochem, 88:349-358 (2004); Wang et al., FEBS Lett, 436:28-34 (1998)].

La forma normofosforilada de la proteína es una proteína asociada a los microtúbulos que estimula y estabiliza el ensamblaje de los microtúbulos. Esa forma normofosforilada contiene típicamente dos o tres moles de fosfato por mol de proteína [Kickstein et al., Proc Natl Acad Sci, USA, 107(50):21830-21835 (2010)].

Las proteínas tau fosforiladas multiplicadas (hiperfosforiladas); es decir, las proteínas tau que contienen más del número normofosforilado de grupos fosfato, pueden dar lugar a la formación de ovillos neurofibrilares que están asociados con varias afecciones patológicas que son referidas colectivamente como tauopatías. Por ejemplo, los niveles de fosforilación de tau en pacientes con enfermedad de Alzheimer son de tres a cuatro veces más altos que el número de grupos fosfato presentes en la molécula normofosforilada [Kickstein et al., Proc Natl Acad Sci, USA, 107(50):21830-21835 (2010)].

La evidencia creciente sugiere que la neuroinflamación es una característica común de las tauopatías. Por tanto, se encuentran microglia activadas en los tejidos cerebrales postmortem de diversas tauopatías humanas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (EA), la demencia frontotemporal (DFT), la parálisis supranuclear progresiva y la degeneración corticobasal [Gebicke-Haerter, Microsc Res Tech, 54:47-58 (2001); Gerhard et al., Mov Disord, 21:89-93 (2006); Ishizawa et al., JNeuropathol Exp Neurol, 60:647-657 (2001)].

La inducción de la inflamación sistémica mediante la administración del ligando del receptor tipo Toll 4 (TLR4), lipopolisacárido (LPS), induce significativamente la hiperfosforilación de MAPT (tau) en un modelo de ratón transgénico triple de EA [Kitazawa et al., J Neurosci, 25:8843 -8853 (2005)]. El fármaco inmunosupresor FK506 (tacrolimus) atenuó la activación microglial y extendió la vida útil del modelo de ratón transgénico P301S de FTD [Yoshiyama et al., Neuron 53:337-351 (2007)]. Además, un número creciente de estudios sugiere que las citoquinas proinflamatorias, como la interleucina-1 (IL-1), la interleucina-6 (IL-6) y el óxido nítrico liberado por los astrocitos

pueden acelerar la patología de la MAPT y la formación de ovillos neurofibrilares (NFT) *in vitro* [Li et al., J Neurosci, 23:1605-1611 (2003); Quintanilla et al., Exp Cell Res, 295:245-257 (2004); Saez et al., In Vivo, 18:275-280 (2004)].

Los receptores tipo toll (TLR) son un grupo de receptores transmembrana cuyas porciones citoplásmicas son muy similares, y tienen una gran similitud con el receptor de interleucina-1 (IL-1). Esa porción citoplásmica es referida ahora como el dominio del receptor Toll/IL-1 (TIR). Las porciones extracelulares no están relacionadas estructuralmente. Los TLR reconocen componentes patógenos. [Takeda et al., Seminars in Immunology, 16:3-9 (2004).]

El TLR4 desempeña un papel fundamental en el reconocimiento de patógenos al reconocer el lipopolisacárido (LPS) que se encuentra en la mayoría de las bacterias gram-negativas, así como en otras moléculas. Este receptor también desempeña un papel en la activación de la inmunidad innata. La activación de la vía de TLR4 puede ser un indicador de una infección.

El TLR4 se asocia típicamente con la molécula adaptadora, MD2, CD14 y la molécula de unión a lipopolisacáridos (LPB) cuando se asocia con LPS. La señalización se produce a través de una serie de moléculas citoplásmicas en lo que se conoce como la vía dependiente del factor de diferenciación mieloide 88- (MyD88-) común a todos los TLR, y la vía independiente de MyD88 compartida por TLR3 y TLR4. El TLR3 reconoce el ARN de cadena doble y su activación se produce bajo diferentes condiciones de la activación de TLR4.

La señalización inducida por LPS a través de la vía independiente de MyD88 lleva a la activación del factor de transcripción IRF-3, y por lo tanto induce IFN- β . IFN- β , a su vez, activa Stat1, lo que lleva a la inducción de varios genes inducibles por IFN. La activación de NF- κ B y JNK inducida por LPS parece ser independiente de la presencia de MyD88. [Takeda et al., Seminars in Immunology, 16:3-9 (2004).]

El TLR4 está presente en las células del sistema inmunológico, como las células B, las células T y los macrófagos, así como las células del SNC. El TLR4 es un mediador importante de la respuesta inmune innata y contribuye significativamente a la neuroinflamación inducida por una lesión cerebral. La neuroinflamación mediada por TLR4 procede típicamente a través de la vía de señalización de MyD88 de TLR4/proteína adaptadora anterior.

Mao et al., J Neurotrauma, 14 de mayo (2012) informaron de los posibles mecanismos neuroprotectores del pretratamiento del polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria-(PACAP-) en un modelo de rata de lesión cerebral traumática (TBI). Se descubrió que el TBI indujo una regulación por incremento significativa de TLR4 con un pico de expresión teniendo lugar 24 horas después del trauma.

El pretratamiento con PACAP mejoró significativamente la disfunción cognitiva y motora, atenuó la apoptosis neuronal y disminuyó el edema cerebral. Ese pretratamiento inhibió la regulación por incremento de TLR4, así como la de sus moléculas de señalización descendentes, MyD88, p-I κ B y NF- κ B, y suprimió los aumentos en los niveles de los agentes inflamatorios descendentes, interleucina-1 β (IL-1 β) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α), en el tejido cerebral que rodea la corteza lesionada y en el hipocampo. El tratamiento con PACAP ejerció por tanto un efecto neuroprotector en este modelo de rata de TBI, potencialmente mediante la inhibición de una respuesta inflamatoria secundaria mediada por la vía de señalización de TLR4/MyD88/NF- κ B en la microglía y las neuronas, reduciendo de este modo la muerte neuronal y mejorando el resultado después de una TBI.

La lesión cerebral traumática (TBI) es una lesión "característica" de conflictos militares recientes y se asocia con síntomas psiquiátricos y discapacidad cognitiva a largo plazo. La encefalopatía traumática crónica (CTE), un trastorno neurodegenerativo ligado a la proteína tau hiperfosforilada (tauopatía) informada en atletas con múltiples conmociones cerebrales, comparte características clínicas con la TBI en personal militar expuesto a explosiones explosivas. La CTE también comparte la patología encontrada en los boxeadores que antes se conocía como demencia pugilística. [Gandy et al., Sci. Transl. Medicina. 4:1341-1343 (12 de mayo de 2012)].

Goldstein et al., Sci. Transl. Med. 4:134ra60 (2012), investigaron la conexión entre la TBI y la CTE en una serie de cerebros postmortem de veteranos militares de los Estados Unidos con exposición a explosiones y/o lesiones por conmoción cerebral. Esos autores informaron de evidencia de neuropatología de CTE en los cerebros de veteranos de guerra que es similar a la observada en los cerebros de jugadores de fútbol americano amateur jóvenes y un luchador profesional. Los investigadores desarrollaron un modelo de ratón de neurotrauma explosivo que imita las condiciones de explosión típicas asociadas con la lesión por explosiones militar y descubrieron que los ratones expuestos a explosiones también presentan neuropatología de CTE, incluyendo la hiperfosforilación de la proteína tau, la axonopatía mielinizada, el daño microvascular, la neuroinflamación crónica y la neurodegeneración.

Se ha informado que la neuropatología del ratón estaba acompañada de déficits funcionales, incluyendo conducción axonal ralentizada, plasticidad sináptica a largo plazo dependiente de la actividad reducida y aprendizaje espacial y memoria deteriorados que persistieron durante 1 mes después de la exposición a una única explosión. Luego, los investigadores demostraron que los déficits de aprendizaje y memoria inducidos por la explosión en los ratones se redujeron al inmovilizar la cabeza durante la exposición a la explosión.

Los descubrimientos neuropatológicos en veteranos militares con exposición a explosiones y/o lesiones por conmoción cerebral y atletas adultos jóvenes con lesión por conmoción repetitiva fueron consistentes con los estudios de casos anteriores de CTE de esos autores [McKee et al., J Neuropathol Exp Neurol 68:709-735 (2009); McKee et al., J Neuropathol Exp Neurol 69:918-929 (2010)], y se informó que se diferenciaron fácilmente de la neuropatología asociada con la enfermedad de Alzheimer, la demencia frontotemporal y otros trastornos neurodegenerativos relacionados con la edad.

La apolipoproteína E (ApoE) es una clase de apolipoproteína que se encuentra en el quilomicron y la lipoproteína de densidad intermedia (IDL) que se une a un receptor específico en las células hepáticas y las células periféricas. La ApoE se ha estudiado por su papel en varios procesos biológicos no relacionados directamente con el transporte de lipoproteínas, su función más estudiada, incluida la enfermedad de Alzheimer, la inmunorregulación y la cognición.

La ApoE tiene 299 aminoácidos de largo y transporta lipoproteínas, vitaminas liposolubles y colesterol al sistema linfático y luego a la sangre. Se sintetiza principalmente en el hígado, pero también se ha encontrado en otros tejidos como el cerebro. En el sistema nervioso, los tipos de células no neuronales, sobre todo la astrogliya y la microglia, son los principales productores de ApoE, mientras que las neuronas expresan preferentemente los receptores para ApoE.

Hay siete receptores de mamíferos identificados actualmente para ApoE que pertenecen a la familia de genes del receptor de lipoproteínas de baja densidad conservados evolutivamente. *ApoE* es un gen polimórfico con tres isoformas principales, *ApoE2*, *ApoE3*, *ApoE4*, que se traducen de tres alelos del gen, de los cuales *ApoE-ε3* es el alelo "normal", y *ApoE-ε2* y *ApoE-ε4* son alelos disfuncionales.

La ApoE4 se ha implicado en la aterosclerosis y la enfermedad de Alzheimer, la función cognitiva alterada y el crecimiento de neuritas reducido. La variante de ApoE4 es el mayor factor de riesgo genético conocido para la enfermedad de Alzheimer (EA) esporádica de inicio tardío en una variedad de grupos étnicos. Los portadores caucásicos y japoneses de dos alelos E4 tienen entre 10 y 30 veces más riesgo de desarrollar EA a los 75 años de edad, en comparación con los que no tienen alelos E4.

Aunque el 40-65% de los pacientes con EA tienen por lo menos una copia del alelo 4, La *ApoE4* no es un determinante de la enfermedad. Por lo menos un tercio de los pacientes con EA son *ApoE4* negativos y algunos homocigotos *ApoE4* nunca desarrollan la enfermedad. Sin embargo, aquellos con dos alelos E4 tienen hasta 20 veces más riesgo de desarrollar EA.

Además, la sobreexpresión de ApoE4 en neuronas de ratón dio como resultado una hiperfosforilación de tau y el desarrollo de problemas motores, acompañados de pérdida de masa muscular, pérdida de peso corporal y muerte prematura. [Tesseur et al., Am J Pathol, 156(3):951-964 (2000).] Por otro lado, el tratamiento de las neuronas con isoformas de ApoE (E2 o E4) suministradas exógenamente afecta varias cascadas de señalización descendentes en las neuronas: disminuyó la fosforilación de tau quinasa y la inhibición de la fosforilación de tau en los epítomos Thr171 y Ser202/Thr205 en el cultivo neuronal primario. La ApoE puede alterar los niveles de tau quinasa y epítomos de fosfo-tau, afectando potencialmente a los cambios neuropatológicos de tau observados en cerebros con EA. [Hoe et al., Molecular Degeneration, 1:8 (2006).]

Eisenberg y sus colaboradores han estudiado la formación de fibrillas de lámina beta a partir de la proteína tau autoagregante, y descubrieron que un hexapéptido particular puede inhibir su formación interfiriendo con la "cremallera estérica" de la fibrilla de lámina beta. Sin embargo, el péptido inhibidor es demasiado grande para penetrar profundamente en el cerebro y no parece que penetre en las células cerebrales en las que se forman las fibrillas de tau. Ver, Sawaya et al., Nature, 447:453-457 (2007); Landau et al., PLoS Biology, 9(6):e1001080 (2011); y Sievers et al., Nature, DOI: 10.1038/nature10154 (2011). Por lo tanto, sería beneficioso si se pudiera encontrar un inhibidor de la formación de NFT que contengan tau que penetre en el cerebro y otras estructuras del SNC, así como en las células de esas estructuras.

La enfermedad de Alzheimer (EA) plantea una gran necesidad médica no satisfecha, con una estimación de 35 millones de pacientes actuales en todo el mundo y ningún tratamiento modificador de la enfermedad disponible. Las dos clases de fármacos que se usan actualmente para la EA, los inhibidores de colinesterasa y memantina, solo mejoran de forma transitoria la función cognitiva en estos pacientes.

Se acepta generalmente que el agente causante en la patología de la EA es el amiloide-β (Aβ), Aβ₄₂. El Aβ es un producto de proteólisis de 39-42 residuos de la proteína precursora de amiloide (APP) que es una proteína de membrana integral expresada en muchos tejidos y concentrada en las sinapsis de las neuronas.

Los animales transgénicos con niveles de Aβ aumentados pueden modelar la AD, y los niveles de Aβ en cerebros con EA postmortem se correlacionan con el grado de deterioro cognitivo y neuropatología [Tanzi et al., Cell 120:545-555 (2005)]. Esta correlación es mayor para el Aβ soluble que para las placas ricas en Aβ, lo que implica el

A β soluble en la patogénesis de la EA [Naslund et al., J Am Med Assoc, 283:1571-1577 (2000)].

Se cree que el papel patógeno crítico de la A β soluble es la señalización tóxica a través del receptor de acetilcolina nicotínico α -7 (α 7nAChR), como se demostró hace una década. La A β se une a este receptor con alta afinidad [Wang et al., J Biol Chem 275:5626-5632 (2000); Wang et al., J Neurochem 75:1155-1161 (2000)], activando ERK2, que fosforila la proteína tau [Wang et al., J Biol Chem 278:31547-31553 (2003)]. ERK2 también se conoce como proteína quinasa 1 activada por mitógenos (MAPK1) indicada anteriormente.

La hiperfosforilación anormal persistente de las proteínas tau da como resultado ovillos neurofibrilares (NFT), una característica neuropatológica prominente en el cerebro con EA, y la magnitud de estas lesiones se correlaciona con la gravedad de los síntomas de la EA [Delacourte et al., Neurology 52:158-1165 (1999); Delacourte et al., Neurology 43:93-204 (1998)]. Los NFT son inicialmente intracelulares y se convierten en ovillos fantasmas extracelulares después de la muerte de la neurona [Mandelkow et al., Trends in Cell Biology, 8:425-427 (1998)].

Se ha demostrado que el péptido A β induce la fosforilación de tau en varios sistemas experimentales *in vitro* [Johnson et al., J. Alzheimers Dis 1:29-351 (1999)], y se ha demostrado que la fosforilación de tau inducida por A β es dependiente de α 7nAChR, ya que el pretratamiento de tejidos con antagonistas de α 7nAChR o con A β ₁₂₋₂₈, que inhiben la interacción A β ₄₂ - α 7nAChR, reduce la fosforilación de tau inducida por A β ₄₂ [Wang et al., J Biol Chem 278:31547-31553 (2003)].

La fosforilación de algunos sitios parece regular las propiedades de unión a microtúbulos (por ejemplo, Ser262 y Ser356) [Mandelkow et al., Trends in Cell Biology, 8:425-427 (1998)]. Por otro lado, la fosforilación en uno o más de 202Ser, 231Thr y 181Thr se encuentra en los NFT que contienen tau [Wang et al., J Biol Chem 278:31547-31553 (2003); Wang et al., Biol Psychiatry 67:522-530 (2010)].

El papel crítico de α 7nAChR en la mediación de la patología neurofibrilar está respaldado por al menos dos hallazgos: 1) la incubación prolongada de A β ₄₂ con células SK-N-MC que sobre-expresan NFT promotores de α 7nAChRs y 2) oligonucleótidos antisentido- α 7nAChR que reducen los niveles de α 7nAChR suprimen lesiones neurofibrilares inducidas por A β ₄₂ [Wang et al., J Biol Chem 278:31547-31553 (2003)]. Estos datos sugieren que la perturbación crónica de los α 7nAChRs con A β ₄₂ en cerebros con EA produce lesiones que contienen tau fosforiladas neurofibrilares.

Geerts et al. (1996) Neurobiol. Aging 17, 573-581 informa que el sabeluzol estabiliza el citoesqueleto neuronal.

Mohr et al. (1997) Clin. Neurofarmacol. 20, 338-345 describe un estudio que investiga el efecto del sabeluzol en pacientes con enfermedad de Alzheimer probable.

Wang et al. (18 de julio de 2012) J. Neurosci. 32, 9773-9784 y Wang et al. (19 de julio de 2012) Alzheimer's & Dementia 8, 259-260 informan de los efectos del compuesto PTI-125.

La WO 2010/084499 A2 describe compuestos espiro heterocíclicos bicíclicos para el tratamiento de enfermedades y afecciones que son susceptibles a la modulación del receptor muscarínico M1.

Tran et al. (2012) J. Neuropath. Exp. Neurol. 2, 116-129 describe un estudio que investiga los mecanismos responsables de la fosforilación y acumulación de tau aumentadas después de un trauma cerebral.

Como se trata con más detalle en la presente a continuación, la presente divulgación proporciona un método para inhibir la hiperfosforilación inducida por A β ₄₂ de las proteínas tau inhibiendo una o más vías de señalización que utilizan el andamiaje de señalización, filamina A (FLNA). En una vía, A β y α 7nAChR interactúan, lo que lleva al reclutamiento de FLNA. En otra vía, TLR4 se activa mediante A β ₄₂ o su ligando análogo, LPS por ejemplo, y la señalización mediada por TLR4 se activa a través del reclutamiento de FLNA al receptor TLR4. La A β ₄₂ induce el reclutamiento de FLNA a α 7nAChR o TLR4, así como la fosforilación de tau que puede observarse incubando 250.000 células en 250 μ l de Krebs-Ringer oxigenado con 1 nM de A β ₄₂. Se descubrió que este efecto mediado A β ₄₂ se estabilizó a 100 nM.

El enfoque de tratamiento divulgado a continuación está dirigido a inhibir la hiperfosforilación de proteínas tau mediada por FLNA usando un compuesto que se une a FLNA con alta afinidad. Se cree que esta unión altera la conformación de FLNA y evita que interactúe con otras moléculas de señalización, como α 7nAChR, inhibiendo de esta manera la hiperfosforilación de la proteína tau.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención es como se define en las reivindicaciones. La presente divulgación contempla un método para inhibir la hiperfosforilación [fosforilación en una o más de serina-202 (también 202Ser y S²⁰²), treonina-

231 (también 231Thr y T²³¹) y treonina-181 (también 181Thr y T¹⁸¹) además de la fosforilación que puede estar presente en cualquier otro sitio] de la proteína tau que comprende los pasos de administrar a las células del sistema nervioso central con necesidad reconocida (diagnosticada) de ello de una cantidad eficaz de un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que se une a a filamina A (FLNA) o se une a un pentapéptido de filamina A de la SEQ ID NO: 1 como se describe en el Ejemplo 1, por ejemplo, inhibe por lo menos aproximadamente el 60 por ciento y más preferiblemente aproximadamente el 70 por ciento de la unión de naloxona marcada con FITC cuando está presente a una concentración de 10 μ M y usando naloxona no marcada como inhibidor de control a la misma concentración. El compuesto es de la Serie C-2 como se describe en la presente a continuación, y preferiblemente contiene por lo menos de cuatro de los seis farmacóforos de las Figs. 35-40. La administración se lleva a cabo en ausencia de una cantidad eficaz de unión al receptor opioide mu (MOR) de una molécula agonista o antagonista de MOR separada.

También se contempla el uso de un único estereoisómero o mezcla de estereoisómeros, o una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto contemplado. La administración contemplada puede tener lugar *in vivo* o *in vitro*, y se repite típicamente durante un período de días o meses cuando se administra *in vivo*. La divulgación contempla un método para inhibir una respuesta inmune mediada por TLR4 como la inflamación de las células del SNC. Un método contemplado comprende administrar a células que contienen TLR4 con una necesidad reconocida de ello (diagnosticada) una cantidad eficaz de un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que se une a la filamina A o se une a un pentapéptido de filamina A (FLNA) de la SEQ ID NO: 1 como se describe en el Ejemplo 1, inhiba por lo menos aproximadamente el 60 por ciento y más preferiblemente aproximadamente el 70 por ciento de la unión de naloxona marcada con FITC cuando está presente a una concentración de 10 μ M y usar naloxona no marcada como el inhibidor de control a la misma concentración. Un compuesto contemplado es de la Serie C-2 como se describe en la presente, y preferiblemente contiene por lo menos cuatro de los seis farmacóforos de las Figs. 35-40. La administración se lleva a cabo preferiblemente en ausencia de una cantidad eficaz de unión al receptor opioide mu (MOR) de una molécula agonista o antagonista de MOR separada.

También se contempla el uso de un único estereoisómero o mezcla de estereoisómeros, o una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto contemplado. La administración contemplada puede tener lugar *in vivo* o *in vitro*, y se repite típicamente durante un período de días o meses cuando se administra *in vivo* a las células de un animal huésped tal como un humano.

En un aspecto de un método anterior, la hiperfosforilación de tau de uno o más de S²⁰², T²³¹ y T¹⁸¹ tiene lugar a través de la interacción de A β y α 7nAChR a través de la proteína de andamiaje filamina A (FLNA). En otro aspecto de un método contemplado, tal hiperfosforilación de tau tiene lugar a través de una respuesta inmune mediada por TLR4 en un mecanismo actualmente desconocido que también implica la intermediación de FNLA.

Actualmente se cree que cada una de las vías anteriores, A β - α 7nAChR y TLR4, pueden operar al mismo tiempo y también independientemente. Las condiciones del SNC ilustrativas que muestran una o ambas fosforilaciones de tau mediadas por A β - α 7nAChR y/o mediadas por TLR4 de uno o más de S²⁰², T²³¹ y T¹⁸¹ incluyen las de personas y otros animales cuyas células del SNC muestran una respuesta inmune como inflamación inducida por lesión cerebral como la lesión cerebral traumática (por ejemplo, conmoción cerebral), la encefalopatía traumática crónica, aquellas que tienen síntomas de la enfermedad de Alzheimer (EA), la demencia frontotemporal (FTD), la parálisis supranuclear progresiva, la demencia pugilística y la degeneración corticobasal y también la infección por uno o ambos de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

La inhibición de la unión a un pentapéptido de la SEQ ID NO: 1 mediante un compuesto contemplado se determina como se trata en el Ejemplo 1. Un compuesto contemplado está sustancialmente libre de unión con cualquier otra porción de FLNA a la concentración del compuesto contemplado usado. La libertad sustancial de unión a cualquier otra porción de FLNA puede determinarse usando un ensayo de titulación como el que se muestra en la Fig. 48A en la presente [Fig. 3 de Wang et al., PLoS One. 3(2):e1554 (2008)], que en esa figura indica la presencia de dos regiones de sitio de unión por los dos puntos de inflexión mostrados en el gráfico, mientras que la presencia de un único sitio de unión se indica por la presencia de un solo punto de inflexión en dicho gráfico (Fig. 48D). La libertad sustancial de unión con cualquier otra porción de FLNA también se puede inferir a partir de datos funcionales como un ensayo de liberación de citoquinas ilustrado posteriormente que indica que los compuestos contemplados no se unen al segundo sitio en FLNA porque los compuestos son eficaces sobre un amplio intervalo de concentraciones, a diferencia de aquellos compuestos tales como naloxona y naltrexona que se unen a dos sitios de unión en FLNA.

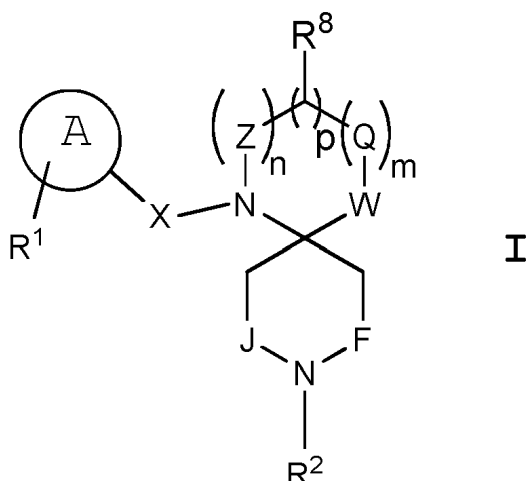
En el aspecto actualmente preferido, la presente divulgación contempla un método para inhibir la fosforilación de la proteína tau en uno o más de S²⁰², T²³¹ y T¹⁸¹ que comprende el paso de administrar a células del sistema nervioso central con una necesidad de ello reconocida (diagnosticada), como células cerebrales, una cantidad eficaz de un compuesto de uno o más de la Serie C-2, un estereoisómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Las células, *in vivo* o *in vitro*, como las células cerebrales con necesidad de ello reconocida (diagnosticada) son células en aquellos tejidos u órganos de un sujeto mamífero que muestran una respuesta inmune,

como inflamación inducida por una lesión cerebral como una lesión cerebral traumática, encefalopatía traumática crónica, aquellas con síntomas de la enfermedad de Alzheimer (EA), demencia frontotemporal (FTD), parálisis supranuclear progresiva, demencia pugilística y degeneración corticobasal y también infección por una o ambas bacterias Gram positivas y Gram negativas.

La administración se lleva a cabo preferiblemente en ausencia de una cantidad eficaz de unión a MOR de una molécula agonista o antagonista de MOR separada, y a menudo se lleva a cabo una pluralidad de veces durante un período de días o meses.

También se contempla el uso de un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la fabricación de un medicamento para inhibir la fosforilación de la proteína tau en células del sistema nervioso central que tienen necesidad reconocida de tratamiento. Dicho compuesto o su sal se une a un pentapéptido de filamina A de la SEQ ID NO: 1, inhibe por lo menos aproximadamente el 60 por ciento y más preferiblemente aproximadamente el 70 por ciento de la unión de naloxona marcada con FITC cuando está presente a una concentración de 10 μ M y usa naloxona sin marcar como el inhibidor de control a la misma concentración. Este uso contempla la fabricación de un medicamento que inhibe la hiperfosforilación de tau (fosforilación) a través de la interacción de A β y α 7nAChR a través de la proteína de andamiaje filamina A (FLNA), así como dicha hiperfosforilación de tau que se produce a través de una respuesta inmune mediada por TLR4 que también se cree que implica la intermediación de FNLA como se ha indicado anteriormente.

La estructura general del compuesto se muestra a continuación, seguida por divulgaciones más específicas para las varias letras y grupos R.



También se contemplan isómeros ópticos individuales y mezclas de isómeros ópticos de compuestos de la Fórmula anterior, como los son sales farmacéuticamente aceptables de esos compuestos.

Un compuesto contemplado descrito anteriormente o su sal farmacéuticamente aceptable se administra típicamente en una cantidad eficaz disuelta o dispersada en una composición farmacéutica. Esa composición farmacéutica puede estar en forma sólida o líquida.

La divulgación también contempla un método de:

- a) inhibir la asociación α 7nAChR-FLNA (formación de complejos);
- b) inhibir la señalización mediada por α 7nAChR inducida por A β de la quinasa 2 regulada por señal extracelular [ERK2; también conocida como proteína quinasa 1 activada por mitógenos (MAPK1)];
- c) inhibir la asociación inducida por A β ₄₂ de TLR4 con FLNA;
- d) inhibir el deterioro inducido por A β ₄₂ en función de α 7nAChR, por ejemplo, afluencia de calcio, después de la estimulación de α 7nAChR;
- e) restablecer el deterioro inducido por A β ₄₂ en función del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) (NMDAR), por ejemplo, la afluencia de calcio después de la estimulación de NMDAR con co-agonistas NMDA y glicina;
- f) restablecer el deterioro inducido por A β ₄₂ en función del receptor de insulina (IR) medido por una o ambas de la fosforilación de la subunidad IR β y la asociación con la molécula de señalización IRS-1;
- g) inhibir el deterioro inducido por A β ₄₂ de la afluencia de calcio celular provocada por K⁺;
- h) reducir la formación de NFT que contienen tau y también agregados de A β ₄₂ (placas neuríticas) en presencia de A β ₄₂; y

i) inhibir la producción de citoquinas inflamatorias inducida por A β ₄₂. Cada uno de esos métodos se lleva a cabo administrando a las células del sistema nervioso central, como las células cerebrales, una cantidad eficaz de un compuesto descrito anteriormente que se une al pentapéptido FLNA de la SEQ ID NO: 1. La administración se lleva a cabo en ausencia de una cantidad eficaz de unión a MOR de una molécula agonista o antagonista de MOR separada.

Un aspecto adicional más de esta divulgación contempla un método para promover la reparación del cartílago en un mamífero que tiene osteoartritis, como el inducido por collagenasa y/o cirugía u otras causas. Este método comprende los pasos de administrar a células madre mesenquimales multipotentes en un mamífero con necesidad de ello reconocida (diagnosticada) una cantidad eficaz de un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que se une a la filamina A o se une a un pentapéptido de filamina A (FLNA) de la SEQ ID NO: 1 como se describe en el Ejemplo 1, por ejemplo, inhibe por lo menos aproximadamente el 60 por ciento y más preferiblemente aproximadamente el 70 por ciento de la unión de naloxona marcada con FITC cuando está presente a una concentración de 10 μ M y se usa naloxona no marcada como inhibidor de control a la misma concentración. El compuesto es de la Serie C-2 como se describe en la presente y preferiblemente contiene por lo menos cuatro de los seis farmacóforos de las Figs. 35-40. La administración se lleva a cabo en ausencia de una cantidad eficaz de unión al receptor opioide mu (MOR) de una molécula agonista o antagonista de MOR separada.

También se contempla el uso de un único estereoisómero o mezcla de estereoisómeros, o una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto estereoisomérico contemplado. La administración contemplada puede tener lugar *in vivo* o *in vitro*, y se repite típicamente cuando se administra *in vivo*.

La presente divulgación tiene varios beneficios y ventajas.

Un beneficio es que un método contemplado inhibe la señalización de A β a través de α 7nAChR que se cree superior a dirigir el receptor en sí. Deshabilitar la señalización de α 7nAChR inducida por A β sin afectar directamente a α 7nAChRs evita alterar la sensibilidad o el nivel de la superficie celular de los receptores, un problema insidioso con el uso de agonistas o antagonistas de receptores crónicos.

Una ventaja de esta divulgación es que este enfoque parece afectar selectivamente el aumento robusto en el reclutamiento de filamina por A β a la vez que se conserva el acoplamiento basal, lo que sugiere que los compuestos usados en el método reducen la señalización patológica por A β , a la vez que retienen la señalización de α 7nAChR fisiológica.

Otro beneficio de la divulgación es que la administración de un compuesto contemplado inhibe la fosforilación *in vitro* e *in vivo* de la proteína tau.

Otra ventaja de la divulgación es que cuando un compuesto contemplado se administra *in vivo*, la administración inhibe la formación de NFT en el cerebro de un mamífero sujeto al que se administra un compuesto contemplado.

Otro beneficio más de la divulgación es que la administración de un compuesto contemplado puede proporcionar los beneficios de uno o más de los métodos enumerados anteriormente mediante la unión de ese compuesto al pentapéptido FLNA de la SEQ ID NO: 1 interrumpiendo uno o más de las recién descubiertas interacciones de FLNA.

Otra ventaja más de la divulgación es que su uso puede disminuir los efectos de la fosforilación de tau en personas u otros animales con lesiones en la cabeza y la inflamación mediada por TLR4 resultante.

Más beneficios y ventajas adicionales serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de las divulgaciones que siguen.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

En los dibujos que forman parte de esta divulgación,

La Fig. 1 muestra una asociación de α 7nAChR - FLNA elevada en la corteza frontal de ratones transgénicos con EA y pacientes con EA. Se analizaron los sinaptosomas corticales frontales de ratones transgénicos/de tipo salvaje de 6 meses de edad con EA (n=4) y 4 pares de humanos de EA/control correspondientes para sus contenidos del complejo α 7nAChR-FLNA de referencia. Los complejos α 7nAChR-FLNA en los sinaptosomas corticales frontales solubilizados se inmunoprecipitaron con anti-FLNA y los niveles de α 7nAChR en el inmunoprecipitado anti-FLNA se determinaron mediante transferencia Western con anticuerpos anti- α 7nAChR. Luego se eliminaron las transferencias y se volvieron a sondear con anti-FLNA como control de carga. Se uso escaneo densitométrico para la cuantificación.

La Fig. 2 en dos paneles como la Fig. 2A y la Fig. 2B, ilustra que compuestos de unión a FLNA de alta

afinidad reducen la asociación $\alpha 7$ nAChR-FLNA. Se trataron los sinaptosomas corticales frontales de ratas de 2 meses de edad ($n=4$) con concentraciones de 0,1 o 1 nM de compuestos [A0033, A0040, A0053, A0068, B0055, C0105M, C0114M, C0137M y C0138M] o simultáneamente (Sim) con o 10 minutos antes (10' pr) a $A\beta_{42}$ y se analizaron para determinar su contenido de complejo $\alpha 7$ nAChR-FLNA. Los complejos $\alpha 7$ nAChR-FLNA en los sinaptosomas solubilizados se inmunoprecipitaron con anti-FLNA inmovilizado y los niveles de $\alpha 7$ nAChR y FLNA en los inmunoprecipitados anti-FLNA se determinaron mediante transferencia Western (Fig. 2A) y se cuantificaron por densitometría (Fig. 2B). $n=3$. Los datos son medias \pm SEM. $**p<0,05$, $*p<0,01$ frente a $A\beta_{42}$ solo. La designación de la letra "M" que acompaña a muchos de los compuestos de la "serie C" se omite de la Fig. 2, las figuras restantes y la mayoría de las exposiciones de las figuras y compuestos posteriores para facilitar su expresión. Las fórmulas estructurales de los compuestos usados en esta y en las otras figuras se proporcionan más adelante.

La Fig. 3 en dos paneles como la Fig. 3A y la Fig. 3B, ilustra que los compuestos de unión a FLNA reducen la señalización de ERK2 mediada por $\alpha 7$ nAChR inducida por $A\beta$. En los mismos sinaptosomas tratados usados en la Fig. 2, los niveles de ERK2 fosforilados (activados) se midieron en inmunoprecipitados de ERK2. $A\beta_{42}$ activó fuertemente la quinasa 2 regulada por señales extracelular [ERK2; también conocida como proteína quinasa 1 activada por mitógenos (MAPK1)], y todos los compuestos estudiados redujeron esta activación con 10 minutos de pretratamiento. El compuesto C0105 también redujo pERK2 con administración simultánea. Los inmunoprecipitados se determinaron mediante transferencia de Western (Fig. 3A) y se cuantificaron para cuatro compuestos por densitometría (Fig. 3B). $n=3$. Los datos son medias \pm SEM. $**p<0,05$, $*p<0,01$ frente a $A\beta_{42}$ solo.

La Fig. 4 en cuatro paneles como las Figs. 4A-4D, ilustra que los compuestos de unión a FLNA reducen la fosforilación de tau en los tres sitios de fosforilación. En los mismos sinaptosomas tratados usados en las Figs. 2 y 3, los niveles de proteína tau fosforilada en S^{202} , T^{231} y T^{181} se midieron en inmunoprecipitados usando un anticuerpo anti-tau que no distingue su estado de fosforilación. Los tres fosfoepítomos de tau se detectaron en inmunoprecipitados usando anticuerpos específicos. $A\beta_{42}$ promueve fuertemente la fosforilación de tau en los tres sitios, y todos los compuestos redujeron esta fosforilación con un tratamiento previo de 10 minutos. El compuesto C0105 también redujo la fosforilación de tau con la administración simultánea. Los inmunoprecipitados se determinaron mediante transferencia Western (Figs. 4A-4C) y se cuantificaron por densitometría (Fig. 4D). Los datos son medias \pm SEM. $**p<0,05$, $*p<0,01$ frente a $A\beta_{42}$ solo.

La Fig. 5 en tres paneles ilustra que los compuestos C0105 y C0114 reducen los aumentos inducidos por $A\beta_{42}$ en asociación de FLNA con $\alpha 7$ nAChR y TLR4. Los sinaptosomas se prepararon a partir de cultivos de cortes de FCX organotípicos tratados con concentraciones de 0,1 o 1 nM de compuestos simultáneamente con $A\beta_{42}$ y se analizaron para determinar sus contenidos de complejo $\alpha 7$ nAChR-FLNA. La extensión de la asociación de FLNA con $\alpha 7$ nAChR, TLR4, IR y MOR se evaluó en los sinaptosomas solubilizados mediante inmunoprecipitación con anti-FLNA inmovilizado y detección por transferencia de Western (Fig. 5A) usando anticuerpos específicos para cada receptor. Las transferencias se analizaron por cuantificación densitométrica (Fig. 5B). Aunque $A\beta_{42}$ aumentó considerablemente la asociación de $\alpha 7$ nAChR y TLR4 con FLNA, los niveles de asociación de IR y OR con FLNA se mantuvieron sin cambios. C0105 y C0114 disminuyeron estos aumentos inducidos por $A\beta_{42}$. El porcentaje de inhibición se representa en la Fig. 5C. $n=3$. Los datos son medias \pm SEM. $**p<0,05$, $*p<0,01$ frente a $A\beta_{42}$ solo; $\#p<0,01$ frente a vehículo.

La Fig. 6 ilustra en tres paneles que el contacto de los sinaptosomas con los compuestos C0105 (0,1, 1 y 10 nM) y C0114 (1 y 10 nM) redujo la fosforilación de tau en los tres sitios de fosforilación. En los mismos sinaptosomas tratados usados en la Fig. 5, los niveles de proteína tau fosforilada en S^{202} , T^{231} y T^{181} se midieron en inmunoprecipitados usando un anticuerpo anti-tau que no distingue su estado de fosforilación. Los tres fosfoepítomos de tau se detectaron en inmunoprecipitados usando anticuerpos específicos. $A\beta_{42}$ promueve fuertemente la fosforilación de tau en los tres sitios, y ambos compuestos redujeron significativamente esta fosforilación. Se analizaron transferencias Western (Fig. 6A) por cuantificación densitométrica (Fig. 6B). El porcentaje de inhibición se representa en la Fig. 6C. $n=3$. Los datos son medias \pm SEM. $**p<0,05$, $*p<0,01$ frente a $A\beta_{42}$ solo; $\#p<0,001$, $###p<0,007$, $####p<0,003$ frente al grupo de vehículo libre de $A\beta_{42}$.

La Fig. 7 ilustra que cada uno de los Compuestos C0105 y C0114 restaura el deterioro inducido por $A\beta_{42}$ en la función de $\alpha 7$ nAChR. En los mismos sinaptosomas de los cultivos de FCX tratados, $A\beta_{42}$ deteriora significativamente la afluencia de calcio después de la estimulación con PNU282987, un agonista completo de $\alpha 7$ nAChR, y los Compuestos C0105 y C0114 previenen cada uno este deterioro. $n=3$. Los datos son medias \pm SEM. $*p<0,01$ frente a vehículo; $\#p<0,01$ frente a $A\beta_{42}$ solo.

La Fig. 8 ilustra que cada uno de los Compuestos C0105 y C0114 restaura el deterioro inducido por $A\beta_{42}$ en la función de NMDAR. $A\beta_{42}$ deteriora significativamente la afluencia de calcio después de la estimulación con NMDA y glicina, los agonistas de NMDAR, y los Compuestos C0105 y C0114 previenen este deterioro. $n=3$. Los datos son medias \pm SEM. $*p<0,01$ frente a vehículo; $###p<0,05$, $\#p<0,01$ frente a $A\beta_{42}$ solo.

La Fig. 9 ilustra en dos paneles que cada uno de los compuestos C0105 y C0114 restaura los niveles de las moléculas de señalización asociadas a NMDAR. La función de señalización de NMDAR también se evaluó midiendo los niveles de seis moléculas de señalización diferentes co-inmunoprecipitantes con NR-1, la subunidad obligatoria de NMDAR, después de la co-estimulación con glicina y NMDA (Fig. 9A). $A\beta_{42}$ suprimió los niveles de asociación de los seis componentes de señalización con NR-1 confirmando la disfunción de NMDAR ilustrada en la Fig. 8 (Fig. 9B). $n=3$. Los datos son medias \pm SEM. $**p<0,05$, $*p<0,01$ frente a $A\beta_{42}$

solo; **#p**<0.01 frente a vehículo.

La Fig. 10 en dos paneles C0105 y C0114 ilustra que cada uno de los Compuestos C0105 y C0114 restaura el deterioro en la función de IR inducida por A β ₄₂. A β ₄₂ deterioró la señalización de IR medida por la fosforilación de IR β y su asociación con la molécula de señalización IRS-1 como se muestra por transferencias Western (Fig. 10A) y mediciones densitométricas (Fig. 10B). *p<0,01 frente a A β ₄₂ solo; **#p**<0,01 frente a vehículo.

La Fig. 11 ilustra que cada uno de los compuestos C0105 y C0114 puede reducir la muerte celular como se indica por la afluencia de calcio provocada por K⁺ reducida. A β ₄₂ redujo la afluencia de Ca⁺² provocada por K⁺ indicando células moribundas o no funcionales. Poner en contacto las células con cualquiera de los compuestos C0105 y C0114 previene el deterioro inducido por A β ₄₂. n=3. Los datos son medias \pm SEM. **p<0,05, *p<0,01 contra vehículo; **#p**<0,01 frente a A β ₄₂ solo.

La Fig. 12 en dos conjuntos de tres paneles ilustra que la administración del compuesto C0105 a cultivos de cortes de cerebro frontocorticales previene los NFT inducidos por A β ₄₂. La incubación con A β ₄₂ produjo NFT como se visualizó mediante inmunoreactividad de tau fosforilada (pTau) (Fig. 12A). La incubación conjunta de A β ₄₂ con el compuesto C0105 previno esta neuropatología (Fig. 12B). Los cortes tratados con vehículo se representan en la Fig. 12C. Los paneles inferiores son de mayor aumento.

La Fig. 13 en dos conjuntos de tres paneles ilustra que la administración del compuesto C0105 a cultivos de cortes cerebrales frontocorticales reduce drásticamente la inmunotinción de agregados de A β ₄₂. La incubación con A β ₄₂ produjo depósitos amiloides como se visualizó mediante inmunoreactividad de A β ₄₂ (Fig. 13A), y la incubación conjunta con A β ₄₂ y el Compuesto C0105 previno esta neuropatología (Fig. 13B). Los cortes tratados con vehículo se representan en la Fig. 13C. Los paneles inferiores son de mayor aumento.

La Fig. 14 ilustra en tres partes que la administración sistémica del Compuesto C0105 a ratones disminuyó la asociación de FLNA inducida por A β ₄₂ tanto con α 7nAChR como con el receptor 4 tipo toll (TLR4). Por tanto, se analizaron las sinaptosomas preparadas a partir de la corteza prefrontal y el hipocampo de ratones que recibieron infusión intracerebroventricular (ICV) continua de A β ₄₂ o vehículo e inyecciones dos veces al día del Compuesto C0105 o vehículo para sus interacciones FLNA - α 7nAChR/TLR4. La extensión de la asociación de FLNA con α 7nAChR o TLR4 se evaluó en los sinaptosomas solubilizados mediante inmunoprecipitación con anti-FLNA inmovilizado y detección de transferencia Western (Fig. 14A) usando anticuerpos específicos para cada receptor. Los números fuera y a la izquierda de las transferencias son posiciones de pesos moleculares dentro de las transferencias. Las transferencias se analizaron por cuantificación densitométrica (Fig. 14B). A β ₄₂ aumentó considerablemente la asociación de α 7nAChR y TLR4 con FLNA, y el Compuesto C0105 disminuyó estos aumentos inducidos por A β ₄₂. El porcentaje de inhibición se representa en la Fig. 14C. n=3. Los datos son medias \pm SEM. *p<0,01 frente a simulación, vehículo; **#p**<0,01 frente a A β ₄₂, vehículo.

La Fig. 15 ilustra en tres partes que la administración del Compuesto C0105 a ratones reduce la fosforilación de tau en los tres sitios de fosforilación. En los mismos sinaptosomas tratados usados en la Fig. 14, los niveles de proteína tau fosforilada en S²⁰², T²³¹ y T¹⁸¹ se midieron en inmunoprecipitados usando un anticuerpo anti-tau que no distingue su estado de fosforilación. Los tres fosfoepítomos de tau se detectaron en inmunoprecipitados usando anticuerpos específicos. A β ₄₂ promueve fuertemente la fosforilación de tau en los tres sitios, y ambos compuestos reducen significativamente esta fosforilación. Se analizaron transferencias Western (Fig. 15A) mediante cuantificación densitométrica (Fig. 15B). Los números fuera y a la izquierda de las transferencias de la Fig. 15A son las posiciones de peso molecular dentro de las transferencias. El porcentaje de inhibición se representa en la Fig. 15C. Los datos son medias \pm SEM. *p<0,01 frente a simulación, vehículo; **#p**<0,01 frente a A β ₄₂, vehículo.

La Fig. 16 ilustra en tres partes que la administración del Compuesto C0105 a ratones reduce los complejos A β ₄₂- α 7nAChR. El tratamiento dos veces al día de ratones con el Compuesto C0105 redujo en gran medida el nivel de complejos A β ₄₂- α 7nAChR tanto en la corteza prefrontal como en el hipocampo, n=7 o n=8. Se analizaron transferencias Western (Fig. 16A) mediante cuantificación densitométrica (Fig. 16B). Los números fuera y a la izquierda de las transferencias de la Fig. 16A son las posiciones de peso molecular dentro de las transferencias. El porcentaje de inhibición se representa en la Fig. 16C. Los datos son medias \pm SEM. *p<0,01 frente a simulación, vehículo; **#p**<0,01 frente a A β ₄₂, vehículo.

La Fig. 17 ilustra que el tratamiento con el Compuesto C0105 reduce la disfunción de α 7nAChR inducida por A β ₄₂. El tratamiento dos veces al día de ratones con el Compuesto C0105 normalizó el deterioro inducido por A β ₄₂ en la afluencia de calcio tras la estimulación con el agonista de α 7nAChR completo PNU282987. n=7 o n=8. Los datos son medias \pm SEM. *p<0,01 frente a simulación, vehículo; **#p**<0,01 frente a A β ₄₂, vehículo; +p<0,01 frente a grupos simulados tratados con vehículo y compuesto C0105.

La Fig. 18 ilustra que el tratamiento con el compuesto C0105 de ratones reduce la disfunción de NMDAR inducida por A β ₄₂. A β ₄₂ altera significativamente la afluencia de calcio después de la estimulación con NMDA y glicina, los co-agonistas de NMDAR y el Compuesto C0105 previenen este deterioro. n=7 o n=8. Los datos son medias \pm SEM. *p<0,01 frente a simulación, vehículo; **#p**<0,01 frente a A β ₄₂, vehículo; +p<0,01 frente a los grupos simulados tratados con vehículo y compuesto C0105.

La Fig. 19 ilustra que el tratamiento con el Compuesto C0105 de ratones reduce la muerte celular como se mide por la afluencia de Ca⁺² provocada por K⁺. A β ₄₂ redujo la afluencia de Ca⁺² provocada por K⁺, indicando células moribundas o no funcionales. El Compuesto C0105 reduce este deterioro inducido por A β ₄₂. n=7 o n=8. Los datos son medias \pm SEM. *p<0,01 frente a simulación, vehículo; **#p**<0,01 frente a A β ₄₂, vehículo;

++p<0,05 frente a grupos simulados tratados con vehículo y compuesto C0105.

La Fig. 20 ilustra en dos paneles que el tratamiento con el Compuesto C0105 de ratones normaliza los deterioros de la señalización de NMDAR inducidos por $A\beta_{42}$. La función de señalización de NMDAR también se evaluó midiendo los niveles de seis moléculas de señalización diferentes (PLCy, nNOS, pY⁴⁰²PyK2, PSD-95, PKCy, pY⁴¹⁶Src y NR1) co-inmunoprecipitando con NR-1, la subunidad obligatoria de NMDAR, después de la co-estimulación con glicina y NMDA (Fig. 20A). Los números fuera y a la izquierda de las transferencias son como se ha tratado anteriormente. $A\beta_{42}$ suprimió los niveles de asociación de los seis componentes de señalización con NR-1 confirmando la disfunción de NMDAR ilustrada en la Fig. 18 (Fig. 20B). n=7 o n=8. Los datos son medias \pm SEM. *p<0,01 frente al nivel basal en el grupo de vehículo de control; *p<0,01 frente a nivel estimulado con NMDA/glicina en el grupo de vehículo simulado; #p<0,01 frente a nivel estimulado con NMDA/glicina en ICV $A\beta_{42}$, vehículo.

La Fig. 21 ilustra en dos paneles que el tratamiento con el Compuesto C0105 de ratones normaliza los deterioros de señalización del receptor de insulina inducidos por $A\beta_{42}$. $A\beta_{42}$ deterioró la señalización de IR como se mide por la fosforilación de IR β y su asociación con la molécula de señalización IRS-1. Los inmunoprecipitados preparados usando anti-IRP inmovilizado se muestran en la Fig. 21A, en donde los números fuera y a la izquierda de las transferencias son como se ha tratado antes. La Fig. 21B muestra los resultados obtenidos después de la eliminación de los anticuerpos, la transferencia a las membranas de nitrocelulosa y la transferencia Western con anticuerpos a las especies anotadas en las ordenadas, seguido de la cuantificación usando densitometría. El compuesto C0105 normalizó estos deterioros. n=7 o n=8. Los datos son medias \pm SEM. *p<0,01 frente al nivel de insulina estimulada en grupo simulado, vehículo; #p<0,01 frente a nivel estimulado por insulina en ICV $A\beta_{42}$, grupo de vehículo.

La Fig. 22 ilustra que el tratamiento con el Compuesto C0105 de ratones casi elimina la producción de citoquinas inducida por $A\beta_{42}$. $A\beta_{42}$ aumentó los niveles de citoquinas IL-6, TNF α e IL-1 β medidas por un ensayo ELISA de fluorescencia usando FITC. El compuesto C0105 casi eliminó la producción de estas 3 citocinas. n=7 o n=8. Los datos son medias \pm SEM. *p<0,01 frente al nivel de citoquinas respectivo en grupo de vehículo simulado; #p<0,01 frente al nivel de citoquinas respectivo en ICV $A\beta_{42}$, grupo de vehículo.

La Fig. 23 contiene en dos paneles fotomicrografías que ilustran que el tratamiento con el Compuesto C0105 de ratones reduce drásticamente la inmunotinción de NFT. Secciones representativas inmunoteñidas con un anticuerpo anti-fosfo-tau (Fig. 23A) muestran claramente que el tratamiento con el Compuesto C0105 redujo en gran medida la inmunorreactividad de NFT en tanto la corteza prefrontal (FCX) como en el hipocampo (HP) de ratones que recibieron infusiones de ICV $A\beta_{42}$. La cuantificación de la densidad óptica en todos los animales (Fig. 23B) muestra que el Compuesto C0105 redujo significativamente la inmunorreactividad de NFT inducida por $A\beta_{42}$ en ambas regiones. #p<0,01 $A\beta_{42}$ frente a $A\beta_{42}$ +C0105, *p<0,01 frente a simulado.

La Fig. 24 contiene en dos paneles fotomicrografías que ilustran que el tratamiento con Compuesto C0105 de ratones reduce drásticamente la inmunotinción de agregados de $A\beta_{42}$. Las secciones representativas inmunoteñidas para agregados de $A\beta_{42}$ (Fig. 24A) muestran claramente que el tratamiento con el Compuesto C0105 redujo en gran medida la inmunotinción de agregados de $A\beta_{42}$ tanto en la corteza prefrontal (FCX) como en el hipocampo (HP) de ratones que recibieron infusiones de ICV $A\beta_{42}$. La cuantificación de la densidad óptica en todos los animales (Fig. 24B) muestra que el Compuesto C0105 redujo significativamente la inmunorreactividad de NFT inducida por $A\beta_{42}$ en ambas regiones. #p<0,01 $A\beta_{42}$ frente a $A\beta_{42}$ +C0105, *p<0,01 frente a simulado.

La Fig. 25 ilustra en cinco paneles que el Compuesto C0105 disminuyó la asociación de FLNA inducida por $A\beta_{42}$ tanto con $\alpha 7$ nAChR como con TLR4 en EA postmortem humana y el tejido cerebral de control. Los cortes de cerebro de EA y de control de la misma edad se trataron con concentraciones de 0,1 o 1 nM del Compuesto C0105, y los cortes de cerebro de control se trataron simultáneamente con $A\beta_{42}$. La extensión de la asociación de FLNA con $\alpha 7$ nAChR o TLR4 se evaluó en los sinaptosomas solubilizados mediante inmunoprecipitación con anti-FLNA inmovilizado y detección de transferencia Western (Fig. 25A) usando anticuerpos específicos para cada receptor, y en donde los números fuera y a la izquierda de las transferencias son como se ha tratado anteriormente. Las transferencias se analizaron mediante cuantificación densitométrica (Figs 25B y Fig. 25D). El tejido de control tratado con $A\beta_{42}$ mostraron una asociación marcadamente aumentada de $\alpha 7$ nAChR y TLR4 con FLNA, y el Compuesto C0105 redujo estas asociaciones. El porcentaje de inhibición se representa en la Fig 25C y la Fig. 25E. n=11. Los datos son medias \pm SEM. *p<0,01 frente al control tratado con vehículo, #p<0,01 frente al control tratado con $A\beta_{42}$ o EA tratado con vehículo.

La Fig. 26 ilustra en dos paneles que el Compuesto C0105 reduce los complejos $A\beta_{42}$ - $\alpha 7$ nAChR en EA y control tratado con $A\beta_{42}$. Los sinaptosomas solubilizados de la misma EA tratada y los cortes de cerebro de control usados en la Fig. 25 se inmunoprecipitaron con anti- $A\beta_{42}$ y se sondaron transferencias Western (Fig. 26A) de inmunoprecipitados con anti- $\alpha 7$ nAChR y se analizaron mediante cuantificación densitométrica (Fig. 26B). Los complejos $A\beta_{42}$ - $\alpha 7$ nAChR se elevaron tanto en el tejido de control tratado con $A\beta_{42}$ como en tejido de EA, y el Compuesto C0105 (0,1 y 1 nM) redujo esta interacción. n=11. Los datos son medias \pm SEM. *p<0,01 frente al control tratado con vehículo, #p<0,01 frente al control tratado con $A\beta_{42}$ o EA tratado con vehículo.

La Fig. 27 ilustra en dos paneles que el Compuesto C0105 reduce la afinidad de la interacción $A\beta_{42}$ - $\alpha 7$ nAChR. En el tejido de control postmortem, la incubación del Compuesto C0105 reduce la afinidad de unión de $A\beta_{42}$ para $\alpha 7$ nAChR 1000 veces desde 100 femtomolar a 16 nanomolar en membranas sinápticas

biotiniladas de cortes frontales postmortem de controles sin demencia (Fig. 27A). En células SK-N-MC nuevas, el Compuesto C0105 reduce esta afinidad de unión 10.000 veces, de 770 femtomolar a 1 nanomolar (Fig. 27B). Los datos son medias \pm SEM. $n=11$ para el tejido de control postmortem; $n=6$ para células SK-N-MC.

La Fig. 28 es un gráfico de barras que ilustra que el Compuesto C0105 reduce la disfunción de $\alpha 7$ nAChR. Los cortes de cerebro con EA y los cortes de cerebro de control tratados con $A\beta_{42}$ tuvieron una afluencia de calcio significativamente deteriorada después de la estimulación con el agonista completo de $\alpha 7$ nAChR PNU282987. El tratamiento con compuesto C0105 normalizó este deterioro. Los datos son medias \pm SEM. $n=11$. * $p<0,01$ frente a control tratado con vehículo, # $p<0,01$ frente a grupo de EA tratado con vehículo, + $p<0,01$ frente a los grupos de control tratados con vehículo y compuesto C0105.

La Fig. 29 es un gráfico de barras que ilustra que el Compuesto C0105 reduce la disfunción de NMDAR. Los cortes de cerebro de EA y los cortes de cerebro de control tratados con $A\beta_{42}$ tenían una afluencia de Ca^{+2} significativamente deteriorada después de la estimulación con NMDA y glicina, co-agonistas de NMDAR. El tratamiento con compuesto C0105 normalizó este deterioro. Los datos son medias \pm SEM. $n=11$. * $p<0,01$ frente al nivel basal en el control, # $p<0,01$ frente al grupo de EA tratado con vehículo, + $p<0,01$ en comparación con los grupos de control tratados con vehículo y compuesto C0105.

La Fig. 30 es un gráfico de barras que ilustra que el Compuesto C0105 1 nM normaliza parcialmente la afluencia de Ca^{+2} provocada por K^{+} . La afluencia de Ca^{+2} provocada por K^{+} disminuye drásticamente en los cortes de cerebro con EA y en los cortes de cerebro de control tratados con $A\beta_{42}$, indicando células no funcionales o muerte celular. La incubación del compuesto C0105 eleva significativamente esta afluencia de Ca^{+2} inducida por despolarización, rescatando algunas de las células no funcionales. Los datos son medias \pm SEM. $n=11$. * $p<0,01$ frente al grupo de control tratado con vehículo; # $p<0,01$ frente a grupo de EA tratado con vehículo; + $p<0,01$ frente a los grupos de control tratados con vehículo y compuesto C0105.

La Fig. 31 ilustra en dos paneles que el Compuesto C0105 normaliza los deterioros de señalización de NMDAR. La disfunción de NMDAR en los cortes cerebrales de EA y de control tratados con $A\beta_{42}$ también se evidencia por las reducciones en los ligamientos de varias moléculas de señalización con NR-1, la subunidad de NMDAR obligatoria. El compuesto C0105 (1 nM) mitiga estas reducciones. Las transferencias Western (Fig. 31A), en las que los números fuera y a la izquierda de las transferencias son como se ha tratado anteriormente, se analizaron mediante cuantificación densitométrica (Fig. 31B). Los datos son medias \pm SEM. $n=11$. * $p<0,01$ frente a nivel estimulado con NMDA/glicina en el grupo de control tratado con vehículo; # $p<0,01$ frente a nivel estimulado con NMDA/glicina en el grupo con EA tratado con vehículo.

La Fig. 32 ilustra en dos paneles que el Compuesto C0105 normaliza los deterioros de la señalización IR. La señalización de IR está deteriorada en los cortes cerebrales de control con EA y tratados con $A\beta_{42}$, como se mide por la fosforilación de $IP\beta$ y su asociación con la molécula de señalización IRS-1. La incubación con el Compuesto C0105 (1 nM) normaliza estos deterioros. Las transferencias Western (Fig. 32A), en las que los números fuera y a la izquierda de las transferencias son como se ha tratado anteriormente, se analizaron mediante cuantificación densitométrica (Fig. 32B). Los datos son medias \pm SEM. $n=11$. * $p<0,01$ en comparación con el nivel estimulado con insulina en el grupo de vehículo de control; # $p<0,01$ frente a nivel estimulado por insulina en el grupo de vehículo con EA.

La Fig. 33 ilustra en dos paneles que el pentapéptido VAKGL (SEQ ID NO: 1) (10 μ M) bloquea la prevención de la asociación FLNA- $\alpha 7$ nAChR o TLR4 por C0105. Actuando como un señuelo para la proteína FLNA, el sitio de unión al pentapéptido del Compuesto C0105 en FLNA bloquea la reducción del Compuesto C0105 en la asociación de FLNA - $\alpha 7$ nAChR/TLR4 inducida por $A\beta_{42}$ en sinaptosomas corticales frontales postmortem. Las transferencias Western (Fig. 33A), en las que los números fuera y a la izquierda de las transferencias son como se ha tratado anteriormente, se analizaron mediante cuantificación densitométrica (Fig. 33B). Los datos son medias \pm SEM. $n=3$. * $p<0,01$ frente a el nivel basal respectivo; # $p<0,01$ frente a los tejidos expuestos a $A\beta_{42}$.

Fig. 34 el pentapéptido VAKGL (SEQ ID NO: 1) (10 μ M) bloquea la prevención de la fosforilación de Tau por el Compuesto C0105. De nuevo, usando sinaptosomas corticales frontales postmortem, el pentapéptido VAKGL bloquea la reducción por C0105 en la fosforilación de tau en los tres sitios de fosforilación que se encuentran en los ovillos neurofibrilares. Las transferencias Western (Fig. 34A), en las que los números fuera y a la izquierda de las transferencias son como se ha tratado anteriormente, se analizaron mediante cuantificación densitométrica (Fig. 34B). Los datos son medias \pm SEM. $n=3$. * $p<0,01$ frente a el nivel basal respectivo; # $p<0,01$ frente a los tejidos expuestos a $A\beta_{42}$.

De la Fig. 35 a la Fig. 40 representan farmacóforos esquemáticos (Farmacóforos 1-6, respectivamente) que muestran localizaciones relativas de características químicas como un aceptor de enlaces de hidrógeno (HBA), un centro aromático/hidrófobo (ARO/HYD) y las distancias intramoleculares entre ellos en Angstroms para un compuesto que se une al péptido pentamérico de FLNA de la SEQ ID NO: 1.

La Fig. 41, ilustra en dos paneles, las Figs. 41 y 41B, compuestos adicionales de unión a FLNA de alta afinidad que reducen la asociación $\alpha 7$ nAChR-FLNA ensayada como en la Fig. 2. Se trataron sinaptosomas corticales frontales de ratas de 2 meses de edad con concentraciones de 1 o 10 nM de los Compuestos A, B o C, usando los Compuestos C0134 y C0105 como controles, ya sea simultáneamente (Sim) con o 10 minutos antes (10' pr) a $A\beta_{42}$ (0,1 μ M) y se inmunoprecipitaron con anti-FLNA inmovilizado. Los complejos en los sinaptosomas solubilizados, y los niveles de $\alpha 7$ nAChR, TLR4 y FLNA en los inmunoprecipitados anti-FLNA se determinaron mediante transferencia Western (Fig. 41A) en la que los números fuera y a la

izquierda de las transferencias son como se ha tratado anteriormente. Las cantidades presentes en las transferencias se cuantificaron por densitometría (Fig. 41B). Las proporciones de $\alpha 7nAChR/FLNA$ fueron estadísticamente diferentes de $A\beta_{42}$ solo con $p < 0,01$ para todos los compuestos examinados en la prueba de Dunnett. Las proporciones de $TLR4/FLNA$ fueron estadísticamente diferentes de $A\beta_{42}$ solo para la mayoría de los compuestos y condiciones a $*p < 0,01$ o $**p < 0,05$. Las fórmulas estructurales de los compuestos usados en esta y en las otras figuras se proporcionan a continuación en la presente.

La Fig. 42, ilustra también en dos paneles, las Figs. 42A y 42B, que los compuestos de unión a FLNA reducen la fosforilación de tau en los tres sitios de fosforilación usando los compuestos y concentraciones de la Fig. 41 usando inmunoprecipitación y transferencia Western. Por tanto, en los mismos sinaptosomas tratados usados en la Fig. 41, los niveles de proteína tau fosforilada en S^{202} , T^{231} y T^{181} se midieron en inmunoprecipitados usando un anticuerpo anti-tau que no distingue su estado de fosforilación (Tau). Los tres fosfoepítomos de tau se detectaron en inmunoprecipitados usando anticuerpos específicos. $A\beta_{42}$ promueve fuertemente la fosforilación de tau en los tres sitios (Fig. 42A). El análisis densitométrico de las transferencias (Fig. 42B) mostró que los cinco compuestos reducen esta fosforilación a una concentración de 10 nM cuando se administraban o simultáneamente o con un pretratamiento de 10 minutos a ambas concentraciones en comparación con $A\beta_{42}$ solo usando la prueba de Dunnett a $*p < 0,01$. El Compuesto A también redujo la fosforilación de tau con la administración simultánea a 1 nM con $**p < 0,05$ o $*p < 0,01$, mientras que el Compuesto C no proporcionó un resultado estadísticamente significativo en dos posiciones de fosforilación cuando se administró simultáneamente.

La Fig. 43, en dos paneles, Fig. 43A y Fig. 43B, ilustra otros compuestos de unión a FLNA de alta afinidad que reducen la asociación $\alpha 7nAChR-FLNA$ ensayada como en la Fig. 2. Se trataron sinaptosomas corticales frontales de ratas de 2 meses de edad con concentraciones de 1 o 10 nM de Compuesto C0087 y Compuesto C0108, usando el Compuesto C0105 como control, ya sea simultáneamente (Sim) o 10 minutos antes (10' pr) a $A\beta_{42}$ (0,1 μM) y se inmunoprecipitaron con anti-FLNA inmovilizado. Los complejos en los sinaptosomas solubilizados, y los niveles de $\alpha 7nAChR$, $TLR4$ y $FLNA$ en los inmunoprecipitados anti-FLNA se determinaron mediante transferencia Western (Fig. 43A) en la que los números fuera y a la izquierda de las transferencias son como se ha tratado anteriormente. Las cantidades presentes en las transferencias se cuantificaron por densitometría (Fig. 43B). Las proporciones de $\alpha 7nAChR/FLNA$ y $TLR4/FLNA$ fueron estadísticamente diferentes de $A\beta_{42}$ solo con $**p < 0,05$, $*p < 0,01$ para los compuestos como se muestra usando la prueba de Dunnett. Las fórmulas estructurales de los compuestos usados en esta y en las otras figuras se proporcionan en la presente a continuación.

La Fig. 44, ilustra también en dos paneles, Fig. 44A y Fig. 44B, que los compuestos de unión a FLNA reducen la fosforilación de tau en los tres sitios de fosforilación usando los compuestos y concentraciones de la Fig. 43 usando inmunoprecipitación y transferencia Western. Por tanto, en los mismos sinaptosomas tratados usados en la Fig. 43, se midieron los niveles de proteína tau fosforilada en S^{202} , T^{231} y T^{181} en inmunoprecipitados usando un anticuerpo anti-tau que no distingue su estado de fosforilación (Tau). Los tres fosfoepítomos de tau se detectaron en inmunoprecipitados usando anticuerpos específicos. $A\beta_{42}$ promueve fuertemente la fosforilación de tau en los tres sitios. El análisis densitométrico de las transferencias (Fig. 44B) mostró que ambos compuestos redujeron esta fosforilación a ambas concentraciones, ya sea administrados simultáneamente o con un pretratamiento de 10 minutos en comparación con $A\beta_{42}$ solo usando la prueba de Dunnett a $**p < 0,05$, $*p < 0,01$.

La Fig. 45, ilustra en dos paneles, Fig. 45A y Fig. 45B, compuestos de unión a FLNA de alta afinidad adicionales que reducen la asociación $\alpha 7nAChR-FLNA$ ensayada como en Fig. 2. Se trataron sinaptosomas corticales frontales de ratas de 2 meses de edad con concentraciones de 1 o 10 nM de Compuesto C0124, usando el Compuesto C0105 como control, ya sea simultáneamente (Sim) o 10 minutos antes (10' pr) a $A\beta_{42}$ (0,1 μM) y se inmunoprecipitaron con anti-FLNA inmovilizado. Los complejos en los sinaptosomas solubilizados, y los niveles de $\alpha 7nAChR$, $TLR4$ y $FLNA$ en los inmunoprecipitados anti-FLNA se determinaron mediante transferencia Western (Fig. 45A) en la que los números fuera y a la izquierda de las transferencias son como se ha tratado anteriormente. Las cantidades presentes en las transferencias se cuantificaron por densitometría (Fig. 45B). Las proporciones de $\alpha 7nAChR/FLNA$ y $TLR4/FLNA$ fueron estadísticamente diferentes de $A\beta_{42}$ solo con $**p < 0,05$, $*p < 0,01$ para los compuestos como se muestra usando la prueba de Dunnett. Las fórmulas estructurales de los compuestos usados en esta y en las otras Figuras se proporcionan en la presente a continuación.

La Fig. 46, también ilustra en dos paneles, Fig. 46A y Fig. 46B, que los compuestos de unión a FLNA reducen la fosforilación de tau en los tres sitios de fosforilación usando los compuestos y concentraciones de la Fig. 45 usando inmunoprecipitación y transferencia Western. Así, en los mismos sinaptosomas tratados usados en la Fig. 45, se midieron los niveles de proteína tau fosforilada en S^{202} , T^{231} y T^{181} en inmunoprecipitados usando un anticuerpo anti-tau que no distingue su estado de fosforilación (Tau). Los tres fosfoepítomos de tau se detectaron en inmunoprecipitados usando anticuerpos específicos. $A\beta_{42}$ promueve fuertemente la fosforilación de tau en los tres sitios. El análisis densitométrico de las transferencias (Fig. 46B) mostró que ambos Compuestos C0105 y C0124 redujeron esta fosforilación a ambas concentraciones administradas o simultáneamente o con un pretratamiento de 10 minutos en comparación con $A\beta_{42}$ solo usando la prueba de Dunnett en $*p < 0,01$.

La Fig. 47, ilustra en tres paneles como las Figs. 47A-47C, que el LPS en cada una de las dos concentraciones (10 $\mu g/ml$ y 10 $\mu g/ml$) induce la fosforilación de tau en los tres sitios de fosforilación en cortes

de células del hipocampo postmortem humanas, y que esa fosforilación es inhibida por el compuesto C0105 a una concentración de 1 nM usando inmunoprecipitación y transferencia Western. Los niveles de proteína tau fosforilada en S²⁰², T²³¹ y T¹⁸¹ se midieron en inmunoprecipitados usando un anticuerpo anti-tau que no distingue su estado de fosforilación (Tau). Los tres fosfoepítomos de tau se detectaron en inmunoprecipitados usando anticuerpos específicos usando transferencias Western (WB). A β ₄₂ se usó como un control que también promueve la fosforilación de tau en los tres sitios. El análisis densitométrico de las transferencias (Figs. 47B y 47C) proporciona una ilustración cuantitativa de que el Compuesto C0105 redujo esta fosforilación usando comparaciones múltiples de Newman-Keuls: *p<0,01, **p<0,05 en comparación con el grupo incubado con vehículo, y #p<0,01 en comparación con el grupo tratado con LPS o Ab₄₂ respectivo. Los gráficos en la Fig. 47C están en el mismo orden que los mostrados en la Fig. 47B.

La Fig. 48, en cuatro partes como la Fig. 48A, 48B, 48C y 48D, son gráficos que muestran curvas de competencia que ilustran la unión de naloxona [³H] LX radiomarcada en presencia de naltrexona (NTX) o Compuesto ilustrativo C0105 a la filamina A (FLNA) o al pentámero de filamina A (FLNA) de la SEQ ID NO. 1 como se informa en Wang et al., PLoS One. 3(2):e1554 (2008). La Fig. 48A ilustra la unión de [³H] NLX a FLNA en las membranas de células A7 en presencia de las cantidades indicadas de naltrexona (NTX) y se toma de Wang et al., PLoS One. 3(2):e1554 (2008), Fig. 3; la Fig. 48B ilustra la unión de [³H]NLX a FLNA en membranas de células A7 en presencia de las cantidades indicadas del Compuesto C0105; la Fig. 48C ilustra la unión de [³H]NLX en presencia de las cantidades indicadas de Compuesto C0105 a FLNA en membranas de células SK-N-MC; y la Fig. 48D ilustra la unión de [³H]NLX al pentámero FLNA de la SEQ ID NO. 1 en presencia de las cantidades indicadas de Compuesto C0105.

ABREVIATURAS Y FORMAS CORTAS

En la presente especificación se usan las siguientes abreviaturas y formas cortas.

"A β " significa beta-amiloide
 "A β ₄₂" significa un producto de proteólisis de 42 residuos de la proteína precursora amiloide (APP)
 "α7nAChR" significa receptor de acetilcolina alfa-7 nicotínico
 "DAMGO" significa [D-Ala2, N-MePhe4, Gly-ol] -encefalina
 "ERK2" significa quinasa 2 regulada por señal extracelular
 "FCX" significa corteza frontal o corteza prefrontal
 "FLNA" significa filamina A
 "FITC" significa isotiocianato de fluoresceína
 "Gs" significa subtipo estimulante de la proteína G, estimula la adenilil ciclasa
 "HP" significa hipocampo
 "IHC" significa inmunohistoquímica
 "IR" significa receptor de insulina
 "MOR" significa receptor opioide μ
 "NLX" significa naloxona
 "NTX" significa naltrexona
 "NFTs" significa ovillos neurofibrilares
 "NMDA" significa N-metil-D-aspartato
 "NMDAR" significa receptor de NMDA
 "pERK2" significa ERK2 fosforilado
 "pTau" significa proteína tau hiperfosforilada
 "TLR4" significa receptor tipo toll 4

DEFINICIONES

En el contexto de la presente invención y las reivindicaciones asociadas, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

Los artículos "un" y "unan" se usan en la presente para referirse a uno o a más de uno (es decir, a por lo menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

Como se usa en la presente, el término "hidrocarbilo" es un término corto para un grupo no aromático que incluye grupos alifáticos de cadena lineal y ramificada, así como grupos alicíclicos o radicales que contienen solo carbono e hidrógeno. En la medida en que los grupos alicíclicos son grupos alifáticos cíclicos, tales sustituyentes se consideran en lo sucesivo como subsumidos dentro de los grupos alifáticos. Por tanto, se contemplan grupos alquilo, alquenilo y alquinilo, mientras que los hidrocarburos aromáticos como los grupos fenilo y naftilo, que hablando estrictamente también son grupos hidrocarbilo, son referidos en la presente como grupos, sustituyentes, fracciones o radicales arilo, como se describe más adelante en la presente. Un grupo sustituyente aralquilo como bencilo se considera un grupo aromático debido a que tiene un anillo aromático unido a un grupo X, donde X es CH₂. Un grupo sustituyente que contiene tanto un anillo alifático como una porción de anillo aromático como tetralina (tetrahidronaftaleno) que está enlazado directamente a través de la porción alifática al anillo representado que contiene el grupo W se considera un grupo hidrocarbilo no aromático. Por otro lado, un grupo similar unido

directamente a través de la porción aromática, se considera un grupo aromático sustituido. Cuando se pretende un grupo sustituyente de hidrocarbilo alifático específico, se recita ese grupo; es decir, alquilo C₁-C₄, metilo o dodecenilo. Los grupos hidrocarbilo ejemplares contienen una cadena de 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono, y preferiblemente de 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono, y más preferiblemente de 1 a 6 átomos de carbono.

Un grupo hidrocarbilo particularmente preferido es un grupo alquilo. Como consecuencia, puede enumerarse un sustituyente generalizado, pero más preferido, reemplazando el descriptor "hidrocarbilo" por "alquilo" en cualquiera de los grupos sustituyentes enumerados en la presente.

Los ejemplos de radicales alquilo incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, iso-amilo, hexilo, octilo, decilo, dodecilo y similares. También se contemplan radicales alquilo cíclicos como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo, al igual que sus radicales alqueno y alquino correspondientes. Los ejemplos de radicales alqueno de cadena lineal y ramificada adecuados incluyen etenil(vinilo), 2-propenilo, 3-propenilo, 1,4-pentadienilo, 1,4-butenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, decenilo y similares. Los ejemplos de radicales alquino de cadena lineal y ramificada incluyen etinilo, 2-propinilo, 3-propinilo, decinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 3-butinilo y similares.

Se sigue la nomenclatura de los sufijos químicos habitual cuando se usa la palabra "hidrocarbilo", excepto que no siempre se sigue la práctica habitual de eliminar el terminal "il" y añadir un sufijo apropiado debido a la posible similitud de un nombre resultante con uno o más sustituyentes. Por lo tanto, un hidrocarbilo éter es referido como un grupo "hidrocarbilo" en lugar de un grupo "hidrocarbilo", ya que posiblemente sea más apropiado cuando se siguen las reglas habituales de la nomenclatura química. Los grupos hidrocarbilo ilustrativos incluyen grupos metoxi, etoxi y ciclohexenilo. Por otro lado, un grupo hidrocarbilo que contiene una funcionalidad -C(O)- es referido como un hidrocarbilo (acilo) y el que contiene una -C(O)O- es un grupo hidrocarbilo en la medida en que no existe ambigüedad. Los grupos hidrocarbilo e hidrocarbilo ejemplares incluyen grupos acilo y aciloxi, respectivamente, como acetilo y acetoxi, acrililo y acrililo.

Los grupos de enlace relacionados con carboxilo entre el sistema de anillo espiro central y un sistema de anillo aromático o heteroaromático, círculo **A**, incluyen varios tipos de enlaces éster y amida. Ilustrativos de tales enlaces son los ésteres de sulfonamida, sulfonato y tiosulfonato que pueden formarse entre un grupo que contiene SO₂ [también mostrado algunas veces como grupo S(=O)₂] y un átomo de amina, oxígeno o azufre, respectivamente. Los enlaces amida, éster y tioéster pueden formarse entre un anillo aromático o heteroaromático que contiene un C(O) [también mostrado algunas veces como grupo (C=O)] y un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, respectivamente. De manera similar, puede formarse un conector de guanidino entre un anillo aromático o heteroaromático que contiene un grupo NHC(NH)[NHC(=NH)] y un nitrógeno, un uretano, carbonato o tiocarbonato puede formarse entre un anillo aromático o heteroaromático que contiene un grupo OC(O) [o OC(=O)] y un nitrógeno, oxígeno o azufre, respectivamente. Un compuesto que contiene un conector de urea, un conector de uretano o un conector de isotiourea [NHC(O)S] {o [NHC(=O)S]} puede formarse entre un anillo aromático o heteroaromático que contiene un grupo NHC(O) y un nitrógeno, oxígeno o azufre, respectivamente. También se contempla un enlace tiourea.

Un sustituyente "carboxilo" es un grupo -C(O)OH. Un carboxilato de hidrocarbilo C₁-C₆ es un éster de hidrocarbilo C₁-C₆ de un grupo carboxilo. Una carboxamida es un sustituyente -C(O)NR³R⁴, en donde los grupos R se definen en otro lugar y se numeran aquí como 3 y 4 para facilitar la exposición adicional, pero no necesitan ser numerados así en las fórmulas químicas siguientes. De manera similar, una sulfonamida es un sustituyente -S(O)₂NR³R⁴, donde los grupos R se definen en la presente a continuación. Los grupos R³ y R⁴ ilustrativos que junto con el nitrógeno representado de una carboxamida forman un anillo de 5-7 miembros que contiene opcionalmente 1 o 2 heteroátomos adicionales que son independientemente nitrógeno, oxígeno o azufre, incluyen grupos morfolinilo, piperazinilo, oxatiazolilo, 1,2,3-triazolilo, 1,2,4-triazolilo, pirazolilo, 1,2,4-oxadiazinilo y azepinilo.

Como comprenderá un trabajador experto, no se pretende que un sustituyente que no puede existir como un grupo alqueno o alquino C₁ esté abarcado por la palabra "hidrocarbilo", aunque se pretenden tales sustituyentes con dos o más átomos de carbono.

El término "arilo", solo o en combinación, significa un fenilo, naftilo u otro radical como se describe a continuación que lleva opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados de hidrocarbilo, hidrocarbilo, halógeno, hidroxilo, amino, nitrógeno y similares, como fenilo, p-tolilo, 4-metoxifenilo, 4- (terc-butoxi) fenilo, 4-fluorofenilo, 4-clorofenilo, 4-hidroxifenilo y similares. El término "arilhidrocarbilo", solo o en combinación, significa un radical hidrocarbilo como se ha definido anteriormente en el que un átomo de hidrógeno se reemplaza por un radical arilo como se ha definido anteriormente, como bencilo, 2-feniletilo y similares. El término "arilhidrocarbilo", solo o en combinación, significa un radical de la fórmula -C(O)-O-arilhidrocarbilo en el que el término "arilhidrocarbilo" tiene el significado dado anteriormente. Un ejemplo de un radical arilhidrocarbilo es benciloxicarbonilo. El término "ariloxi" significa un radical de la fórmula aril-O- en el que el término arilo tiene el significado dado anteriormente. El término "anillo aromático" en combinaciones tales como sulfonamida de anillo aromático sustituido,

sulfinamida de anillo aromático sustituido o sulfenamida de anillo aromático sustituido significa arilo o heteroarilo como se ha definido anteriormente.

Como se usa en la presente, el término "se une" se refiere a la adherencia específica de las moléculas entre sí, como por ejemplo, pero no limitado a, la interacción de un ligando con su receptor, o un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 con una molécula pequeña tales como los compuestos divulgados en la presente, o un anticuerpo y su antígeno.

Como se usa en la presente, el término "compuesto de unión a FLNA" se refiere a un compuesto que se une a la proteína filamina A del armazón, o más preferiblemente a un polipéptido que comprende residuos -Val-Ala-Lys-Gly-Leu- (SEQ ID NO: 1) de la secuencia de FLNA que corresponde a las posiciones de los residuos de aminoácidos 2561-2565 de la secuencia de la proteína FLNA como se indica en la secuencia proporcionada en la página web: UniProtKB/Swiss-Prot entrada P21333, FLNA-HUMAN, secuencia de la proteína Filamina-A. Un compuesto de unión a FLNA puede inhibir el acoplamiento de MOR-Gs provocado por la estimulación agonista del receptor opioide μ a través de interacciones con la filamina A, preferiblemente en el 24^a región de repetición.

Como se usa en la presente, el término "receptor opioide" se refiere a un receptor acoplado a proteína G localizado en el SNC que interactúa con los opioides. Más específicamente, el receptor opioide μ es activado por la morfina que causa analgesia, sedación, náuseas y muchos otros efectos secundarios conocidos por los expertos en la técnica.

Como se usa en la presente, el término "agonista opioide" se refiere a una sustancia que tras unirse a un receptor opioide puede estimular el receptor, inducir el acoplamiento de la proteína G y desencadenar una respuesta fisiológica. Más específicamente, un agonista opioide es una sustancia similar a la morfina que interactúa con MOR para producir analgesia.

Como se usa en la presente, el término "antagonista opioide" se refiere a una sustancia que tras unirse a un receptor opioide inhibe la función de un agonista opioide al interferir con la unión del agonista opioide con el receptor.

Como se usa en la presente, el término "dosis ultra baja" o "cantidad ultra baja" se refiere a una cantidad de compuesto que cuando se administra en combinación con un agonista opioide es suficiente para mejorar la potencia analgésica del agonista opioide. Más específicamente, la dosis ultra baja de un antagonista opioide se mezcla con un agonista opioide en una cantidad de aproximadamente 1000 a aproximadamente 10.000.000 veces menos, y preferiblemente de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 1.000.000 veces menos que la cantidad de agonista opioide.

Como se usa en la presente, una "cantidad eficaz de unión a FLNA" o más simplemente una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto contemplado suficiente para unirse al pentapéptido FLNA de la SEQ ID NO: 1 y realizar las funciones descritas en la presente, como la inhibición de la fosforilación de la proteína tau. Una cantidad eficaz de un compuesto contemplado se determina más fácilmente usando el ensayo *in vitro* del Ejemplo 1. Usando esa definición, una cantidad eficaz de un compuesto contemplado se une a un pentapéptido de la SEQ ID NO: 1, inhibe por lo menos aproximadamente el 60 por ciento y más preferiblemente aproximadamente el 70 por ciento de la unión de naloxona marcada con FITC cuando está presente a una concentración de 10 μ M y se usa naloxona sin marcar como inhibidor de control a la misma concentración y en las mismas condiciones que el compuesto contemplado, y hasta aproximadamente dos veces (200 por ciento) la inhibición obtenida con naloxona como control.

Como se usa en la presente, el término "farmacóforo" no se pretende que implique ninguna actividad farmacológica. Un farmacóforo se puede definir como los grupos relevantes en una molécula que interactúan con un receptor y son responsables de la actividad del compuesto. [R.B. Silverman, The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action, 2^a ed., Elsevier Academic Press, Amsterdam, (2004), pág. 17]. El término también puede definirse y se pretende en la presente que sean las características químicas de una molécula y su distribución en el espacio tridimensional que constituye los requisitos preferidos para la interacción molecular con un receptor (ver, Patente de Estados Unidos N° 6.034.066). Un farmacóforo se calcula informáticamente determinando las funciones aceptoras de unión a hidrógeno y aromáticas/hidrófobas compartidas y las distancias entre ellas de un grupo de compuestos que se unen de manera similar a un receptor particular, aquí, el pentapéptido de la SEQ ID NO: 1, usando un ordenador apropiadamente programado. Tales programas informáticos están disponibles comercialmente de compañías como Accelrys Software Inc., San Diego, CA, Schrödinger, LLC, Portland, OR, de Chemical Computing Group, Inc., Montreal, QC, Canadá, o como un programa de acceso abierto referido como ZINCPharmer

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención es como se define en las reivindicaciones. La presente divulgación contempla un método para inhibir la hiperfosforilación (fosforilación) de la proteína tau en uno o más de S²⁰², T²³¹ y T¹⁸¹ *in vitro*, así

como *in vivo*. Dicho método comprende los pasos de administrar a las células del sistema nervioso central con necesidad reconocida de ello, como las células cerebrales, una cantidad eficaz de un compuesto que se une al pentapéptido FLNA de la SEQ ID NO: 1, inhibe por lo menos aproximadamente el 60 por ciento y más preferiblemente aproximadamente el 70 por ciento de la unión de naloxona marcada con FITC cuando está presente en una concentración de 10 μ M y usa naloxona no marcada como inhibidor de control a la misma concentración. Ese compuesto también contiene preferiblemente por lo menos cuatro de los seis farmacóforos de las Figs. 35-40. Un compuesto más preferido contiene cinco de los seis farmacóforos, y el compuesto más preferido contiene los seis de esos farmacóforos.

La fosforilación de uno o más de S²⁰², T²³¹ y T⁸¹ de la proteína tau es típicamente además de la fosforilación de uno o más residuos adicionales de la proteína. La presencia de dicha fosforilación puede determinarse mediante la inmunoreacción de un anticuerpo, habitualmente un anticuerpo monoclonal, que inmunoreacciona específicamente con una proteína tau que se fosforila en uno de esos tres residuos de aminoácidos, como se ilustra en la presente.

La administración se lleva a cabo preferiblemente en ausencia de una cantidad eficaz de unión a MOR de una molécula agonista o antagonista de MOR proporcionada exógenamente separada. Por tanto, un compuesto de unión a MOR suministrado exógenamente, como la propia morfina, codeína, oxicodona y compuestos de unión a MOR similares, está ausente cuando se administra un compuesto contemplado a las células. La presencia de un compuesto de unión a MOR suministrado endógenamente, como una endorfina o una encefalina, no puede controlarse tan fácilmente y no se excluye. Algunos de los compuestos de unión al pentapéptido FLNA contemplados también se unen a MOR y su uso tampoco está excluido. Sin embargo, se prefiere usar un compuesto que se una pobremente o nada a MOR, como se trata a continuación y no sea un agonista de MOR. Tal compuesto muestra menos de aproximadamente el 80 por ciento de estimulación de MOR proporcionado por DAMGO a la misma concentración y condiciones de ensayo.

La inhibición de la hiperfosforilación (fosforilación) de la proteína tau *in vitro* e *in vivo* puede ensayarse en lisados u otras preparaciones celulares de células del SNC cultivadas *in vitro* o en lisados de células del SNC, como las neuronas olfativas, obtenidas mediante raspado de la cavidad nasal para células epiteliales neurales o de muestras de biopsia para ensayos *in vivo*.

También se contempla un método para inhibir la respuesta inmune mediada por TLR4 como la inflamación de células que contienen TLR4 como linfocitos o células del SNC, que comprende administrar a células que contienen TLR4 con necesidad reconocida de ello una cantidad eficaz de un compuesto o un sal farmacéuticamente aceptable del mismo que se une a un pentapéptido de filamina A (FLNA) de la SEQ ID NO: 1, inhibe por lo menos aproximadamente el 60 por ciento y más preferiblemente aproximadamente el 70 por ciento de la unión de naloxona marcada con FITC cuando está presente a una concentración de 10 μ M y se usa naloxona no marcada como el inhibidor de control a la misma concentración, y contiene por lo menos cuatro de los seis farmacóforos de las Figs. 35-40. La administración se lleva a cabo preferiblemente en ausencia de una cantidad eficaz de unión al receptor opioide mu (MOR) de una molécula agonista o antagonista de MOR separada. Un compuesto administrado preferiblemente se une pobremente o no se une a MOR como se describe posteriormente, por ejemplo, el compuesto muestra menos de aproximadamente el 80 por ciento de la estimulación de MOR proporcionada por DAMGO a la misma concentración.

También se contempla el uso de un único estereoisómero o mezcla de estereoisómeros, o una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto contemplado. La administración contemplada puede tener lugar *in vivo* o *in vitro*, y se repite típicamente una pluralidad de veces durante un período de días o meses cuando se administra *in vivo* a las células de un animal huésped como un humano.

Un compuesto administrado contiene por lo menos cuatro de los seis farmacóforos de las Figs. 35-40, pero más preferiblemente, dicho compuesto contemplado contiene por lo menos cinco de los seis farmacóforos de las Figs. 35-40. Más preferiblemente, el compuesto administrado contiene cada uno de los seis farmacóforos de las Figs. 35-40.

La inflamación de la respuesta inmune mediada por TLR4 de las células del SNC produce hiperfosforilación de la proteína tau y tauopatías relacionadas, como las que resultan de las NFT. Como consecuencia, una manera de analizar la presencia de inflamación mediada por TLR4 es analizar la presencia de una cantidad aumentada de tau fosforilada en comparación con la cantidad presente en una afección no inflamatoria como se describió anteriormente para la tau hiperfosforilada.

La inflamación mediada por TLR4 también puede reconocerse por una abundancia mayor que la de fondo de marcadores de proteínas de activación de TLR4, como las citoquinas IL-1 β , IL-6 y TNF α que generalmente se aumentan juntas, y/o las proteínas NF- κ B y JNK estimuladas por separado. Como se ha señalado anteriormente, la expresión aumentada de IL-1 β , IL-6 y TNF α en comparación con la expresión de NF- κ B y JNK parece proceder por diferentes vías mediadas por TLR4. Sin embargo, ambos marcadores de inflamación pueden estar presentes al

mismo tiempo debido al mismo inmunoestimulo.

Por tanto, la presencia de una cantidad aumentada de uno, dos o tres de IL-1 β , IL-6 y TNF α en relación con la cantidad presente en una afección no inflamatoria indica la presencia de inflamación mediada por TLR4. De manera similar, la presencia aumentada del factor de transcripción NF- κ B y la proteína quinasa activada por mitógeno c-Jun N-terminal quinasa (JNK) en comparación con la cantidad presente en una afección no inflamatoria por separado implica la presencia de una inflamación mediada por TLR4.

Estas proteínas o polipéptidos pueden analizarse en lisados de células cultivadas como linfocitos B, células T y macrófagos o células del SNC como neuronas olfativas que pueden obtenerse raspando la cavidad nasal para células epiteliales neuronales para ensayos *in vivo*. Las proteínas también pueden analizarse en el medio de cultivo celular para estudios *in vitro* usando linfocitos o células del SNC como las ilustradas posteriormente en la presente y en fluidos corporales como sangre o su plasma constitutivo o suero o linfocitos para ensayos *in vivo*.

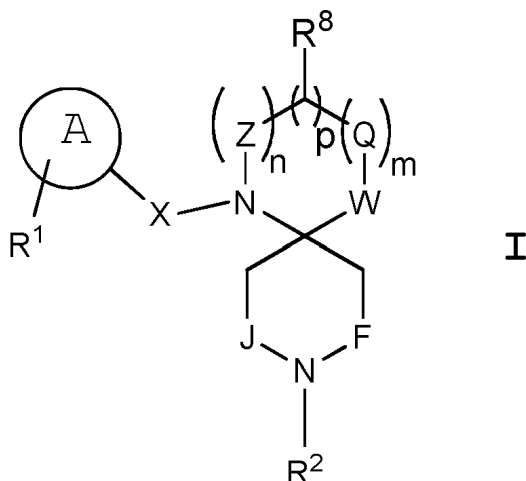
La administración de un compuesto contemplado o su sal farmacéuticamente aceptable se continúa hasta que la hiperfosforilación de tau ya no aumenta y/o hasta que la cantidad de uno o más de los marcadores de proteína de activación de TLR4 se encuentra en niveles de fondo. La mejora del nivel de tau hiperfosforilada o uno de los marcadores de proteínas TLR4 en relación con el fondo (en ausencia de una respuesta inmune mediada por TLR4) se determina por una diferencia que es estadísticamente significativa por lo menos al nivel de confianza del 90% ($p < 0,1$), y preferiblemente al nivel de confianza del 95 por ciento ($p < 0,05$) como se ilustra en las figuras acompañantes.

También se prefiere que un compuesto administrado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo esté presente disuelto o dispersado en un diluyente farmacéuticamente aceptable como una composición farmacéutica cuando se administra. Más preferiblemente, la administración es peroral.

También se contempla el uso de una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto contemplado, como es el uso de un único estereoisómero o mezcla de estereoisómeros, o de sus sales farmacéuticamente aceptables. La administración contemplada puede tener lugar *in vivo* o *in vitro*.

En los aspectos actualmente preferidos, la presente divulgación contempla un método para inhibir 1) la fosforilación de la proteína tau y/o 2) la respuesta inmune mediada por TLR4 (por ejemplo, Inflamación) de linfocitos y/o células del SNC que comprende administrar a células del sistema nervioso central con necesidad reconocida de ello, como células cerebrales, una cantidad eficaz de un compuesto de uno o más de la Serie C-2, un único enantiómero, una mezcla de enantiómeros o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquier compuesto contemplado. La administración se lleva a cabo preferiblemente en ausencia de una cantidad eficaz de unión a MOR de una molécula agonista o antagonista de MOR separada. Ilustrativas de las células del SNC son células como las de un animal huésped que muestra inflamación inducida por una lesión cerebral como una lesión cerebral traumática, encefalopatía traumática crónica, así como las de un animal huésped como un humano que muestra síntomas de enfermedad de Alzheimer (EA), demencia frontotemporal (DFT), parálisis supranuclear progresiva, demencia pugilística y degeneración corticobasal, así como una infección por bacterias Gram positivas o Gram negativas.

La estructura general del compuesto se muestra a continuación. Una exposición detallada se presenta en la sección titulada "Compuestos Contemplados" que sigue.



De acuerdo con un método descrito anteriormente, una composición que contiene una cantidad eficaz de

un compuesto contemplado o su sal farmacéuticamente aceptable disuelta o dispersada en un diluyente farmacéuticamente aceptable se administra a células del SNC con necesidad reconocida de ello, y particularmente al cerebro, *in vivo* en un animal vivo o *in vitro* en una preparación celular. Cuando se administra *in vivo* a un animal como una rata o ratón de laboratorio o un ser humano con necesidad reconocida, la administración inhibe la formación de NFT que contienen tau fosforilada en el SNC, como en el cerebro de un animal sujeto al que se administra un compuesto contemplado. La mezcla de una composición que contiene un compuesto contemplado o su sal farmacéuticamente aceptable disuelta o dispersada en un diluyente farmacéuticamente aceptable con células del SNC, como una preparación de células cerebrales *in vitro*, también inhibe la formación de NFT como se ilustra a continuación.

Un compuesto contemplado se une a la proteína FLNA de andamiaje y, en particular, a una porción de cinco residuos de la secuencia de la proteína FLNA Val-Ala-Lys-Gly-Leu (SEQ ID NO: 1) en un ensayo *in vitro* que se expone a continuación en el Ejemplo 1, y brevemente a continuación. Un compuesto contemplado se une solo a un único sitio en FLNA y ese sitio es el sitio del pentapéptido de la SEQ ID NO: 1.

Estudios de unión de la inhibición de naltrexona de naloxona tritiada, [³H]NLX, unión a membranas de células A7 que expresan FLNA (una línea celular de astrocitos producida inmortalizando los astrocitos del nervio óptico de rata Sprague-Dawley embrionaria con antígeno T grande SV40) ha demostrado la existencia de dos sitios de afinidad en FLNA; un sitio de alta afinidad (H) con un IC₅₀-H de 3,94 picomolar y un sitio de menor afinidad (L) IC₅₀-L de 834 picomolar. [Wang et al., PLoS One. 3(2):e1554 (2008); Wang et al., PLoS One. 4(1):e4282 (2009).] El sitio de alta afinidad se identificó posteriormente como el pentapéptido FLNA de la SEQ ID NO: 1 (Publicación de Patente de Estados Unidos 2009/0191579 y su solicitud predecesora N° de serie 60/985.086 que se presentó el 2 de noviembre de 2007), mientras que el sitio de menor afinidad aún no se ha identificado.

Los compuestos tales como la naloxona (NLX), naltrexona (NTX), metadona, fentanilo, nalorfina, nalbufina y buprenorfina, y similares se unen bien al pentapéptido FLNA de alta afinidad de la SEQ ID NO: 1 (VAKGL). Sin embargo, cuando se usan a una dosis mencionada en la etiqueta del producto, esos compuestos también se unen al sitio de menor afinidad en FLNA, y típicamente también se unen al MOR. Algunos de los compuestos son antagonistas de MOR como la naloxona, naltrexona, nalbufina, mientras que otros como la metadona, la buprenorfina y el fentanilo son agonistas totales o parciales de MOR. La unión a ese sitio FLNA de menor afinidad deteriora la actividad del pentapéptido FLNA de la SEQ ID NO: 1 para mostrar sus actividades como se trata, utiliza e ilustra en la presente. Como consecuencia, compuestos tales como la naloxona, naltrexona, metadona, fentanilo, nalorfina, nalbufina, buprenorfina, y compuestos similares que también se unen al sitio de menor afinidad en la proteína FLNA no se contemplan para su uso en la presente.

Un compuesto contemplado para su uso en la presente invención inhibe la unión de naloxona marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-NLX) a la SEQ ID NO: 1 (Bn-VAKGL) ligada a biotina unida a placas de estreptavidina recubiertas bajo condiciones definidas posteriormente en el Ejemplo 1 en un extensión que es por lo menos aproximadamente el 60 por ciento y más preferiblemente por lo menos aproximadamente el 80 por ciento del valor obtenido cuando está presente en una concentración de 10 µM y usando naloxona como el inhibidor de control a la misma concentración que el compuesto contemplado, y hasta aproximadamente el doble del valor obtenido con naloxona como control.

La naltrexona (NTX) también puede usarse como un inhibidor de control. Los valores de inhibición media obtenidos usando NTX en lugar de NLX tienden a ser un 1 o 2 por ciento más bajos en valor absoluto que los obtenidos con NLX. Así, por ejemplo, cuando un valor de inhibición promedio a una concentración particular de NLX es el 40 por ciento, se puede esperar que los valores obtenidos con NTX sean aproximadamente del 38 o 39 por ciento. Los valores de inhibición de unión para un compuesto contemplado se determinan teniendo en cuenta la diferencia de valor de NLX/NTX esperada.

En otros estudios de unión, las Patentes de Estados Unidos N° 7.560.882 y N° 8.153.795 de Sundermann et al. enseñan que compuestos similares a los de las Series C-1 y C-2 de compuestos son útiles para la inhibición de la recaptación de serotonina, la recaptación de noradrenalina y tienen una alta afinidad por los receptores de batrachotoxina (BTX) y/o receptores de cannabinoides (CB2). Los resultados mostrados en la Fig. 45 ilustran que los compuestos de la Serie D que están dentro de la definición proporcionada por Sundermann et al. Patente de Estados Unidos N° 7.560.882 también inhiben la hiperfosforilación de tau y son útiles en un método contemplado.

Los compuestos representativos del presente grupo de la Serie C-2 fueron examinados por Ricerca Biosciences LLC de Taipei, Taiwán en estudios de ensayos de unión competitiva usando técnicas publicadas para determinar si los compuestos podrían inhibir competitivamente la unión a alguno de los más de 65 receptores, canales y transportadores, incluyendo los receptores adrenérgicos a los que se une la noradrenalina, receptores de serotonina, receptores muscarínicos a los que se une BTX y receptores de cannabinoides. Los compuestos estudiados no mostraron ninguno una inhibición significativa en cada uno de esos ensayos.

Determinaciones de Farmacóforos

Un aspecto de la invención es el uso de un compuesto que se une al pentapéptido de la SEQ ID NO: 1 que está presente en FLNA para inhibir la fosforilación de la proteína tau. En este aspecto, las estructuras de los compuestos que se unen eficazmente a un pentapéptido de la SEQ ID NO: 1 son bastante variadas, pero pueden unificarse a través de cálculo asistido por ordenador de un grupo de farmacóforos compartidos por aquellos compuestos que sí se unen.

Un compuesto contemplado útil en la invención contiene por lo menos cuatro de los seis farmacóforos de las Figs. 35-40. En la práctica preferida, un compuesto contemplado contiene cinco de los seis farmacóforos de esas figuras, y más preferiblemente, un compuesto contemplado contiene los seis farmacóforos. Aparte de NLX, NTX, metadona, fentanilo, nalorfina, nalbufina y buprenorfina que se unen bien al pentapéptido FLNA de la SEQ ID NO: 1 (VAKGL), se prefieren particularmente los compuestos de cuatro series estructurales expuestas a continuación.

Se preparó un modelo de farmacóforo conjunto con un ordenador de propósito general programado usando las conformaciones tridimensionales de los compuestos en los conjuntos de entrenamiento. Usando datos de 0.1 μ M del Ejemplo 1 como punto de partida, 153 compuestos de la lista de compuestos en las tablas del Ejemplo 1 tienen una actividad de unión al pentapéptido FLNA que es menor que el valor medio del 45,54 por ciento. Un compuesto de "unión pobre" o "aglutinante pobre" se define como un compuesto cuya inhibición de unión es igual o menor que el valor medio del 45,54 por ciento en un ensayo como el realizado en el Ejemplo 1, cuyos resultados se muestran en las tablas del Ejemplo 1. El conjunto de entrenamiento consiste de diez compuestos que se sabe que se unen al pentapéptido FLNA, los 153 compuestos de unión pobre anteriores y también aproximadamente 1000 compuestos aleatorios seleccionados de la base de datos ZINC en zinc.docking.org.

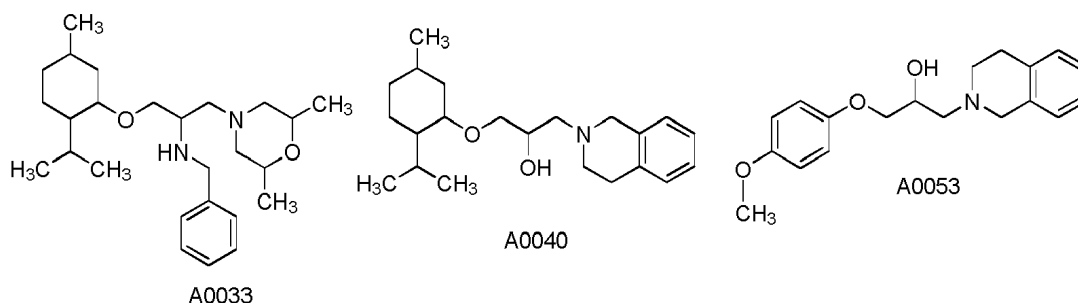
La selección de los farmacóforos implica los pasos siguientes: 1) Primero se prepararon conformaciones tridimensionales generadas por ordenador de todos los compuestos. 2) Se derivó un conjunto de farmacóforos de 4 puntos presentes en la mayoría de los compuestos activos conocidos. 3) Usando compuestos seleccionados inactivos y aleatorios conocidos como compuestos de referencia, solo aquellos farmacóforos que no estaban presentes en la mayoría de los compuestos de referencia se identificaron como relevantes para la actividad de unión a FLNA. 4) Finalmente se identificaron seis farmacóforos de 4 puntos de los determinados anteriormente para representar mejor los 10 compuestos activos.

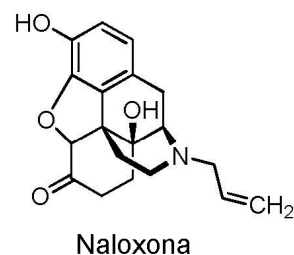
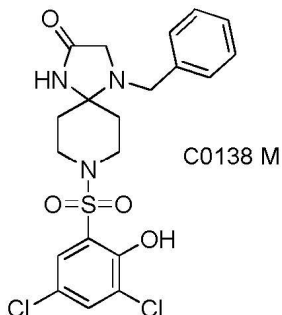
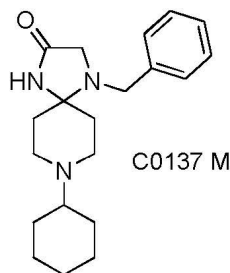
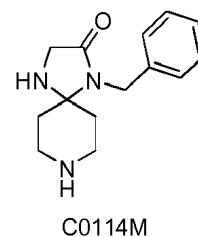
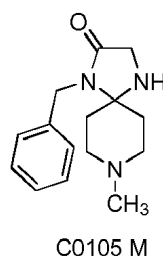
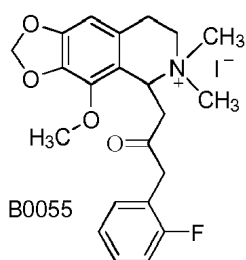
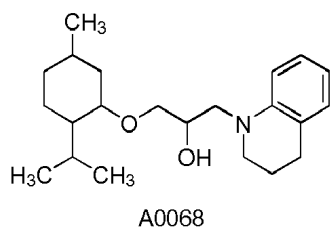
Un compuesto no probado que contiene cuatro de los seis farmacóforos tiene aproximadamente un 20 por ciento de probabilidad de ser un aglutinante activo en el pentapéptido FLNA. Un compuesto que contiene cinco de los seis farmacóforos tiene una probabilidad de aproximadamente el 32 por ciento de ser un aglutinante activo en el pentapéptido FLNA, y una probabilidad de aproximadamente el 60 por ciento cuando contiene seis de los seis farmacóforos.

Se usó el software Molecular Operating Environment (MOE) de Chemical Computing Group, Montreal, Quebec, Canadá, para programar un ordenador de propósito general para generar conformaciones tridimensionales, para derivar farmacóforos de 4 puntos a partir de compuestos activos, y para probar estos farmacóforos frente a compuestos inactivos conocidos y compuestos seleccionados aleatoriamente. El modelado de farmacóforos como se usa en la presente se lleva a cabo como se expone y explica en Penzotti et al., J Med Chem, 2002, 45(9):1737-1740 (2002); Siew et al., Bioorg Med Chem Lett, 21(10):2898-2905 (15 de mayo de 2011); Leong, Chem Res Toxicol, 20(2):217-226 (2007); y Lin, chemcomp.com/journal/ph4.htm.

En algunas realizaciones, se prefiere que un compuesto de unión a FLNA también sea un agonista de MOR. En otras realizaciones, se prefiere que el compuesto de unión a FLNA no sea un agonista de MOR. En la presente se define que un compuesto no es un agonista de MOR si tiene menos de aproximadamente el 80 por ciento de la unión de [D-Ala2, N-MePhe4, Gly-ol]-encefalina (DAMGO) en cualquiera de las dos concentraciones utilizadas en la Tabla del Ejemplo 2.

Los diez compuestos del conjunto de entrenamiento de unión a pentapéptido FLNA conocidos se muestran a continuación junto con sus designaciones alfanuméricas usadas en la presente.



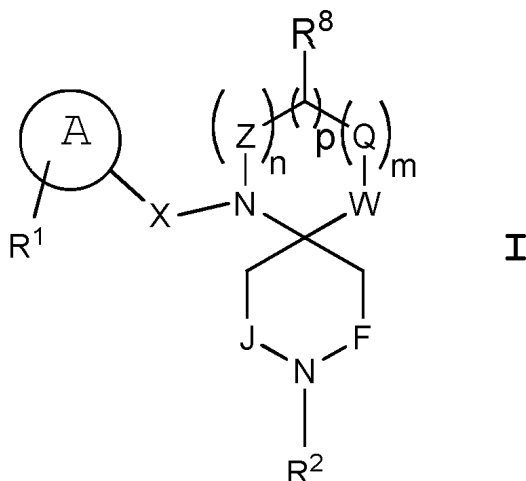


De los diez compuestos anteriores usados en el conjunto de entrenamiento para determinar los farmacóforos, nueve contenían los seis farmacóforos. La naloxona contenía cinco de los seis. Examinando varias estructuras más de los compuestos mostrados en las tablas y analizados en el Ejemplo 1 posteriormente, veinte compuestos adicionales contenían cinco de los seis farmacóforos, y otros veinte contenían cuatro de los seis.

Compuestos de Unión a FLNA Contemplados Específicamente

Un compuesto contemplado para su uso en un método contemplado se une al pentapéptido FLNA de la SEQ ID NO: 1, y contiene por lo menos cuatro de los seis farmacóforos de las Figs. 35-40. Tal compuesto puede tener una estructura variada como se ha indicado anteriormente. Independientemente de esa varianza estructural, un compuesto contemplado inhibe la unión de naloxona marcada (FITC-NLX) con el pentapéptido VAKGL biotinilado (Bn-VAKGL; SEQ ID NO: 1) unido a placas de estreptavidina recubiertas en una extensión que es por lo menos aproximadamente el 80 por ciento del valor obtenido cuando se usa naloxona como inhibidor a la misma concentración y bajo las condiciones definidas posteriormente en el Ejemplo 1, y puede ser aproximadamente dos veces el valor de naloxona a la misma concentración.

Se ha descubierto que los compuestos de la Serie C-2 se unen bien al pentapéptido de la SEQ ID NO: 1. La inhibición de la fosforilación de tau por los Compuestos A, B y C y la Serie D se ilustran en la presente y esos compuestos son representativos de esas series estructurales. La estructura general se muestra a continuación, seguida por divulgaciones más específicas.

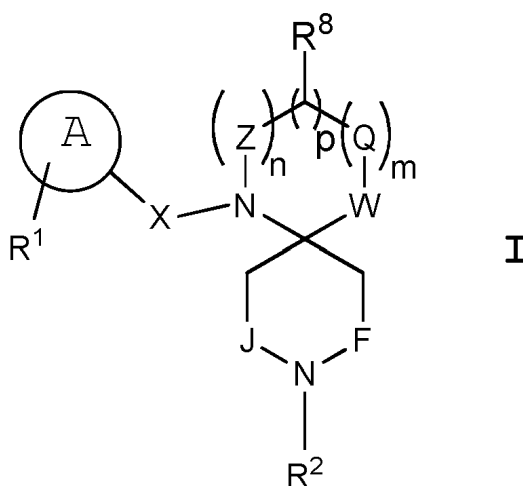


También se contempla una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de cada una de las fórmulas

anteriores. Un compuesto que tiene un carbono asimétrico (quiral) o una sal de dicho compuesto puede existir en forma de estereoisómeros, que son dos enantiómeros. La invención se refiere tanto a cada enantiómero por separado, como a su mezcla; es decir, a ambas formas enantioméricas (*d* y *l*, o *R* y *S*) y para su mezcla. Adicionalmente, cuando están presentes dos o más centros quirales, pueden formarse estereoisómeros denominados diastereómeros, y también se contemplan los diastereómeros.

Como se observará a partir de las siguientes definiciones, un compuesto contemplado puede contener uno o más átomos de carbono deuterados, en los que el deuterio se designa por su designación química habitual, D. Los compuestos deuterados pueden ser útiles para estudiar el mecanismo de las interacciones de los fármacos con organismos vivos para la elucidación de las vías metabólicas y biosintéticas. La deuteración también puede prolongar la vida media de un compuesto contemplado *in vivo* ya que un enlace carbono-deuterio (C-D) es más fuerte que un enlace carbono-hidrógeno (C-H) requiriendo de este modo más entrada de energía para la escisión del enlace. Ver, Blake et al., 1975 J. Pharm. Sci. 64 (3):367-391; y Nelson et al., Drug Metab 2003. Dispos. 31(12):1481-1498, y las citas en los mismos. Los compuestos deuterados contemplados se preparan usando reacciones bien conocidas.

Un compuesto de la Serie C-2 tiene la estructura de Fórmula I



en la que **J** y **F** son iguales o diferentes y son CH₂, CHD o CD₂ (donde D es deuterio); y

Q es CHR⁹ o C(O), **Z** es CHR¹⁰ o C(O), y solo uno de **Q** y **Z** es C(O);

cada uno de *m* y *n* y *p* es cero o uno y la suma de *m*+*n*+*p* es 2 o 3, preferiblemente 2;

W se selecciona del grupo que consiste de NR²⁰, NR², NR⁷, S y O, donde R⁷ y R² son iguales o diferentes y son H, C(H)_v(D)_h donde cada uno de *v* y *h* es 0, 1, 2 o 3 y *v*+*h*=3, C(H)_q(D)_r-hidrocarbilo C₁-C₁₁ alifático donde cada uno de *q* y *r* es 0, 1 o 2 y *q*+*r*=0, 1 o 2, (incluyendo hidrocarbilo C₁-C₁₂ alifático cuando *q*+*r*=0), hidrocarbilo C₁-C₁₂ sulfonilo alifático o hidrocarbilo C₁-C₁₂ alifático (acilo), y R²⁰ es **X**-círculo **A**-R¹ como se define en la presente a continuación.

Preferiblemente, en una realización,

J y **F** son iguales o diferentes y son CH o CD (donde D es deuterio).

X es SO₂, C(O), CH₂, CD₂, OC(O), NHC(NH), NHC(S) o NHC(O), preferiblemente SO₂, C(O) o CH₂. En algunas realizaciones, **X** es más preferiblemente CH₂ o SO₂. En otras realizaciones, **X** es preferiblemente SO₂, NHC(NH), NHC(S) o NHC(O).

El círculo **A** es un sistema de anillo aromático o heteroaromático que preferiblemente contiene un único anillo, pero también puede contener dos anillos fusionados. R¹ es H o representa hasta tres sustituyentes, R^{1a}, R^{1b} y R^{1c}, que pueden ser ellos mismos iguales o diferentes, en donde cada uno de esos tres grupos, R^{1a-c}, se selecciona por separado del grupo que consiste de H, hidrocarbilo C₁-C₆, hidrocarbilo C₁-C₆, hidrocarbilo C₁-C₆, trifluorometilo, trifluorometoxi, hidrocarbilo C₁-C₇, hidroxi-, trifluorometil- (-CF₃) o hidrocarbilo C₁-C₇ sustituido con halógeno, hidrocarbilsulfonilo C₁-C₆, hidrocarbilo C₁-C₆, halógeno (F, Cl, o Br, y preferiblemente Cl) nitro, fenilo, ciano, carboxilo, hidrocarbilo carboxilato C₁-C₇ [C(O)O-hidrocarbilo C₁-C₇], carboxamida [C(O)NR³R⁴] o sulfonamida [S(O)₂NR³R⁴],

en donde el nitrógeno amido en cualquiera de los grupos amida tiene la fórmula NR³R⁴ en la que R³ y R⁴ son iguales o diferentes y son H,

El hidrocarbilo C₁-C₄, o R³ y R⁴ junto con el nitrógeno representado forman un anillo de 5-7 miembros que opcionalmente contiene 1 o 2 heteroátomos adicionales que son independientemente nitrógeno, oxígeno o azufre,

MAr, donde **M** es -CH₂-, -O- o -N=N- y Ar es un grupo arilo o heteroarilo de un solo anillo y NR⁵R⁶ en donde R⁵ y R⁶ son iguales o diferentes y son H, hidrocarbilo C₁-C₄, acilo C₁-C₄, hidrocarbilsulfonilo C₁-C₄, o R⁵ y R⁶ junto con el nitrógeno representado forman un anillo de 5-7 miembros que contiene opcionalmente 1 ó 2 heteroátomos adicionales que son independientemente nitrógeno, oxígeno o azufre.

R⁸, R⁹ y R¹⁰ son cada uno H, lo que se prefiera, o dos de R⁸, R⁹ y R¹⁰ son H y uno es un grupo hidrocarbilo C₁-C₈ que no está sustituido o está sustituido con hasta tres átomos que son iguales o diferentes y son átomos de oxígeno o nitrógeno (incluyendo hidrógenos, según corresponda).

En otra realización preferida de un compuesto de Fórmula I, anterior,

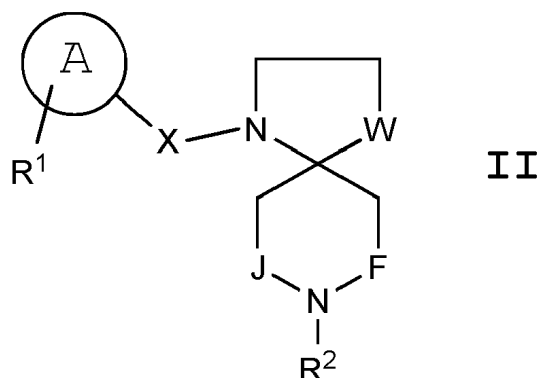
Q es CHR⁹ o C(O); y

Z es CHR¹⁰ o C(O), con el otro de **J**, **F**, **X**, **Z**, n, m, p, círculo **A**, y todos los grupos R siendo definidos como se ha expuesto anteriormente, a menos que la fórmula estructural lo excluya.

También se contempla una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de Fórmula I de la Serie C-2 y todas las fórmulas restantes descritas en la presente.

Preferiblemente, i) R² de NR² representado es distinto de -S(O)₂-hidrocarbilo C₁-C₃ cuando (a) la suma de m+n+p es 2 y la **Q** o **Z** presente es CH₂, (b) la **G** o **W** que no es NR²⁰ es O, y (c) R²⁰ es -S(O)₂fenil-R¹, donde R¹ es H, hidrocarbilo C₁-C₃ o halógeno, y ii) **W** es distinto de NR² o NR⁷ en donde R² o R⁷ es H o un hidrocarbilo C₁ alifático cuando (a) la suma de m+n+p es 2 y (b) **Z** es C (O).

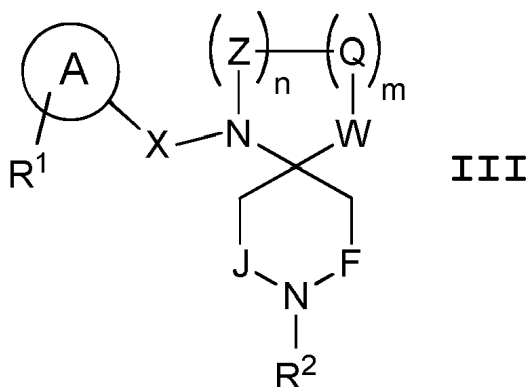
En otra realización preferida donde R⁸ es H, uno de n y m es cero y la **Z** o **Q** restante es CH₂, un compuesto de la Fórmulas I de la Serie C-2 tiene la estructura de la Fórmula II de la Serie C-2



en la que **J** y **F** son iguales o diferentes y son CH₂, CHD o CD₂ (donde D es deuterio); y

X, **W**, círculo **A**, R¹, R² y los grupos R definidos en el mismo son los descritos anteriormente para un compuesto de la Fórmula A de la Serie C-2, a menos que la fórmula que se muestra excluya una definición previa. Preferiblemente, R² del NR² representado es distinto de -S(O)₂hidrocarbilo-C₁-C₃ cuando **W** es O, y **X**-círculo **A**-R¹ es -S(O)₂fenil-R¹, donde R¹ es H, hidrocarbilo-C₁-C₃ o halógeno.

En una realización preferida adicional, donde R⁸ es H, un compuesto de la Fórmulas I de la Serie C-2 tiene la estructura de la Fórmula III de la Serie C-2



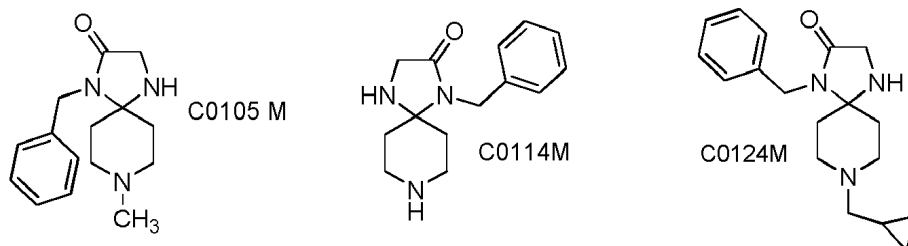
en la que **J** y **F** son iguales o diferentes y son CH₂, CHD o CD₂ (donde D es deuterio);
cada uno de m y n es uno; y

W, **X**, **Z**, **Q**, círculo **A**, R¹, R² y los grupos R definidos en el mismo son los descritos anteriormente para un compuesto de la Fórmula I de la Serie C-2, a menos que la fórmula que se muestra excluya una definición previa.

En una realización preferida, i) **Z** es C(O), ii) **Q** es CH₂, iii) **W** es NH, y R² es H o hidrocarbilo C₁-C₁₂ alifático lineal, ramificado o cíclico, iv) **X** es preferentemente CH₂, SO₂, NHC(NH), NHC(S) o NHC(O), y más preferiblemente CH₂. En otra realización preferida, i) uno de **Z** y **Q** es C(O), y ii) **W** es distinto de NR² o NR⁷ en el que R² y R⁷ es H o un hidrocarbilo C₁ alifático cuando **Z** es C(O), y iii) **X** es preferiblemente CH₂, SO₂, NHC(NH), NHC(S) o NHC(O).

En una realización preferida adicional más, i) **Z** es C(O), ii) **Q** es CH₂, iii) **W** es NH, (vi) R² es el mismo o diferente R²⁰, y (vii) R²⁰ es X-círculo A-R¹. En esta realización, **X** es preferiblemente CH₂, SO₂, NHC(NH), NHC(S) o NHC(O), más preferiblemente CH₂.

Un compuesto actualmente más preferido para llevar a cabo un método contemplado corresponde en su estructura a la Fórmula III, anterior, en la que i) **Z** es C(O), ii) **Q** es CH₂, iii) **W** es NH, y R² es H o un C₁-C₁₂, preferiblemente C₁-C₈, y más preferiblemente un grupo hidrocarbilo C₁-C₆ alifático lineal, ramificado o cíclico, iv) **X** es CH₂, y el círculo A-R¹ es fenilo no sustituido por lo que el sustituyente X-círculo A-R¹ es un grupo bencilo. Los compuestos de N-(bencilamido)-no sustituido- amina ilustrativos actualmente más preferidos incluyen los Compuestos C0105M, C0115M y C0124M, cuyas fórmulas estructurales se muestran a continuación.



En una realización preferida, i) **W** es diferente de NR² o NR⁷ en el que R² o R⁷ es H o un hidrocarbilo C₁ alifático, cuando p es cero y la suma de m+n+p es 2 y **Z** es C(O) y ii) R² del grupo NR² representado es distinto de H o un hidrocarbilo C₁ alifático, cuando p es cero y la suma de m+n+p es 2, **W** es NR² o NR⁷, y **Q** es C(O).

También se observa que las preferencias mencionadas anteriormente se aplican a **X**, **W**, **Z**, **Q**, n, m, círculo **A** y todos los grupos R se aplican a un compuesto de la Serie C-2 I-III, a menos que la fórmula como se muestra excluye una definición anterior.

Un sistema de anillo aromático (arilo) contemplado del círculo **A** de uno de los compuestos contemplados contiene preferiblemente un único anillo aromático, pero también puede contener dos anillos aromáticos fusionados. Un sistema de anillo aromático de círculo **A** ilustrativo se selecciona del grupo que consiste de fenilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, triazinilo (1,3,5-triazinilo, 1,2,4-triazinilo y 1,2,3-triazinilo), furanilo, tienilo, oxazolilo, isoxazolilo, naftilo, benzofuranilo, isobenzofuranilo, benzotiofenilo, isobenzotiofenilo, benzoxazolilo, bencisoxazol, quinolilo, isoquinolilo, quinazolilo, cinnolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo, y benzopirimidilo.

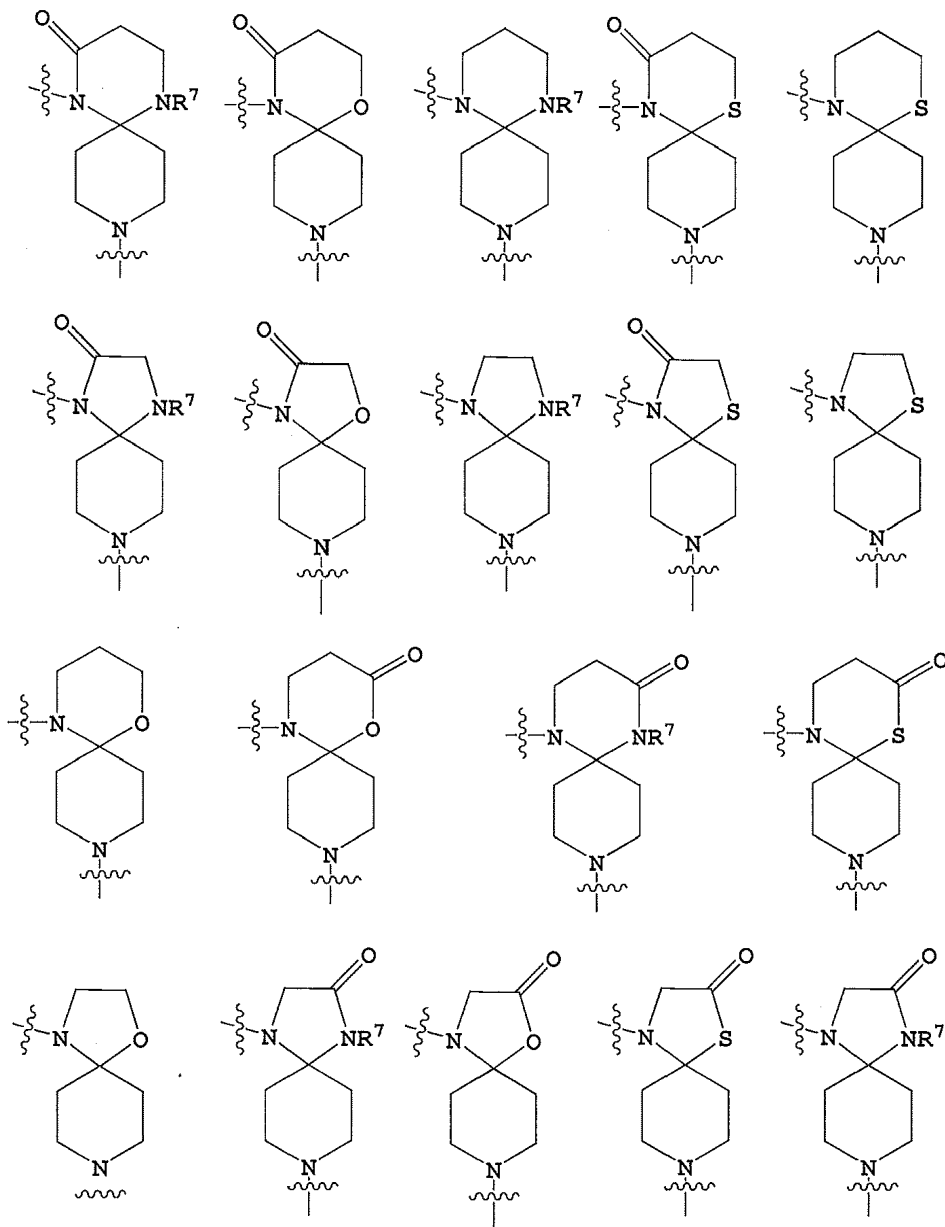
Un grupo arilo o heteroarilo de anillo único ilustrativo de un grupo círculo **A** o de un sustituyente del círculo **A**, MAr, se selecciona del grupo que consiste de grupos fenilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, triazinilo (1,3,5-triazinilo, 1,2,4-triazinilo y 1,2,3-triazinilo), furanilo, tienilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo e isotiazolilo.

El fenilo, piridinilo y furanilo son un sistema de anillo aromático o heteroaromático preferido del círculo **A**, siendo más preferido el fenilo. El fenilo, piridinilo y furanilo también son grupos arilo o heteroarilo de anillo único preferidos, Ar, de un sustituyente MAr, siendo particularmente preferido el fenilo.

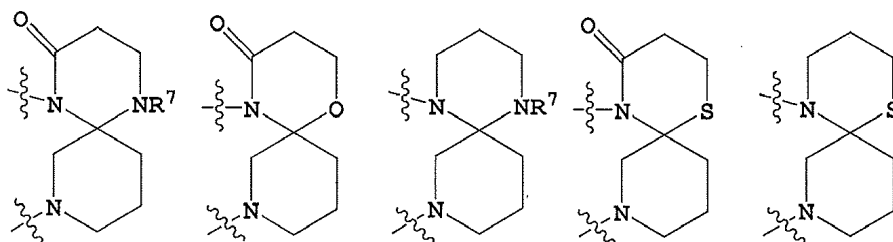
Desde un átomo de nitrógeno representado de los anillos espiro centrales hasta el sistema de anillo del círculo **A**, **X** e **Y** pueden formar un enlace sulfonamido (N-SO₂-círculo **A**), uno carboxamido [N-C(=O)-círculo **A**], uno urea [carbonildiimino; N-C(=O)-NH-círculo **A**], uno tiourea [tiocarbonildiimino; N-C(=S)-NH-círculo **A**], uno guanidino [N-C(=NH)-NH-círculo **A**] o aminometileno (N-CH₂-círculo **A**).

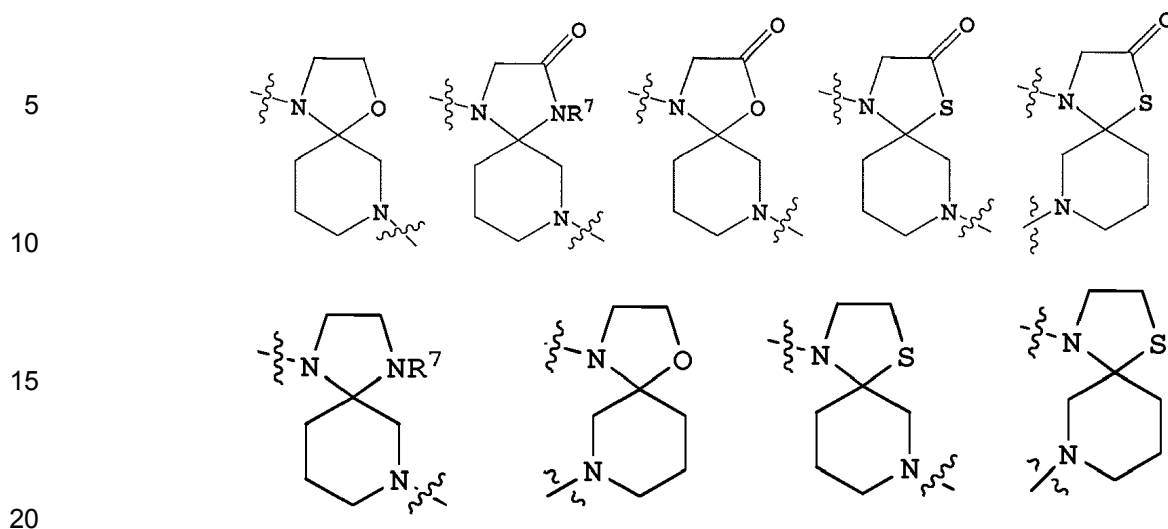
Examinando un compuesto de las fórmulas de la Serie C-2 anteriores más atentamente, se ve que esa fórmula define un compuesto espiro sustituido de doble anillo que puede tener dos anillos de seis miembros o un anillo de seis y uno de cinco miembros, como cuando uno de "m" y "n" es uno y el otro cero. Uno de esos anillos (el anillo inferior en las fórmulas) contiene un átomo de nitrógeno en el anillo de 6 miembros y los átomos restantes del anillo son carbonos. El anillo que puede contener átomos de 5 o 6 anillos (anillo superior en las fórmulas) puede

contener un nitrógeno y cuatro o cinco carbonos en el anillo, o dos nitrógenos, un nitrógeno y un azufre o un átomo de nitrógeno y uno de oxígeno junto con tres o cuatro carbonos de anillo. Los anillos de espiro centrales ilustrativos se muestran a continuación, donde se utilizan líneas onduladas para indicar la presencia de enlaces covalentes a otras entidades, y donde R^7 se define arriba y R^8 es H para mayor claridad.



Los compuestos ilustrativos de la Fórmula A de la Serie C-2 en la que d y e son cada uno cero y R^{11} , R^{12} y R^{13} son cada uno H tienen estructuras de anillo espiro asimétricas, algunas de las cuales se muestran a continuación con líneas onduladas que indican la presencia de enlaces covalentes para otras entidades, y R^7 se define arriba y R^8 es nuevamente H para mayor claridad.





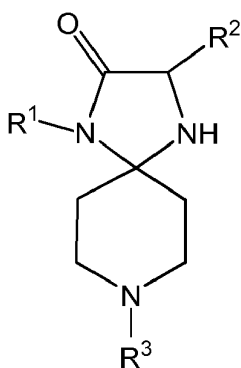
En la práctica preferida para los compuestos de la Serie C-2, el anillo central es un sistema de anillo 5,6 espiro cuyo anillo de 6 miembros no está sustituido y en el que los enlaces espiro están en la posición 4 en relación al nitrógeno del anillo de 6 miembros. Se prefiere por separado que **W** sea O, S o NR⁷. También se prefiere que **X** sea SO₂ (sulfonilo).

El sustituyente aromático, el círculo **A**, está ligado a un átomo de nitrógeno de los anillos espiro por un grupo **X** que es SO₂, C(O), CH₂, CD₂, OC(=O), NHC(=NH), NHC(=S) o NHC(=O), preferiblemente SO₂, C(O), CH₂, o CD₂, y lo más preferiblemente CH₂ y SO₂. El sustituyente aromático resultante está enlazado de este modo a la porción de anillo espiro mediante un enlace sulfonamida, amida, metileno, urea, tiourea o guanidino. Se prefieren los puentes de aril sulfonamida, puentes de aril amida y puentes de fenilmetileno (compuestos de bencilo), siendo particularmente preferidos la arilsulfonamida y el fenilmetileno.

Muchos de los compuestos de la Serie C-2, así como compuestos como la naloxona y la naltrexona, no solo se unen al péptido de la SEQ ID NO: 1, sino que también se unen a MOR y activan o estimulan ese receptor. La naloxona y la naltrexona se unen a MOR aproximadamente 200 veces más pobremente que cuando se unen al pentapéptido de la SEQ ID NO: 1. Las tablas del Ejemplo 2 ilustran las capacidades de unión relativas de compuestos ejemplares de la Serie C-2 en base a la actividad estimuladora de MOR.

En algunas realizaciones, se prefiere que un compuesto útil en un método contemplado se una bien y active MOR. En esos casos, se prefiere que el compuesto se una a MOR en una extensión de por lo menos aproximadamente ± 20 por ciento, así como DAMGO a una concentración que se muestra en las tablas, indicando que el compuesto es un agonista completo para el receptor. En otras realizaciones, se prefiere que un compuesto útil en la presente no se una bien a MOR. En esas realizaciones, se prefiere que el compuesto muestre menos de aproximadamente el 80 por ciento de la estimulación de MOR proporcionada por DAMGO a la misma concentración y condiciones, hasta la unión/estimulación de cero. Los porcentajes de unión ilustrativos en presencia de las concentraciones indicadas de DAMGO se ilustran para compuestos ejemplares de la Serie C-2 en las tablas del Ejemplo 2, a continuación.

Un compuesto de 1,4,8-triazaspiro[4,5]-decan-2-ona de la Serie D corresponde en su estructura a la fórmula



en la que R¹ representa hidrógeno; un grupo alquilo lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; un grupo alqueno lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; un grupo alquino lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; un grupo arilo no sustituido o por lo menos monosustituido o un grupo heteroarilo no sustituido o por lo menos monosustituido, tales grupos arilo y heteroarilo pueden estar unidos a través de un grupo alqueno lineal o ramificado que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; o un grupo -C(=O)OR⁷ que puede estar unido a través de un grupo alqueno lineal o ramificado;

R² representa hidrógeno; un grupo alquilo lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; un grupo alqueno lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; un grupo alquino lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; un grupo arilo no sustituido o por lo menos monosustituido o un grupo heteroarilo no sustituido o por lo menos monosustituido, tales grupos arilo y heteroarilo pueden estar unido a través de un grupo alqueno lineal o ramificado que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace;

R³ representa un grupo -S(=O)₂-R⁴; un grupo -C(=S)NH-R⁵; o un grupo -C(=O)NH-R⁶;

R⁴ representa un grupo -NR¹⁰R¹¹; un grupo alquilo lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; un grupo alqueno lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; un grupo alquino lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; un grupo arilo no sustituido o por lo menos monosustituido o un grupo heteroarilo no sustituido o por lo menos monosustituido, tales grupos pueden unirse a través de un grupo alqueno lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace y puede condensarse con un sistema de anillo monocíclico no sustituido o por lo menos monosustituido; un grupo cicloalifático no sustituido o por lo menos monosustituido, que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un miembro del anillo y que puede unirse a través de un grupo alqueno lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace y que puede estar puenteado por un grupo alqueno lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido.

R⁵ representa un grupo alquilo lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; un grupo alqueno lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; un grupo alquino lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; un grupo arilo no sustituido o por lo menos monosustituido o un grupo heteroarilo no sustituido o por lo menos monosustituido, dicho grupo puede estar unido a través de un grupo alqueno lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido, que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; un grupo cicloalifático no sustituido o por lo menos monosustituido, que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un miembro del anillo o que puede estar unido a través de un grupo alqueno lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; un grupo -C(=O)OR⁸ o un grupo -C(=O)OR⁹, que puede, en cualquier caso, estar unido a través de un grupo alqueno lineal o ramificado;

R⁶ representa un grupo arilo no sustituido o por lo menos monosustituido o un grupo heteroarilo no sustituido o por lo menos monosustituido, tales grupos arilo y heteroarilo pueden estar unidos a través de un grupo alqueno lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; o por un grupo cicloalifático no sustituido o por lo menos monosustituido, que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un miembro del anillo o que puede estar unido a través de un grupo alqueno lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace;

R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰ y R¹¹ representan cada uno independientemente un grupo alquilo lineal o ramificado, un grupo alqueno lineal o ramificado, o un grupo alquino lineal o ramificado, o una sal fisiológicamente aceptable de los mismos.

Preferiblemente para un compuesto 1,4,8-triazaespiro[4,5]decan-2-ona correspondiente a la fórmula anterior, R¹ representa hidrógeno; un grupo alquilo C₁₋₁₀ lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; un grupo alqueno C₂₋₁₀ lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; un grupo alquino C₂₋₁₀ lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; un grupo arilo o grupo heteroarilo no sustituido o por lo menos monosustituido de cinco miembros a catorce miembros, que puede unirse mediante un grupo alqueno C₁₋₅ lineal o ramificado que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; un grupo -C(=O)OR⁷ que puede unirse mediante un grupo alqueno C₁₋₅ lineal o ramificado;

R² representa hidrógeno; un grupo alquilo C₁₋₁₀ lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que

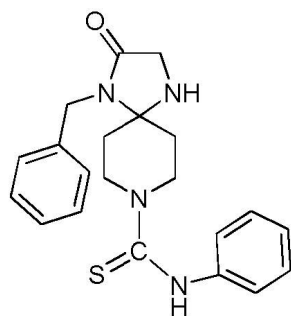
puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; un grupo alqueno C_{2-10} lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; un grupo alquino C_{2-10} lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; un grupo arilo o heteroarilo no sustituido o por lo menos monosustituido de cinco miembros a catorce miembros, que puede unirse a través de un grupo alqueno C_{1-5} lineal o ramificado que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace;

R^4 representa un grupo $NR^{10}R^{11}$; un grupo alquilo C_{1-10} lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; un grupo alqueno C_{2-10} lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; un grupo alquino C_{2-10} lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; un grupo arilo o heteroarilo no sustituido o por lo menos monosustituido de cinco miembros a catorce miembros, que puede unirse mediante un grupo alqueno C_{1-5} lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace y se puede condensar con un sistema de anillo monocíclico de cinco o seis miembros; un grupo cicloalifático C_{3-8} no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un miembro del anillo o que puede unirse a través de un grupo alqueno C_{1-5} lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace y que puede estar puentonado por un grupo alqueno $C_{sub.1-5}$ lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido; R^5 representa un grupo alquilo C_{1-10} lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; un grupo alqueno C_{2-10} lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; un grupo alquino C_{2-10} lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; un grupo arilo o heteroarilo no sustituido o por lo menos monosustituido de cinco miembros a catorce miembros, que puede estar unido a través de un grupo alqueno C_{1-5} lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido, que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un enlace; un grupo cicloalifático C_{3-8} no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un miembro del anillo y que puede estar unido a través de un grupo alqueno C_{1-5} lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido, que puede comprender por lo menos un heteroátomo como enlace; un grupo $-C(=O)OR^8$ o un grupo $-C(=O)OR^9$ cualquiera de los cuales puede estar unido a través de un grupo alqueno C_{1-10} lineal o ramificado;

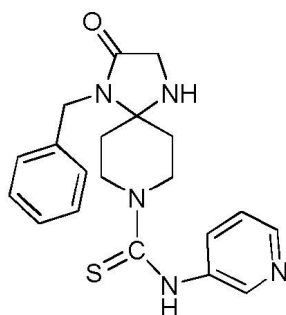
R^6 representa un grupo arilo o heteroarilo no sustituido o por lo menos monosustituido de cinco miembros a catorce miembros, tal grupo arilo o heteroarilo puede estar unido a través de un grupo alqueno C_{1-5} lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido, que puede comprender por lo menos un heteroátomo como enlace; un grupo cicloalifático C_{3-8} no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como un miembro del anillo, o que puede estar unido a través de un grupo alqueno C_{1-5} lineal o ramificado no sustituido o por lo menos monosustituido que puede comprender por lo menos un heteroátomo como enlace; y

R^7 , R^8 , R^9 , R^{10} y R^{11} , representan independientemente un grupo alquilo C_{1-5} lineal o ramificado, un grupo alqueno C_{2-5} lineal o ramificado, o un grupo alquino C_{2-5} lineal o ramificado.

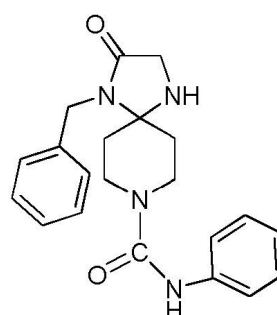
Los compuestos A, B y C cuyas fórmulas estructurales se muestran a continuación son compuestos ilustrativos.



Compuesto A



Compuesto B



Compuesto C

Composiciones Farmacéuticas

Un compuesto contemplado útil en la invención puede proporcionarse para su uso por sí mismo, o como una sal farmacéuticamente aceptable. Independientemente de si está en forma de una sal o no, una composición contemplada se disuelve o dispersa típicamente en un diluyente farmacéuticamente aceptable que forma una composición farmacéutica y a esa composición farmacéutica se administra al SNC y/u otras células.

Un compuesto contemplado puede usarse en la fabricación de un medicamento (composición farmacéutica)

que es útil por lo menos para inhibir la fosforilación de la proteína tau en células de mamíferos y en preparaciones de células de mamíferos. Un compuesto contemplado puede usarse en la fabricación de un medicamento que es útil por lo menos para inhibir la interacción de FLNA con $\alpha 7$ nAChR y TLR4, así como de $A\beta_{42}$ con $\alpha 7$ nAChR en células de mamíferos y preparaciones de células de mamíferos.

Una composición farmacéutica contemplada contiene una cantidad eficaz de un compuesto contemplado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo disuelta o dispersada en un portador fisiológicamente tolerable. Dicha composición puede administrarse a células de mamífero *in vitro* como en un cultivo celular, o *in vivo* como en un mamífero huésped vivo que lo necesita.

Una composición contemplada se administra típicamente una pluralidad de veces durante un período de días. Más habitualmente, una composición contemplada se administra una o dos veces al día. Se contempla que una vez que la administración de un compuesto contemplado haya comenzado, el compuesto se administrará crónicamente durante la duración del estudio que se esté llevando a cabo o durante la vida del receptor.

Un compuesto contemplado puede unirse a FLNA a una concentración de 100 femtomolar e inhibir eficazmente la liberación de citoquinas de astrocitos estimulados con LPS *in vitro*. Un compuesto contemplado se usa más habitualmente en cantidades picomolares a micromolares. Por tanto, una cantidad eficaz de un compuesto contemplado presente en una composición farmacéutica contemplada es la que proporciona una concentración de aproximadamente 100 femtomolar a aproximadamente micromolar a un torrente sanguíneo del animal huésped o a un medio celular *in vitro* en la puesta en práctica de un método contemplado de la divulgación. Una cantidad más habitual es de picomolar a micromolar. Una cantidad aún más habitual es de picomolar a nanomolar. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente un nivel de dosificación apropiado de un compuesto contemplado para inhibir una cantidad deseada de fosforilación de la proteína tau.

Una composición farmacéutica contemplada puede administrarse por vía oral (peroralmente), por vía parenteral, mediante pulverización por inhalación en una formulación que contiene portadores, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales, según se desee. El término parenteral como se usa en la presente incluye inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intraesternal o técnicas de infusión. La formulación de fármacos se trata, por ejemplo, en Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania; 1975 y Liberman, H.A. y Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, Nueva York, N.Y., 1980.

Para preparaciones inyectables, por ejemplo, pueden formularse suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o solvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que pueden emplearse se encuentran el agua, la solución de Ringer y solución de cloruro de sodio isotónica, solución salina tamponada con fosfato. Las composiciones farmacéuticas líquidas incluyen, por ejemplo, soluciones adecuadas para administración parenteral. Soluciones estériles en agua de un componente activo o solución estéril del componente activo en solventes que comprenden agua, etanol, o propilenglicol son ejemplos de composiciones líquidas para administración parenteral.

Además, se emplean convencionalmente aceites fijos estériles como un solvente o medio de suspensión. Con este propósito, puede emplearse cualquier aceite fijo insípido, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos como el ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables. Se pueden usar dimetil acetamida, surfactantes que incluyen detergentes iónicos y no iónicos, polietilenglicoles. También son útiles las mezclas de solventes y agentes humectantes como los expuestos anteriormente.

Las soluciones estériles pueden prepararse disolviendo el componente activo en el sistema solvente deseado, y luego pasando la solución resultante a través de un filtro de membrana para esterilizarlo o, alternativamente, disolviendo el compuesto estéril en un solvente previamente esterilizado bajo condiciones estériles.

Las formas de dosificación sólidas para administración oral pueden incluir cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, un compuesto contemplado se combina normalmente con uno o más excipientes apropiados para la vía de administración indicada. Si se administra por vía oral, los compuestos pueden mezclarse con lactosa, sacarosa, almidón en polvo, ésteres de celulosa de ácidos alcanoicos, alquil ésteres de celulosa, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y calcio de ácidos fosfóricos y sulfúricos, gelatina, goma acacia, alginato sódico, polivinilpirrolidona y/o alcohol polivinílico, y luego comprimirse o encapsularse para una administración conveniente. Tales cápsulas o comprimidos pueden contener una formulación de liberación controlada que se puede proporcionar en una dispersión de compuesto activo en hidroxipropilmetil celulosa. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes de tamponamiento como citrato de sodio, carbonato o bicarbonato de magnesio o calcio. Los comprimidos, cápsulas y píldoras pueden prepararse adicionalmente con recubrimientos

entéricos.

Un mamífero con necesidad de tratamiento y al que se le administra una composición farmacéutica que contiene un compuesto contemplado puede ser un primate como un ser humano, un simio como un chimpancé o un gorila, un mono como un mono cynomolgus o un macaco, un animal de laboratorio como una rata, un ratón o un conejo, un animal de compañía como un perro, un gato, un caballo o un animal para consumo como una vaca o novillo, una oveja, un cordero, un cerdo, una cabra, una llama o similares. Cuando se contempla el contacto de células de mamífero *in vitro*, se usa a menudo un cultivo de tejido del SNC de células de un mamífero ilustrativo, como se ilustra posteriormente en la presente.

Preferiblemente, la composición farmacéutica está en forma de dosificación unitaria. En tal forma, la composición se divide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del agente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación envasada, el envase conteniendo cantidades discretas de la preparación, por ejemplo, en viales o ampollas.

Varios compuestos contemplados útiles son aminas y pueden usarse típicamente en forma de una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable derivada de un ácido inorgánico u orgánico. Las sales ejemplares incluyen, pero no están limitadas a, las siguientes: acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, canforato, canforsulfonato, digluconato, ciclopentanopropionato, dodecilsulfato, etanosulfonato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, fumarato, clorhidrato, bromhidrato, hidroyoduro, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, nicotinato, 2-naftalensulfonato, oxalatoato, palmoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropinato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato, mesilato y undecanoato.

Otros compuestos útiles en esta invención que contienen funcionalidades de ácido también pueden formar sales con una base. Las bases ilustrativas incluyen bases amina como mono-, di- y tri-alquilo C₁-C₄ o aminas de hidroxialquilo como trietilamina, dimetilamina, 2-hidroxietilamina, y dimetil-2-hidroxietilamina, y bases como hidróxidos de alquil C₁-C₆ amonio cuaternarios de metales alcalinos, metales alcalinotérreos, como hidróxidos de sodio, potasio, calcio, magnesio y tetrametilamonio. También se contemplan sales básicas como carbonatos y fosfatos de amonio de metales alcalinos o metales alcalinotérreos.

Se dirige al lector a Berge, J. Pharm. Sci. 68(1):1-19 (1977) para listas de ácidos y bases farmacéuticamente aceptables usados comúnmente que forman sales farmacéuticamente aceptables con compuestos farmacéuticos.

En algunos casos, las sales también pueden usarse como ayuda en el aislamiento, purificación o resolución de los compuestos de esta invención. En tales usos, el ácido usado y la sal preparada no necesitan ser farmacéuticamente aceptables.

Exposición

La siguiente exposición ilustra los compuestos y composiciones que contienen uno o más de esos compuestos que se unen a la proteína FLNA de andamiaje, y en particular el sitio de unión del pentapéptido VAKGL (SEQ ID NO: 1) presente en la proteína FLNA, e inhiben la fosforilación de la proteína tau. Algunos compuestos de tales composiciones también interrumpen la señalización tóxica de amiloide- β_{42} ($A\beta_{42}$), así como reducen la inflamación provocada por tanto $A\beta_{42}$ como la neurodegeneración en curso. Estos compuestos disminuyen muchos aspectos de la patología similar a la EA, incluyendo los deterioros en el funcionamiento normal del receptor.

Los estudios iniciales se llevaron a cabo con los Compuestos A0033, A0040, A0053, A0068, B0055, C0105, C0114, C0137 y C0138 como ilustrativos o ejemplares. También se llevaron a cabo estudios adicionales usando los Compuestos C0134, el Compuesto A, el Compuesto B y el Compuesto C. Los resultados mostrados en las Figuras y tratados en la presente a continuación son indicativos de la generalidad de los resultados obtenidos usando estos compuestos estructuralmente muy diferentes. Los resultados iniciales indicaron que los compuestos parecen estar oralmente disponibles y ser bien tolerados porque se produjeron niveles notables de plasma y SNC, pero se observaron efectos secundarios despreciables a 2 g/kg administrados por vía oral en ratas. Esos resultados también indicaron actividades similares entre los nueve compuestos, con los compuestos C0105 y C0114 siendo usados para estudios adicionales debido a su alta actividad, facilidad de síntesis, solubilidad y ausencia de enantiómeros.

El hecho de que la unión de $A\beta_{42}$ bloquea la afluencia de Ca^{+2} por $\alpha 7nAChRs$ [Wang et al., J Neurosci 35:10961-10973 (2009); Wang et al., Biol Psychiatry 67:522-530 (2010)] sugiere que puede tener lugar un cambio conformacional en $\alpha 7nAChR$ en la interfaz entre los dominios extracelular y transmembrana, el área que gobierna la apertura/desensibilización del canal [Bouzat et al., J Neurosci 28:7808-7819 (2008)]. Este cambio conformacional expone probablemente una región transmembrana rica en carga positiva cerca del sitio de unión de $A\beta_{42}$. FLNA se une a esta carga positiva para estabilizar la $A\beta_{42}$ unido y la unión adicional de péptidos de $A\beta_{42}$, llevando a una eventual internalización de los complejos $A\beta_{42}$ - $\alpha 7nAChR$ [(Nagele et al., Neuroscience 110:199-211 (2002)). La

interrupción del compuesto C0105 de la interacción FLNA- $\alpha 7$ nAChR detiene la señalización patológica y detiene la el anclaje de alta afinidad de $A\beta_{42}$ al receptor.

Usando cultivos de cortes frontocorticales organotípicos de ratas adultas, se muestra que la señalización de $A\beta$ a través del receptor de acetilcolina nicotínico $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR) requiere el reclutamiento de FLNA. Al unirse a un segmento de pentapéptido crítico de FLNA, estos compuestos bloquean la asociación FLNA- $\alpha 7$ nAChR y la cascada de señalización de $A\beta_{42}$. En los cultivos de cortes frontocorticales organotípicos tratados con $A\beta_{42}$ ilustrativos, los Compuestos ejemplares C0105 y C0114 reducen cada uno por separado drásticamente la fosforilación de tau en los tres sitios de fosforilación de tau encontrados en los ovillos neurofibrilares (Figs. 4D, 6B y 6C), y restauran completamente el funcionamiento normal de $\alpha 7$ nAChR y los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDAR) en sentido descendente, críticos para el aprendizaje y la memoria.

Además, como indicativo de la resistencia a la insulina común en los pacientes con EA [Neumann et al., Curr Alzheimer Res 5:438-447 (2008)], también se restauró la función de los IR emparejados con $A\beta_{42}$ en los cultivos de cortes ilustrativos por cada uno de los Compuestos ejemplares C0105 y C0114 (Fig. 5B). Estos compuestos, con un nuevo mecanismo de interrupción de la señalización tóxica de $A\beta_{42}$, confieren una restauración de múltiples disfunciones inducidas por $A\beta_{42}$. Además, la desactivación de la señalización de $\alpha 7$ nAChR inducida por $A\beta$ sin afectar directamente a $\alpha 7$ nAChRs evita la alteración de la sensibilidad o el nivel de la superficie celular de los receptores, un problema insidioso con el uso de agonistas o antagonistas de receptores crónicos.

En un modelo de ratón de infusión de ICV $A\beta_{42}$ de la enfermedad de Alzheimer, el Compuesto C0105 redujo en gran medida la fosforilación de la tau, múltiples deterioros en la señalización inducidos por $A\beta_{42}$, la liberación de citoquinas inflamatorias, así como los ovillos neurofibrilares y los agregados de $A\beta_{42}$. El Compuesto ilustrativo C0105 logró todos estos efectos mediante su unión de alta afinidad a FLNA. $A\beta_{42}$ aumenta drásticamente la asociación de FLNA con $\alpha 7$ nAChR para permitir su unión y señalización tóxica a través de este receptor, y el Compuesto C0105 ilustrativo previno esta cascada.

El efecto antiinflamatorio del Compuesto C0105 se produce por una interrupción similar de la asociación de FLNA inducida por $A\beta_{42}$ con TLR4. $A\beta_{42}$ aumenta la asociación de FLNA con TLR4, y esta asociación parece ser crítica para la producción de citoquinas inflamatorias debido a la exposición a $A\beta_{42}$, porque el Compuesto C0105 ilustrativo casi elimina la producción de citoquinas. Aunque $A\beta_{42}$ no interactúa con TLR4, $A\beta_{42}$ se une a CD14, que a su vez se une a TLR4 para producir la inflamación observada en la EA [Reed-Geaghan et al., J. Neurosci. 29(38):11982-11992 (23 de septiembre de 2009)].

La normalización de la función de $\alpha 7$ nAChR, NMDAR e IR ilustra además el amplio espectro de beneficios de un compuesto contemplado como el Compuesto C0105 como un agente terapéutico potencial para la EA. Aunque los NMDAR están en sentido descendente de $\alpha 7$ nAChR y probablemente están comprometidos como resultado directo de la señalización tóxica de $A\beta_{42}$ a través de $\alpha 7$ nAChR, los IR no están directamente en sentido descendente de $\alpha 7$ nAChR en las redes neuronales. Además, aunque FLNA interactúa con el IR, esta interacción no cambia con $A\beta_{42}$ o el Compuesto C0105. Sin embargo, el $A\beta_{42}$ deteriora la señalización IR, y un compuesto contemplado como el Compuesto C0105 restaura esa señalización, sugiriendo también un efecto terapéutico en este componente de EA.

El pensamiento actual señala a la necesidad de varios enfoques simultáneos diferentes para tratar la EA. Con su multitud de efectos terapéuticos y su nuevo objetivo, un compuesto contemplado como el Compuesto C0105 tiene un gran potencial como un agente terapéutico modificador de la enfermedad para la EA.

Muchos en el campo creen que las toxicidades de $A\beta_{42}$ en la EA así como en el deterioro cognitivo leve de la demencia senil se deben a su capacidad de señalización a través de $\alpha 7$ nAChR. Esta señalización tóxica activa ERK2 y fosforila tau, un componente crítico de los NFT. Los nuevos compuestos de unión a FLNA presentados aquí suprimen potentemente la señalización de $A\beta_{42}$ a través de $\alpha 7$ nAChR a concentraciones nanomolares (nM) o sub-nM. Estos compuestos logran este bloqueo de la señalización previniendo la asociación aumentada de FLNA con $\alpha 7$ nAChR provocada por $A\beta_{42}$. Específicamente, su unión puede alterar la conformación de FLNA para que no sea reclutada por el receptor.

Además, la desactivación de esta interacción también parece disminuir la afinidad de unión de $A\beta_{42}$ a $\alpha 7$ nAChR, como se muestra por la unión disminuida de FITC- $A\beta_{42}$ en presencia de un compuesto contemplado como los compuestos C0105 o C0114. El bloqueo resultante de la señalización se evidenció por la activación de ERK2 disminuida y la fosforilación de tau disminuida en los tres sitios de fosforilación de tau encontrados en NFT en cerebros con EA.

Además de interrumpir la asociación FLNA- $\alpha 7$ nAChR que aumenta con $A\beta_{42}$, los Compuestos ilustrativos C0105 y C0114 evitan una asociación inducida por $A\beta_{42}$ de FLNA con TLR4 (Fig. 5), el receptor inmune responsable de la liberación de citoquinas. Esta asociación, junto con la neurodegeneración en curso, puede impulsar la inflamación masiva en los cerebros con EA, [Lee et al., Arch Pharm Res 33:1539-1556 (2010)] y su interrupción es el

mecanismo de acción probable para los efectos antiinflamatorios de nuestros compuestos de unión a FLNA [Burns et al., Recent Patents on CNS Drug Discovery 5:210-220 (2010)].

La actividad antiinflamatoria del Compuesto C0105 ilustrativo se demostró en un modelo de ratón con infusión de ICV A β ₄₂ de EA. Los niveles de IL-6, TNF- α e IL-1 β disminuyeron en un 80-100% en ratones que recibieron C0105. Además, los resultados anteriores mostraron que otros compuestos que se unen a la misma región de pentapéptido de FLNA disminuyeron drásticamente la liberación de citoquinas inflamatorias de los astrocitos humanos primarios estimulados con LPS [Burns et al., Recent Patents on CNS Drug Discovery 5:210-220 (2010)]. Una propiedad antiinflamatoria debería ser un gran beneficio en un agente terapéutico para la EA.

El hecho de que un compuesto contemplado como los Compuestos C0105 y C0114 también restablezca el funcionamiento normal del NMDAR en sentido descendente (Fig. 8) y el IR sugiere que los beneficios de evitar la señalización de A β a través del α 7nAChR no están aislados para la salud de α 7nAChRs, sino que pueden ser el punto crítico de la patogénesis en la EA. Debido a que la señalización NMDAR es esencial para la potenciación a largo plazo (LTP) y, por lo tanto, el aprendizaje y la memoria, mantener el funcionamiento normal de este sistema neurotransmisor es crucial para preservar la memoria en la EA.

La razón por la que estos compuestos preservan la función de IR sigue siendo especulativa ya que el enlace FLNA-IR no se ve afectado por A β ₄₂, ni por estos compuestos, y porque los IR no están directamente en sentido descendente de α 7nAChRs. Sin embargo, preservar la sensibilidad de los IR a la insulina (Fig. 10) representa un beneficio divergente de prevenir la señalización tóxica de A β a través de α 7nAChR en patología de la EA. Además, los compuestos de unión a FLNA presentados aquí representan un enfoque nuevo y quizás más seguro para prevenir esta señalización tóxica sin antagonizar o desensibilizar directamente el receptor.

Además, su eficacia a bajas concentraciones de nM indica una ventana grande para la eficacia terapéutica. Adicionalmente, la capacidad de eliminar A β unido de α 7nAChRs disminuyendo la afinidad normalmente alta al receptor [Wang et al., J Biol Chem 275:5626-5632 (2000)] sugiere que un compuesto contemplado puede ser eficaz no solo para prevenir la EA sino también puede proporcionar cierta recuperación cognitiva y ayudar a detener una degeneración adicional en etapas posteriores de EA.

La administración intraperitoneal dos veces al día a ratones E129 con 10 mg/kg del Compuesto ilustrativo C0105 redujo en gran medida los aumentos inducidos por A β ₄₂ en las asociaciones de FLNA tanto con α 7nAChR como con TLR4, suprimió la fosforilación de tau en los tres sitios de fosforilación de tau que se encuentran en los ovillos neurofibrilares, redujo el nivel de complejos A β ₄₂- α 7nAChR, previno los deterioros funcionales inducidos por A β ₄₂ en la señalización de α 7nAChR, NMDAR y IR, y suprimió los niveles de citoquinas inflamatorias (Figs. 14-24). El Compuesto ilustrativo C0105 logró todos estos efectos a través de su unión de alta afinidad a FLNA. A β ₄₂ aumenta drásticamente la asociación de FLNA con α 7nAChR para permitir su unión y señalización tóxica a través de este receptor.

Resultados Específicos

Acoplamiento de α 7nAChR-FLNA aumentado en la corteza frontal de ratones transgénicos con EA y pacientes con EA

La incubación de sinaptosomas con A β ₄₂ *in vitro* aumenta el acoplamiento de α 7nAChR a una proteína de andamiaje con una masa molecular de 300 KDa, que se sospechaba que era FLNA. Aunque se sabe que FLNA se acopla con muchas proteínas receptoras, estos datos son los primeros en revelar la conexión α 7nAChR - FLNA y sugiere que la EA, con cargas de A β ₄₂ elevadas, puede tener acoplamiento de α 7nAChR - FLNA aumentado. Esta hipótesis se probó directamente en sinaptosomas preparados a partir de cortezas frontales de ratones transgénicos y de tipo salvaje con EA de 6 meses de edad, así como parejas humanas de control con EA ajustadas estrechamente para la edad y los retrasos postmortem.

Los datos presentados en la Fig. 1 muestran un aumento de 3 veces en la abundancia de complejos α 7nAChR-FLNA en la corteza frontal tanto de ratones transgénicos con EA como de pacientes con EA. Debido a que se sabe que FLNA regula la señalización de sus receptores asociados, los aumentos en la asociación de α 7nAChR - FLNA inducida por A β ₄₂ pueden estar relacionados con la señalización de α 7nAChR provocada por A β ₄₂ y la fosforilación de tau. Por tanto, los compuestos que reducen la asociación de α 7nAChR - FLNA provocada por A β ₄₂ pueden reducir la patología neurofibrilar en la EA.

ex vivo en Sinaptosomas

Compuestos de unión a FLNA de alta afinidad reducen la asociación de α 7nAChR-FLNA inducida por A β ₄₂, la activación de ERK2 y la fosforilación de tau *ex vivo* en sinaptosomas

Se analizaron nueve compuestos de unión a FLNA de alta afinidad [A0033, A0040, A0053, A0068, B0055,

C0105, C0114, C0137 y C0138] para determinar si podrían interrumpir la asociación de FLNA y $\alpha 7$ nAChR en sinaptosomas preparados a partir de cortes frontales de ratas adultas. Los sinaptosomas se expusieron a $A\beta_{42}$ 100 nM durante 30 minutos, y con compuestos de 0,1 o 1 μ M añadidos o simultáneamente o 10 minutos antes. Los controles fueron un vehículo (no $A\beta_{42}$) y una condición de $A\beta_{42}$ solo.

La Fig. 2 muestra las transferencias Western de los nueve compuestos analizados, más (+)naloxona (NLX), así como la cuantificación de las transferencias para los cuatro compuestos más activos. Los cuatro de esos compuestos redujeron la asociación de $\alpha 7$ nAChR-FLNA con una preincubación de 10 minutos, y el Compuesto C0105 también redujo marcadamente este acoplamiento con administración simultánea.

Para evaluar la señalización de $A\beta_{42}$ a través de $\alpha 7$ nAChR después de la administración del compuesto, se midieron los niveles de ERK2 fosforilado en las mismas preparaciones de sinaptosomas tratadas con $A\beta_{42}$ y compuestos. La fosforilación de ERK2 indica su activación, lo que lleva a la fosforilación de tau. En comparación con la condición de control, $A\beta_{42}$ activa fuertemente ERK2, y esta activación se suprime en gran medida por los cuatro compuestos a 0,1 y 1 nM con un pretratamiento de 10 minutos, y también por el Compuesto C0105 con tratamiento simultáneo (Fig. 3).

Lo siguiente que se evaluó fue si los compuestos de unión a FLNA también disminuyen la fosforilación de tau, un efecto en sentido descendente de la unión de $A\beta_{42}$ a $\alpha 7$ nAChR y la activación de ERK2. Se examinaron los tres sitios de fosforilación principales en la proteína tau para determinar sus niveles de fosforilación en comparación con el contenido de proteína tau total. Tau, fosforilada en estos tres sitios, es un componente de las NFT. Consistente con los efectos sobre la asociación de FLNA- $\alpha 7$ nAChR y la activación de ERK2, todos los compuestos de unión a FLNA ensayados, con preincubación de 10 minutos, disminuyeron la fosforilación inducida por $A\beta_{42}$ de tau en los tres sitios (Fig. 4).

Los compuestos C0105 y C0114 disminuyen la unión de FITC- $A\beta_{42}$ a las fracciones de membrana que contienen $\alpha 7$ nAChR y FLNA

Usando fragmentos de células SK-N-MC que contienen $\alpha 7$ nAChR biotinilados, se añadieron compuestos y FITC- $A\beta_{42}$ simultáneamente y se incubaron a 30° C durante 30 minutos. El compuesto C0105 a una concentración de 0,1, 1 y 10 nM inhibió la unión de FITC- $A\beta_{42}$ en $52,3 \pm 3,7\%$, $55,1 \pm 3,0\%$ y $56,5 \pm 4,2\%$, respectivamente. El Compuesto C0114 fue menos eficaz, disminuyendo la unión de FITC- $A\beta_{42}$ en $27,8 \pm 3,3\%$, $40,0 \pm 2,1\%$ y $53,4 \pm 3,6\%$ a estas tres concentraciones. Estos datos sugieren que al unirse al FLNA y probablemente cambiar su conformación, el Compuesto ilustrativo C0105 y, en menor medida, el Compuesto C0114, pueden afectar a la afinidad de la unión de $A\beta_{42}$ a $\alpha 7$ nAChR.

Las asociaciones de FLNA- $\alpha 7$ nAChR/TLR4 y $A\beta_{42}$ - $\alpha 7$ nAChR aumentan en linfocitos de EA

Debido a que los linfocitos contienen $\alpha 7$ nAChR y TLR4, se evaluó si las asociaciones de estos receptores con FLNA aumentan en los linfocitos de pacientes con EA y si el tratamiento con el compuesto C0105 *ex vivo* podría interrumpir estas asociaciones. También se analizó el efecto del Compuesto C0105 sobre los complejos $A\beta_{42}$ - $\alpha 7$ nAChR en linfocitos de EA y linfocitos tratados con $A\beta_{42}$ de sujetos de control emparejados por edad.

Las asociaciones de FLNA con $\alpha 7$ nAChR y con TLR4 aumentaron drásticamente en EA y los linfocitos de control tratados con $A\beta_{42}$ en comparación con los linfocitos de control tratados con vehículo. Además, el nivel de complejos $A\beta_{42}$ - $\alpha 7$ nAChR se elevó en EA o los linfocitos de control tratados con $A\beta_{42}$. La incubación con Compuesto 1 nM C0105 durante 30 minutos redujo significativamente las asociaciones aumentadas con FLNA y el nivel de complejos $A\beta_{42}$ - $\alpha 7$ nAChR.

Estudios en cultivos de cortes de cerebro frontocortical organotípicos de ratas adultas

Los compuestos C0105 y C0114 reducen la asociación de FLNA inducida por $A\beta_{42}$ tanto con $\alpha 7$ nAChR como con TLR4

Se incubaron cortes cerebrales frontocorticales organotípicos de ratas adultas durante 16 horas con $A\beta_{42}$ 100 nM y con el Compuesto C0105 o C0114 ilustrativo, añadidos simultáneamente. El tejido se recogió y se solubilizó, y se usó un anticuerpo específico contra FLNA para inmunoprecipitar FLNA y las proteínas asociadas. El inmunoprecipitado de FLNA se fraccionó por tamaño utilizando SDS-PAGE, se transfirió y se sondó con anticuerpos específicos dirigidos contra cada uno de los siguientes receptores: $\alpha 7$ nAChR, TLR4, IR y MOR. $A\beta_{42}$ (100 nM) provocó un aumento en la asociación de FLNA tanto con $\alpha 7$ nAChR como con TLR4, pero no con IR o MOR (Fig. 5). El compuesto C0105 redujo el aumento inducido por $A\beta_{42}$ en la asociación FLNA- $\alpha 7$ nAChR a 0,1, 1 y 10 nM, y redujo el aumento en FLNA-TLR4 a 1 y 10 nM. El compuesto C0114, probado solo a 1 y 10 nM, redujo la asociación FLNA- $\alpha 7$ nAChR en ambas concentraciones y la asociación FLNA-TLR4 a 10 nM.

Los compuestos C0105 y C0114 reducen la fosforilación de tau inducida por $A\beta_{42}$

En los cultivos de cortes de cerebro frontocorticales organotípicos tratados simultáneamente con A β ₄₂ y cualquiera de los Compuestos C0105 o C0114, las tres concentraciones del Compuesto C0105 y ambas concentraciones del Compuesto C0114 redujeron la fosforilación de tau en los tres sitios de fosforilación de tau que se encuentran en los ovillos neurofibrilares (Fig. 6).

Los compuestos C0105 y C0114 restauran el deterioro en la función α 7nAChR inducida por A β ₄₂

El funcionamiento normal de α 7nAChR está comprometido por A β ₄₂, como lo indica la afluencia de calcio reducida después de estimular el receptor con un agonista completo (PNU282987; N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il]-4-clorobenzamida). Ambos Compuestos **C0105** y C0114 restauraron el funcionamiento de este receptor, con 1 y 10 nM de Compuesto C0105 con función de restauración completa (Fig. 7).

Los compuestos C0105 y C0114 restauran el deterioro en la función de NMDAR inducida por A β ₄₂

Similar a la evaluación de la función de α 7nAChR después de la exposición a A β ₄₂, la función de NMDAR se evaluó midiendo la afluencia de calcio después de la estimulación con el co-agonista, glicina y NMDA. El deterioro inducido por A β ₄₂ fue completamente prevenido por 1 y 10 nM de Compuesto C0105, con 0,1 nM de los compuestos C0105 y C0114 también restaurando significativamente la función de NMDAR (Fig. 8).

También se evaluó la disfunción de NMDAR midiendo los niveles de seis moléculas de señalización diferentes (nNOS, PLC γ 1, PKC γ , pY⁴⁰²PyK2, pY⁴¹⁶Src y PSD-95) en asociación con la subunidad de NMDAR obligatoria, NR1, después de la estimulación con NMDA y glicina. NMDA con glicina intensificó la asociación de NMDAR con PSD-95, aumentó el reclutamiento de nNOS, PLC γ 1 y PKC γ a complejos NMDAR y elevó los niveles de PyK2 activo (pY⁴⁰²PyK2) y Src (pY⁴¹⁶Src) en la condición de control del vehículo; todas estas elevaciones se vieron gravemente comprometidas por A β ₄₂ (Fig. 9). Ambos Compuestos C0105 y C0114 restauraron completamente la función como lo demuestran las restauraciones completas en los niveles de estas moléculas con el receptor.

Los compuestos C0105 y C0114 restauran el deterioro en la función de IR inducida por A β ₄₂

Un tercer receptor examinado, el IR, también mostró una disfunción inducida por A β ₄₂ (Fig. 10). En la condición del vehículo, después de la estimulación por el agonista (insulina) del receptor, la asociación de la proteína adaptadora para la molécula de señalización en sentido descendente IRS-1 con IR (detectado por inmunoprecipitación con un anticuerpo para IR β) aumenta y el nivel de IR activado como se indica por el IR β fosforilada, pY^{1150/1151}IR β . Con la exposición a A β ₄₂, los niveles tanto de la asociación de IRS-1 y la pY^{1150/1151}IR β se reducen drásticamente, indicando una desensibilización del receptor o una resistencia a la insulina. A pesar de la observación de que la asociación IR-FLNA no se ve afectada por A β ₄₂ ni por los compuestos estudiados aquí, cada uno de los Compuestos C0105 y C0114 normalizó los deterioros de señalización inducidos por la exposición a A β ₄₂.

Los compuestos C0105 y C0114 previenen la muerte celular inducida por A β ₄₂ como lo indica la afluencia de calcio provocada por K⁺

Una indicación de células no funcionales o moribundas es su incapacidad para despolarizar y dejar entrar el calcio. Por lo tanto, para medir la muerte celular o la no funcionalidad en los cultivos de cortes, el afluencia de calcio se midió en respuesta a la despolarización provocada por K⁺. La afluencia de calcio se redujo en gran medida por A β ₄₂, y esta reducción se invirtió completamente con 1 y 10 nM de compuesto C0105 y con 10 nM de compuesto C0114 (Fig. 11). Las concentraciones más bajas del compuesto C0105 (0.1 nM) y del Compuesto C0114 (1 nM) también fueron muy eficaces para prevenir la muerte celular.

El compuesto C0105 reduce drásticamente la inmunotinción para depósitos de NFT y A β ₄₂

La inmunohistoquímica usando anticuerpos contra pTau y A β ₄₂, respectivamente, muestra que la administración del compuesto C0105 reduce drásticamente tanto la NFT (Fig. 12) como los agregados de A β ₄₂ (Fig. 13) en cultivos de cortes cerebrales frontocorticales organotípicos incubados con A β ₄₂.

Modelo de ratón de infusión de ICV A β ₄₂

En un modelo de ratón de infusión de A β ₄₂ intracerebroventricular (ICV) de la enfermedad de Alzheimer, la A β ₄₂ incrementó drásticamente la asociación de FLNA tanto con α 7nAChR como con TLR4, provocó la fosforilación de tau en los tres sitios de fosforilación de tau en los ovillos neurofibrilares y la señalización deteriorada de α 7nAChR, NMDAR e IR. El tratamiento sistémico dos veces al día con 10 mg/kg de Compuesto C0105 redujo marcadamente estos efectos de la infusión de A β ₄₂. El compuesto C0105 redujo los aumentos inducidos por A β ₄₂ en las asociaciones de FLNA con α 7nAChR y TLR4 (Fig. 14), lo que sugiere una reducción en la señalización mediada por A β ₄₂ de estos dos receptores.

El tratamiento con el compuesto C0105 suprimió la fosforilación de tau en los tres sitios de fosforilación (Fig. 15), indicando de nuevo que la señalización de A β ₄₂ a través de α 7nAChR está interrumpida. La unión de alta afinidad del compuesto C0105 a FLNA parece reducir la señalización de A β ₄₂ a través de α 7nAChR reduciendo la unión de A β ₄₂ a α 7nAChR: el nivel de estos complejos A β ₄₂- α 7nAChR se reduce en los animales tratados con C0105 (Fig. 16).

La disfunción inducida por A β ₄₂ de α 7nAChR se ilustró mediante la afluencia de calcio después de la estimulación de α 7nAChR con su agonista completo PNU282987. La reducción inducida por A β ₄₂ en esta afluencia de calcio se normalizó en los animales tratados con el Compuesto C0105 (Fig. 17). De igual manera, la función de NMDAR descendente también se vio deteriorada por la infusión de ICV A β ₄₂, ilustrada por la afluencia de calcio después de la coestimulación con NMDA y glicina (Fig. 18). De nuevo, el tratamiento con Compuesto C0105 restauró la disfunción de NMDAR inducida por A β ₄₂. La afluencia de calcio después de la despolarización por K⁺ se usó para evaluar la disfunción celular total o las células moribundas. La infusión de ICV A β ₄₂ redujo en gran medida esta afluencia de calcio provocada por K⁺, y el tratamiento con C0105 lo restauró (Fig. 19).

Que el tratamiento con el Compuesto C0105 puede revertir la disfunción de NMDAR también se evidencia midiendo la señalización de NMDAR. Los ratones infundidos con A β ₄₂ mostraron reducciones en la activación inducida por NMDA/glicina (fosforilación) y en el reclutamiento a NMDAR de seis componentes de señalización. El tratamiento con compuesto C0105 de ratones infundidos con ICV A β ₄₂ produjo resultados prácticamente idénticos.

El deterioro de la señalización de NMDAR también se evaluó mediante niveles de seis componentes de señalización (PLC γ , nNOS, pY⁴⁰²PyK2, PSD-95, PKC γ , pY⁴¹⁶Src y NR1) co-inmunoprecipitando con NR-1, la subunidad obligatoria de NMDAR, después de co-estimulación con NMDA y glicina. A β ₄₂ redujo los niveles de las seis moléculas de señalización, y éstas se normalizaron mediante el tratamiento con C0105 (Fig. 20). De manera similar, la señalización de IR se evaluó mediante la fosforilación de IP β y su asociación con la molécula de señalización IRS-1 después de la estimulación con insulina. Al igual que la señalización de NMDAR, estas medidas se redujeron con A β ₄₂ y se restauraron con el tratamiento con C0105 (Fig. 21).

De manera importante, debido a que la asociación de FLNA con TLR4 aumenta con A β ₄₂ y se normaliza con el Compuesto C0105, se evaluó si la liberación de citoquinas inflamatorias después de la infusión de ICV A β ₄₂ se suprimiría con el tratamiento con el Compuesto C0105. La infusión de ICV A β ₄₂ aumentó la producción de IL-6, TNF- α e IL-1 β . El tratamiento con compuesto C0105 eliminó completamente la producción de IL-6 inducida por A β ₄₂ y suprimió los niveles de TNF- α e IL-1 β en un 86 y 80%, respectivamente (Fig. 22). Finalmente, la inmunohistoquímica (IHC) de la corteza prefrontal (FCX) y el hipocampo (HP) muestra que el tratamiento con el Compuesto C0105 no solo evita la formación de NFT (Fig. 23) sino también depósitos de amiloide (Fig. 24).

Estudio del tejido cerebral humano postmortem

En el tejido con EA y de control tratado con A β ₄₂, el Compuesto C0105 reduce la asociación de FLNA inducida por A β ₄₂ con α 7nAChR y TLR4 (Fig. 25). El contacto con el compuesto C0105 reduce los complejos A β ₄₂- α 7nAChR (Fig. 26) reduciendo la afinidad para esta interacción aproximadamente 1.000-10.000 veces (Fig. 27). El contacto con el Compuesto C0105 preserva el funcionamiento de α 7nAChR (Fig. 28) y NMDAR (Fig. 29) como lo demuestra la afluencia de calcio después de la estimulación del receptor. La normalización de la función del receptor también se demostró mediante los niveles de ensamblaje de señalización de NMDAR (Fig. 31) e IR (Fig. 32). Notablemente, una incubación de una hora de cortes de cerebro con EA con 1 nM de Compuesto C0105 normalizó las seis medidas de este deterioro de señalización de NMDAR sin afectar a los ensamblajes de la subunidad de NMDAR. De manera similar a los descubrimientos en el modelo de ratón, la incubación con el Compuesto C0105 también atenuó el déficit en la afluencia de calcio inducida por despolarización en el tejido con EA postmortem que indica células no funcionales o moribundas (Fig. 30).

En el tejido frontocortical de control postmortem, el sitio de unión al pentapéptido de FLNA del Compuesto C0105 (VAKGL de la SEQ ID NO: 1) se usó como un señuelo para bloquear la atenuación de la asociación de FLNA con α 7nAChR y TLR4 por el Compuesto C0105 (Fig. 33). Un bloqueo similar de la prevención de la fosforilación de tau se demostró con este pentapéptido señuelo (Fig. 34). Juntos, estos resultados confirman que el Compuesto C0105 inhibe la fosforilación de tau y preserva múltiples funciones del receptor a través de su unión a FLNA.

También se usó tejido frontocortical de control postmortem para demostrar que el Compuesto C0105 también reduce la fosforilación de tau inducida por LPS (Fig. 47).

En el tejido frontocortical de control postmortem, el reclutamiento de FLNA inducido por A β ₄₂ a α 7nAChRs fue imitado por concentraciones 10 veces mayores de A β ₄₀ o de los agonistas de α 7nAChR nicotina y PNU282987 con magnitudes significativamente menores. Los antagonistas de α 7nAChR α -bungarotoxina y metillicaconitina y el inhibidor de la colinesterasa/modulador del receptor nicotínico alostérico positivo galantamina no mostraron ningún efecto (Tabla, a continuación). De manera interesante, la memantina, un antagonista tanto de NMDAR como de α 7nAChR, provocó el reclutamiento de FLNA a α 7nAChRs con una magnitud no muy lejana a la de A β ₄₀.

Tabla

Efectos de los agentes $\alpha 7$ nAChR en el reclutamiento de FLNA para $\alpha 7$ nAChR				
Agente	Relación FLNA/ $\alpha 7$ nAChR (estimulación frente a vehículo.%)	Estadísticas frente a vehículo, <i>p</i>	Efecto de A β 42,%	Estadísticas frente a A β 42, <i>p</i>
Vehículo	0.07 \pm 0.01	--	--	--
0.1 μ M Ap42	0.73 \pm 0.05 (1012.3 \pm 104.9)	<0.0001	100	--
1 μ M de Ap40.	28 \pm 0.03 (341.9 \pm 65.1)	0.001	34.8 \pm 6.6	<0.001
1 μ M de nicotina	0.13 \pm 0.02 (107.7 \pm 31.4)	<0.001	11.0 \pm 3.2	0.001
1 μ M de PNU282987	0.12 \pm 0.02 (87.1 \pm 37.9)	0.01	8.9 \pm 3.9	0.001
1 μ M de α -Bungarotoxina	0.07 \pm 0.01 (7.5 \pm 6.6)	0.65	0.8 \pm 0.7	<0.001
1 μ M de metillicaconitina	0.08 \pm 0.02 (19.8 \pm 12.2)	0.21	2.0 \pm 1.2	<0.001
1 μ M de galantamina	0.08 \pm 0.02 (17.1 \pm 14.6)	0.37	1.7 \pm 1.5	<0.001
1 μ M de Memantina	0.21 \pm 0.03 (225.9 \pm 38.5)	<0.00001	23.0 \pm 3.9	0.001

Compuestos

Los compuestos se sintetizaron y proporcionaron por Medicilon, Shanghai. Aparte de las tres síntesis descritas en la presente, las síntesis más detalladas se presenta en una o más de las Publicaciones de Patente de Estados Unidos N° 2009/0191579 A1, N° 2010/0279996 A1, N° 2010/0279997 A1, N° 2010/0280061 A1, N° 2011/0105481 A1, 2011/0105484 A1, N° 2011/0105487 A1, y N° 2011/0105547 A1.

Un compuesto que tiene un carbono asimétrico (quiral) o una sal del mismo puede existir en forma de dos enantiómeros. La invención se refiere tanto a cada enantiómero como a su mezcla; es decir, tanto a las formas enantioméricas como para su mezcla. Adicionalmente, cuando hay dos o más centros quirales, se pueden formar diastereómeros.

Cuando un compuesto contemplado o una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de la Serie C-2, o cualquiera de las otras fórmulas en la presente se obtiene en forma de una mezcla de estereoisómeros, preferiblemente en forma de racematos u otras mezclas de los varios enantiómeros y/o diastereoisómeros, pueden separarse y aislarse opcionalmente mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. De manera ilustrativa, por ejemplo, son útiles los procesos de separación cromatográfica, particularmente los procesos de cromatografía líquida a presión estándar o a presión elevada, preferiblemente métodos de MPLC y HPLC, y también métodos que implican cristalización fraccional. Esto puede implicar particularmente la separación de enantiómeros individuales, por ejemplo, sales diastereoisoméricas separadas por medio de HPLC en la fase quiral o por medio de cristalización con ácidos quirales, por ejemplo ácido (+)-tartárico, ácido(-)-tartárico o ácido (+)-10-canforsulfónico. Un enantiómero separado mediante formación de sal quiral puede convertirse fácilmente en una sal farmacéuticamente aceptable de tipo aquiral o racémica para su uso.

Se contempla que un compuesto de la Serie C-2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se use opcionalmente en forma enantioméricamente pura; es decir, en la configuración (S) o (R) o las formas d y l, o en forma de una mezcla racémica que muestra una configuración (S, R) o (d, l), o como uno o más diastereómeros, y mezclas de los mismos.

Por lo tanto, un compuesto contemplado o su sal farmacéuticamente aceptable puede estar presente opcionalmente en una o más formas. De manera ilustrativa, el compuesto o su sal puede estar en forma de un enantiómero o diastereoisómero individual. Un compuesto contemplado o su sal también puede estar presente en forma de una mezcla de estereoisómeros. Un compuesto o sal contemplado también puede estar presente en forma de una mezcla racémica.

A continuación se muestra un esquema sintético ilustrativo para la preparación de compuestos de la Serie C-2 que contienen varios sustituyentes y átomos del anillo. Ese esquema puede adaptarse fácilmente para la preparación de compuestos que contienen dos enlaces carbonilo, y también un enlace carbonilo y uno sulfonilo en las configuraciones opuestas a las mostradas. La etanolamina o tioetanolamina puede reemplazarse por etilendiamina o N-metiletlen-diamina para preparar los compuestos de dinitrógeno correspondientes. Un reemplazo similar con 2-aminoacetamida o una acetamida o propionamida N-sustituida proporciona el sistema de anillo que contiene aminoamido correspondiente.

Esquema 3

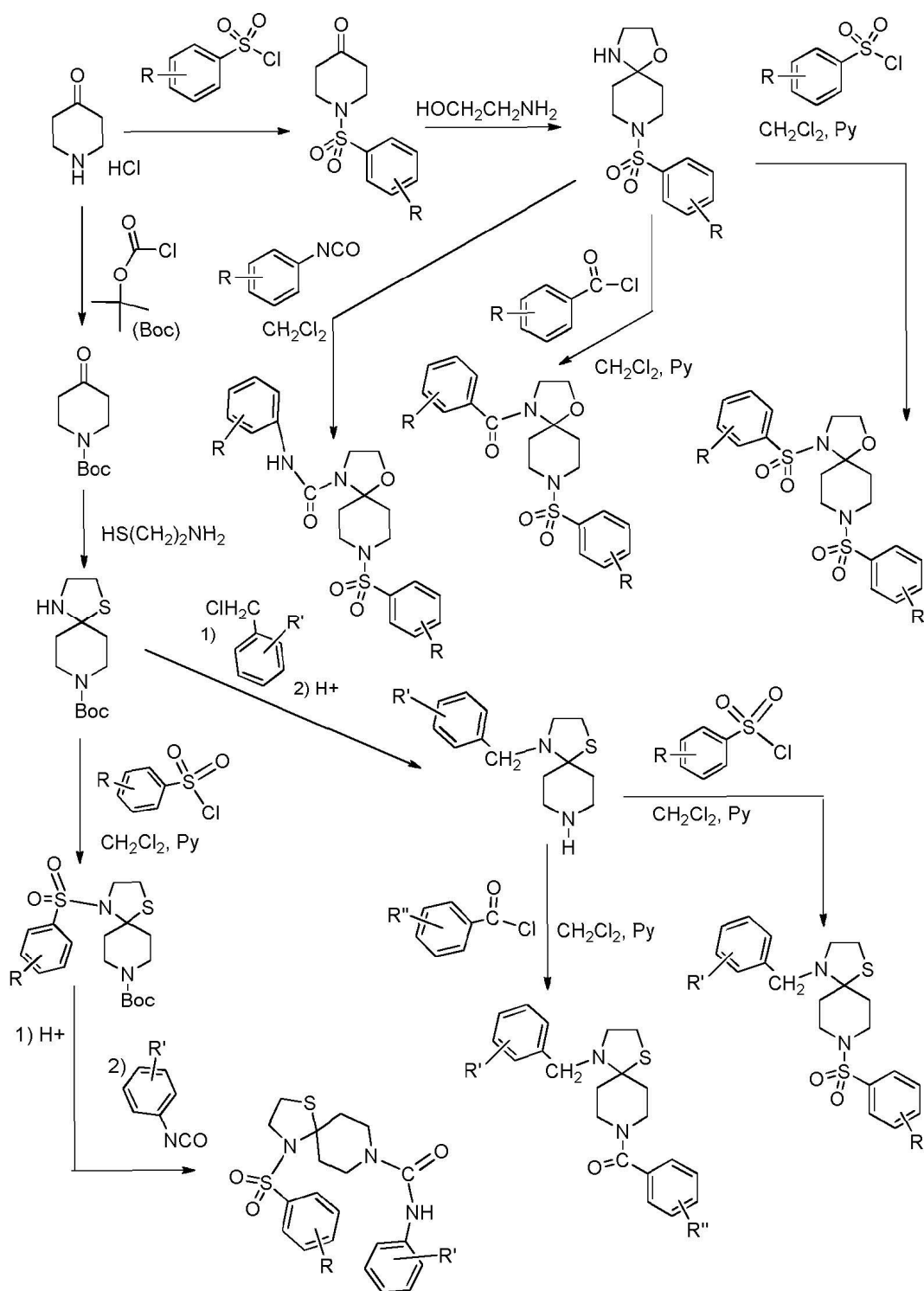


 Tabla de Compuestos de la Serie C-2

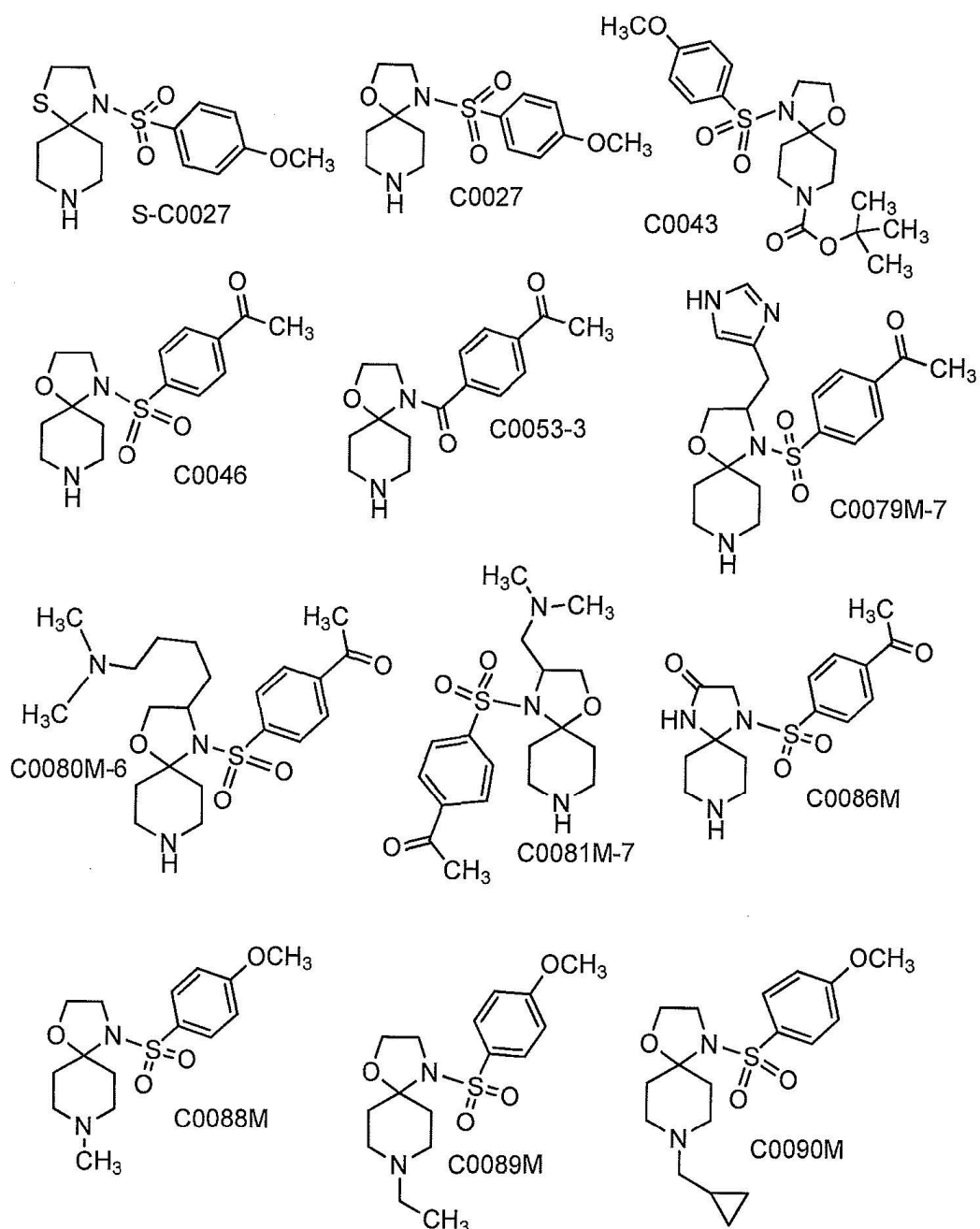


Tabla de Compuestos de la Serie C-2 Continuación

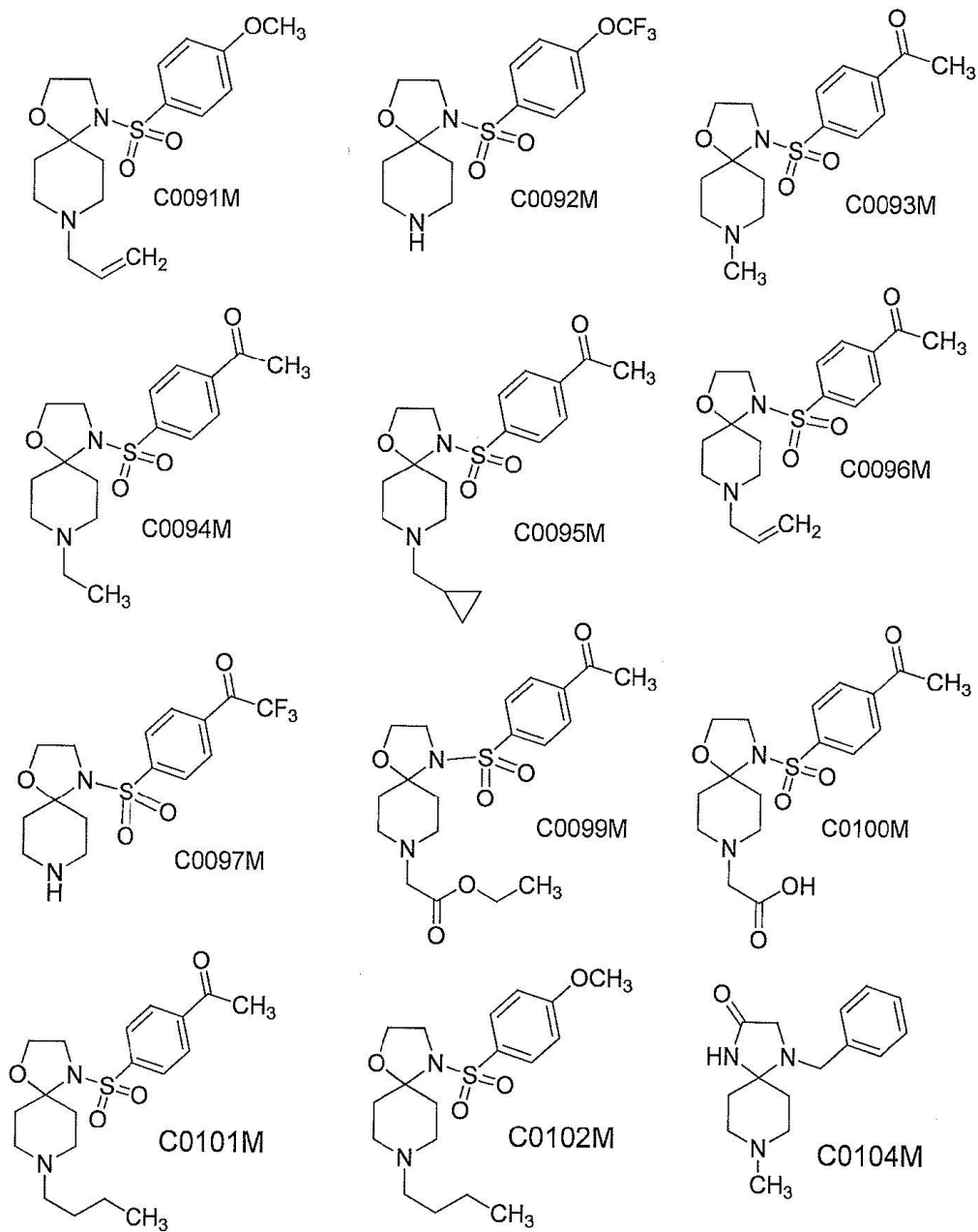


Tabla de Compuestos de la Serie C-2 Continuación

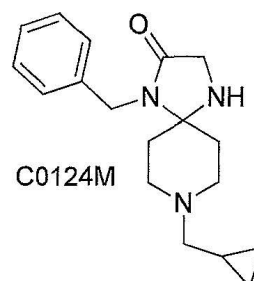
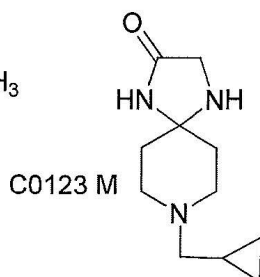
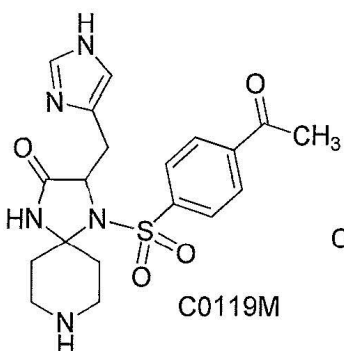
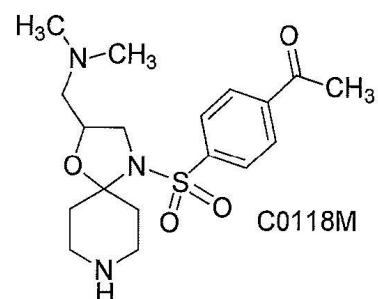
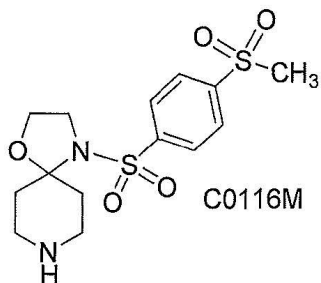
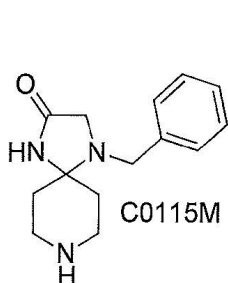
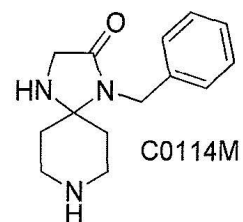
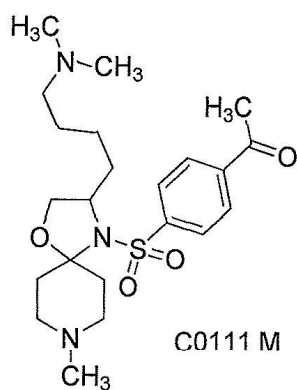
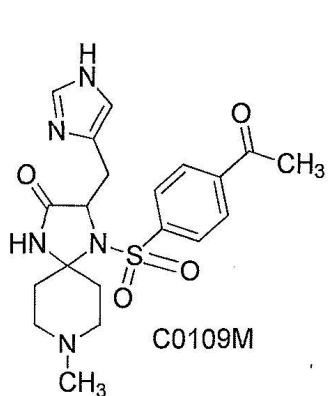
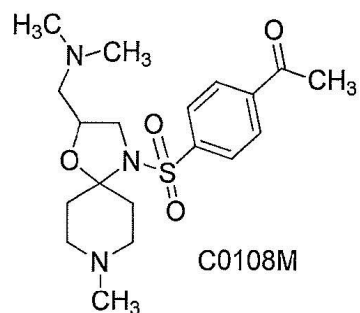
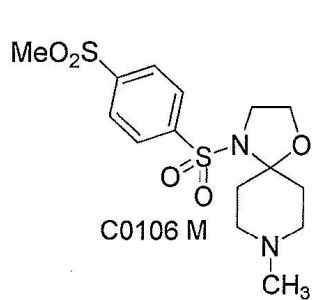
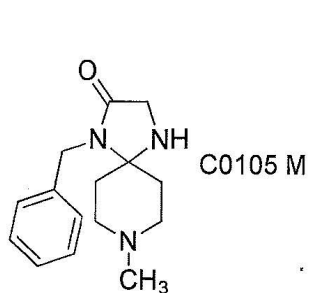


Tabla de Compuestos de la Serie C-2 Continuación

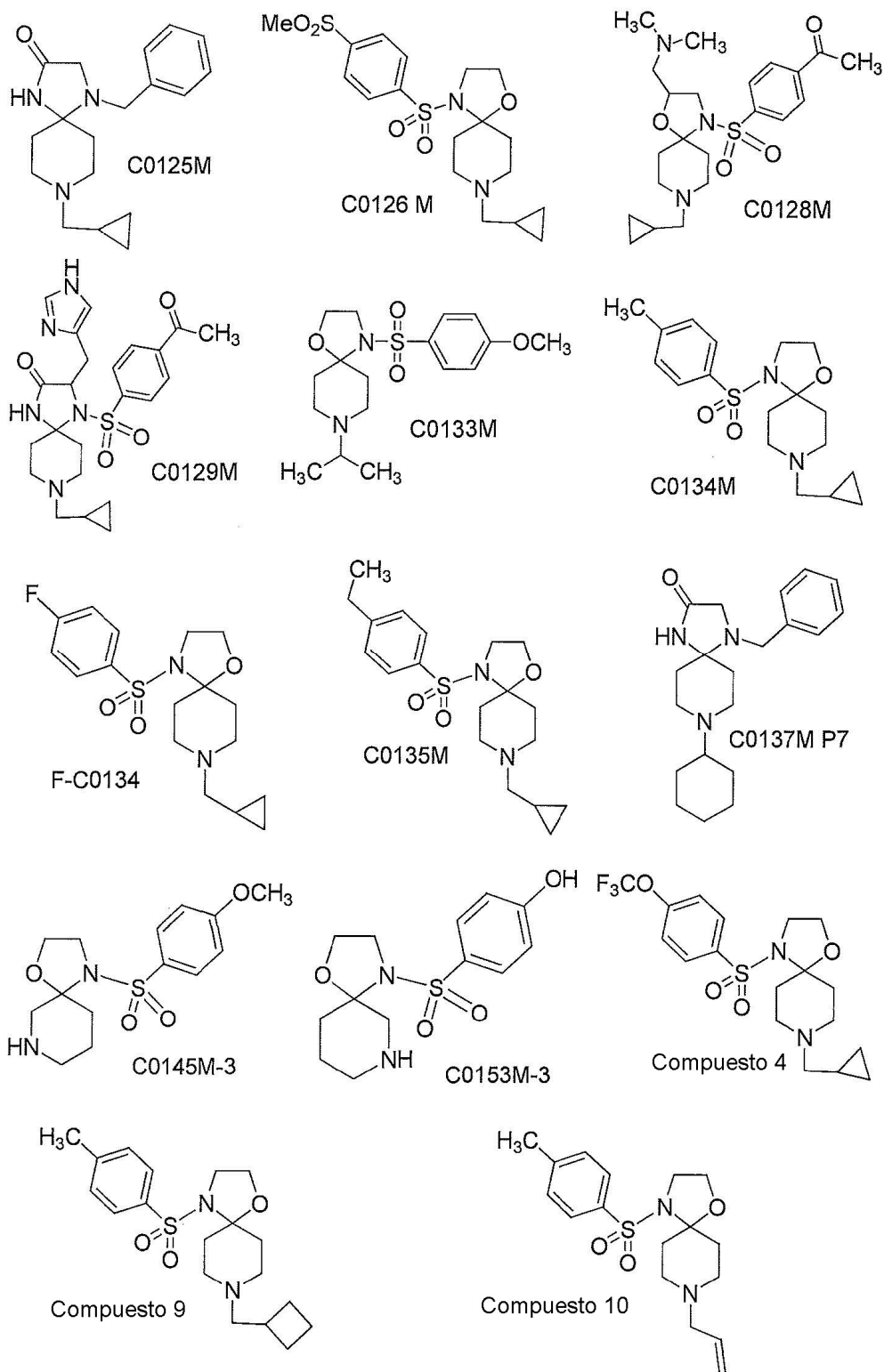
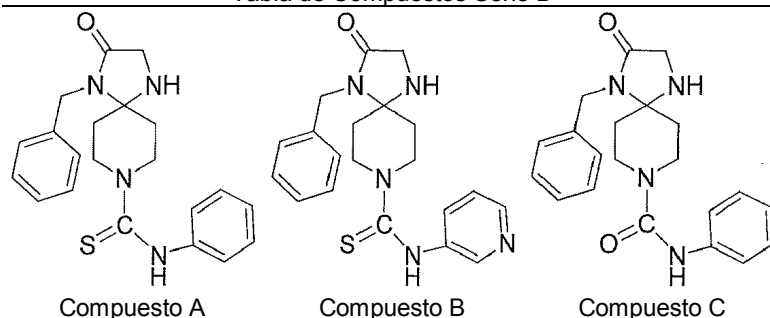


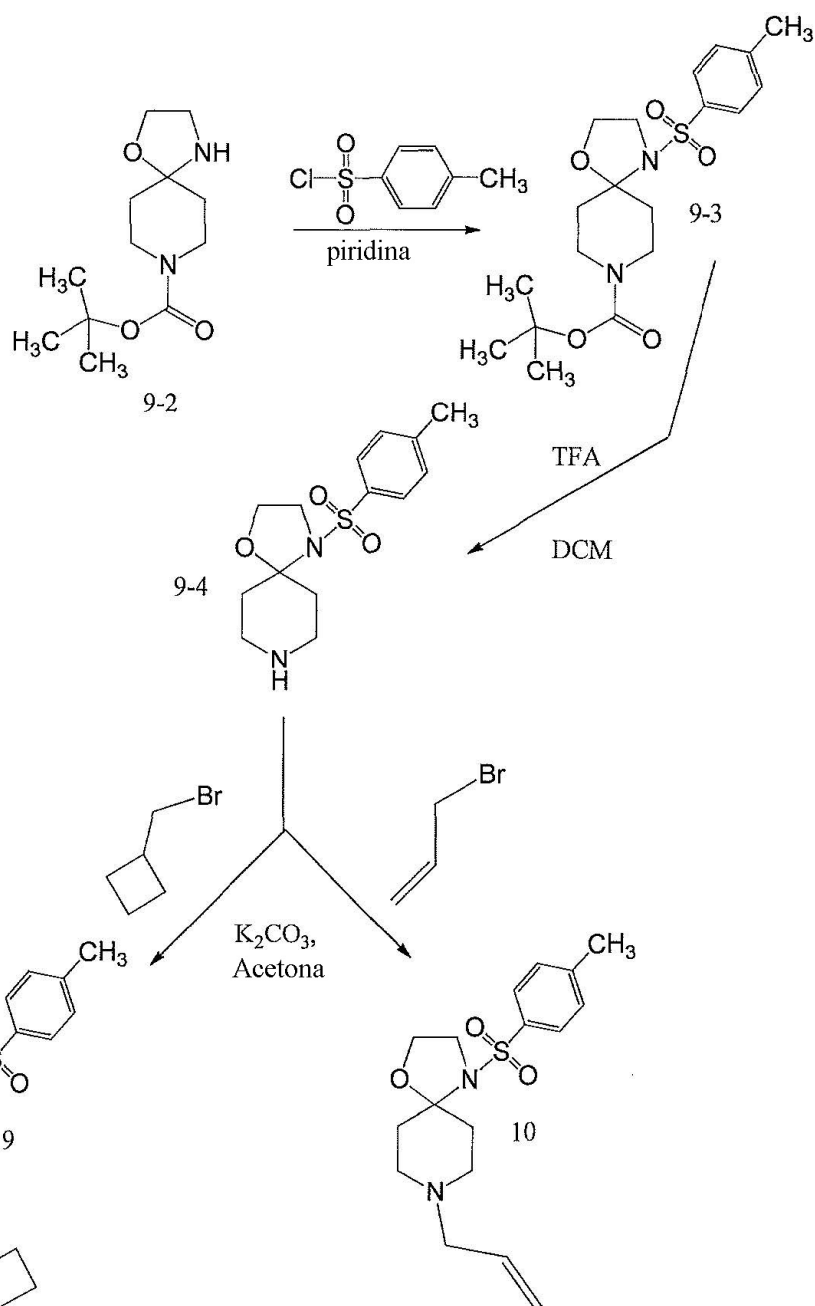
Tabla de Compuestos Serie D



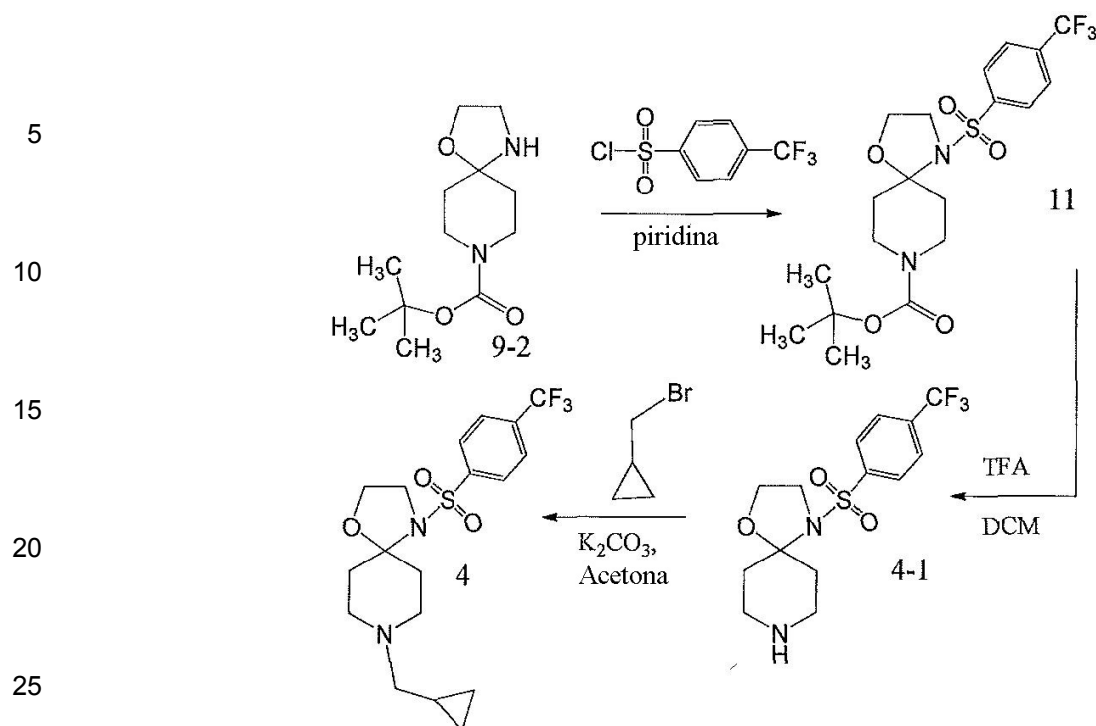
Preparación de Compuestos 4, 9 y 10 de la Serie C-2

Estos tres compuestos se prepararon a través de un intermedio común designado 9-2 en la presente que se preparó durante la síntesis del Compuesto C0116M en la solicitud N° de Serie. 12/5610.091 (Publicación de Estados Unidos N° 20110105487 A1 del 5 de mayo de 2011; WO 2010/051497), y haciendo referencia al mismo como Compuesto C0116M-1.

Después de la preparación del Compuesto 9-2, las síntesis de los Compuestos 9 y 10 procedió rutinariamente añadiendo primero el grupo tosilo en piridina al nitrógeno del anillo de cinco miembros, seguido de la eliminación del grupo *t*-BOC con ácido trifluoroacético (TFA) en diclorometano para formar el Compuesto 9-4 como se muestra a continuación. Los detalles de las síntesis se proporcionan a continuación.



El Compuesto 9-2 también sirvió como base para la preparación del Compuesto 4. Aquí, como se muestra a continuación, el cloruro de 4-trifluorometoxifenil sulfonilo se hizo reaccionar en piridina con la amina del anillo de cinco miembros y el grupo t-BOC se eliminó en TFA/DCM como anteriormente para formar el Compuesto 4-1. El nitrógeno de amina del anillo de seis miembros del Compuesto 4-1 se hizo reaccionar luego con (bromometil)ciclopropano para formar el producto N-alkilado que es el Compuesto 4.



Preparación del compuesto 9-2

A una solución de N-Boc-piperidin-4-ona (50 g, 251 mmol) en etanol (500 ml) se le añadió 2-aminoetanol (46 g). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche (aproximadamente 18 horas). Luego se eliminó el solvente a presión reducida. El residuo se diluyó con CH₂Cl₂ (DCM) y se lavó con Na₂CO₃ acuoso saturado (100 ml x 6). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, y se concentró para proporcionar el producto como un aceite amarillo (61 g, rendimiento: 100%, confirmada por TLC).

Preparación del compuesto 9-3

Se añadió cloruro de toluensulfonilo (TsCl; 24,7 g, 130 mmol) a una solución del Compuesto 9-2 (31,2 g, 130 mmol) en piridina (320 ml). La mezcla se agitó durante la noche (aproximadamente 18 horas) a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción se concentró al vacío para eliminar la piridina y el residuo se disolvió con DCM y se lavó con solución saturada de NaHCO₃. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se concentró y se purificó por cromatografía en columna para proporcionar el producto como un sólido blanco (40 g, rendimiento: 78%, confirmado por ¹H NMR).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : 7.74 (d, J = 8.4 Hz, 2H); 7.31 (d, J = 8.0 Hz, 2H); 4.13~4.03 (m, 4H); 3.56~3.50 (m, 2H); 2.89 (brs, 2H); 2.46 (s, 3H); 2.43~2.36 (m, 2H); 1.63 (brs, 2H); 1.47 (s, 9H).

Preparación del compuesto 9-4

Se añadió ácido trifluoroacético (CF₃COOH; 60 ml) a una solución del Compuesto 9-3 (35,2 g, 88,7 mmol) en DCM (350 ml). La mezcla se agitó en hielo/agua durante 50 minutos. A la mezcla de la reacción se le añadieron 200 ml de DCM, y la composición resultante se lavó con Na₂CO₃ saturado. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se concentró al vacío para proporcionar el producto bruto. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna para proporcionar el producto deseado como un aceite amarillo pálido (11,2 g, rendimiento: 42%, confirmado por ¹H NMR).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : 7.75 (d, J = 8.4 Hz, 2H); 7.29 (d, J = 8.0 Hz, 2H); 3.95 (t, J = 6.4 Hz, 2H); 3.75 (brs, 1H); 3.51~3.48 (t, J = 5.6 Hz, 2H); 3.16~3.12 (dd, J = 12.4, 4.0 Hz, 2H); 2.92~2.86 (td, J = 12.8, 2.0 Hz, 2H); 2.48~2.44 (m, 2H); 2.41 (s, 3H); 1.65 (d, J = 12.8 Hz, 2H)

Preparación del compuesto 9

Se añadió (bromometil)ciclobutano (1,86 g, 12,5 mmol) a una mezcla del Compuesto 9-4 (1,85 g, 6,25 mmol) y K₂CO₃ (3,39 g, 12,5 mmol) en acetona (40 ml), y la mezcla de la reacción se agitó a reflujo durante la noche (aproximadamente 18 horas). Después de enfriar, la mezcla se filtró y se concentró, se purificó por cromatografía con acetato de etilo (EA) para obtener un producto bruto como un sólido amarillo pálido (1,6 g, rendimiento: 70%,

confirmado por LCMS, ^1H NMR mostró que era impuro). El producto bruto se purificó por cromatografía adicional con EA para proporcionar el producto deseado como de un sólido blanco (1,15 g, rendimiento: 50%, confirmado por LCMS y ^1H NMR, HPLC: 99,3% @ 254 nm, 99,5 @ 214 nm).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : 7.77 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H); 7.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H); 3.95 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H); 3.52 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H); 2.76-2.73 (d, $J = 10.0$ Hz, 2H); 2.54~2.39 (m, 8H); 2.21~2.15 (t, $J = 11.6$ Hz, 2H); 2.07~2.05 (m, 2H); 1.93~1.88 (m, 2H); 1.70~1.65 (m, 2H); 1.56~1.53 (d, $J = 12.4$ Hz, 2H). MS (ESI) calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ (m/z): 364.18, encontrado: 365.1 $[\text{M}+1]^+$.

Preparación del compuesto 10

A una mezcla del Compuesto **9-4** (1,72 g, 5,8 mmol) y K_2CO_3 (1,6 g, 11,6 mmol) en acetona (30 ml) se añadió 3-bromoprop-1-eno (0,7 g, 5,8 mmol), y la mezcla de reacción se agitó a 40° C durante 2 horas. Después de enfriarse, la mezcla se filtró y se concentró, se purificó por cromatografía con EA para obtener el producto deseado como un sólido blanco (1,1 g, 56% de rendimiento, confirmado por LCMS y ^1H NMR, HPLC: 98,8% @ 254 nm, 98,9 @ 214 nm).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : 7.76~7.74 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H); 7.29~7.27 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H); 5.90~5.82 (m, 1H); 5.18~5.11 (m, 2H); 3.95~3.91 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H); 3.52~3.49 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H); 3.0~2.98 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H); 2.83~2.80 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 2H); 2.55~2.48 (td, $J = 13.2, 4.4$ Hz, 2H); 2.41 (s, 3H); 2.19~2.14 (t, $J = 11.2$ Hz, 2H); 1.58~1.55 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H). MS (ESI) calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ (m/z): 336.45, encontrado: 337.1 $[\text{M}+1]^+$.

Preparación del compuesto 11

A una solución del Compuesto **9-2** (14,6 g, 60 mmol) en piridina (150 ml) se le añadió cloruro de 4-(trifluoro-metoxi)benceno-1-sulfonilo (15,7 g, 60 mmol). La mezcla se agitó durante la noche (aproximadamente 18 horas) a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción se concentró al vacío para eliminar la piridina y el residuo se disolvió con DCM, se lavó con NaHCO_3 saturado. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se concentró y se purificó por cromatografía en columna para dar el producto como un sólido blanco (20 g, rendimiento: 71%, confirmada por ^1H NMR y LCMS).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : 7.92~7.90 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H); 7.35~7.32 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H); 4.13~3.97 (m, 4H); 3.51 (brs, 2H); 2.90 (brs, 2H); 2.45~2.35 (m, 2H); 1.58 (brs, 2H); 1.47 (s, 9H). MS (ESI) calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ (m/z): 466.14, encontrado: 367.0 $[\text{M}+1]^+$.

Preparación del compuesto 4-1

Se añadió ácido trifluoroacético (CF_3COOH ; 20 ml) a una solución del Compuesto **11** (15 g, 32 mmol) en DCM (150 ml). La mezcla se agitó en hielo/agua durante 50 minutos. La mezcla de la reacción se añadió a 200 ml de DCM, se lavó con Na_2CO_3 saturado. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se concentró al vacío para proporcionar el producto bruto. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna para proporcionar el producto deseado en forma de un sólido amarillo pálido (5,9 g, rendimiento: 50%, confirmado por ^1H NMR).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : 7.93~7.91 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H); 7.34~7.32 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H); 4.0~3.97 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H); 3.51~3.48 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H); 3.06~3.02 (dd, $J = 12.4, 4.0$ Hz, 2H); 2.86~2.80 (t, $J = 13.2$ Hz, 2H); 2.39~2.31 (td, $J = 12.8, 4.8$ Hz, 2H); 2.48~2.44 (m, 2H); 1.64~1.62 (d, $J = 12.8$ Hz, 2H).

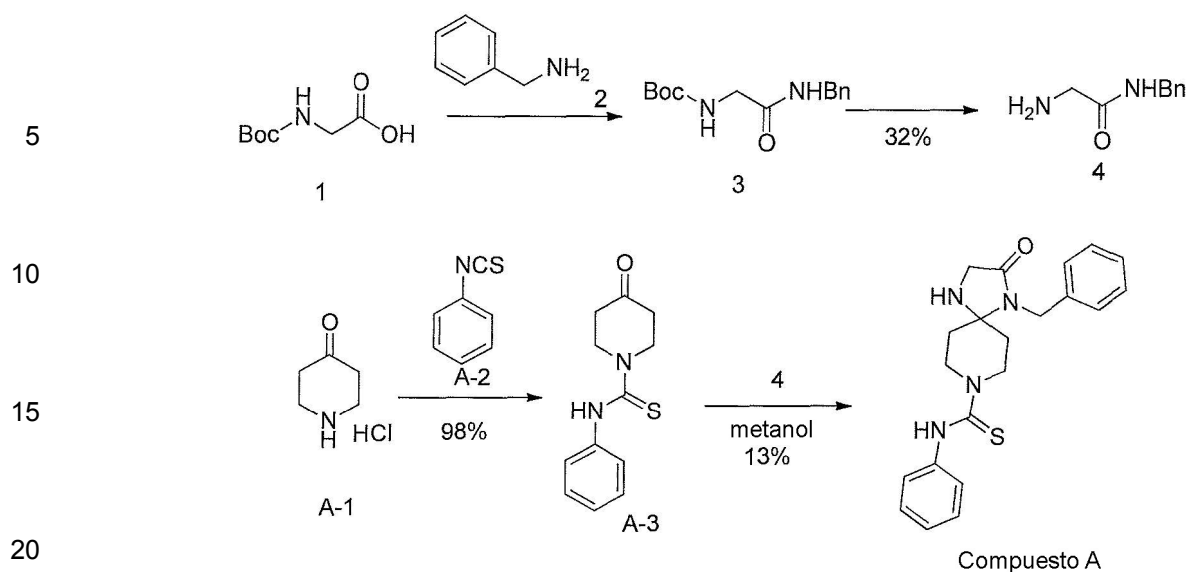
Preparación del compuesto 4

Se añadió (bromometil)ciclobutano (1,5 g, 4,1 mmol) a una mezcla del compuesto **4-1** (1,5 g, 4,1 mmol) y K_2CO_3 (1,13 g, 8,2 mmol) en acetona (15 ml), y la mezcla de la reacción se agitó a reflujo durante 4 horas. Después de enfriarse, la mezcla se filtró y se concentró, se purificó por cromatografía con EA para proporcionar el producto deseado como un sólido blanquecino (1,05 g, rendimiento: 61%, confirmado por LCMS y ^1H NMR, HPLC: 96,9% @ 254 nm, 98,4 @ 214nm).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : 7.91~7.94 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H); 7.34~7.32 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H); 3.98~3.95 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H); 3.54~3.51 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H); 2.99~2.96 (dd, $J = 8.8, 2.0$ Hz, 2H); 2.56~2.49 (td, $J = 12.8, 4.4$ Hz, 2H); 2.26~2.17 (m, 4H); 1.60~1.57 (d, $J = 12.4$ Hz, 2H); 0.87~0.84 (m, 1H); 0.52~0.48 (m, 2H); 0.10~0.07 (m, 2H). MS (ESI) calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ (m/z): 420.13, encontrado: 421.1 $[\text{M}+1]^+$.

Preparación de los compuestos A, B y C de la serie D

Compuesto A

Compuesto 4

25 A una solución del Compuesto 1 (10 g, 57 mmol) en THF (100 ml) se añadió 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) (11,1 g, 68,5 mmol) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó durante 30 minutos. Luego se añadió el Compuesto 2 (7,34 g, 68,5 mmol) y se agitó durante la noche (aproximadamente 18 horas). El solvente se evaporó y el residuo se disolvió en acetato de etilo (EA; 400 ml) al que se añadió HCl/MeOH 4M (50 ml) y la mezcla resultante se agitó durante la noche (aproximadamente 18 horas). El sólido blanco resultante se filtró y se suspendió en EA, se lavó con NaHCO₃ acuoso y se concentró para proporcionar el producto como un sólido blanco (3,2 g, rendimiento del 34%, según se confirmó por NMR).

30 1H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : 3.41 (s, 3H); 4.48 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H); 7.26~7.36 (m, 5H); 7.57 (br, s, 1H) .

Compuesto A-3

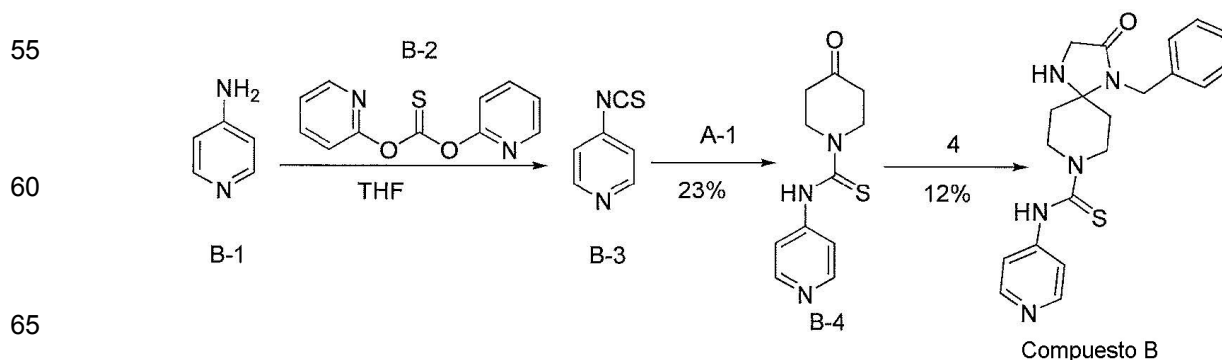
35 Una mezcla de Compuesto A-1 (3,75 g, 24 mmol), A-2 (1,5 g, 11 mmol) y trietilamina (TEA) (4,5 g, 44,38 mmol) en diclorometano (DCM) (50 ml) se agitó a temperatura ambiente durante la noche (aproximadamente 18 horas). La mezcla de la reacción se lavó con agua, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró para proporcionar el producto como un sólido blanco (2,55 g, rendimiento del 98%, confirmado por NMR).

40 1H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : 2.53 (t, *J* = 6.4 Hz, 4H); 4.01 (t, *J* = 6.4 Hz, 4H); 7.10~7.30 (m, 5H).

Compuesto A

45 Una mezcla de Compuesto A-3 (400 mg, 1,7 mmol) y Compuesto 4 (280 mg, 1,7 mmol) en metanol (60 ml) se calentó a reflujo durante la noche (aproximadamente 18 horas) bajo argón. La mezcla se concentró y se purificó mediante pre-TLC para obtener el producto como un sólido blanco pálido (84 mg, 13% de rendimiento, NMR y MS confirmados, 98% por HPLC).

50 1H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : 1.42 (d, *J* = 12.4 Hz, 2H); 1.92 (dt, *J* = 4.4, 13.2 Hz, 2H); 3.32 (dt, *J* = 2.0, 12.8 Hz, 2H); 3.52 (s, 2H); 4.42 (s, 2H); 4.47 (s, 2H); 7.06 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H); 7.14 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H); 7.24~7.33 (m, 9H). MS (ESI) calculado para C₂₁H₂₄N₄OS (m/z) : 380.17, encontrado: 381.2 [M+1]⁺.

Compuesto B

Compuesto B-4

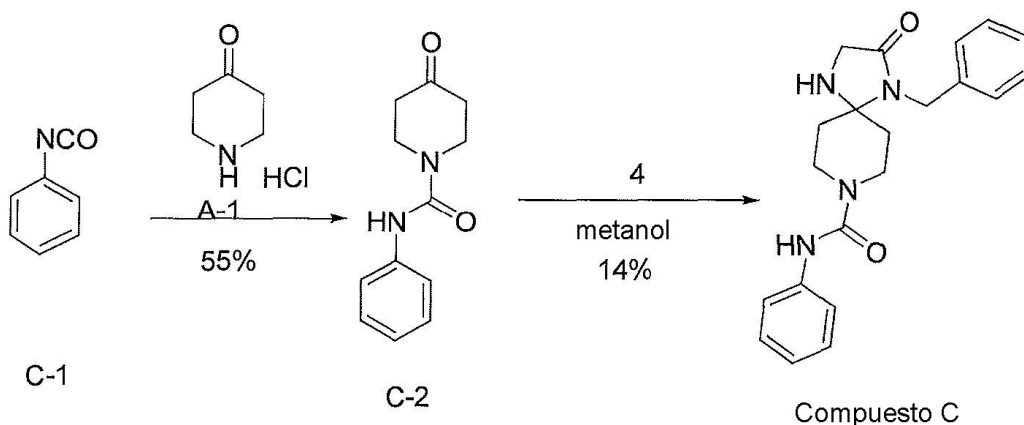
A una solución de piridin-4-amina (400 mg, 4,25 mmol) en THF (35 ml) se le añadió NaH al 60% (340 mg, 8,5 mmol) en un baño de hielo, y la mezcla se agitó durante 1 hora. Se añadió el compuesto **B-2** (0,99 g, 4,25 mmol) y se dejó que la mezcla alcanzara gradualmente la temperatura ambiente y se agitó durante 3 horas. Se añadió el Compuesto **A-1** (0,78 g, 5,1 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (DIEA; 1 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche (aproximadamente 18 horas). Se añadió agua y la composición resultante se extrajo con EA, se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄, se concentró y se purificó por cromatografía en columna para proporcionar aceite (0,23 g, rendimiento del 23%, NMR no era puro pero el componente principal era el compuesto del título).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : 2.66 (t, *J* = 6.4 Hz, 4H) ; 4.12 (t, *J* = 6.4 Hz, 4H); 7.11~7.12 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H); 8.50~8.52 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H).

Compuesto B

Una solución de Compuesto **B-4** (230 mg, 1,7 mmol) y Compuesto **4** (225 mg, 1,37 mmol) en metanol (25 ml) se calentó a reflujo durante la noche (aproximadamente 18 horas) bajo argón. La mezcla se concentró y se purificó mediante pre-TLC para obtener el producto como un sólido amarillo (45 mg, rendimiento del 12%, NMR y MS confirmados, 96% por HPLC).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : 1.47 (d, *J* = 13.2 Hz, 2H); 1.92~1.98 (m, 2H); 3.41 (t, *J* = 13.2 Hz, 2H); 3.54 (s, 2H); 4.44 (s, 4H); 6.95 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H); 7.26~7.31 (m, 5H); 8.45 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H);. MS (ESI) calculado para C₂₀H₂₃N₅OS (m/z) : 381.16, encontrado: 382.4 [M+1]⁺.

Compuesto C**Compuesto C-2**

Se agitó una mezcla de Compuesto **C-1** (1,0 g, 8,39 mmol), Compuesto **A-1** (2,83 g, 18,45 mmol) y carbonato de potasio (4,64 g, 33,6 mmol) en DCM (50 ml) a temperatura ambiente durante 18 horas.. La mezcla se lavó con agua, HCl 1 N (acuoso), se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna (PE/EA=3:1) para proporcionar el producto como un sólido blanco (1,0 g, 55% de rendimiento, NMR confirmó el compuesto del título).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : 2.56 (t, *J* = 6.4 Hz, 4H); 3.81 (t, *J* = 6.4 Hz, 4H); 6.50 (brs, 1H); 7.07 (t, *J* = 7.2 Hz, 4H); 7.28~7.37 (m, 4H).

Compuesto C

Una mezcla de Compuesto **C-2** (400 mg, 1,84 mmol) y Compuesto **4** (400 mg, 2,44 mmol) en metanol (40 ml) se calentó a reflujo durante la noche (aproximadamente 18 horas) bajo argón. La mezcla se concentró y se purificó mediante pre-TLC para proporcionar el producto como un sólido blanco (96 mg, rendimiento del 14%, NMR y MS confirmados, 98% por HPLC).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : 1.45 (d, *J* = 12.0 Hz, 2H); 1.85 (dt, *J* = 4.4, 13.2 Hz, 2H); 3.19 (dt, *J* = 2.0, 13.2 Hz, 2H); 3.55 (s, 2H); 3.96 (dt, *J* = 13.6, 2.0 Hz, 2H); 4.44 (s, 2H); 6.29 (s, 1H); 7.02~7.06 (m, 1H); 7.22~7.33 (m, 10H);. MS (ESI) calculado para C₂₁H₂₄N₄O₂ (m/z) : 364.19, encontrado: 365.2 [M+1]⁺.

Ejemplo 1: Ensayo de selección de FLNA basado en FITC-NLX**A. Placas de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina**

Se lavan placas de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina (Reacti-Bind™ NeutrAvidin™ Placa de 96 pocillos recubierta de alta capacidad de unión, Pierce-ENDOGEN) tres veces con 200 µl de Tris HCl 50 mM, pH 7,4 según las recomendaciones del fabricante.

5 B. Pentapéptido VAKGL N-biotinilado (Bn-VAKGL) (SEQ ID NO: 1)

El péptido Bn-VAKGL (0,5 mg/placa) se disuelve en 50 µl de DMSO y luego se añade a 4450 µl de Tris HCl 50 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 100 mM e inhibidores de la proteasa (medio de unión), así como 500 µl de superbloqueo en PBS. (Pierce-ENDOGEN) [concentración final para DMSO: 1%].

C. Acoplamiento de péptidos de Bn-VAKGL a placa recubierta con estreptavidina

Las placas recubiertas con estreptavidina lavadas se ponen en contacto con 5 µg/pocillo de Bn-VAKGL (100 µl) durante 1 hora (incubadas) con agitación constante a 25° C [50 µl de solución de péptido Bn-VAKGL de B + 50 µl de medio de unión, concentración final para DMSO: 0,5%]. Al final de la incubación, la placa se lava tres veces con 200 µl de Tris HCl 50 mM helado, pH 7.4.

D. Unión de naloxona marcada con FITC[FITC-NLX] a VAKGL

Las placas de estreptavidina recubiertas con Bn-VAKGL se incuban con naloxona marcada con isotiocianato de fluoresceína 10 nM (FITC-NLX; Invitrogen) en medio de unión (Tris HCl 50 mM, pH 7,4 que contiene NaCl 100 mM e inhibidores de proteasa) durante 30 minutos a 30° C con agitación constante. El volumen final del ensayo es de 100 µl. Al final de la incubación, la placa se lava dos veces con 100 µl de Tris 50 mM helado, pH 7,4. La señal, FITC-NLX- unido se detecta usando un lector de placas multimodo DTX-880 (Beckman).

E. Detección de análogos de química médica

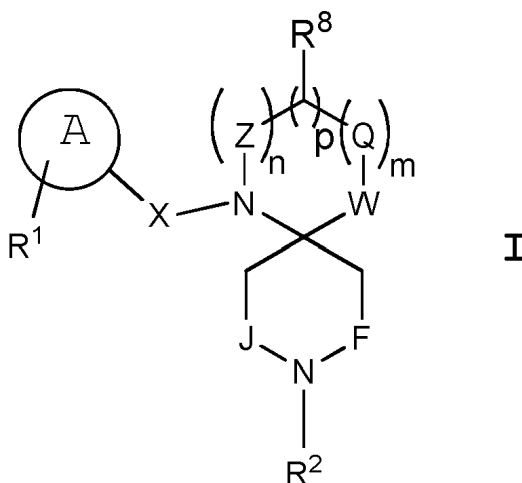
Los compuestos se disuelven primero individualmente en DMSO al 25% que contiene Tris HCl 50 mM, pH 7.4, hasta una concentración final de 1 mM (asistida por sonicación cuando es necesario) y luego se colocan en placas de compuesto de 96 pocillos. Para seleccionar los análogos de química médica (nuevos compuestos), cada solución de compuesto (1 μ l) se añade a la placa de estreptavidina recubierta con Bn-VAKGL con 50 μ l/pocillo de medio de unión seguido inmediatamente con la adición de 50 μ l de FITC-NLX (volumen/pocillo del ensayo total es de 100 μ l). La concentración final de selección para cada nuevo compuesto es inicialmente de 10 μ M.

Cada placa de selección incluye control de vehículo (unión total), así como naloxona (NLX) y/o naltrexona (NTX) como controles positivos. Los compuestos se prueban por triplicado o cuadruplicado. Se calcula el porcentaje de inhibición de unión de FITC-NLX para cada compuesto $[(\text{FITC-NLX total unido en vehículo} - \text{FITC-NLX unido con compuesto}) / \text{FITC-NLX total unido en vehículo}] \times 100\%$. Para evaluar las eficacias y las potencias de los compuestos seleccionados, los compuestos que logran una inhibición de aproximadamente el 60-70% a 10 μM se analizan adicionalmente a concentraciones de 1 y 0.1 μM .

Los resultados de este ensayo de selección se muestran en las tablas siguientes.

Ensayos de unión a péptidos de FLNA

Compuestos de Serie C-2



ES 2 716 049 T3

Cada designación en la fórmula anterior se define en otra parte en la presente.

Compuesto de unión a FLNA	Concentración de compuesto de unión a FLNA		
	0.01 μ M	0.1 μ M	1 μ M
	Porcentaje de inhibición de unión		
Media de Control de naloxona	39.87	46.29%	50.91
C0011	37.6%	41.4%	46.0%
C0026	42.3%	44.8%	49.0%
C0027	50.8%	61.2%	63.8%
S-C0027	39.1%	46.5%	53.6%
C0034-3	29.6%	38.3%	44.8%
C0037-2	ND*	ND	ND
C0040	38.4%	46.3%	55.9%
C0043	43.9%	51.3%	58.0%
C0044	37.3%	43.9%	50.6%
C0045	39.1%	48.9%	53.7%
C0046	30.8%	35.7%	42.2%
C0050	26.7%	34.5%	36.4%
C0055	29.0%	34.9%	39.5%
C0056	33.7%	38.9%	41.4%
C0060	60.3%	64.0%	68.0%
C0086M	37.9%	48.1%	53.4%
C0087M	51.6%	57.9%	61.5%
C0088M	40.1%	52.4%	56.1%
C0089M	40.7%	46.1%	51.2%
C0090M	42.5%	52.5%	55.8%
C0091M	38.1%	39.8%	46.3%
C0093M	44.8%	49.9%	53.5%
C0094M	43.0%	52.8%	57.5%
C0095M	40.1%	46.6%	50.5%
C0096M	43.0%	48.3%	55.0%
C0099M	46.9%	53.3%	56.0%
C0100M	52.2%	58.2%	64.5%
C0101M	50.5%	56.4%	59.0%
C0102M	52.3%	53.1%	56.6%
C0104M	51.4%	54.1%	55.2%
C0105M	55.7%	62.0%	68.8%
C0106M	45.8%	55.6%	58.9%
C0108M	54.6%	61.4%	68.7%
C0114M	57.1%	63.2%	66.7%

(continuación)

Compuesto de unión a FLNA	Concentración de compuesto de unión a FLNA		
	0.01 μ M	0.1 μ M	1 μ M
	Porcentaje de inhibición de unión		
C0115M	47.8%	57.8%	59.9%
C0116M	53.9%	60.0%	62.9%
C0118M	56.6%	61.4%	62.4%
C0119M	41.6%	55.5%	60.0%
C0123M	51.9%	60.5%	62.9%
C0124M	47.7%	52.2%	58.7%
C0125M	54.2%	59.7%	63.3%
C0126M	50.7%	55.4%	67.3%
C0128M	46.5%	54.4%	58.2%
C0133M	47.8%	54.9%	58.5%
C0134M	55.7%	60.5%	61.9%
F-C0134	37.4%	45.7%	53.1%
C0135M	53.9%	55.1%	62.3%
C0136M (P5)	46.7%	55.2%	58.2%
C0137M (P7)	42.4%	49.9%	61.2%
C0142M	35.1%	39.4%	56.0%
C0143M	45.3%	48.4%	57.8%
C0148M	46.2%	52.0%	57.0%
C0149M	48.5%	52.3%	62.0%
C0150M	47.3%	51.8%	61.4%
C0151M	48.3%	51.7%	58.7%
C0152M-4	ND	ND	ND
C0153M-3	ND	ND	ND
Media de control de naloxona	39.87%	46.29%	50.91%
* ND=No Hecho.			

Se realizó un estudio preliminar similar al inmediatamente anterior usando los Compuestos 4, 9 y 10 y 100 nM de FITC-NLX almacenado congelado en lugar de 10 nM de FITC-NLX. A continuación se muestran los resultados de una media de dos ejecuciones para este estudio.

Compuesto	0.1 nM	1 nM	10 nM	100 nM	1 μ M
4	18.8%	21.3%	17.9%	28.8%	42.9%
9	22.5%	24.8%	27.7%	35.3	49.6%
10	27.5%	27.3%	26.6%	27.3%	34.5%
(+) NLX	22.7%	22.8%	23.1%	22.8%	39.8%

EJEMPLO 2: Actividad agonista de MOR usando el ensayo de unión de GTPyS

Para evaluar la actividad agonista del receptor opiáceo mu (MOR) de los compuestos positivos de la

selección de FLNA, los compuestos se probaron en un ensayo de unión [³⁵S]GTPyS usando membranas estriatales. Un estudio anterior ha demostrado que en las membranas estriatales, la activación de MOR lleva a un aumento en la unión de [³⁵S]GTPyS a Gao (Wang et al., 2005 Neuroscience 135:247-261). Este ensayo mide una consecuencia funcional de la ocupación del receptor en uno de los primeros eventos mediados por el receptor. El ensayo permite los parámetros farmacológicos tradicionales de potencia, eficacia y afinidad antagonista, con la ventaja de que las medidas de los agonistas no están sujetas a amplificación u otra modulación que pueda tener lugar cuando se analizan parámetros más en sentido descendente que el receptor.

Por tanto, el tejido estriatal se homogeneizó en 10 volúmenes de tampón HEPES 25 mM helado, pH 7,4, que contenía EGTA 1 mM, sacarosa 100 mM, 50 µg/ml de leupeptina, PMSF 0,04 mM, 2 µg/ml de inhibidor de tripsina de soja y 2-mercaptoetanol al 0,2%. Los homogeneizados se centrifugaron a 800 X g durante 5 minutos y los sobrenadantes se centrifugaron a 49.000 X g durante 20 minutos. Los sedimentos resultantes se suspendieron en 10 volúmenes de tampón de reacción, que contenía HEPES 25 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, 50 µg/ml de leupeptina, 2 µg/ml de inhibidor de tripsina de soja, PMSF 0,04 mM y 2-mercaptometanol al 0,02%.

La preparación de membranas estriatal resultante (200 µg) se mezcló y se mantuvo (incubó) a 30° C durante 5 minutos en tampón de reacción como anteriormente que contenía adicionalmente MgCl₂ 1 mM y de [³⁵S]GTPyS 0,5 nM (0,1 µCi/ensayo, PerkinElmer Life and Analytical Sciences) en un volumen total de 250 µl y continuó durante 5 minutos en ausencia o presencia de 0,1-10 µM de un compuesto ensayado de interés. La reacción se terminó mediante dilución con 750 l de tampón de reacción helado que contenían MgCl₂ 20 mM y EGTA 1 mM y centrifugación inmediata a 16.000 X g durante 5 minutos.

El sedimento resultante se solubilizó por sonicación durante 10 segundos en 0,5 ml de tampón de inmunoprecipitación que contenía 0,5% de digitonina, 0,2% de colato de sodio y 0,5% de NP-40. Se añadió suero de conejo normal (1 µl) a 1 ml de lisado y se incubó a 25° C durante 30 minutos. Los complejos inmunes no específicos se eliminaron mediante incubación con 25 µl de perlas de agarosa conjugada con proteína A/G a 25° C durante 30 minutos, seguido de centrifugación a 5.000 X g a 4° C durante 5 minutos. El sobrenadante se dividió y se incubó por separado a 25° C durante 30 minutos con anticuerpos producidos contra proteínas Gao (diluciones 1:1.000).

Los inmunocomplejos así formados se recogieron mediante incubación a 25° C durante 30 minutos con 40 µl de perlas de proteína A/G conjugadas con agarosa y centrifugación a 5.000 X g a 4° C durante 5 minutos. El sedimento se lavó y se suspendió en un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 y NP-40 al 1%. La radioactividad en la suspensión se determinó mediante espectrometría de centelleo líquido. La especificidad de la activación de MOR de unión de [³⁵S]GTPyS a Gao inducida por un compuesto selectivo se definió mediante la inclusión de β-funaltrexamina 1 µM (β-FNA; un derivado alquilante de naltrexona que es un antagonista de MOR selectivo). Se usó DAMGO (1 o 10 µM) como control positivo.

Los resultados de este estudio se muestran en las Tablas siguientes.

Actividad agonista MOR del Compuesto de unión a FLNA

Actividad agonista de MOR del compuesto de unión a FLNA de la serie C-2

Compuesto de unión a FLNA	Concentración del compuesto de unión a FLNA como agonista					
	0.1 µM	1 µM	1 µM+BFNA	% DAMGO (0.1µM)	% DAMGO (1 µM)	% DAMGO + BFNA
C0011	217.0%	305.0%	19.0%	126.8%	114.3%	36.5%
C0026	207.2%	288.4%	21.2%	107.7%	105.6%	48.3%
C0027	233.2%	313.9%	72.2%	121.3%	115.0%	164.5%
S-C0027	156.2%	286.8%	56.2%	74.2%	84.4%	98.1%
C0034-3	ND*	ND	ND	ND	ND	ND
C0037-2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C0040	145.8%	308.3%	90.4%	93.1%	133.2%	277.3%
C0043	175.4%	242.6%	83.3%	103.8%	110.9%	501.8%
C0044	173.7%	280.1%	59.1%	102.8%	128.0%	356.0%
C0045	149.2%	238.8%	105.3%	88.3%	109.1%	634.3%
C0046	286.2%	492.9%	156.8%	197.4%	211.5%	356.4%

(continuación)

Compuesto de unión a FLNA	Concentración del compuesto de unión a FLNA como agonista					
	0.1 μ M	1 μ M	1 μ M+BFNA	% DAMGO (0.1 μ M)	% DAMGO (1 μ M)	% DAMGO + BFNA
C0050	110.3%	127.6%	59.0%	76.1%	54.8%	134.1%
C0055	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C0056	98.6%	193.4%	86.3%	68.0%	83.0%	196.1%
C0060	166.5%	218.9%	143.9%	114.8%	93.9%	327.0%
C0086M	206.8%	265.3%	152.3%	117.5%	104.9%	692.3%
C0087M	262.8%	329.6%	142.5%	138.9%	132.8%	293.8%
C0088M	276.3%	355.3%	177.1%	160.5%	161.7%	513.3%
C0089M	234.5%	295.3%	81.9%	136.3%	134.4%	237.4%
C0090M	237.0%	341.0%	41.0%	137.7%	155.2%	118.8%
C0091M	207.9%	274.4%	80.8%	118.1%	108.5%	367.3%
C0093M	140.0%	211.8%	44.0%	81.3%	96.4%	127.5%
C0094M	172.5%	263.5%	115.3%	100.2%	119.9%	334.2%
C0095M	189.1%	224.6%	107.7%	107.4%	88.8%	489.5%
C0096M	186.4%	328.9%	127.1%	105.9%	130.0%	577.7%
C0099M	157.2%	195.7%	114.7%	93.8%	88.0%	241.5%
C0100M	173.6%	245.9%	195.6%	103.6%	110.6%	411.8%
C0101M	138.2%	274.3%	174.8%	82.5%	123.4%	368.0%
C0102M	131.8%	272.0%	150.4%	78.6%	122.4%	316.6%
C0104M	188.2%	238.9%	143.8%	99.5%	96.3%	296.5%
C0105M	198.1%	220.3%	73.1%	104.7%	88.8%	150.7%
C0106M	171.8%	240.7%	117.2%	102.5%	108.3%	246.7%
C0108M	205.6%	258.5%	76.9%	108.7%	104.1%	158.6%
C0114M	114.0%	144.3%	35.9%	77.6%	71.4%	91.3%
C0115M	177.2%	226.8%	118.4%	105.7%	102.0%	249.3%
C0116M	258.4%	302.8%	152.0%	136.6%	122.0%	313.4%
C0118M	166.2%	261.5%	79.2%	87.8%	105.4%	163.3%
C0119M	105.7%	167.8%	35.1%	71.9%	83.0%	89.3%
C0124M	252.0%	305.1%	61.4%	133.2%	122.9%	126.6%
C0125M	168.6%	195.2%	159.7%	89.1%	78.6%	329.3%
C0126M	181.8%	265.3%	108.5%	108.5%	119.3%	228.4%
C0128M	197.8%	286.0%	63.9%	104.5%	115.2%	131.8%
C0133M	139.4%	214.8%	72.4%	83.2%	96.6%	152.4%
C0134M	158.5%	207.3%	46.6%	94.6%	93.3%	98.1%
F-C0134	290.6%	378.9%	66.6%	138.1%	111.4%	116.2%
C0135M	161.3%	310.1%	113.3%	85.3%	124.9%	233.6%
C0136M (P5)	176.8%	237.3%	74.5%	93.4%	95.6%	153.6%
C0137M (P7)	180.8%	193.8%	55.8%	95.6%	78.1%	115.1%

(continuación)

Compuesto de unión a FLNA	Concentración del compuesto de unión a FLNA como agonista					
	0.1 μ M	1 μ M	1 μ M+BFNA	% DAMGO (0.1 μ M)	% DAMGO (1 μ M)	% DAMGO + BFNA
C0142M	143.7%	192.5%	98.7%	97.8%	95.2%	251.1%
C0143M	81.0%	193.3%	86.5%	47.1%	59.3%	94.7
C0144M-2	186.3%	295.9%	125.9%	108.3%	90.8%	137.9%
C0145M-3	193.0%	289.2%	87.0%	112.2%	88.7%	95.3%
C0149M-2	209.8%	406.7%	93.4%	122.0%	124.8%	102.3%
C0150M-2	167.1%	423.1%	158.1%	97.2%	129.8%	173.2%
C0151M-2	346.8%	397.6%	212.8%	201.6%	122.0%	233.1%
C0152M-2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C0153M-3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Media de DAMGO	168.5%	266.1%	53.2%	ND	ND	ND
* ND=No Hecho.						

Se llevó a cabo un estudio preliminar similar al inmediatamente anterior usando los Compuestos 4, 9 y 10 y el Compuesto C0134M resintetizado y DAMGO. A continuación se muestran los resultados de una media de dos ejecuciones para este estudio.

Compuesto	Concentración del compuesto de unión a FLNA como agonista		
	0.1 μ M	1 μ M	1 μ M+ β NFA
4	133.9%	165.2%	49.5%
9	156.6%	197.2%	56.6%
10	163.1%	191.8%	60.4%
C0134M	150.7%	224.0%	53.2%
DAMGO	144.7%	233.4%	56.8%

Los resultados anteriores indican que los Compuestos 9 y 10 no solo se unen bien a FLNA, sino que también son agonistas de MOR, mientras que el Compuesto 4 se unió bien a FLNA, pero no fue un agonista de MOR tan potente como lo fueron los otros dos compuestos. El Compuesto C0134M recién sintetizado mostró una actividad agonista de MOR similar a la mostrada anteriormente.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio *in vitro* bajo la dirección de Hoau-Yan Wang, Ph.D. por el Departamento de Fisiología, Farmacología y Neurociencia, CUNY Medical School, 138th Street and Convent Avenue, New York, NY 10031, para evaluar los dos compuestos principales de unión a filamina A (FLNA), C0105 y C0114 para su capacidad de bloquear la asociación de FLNA inducido por amiloide beta ($A\beta_{42}$) - receptor de acetilcolina nicotínico $\alpha 7$ ($\alpha 7nAChR$) y fosforilación de tau, indicando su potencial para tratar la enfermedad de Alzheimer.

Animales

Se usaron ratas Sprague Dawley adultas (2 meses de edad) para cultivos de cortes frontocorticales organotípicos. Las ratas se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con comida y agua. Todos los procedimientos de los animales cumplen con la National Institutes of Health Guide for Care Use of Laboratory Animals y fueron aprobados por el City College of New York Animal Care and Use Committee.

Cultivos de cortes frontocorticales organotípicos.

Se modificaron los métodos de cultivo organotípico de cortes de cerebro de rata de los publicados anteriormente. [Adamchik et al., Brain Res Brain Res Protoc 5:153-158 (2000)]. Los cortes de FCX (200 μ M de

grosor) se transfirieron a insertos Millicell-CM porosos estériles (0,4 μ m). Cada unidad de inserto de cultivo contenía dos cortes de cerebro y se colocó en pocillos individuales de una bandeja de cultivo de 12 pocillos en 2 ml de medio: MEM al 50% con sales de Earl, L-glutamina 2 mM, solución de sal equilibrada de Earl al 25%, 6,5 g/l de D-glucosa, suero bovino fetal (FBS) al 20%, suero de caballo al 5%, tampón HEPES 25 mM, pH 7,2, y 50 mg/ml de estreptomicina y 50 mg/ml de penicilina. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora durante 2 días a 36° C en 5% de CO₂ para minimizar el impacto de la lesión por la preparación del corte.

En el día del experimento, el medio se retiró, los cortes de cerebro se enjuagaron y se incubaron en medio que contenía FBS al 0,1% durante 4 horas a 36° C en 5% de CO₂. Los cortes de cerebro se cultivaron luego con A β ₄₂ 100 nM y/o 0,1, 1 nM de compuesto C0105 o compuesto C0114 en medio fresco que contenía FBS al 0,1% durante 16 horas. Los cortes de cerebro (6 cortes para cada experimento) se lavaron con Krebs-Ringer helado y se usaron para evaluar el nivel del complejo α 7nAChR-FLNA y tau fosforilada (pS²⁰²-, pT²³¹-y pT¹⁸¹-tau). Los cortes de cerebro también se usaron para determinar la actividad de α 7nAChR y NMDAR por el nivel de afluencia de calcio a través de cada uno de estos dos canales y el nivel de muerte celular usando la afluencia de calcio mediada por el canal de calcio dependiente de voltaje.

Para la inmunohistoquímica, se eliminaron cortes adicionales y se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS a 4° C. El efecto de C0105 y C0114 sobre la acumulación intraneuronal de A β ₄₂ se determinó por el nivel de inmunotinción de A β ₄₂.

Preparación del sinaptosoma cerebral.

Los sinaptosomas cerebrales (fracción P2) se prepararon a partir de cultivos de corte FCX. Siguiendo los métodos descritos anteriormente, [Wang et al., J Biol Chem 278:31547-31553 (2003)] FCX se solubilizó inmediatamente después de la eliminación de los cultivos para obtener los sinaptosomas. Los sinaptosomas se lavaron dos veces y se suspendieron en 2 ml de Krebs-Ringer (KR) helado: HEPES 25 mM, pH 7,4; NaCl 118 mM, KCl 4,8 mM, NaHCO₃ 25 mM, CaCl₂ 1,3 mM, MgSO₄ 1,2 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, glucosa 10 mM, ácido ascórbico 100 μ M, mezcla de proteasa e inhibidores de la proteína fosfatasa (Roche Diagnostics) que había sido aireado durante 10 minutos con 95% de O₂ /5% de CO₂. La concentración de proteína se determinó usando el método de Bradford (Bio-Rad).

Estudios *in vitro* usando tejidos de FCX organotípicos

Para evaluar el efecto de los compuestos C0105 y C0114 sobre los niveles de interacción de α 7nAChR-FLNA inducida por A β ₄₂ y fosforilación de tau (pS²⁰²-, pT²³¹-y pT¹⁸¹-tau), se usó el sistema de cultivo de cortes corticales frontales de rata. El FCX de cerebro de rata se cortó coronariamente en cortes de 200 μ m usando un cortador McIlwain (Brinkman Instruments) y se suspendió en 10 ml de KR oxigenado helado.

El cultivo organotípico de los cortes de cerebro de rata se realizó como se ha descrito anteriormente. [Wang et al., Biol Psychiatry 67, 522-530 (2010).] Los cortes de FCX de rata se transfirieron a un inserto Millicell-CM estéril poroso de 0,4 μ m, 2 cortes por inserto por pocillo que contiene 2 ml de medio: MEM al 50% con sales de Earl, L-glutamina 2 mM, solución salina equilibrada de Earl al 25%, 6,5 g/l de D-glucosa, suero bovino fetal al 20% (FBS), suero de caballo al 5%, tampón HEPES 25 mM, pH 7,2 y 50 mg/ml de estreptomicina y 50 mg/ml de penicilina. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora durante 2 días a 36° C en CO₂ al 5%.

El día del estudio, se eliminó el medio, los cortes de cerebro se enjuagaron y se incubaron en medio que contenía FBS al 0,1% durante 4 horas a 36° C en 5% de CO₂. Los cortes de cerebro se cultivaron luego con A β ₄₂ 0,1 μ M junto con 0,1, 1 o 10 nM del Compuesto C0105 o 1 o 10 nM de C0114 en medio fresco que contenía FBS al 0,1% durante 16 horas. Los corte de cerebro luego se retiraron y se lavaron con PBS helado tres veces y se procesaron para los ensayos funcionales que se describen a continuación o se fijaron en paraformaldehído PBS al 4% enfriado helado a 4° C para la determinación del agregado de A β ₄₂ intraneuronal y los niveles de NFT mediante un método inmunohistoquímico.

1) Asociación de FLNA con α 7nAChR y otros receptores

El nivel de α 7nAChR asociado a FLNA se determinó usando un método de co-inmunoprecipitación/transferencia Western como se ha descrito anteriormente. [Wang et al., Biol Psychiatry 67:522-530 (2010); Wang et al., PLoS One 3:e1554 (2008); Wang et al., J Neurosci 35:10961-10973 (2009)] Brevemente, el extracto de corte de cerebro (200 μ g) se incubó con 1 μ g de anti-FLNA inmovilizado en perlas de agarosa de proteína A a 4° C durante la noche (aproximadamente 18 horas) con rotación constante de extremo a extremo. Los inmunocomplejos anti-FLNA se obtuvieron mediante centrifugación, y luego se lavaron y se disociaron usando un tampón de elución de antígeno. Después de la neutralización con Tris 1,5 M, pH 8,8, los complejos de proteínas asociadas a FLNA resultantes se solubilizaron hirviendo durante 5 minutos en un tampón de preparación de muestras que contenía SDS. Los niveles de α 7nAChR, TLR4, IR y MOR asociados con FLNA se evaluaron mediante transferencia Western usando anticuerpos específicos dirigidos contra las proteínas respectivas y la

transferencia se separó y se volvió a sondear para FLAN para control inmunoprecipitación/carga.

2) Fosforilación de tau

Usando un método establecido, [Wang et al., J Biol Chem 278:31547-31553 (2003); Wang et al., Biol Psychiatry 67:522-530 (2010)] se inmunoprecipitaron proteínas tau con anti-tau inmovilizado (SC-65865), que no discrimina entre los estados de fosforilación. Los niveles de tau fosforilada (pSer202tau, pThr231tau y pThr181tau), así como el tau total precipitado (controles de carga) se evalúan mediante transferencia Western usando anticuerpos específicos dirigidos contra cada uno de los fosfoepítomos y el anti-tau, respectivamente.

3) Evaluación funcional de $\alpha 7$ nAChR y NMDAR

Se evaluó el efecto de los compuestos C0105 y C0114 en función de $\alpha 7$ nAChR y NMDAR en cultivos de cortes de FCX organotípicos tratados con vehículo, 0,1 μ M A β_{42} o 0,1 μ M A β_{42} +0,1-10 nM C0105 o 1-10 nM C0114. Los sinaptosomas preparados a partir de cortes de FCX de rata (6 cortes/ensayo) se lavaron dos veces en KR helado, se centrifugaron y se resuspendieron en 0,5 ml de KR.

Se midió la afluencia de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ mediada por NMDAR y $\alpha 7$ nAChR como se ha descrito anteriormente. [Wang et al., Biol Psychiatry 67:522-530 (2010).] Los sinaptosomas (50 μ g) se incubaron a 37° C durante 5 minutos en Mg $^{2+}$ +KR 0,3 mM oxigenado que contenía $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 5 μ M (10 Ci/mmol, PerkinElmer) seguido de incubación con vehículo, NMDA 0,1-10 μ M/glicina 1 μ M o PNU282987 0,1-10 μ M (un agonista potente y selectivo para el subtipo $\alpha 7$ de receptores de acetilcolina nicotínicos neurales) durante 5 minutos. La reacción se terminó con 1 ml de K-R libre de Ca^{2+} que contenía EGTA 0,5 mM helado y centrifugación. Después de dos lavados, se evaluaron los contenidos de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ sinaptosomales usando espectrometría de centelleo.

El $^{45}\text{Ca}^{2+}$ de fondo se estimó usando sinaptosomas lisados de manera hipotónica. La afluencia de Ca^{2+} absoluta se calculó restando el recuento de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ de fondo. El porcentaje de aumento en la afluencia de Ca^{2+} se calculó como % [(vehículo tratado con fármaco)/vehículo].

4) Muerte celular medida por afluencia de Ca^{2+} provocada por K^{+}

Como el nivel de actividad del canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje es indicativo de la integridad de las células, se evaluó el efecto de los compuestos C0105 y C0114 sobre la muerte celular inducida por A β_{42} en cultivos de cortes de FCX organotípicos tratados con vehículo, A β_{42} 0,1 μ M o A β_{42} 0,1 μ M + compuesto C0105 0,1-10 nM o compuesto C0114 1-10 nM usando la afluencia de Ca^{2+} mediada por despolarización de K^{+} . Los sinaptosomas preparados a partir de cortes de FCX de rata (6 cortes/ensayo) se lavaron dos veces en KR helado, se centrifugaron y se resuspendieron en 0,5 ml de KR. El nivel de la afluencia de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ mediada por el canal de Ca^{2+} dependiente del voltaje se midió como se ha descrito anteriormente. [Wang et al., Biol Psychiatry 67:522-530 (2010)].

Los sinaptosomas (50 μ g) se incubaron a 37° C durante 5 minutos en Mg $^{2+}$ K-R 0,3 mM oxigenado que contenía $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 5 μ M (10 Ci/mmol, PerkinElmer) seguido de incubación con vehículo o K^{+} 65 mM (elaborado con reemplazo isomolar de Na^{+}) durante 1 minuto. La reacción se terminó con 1 ml de K-R libre de Ca^{2+} que contenía EGTA 0,5 mM helado y centrifugación. Después de dos lavados, se evaluaron los contenidos de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ sinaptosomales usando espectrometría de centelleo. El $^{45}\text{Ca}^{2+}$ de fondo se estimó usando sinaptosomas hipotónicamente lisados. La afluencia de Ca^{2+} absoluta se calculó restando el recuento de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ de fondo. El porcentaje de aumento en la afluencia de Ca^{2+} se calculó como % [(vehículo tratado con fármaco)/vehículo].

5) Medición de los niveles de las moléculas de señalización asociadas con NMDAR o IR después de la estimulación del receptor

La señalización de NMDAR y su interacción con la proteína de anclaje sináptica, PSD-95, se compararon en cortes de cerebro de cultivo organotípico FCX tratados con vehículo, A β_{42} 0,1 M y A β_{42} 0,1 M + compuesto C0105 0,1-10 nM o Compuesto C0114 1 y 10 nM durante 16 horas. La activación y señalización de NMDAR se inició mediante la incubación de 6 cortes con KR que contenía Mg $^{2+}$ 0,3 mM (LMKR; basal) o LMKR que contenía NMDA 10 μ M y glicina 1 μ M a 37° C durante 30 minutos.

La mezcla de incubación se aireó con 95% de O_2 /5% de CO_2 cada 10 minutos durante 1 minuto durante la estimulación. La estimulación del ligando se terminó con la adición de 1 ml de una mezcla de K-R libre de Ca^{2+} helado de inhibidores de la proteína fosfatasa, EGTA 0,5 mM y EDTA 0,1 mM. Los cortes de cerebro se recogieron mediante una breve centrifugación y se homogeneizaron en 0,25 ml de tampón de inmunoprecipitación helado. Los homogeneizados se centrifugaron a 1000 x g durante 5 minutos (4° C) y el sobrenadante (fracción post-mitocondrial) se trató con ultrasonidos durante 10 segundos en hielo.

Las proteínas se solubilizaron en digitonina al 0,5%, colato de sodio al 0,2% y NP-40 al 0,5% durante 60

minutos a 4° C con rotación de extremo a extremo. Los lisados resultantes se depuraron mediante centrifugación a 50.000 x g durante 5 minutos y se diluyeron con 0,75 ml de tampón de inmunoprecipitación. Las concentraciones de proteína se midieron por el método de Bradford (Bio-Rad).

Para determinar la asociación de los NMDAR con PSD-95, así como la señalización de NMDAR, se midieron los niveles de subunidades de NMDAR, PSD-95 y moléculas de señalización asociadas a NMDAR en inmunoprecipitados anti-NR1. En estos estudios, se inmunoprecipitaron lisados de cortes de cerebro (100 µg) durante la noche a 4° C con 2 µg de anti-NR1 inmovilizado sobre perlas de proteína A agarosa conjugadas covalentemente (Pierce-ENDOGEN). Los inmunoprecipitados anti-NR1 se incubaron con 75 µl de tampón de elución de antígeno (Pierce-ENDOGEN) y SDS al 2% durante 2 minutos en hielo, se centrifugaron para eliminar los complejos de anticuerpo-proteína A-agarosa y se neutralizaron inmediatamente con 10 µl de tampón Tris 1,5 M, pH 8,8, seguido de la adición de 65 µl de tampón de muestra 2 X PAGE y se hierve durante 5 minutos.

Setenta y cinco µl de los eluidos obtenidos (50%) se fraccionaron por tamaño en SDS-PAGE al 7,5%. Las proteínas se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa y se midieron los niveles de varias subunidades del receptor de NMDA, PSD-95, proteínas de señalización usando transferencia Western con anticuerpos para PSD-95, nNOS, fosfolipasa C-γ1, γPKC, pY⁴⁰²PyK2, pY⁴¹⁶Src o fosfotirosina. Las transferencias se separaron y se volvieron a sondear con anti-NR1 para evaluar la eficacia y la carga de la inmunoprecipitación.

La activación de IR y la señalización se iniciaron mediante la incubación de 6 cortes que se cortaron además horizontalmente en 100 µm (100 µm x 200 µm x 3 mm) con KR (basal) o KR que contenía insulina 1 nM a 37° C durante 30 minutos. La mezcla de incubación se aireó con 95% de O₂/5% de CO₂ cada 10 minutos durante 1 minuto durante la estimulación. La estimulación del ligando se terminó con la adición de 1 ml de mezcla que contenía K-R libre de Ca²⁺ helada de inhibidores de la proteína fosfatasa, EGTA 0,5 mM y EDTA 0,1 mM. Los cortes de cerebro se recogieron mediante una breve centrifugación y se homogeneizaron en 0,25 ml de tampón de inmunoprecipitación helado. Los homogeneizados se centrifugaron a 1000 x g durante 5 minutos (4° C) y el sobrenadante (fracción post-mitocondrial) se sonicó durante 10 segundos en hielo. Las proteínas se solubilizaron en digitonina al 0,5%, colato de sodio al 0,2% y NP-40 al 0,5% durante 60 minutos a 4° C con rotación de extremo a extremo. Los lisados resultantes se depuraron por centrifugación a 50.000 x g durante 5 minutos y se diluyeron con 0,75 ml de tampón de inmunoprecipitación. Las concentraciones de proteína se midieron por el método de Bradford (Bio-Rad).

Para determinar la activación y señalización de IR, se midieron los niveles de pY^{1150/1151}IRβ y el nivel de transductor de señal de IR, IRS-1 en los inmunoprecipitados de anti-IRβ. En estos experimentos, se inmunoprecipitaron lisados de cortes de cerebro (100 µg) durante la noche (aproximadamente 18 horas) a 4° C con 2 µg de anti-IRβ inmovilizado sobre perlas de proteína A-agarosa conjugadas covalentemente (Pierce-ENDOGEN).

Los inmunoprecipitados anti-IRβ se incubaron con 75 µl de tampón de elución de antígeno (Pierce-ENDOGEN) y SDS al 2% durante 2 min en hielo, se centrifugaron para eliminar los complejos de anticuerpo proteína A-agarosa y se neutralizaron inmediatamente con 10 µl de tampón Tris 1,5 M, pH 8,8 seguido de la adición de 65 µl de tampón de muestra 2 X PAGE y se hierve durante 5 minutos. Setenta y cinco µl de los eluidos obtenidos (50%) se fraccionaron por tamaño en SDS-PAGE al 7,5%. Las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y se midieron los niveles de proteínas pY^{1150/1151}IRβ y IRS-1 usando transferencia Western con anticuerpos para pY^{1150/1151}IRβ e IRS-1. Las transferencias se separaron y se volvieron a sondear con anti-IRβ para evaluar la eficacia y la carga de la inmunoprecipitación.

6) Estudios inmunohistoquímicos.

Se usó inmunohistoquímica cuantitativa en secciones de 5 µm consecutivas que contenían PFCX y corteza entorrinal/HP para determinar los niveles de agregados/placas de Aβ₄₂ y patología neurofibrilar (NFT y inmunoreactividad de filamento helicoidal emparejada [PHF]) usando inmunohistoquímica de marcado único como se ha descrito anteriormente. [Wang et al., Biol Psychiatry 67:522-530 (2010); D'Andrea et al., Histopathology 38:120-134 (2001); Nagele et al., Neuroscience 110: 99-211 (2002).] Una sección se inmunotifó con anti-NFT o -PHF. La siguiente sección (consecutiva) (que a menudo contiene la misma neurona) se inmunotifó con anticuerpos anti-Aβ₄₂ para medir los niveles relativos de péptido Aβ₄₂ acumulado en las neuronas. La tasa/extensión de la acumulación relativa de Aβ₄₂ se comparó entre diferentes tipos de células en secciones de cortes de FCX cultivados y cerebros de ratón infundidos con icv Aβ₄₂ usando un análisis de imágenes asistido por ordenador como se ha descrito anteriormente [Wang et al. J Biol Chem 275:5626-5632 (2000)].

Los cortes de cerebro se fijaron a 4° C en formalina al 10% tamponada con fosfato 0,15 M, pH 7,4 durante 2 semanas, se embebieron en parafina, se seccionaron en serie a 5 µm y se procesaron para inmunohistoquímica de campo brillante como se ha descrito anteriormente [Wang et al., J Biol Chem. 275:5626-5632 (2000)]. La inmunoreactividad de Aβ₄₂ estaba ausente cuando se pre-absorbía el anti-Aβ₄₂ con Aβ₄₂ pero no Aβ₄₂₋₁. Las muestras se examinaron usando un microscopio Nikon FXA con una cámara CCD Princeton Instruments y se registraron digitalmente.

Las intensidades relativas de la inmunorreactividad NFT/PHF y A β ₄₂ se midieron y se compararon entre tipos celulares similares y diferentes usando el software Image Pro Plus y Metamorph como se ha descrito anteriormente [D'Andrea et al., *Histopathology* 38:120-134 (2001)]. También se determinaron las correlaciones entre la cantidad de inmunorreactividad NFT/PHF y el material positivo de A β ₄₂ acumulado dentro de las neuronas maduras.

Estudios in Vivo

Se realizó un estudio *in vivo* bajo la dirección de Hoau-Yan Wang, Ph.D. por el Departamento de Fisiología, Farmacología y Neurociencia, CUNY Medical School, 138th Street and Convent Avenue, Nueva York, NY 10031, en un modelo de infusión de beta amiloide ₄₂ (A β ₄₂) de la enfermedad de Alzheimer para la capacidad 1) de bloquear la asociación de FLNA inducida por A β ₄₂ con el receptor de acetilcolina nicotínico α 7 (α 7nAChR) y el receptor tipo toll 4 (TLR4), 2) la fosforilación de tau y 3) y la asociación A β ₄₂- α 7nAChR que indica la posibilidad de tratar la enfermedad de Alzheimer.

Modelo de ratón para infusión de ICV A β ₄₂

Se usaron ratones E129 macho y hembra de ocho semanas de edad (30-35 g), progenie de los pares reproductores de Taconic (Germantown, Nueva York) en el estudio intracerebroventricular (ICV) de A β ₄₂. Los ratones se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con comida y agua. Todos los procedimientos para animales cumplen con la *National Institutes of Health Guide for Care Use of Laboratory Animals* y fueron aprobados por el City College of New York Animal Care and Use Committee.

Administración de A β ₄₂ intracerebroventricular y tratamiento con compuestos

Se colocaron ratones anestesiados con 30 mg/kg de pentobarbital sódico por vía intraperitoneal en un aparato de cirugía estereotáxica de ratón como se describe por Wang et al., *Biol Psychiatry* 67:522-530 (2010). Los ratones que recibieron una infusión continua de 7 días de ICV A β ₄₂ se implantaron con una minibomba para ratones (Alzet) que administra 0,1 μ l/hora a través de una cánula asegurada con pegamento quirúrgico colocada en el ventrículo izquierdo en las siguientes coordenadas: [anterior-posterior de bregma, 3,0 mm; lateral, 1,0 mm; horizontal, 3,0 mm]. El A β ₄₂ (0,2 nmol/ μ l) se disolvió en DMSO al 10% que contenía Tris 50 mM, pH 9,0, para evitar la agregación. Cada ratón recibió A β ₄₂ 4,8 nmol diariamente durante 7 días. Los ratones de control recibieron una infusión de vehículo ICV durante 7 días.

Para evaluar el efecto del Compuesto C0105 *in vivo* sobre los efectos provocados por A β ₄₂, los ratones recibieron 10 mg/kg del Compuesto C0105 por inyección intraperitoneal (i.p.) diaria durante 2 semanas comenzando el día de la cirugía (día 1: 2 horas después de la recuperación de la cirugía, día 2-14 dos veces al día: entre 10-11 a.m. y 3-4 p.m.). Veinticuatro horas después de la última inyección, se solubilizaron FCX e hipocampo de medio cerebro para la evaluación del nivel del complejo α 7nAChR-FLNA y tau fosforilada (pS²⁰²-, pT²³¹- y pT¹⁸¹-tau) usando métodos publicados [Wang et al., *Biol Psychiatry* 67:522-530 (2010)].

Se evaluó si los compuestos tienen un efecto sobre los niveles de acoplamiento de A β ₄₂- α 7nAChR porque la disociación de A β ₄₂ de α 7nAChR es beneficiosa para reducir las patologías de la EA. [Wang et al., *Biol Psychiatry* 67:522-530 (2010); Wang et al., *J Neurosci* 35:10961-10973 (2009).] Además, la corteza prefrontal (PFCX) se usa para determinar el nivel de actividad sináptica usando la actividad de α 7nAChR y NMDAR como guía. Las otras mitades cerebrales se fijaron por inmersión en frío formalina al 10% tamponada con fosfato 0,15 M frío, pH 7,4, y se procesaron para determinaciones inmunohistoquímicas de agregados/placas A β ₄₂ intraneuronales y NFT así como la integridad morfológica.

Preparación de sinaptosomas cerebrales

Los sinaptosomas cerebrales (fracción P2) se prepararon a partir de la corteza prefrontal y el hipocampo de ratones tratados sacrificados por decapitación rápida. Siguiendo los métodos descritos anteriormente [Wang et al., *J Biol Chem* 278:31547-31553 (2003)], el tejido se solubilizó inmediatamente después de la recolgida para obtener los sinaptosomas. Los sinaptosomas se lavaron dos veces y se suspendieron en 2 ml de Krebs-Ringer (KR) helado: HEPES 25 mM, pH 7,4; NaCl 118 mM, KCl 4,8 mM, NaHCO₃ 25 mM, CaCl₂ 1,3 mM, MgSO₄ 1,2 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, glucosa 10 mM, ácido ascórbico 100 μ M, mezcla de proteasa e inhibidores de la proteína fosfatasa (Roche Diagnostics) que se había aireado durante 10 minutos con 95% de O₂ /5% de CO₂. La concentración de proteína se determinó usando el método de Bradford (Bio-Rad).

Evaluaciones ex vivo de tejidos de ratones tratados

Usando sinaptosomas preparados a partir de la corteza prefrontal o hipocampus de ratones que recibieron infusiones ICV continuas de vehículo o A β ₄₂ e inyecciones i.p. dos veces al día del Compuesto C0105 o vehículo, estos estudios evaluaron el efecto del Compuesto C0105 sobre la interacción de α 7nAChR-FLNA inducida por A β ₄₂,

los niveles de fosforilación de tau (pS^{202-} , pT^{231-} y pT^{181-} -tau), la interacción $A\beta_{42}$ - $\alpha 7nAChR$ y alteraciones de señalización.

1) Interacción $\alpha 7nAChR$ -FLNA/TLR4

El nivel de $\alpha 7nAChR$ y TLR4 asociados con FLNA se determinó usando un método de co-inmunoprecipitación/transferencia Western como se ha descrito anteriormente [Wang et al., Biol Psychiatry 67:522-530 (2010); Wang et al., J Neurosci 35:10961-10973 (2009); y Wang et al., PLoS One 3:e1554 (2008)]. Brevemente, los extractos sinaptosomales (200 μg) preparados a partir de la corteza prefrontal o el hipocampo de ratones tratados se incubaron con 1 μg de anti-FLNA inmovilizado en perlas de proteína A-agarosa a 4° C durante la noche (aproximadamente 18 horas) con rotación constante de extremo a extremo. Los inmunocomplejos anti-FLNA se obtuvieron mediante centrifugación, se lavaron y se disociaron usando tampón de elución de antígeno. Después de la neutralización con Tris 1,5 M, pH 8,8, los complejos de proteínas asociadas a FLNA resultantes se solubilizaron hirviendo durante 5 minutos en un tampón de preparación de muestras que contenía SDS. Los niveles de $\alpha 7nAChR$ y TLR4 asociados a FLNA se evaluaron mediante transferencia Western y la transferencia se separó y se volvió a sondear para FLNA para el control de inmunoprecipitación/carga.

Para evaluar el efecto de $A\beta_{42}$ elevados y el tratamiento con Compuesto C0105 sobre la expresión de FLNA y $\alpha 7nAChR$, se midieron los niveles de FLNA y $\alpha 7nAChR$ en el extracto de tejido mediante transferencia Western con β -actina como control de carga.

2) Fosforilación de tau

Usando métodos establecidos [Wang et al., Biol Psychiatry 67:522-530 (2010); y Wang et al., J Biol Chem 278:31547-31553 (2003)], las proteínas tau se inmunoprecipitaron con anti-tau inmovilizado (SC-65865), que no discrimina entre los estados de fosforilación. Los niveles de tau fosforilado ($pSer^{202}tau$, $pThr^{231}tau$ y $pThr^{181}tau$), así como el total de tau precipitado (controles de carga) se evaluaron mediante transferencia Western usando anticuerpos específicos dirigidos contra cada uno de los fosfoepítomos y el anti-tau, respectivamente.

3) Interacción $A\beta_{42}$ - $\alpha 7nAChR$

El nivel de los complejos $A\beta_{42}$ - $\alpha 7nAChR$ se midió en sinaptosomas de la corteza prefrontal y el hipocampo de ratones tratados usando un método establecido [Wang et al., Biol Psychiatry 67:522-530 (2010); y Wang et al., J Biol Chem 278:31547-31553 (2003)]. Brevemente, los complejos de $A\beta_{42}$ - $\alpha 7nAChR$ se inmunoprecipitaron con anti- $A\beta_{42}$ inmovilizado y los contenidos de $\alpha 7nAChR$ se midieron mediante transferencia de Western. Se añadió anti-actina a la inmunoprecipitación y el nivel de β -actina en los inmunoprecipitados sirvió como control de inmunoprecipitación/carga.

4) Evaluación funcional de $\alpha 7nAChR$ y NMDAR

Se evaluó el efecto del Compuesto C0105 sobre la función de $\alpha 7nAChR$ y NMDAR en ratones infundidos con $A\beta_{42}$ o vehículo. Los sinaptosomas preparados a partir de la corteza prefrontal o el hipocampo se lavaron dos veces en K-R helado, se centrifugaron y se resuspendieron en 0,5 ml de KR.

Se midió la afluencia de $^4Ca^{2+}$ mediada por NMDAR y $\alpha 7nAChR$ como se ha descrito anteriormente [Wang et al., Biol Psychiatry 67:522-530 (2010)]. Los sinaptosomas (50 μg) se incubaron a 37° C durante 5 minutos en Mg^{2+} K-R 0,3 mM oxigenado que contenía $^{45}Ca^{2+}$ 5 μM (10 Ci/mmol, PerkinElmer) seguido de incubación con vehículo, NMDA 0,1-10 μM /glicina 1 μM o PNU282987 0,1- 10 μM durante 5 minutos. La reacción se terminó con una mezcla de 1 ml de K-R libre de Ca^{2+} que contenía EGTA 0,5 mM helada y centrifugación.

Después de dos lavados, se evaluaron los contenidos de $^{45}Ca^{2+}$ sinaptosomales usando espectrometría de centelleo. El $^{45}Ca^{2+}$ de fondo se estimó usando sinaptosomas hipotónicamente lisados. Se calculó la afluencia de Ca^{2+} absoluta restando el recuento de $^{45}Ca^{2+}$ de fondo. El porcentaje de aumento en la afluencia de Ca^{2+} se calculó como% [(vehículo tratado con fármaco)/vehículo].

5) Muerte celular medida por la afluencia de Ca^{2+} provocada por K^+

Debido a que el nivel de actividad del canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje es indicativo de la integridad de las células, se evaluó el efecto del Compuesto C0105 sobre la muerte celular inducida por $A\beta_{42}$ en ratones tratados usando afluencia de Ca^{2+} mediada por despolarización de K^+ . Los sinaptosomas preparados a partir de la corteza prefrontal se lavaron dos veces en K-R helado, se centrifugaron y se resuspendieron en 0,5 ml de K-R.

El nivel de afluencia de $^{45}Ca^{2+}$ mediada por el canal de Ca^{2+} dependiente del voltaje se midió como se ha descrito anteriormente [Wang et al., Biol Psychiatry 67:522-530 (2010)]. Los sinaptosomas (50 μg) se incubaron a 37° C durante 5 minutos en Mg^{2+} K-R 0,3 mM oxigenado que contenía $^{45}Ca^{2+}$ 5 μM (10 Ci/mmol, PerkinElmer) seguido

de incubación con vehículo o K^+ 65 mM (elaborado con reemplazo isomolar de Na^+) durante 1 minuto. La reacción se terminó con una mezcla de 1 ml de K-R libre de Ca^{2+} que contenía EGTA 0,5 mM helado y centrifugación.

Después de dos lavados, se evaluó el contenido de $^{45}Ca^{2+}$ sinaptosomal mediante espectrometría de centelleo. El $^{45}Ca^{2+}$ de fondo se estimó usando sinaptosomas hipotónicamente lisados. La afluencia de Ca^{2+} absolutase calculó restando el recuento de $^{45}Ca^{2+}$ de fondo. El porcentaje de aumento en la afluencia de Ca^{2+} se calculó como % [(vehículo tratado con fármaco)/vehículo].

6) Medición de los niveles de las moléculas de señalización asociadas con NMDAR o IR después de la estimulación del receptor

Se compararon la señalización de NMDAR y su interacción con la proteína de anclaje sináptica, PSD-95 en sinaptosomas de ratones tratados. La activación y señalización de NMDAR se inició mediante la incubación de 6 cortes con KR que contenía Mg^{2+} 0,3 mM (LMKR; basal) o LMKR que contenía NMDA 10 μ M y glicina 1 μ M a 37° C durante 30 minutos.

La mezcla de incubación se aireó con 95% de O_2 /5% de CO_2 cada 10 minutos durante 1 minuto durante la estimulación. La estimulación de ligandos se terminó con la adición de 1 ml de una mezcla de K-R libre de Ca^{2+} helado de inhibidores de proteína fosfatasa, EGTA 0,5 mM y EDTA 0,1 mM. Después de la recogida, los tejidos se centrifugaron brevemente y se homogeneizaron en 0,25 ml de tampón de inmunoprecipitación helado. Los homogeneizados se centrifugaron a 1000 x g durante 5 minutos (4° C) y el sobrenadante (fracción post-mitocondrial) se sonicó durante 10 segundos en hielo.

Las proteínas se solubilizaron en digitonina al 0,5%, colato de sodio al 0,2% y NP-40 al 0,5% durante 60 minutos a 4° C con rotación de extremo a extremo. Los lisados resultantes se depuraron mediante centrifugación a 50.000 x g durante 5 minutos y se diluyeron con 0,75 ml de tampón de inmunoprecipitación. Las concentraciones de proteína se midieron por el método de Bradford (Bio-Rad).

Para determinar la asociación de los NMDAR con PSD-95 así como la señalización de NMDAR, se midieron los niveles de las subunidades de NMDAR, PSD-95 y las moléculas de señalización asociadas a NMDAR en inmunoprecipitados anti-NR1. En estos estudios, los lisados de tejido cerebral (100 μ g) se inmunoprecipitaron durante la noche (aproximadamente 18 horas) a 4° C con 2 μ g de anti-NR1 inmovilizado en perlas de proteína A-agarosa conjugadas covalentemente (Pierce-ENDOGEN). Los inmunoprecipitados anti-NR1 se incubaron con 75 μ l de tampón de elución de antígeno (Pierce-ENDOGEN) y SDS al 2% durante 2 minutos en hielo, se centrifugaron para eliminar los complejos de anticuerpo-proteína A-agarosa y se neutralizaron inmediatamente con 10 μ l de tampón Tris 1,5 M, pH 8,8, seguido de la adición de 65 μ l de tampón de muestra 2 X PAGE y se hierve durante 5 minutos.

Setenta y cinco μ l de los eluidos obtenidos (50%) se fraccionaron por tamaño en SDS-PAGE al 7,5%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se midieron los niveles de varias subunidades del receptor de NMDA, PSD-95, proteínas de señalización usando transferencia Western con anticuerpos para PSD-95, nNOS, fosfolipasa C- γ 1, yPKC, pY⁴⁰²PyK2, pY⁴¹⁶Src o fosfotirosina. Las transferencias se eliminaron y se volvieron a sondear con anti-NR1 para evaluar la eficacia y la carga de la inmunoprecipitación.

La activación y señalización de IR se inició mediante la incubación de tejido con K-R (basal) o K-R que contenía insulina 1 nM a 37° C durante 30 minutos. La mezcla de incubación se aireó con 95% de O_2 /5% de CO_2 cada 10 minutos durante 1 minuto durante la estimulación. La estimulación de ligando se terminó con la adición de 1 ml de una mezcla que contenía K-R libre de Ca^{2+} helado de inhibidores de la proteína fosfatasa, EGTA 0,5 mM y EDTA 0,1 mM.

Los tejidos se centrifugaron brevemente y se homogeneizaron en 0,25 ml de tampón de inmunoprecipitación helado. Los homogeneizados se centrifugaron a 1000 X g durante 5 minutos (4° C) y el sobrenadante (fracción post-mitocondrial) se sonicó durante 10 segundos en hielo. Las proteínas se solubilizaron en digitonina al 0,5%, colato de sodio al 0,2% y NP-40 al 0,5% durante 60 minutos a 4° C con rotación de extremo a extremo. Los lisados resultantes se depuraron luego por centrifugación a 50.000 X g durante 5 minutos y se diluyeron con 0,75 ml de tampón de inmunoprecipitación. Las concentraciones de proteína se midieron por el método de Bradford (Bio-Rad).

Para determinar la activación y señalización de IR, se midieron los niveles de pY^{1150/1151}IR β y el nivel de transductor de señales de IR, IRS-1 en inmunoprecipitados de anti-IR β . En estos estudios, se inmunoprecipitaron lisados de tejido cerebral (100 μ g) durante la noche (aproximadamente 18 horas) a 4° C con 2 μ g de anti-IR β inmovilizado sobre perlas de proteína A-agarosa conjugadas de forma covalente (Pierce-ENDOGEN).

Los inmunoprecipitados anti-IR β se incubaron con 75 μ l de tampón de elución de antígeno (Pierce-ENDOGEN) y SDS al 2% durante 2 minutos en hielo, se centrifugaron para eliminar los complejos de anticuerpo-

proteína A-agarosa y se neutralizaron inmediatamente con 10 µl de tampón Tris 1,5 M, pH 8,8 seguido de la adición de 65 µl de tampón de muestra 2 X PAGE y se hirvieron durante 5 minutos.

Setenta y cinco µl de los eluidos obtenidos (50%) se fraccionaron luego por tamaño en SDS-PAGE al 7,5%. Las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y se midieron los niveles de pY^{1150/1151}IRβ e IRS-1 proteínas usando transferencia Western con anticuerpos para pY^{1150/1151}IRβ e IRS-1. Las transferencias se separaron y se volvieron a sondear con anti-IRP para evaluar la eficacia y la carga de la inmunoprecipitación.

7) Evaluación de los niveles de citoquinas.

Se descongelaron primero lentamente cortezas parietales (aproximadamente 10 mg) derivadas de (1) simulación tratado con vehículo, (2) simulación tratada con el compuesto C0105, (3) ICV Aβ₄₂ tratada con vehículo y (4) ratones ICV Aβ₄₂ tratados con el vehículo (-80° C a -20° C a -4° C), se homogeneizaron en 100 µl de medio de homogeneización helado (HEPES 25 mM, pH 7,5; NaCl 50 mM, mezcla de proteasa e inhibidores de la proteína fosfatasa) por sonicación y luego se solubilizó con polioxietileno (40) nonil fenil éter (NP-40) al 0,5%, colato de Na al 0,2% y digitonina al 0,5% a 4° C durante 1 hora con agitación de extremo a extremo. Después de la centrifugación, el lisado resultante se diluyó luego con 500 µl (volumen total 600 µl) y se usó como fuente de citoquinas.

Para determinar los niveles de citoquinas en estos tejidos, se recubrieron 0,5 µg/pocillo de anticuerpo monoclonal de ratón biotinilado anti-TNF-α, anti-IL-6 y anti-IL-1β sobre placas recubiertas con estreptavidina (placa de 96 pocillos recubierta de alta capacidad de unión Reacti-Bind™ NeutrAvidin™s; Thermo Scientific Pierce Protein Research Products; Rockford, IL; Rockford, IL). Las placas se lavaron 3 veces con Tris HCl 50 mM helado (pH 7,4) y se incubaron a 30° C con 100 µl de lisado derivado de los tejidos mencionados anteriormente durante 1 hora.

Las placas se lavaron 3 veces con Tris HCl 50 mM helado (pH 7,4) y se incubaron a 30° C con 0,5 µg/pocillo de anti-TNF-α, anti-IL-6 y anti-IL-1β de conejo no conjugado durante 1 hora. Después de dos lavados con Tris HCl 50 mM (pH 7,4), cada pocillo se incubó en 0,5 µg/pocillo de IgG anti-conejo conjugada con FITC (absorbida por humanos y ratones) durante 1 hora a 30° C. Las placas se lavaron dos veces con 200 µl de Tris HCl helado, pH 7,4 y las señales FITC residuales se determinaron mediante un lector de placas multimodo, DTX880 (Beckman). Cada lisado se muestreo dos veces.

8) Estudios inmunohistoquímicos.

Se usó inmunohistoquímica cuantitativa en secciones de 5 µm consecutivas que contenían corteza prefrontal y corteza entorrinal/hipocampo para determinar los niveles de agregados/placas de Aβ₄₂ y patología neurofibrilar (inmunoreactividad de NFT y de filamento helicoidal emparejado [PHF] usando inmunohistoquímica de marcado único como se ha descrito anteriormente [Wang et al., Biol Psychiatry 67:522-530 (2010)]; D'Andrea et al., Histopathology 38:120-134 (2001); y Nagele et al., Neuroscience 110:199-211 (2002)]. Una sección se inmunotizó con anti-NFT o -PHF. La siguiente sección (consecutiva) (que a menudo contiene la misma neurona) se inmunotizó con anticuerpos anti-Aβ₄₂ para medir los niveles relativos de péptido de Aβ₄₂ acumulado en las neuronas. Las extensiones de acumulación de Aβ₄₂ relativas se compararon entre diferentes tipos de células usando un análisis de imágenes asistido por ordenador como se ha descrito anteriormente [Wang et al., J Biol Chem 275:5626-5632 (2000)].

Los tejidos del cerebro se fijaron a 4° C en formalina al 10% tamponada con fosfato 0,15 M, pH 7,4 durante 2 semanas, se embebieron en parafina, se seccionaron en serie a 5 µm y se procesaron para inmunohistoquímica de campo brillante como se ha descrito. La inmunoreactividad de Aβ₄₂ estaba ausente cuando se pre-absorbía anti-Aβ₄₂ con Aβ₄₂ pero no Aβ₄₂₋₁. Los especímenes se examinaron usando un microscopio Nikon FXA con una cámara CCD Princeton Instruments y se registraron digitalmente.

Las intensidades relativas de la inmunoreactividad NFT/PHF y Aβ₄₂ se midieron y compararon entre tipos de células similares y diferentes usando Image-Pro® Plus (MediaCybernetics, Inc.; Bethesda, MD) y el software Metamorph® (Molecular Devices, Inc.; Sunnyvale, CA) como se ha descrito anteriormente [D'Andrea et al., Histopathology 38:120-134 (2001)]. También se determinaron las correlaciones entre la cantidad de inmunoreactividad NFT/PHF y el material positivo de Aβ₄₂ acumulado dentro de las neuronas maduras.

Tejido postmortem

Este protocolo de estudio se ajustó a la Declaración de Helsinki: Principios Éticos para la Investigación Biomédica con Seres Humanos (la 4ª enmienda), tal como se refleja en una aprobación previa del City College of New York and City University of New York Medical School human research committee. Los participantes tenían una evaluación clínica uniforme que incluía un historial médico, un examen neurológico completo, pruebas cognitivas que incluían examen del estado Mini-Mental y otras pruebas cognitivas en la memoria episódica, la memoria semántica y el lenguaje, la memoria de trabajo, la velocidad de percepción y la capacidad visuoespacial, así como la valoración psiquiátrica. En base a esta información, los sujetos recibieron diagnósticos de EA basados en los criterios NINCDS-

ADRDA [Mckhann et al., Neurology 34, 939-944 (1984)].

Se obtuvieron tejidos cerebrales postmortem (corteza frontal = FCX) de pacientes con EA esporádica clínicamente diagnosticada y tejidos de control de individuos neurológicamente normales de la misma edad normales del Harvard Brain Tissue Resource Center (HBTRC, Belmont, MA) y UCLA Brain Tissue Resource Center (UBTRC, Los Angeles, CA). Tanto HBTRC como UBTRC son apoyados en parte por subvenciones del Public Health Service of the National Institute of Health. Los intervalos de tiempo postmortem para recoger estos cerebros fueron ≤ 13 horas (los intervalos postmortem medios para la recogida de las muestras de cerebro con EA y de control fueron $6,0 \pm 0,9$ horas y $5,8 \pm 0,8$ horas, respectivamente).

Se realizó un examen neuropatológico de diagnóstico en secciones fijas teñidas con tinción con hematoxilina y eosina y con tinción con plata de Bielschowsky modificada [Yamamoto et al., Neuropathol Appl Neurobiol 12, 3-9 (1986)] para establecer cualquier diagnóstico de enfermedad de acuerdo con los criterios definidos por el National Institute on Aging y el Reagan Institute Working Group on Diagnostic Criteria for the Neuropathological Assessment of AD [Hyman et al., J Neuropathol Exp Neurol 56, 1095-1097 (1997)] y el tejido cerebral de los controles emparejados por edad se examinó de manera similar. La presencia de tanto placas neuríticas (amiloides) como ovillos neurofibrilares en todos los cerebros con EA se confirmó mediante tinción de Nissl y Bielschowsky, y se caracterizó inmunohistoquímicamente con anti- $A\beta_{42}$ y tinción con NFT en la corteza frontal y entorrinal, así como en el hipocampo como se ha descrito anteriormente ([Wang et al., J Neurochem 75, 1155-1161 (2000)]).

Los tejidos de control no mostraron una neuropatología microscópica macroscópica y mínima localizada de EA (0-3 placas neuríticas/campo 10x y 0-6 NFT/campo 10x en hipocampo). Se diseccionaron bloques de un gramo de FCX utilizando una sierra de cinta de secciones de cerebro coronal recién congeladas mantenidas a -80°C . Estos bloques se derivaron de las áreas 10 y/o 46 de Brodmann. Todos los tejidos postmortem se identificaron mediante un número de identificación anónimo, y los estudios se realizaron como una pareja mejor emparejada sin conocimiento de la información clínica.

La evaluación de los efectos de los compuestos de prueba en la afinidad de $A\beta_{42}$ para $\alpha 7nAChRs$

Para determinar el efecto del compuesto sobre la afinidad de $A\beta_{42}$ para los $\alpha 7nAChRs$, se biotinilaron 200 μg de sinaptosomas preparados a partir de sujetos control. Los sinaptosomas biotinilados se lisaron por sonicación breve en soluciones hipertónicas y se utilizaron como fuente de tejido para determinar la afinidad de $A\beta_{42}$ por los $\alpha 7nAChR$ en presencia y ausencia del Compuesto C0105.

Tratamiento in vitro de cortes cerebrales para la evaluación del compuesto de prueba en asociaciones $\alpha 7nAChR$ -FLNA, TLR4-FLNA y $A\beta_{42}$ - $\alpha 7nAChR$, afluencia de Ca^{2+} , señalización de NMDAR e IR

Se descongelaron gradualmente tejidos de la corteza frontal postmortem (de -80°C a -20°C) y se cortaron usando un cortador de tejido McIlwain refrigerado ($200\text{ }\mu\text{m} \times 200\text{ }\mu\text{m} \times 3\text{ mm}$). Se suspendieron aproximadamente 20 mg de los cortes de cerebro en 1 ml de solución Krebs-Ringer oxigenada helada (K-R), que contiene HEPES 25 mM, pH 7,4, NaCl 118 mM, KCl 4,8 mM, CaCl_2 1,3 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, MgSO_4 1,2 mM, NaHCO_3 25 mM, glucosa 10 mM, ácido ascórbico 100 μM , 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptina, PMSF 0,2 mM, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de pepstatina A 2, y 0,01 U/ml de inhibidor de tripsina de soja y se centrifugó brevemente. Después de dos lavados adicionales con 1 ml de K-R helado, los cortes de cerebro se suspendieron en 1 ml de K-R.

Para determinar si la exposición a $A\beta_{42}$ exógeno aumenta la asociación de $\alpha 7nAChR$ -FLNA, TLR4-FLNA y $A\beta_{42}$ - $\alpha 7nAChR$ y provoca disfunción del receptor $\alpha 7nAChR$ y N-metil-D-aspartato (NMDAR) inducida por $A\beta_{42}$ aproximadamente 20 mg de cortes corticales frontales de los sujetos de control se incubaron con 0,1 μM de $A\beta_{42}$ a 37°C durante 1 hora. Para probar los efectos de C0105 en los tejidos de EA de control y nativos incubados con $A\beta_{42}$, se añadió el Compuesto C0105 (0,1 y 1 nM) 10 minutos después de 0,1 μM de $A\beta_{42}$. La incubación continuó durante 1 hora en la oscuridad para minimizar la destrucción por la luz de los agentes de prueba. La mezcla de incubación en un volumen de incubación total de 0,5 ml se aireó con 95% de O_2 /5% de CO_2 cada 15 minutos durante 1 minuto durante la incubación. La reacción se terminó mediante la adición de 1,5 ml de K-R libre de Ca^{2+} helado. Los cortes de tejido se recogieron mediante una breve centrifugación y se usaron como fuentes de tejido para varios ensayos.

Para evaluar los efectos de varios agentes de $\alpha 7nAChR$ en los enlaces $\alpha 7nAChR$ -FLNA, se incubaron aproximadamente 20 mg de FCX de sujetos control con nicotina 1 mM, PNU282987, α -bungarotoxina, metillicaconitina, galantamina, memantina y $A\beta_{40}$ junto con $A\beta_{42}$ 0,1 μM . La incubación continuó durante 1 hora en la oscuridad. La mezcla de la incubación en un volumen de incubación total de 0,5 ml se aireó durante 1 minuto cada 15 minutos con 95% de O_2 /5% de CO_2 . La reacción se terminó mediante la adición de 1,5 ml de K-R libre de Ca^{2+} helado, y los cortes se recogieron mediante una breve centrifugación.

Por separado, se determinaron los efectos del compuesto sobre los niveles de los complejos $\alpha 7nAChR$ -

FLNA, TLR4-FLNA y $A\beta_{42}$ - $\alpha 7$ nAChR después de la incubación con 0,1 y 1 nM de compuestos en Krebs-Ringer y sinaptosomas incubados con $A\beta_{42}$ de sujetos de control y pacientes con enfermedad de Alzheimer incubados con Krebs-Ringer. Los niveles de los complejos $\alpha 7$ nAChR-FLNA, TLR4-FLNA y $A\beta_{42}$ - $\alpha 7$ nAChR en los sinaptosomas obtenidos se midieron mediante el método de co-inmunoprecipitación como se describe a continuación que se ha publicado [Wang et al., J Neurosci 35, 10961-10973 (2009)].

Evaluación de la asociación $\alpha 7$ nAChR-FLNA, TLR4-FLNA y $A\beta_{42}$ - $\alpha 7$ nAChR por co-inmunoprecipitación

Se sedimentan doscientos μ g de sinaptosomas por centrifugación y luego se solubilizan mediante sonicación breve en 250 μ l de tampón de inmunoprecipitación (HEPES 25 mM, pH 7,5; NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, 50 μ g/ml de leupeptina, 10 μ g/ml de aprotinina, 2 μ g/ml de inhibidor de tripsina de soja, PMSF 0,04 mM, NaF 5 mM, vanadato de sodio 1 mM, β -glicerofosfato 0,5 mM y 2-mercaptoetanol al 0,2% que contiene digitonina al 0,5%, colato de sodio al 0,2% y NP-40 al 0,5% y se incubó a 4° C con agitación de extremo a extremo durante 1 hora. Después de la dilución con 750 μ l de tampón de inmunoprecipitación helado y centrifugación (4° C) para eliminar los residuos insolubles, los complejos $\alpha 7$ nAChR-/TLR4-FLNA y $A\beta_{42}$ - $\alpha 7$ nAChR en el lisado se aíslan por inmunoprecipitación con 16 horas de incubación a 4° C con anti-FLNA de conejo inmovilizado (1 μ g) y anticuerpos anti- $A\beta_{42}$ (1 μ g) perlas de agarosa conjugadas con proteína A, respectivamente.

Los inmunocomplejos resultantes se sedimentaron por centrifugación a 4° C. Después de tres lavados con 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) helada (pH 7,2) y centrifugación, se solubilizan los complejos $\alpha 7$ nAChR-/TLR4-FLNA y $A\beta_{42}$ - $\alpha 7$ nAChR aislados hirviendo durante 5 minutos en 100 μ l de tampón de preparación de la muestras SDS-PAGE (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8; glicerol al 10%, SDS al 2%; 2-mercaptoetanol al 5%, azul de bromofenol al 0,1%). El contenido de $\alpha 7$ nAChR en el 50% del inmunoprecipitado anti- $A\beta_{42}$ obtenido se determinó mediante transferencia Western con anticuerpos anti- $\alpha 7$ nAChR monoclonales. En el ensayo para determinar el nivel del complejo $A\beta_{42}$ - $\alpha 7$ nAChR, se añadió agarosa conjugada con anti-actina de conejo inmovilizada (0,5 μ g)-proteína A junto con anti- $A\beta_{42}$ en el proceso de co-inmunoprecipitación.

El contenido de β -actina en los inmunoprecipitados resultantes se analiza luego mediante inmunotransferencia usando anti-p-actina monoclonal para ilustrar incluso la eficacia y la carga de la inmunoprecipitación. En el ensayo para determinar los niveles del complejo $\alpha 7$ nAChR-/TLR4-FLNA, las transferencias obtenidas se eliminan y se vuelven a sondear con anti-FLNA monoclonal para evaluar la eficacia y la carga de la inmunoprecipitación.

Evaluación del afluencia de Ca^{2+} en sinaptosomas como medición funcional de los compuestos

Se estudiaron NMDAR-, $\alpha 7$ nAChR y la afluencia de [$^{45}Ca^{2+}$] mediada por el canal de calcio dependiente del voltaje usando sinaptosomas preparados a partir de cortes corticales frontales postmortem de sujetos de control y con EA. Brevemente, se incubaron sinaptosomas de cerebro (100 mg para el estudio postmortem) a 37° C durante 5 minutos en Mg^{2+} -K-R 0,3 mM oxigenado (K-R Mg^{2+} bajo, LMKR) que contiene $^{45}Ca^{2+}$ 5 μ M (10 Ci/mmol) seguido de incubación con vehículo, PNU 282987 0,1-10 μ M, un agonista de $\alpha 7$ nAChR específico, o NMDA 0,1-10 μ M + glicina 1 μ M durante 5 minutos o K^+ 65 mM (hecho con reemplazo isomolar de Na^+) durante 1 minuto en un volumen de incubación total de 0,5 ml. La reacción se terminó mediante la adición de 0,5 ml de K-R libre de Ca^{2+} helado que contenía EGTA 0,5 mM y centrifugación a 4° C. Después de dos lavados adicionales, se evaluaron los contenidos de $^{45}Ca^{2+}$ en los sinaptosomas usando espectrometría de centelleo (Beckman). El $^{45}Ca^{2+}$ de fondo se estimó usando sinaptosomas hipotónicamente lisados. La afluencia de Ca^{2+} absoluta se calculó restando el recuento de $^{45}Ca^{2+}$ de fondo. El porcentaje de aumento en la afluencia de Ca^{2+} se calculó como % [(vehículo tratado con fármaco)/vehículo].

Señalización de NMDAR y asociación con PSD-95.

La señalización de NMDAR y su interacción con la proteína de anclaje sináptica, PSD-95 se compararon en cortes corticales frontales expuestos a K-R y Compuesto C0105 (1 nM) de sujetos de control y con EA. La activación y señalización de NMDAR se iniciaron mediante la incubación de aproximadamente 10 mg de cortes de cerebro tratados *in vitro* con LMKR (basal) o LMKR que contenía NMDA 10 μ M y glicina 1 μ M a 37° C durante 30 minutos. La mezcla de incubación se aireó con 95% de O_2 /5% de CO_2 cada 10 minutos durante 1 minuto durante la estimulación. La estimulación de los ligandos se terminó mediante la adición de 1 ml de K-R libre de Ca^{2+} helado que contenía EGTA 0,5 mM y EDTA 0,1 mM.

Los cortes de cerebro se recogieron mediante una breve centrifugación y se homogeneizaron en 0,25 ml de tampón de inmunoprecipitación helado. Los homogeneizados se centrifugaron a 1000 X g durante 5 minutos (4° C) y el sobrenadante (fracción post-mitocondrial) se soncó durante 10 segundos en hielo. Las proteínas se solubilizan en digitonina al 0,5%, colato de sodio al 0,2% y NP-40 al 0,5% durante 60 minutos a 4° C con rotación de extremo a extremo. Los lisados resultantes se depuraron luego por centrifugación a 50.000 X g durante 5 minutos y se diluyeron con 0,75 ml de tampón de inmunoprecipitación. Las concentraciones de proteínas se miden por el método de Bradford (Bio-Rad).

Para determinar la señalización de NMDAR y la asociación de los complejos de NMDAR con PSD-95 [también conocido como homólogo grande de Discos 4 (DLH4)], se midieron los niveles de las subunidades de NMDAR, PSD-95 y las moléculas de señalización asociadas a NMDAR en inmunoprecipitados anti-NR1. Dos subunidades de proteínas NR1 y dos NR2 forman el receptor NMDA heterotetrámero.

En estos estudios, se inmunoprecipitaron lisados de cortes de cerebro (200 µg) durante la noche (aproximadamente 18 horas) a 4° C con 2 µg de anti-NR1 inmovilizado sobre perlas de agarosa-proteína A conjugadas de forma covalente (Pierce-ENDOGEN). Los inmunoprecipitados anti-NR1 se incubaron con 75 µl de tampón de elución de antígeno (Pierce-ENDOGEN) y SDS al 2% durante 2 minutos en hielo, se centrifugaron para eliminar los complejos de anticuerpo-proteína A-agarosa y se neutralizaron inmediatamente con 10 µl de tampón Tris 1,5 M, pH 8,8, seguido de la adición de 65 µl de tampón de muestra 2 X PAGE y se hirvió durante 5 minutos. Setenta y cinco µl de los eluidos obtenidos (50%) se fraccionaron por tamaño en SDS-PAGE al 7,5%. Las proteínas se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa y los niveles de varias subunidades del receptor de NMDA, PSD-95, proteínas de señalización se midieron usando transferencia Western con anticuerpos para NR1, PSD-95, nNOS, fosfolipasa C-γ1, PKC, pY⁴⁰²PyK2, pY⁴¹⁶Src o fosfotirosina. Las transferencias se separaron y se volvieron a sondear con anti-NR1 o -NR2A/- NR2B para evaluar la carga según sea apropiado.

Activación y señalización de IR.

La señalización de IR se comparó en en cortes corticales frontales expuestos a K-R y compuesto C0105 de sujetos control y con EA. La activación y la señalización de IR se iniciaron mediante la incubación de aproximadamente 10 mg de cortes de cerebro tratados *in vitro* con KR (basal) o KR que contenía insulina 1 nM a 37° C durante 30 minutos. La mezcla de incubación se aireó con 95% de O₂/5% de CO₂ cada 10 minutos durante 1 minuto durante la estimulación. La estimulación del ligando se terminó mediante la adición de 1 ml de K-R libre de Ca²⁺ helado que contenía EGTA 0,5 mM y EDTA 0,1 mM. Los cortes de cerebro se recogieron mediante una breve centrifugación y se homogeneizaron en 0,25 ml de tampón de inmunoprecipitación helado. Los homogeneizados se centrifugaron a 1000 X g durante 5 minutos (4° C) y el sobrenadante (fracción post-mitocondrial) se sonicó durante 10 segundos en hielo. Las proteínas se solubilizan en digitonina al 0,5%, colato de sodio al 0,2% y NP-40 al 0,5% durante 60 minutos a 4° C con rotación de extremo a extremo. Los lisados resultantes se depuraron luego por centrifugación a 50.000 X g durante 5 minutos y se diluyeron con 0,75 ml de tampón de inmunoprecipitación. Las concentraciones de proteínas se miden por el método de Bradford (Bio-Rad).

Para determinar la señalización IR, se midieron los niveles de pY^{1150/1151}- y pY⁹⁷²-IR, así como el sustrato del receptor de insulina (IRS)-1 reclutado para IR, en inmunoprecipitados anti-IRβ. En estos estudios, se inmunoprecipitaron lisados de cortes de cerebro (200 µg) durante la noche (aproximadamente 18 horas) a 4° C con 2 µg de anti-IRP inmovilizado en perlas de proteína A-agarosa conjugadas covalentemente (Pierce-ENDOGEN). Los inmunoprecipitados anti-IRP se incubaron con 75 µl de tampón de elución de antígeno (Pierce-ENDOGEN) y SDS al 2% durante 2 minutos en hielo, se centrifugaron para eliminar los complejos de anticuerpo-proteína A-agarosa y se neutralizaron inmediatamente con 10 µl de tampón Tris 1,5 M, pH 8,8 seguido de la adición de 65 µl de tampón de muestra 2 X PAGE y se hirvió durante 5 minutos. Setenta y cinco µl de los eluidos obtenidos (50%) se fraccionaron por tamaño en SDS-PAGE al 7,5%. Las proteínas se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa y los niveles de IR activado (pY^{1150/1151} y pY⁹⁷²) y IRS-1 reclutado se midieron usando transferencia Western con anticuerpos para PY^{1150/1151}-IRβ, pY⁹⁷²-IRβ o IRS-1. Las transferencias se eliminaron y se volvieron a sondear con anti-IRβ para evaluar la carga según fuese apropiado.

Análisis de transferencia Western

Los inmunoprecipitados solubilizados derivados de los ensayos de co-inmunoprecipitación se separaron mediante SDS-PAGE al 7,5 o al 10% y luego se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se lavaron con PBS y se bloquearon durante la noche (aproximadamente 18 horas) a 4° C con leche al 10% en PBS con Tween®-20 (PBST) al 0,1%. Después de tres lavados de 5 minutos con PBST al 0,1%, las membranas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas con el anticuerpo de elección a diluciones 1:500-1:1.000. Después de tres lavados de 2 minutos en PBST al 0,1%, las membranas se incubaron durante 1 hora con IgG-HRP anti-especie (dilución 1:5.000) y se lavaron con PBST al 0,1% tres veces, 2 minutos cada una. La inmunorreactividad se visualizó haciendo reaccionar con reactivo quimioluminiscente (Pierce-ENDOGEN) durante exactamente 5 minutos y se expuso inmediatamente a una película de rayos X. Las bandas específicas se cuantificaron mediante escaneo densitométrico (densiometro calibrado GS-800, Bio-Rad Laboratories).

Evaluación de la fosforilación de tau inducida por LPS usando cortes corticales frontales humanos postmortem

Se cortaron hipocampos de sujetos de control sin demencia en cortes coronales (100 µm de grosor) usando un cortador de tejido McIlwain (Brinkman Instruments) como se ha descrito anteriormente [Wang et al., J Neurosci, 29:10961-10973 (2009)]. Los cortes se separan cuidadosamente en 10 ml de medio de disección helado oxigenado con dos pares de fórceps finos y agitación suave.

Para determinar si el Compuesto C0105 puede reducir la fosforilación de tau inducida por LPS y A β ₄₂, se incubaron aproximadamente 20 mg de cortes de hipocampo humano a 37° C durante 1 hora con 1 o 10 μ g de LPS o A β ₄₂ 0,1 μ M en Krebs-Ringer oxigenado (HEPES 25 mM, pH 7,4; NaCl 118mM, KCl 4,8 mM, NaHCO₃ 25 mM, CaCl₂ 1,3 mM, MgSO₄ 1,2 mM, H₂PO₄ 1,2 mM, glucosa 10 mM, ácido ascórbico 100 μ M, 50 mg/ml de leupeptina, 10 μ g/ml de aprotinina, 2 μ g/ml de inhibidor de tripsina de soja, PMSF 0,04 mM y mezcla de inhibidores de proteína fosfatasa) con o sin Compuesto C0105 1 nM (el volumen total de incubación es de 500 μ l). La mezcla de reacción se aireó con 95% de O₂/5% de CO₂ durante 1 minuto cada 10 minutos. La reacción se terminó diluyendo con 1,5 ml de Krebs-Ringer libre de Ca²⁺ que contenía EDTA 1 mM helado y se centrifugó durante 10 minutos a 15.000 X g (4° C).

Después de la eliminación del sobrenadante, los cortes se homogeneizaron para preparar la fracción post-mitocondrial (P2). La fracción P2 obtenida se solubilizó en 500 μ l de tampón de inmunoprecipitación (HEPES 25 mM, pH 7,5; NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, 2-mercaptoetanol al 0,02%, 50 μ g/ml de leupeptina, 10 μ g/ml de aprotinina, 2 μ g/ml de inhibidor de tripsina de soja, PMSF 0,04 mM y mezcla de inhibidores de proteína fosfatasa) que contenía digitonina al 0,5%, colato de sodio al 0,2% y NP-40 al 0,5%. Después de la dilución con 1,5 ml de tampón de inmunoprecipitación helado y centrifugación (4° C) para eliminar los residuos insolubles, se purificaron las proteínas tau totales en el lisado tisular mediante inmunoprecipitación con incubación con anticuerpos anti-tau inmovilizados (1 μ g) durante 16 horas a 4° C como se ha descrito anteriormente [Wang et al., J Biol Chem, 278:31547-31553 (2003); Wang et al., Biol Psychiatry, 67:522-530 (2010)].

Los inmunocomplejos anti-tau se enriquecieron mediante incubación con 50 μ l de perlas de agarosa conjugadas con proteína A/G a 4° C y centrifugación. Las proteínas tau purificadas se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato helada (pH 7,2) y luego se solubilizaron hirviendo durante 5 minutos en 150 μ l de tampón de preparación de muestras SDS-PAGE (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8; glicerol al 10 %, SDS al 2%; 2-mercaptoetanol al 5%, azul de bromofenol al 0,1%). El contenido de serina202-tau, treonina231-tau y treonina181-tau fosforiladas en 50 μ l de inmunoprecipitado anti-tau solubilizado se separó en SDS-PAGE al 8-16%, se transfirió electroforéticamente a membrana de nitrocelulosa y se determinó mediante transferencias Western con anticuerpos específicos dirigidos contra pSerina202-tau (AT-8), pTreonina231-tau (AT-180) y pTreonina181-tau (AT270), respectivamente.

Para asegurar que se cargan cantidades iguales de tau precipitadas por anticuerpos anti-tau en SDS-PAGE, el contenido total de tau en el inmunoprecipitado anti-tau se determinó mediante transferencia Western usando un anticuerpo anti-tau (Tau-5) que no discrimina entre tau fosforilada y no fosforilada.

Estos resultados se ilustran en las Figs. 47A, 47B y 47C.

Efectos sobre la liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF α) inducidas por astrocitos humanos primarios por contacto con A β ₄₂ y LPS

Los astrocitos humanos expresan los receptores de superficie celular tanto TLR4 como TLR2. A β ₄₂ y LPS se unen y activan cada uno la vía de señalización de TLR4 dando como resultado la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF α , como se muestra en los estudios previos tratados en la presente, así como en los estudios mostrados en la Fig. 48A y 48B.

Diseño experimental:

Se preparó un cultivo de astrocitos primario de acuerdo con el proveedor (Lonza). Los astrocitos adherentes se tripsinizaron con 0,25% de tripsina-EDTA, luego se recogieron y se subcultivaron en una placa de 12 pocillos (1,2 ml/pocillo). Cuando las células confluieron al 80-85%, las células se trataron en una incubadora bajo 5% de CO₂ con 100 fM, 10 pM o 1 nM de Compuesto C0105 seguido inmediatamente de la adición de A β ₄₂ (0,1 M) y LPS (1 mg/ml); es decir, añadiendo simultáneamente el ligando atacante y el Compuesto C0105 a las células. Los grupos de vehículos se trataron con DMSO al 0,1% solamente. La incubación continuó durante 24 horas después de la adición. El medio de cultivo se usó como blanco (no tratado) y se determinaron los niveles de citoquinas, TNF- α , IL-6 e IL-1 β en 200 μ l de medio de cultivo. Cada pozo se muestreó una vez.

Para determinar el efecto del Compuesto C0105 sobre la liberación de citoquinas de los astrocitos humanos, se recubrieron 0,5 μ g/pocillo de anticuerpo monoclonal de ratón biotinado anti-TNF- α , -IL-6 y -IL-1 β sobre placas recubiertas con estreptavidina (placas de 96 pocillos recubiertas con alta capacidad de unión Reacti-Bind™ NeutrAvidin™). Las placas se lavaron 3 veces con Tris HCl 50 mM helado (pH 7,4) y se incubaron a 30° C con 200 μ l de medio derivado de las condiciones mencionadas anteriormente. Las placas se lavaron 3 veces con Tris HCl 50 mM helado (pH 7,4) y se incubaron a 30° C con 0,5 μ g/pocillo de anti-TNF- α , -IL-6 y -IL-1 β de conejo no conjugado durante 1 hora. Después de tres lavados de 1 minuto con Tris HCl 50 mM (pH 7,4), cada pocillo se incubó en 0,25 μ g/pocillo de IgG anti-conejo conjugada con FITC (absorbida por humanos y ratones) durante 1 hora a 30° C. Las placas se lavaron dos veces con 200 μ l de Tris HCl helado, pH 7, y las señales de FITC residuales se determinaron mediante lector de placas multimodo, DTX880 (Beckman).

Los resultados de estos estudios se muestran en la Fig. 48 para A β ₄₂ y LPS. Como puede verse, el Compuesto C0105 inhibió la liberación de cada una de las citoquinas ensayadas en aproximadamente el 75 a aproximadamente el 95 por ciento para cada una de las tres citoquinas y cada uno de los cuatro ligandos. Análisis estadístico por ANOVA de una vía: $p < 0,01$; $p^* < 0,01$ en comparación con el grupo tratado con vehículo por cada ataque.

Estudios de unión por afinidad de FLNA

Una serie de estudios de unión usando varios compuestos como ligando y FLNA o el pentámero FLNA de la SEQ ID NO: 1 como el receptor. Estos estudios se llevaron a cabo de una manera generalmente similar usando una curva de competencia (desplazamiento) para la inhibición de la unión de [³H]NLX en presencia del ligando, y los resultados se muestran en la Fig. 16. Los detalles específicos de cada estudio se exponen a continuación.

La curva de competencia (desplazamiento) (Fig. 48A) Para la inhibición de la unión de [³H]NLX por la naltrexona a las membranas de A7 que expresa FLNA (melanocitos humano; ATCC CRL-2500), las células que están libres de la mayoría de los receptores y particularmente de mu muestran dos estados de afinidad con IC_{50-H} (alto) de 3,94 picomolar e IC_{50-L} (bajo) de 834 picomolar. Se realizó un análisis de ajuste de curva no lineal usando una ecuación de competencia que asumió dos sitios saturables para la curva de naltrexona que comprende 16 concentraciones que van de 0,1 pM a 1 mM. Los datos se derivan de seis estudios, cada uno de los cuales usa un conjunto diferente de células A7.

La afinidad de unión del Compuesto C0105 para FLNA se determinó de manera similar (Fig. 16B). Brevemente, se incubaron 100 mg de membranas de células A7 con [³H]NLX 0,5 nM en presencia de Compuesto C0105 0,01 nM-1 mM a 30° C durante 60 minutos en 250 ml del medio de unión (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 100 mM e inhibidores de proteasa y proteína fosfatasa). La unión no específica se definió mediante NTX 1 mM. Las reacciones se terminaron mediante filtración rápida a través de membranas de grado B (GF/B) libres de aglutinante de vidrio tratadas con BSA al 3% al vacío. Los filtros se lavaron dos veces con 5 ml de medio de unión helado, y se midió el [³H]NLX retenido en los filtros mediante espectrometría de centelleo líquido. Los datos obtenidos se analizaron usando el programa Prism de GraphPad Software, Inc. (San Diego, CA). Aquí, se determinaron un IC_{50-H} 0,43 picomolar y un IC_{50-L} 226 picomolar. N=4.

La afinidad de unión del Compuesto C0105 para FLNA se determinó de manera similar (Fig. 16C). Brevemente, 200 mg de membranas celulares de SK-N-MC (neuroepitelioma humano; ATCC HTB-10) que contienen tanto $\alpha 7$ nAChR como receptores opioides mu se incubaron con [³H] NLX 0,5 nM en presencia de DAMGO 1 mM y Compuesto C0105 0,01. nM-1 mM a 30° C durante 60 minutos en 250 ml del medio de unión (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 100 mM; e inhibidores de proteasa y proteína fosfatasa). La unión no específica se definió mediante NTX 1 mM. Las reacciones se terminaron mediante filtración rápida a través de membranas GF/B tratadas con BSA al 3% al vacío. Los filtros se lavaron dos veces con 5 ml de medio de unión helado, y se midió el [³H]NLX retenido en los filtros mediante espectrometría de centelleo líquido. Los datos obtenidos se analizaron usando el programa Prism de GraphPad Software, Inc. (San Diego, CA). Aquí, se determinaron un IC_{50-H} de 0,201 picomolar y un IC_{50-L} de 111 picomolar. N=4.

La afinidad de unión del Compuesto C0105 para el péptido VAKGL también se determinó mediante un ensayo de desplazamiento (Fig. 16D). Brevemente, se incubaron 10 mg de péptido VAKGL biotinilado N-terminal (Bn-VAKGL) (SEQ ID NO: 1) con [³H]NLX 0,5 nM en presencia de Compuesto C0105 0,01 nM-1 mM a 30° C durante 60 minutos en 250 ml del medio de unión (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 100 mM; e inhibidores de la proteasa y proteína fosfatasa). La unión no específica se definió mediante NTX 1 mM. La reacción se terminó mediante la adición de 1 ml de medio de unión helado. El Bn-VAKGL unido a [³H]NLX se atrapó mediante incubación con 20 ml de NeutrAvidin®-agarosa (Thermo), seguido de centrifugación. Después de dos lavados de 1,5 ml con PBS, se determinó el [³H]NLX unido usando espectrometría de centelleo. Los datos obtenidos se analizaron usando el programa Prism de GraphPad Software, Inc. (San Diego, CA). Aquí, se obtuvo un único valor de IC₅₀, como se esperaba para el péptido 5-mer de la SEQ ID NO: 1, y su valor fue de 2,76 picomolar. N=4.

Los datos obtenidos en estos estudios ilustran las afinidades similares mostradas entre la naloxona y el Compuesto ilustrativo C0105 para FLNA. Estos datos también ilustran la similitud en la actividad de unión como un receptor mostrado entre la molécula FLNA intacta y el péptido FLNA 5-mer de la SEQ ID NO: 1, y validan de este modo el uso de ese péptido 5-mer como un sustituto para la molécula completa En los ensayos llevados a cabo en la presente.

Se pretende que el uso del artículo "un" o "uno" incluya uno o más.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Wang, Haou-Yan Burns Barbier, Lindsay

<120> UN MÉTODO PARA INHIBIR LA FOSFORILACIÓN DE TAU

<130> PAT-115.3PCT

5 <160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> secuencia sintética

<400> 1

20 Val Ala Lys Gly Leu
1 5

<210> 2

<211> 441

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintética

30 <400> 2

35 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

40 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

45 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45

50 Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 55 60

55

60

65

ES 2 716 049 T3

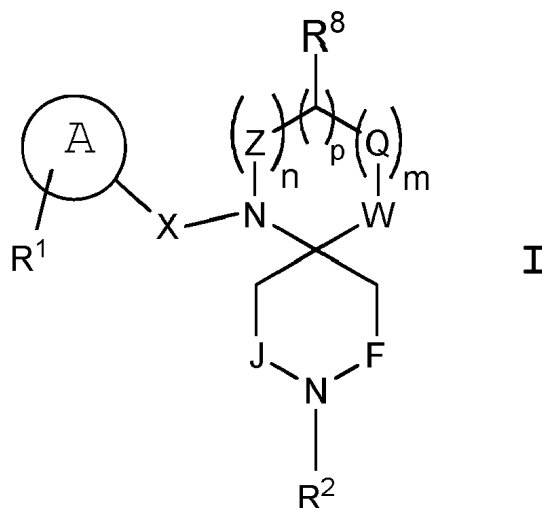
	Asp	Ala	Lys	Ser	Thr	Pro	Thr	Ala	Glu	Asp	Val	Thr	Ala	Pro	Leu	Val	65	70	75	80
5	Asp	Glu	Gly	Ala	Pro	Gly	Lys	Gln	Ala	Ala	Ala	Gln	Pro	His	Thr	Glu	85	90	95	
10	Ile	Pro	Glu	Gly	Thr	Thr	Ala	Glu	Glu	Ala	Gly	Ile	Gly	Asp	Thr	Pro	100	105	110	
15	Ser	Leu	Glu	Asp	Glu	Ala	Ala	Gly	His	Val	Thr	Gln	Ala	Arg	Met	Val	115	120	125	
20	Ser	Lys	Ser	Lys	Asp	Gly	Thr	Gly	Ser	Asp	Asp	Lys	Lys	Ala	Lys	Gly	130	135	140	
25	Ala	Asp	Gly	Lys	Thr	Lys	Ile	Ala	Thr	Pro	Arg	Gly	Ala	Ala	Pro	Pro	145	150	155	160
30	Gly	Gln	Lys	Gly	Gln	Ala	Asn	Ala	Thr	Arg	Ile	Pro	Ala	Lys	Thr	Pro	165	170	175	
35	Pro	Ala	Pro	Lys	Thr	Pro	Pro	Ser	Ser	Gly	Glu	Pro	Pro	Lys	Ser	Gly	180	185	190	
40	Asp	Arg	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ser	Pro	Gly	Ser	Pro	Gly	Thr	Pro	Gly	Ser	195	200	205	
45	Arg	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Leu	Pro	Thr	Pro	Pro	Thr	Arg	Glu	Pro	Lys	210	215	220	
50	Lys	Val	Ala	Val	Val	Arg	Thr	Pro	Pro	Lys	Ser	Pro	Ser	Ser	Ala	Lys	225	230	235	240
55	Ser	Arg	Leu	Gln	Thr	Ala	Pro	Val	Pro	Met	Pro	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	245	250	255	
60	Lys	Ser	Lys	Ile	Gly	Ser	Thr	Glu	Asn	Leu	Lys	His	Gln	Pro	Gly	Gly	260	265	270	
65	Gly	Lys	Val	Gln	Ile	Ile	Asn	Lys	Lys	Leu	Asp	Leu	Ser	Asn	Val	Gln	275	280	285	

ES 2 716 049 T3

	Ser	Lys	Cys	Gly	Ser	Lys	Asp	Asn	Ile	Lys	His	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	
	290						295					300					
5	Ser	Val	Gln	Ile	Val	Tyr	Lys	Pro	Val	Asp	Leu	Ser	Lys	Val	Thr	Ser	
	305					310					315					320	
10	Lys	Cys	Gly	Ser	Leu	Gly	Asn	Ile	His	His	Lys	Pro	Gly	Gly	Gly	Gln	
					325					330					335		
15	Val	Glu	Val	Lys	Ser	Glu	Lys	Leu	Asp	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Gln	Ser	
				340					345					350			
20	Lys	Ile	Gly	Ser	Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	His	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Asn	
			355					360					365				
25	Lys	Lys	Ile	Glu	Thr	His	Lys	Leu	Thr	Phe	Arg	Glu	Asn	Ala	Lys	Ala	
	370						375					380					
30	Lys	Thr	Asp	His	Gly	Ala	Glu	Ile	Val	Tyr	Lys	Ser	Pro	Val	Val	Ser	
	385					390					395					400	
35	Gly	Asp	Thr	Ser	Pro	Arg	His	Leu	Ser	Asn	Val	Ser	Ser	Thr	Gly	Ser	
					405					410					415		
40	Ile	Asp	Met	Val	Asp	Ser	Pro	Gln	Leu	Ala	Thr	Leu	Ala	Asp	Glu	Val	
				420					425					430			
45	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Lys	Gln	Gly	Leu								
			435					440									
50																	
55																	
60																	
65																	

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la Serie C-2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que inhibe por lo menos el 60 por ciento de la unión de naloxona marcada con FITC cuando está presente a una concentración de 10 μ M y usa naloxona no marcada como el inhibidor de control a la misma concentración, para uso en la inhibición de la fosforilación de la proteína tau en un método para tratar la encefalopatía traumática crónica, en donde dicho método comprende administrar dicho compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo en ausencia de una cantidad eficaz de unión al receptor opioide mu (MOR-) de un agonista o antagonista de MOR separado, y en donde el compuesto de la Serie C-2 se describe mediante la Fórmula I siguiente:



en la que

Q es CHR^9 o C(O) , **Z** es CHR^{10} o C(O) , y solo uno de **Q** y **Z** es C(O) ;

cada uno de m, n y p es cero o uno y la suma de m+n+p es 2 o 3;

W se selecciona del grupo que consiste de NR^{20} , NR^2 , NR^7 , S y O, donde R^7 y R^2 son iguales o diferentes y son H, $\text{C(H)}_v(\text{D})_h$ donde cada una de v y h es 0, 1, 2 o 3 y v+h=3, $\text{C(H)}_q(\text{D})_r$ -hidrocarbilo C_1 - C_{11} alifático donde cada uno de q y r es 0, 1 o 2 y q+r=0, 1 o 2, sulfonil hidrocarbilo C_1 - C_{12} alifático o hidrocarbilo C_1 - C_{12} alifático, y R^{20} es X-círculo A- R^1 como se define más adelante;

J y **F** son iguales o diferentes y son CH_2 , CHD o CD_2 (donde D es deuterio)

X es SO_2 , C(O) , CH_2 , CD_2 , OC(O) , NHC(NH) , NHC(S) o NHC(O) ;

el círculo **A** es un sistema de anillo aromático o heteroaromático que contiene un único anillo o dos anillos fusionados;

R^1 es H o representa hasta tres sustituyentes, R^{1a} , R^{1b} y R^{1c} , que pueden ser ellos mismos iguales o diferentes, en donde cada uno de esos tres grupos, R^{1a-c} , se selecciona por separado del grupo que consiste de H, hidrocarbilo C_1 - C_6 , hidrocarbilo C_1 - C_6 , hidrocarbilo C_1 - C_6 , trifluorometilo, trifluorometoxi, hidrocarbilo C_1 - C_7 , hidrocarbilo C_1 - C_7 sustituido con hidroxilo, trifluorometilo o halógeno, hidrocarbilsulfonilo C_1 - C_6 , hidrocarbilsulfonilo C_1 - C_6 , halógeno, nitro, fenilo, ciano, carboxilo, hidrocarbilsulfonilo C_1 - C_7 , carboxamida o sulfonamida,

en donde el nitrógeno amida en cada grupo amida tiene la fórmula NR^3R^4 en la que R^3 y R^4 son iguales o diferentes y son H, hidrocarbilo C_1 - C_4 , o R^3 y R^4 junto con el nitrógeno representado forman un anillo de 5-7 miembros que contiene opcionalmente 1 o 2 heteroátomos adicionales que son independientemente nitrógeno, oxígeno o azufre,

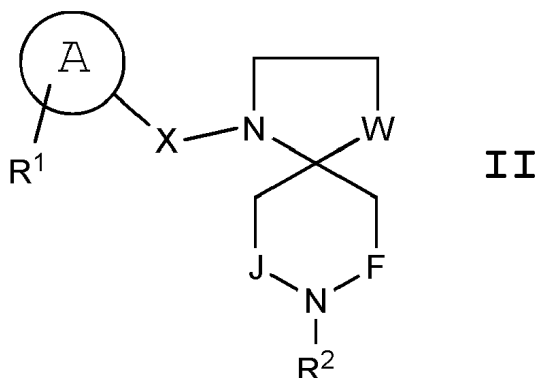
MAr, donde **M** es $-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-$ o $-\text{N}=\text{N}-$ y Ar es un grupo arilo o heteroarilo de un solo anillo y NR^5R^6 en donde R^5 y R^6 son iguales o diferentes y son H, hidrocarbilo C_1 - C_4 , acilo C_1 - C_4 , hidrocarbilsulfonilo C_1 - C_4 o R^5 y R^6 junto con el nitrógeno representado forman un anillo de 5 a 7 miembros que contiene opcionalmente 1 o 2 heteroátomos adicionales que son independientemente nitrógeno, oxígeno o azufre.

R^8 , R^9 y R^{10} son cada uno H, o dos de R^8 , R^9 y R^{10} son H y uno es un grupo hidrocarbilo C_1 - C_8 que no está sustituido o está sustituido con hasta tres átomos que son iguales o diferentes y son átomos de oxígeno o nitrógeno.

2. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho compuesto muestra menos del 80 por ciento de la estimulación de MOR proporcionada por DAMGO a la misma concentración.

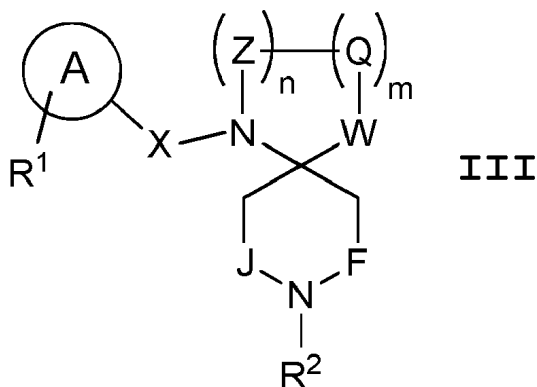
3. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el

que dicho compuesto es un compuesto de la Serie C-2 que corresponde en estructura a la Fórmula II siguiente:



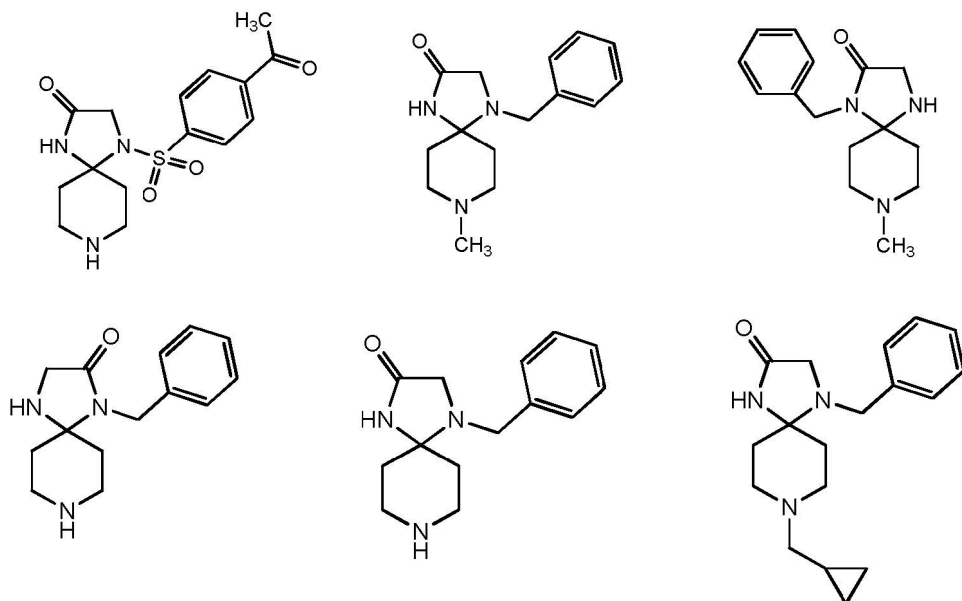
en la que J y F son iguales o diferentes y son CH₂, CHD o CD₂ (donde D es deuterio).

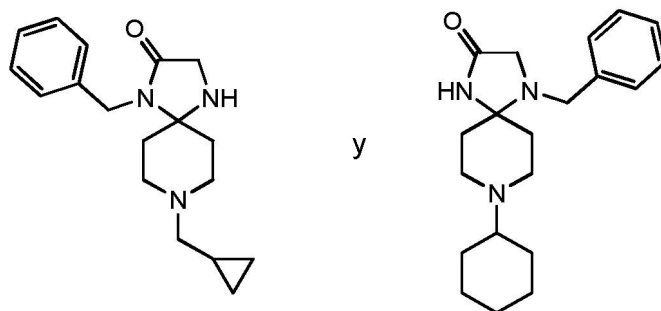
4. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho compuesto es un compuesto de la Serie C-2 que corresponde en estructura a la Fórmula III siguiente:



en la que J y F son iguales o diferentes y son CH₂, CHD o CD₂ (donde D es deuterio); y cada uno de m y n es uno.

5. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho compuesto es un compuesto de la Serie C-2 que corresponde en estructura a un compuesto seleccionado del grupo que consiste de:





6. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho método comprende administrar dicho compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo una pluralidad de veces.

7. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho método comprende administrar dicho compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo diariamente.

8. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho método comprende administrar dicho compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo varias veces al día.

9. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de dicho compuesto se administra en una composición farmacéutica.

10. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicha composición farmacéutica está en forma líquida.

11. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicha composición farmacéutica está en forma sólida.

Fig. 1

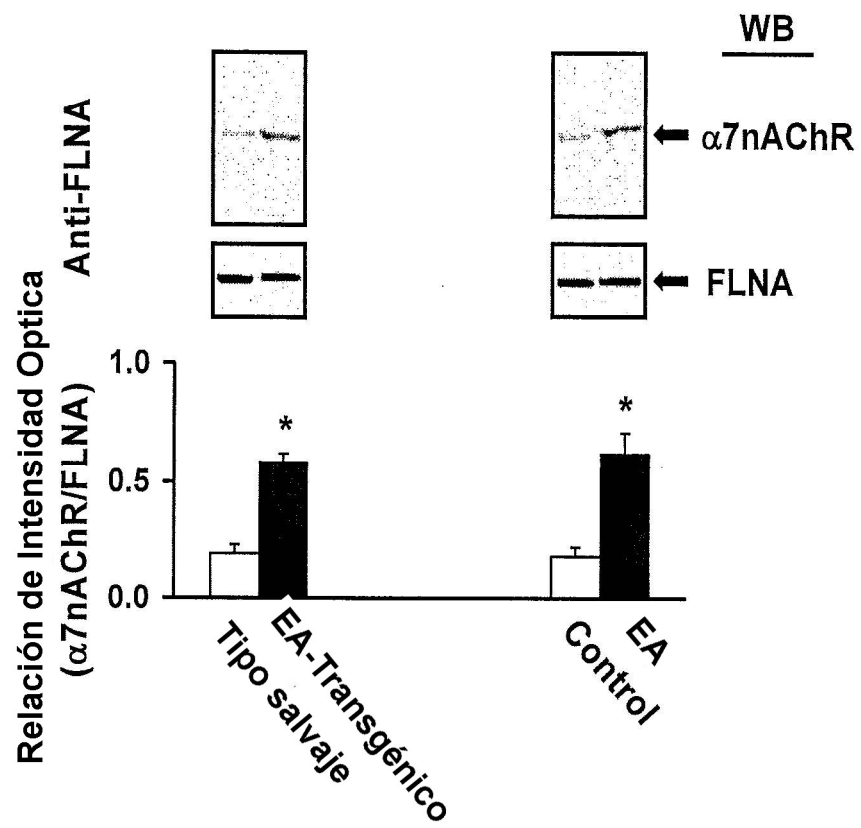
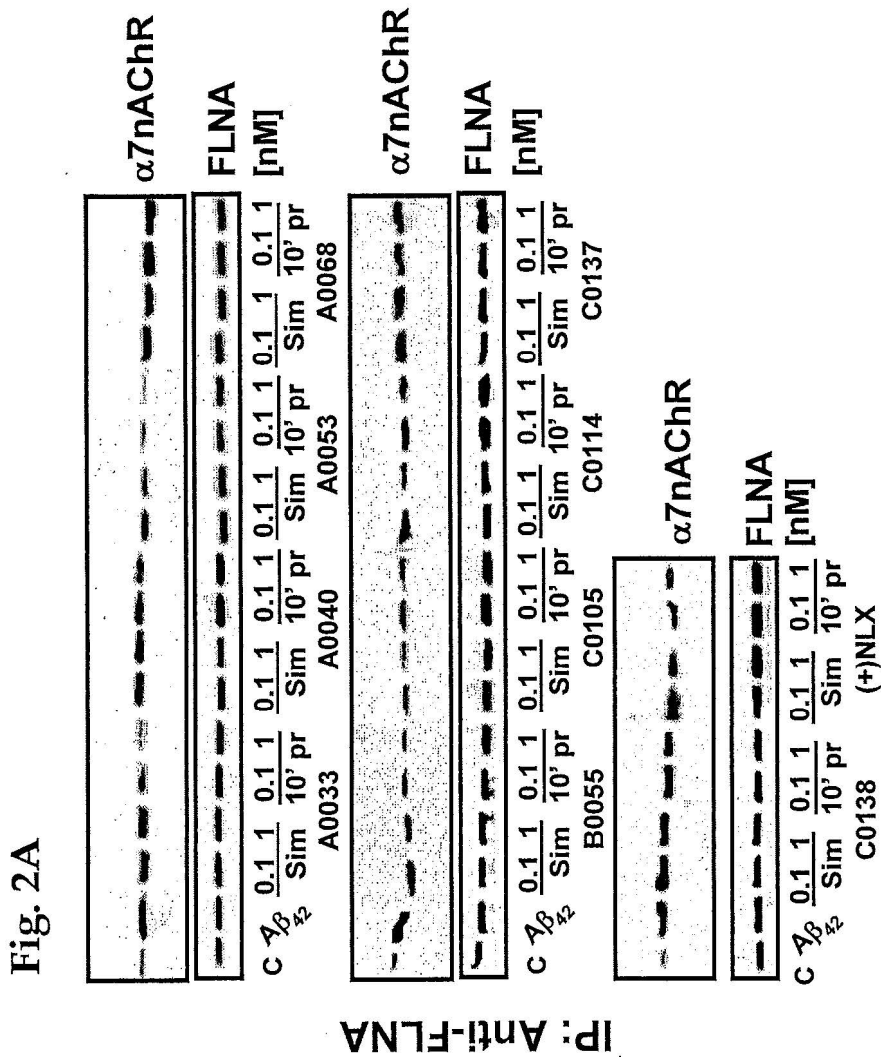


Fig. 2



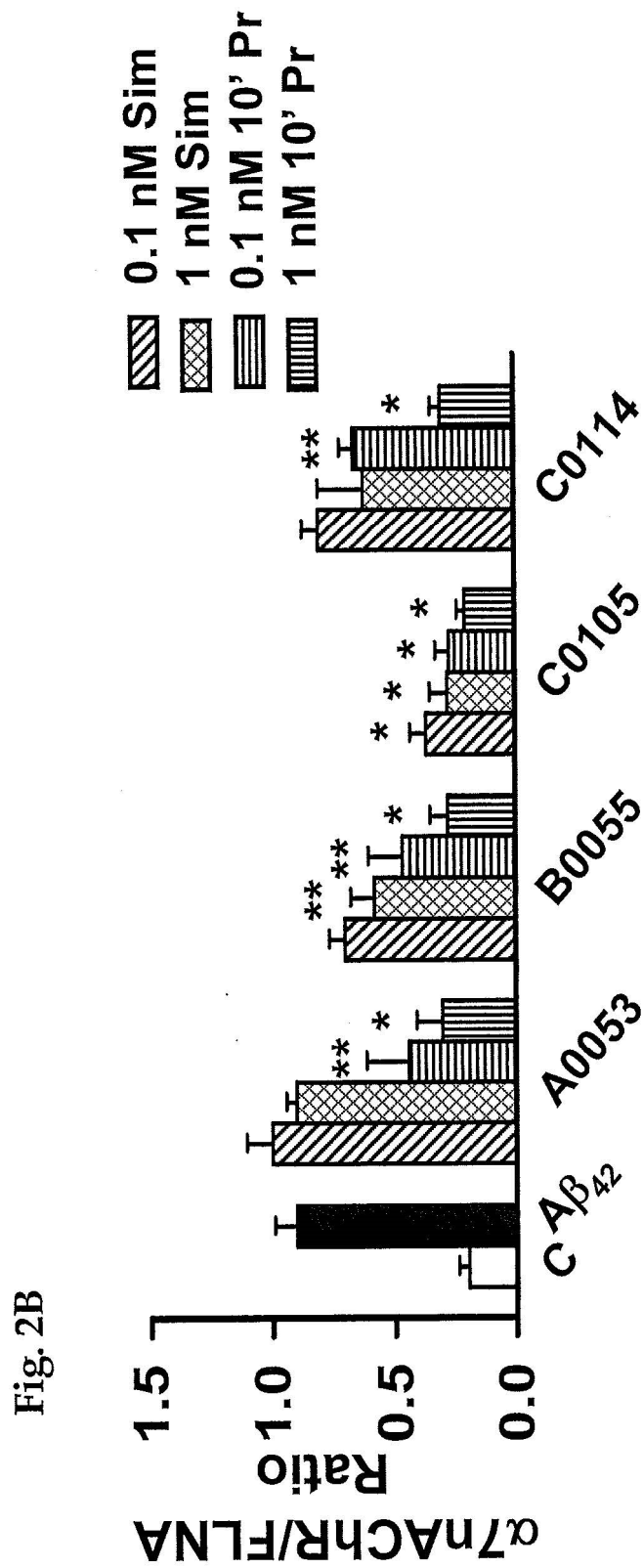


Fig. 3B

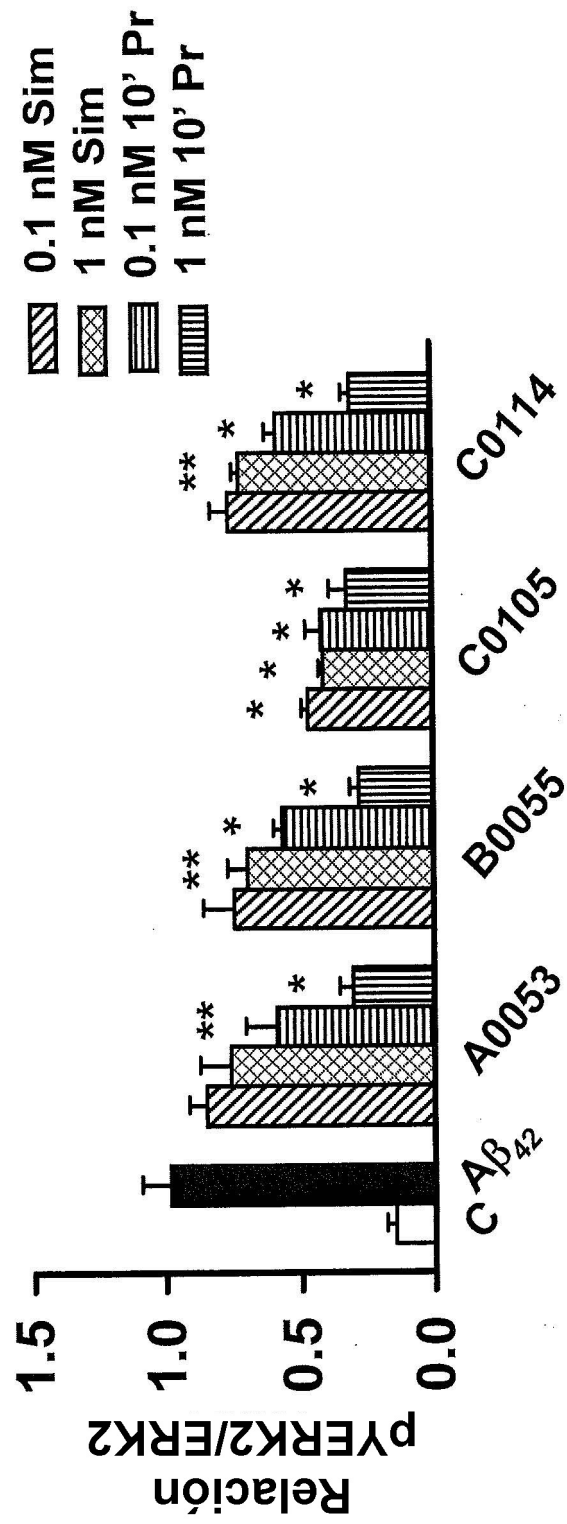


Fig. 4

Fig. 4A

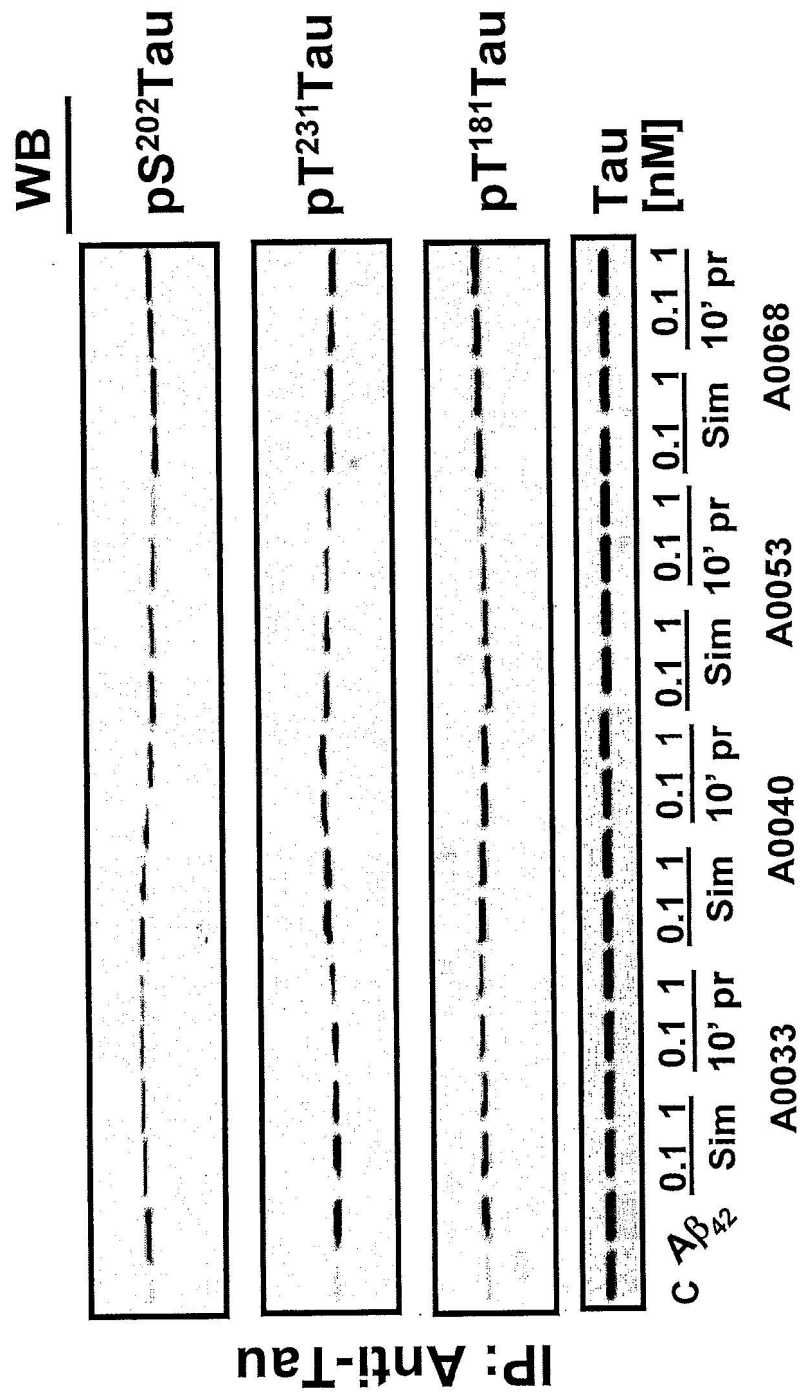


Fig. 4B

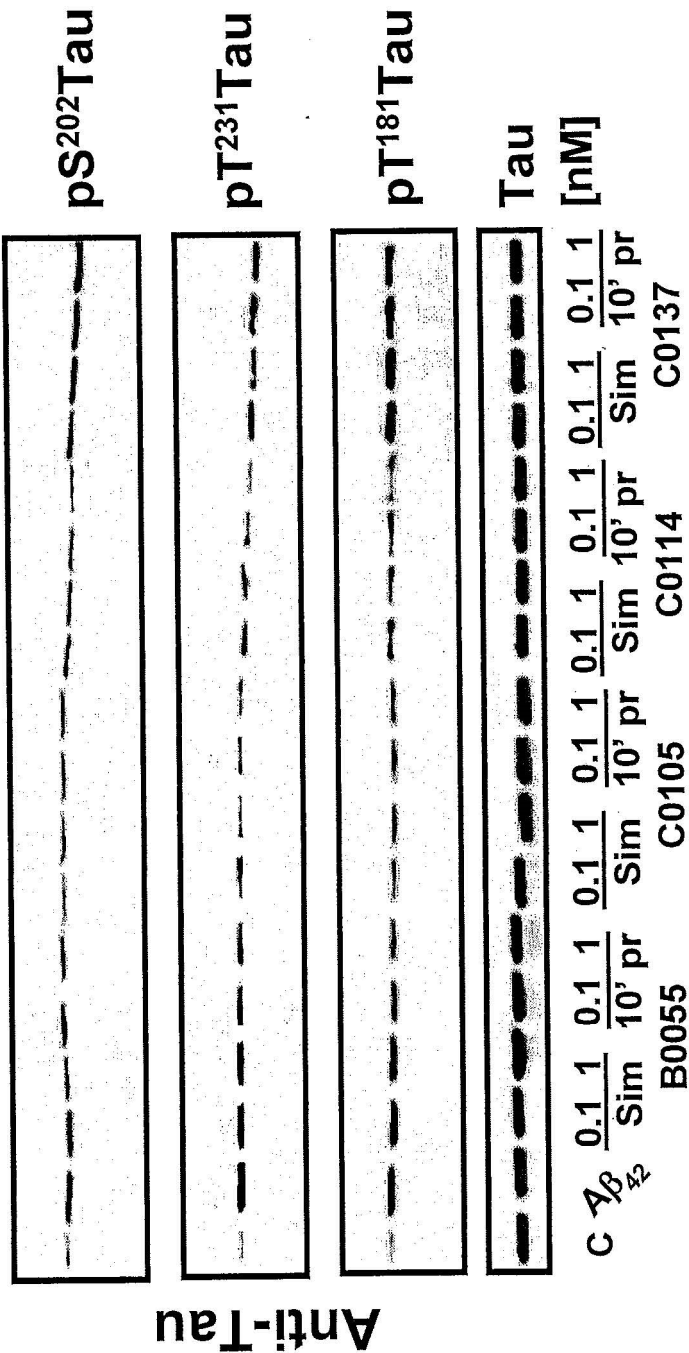


Fig. 4C

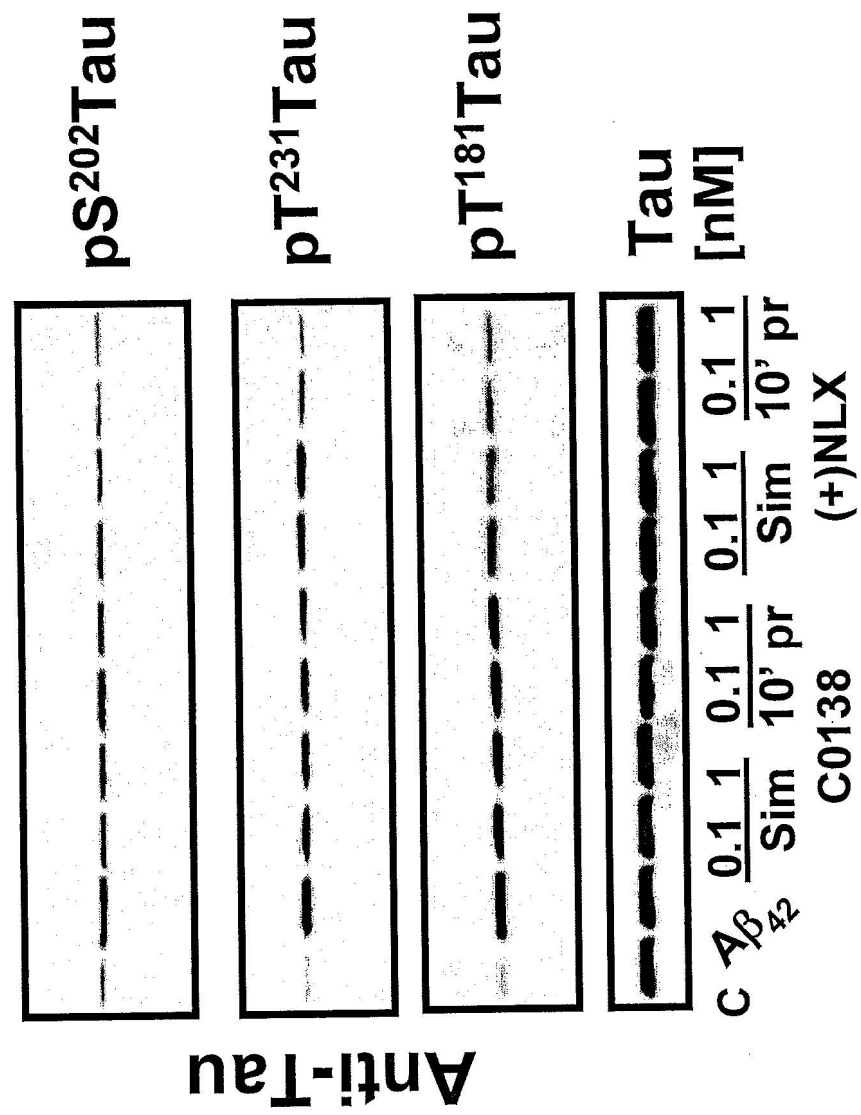


Fig. 4D

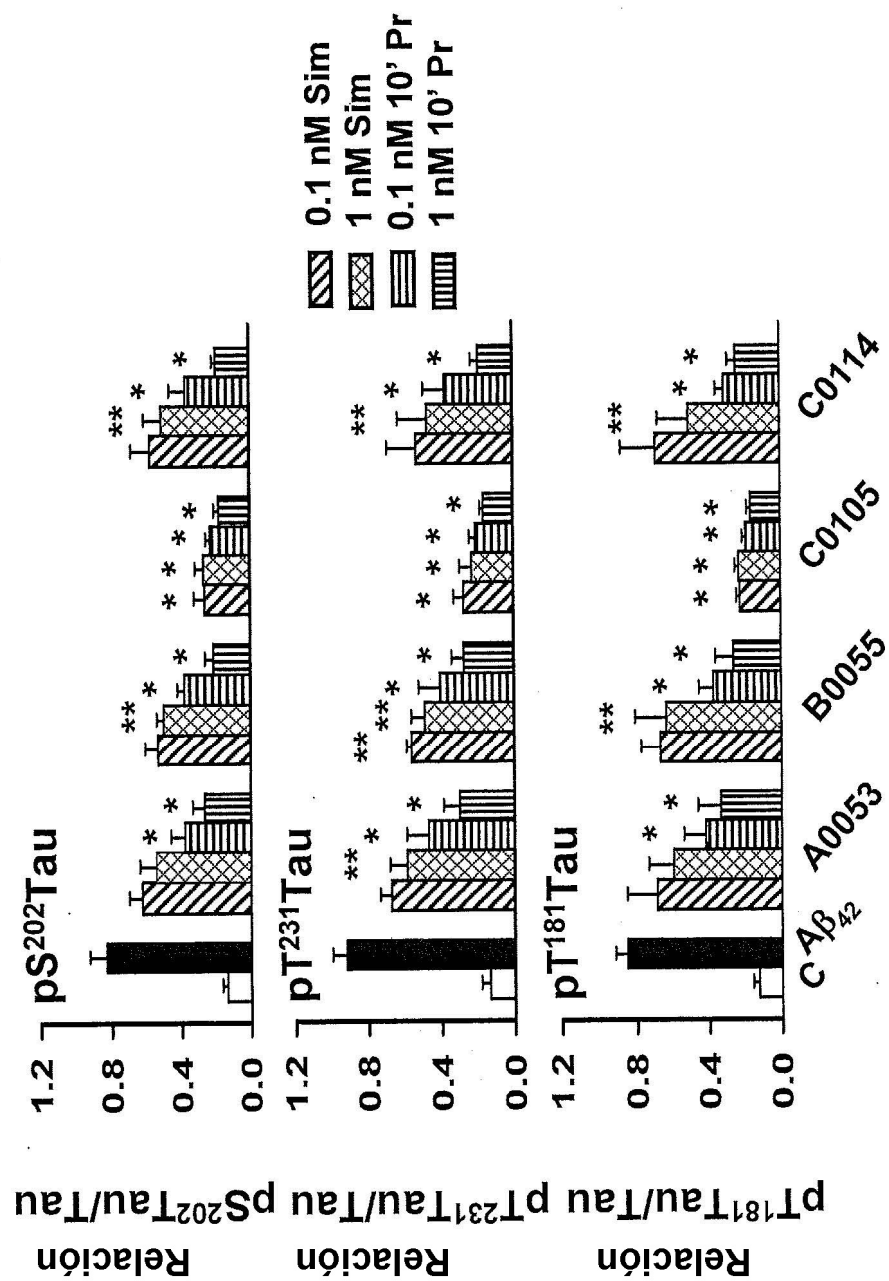


FIG. 5

Fig. 5A

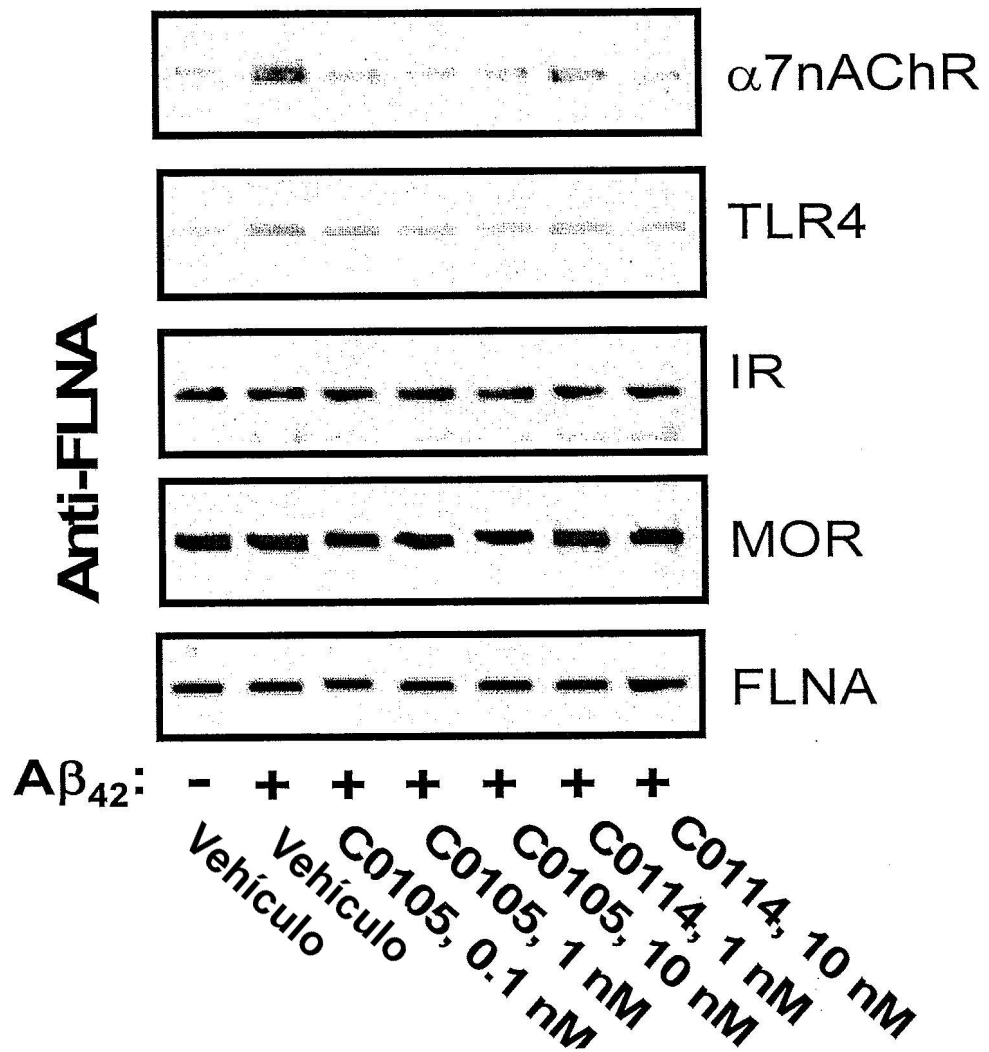


Fig. 5B

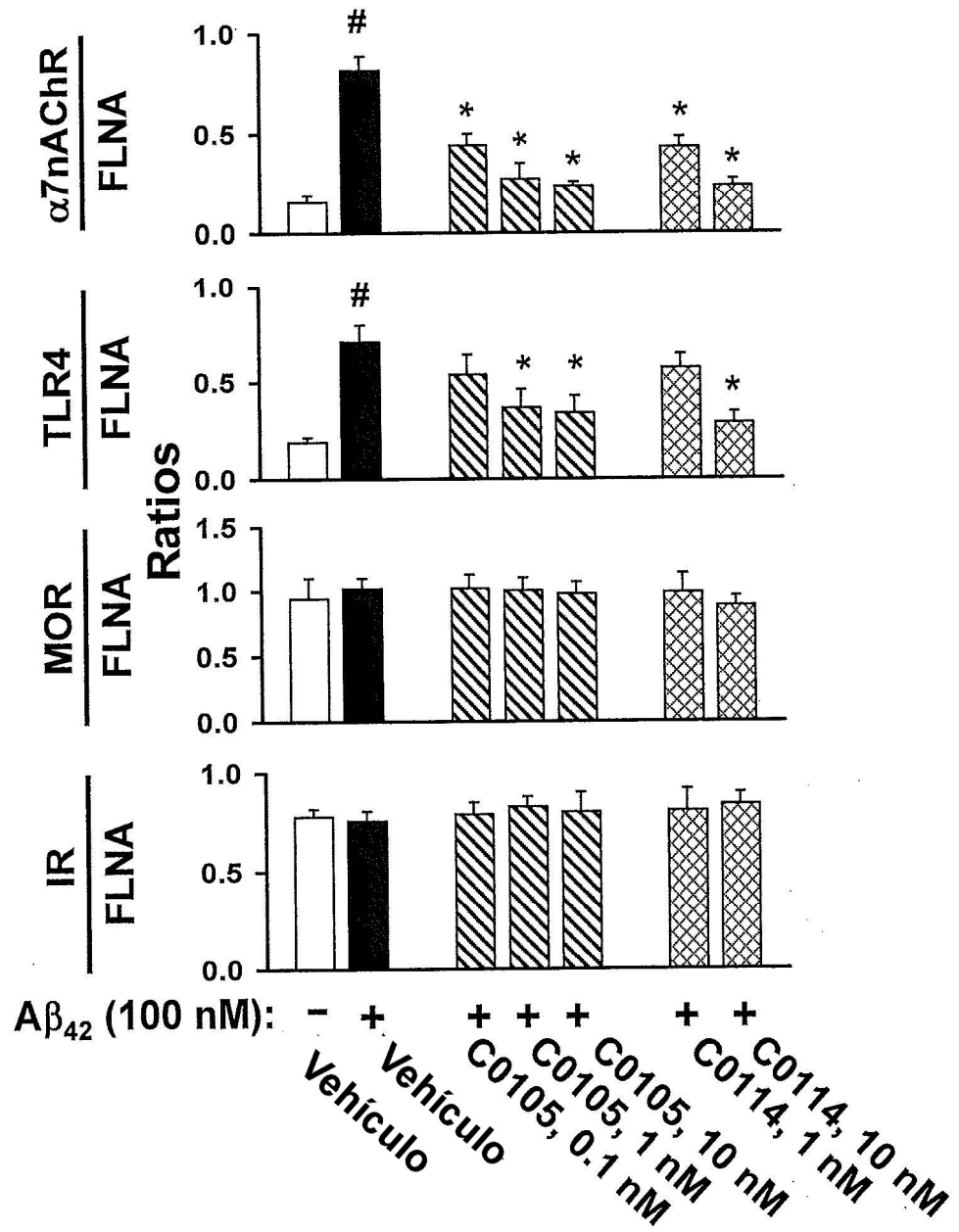


Fig. 5C

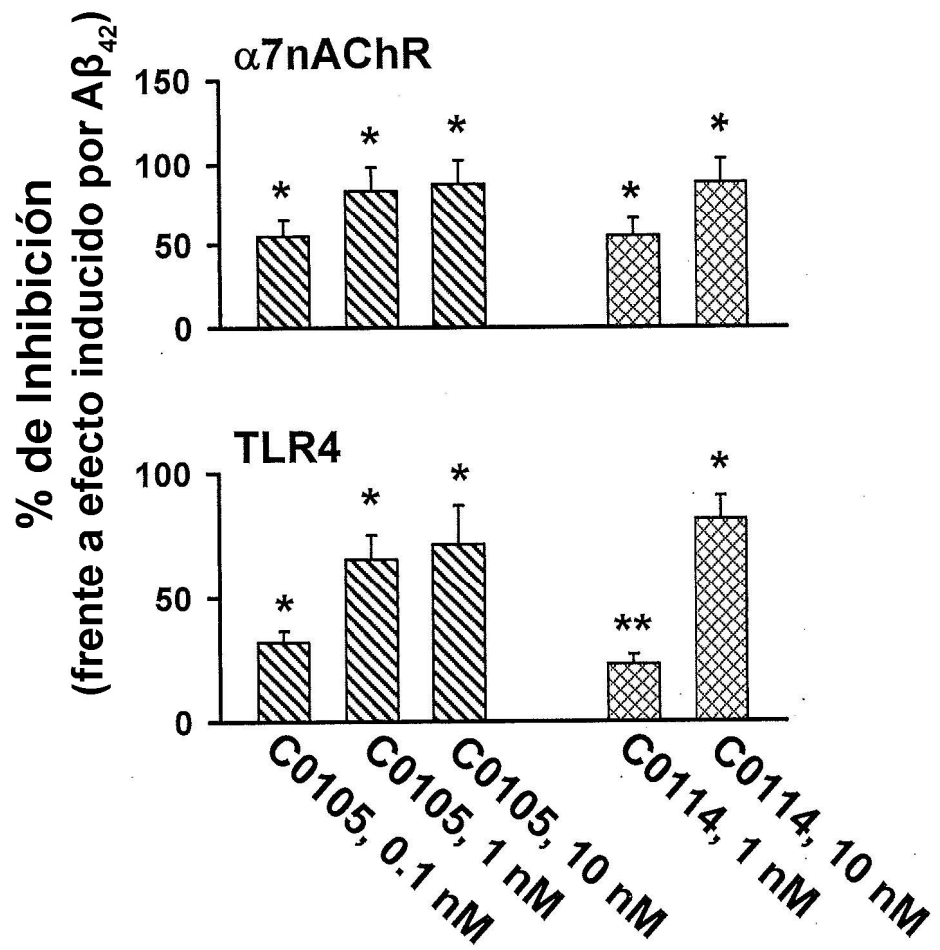


Fig. 6

Fig. 6A

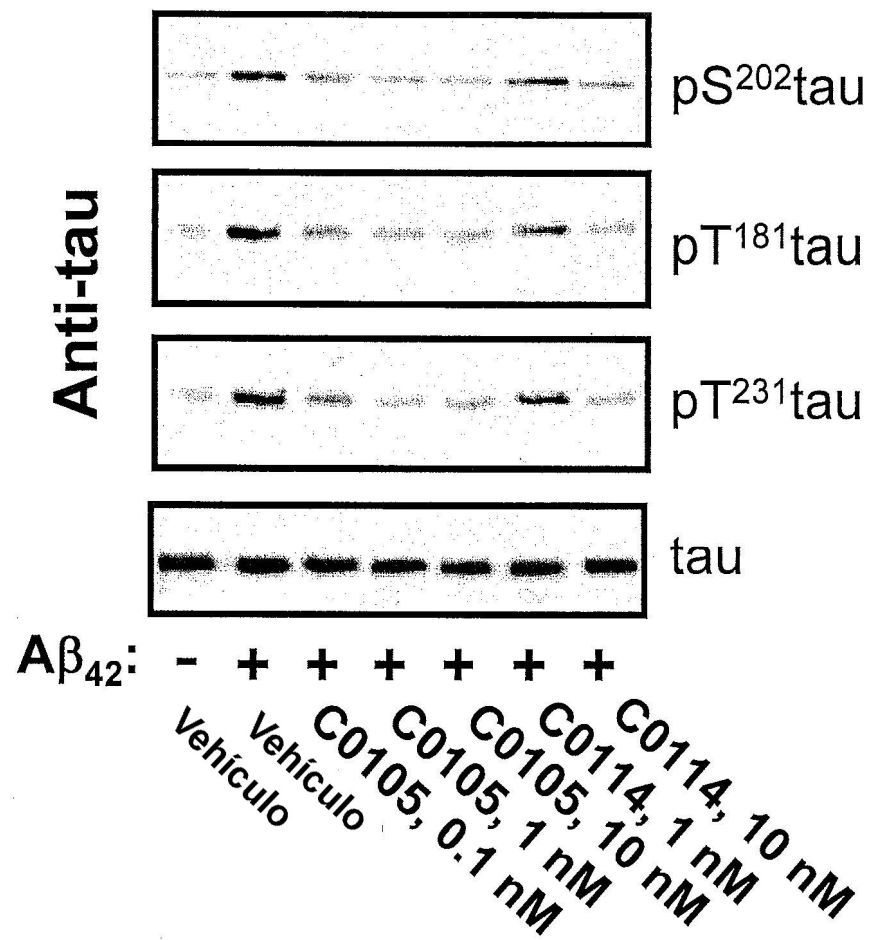


Fig. 6B

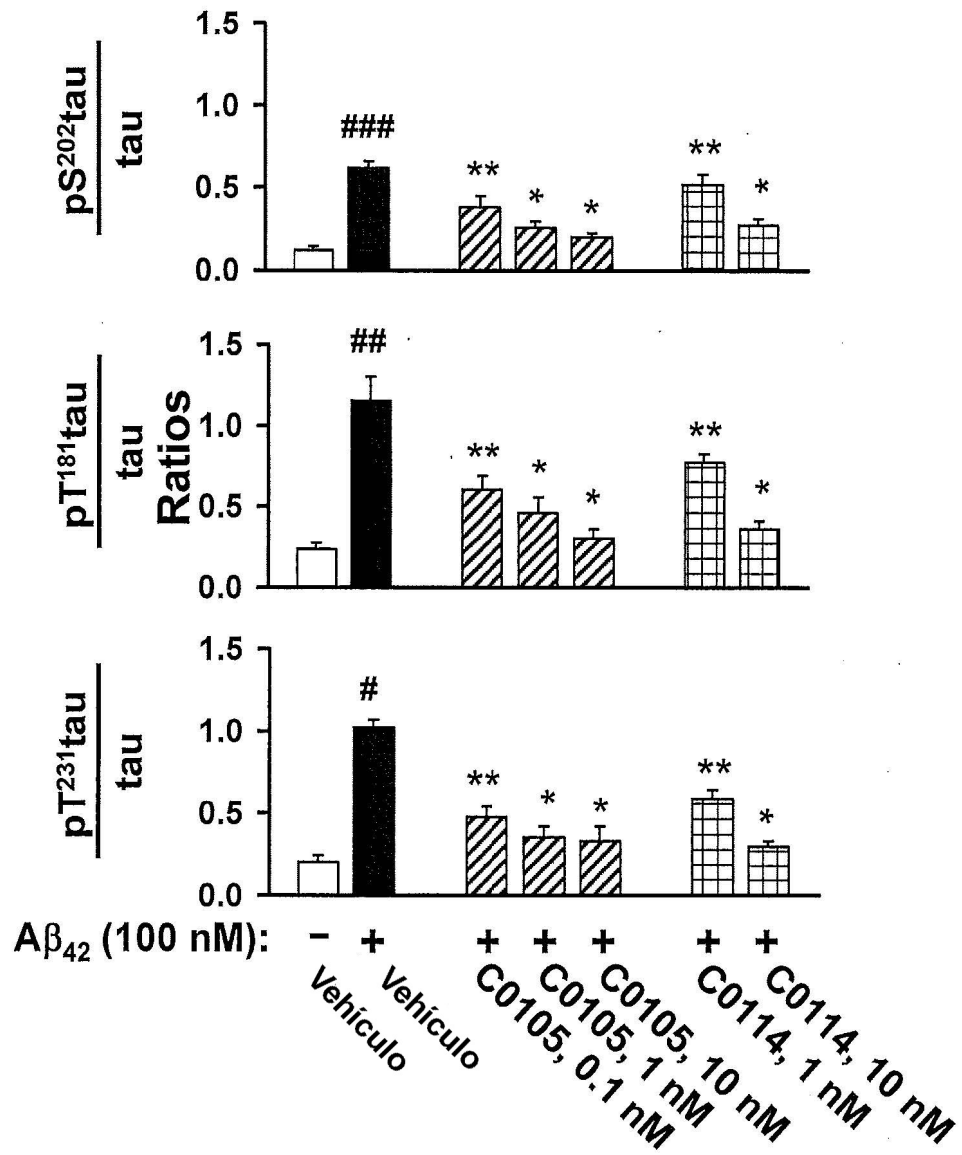


Fig. 6C

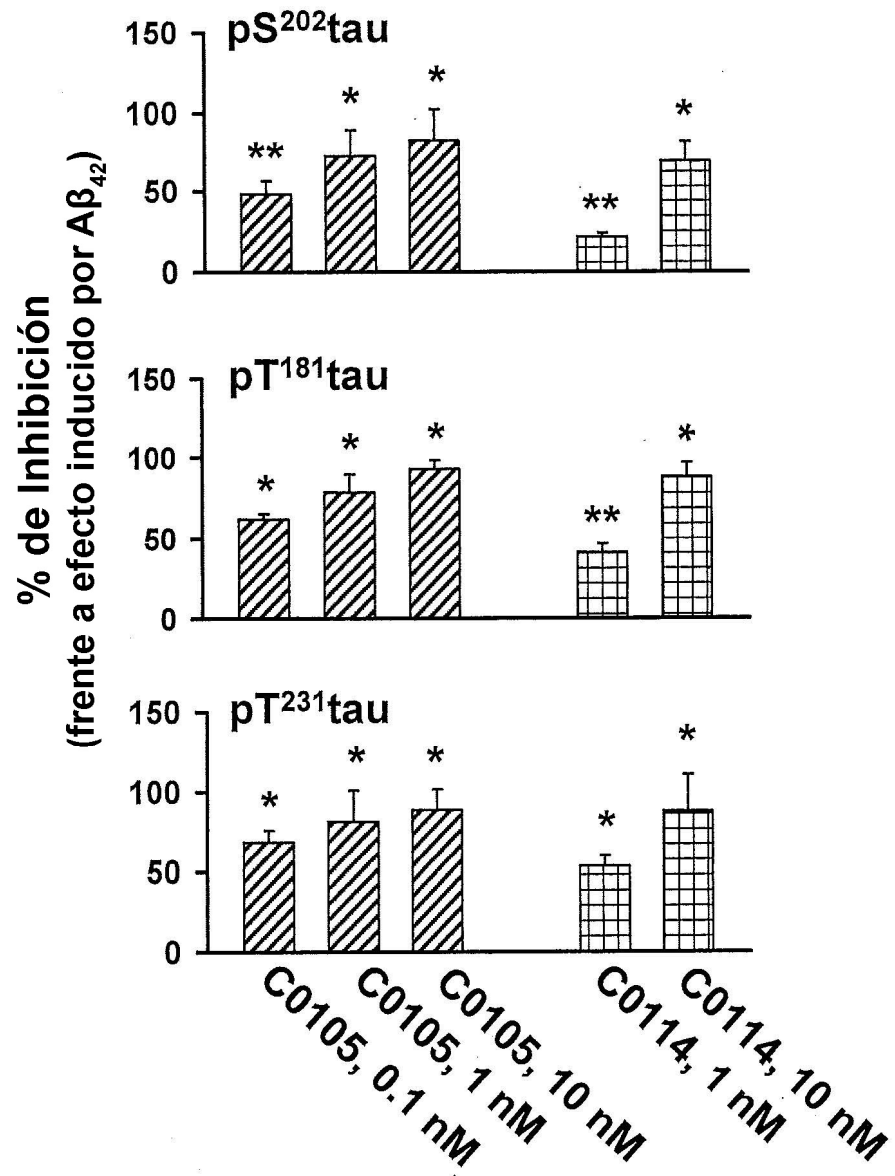


Fig. 7

El tratamiento simultáneo de C0105 o C0114 con $A\beta_{42}$ durante 16 horas
previene la disfunción inducida por $A\beta_{42}$ en cortes de FCX

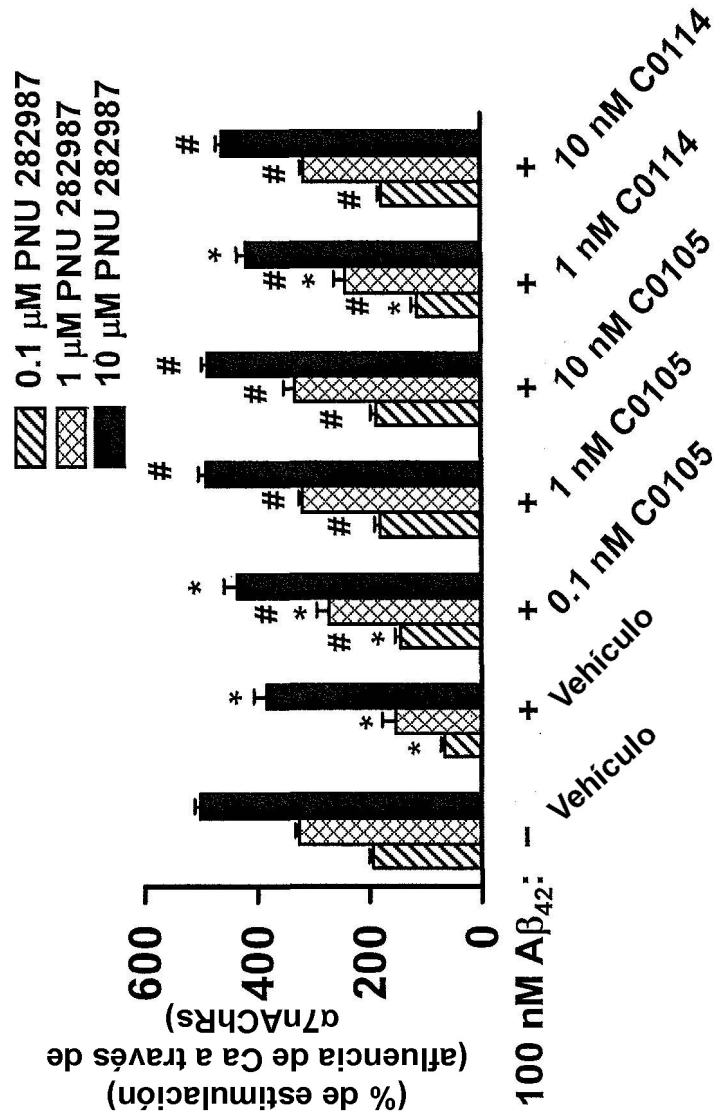


Fig. 8

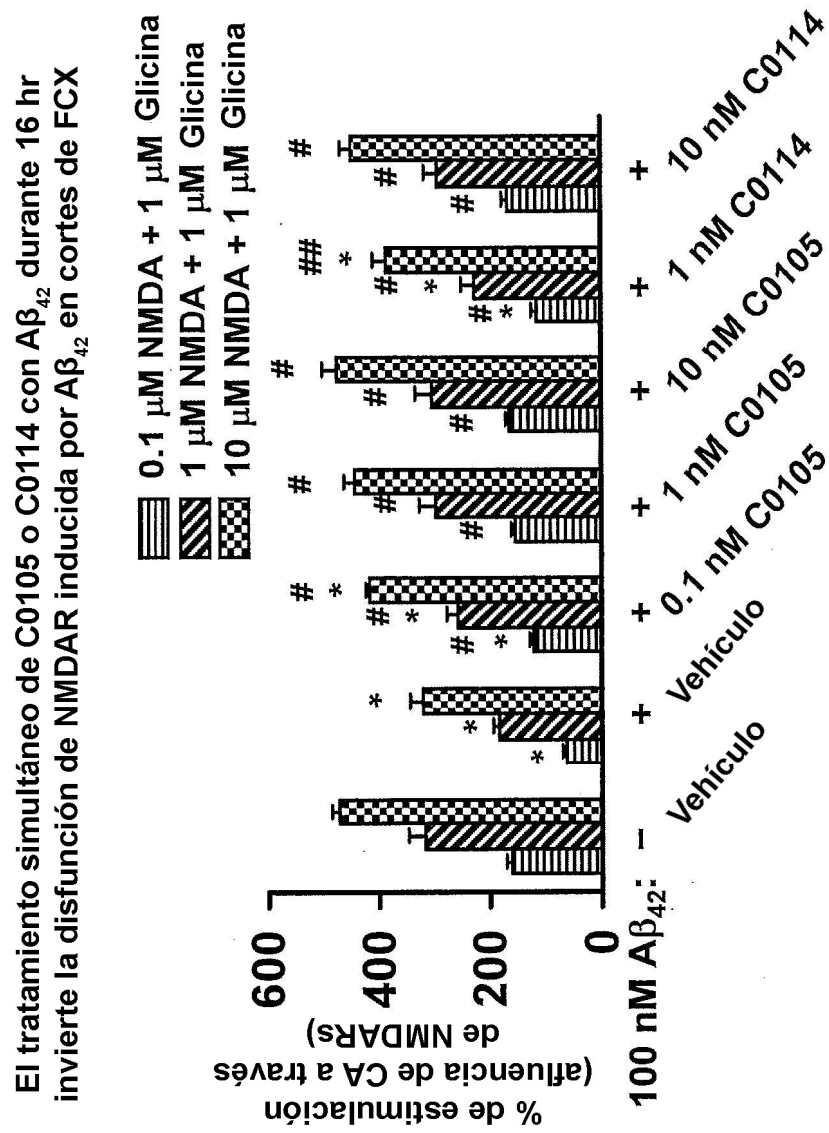


Fig. 9

Fig. 9A

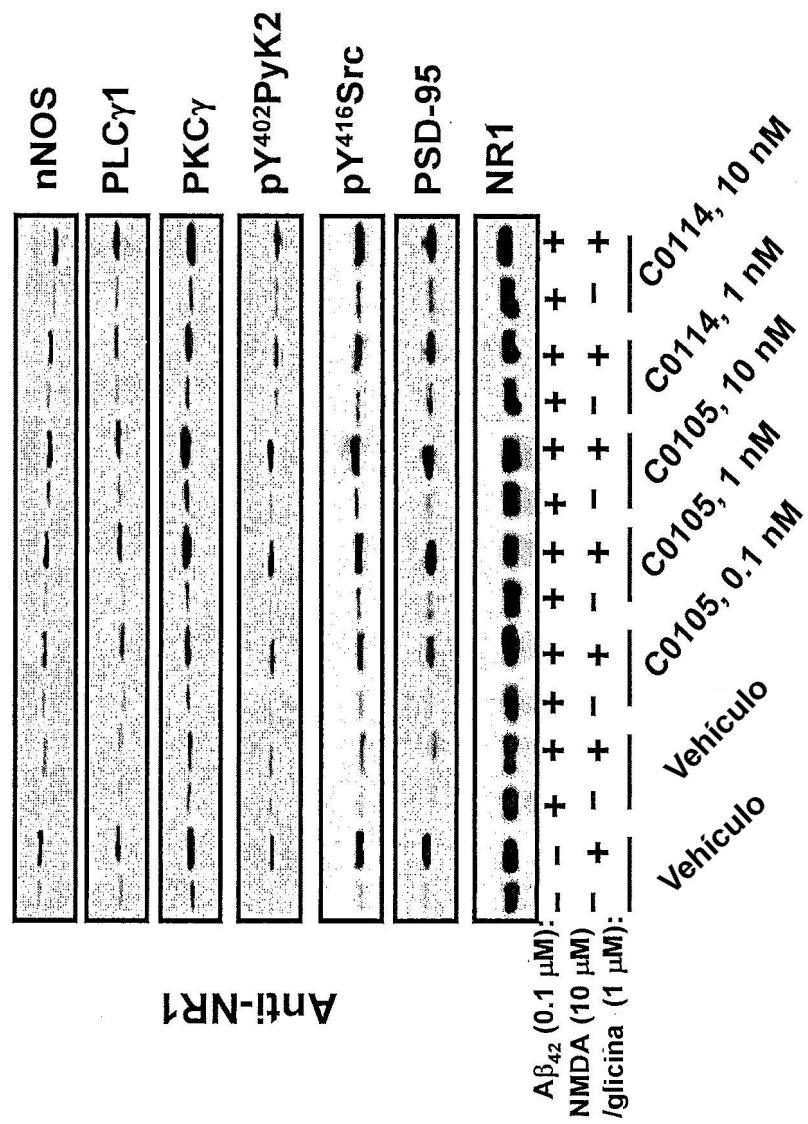


Fig. 9B

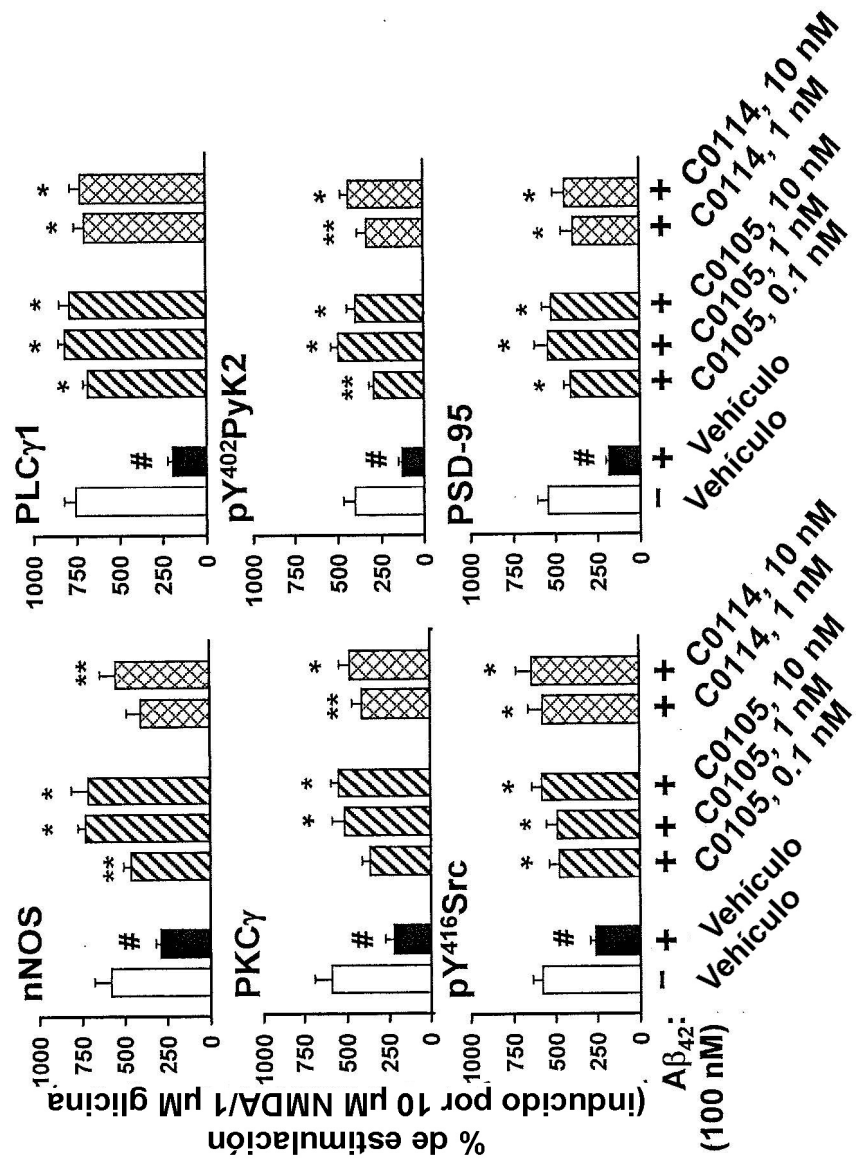


Fig. 10

Fig. 10 A

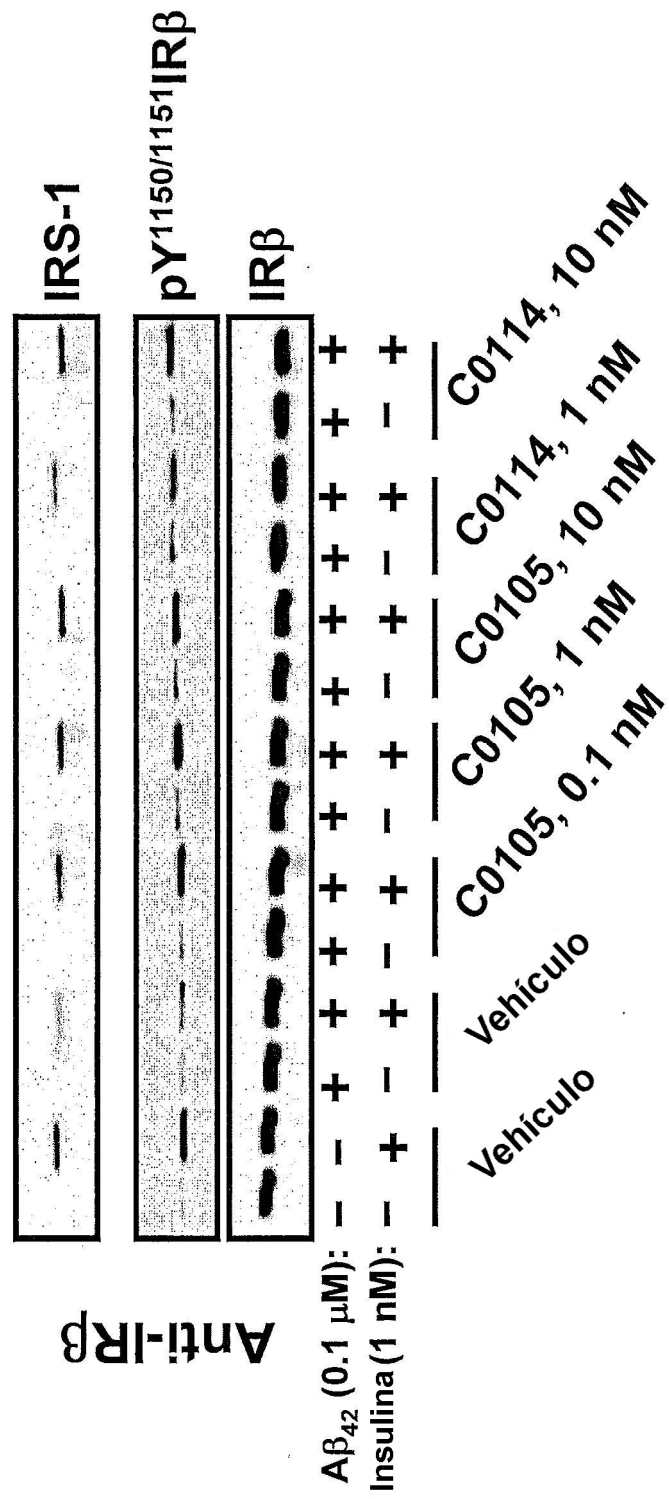


Fig. 10 B

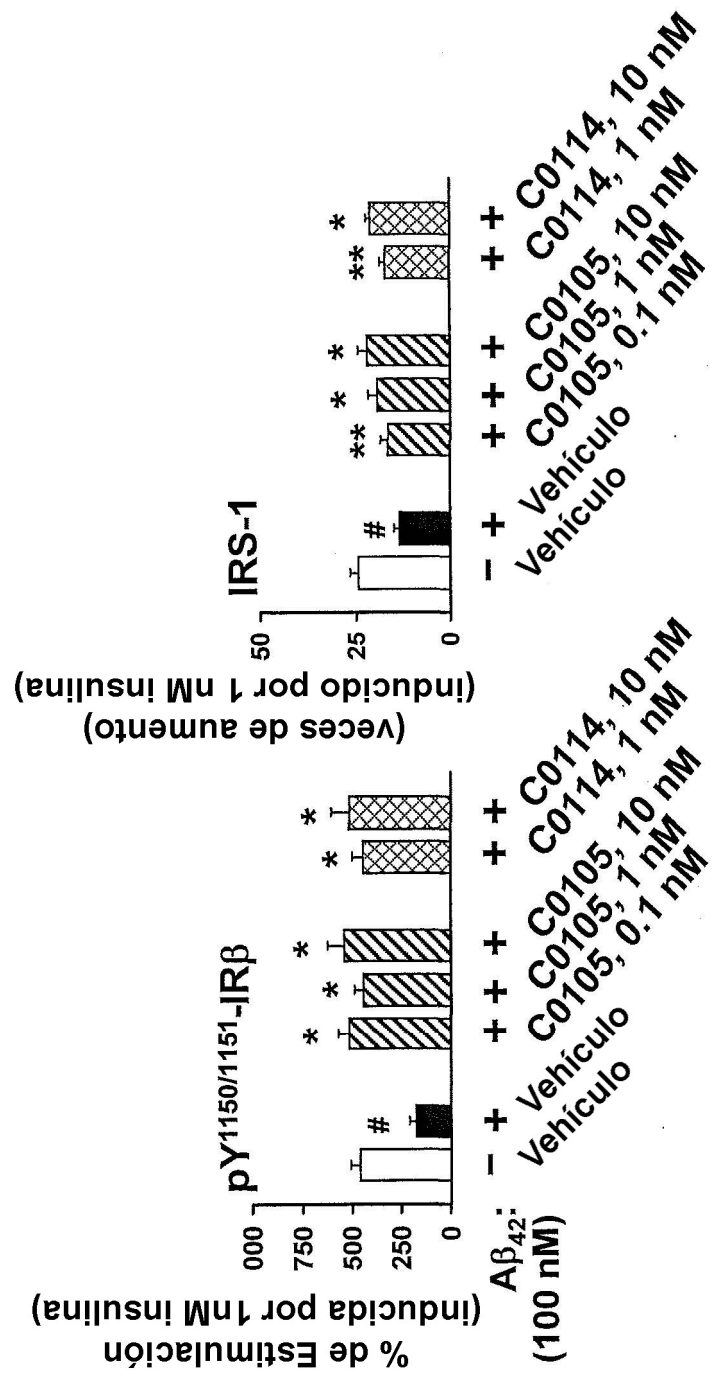


Fig. 11

El tratamiento simultáneo de C0105 o C0114 con $A\beta_{42}$ durante 16 hr invierte la reducción inducida por $A\beta_{42}$ en la afluencia de Ca^{2+} inducida por K^+ en cultivo organotípico de cortes corticales frontales

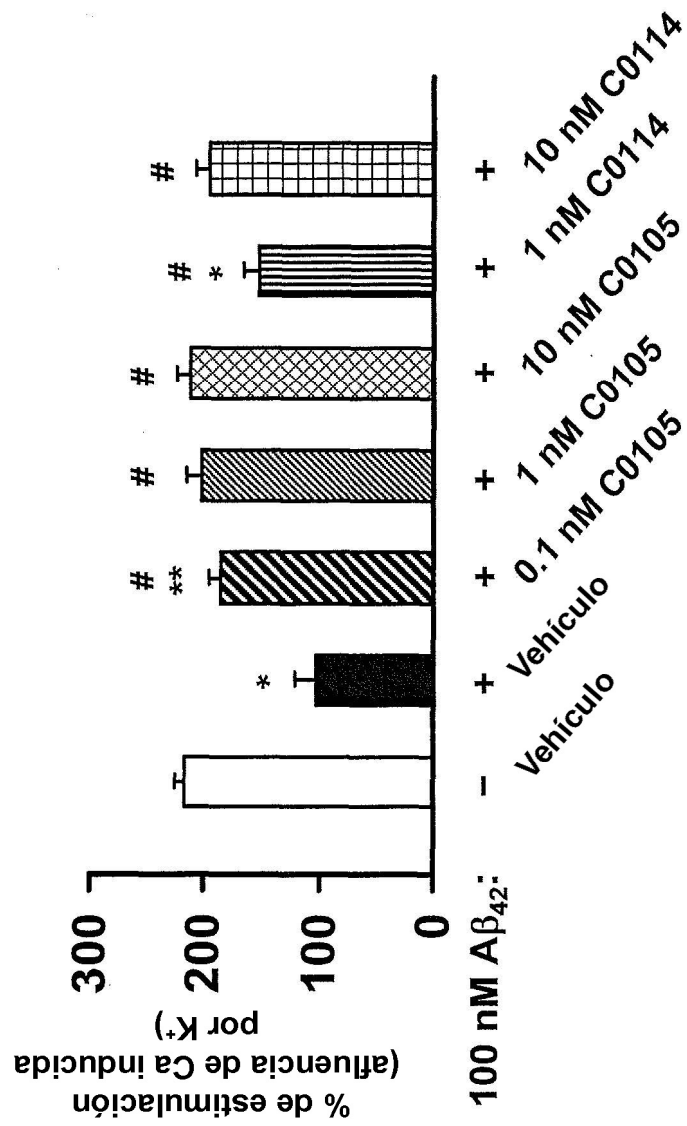


Fig. 12

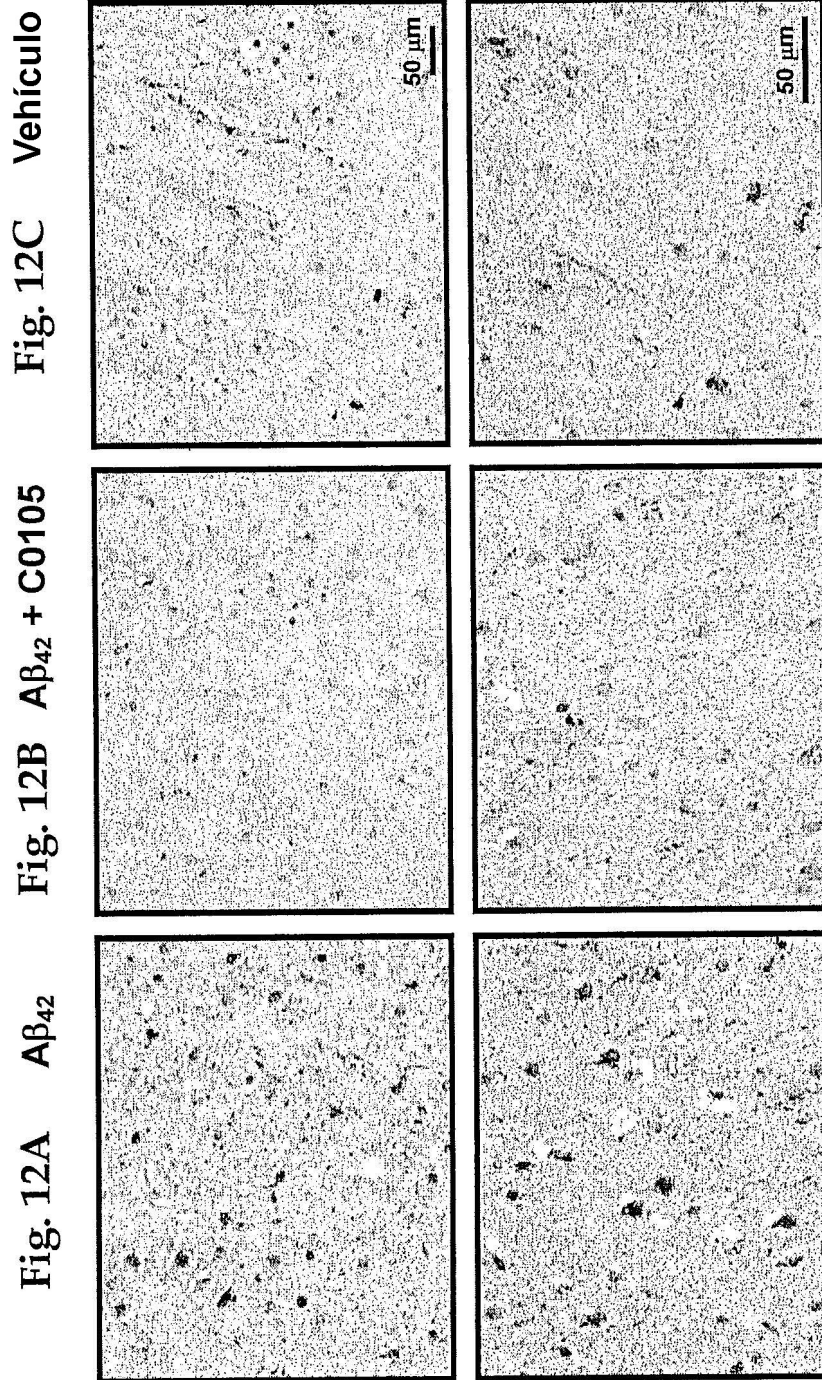


Fig. 13

Fig. 13A $A\beta_{42}$ Fig. 13B $A\beta_{42}$ + C0105 Fig. 13C Vehículo

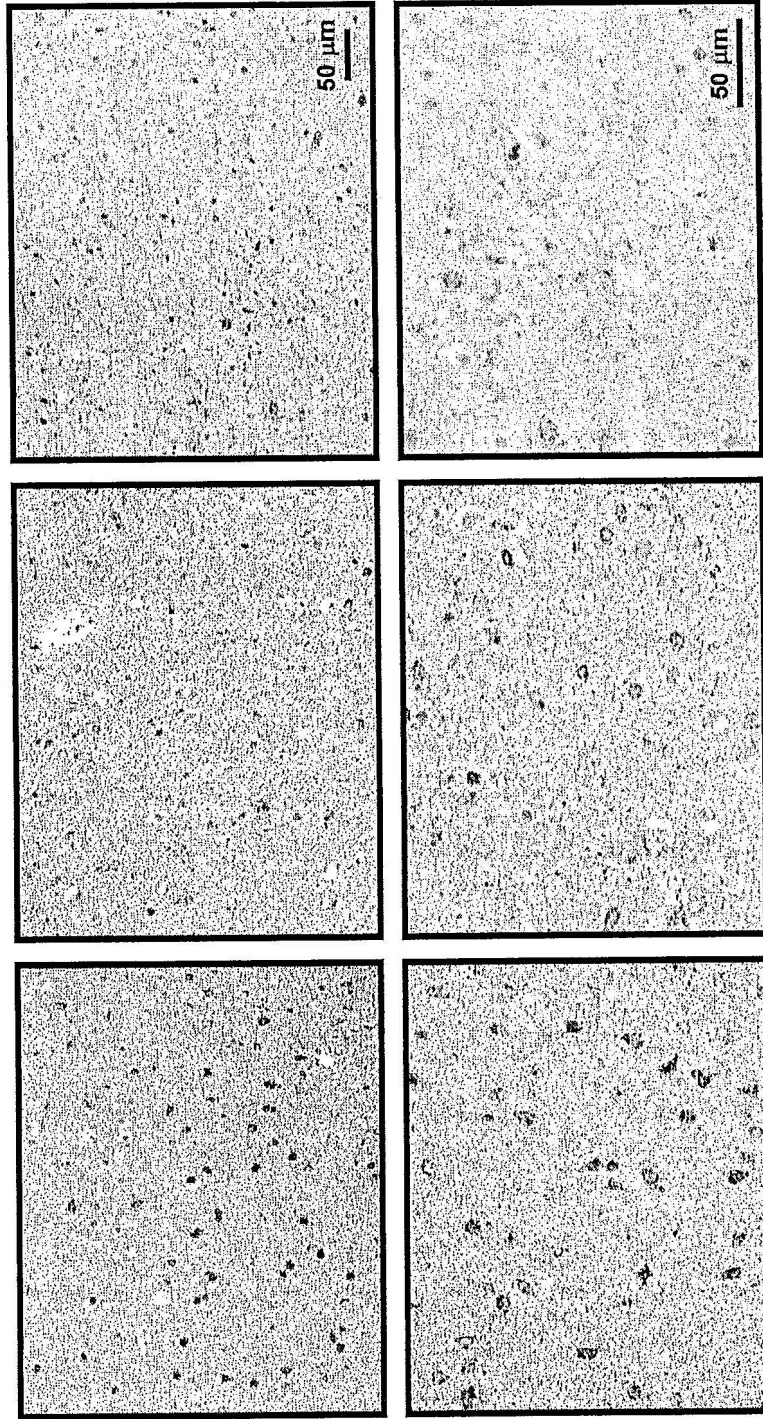


Fig. 14

Fig. 14 A

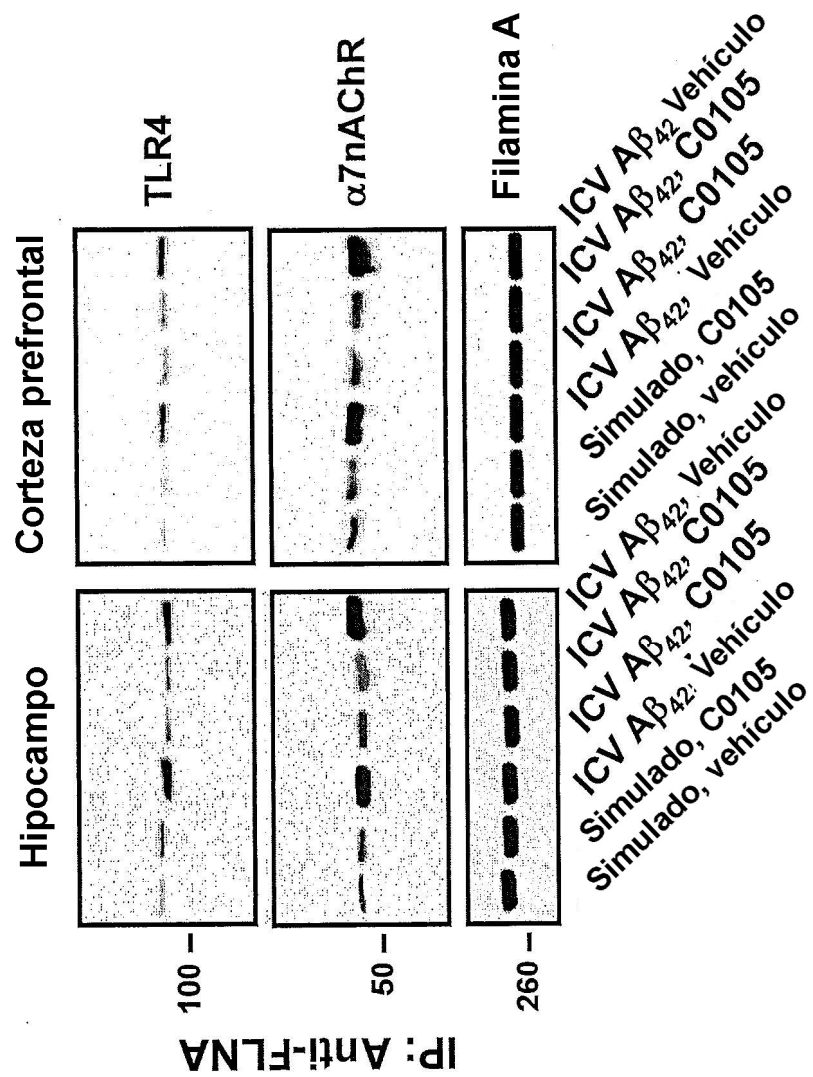


Fig. 14B

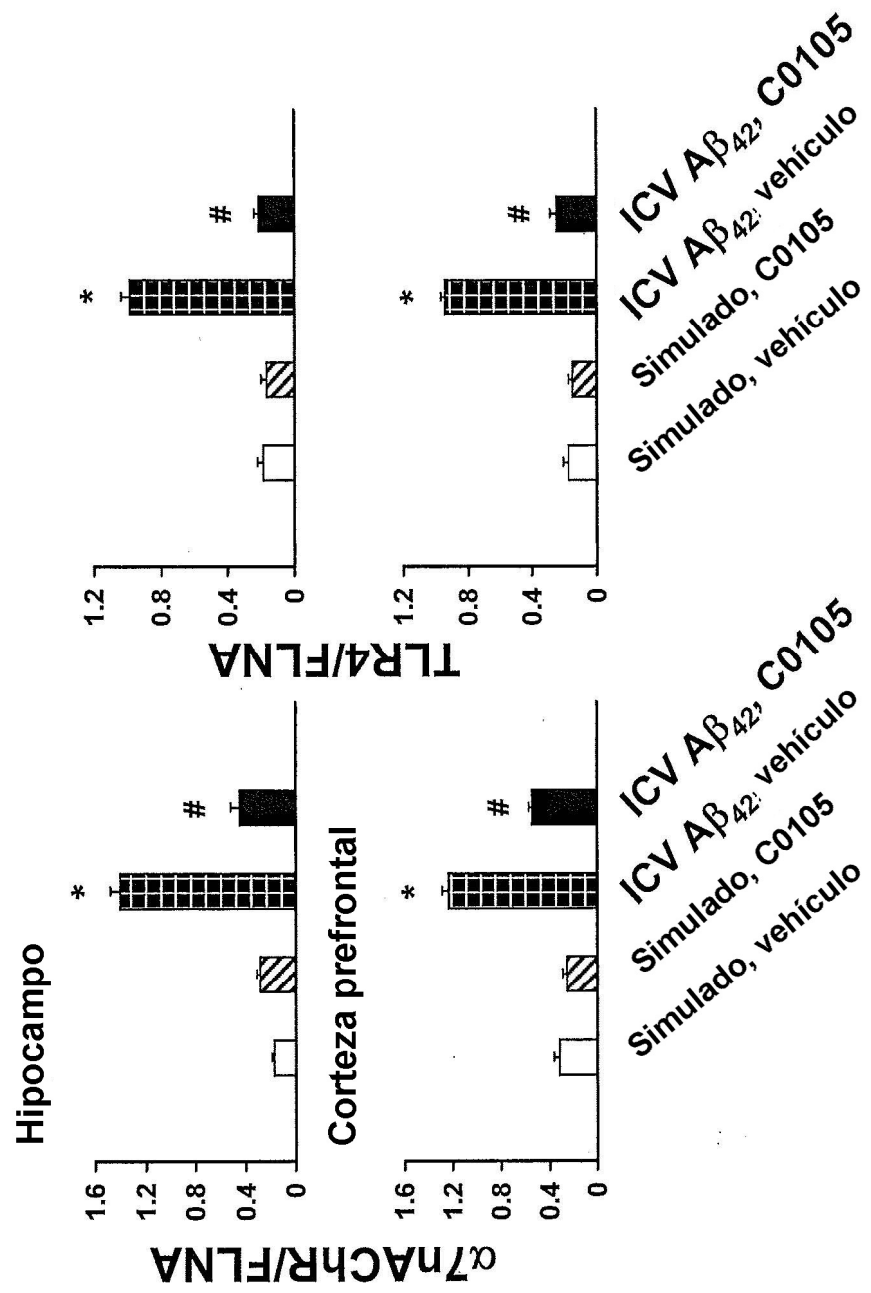


Fig. 14C

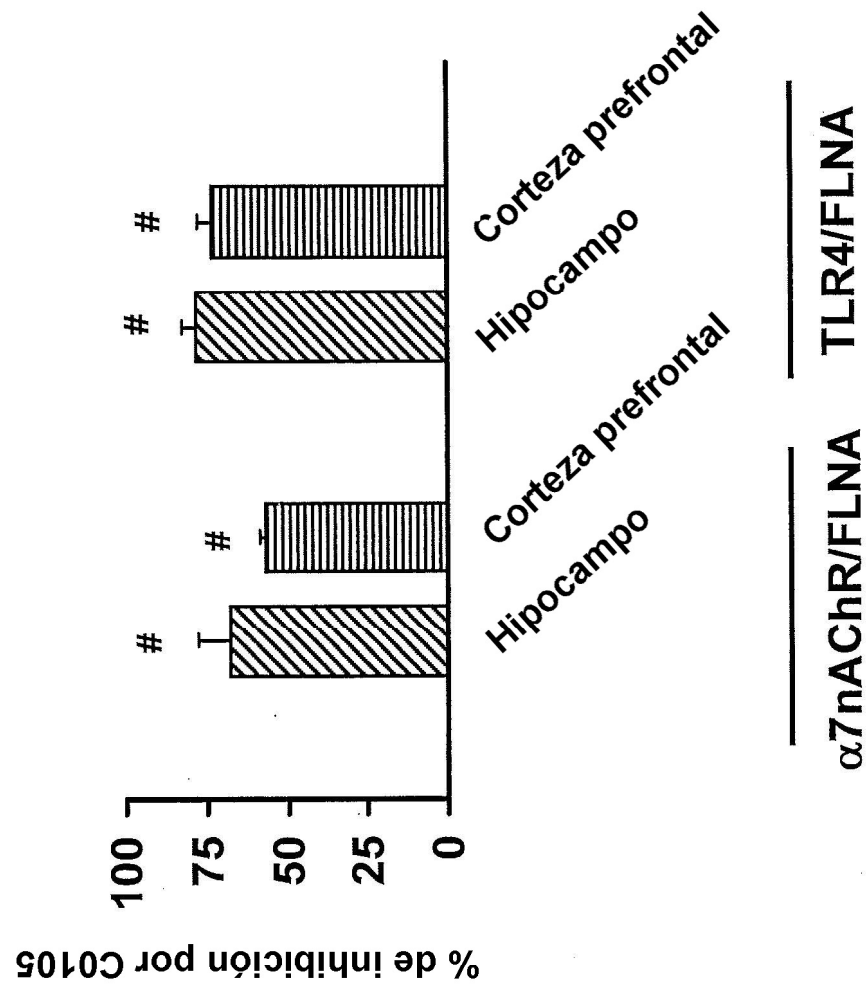


Fig. 15

Fig. 15A

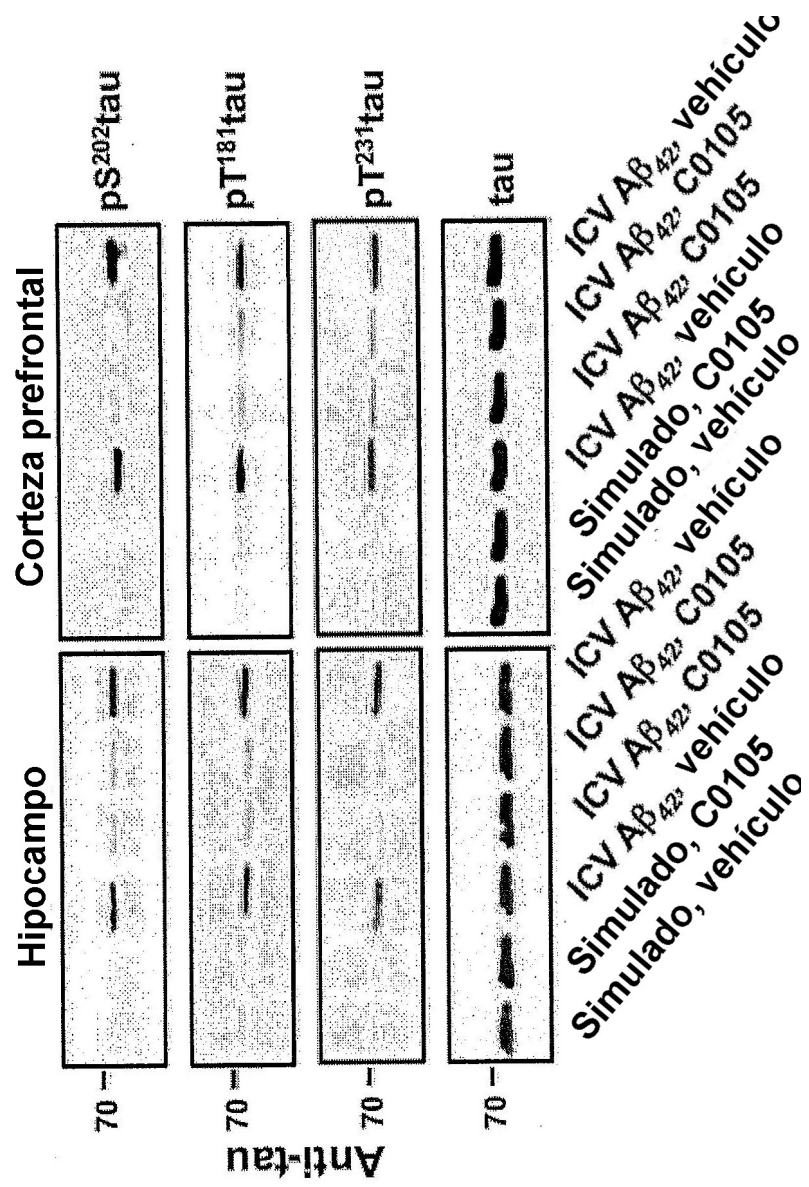


Fig. 15B

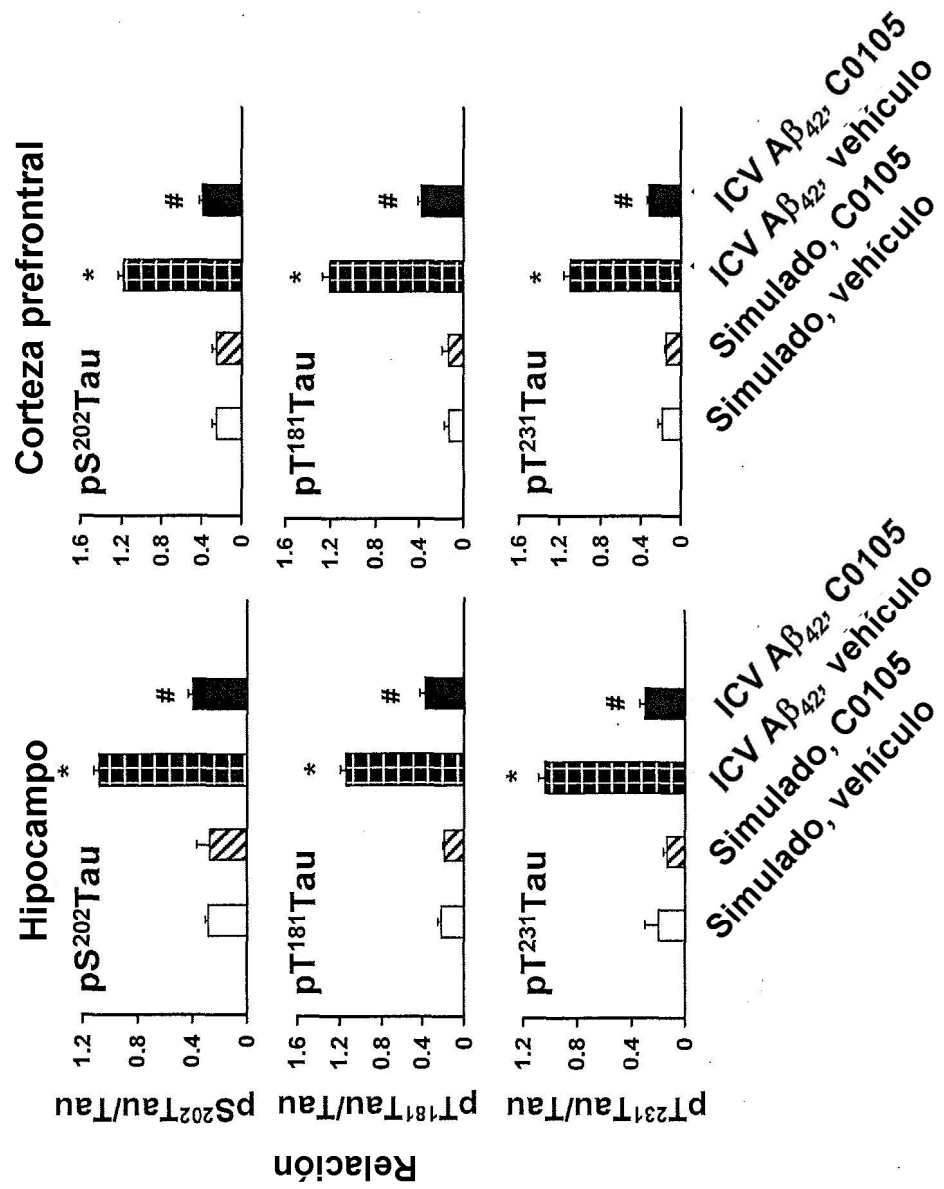


Fig. 15C

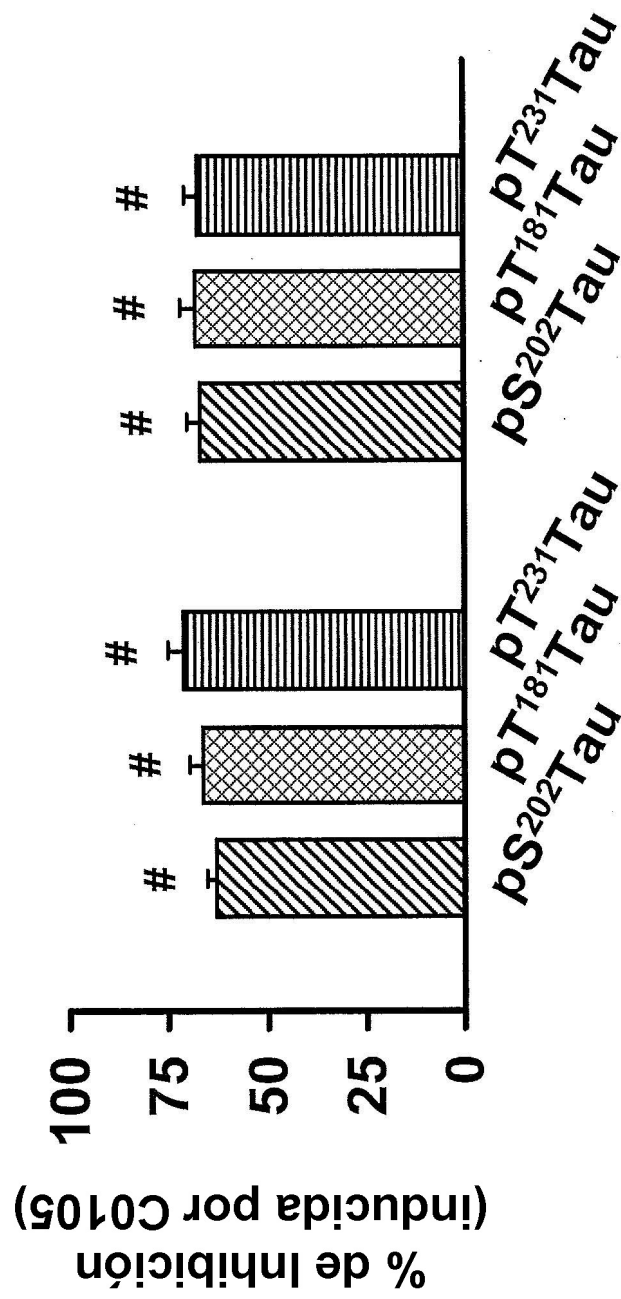


Fig. 16

Fig. 16A

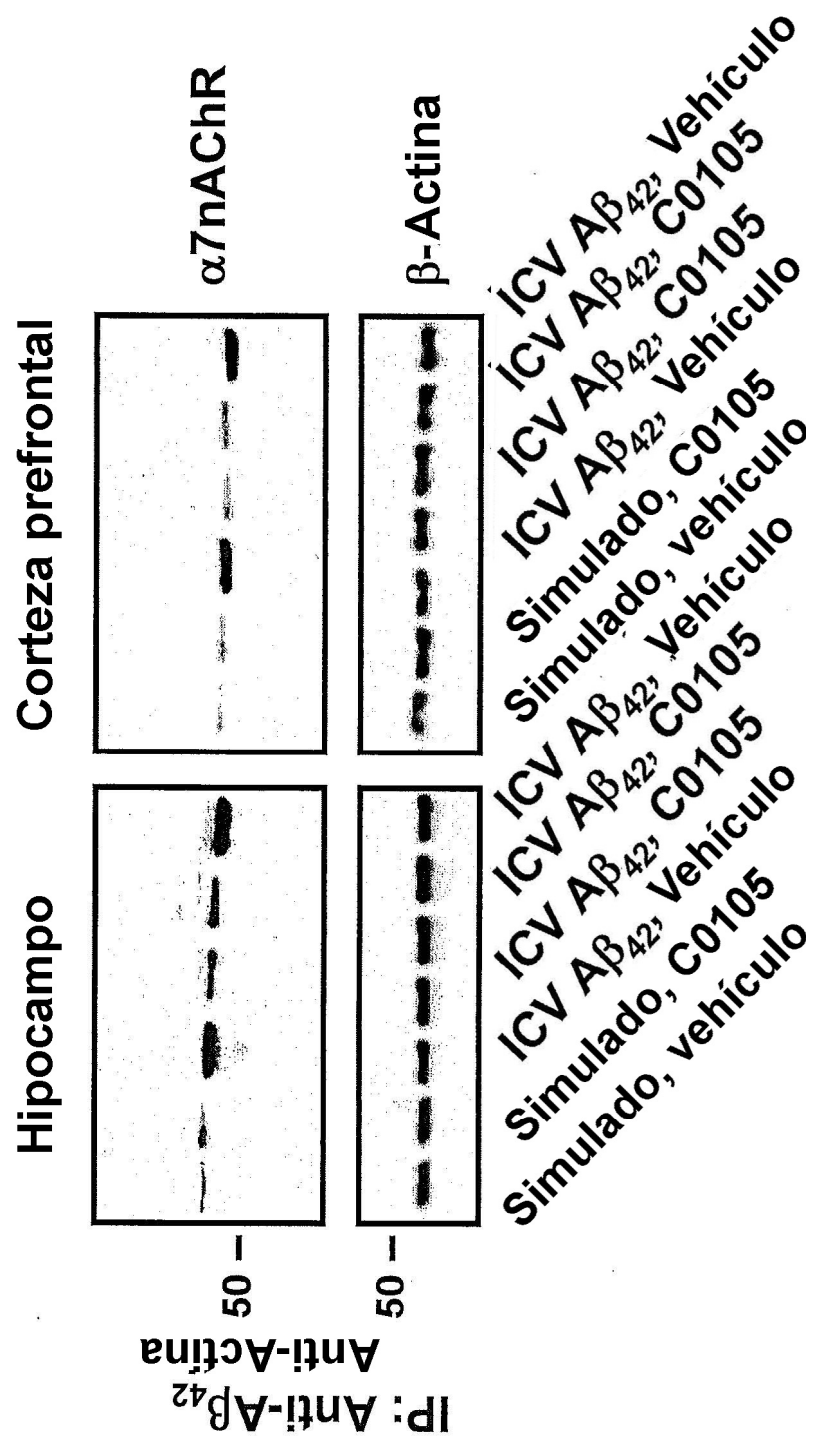


Fig. 16C

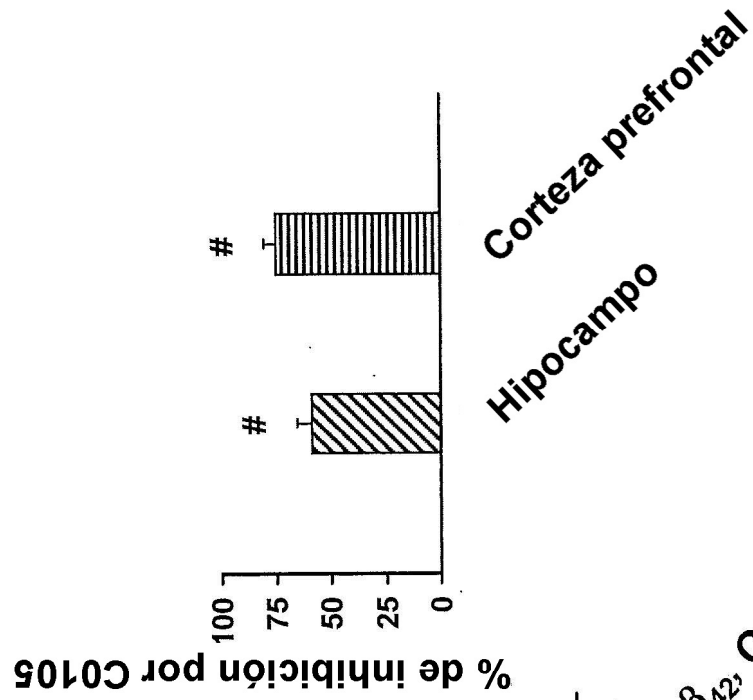


Fig. 16B

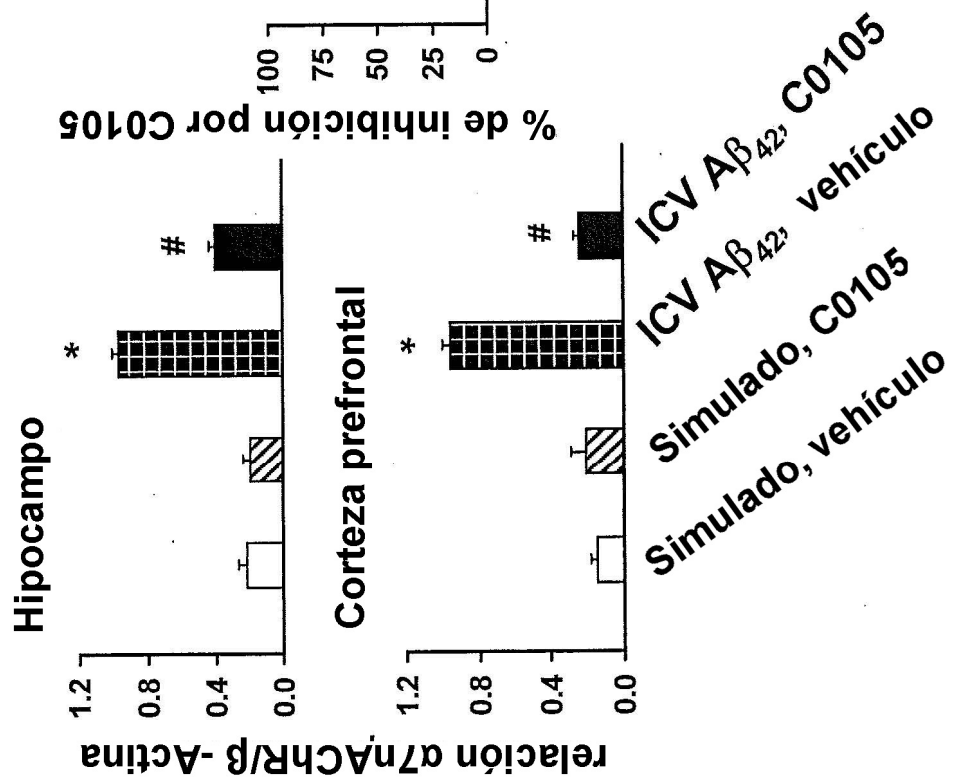


Fig. 17

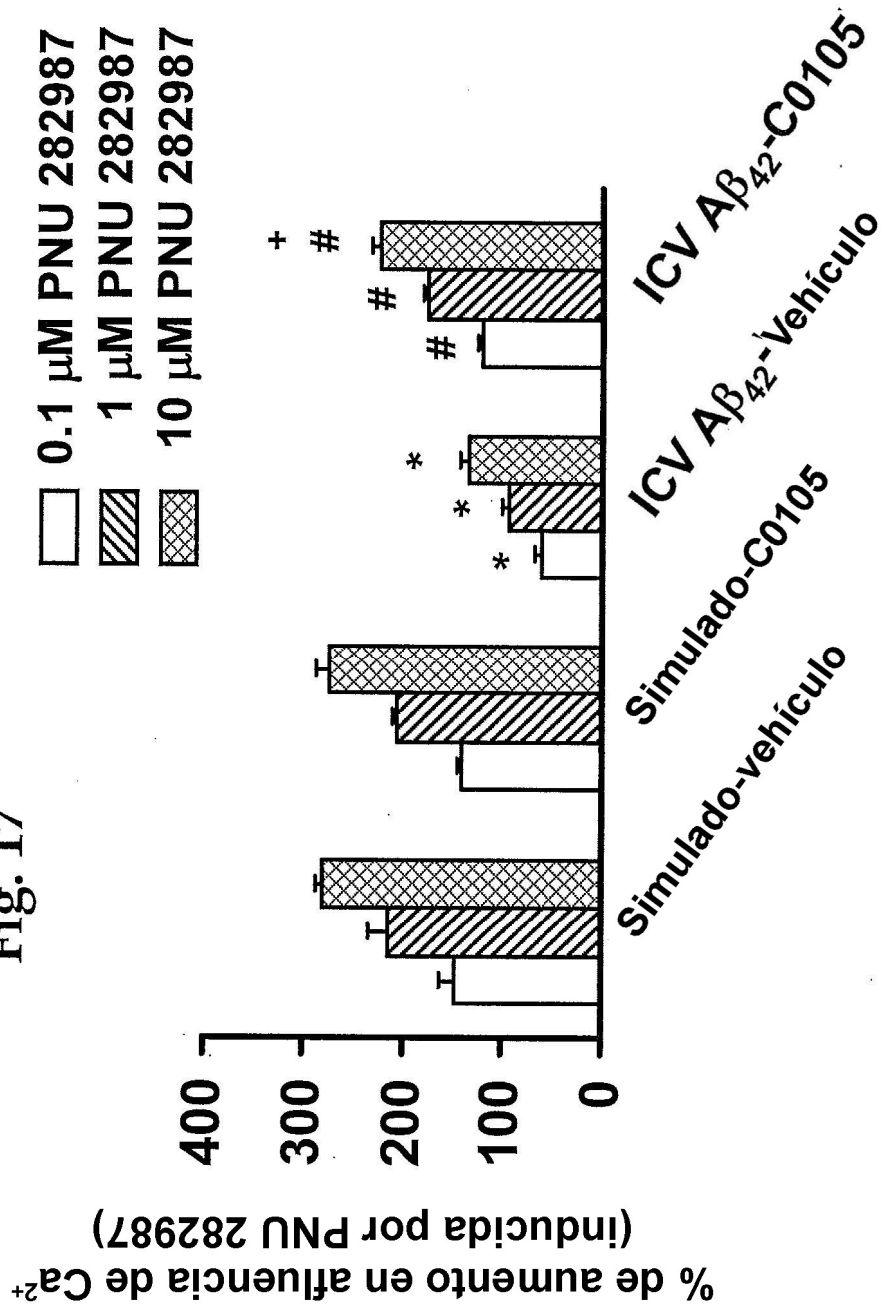


Fig. 18

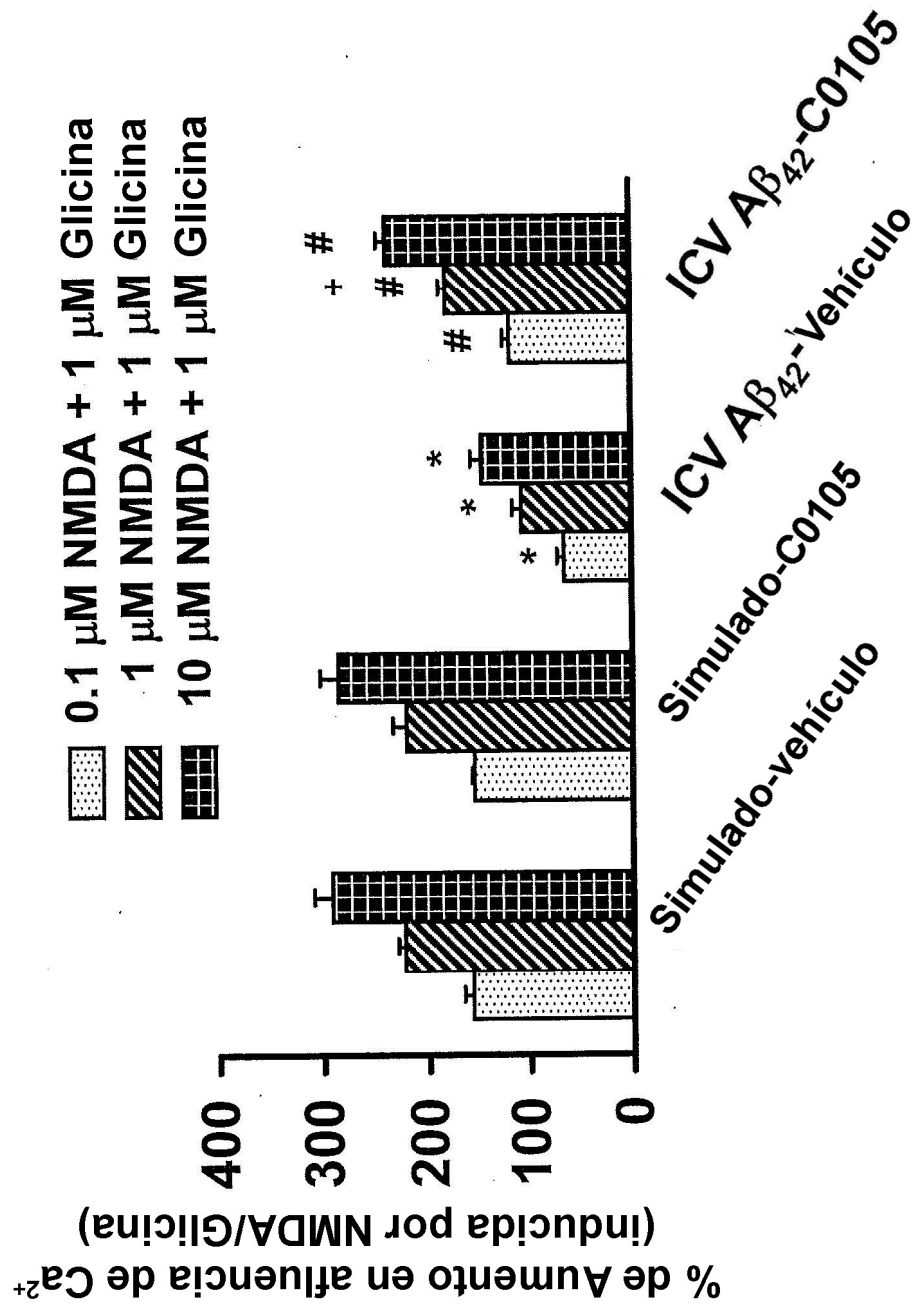


Fig. 19

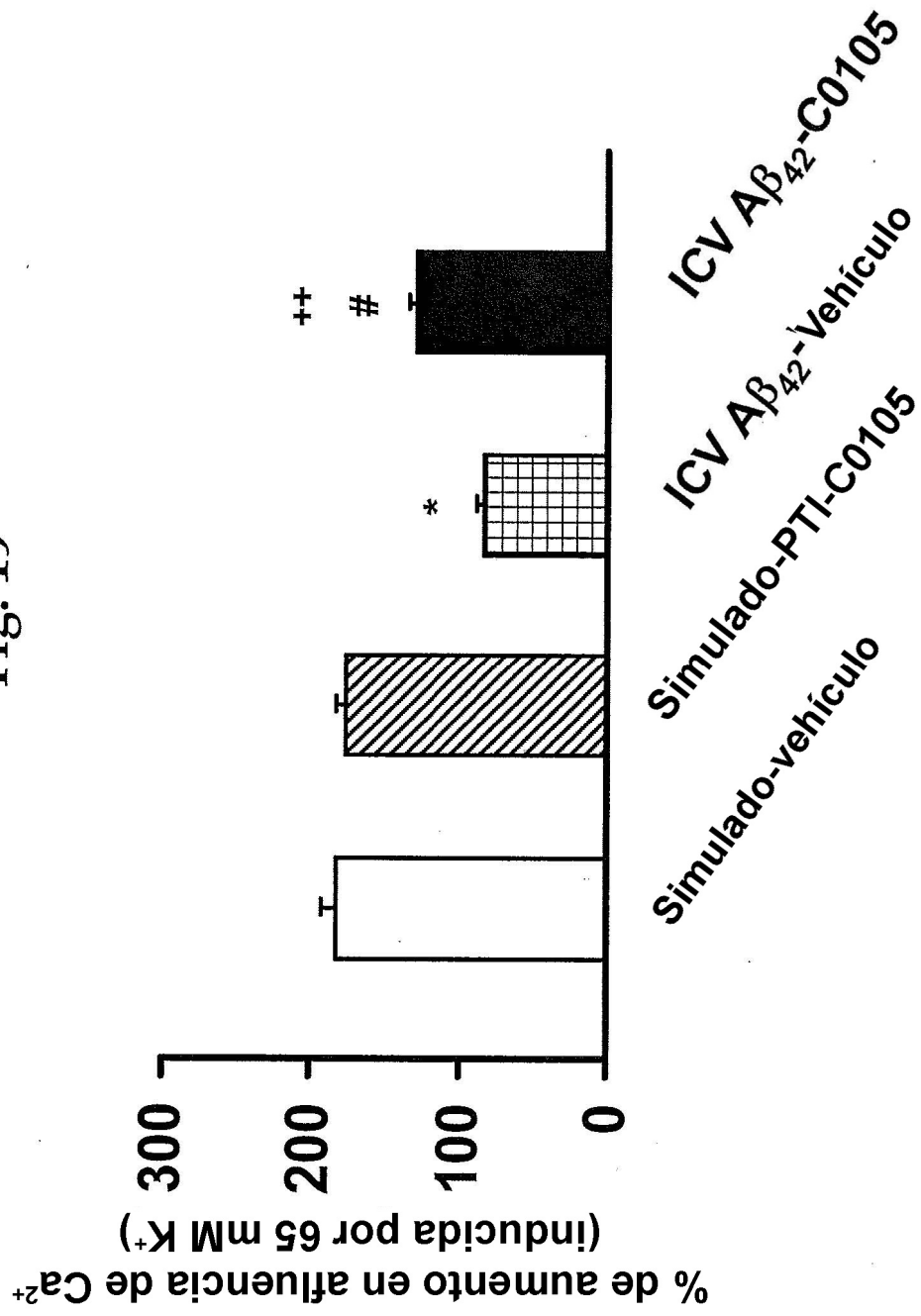
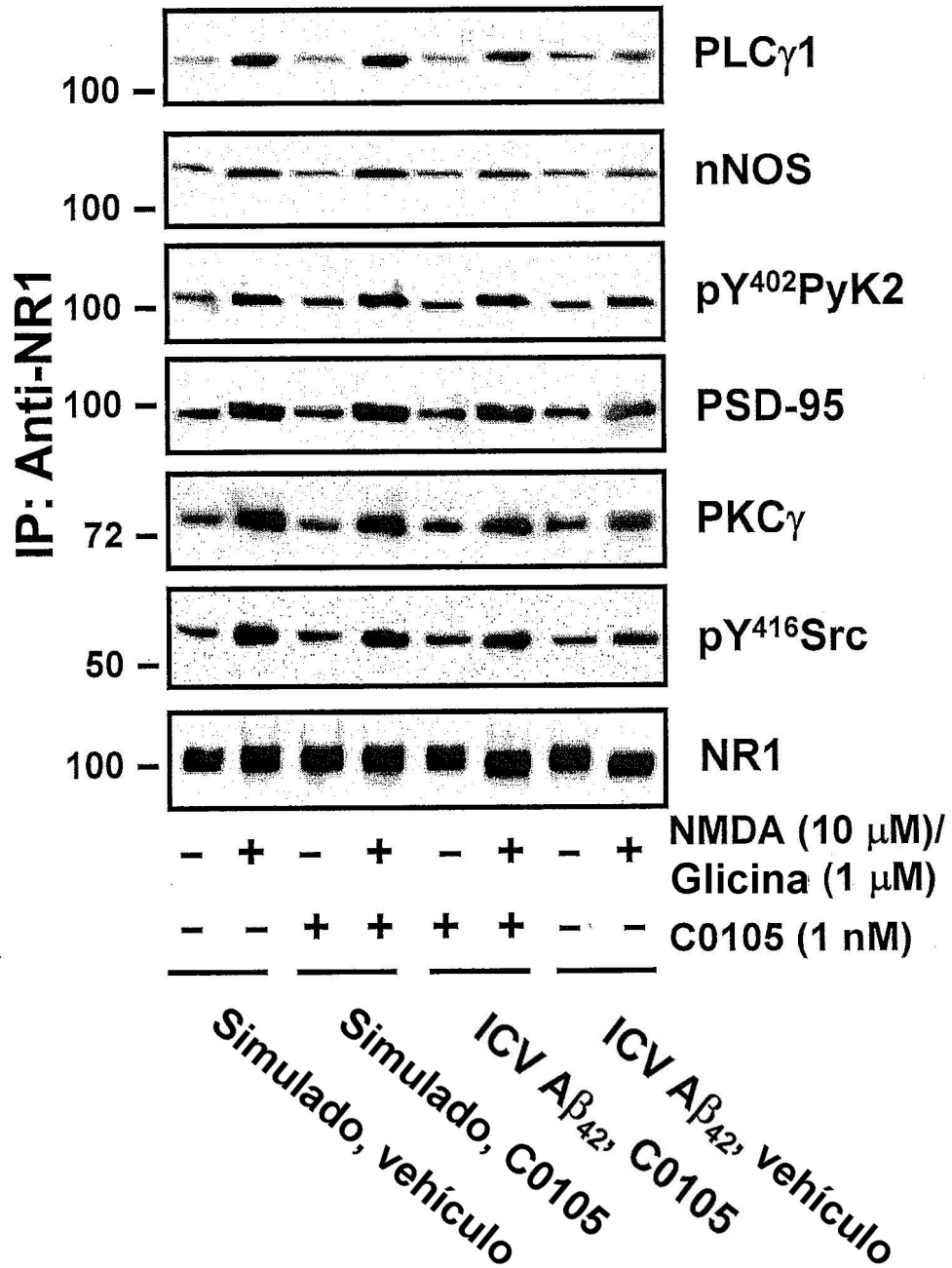


Fig. 20

Fig. 20A



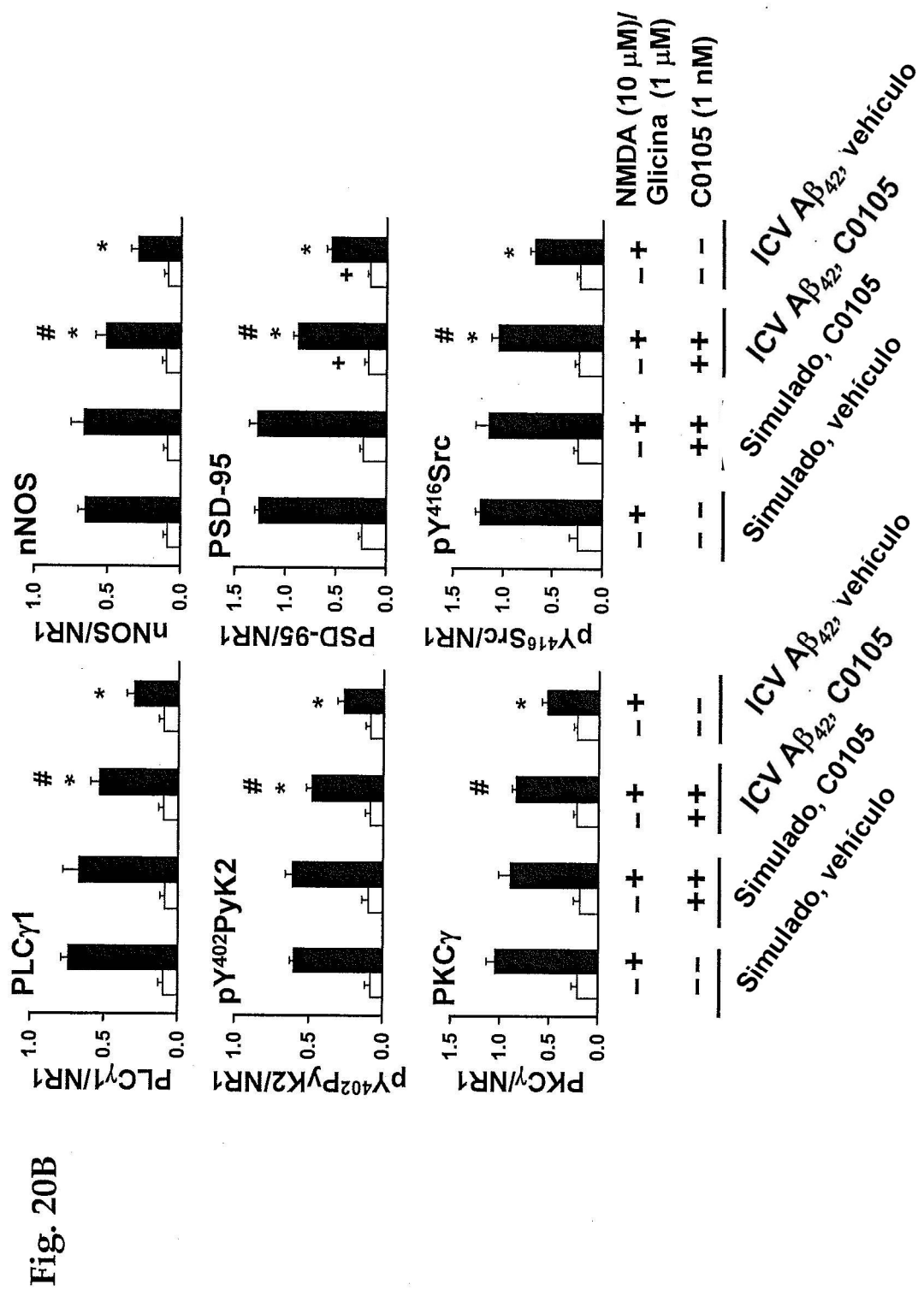


Fig. 21

Fig. 21A

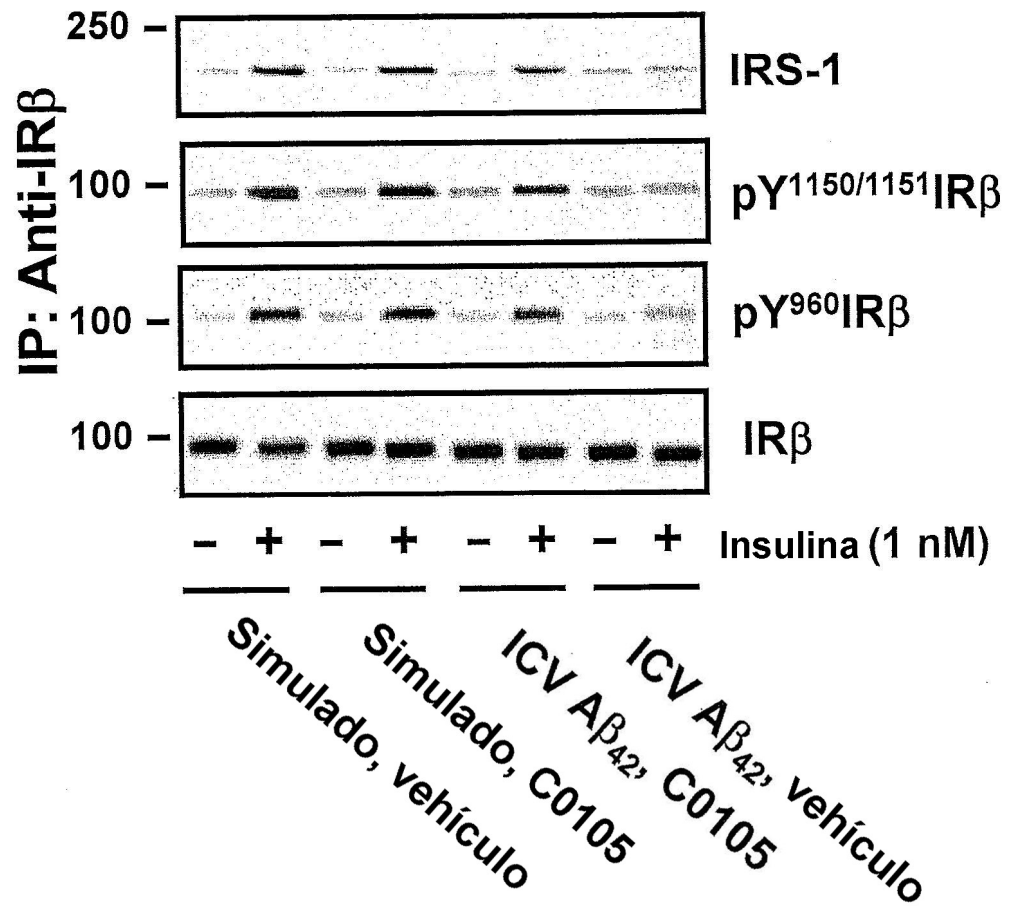


Fig. 21B

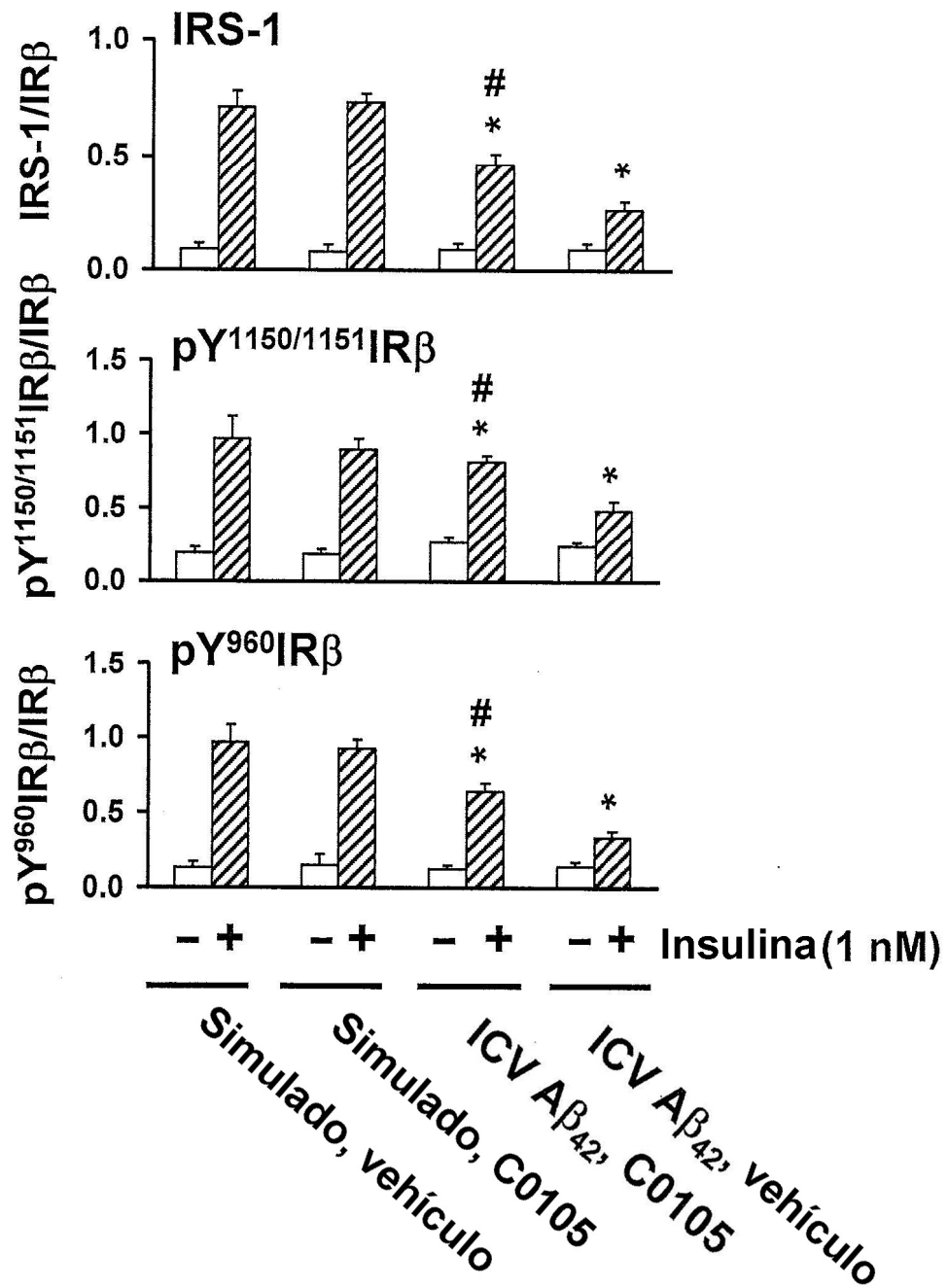


Fig. 22

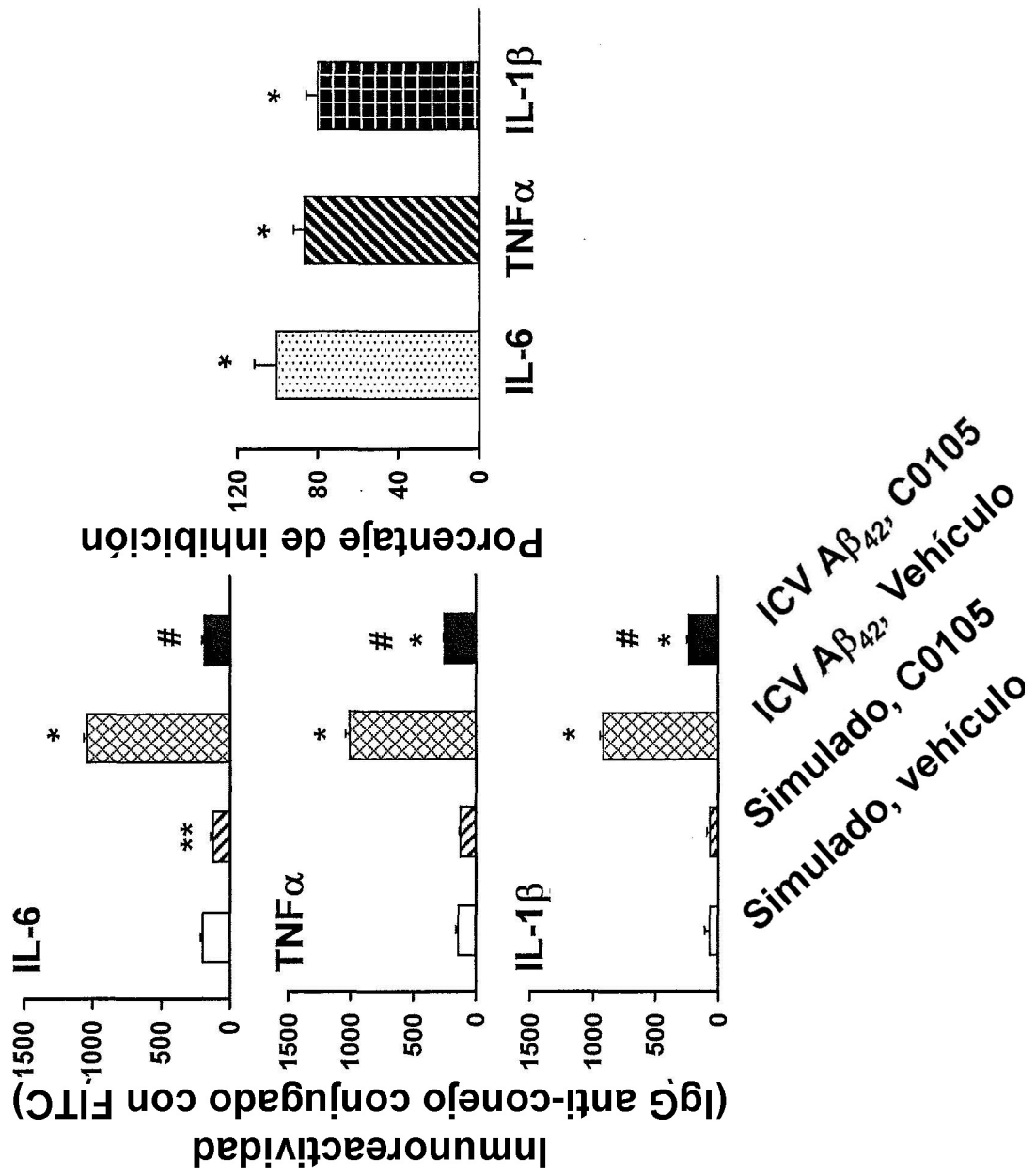


Fig. 23

Fig. 23A

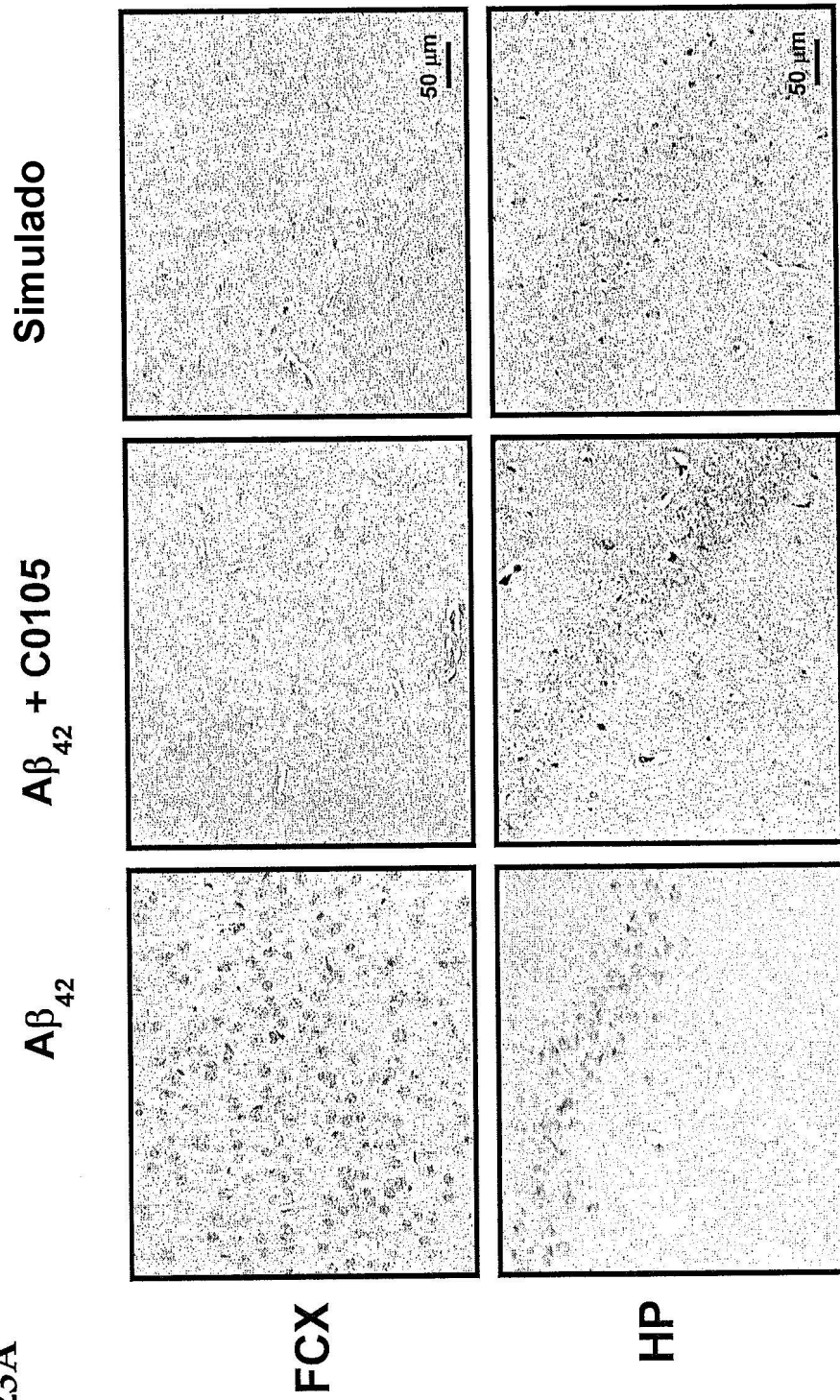


Fig. 23B

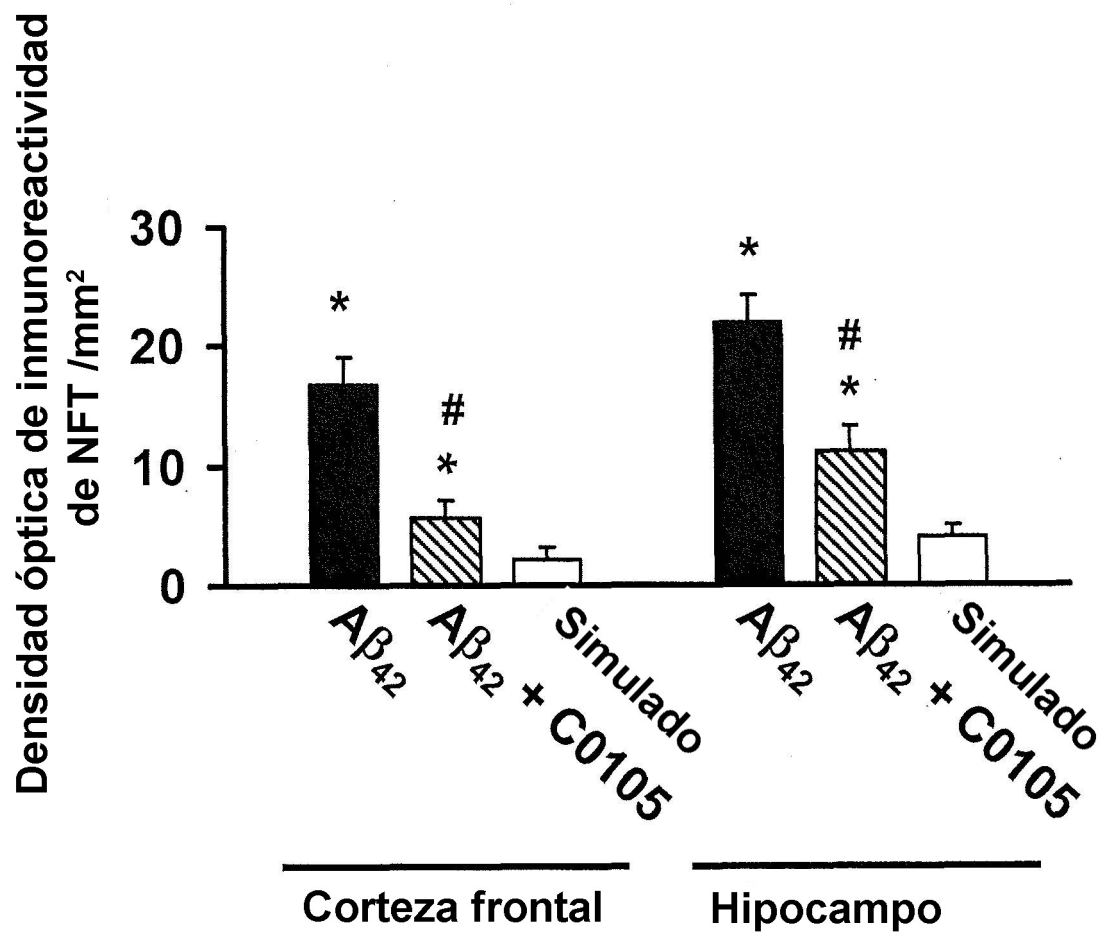


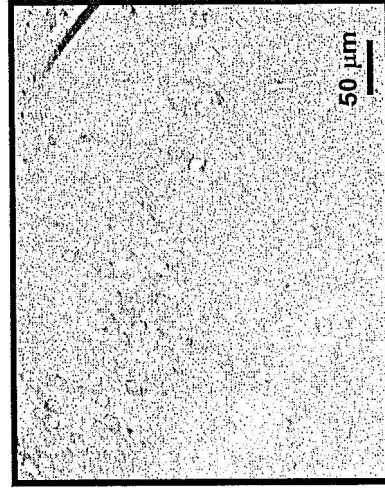
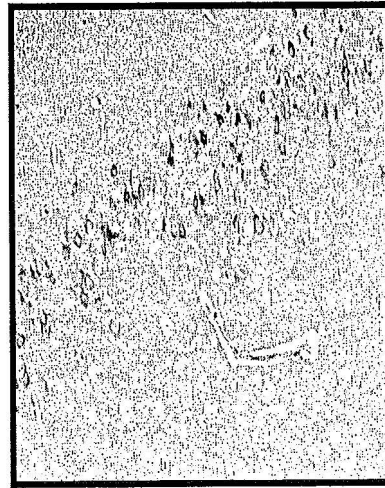
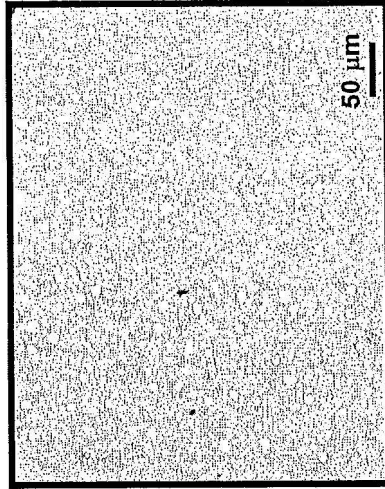
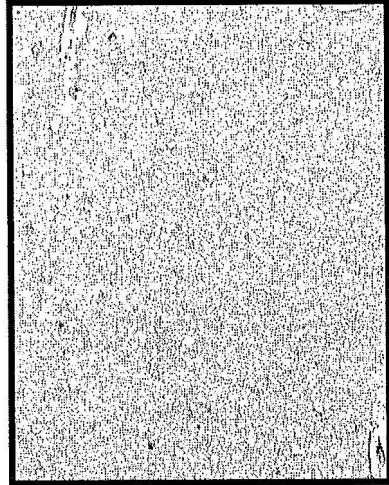
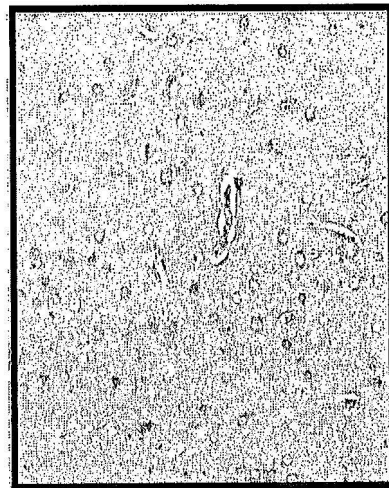
Fig. 24

Fig. 24A

$A\beta_{42}$

$A\beta_{42}$ + C0105

Simulado



FCX

HP

Fig. 24B

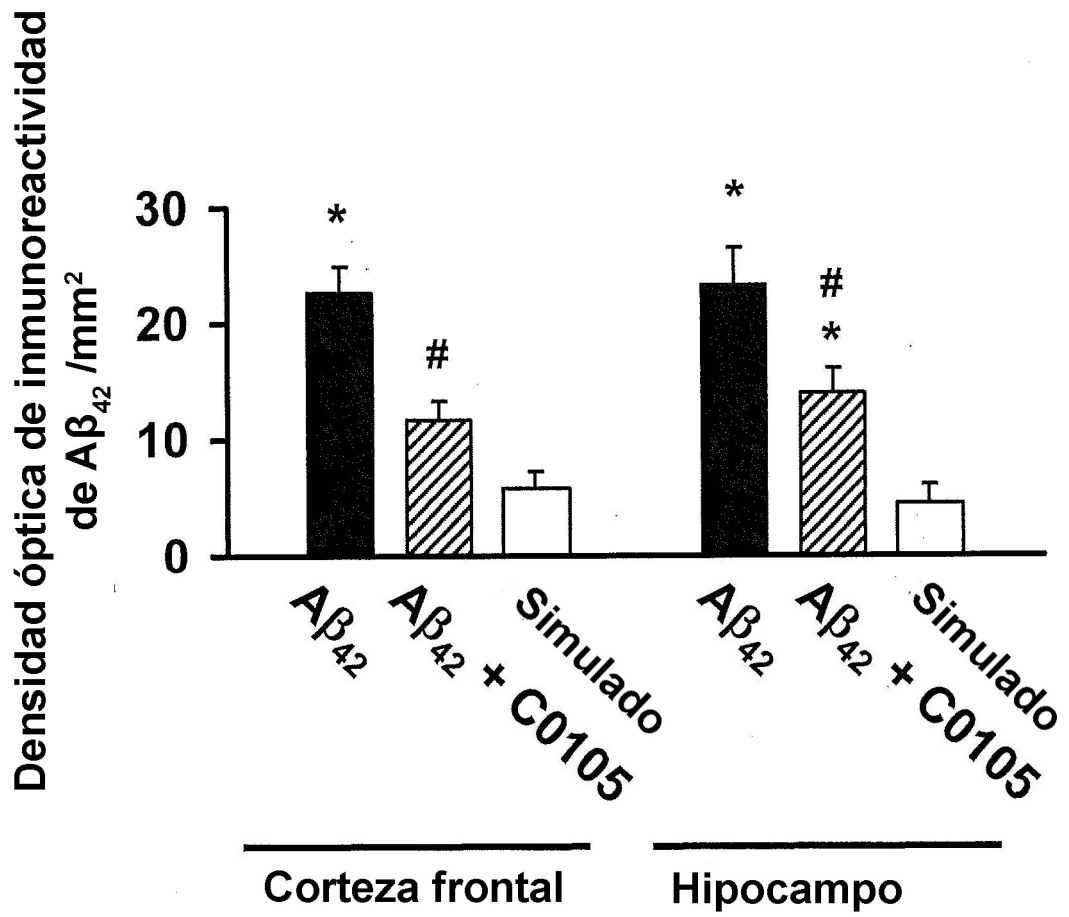


Fig. 25

Fig. 25A

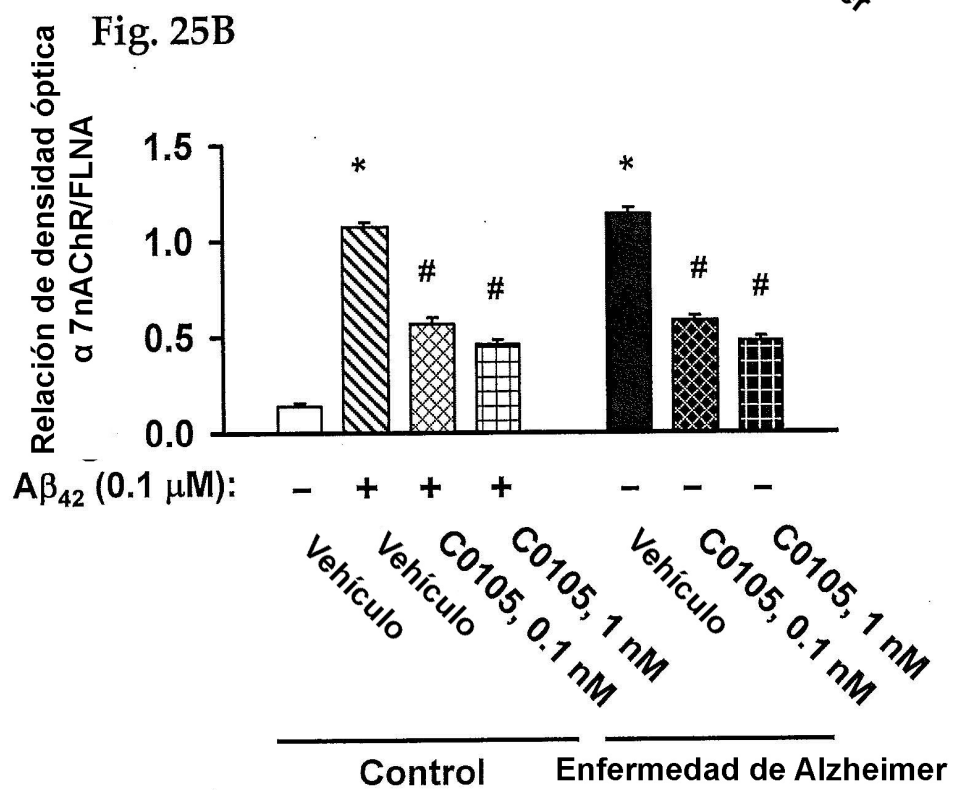
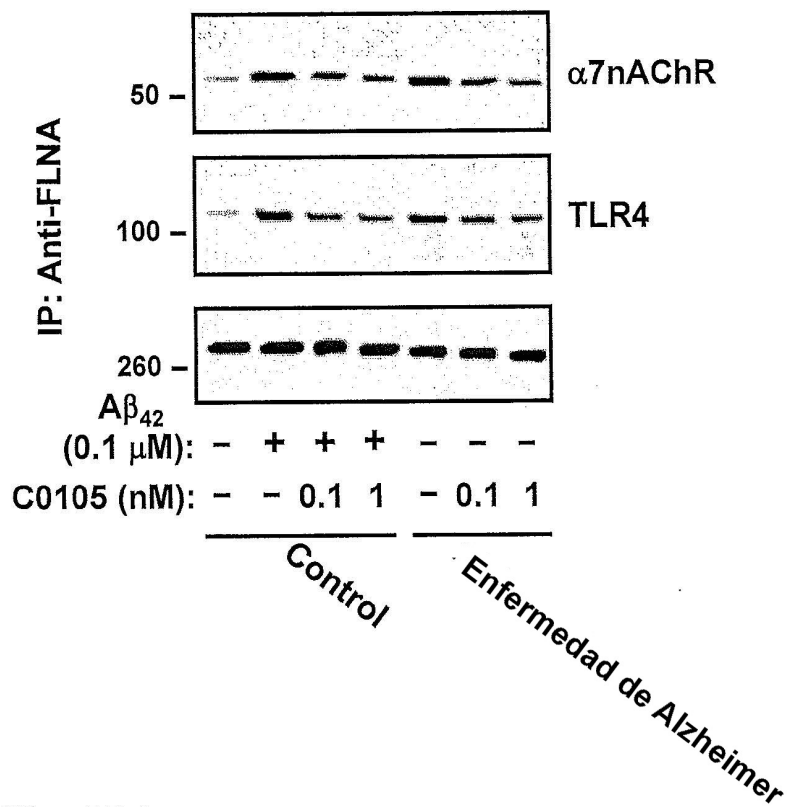


Fig. 25C

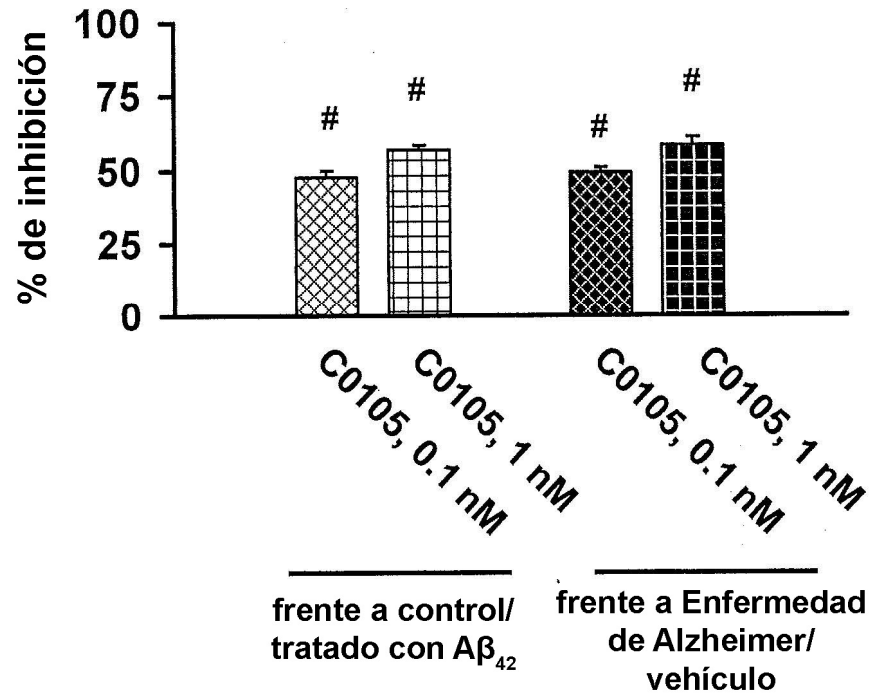


Fig. 25D

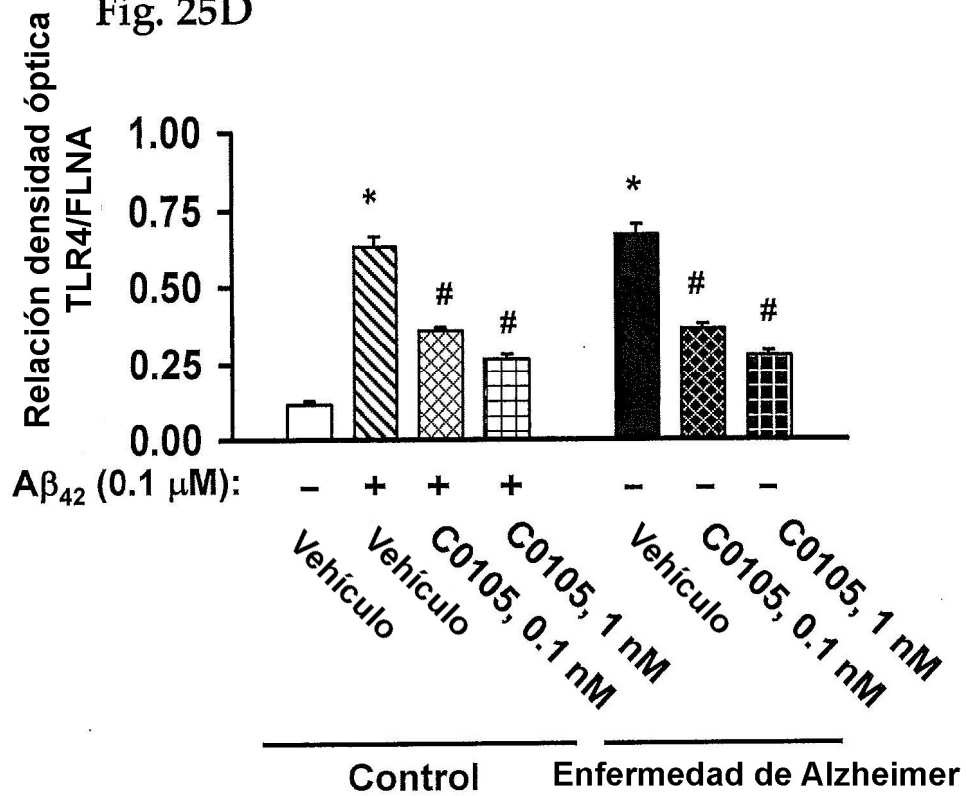


Fig. 25E

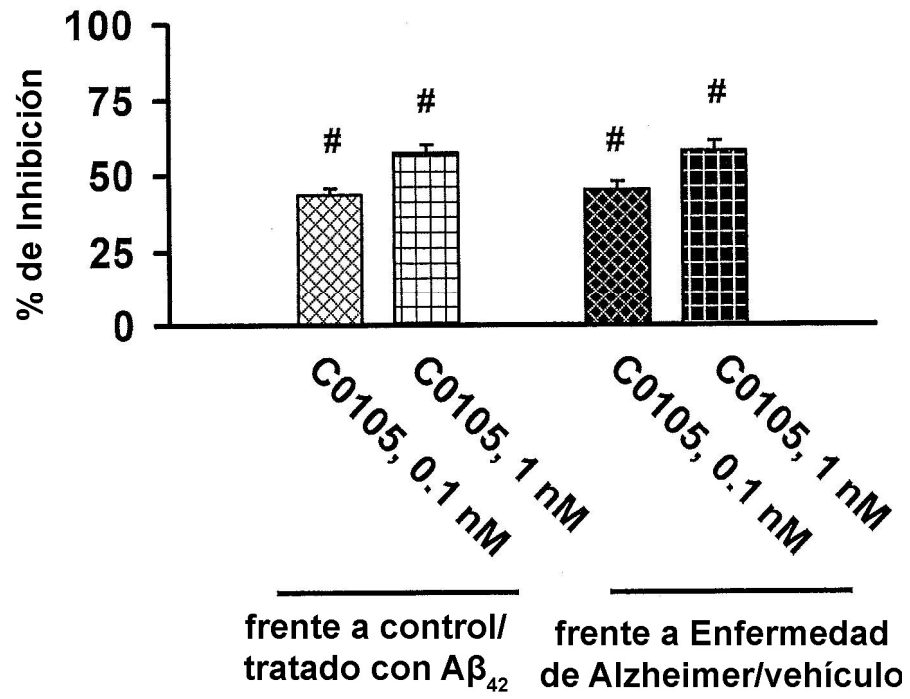


Fig. 26

Fig. 26A

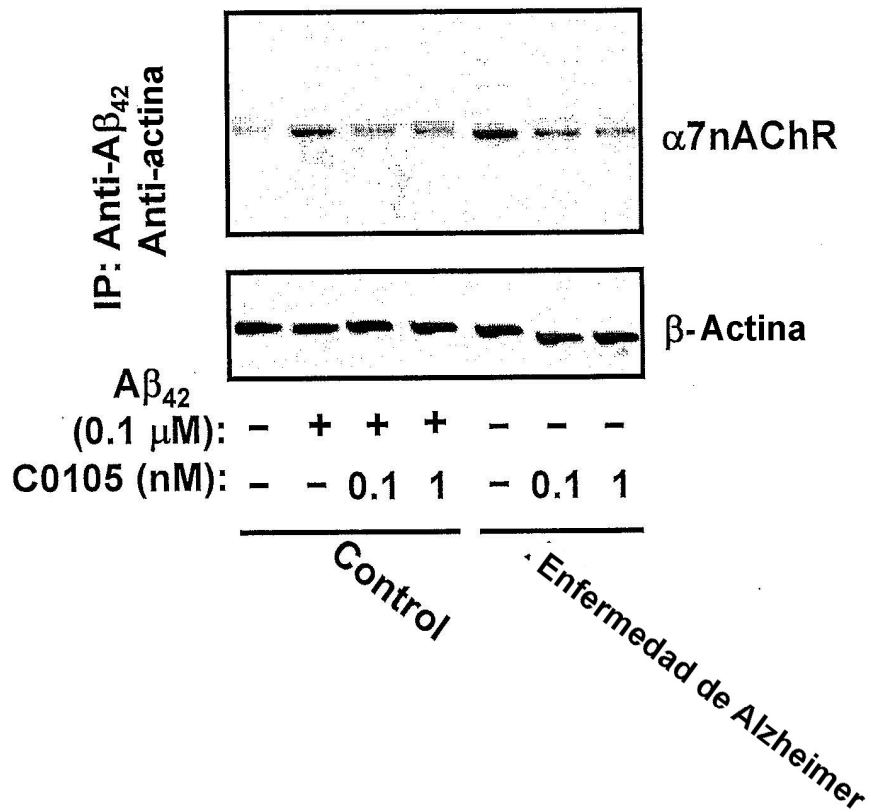


Fig. 26B

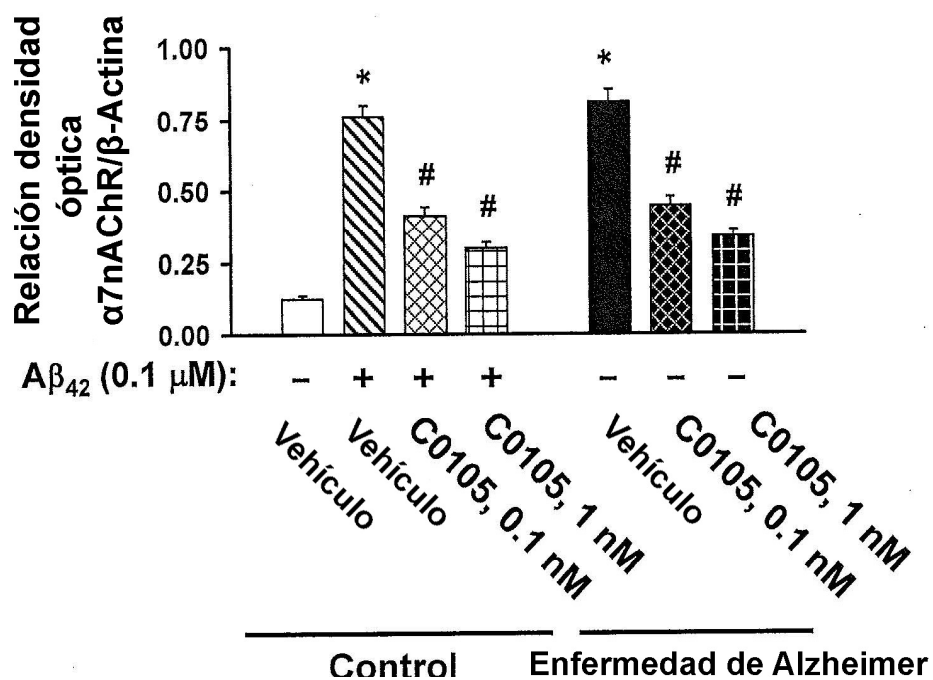


Fig. 27

Fig. 27A

	K-R	C0105
EC50_1	1.0350e-013	1.6250e-010
EC50_2	9.2530e-010	3.0920e-007

	K-R	C0105
R ²	0.9006	0.9406

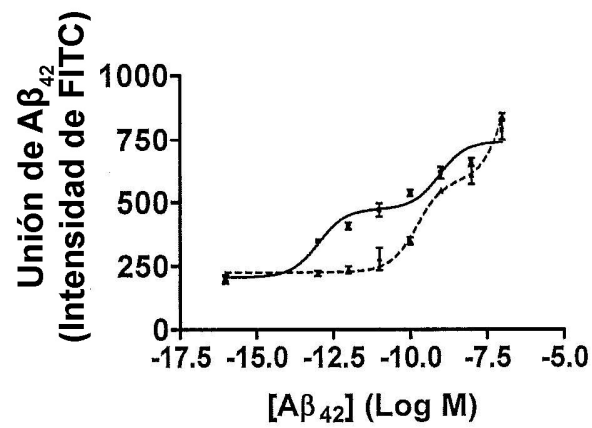


Fig. 27B

	K-R	C0105
EC50_1	7.7760e-013	1.4450e-009
EC50_2	4.9650e-009	7.0010e-008

	K-R	C0105
R ²	0.9575	0.9814

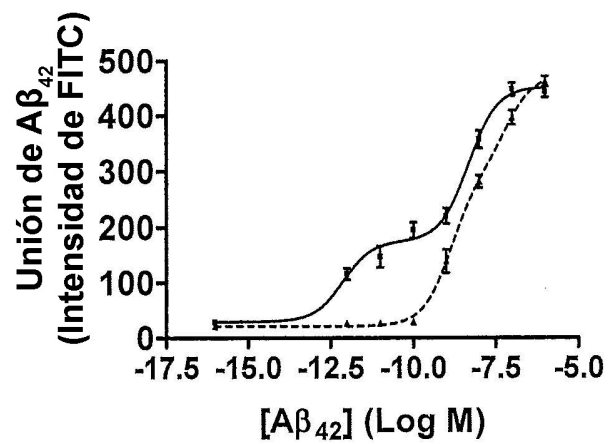


Fig. 28

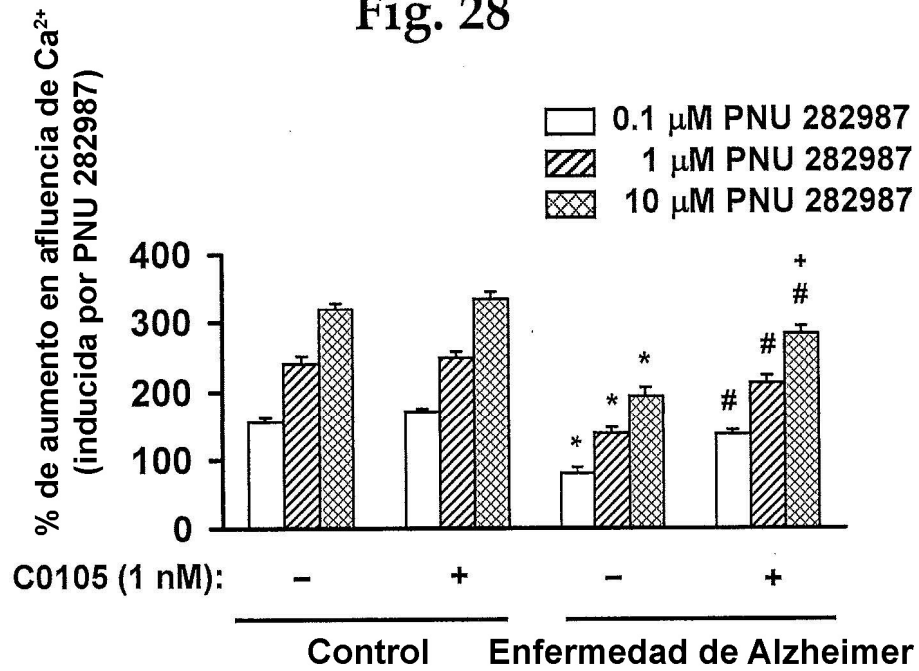


Fig. 29

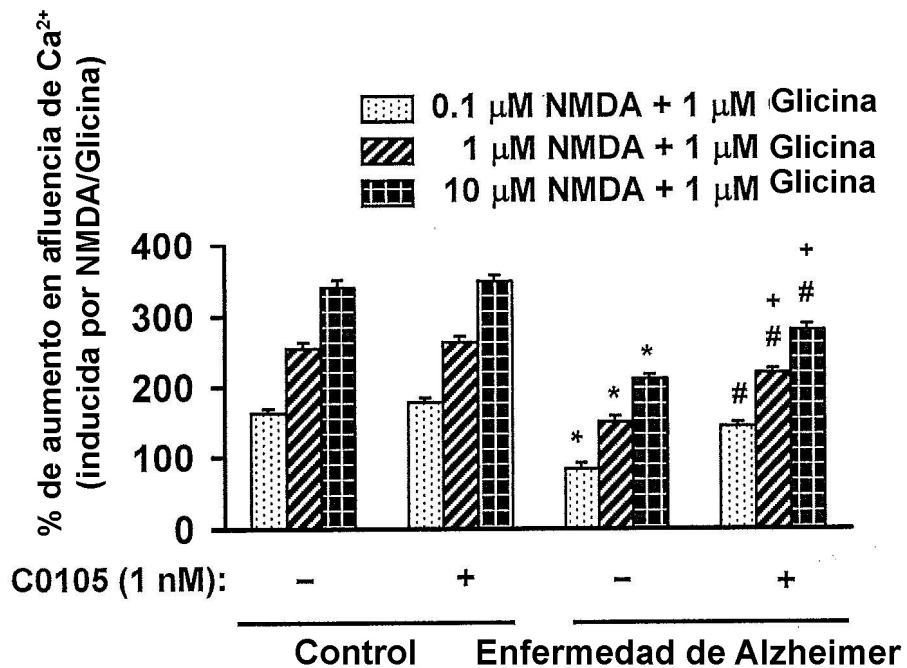


Fig. 30

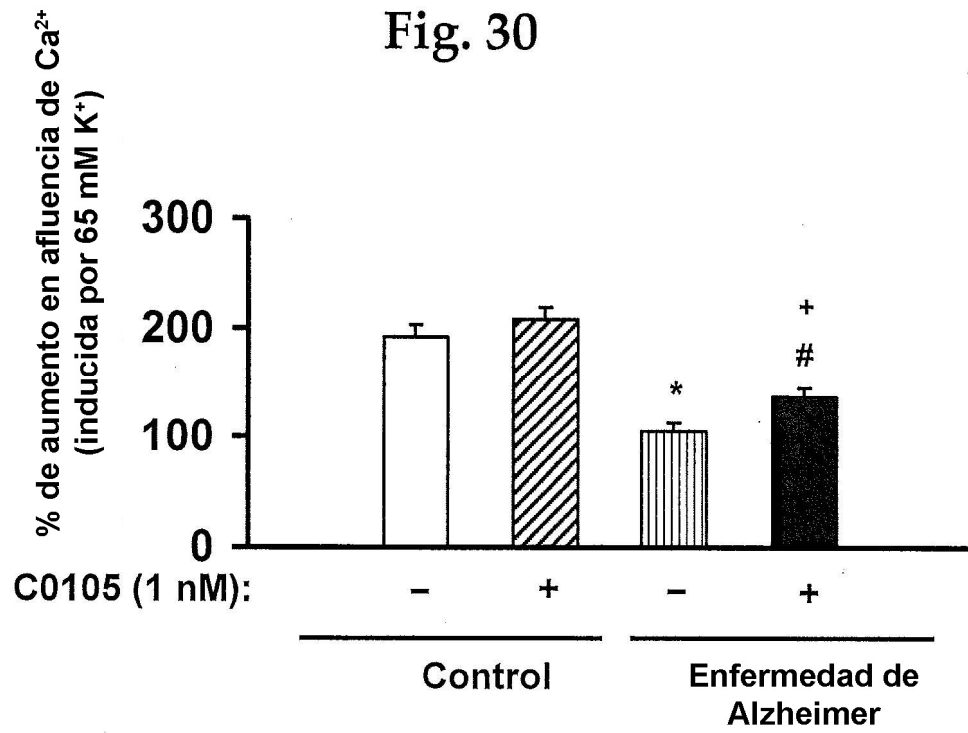


Fig. 31

Fig. 31A

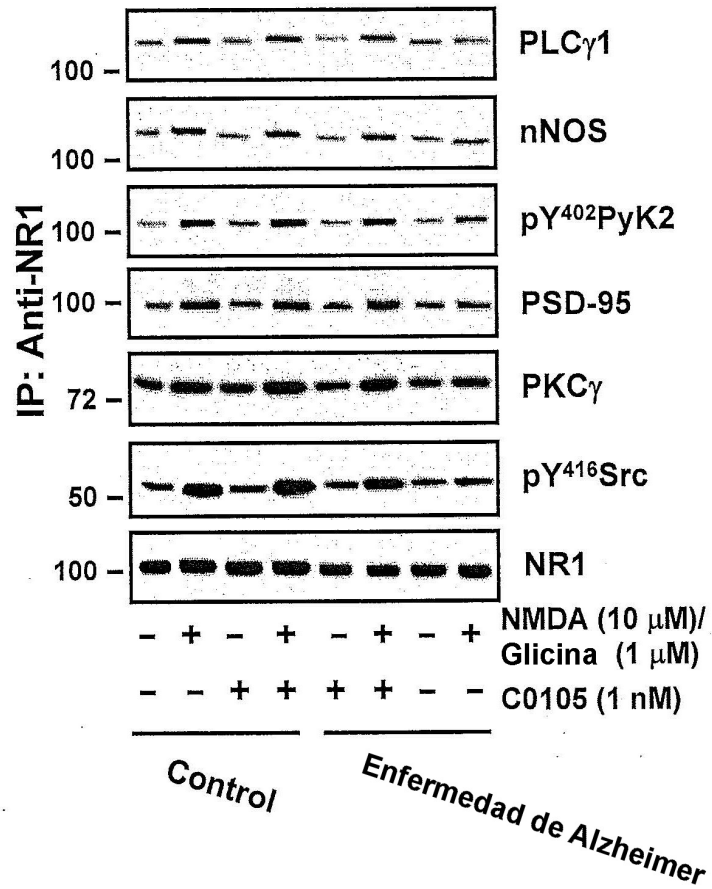


Fig. 31B

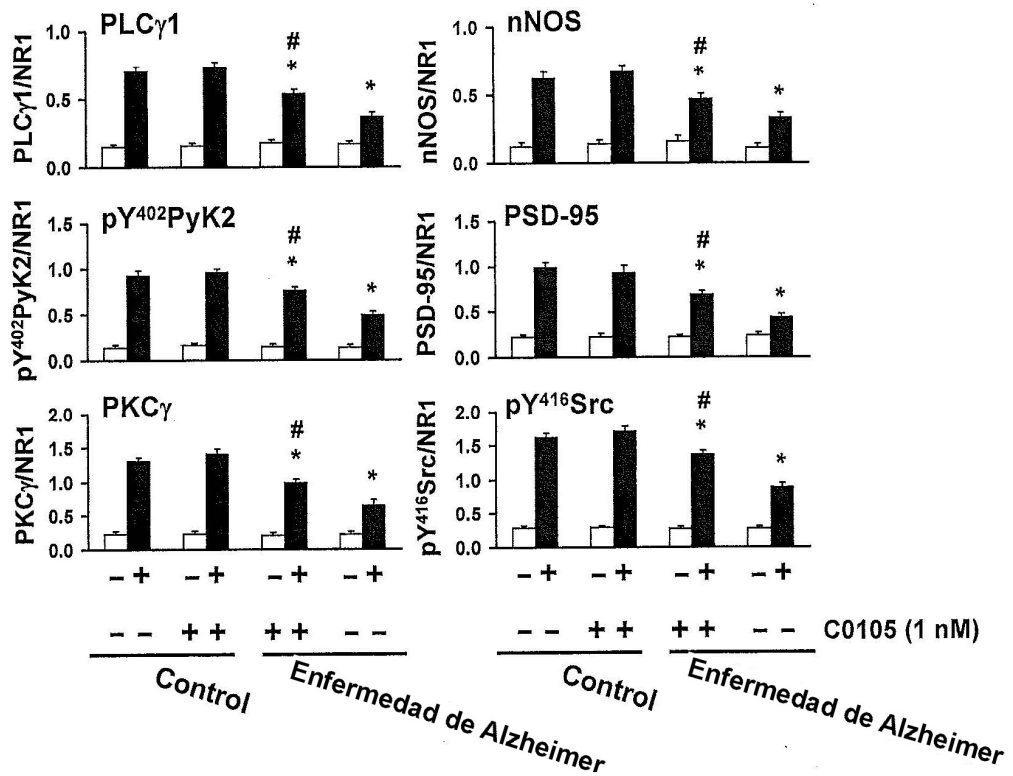


Fig. 32

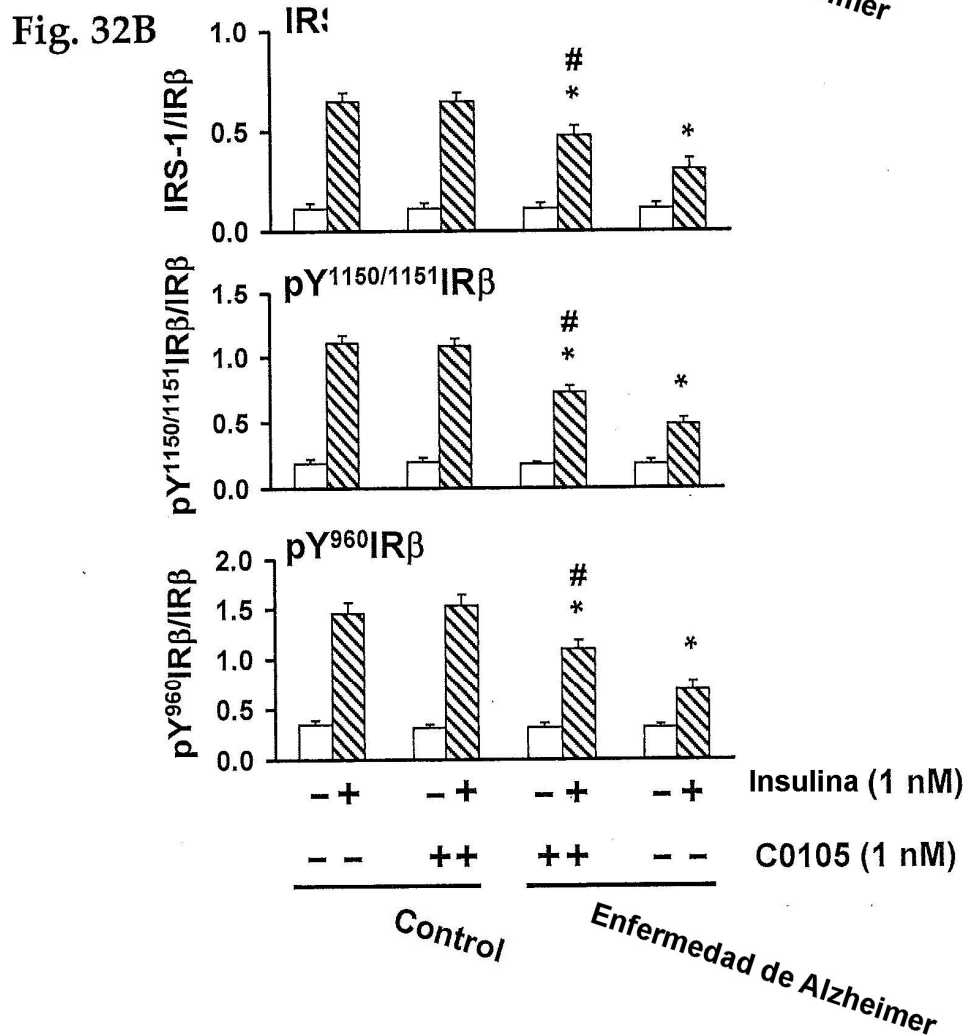
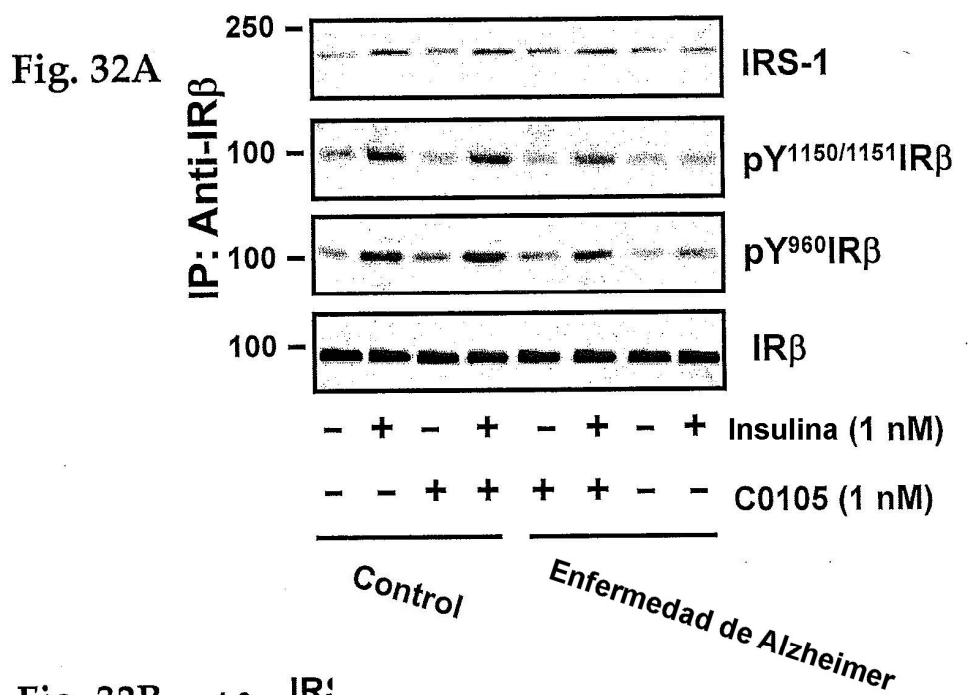


Fig. 33

Fig. 33A

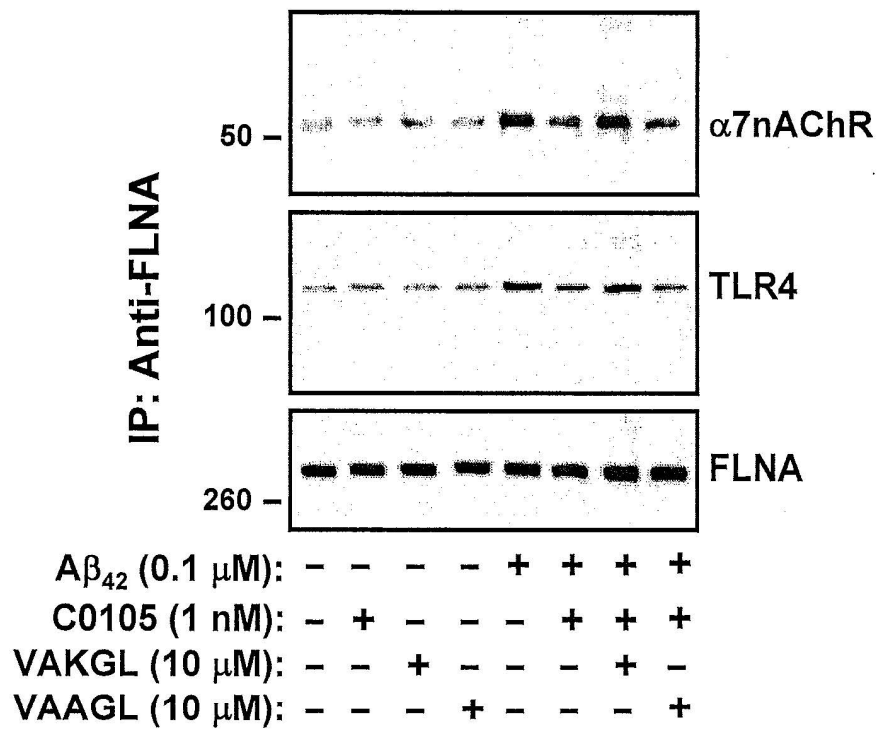


Fig. 33B

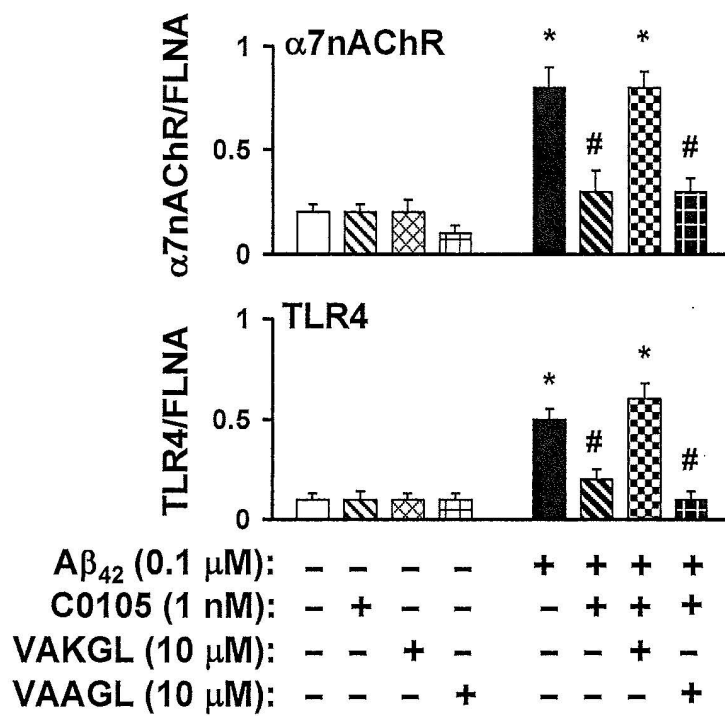


Fig. 34

Fig. 34A

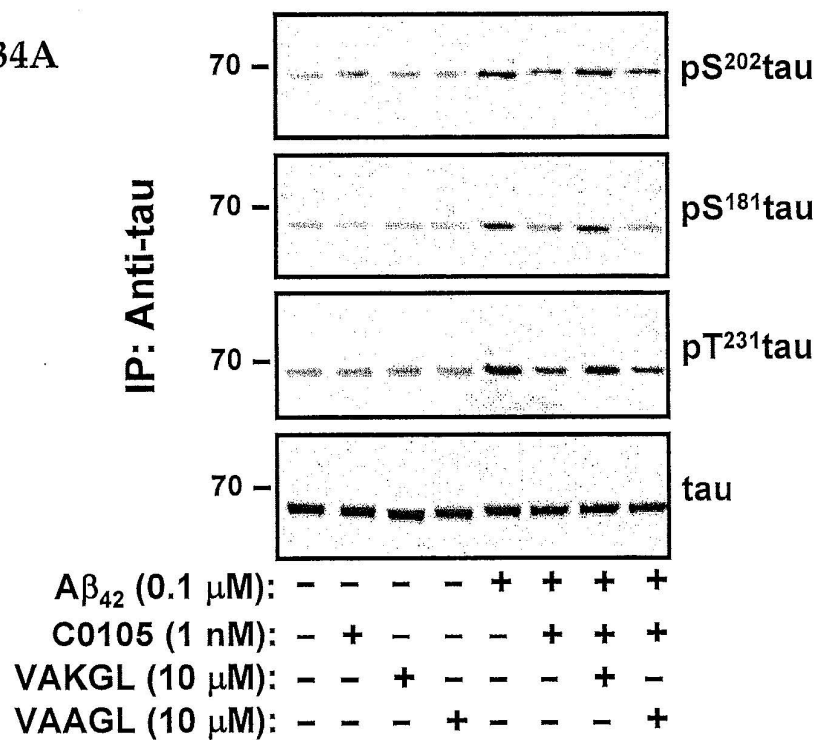


Fig. 34B

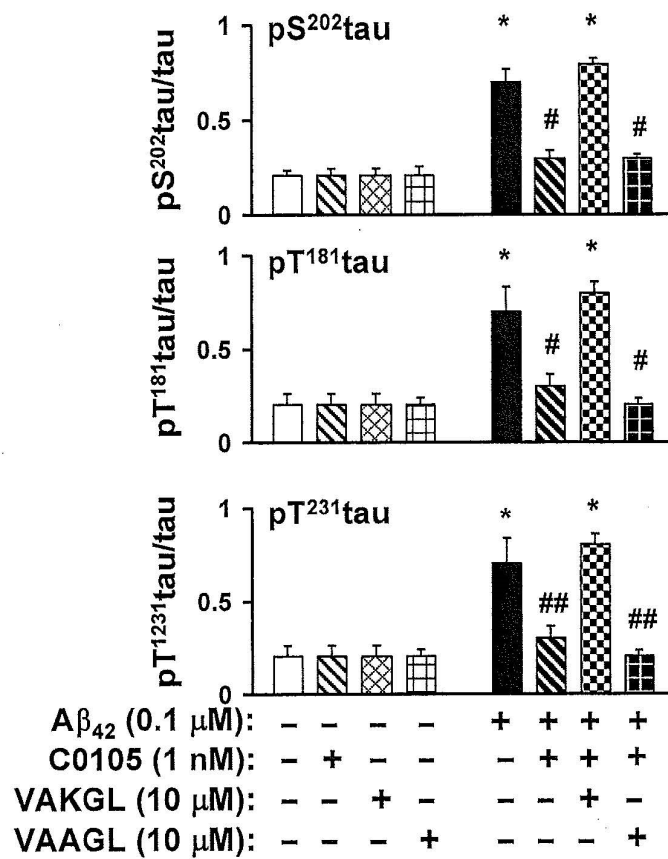


Fig. 35

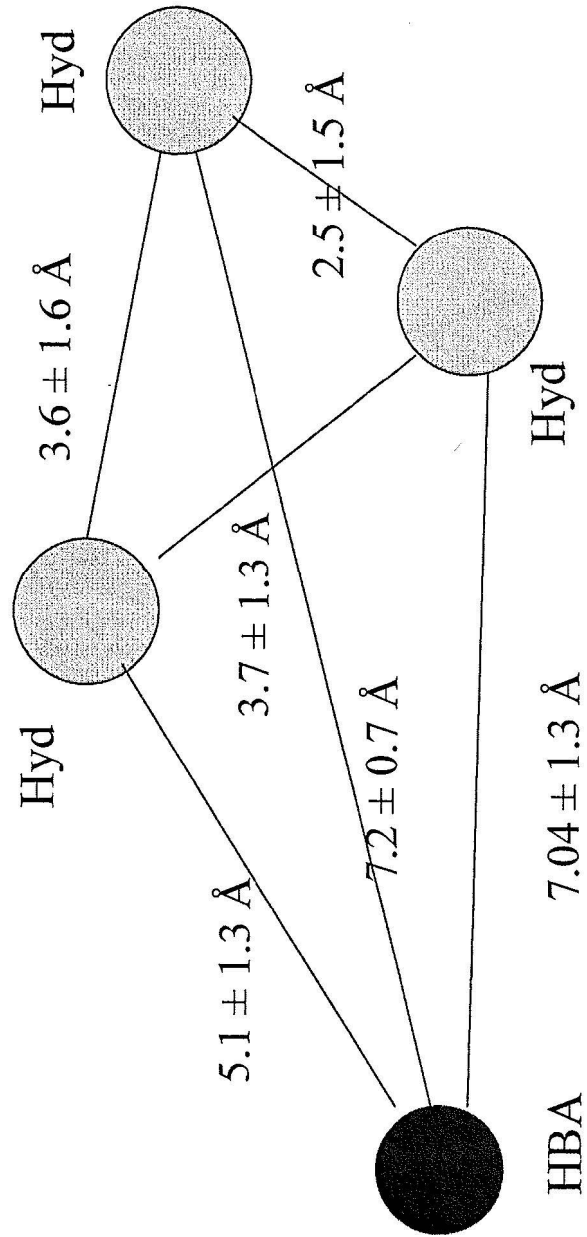
Farmacóforo 1

Fig. 36

Farmacóforo 2

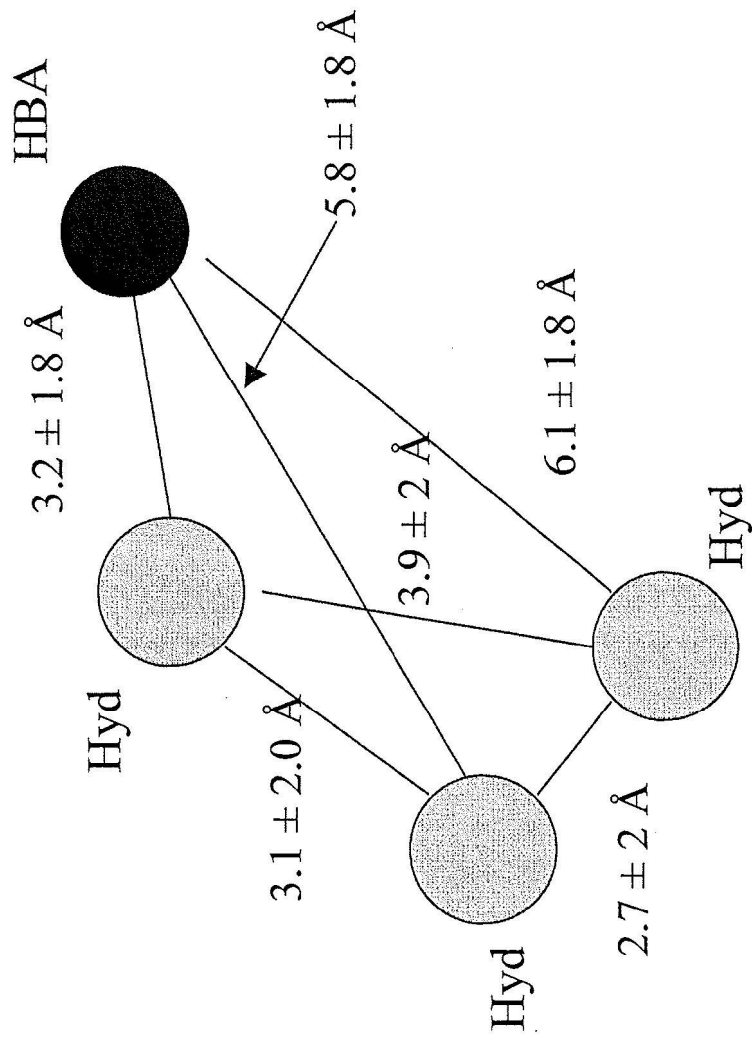


Fig. 37

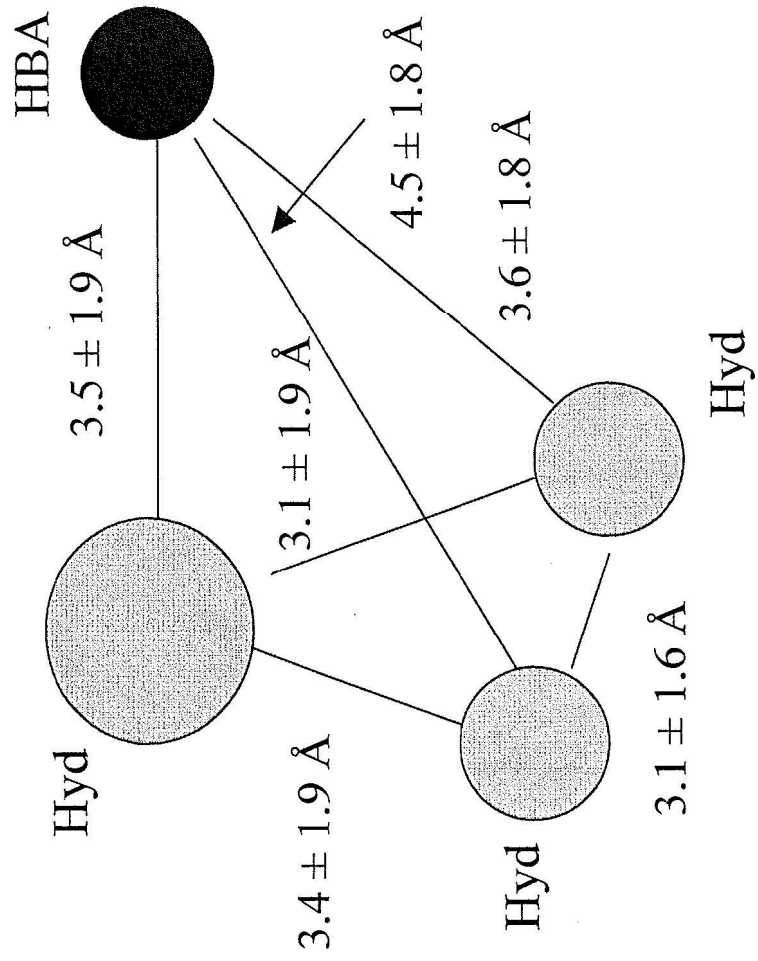
Farmacóforo 3

Fig. 38

Farmacóforo 4

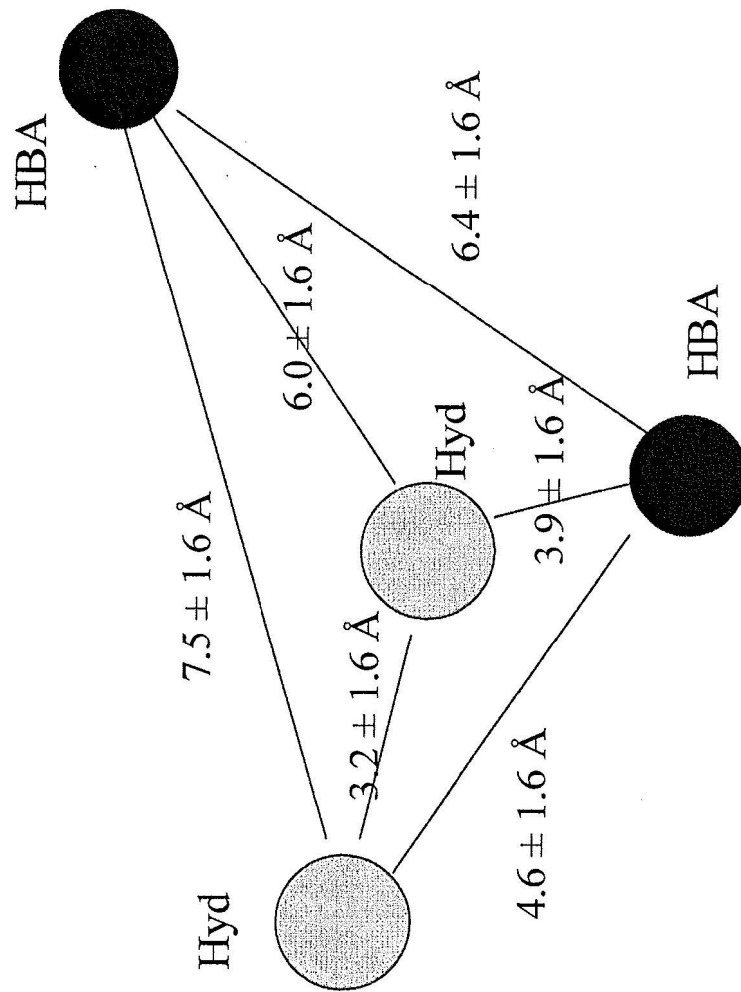


Fig. 39

Farmacóforo 5

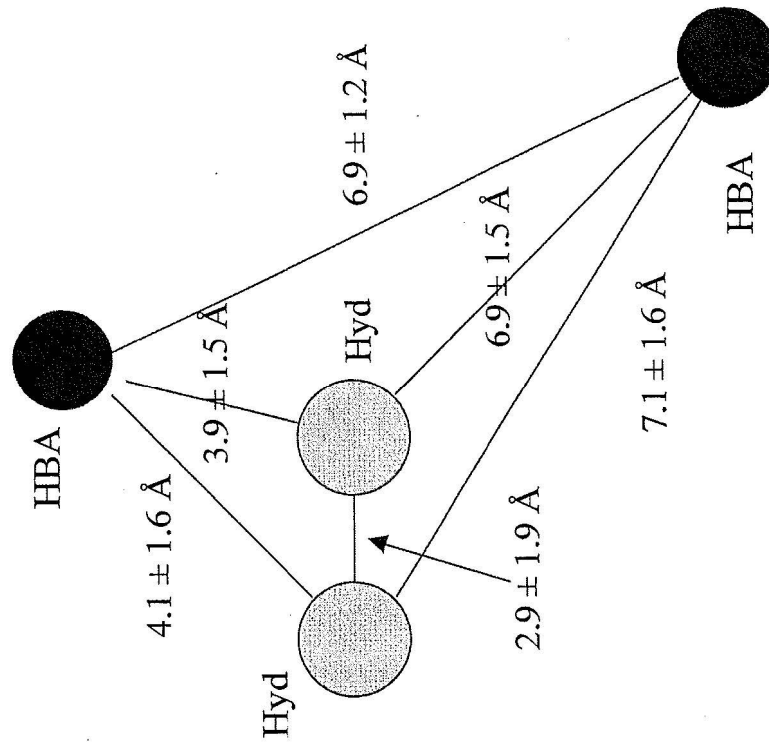


Fig. 40

Farmacóforo 6

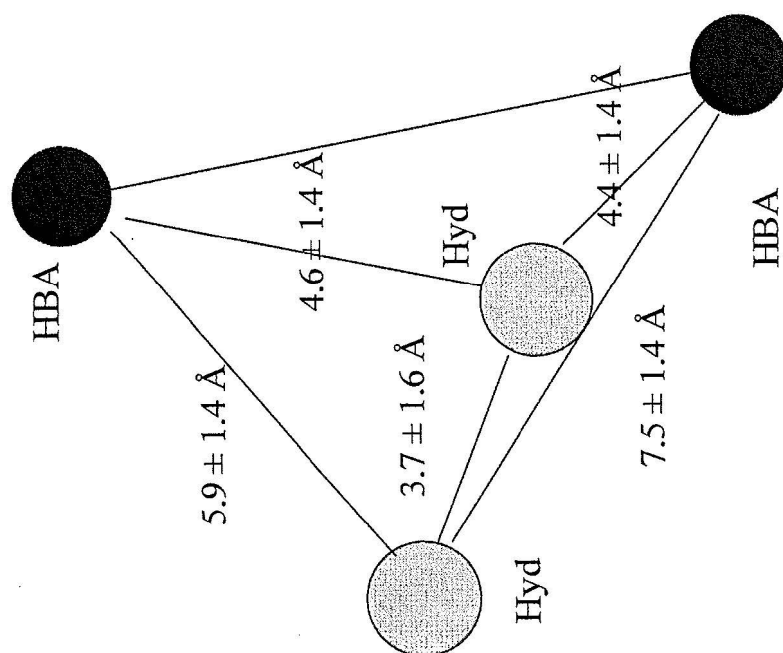


Fig. 41

Fig. 41A

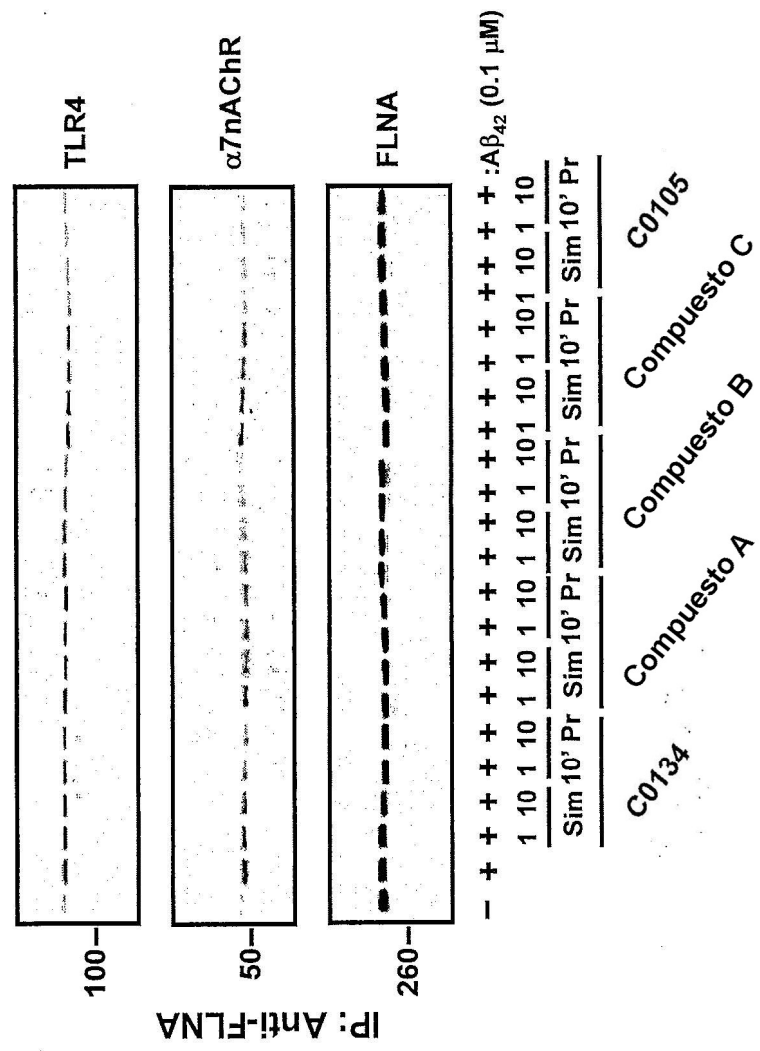


Fig. 41B

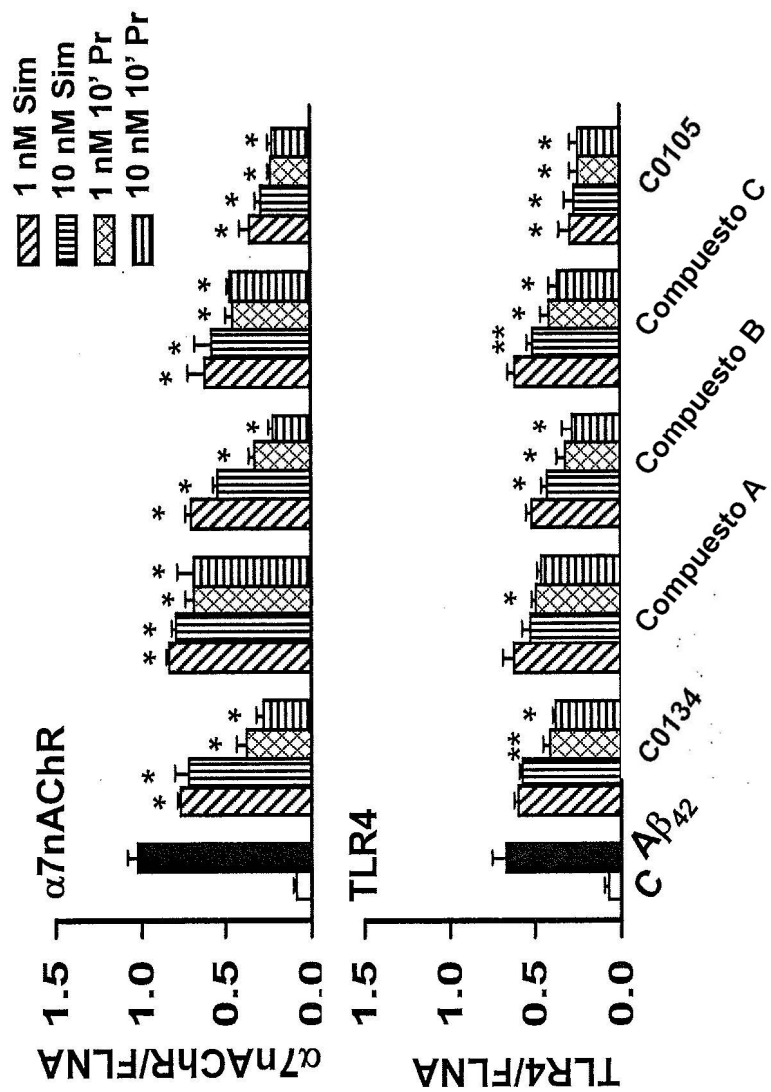


Fig. 42B

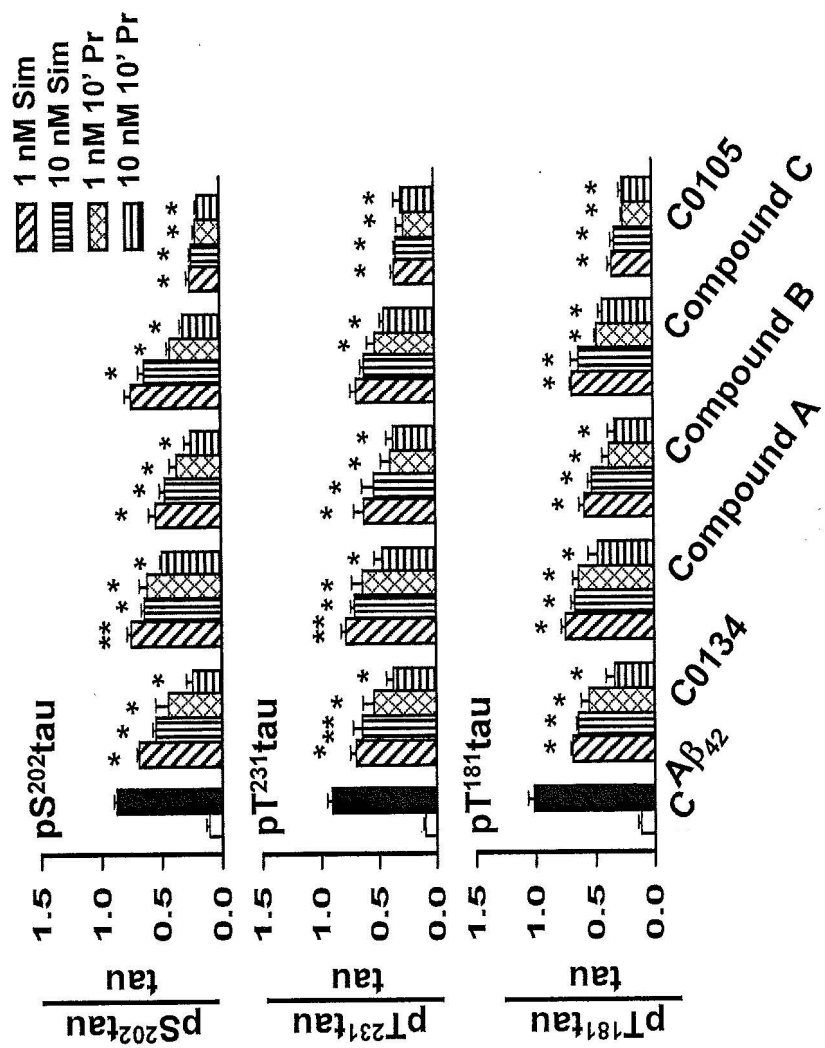


Fig. 43

Fig. 43A

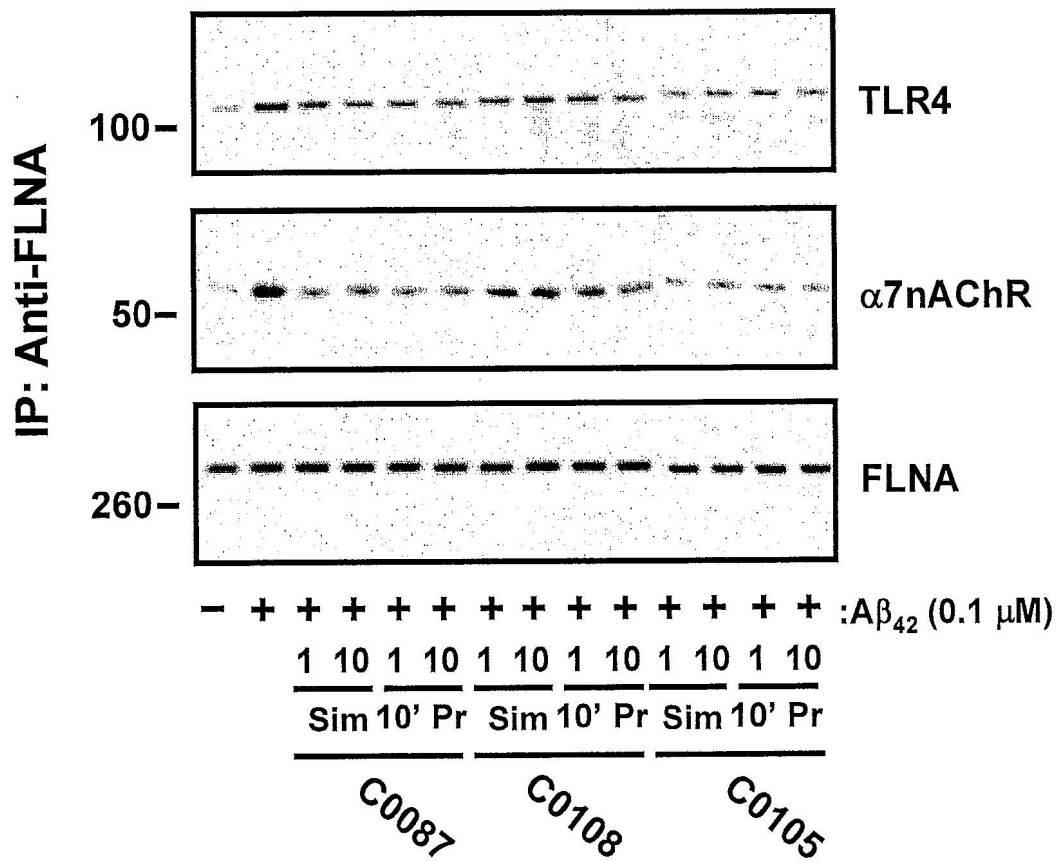


Fig. 43B

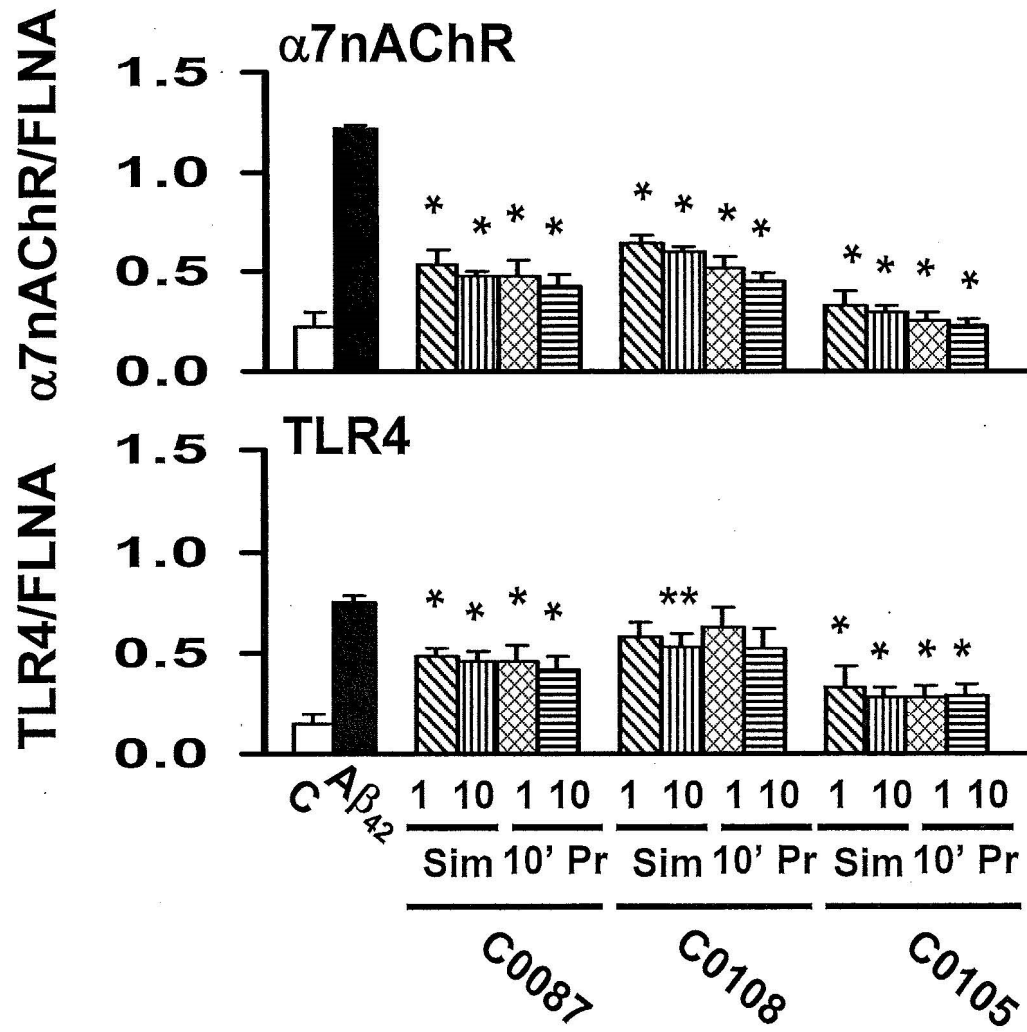


Fig. 44

Fig. 44A

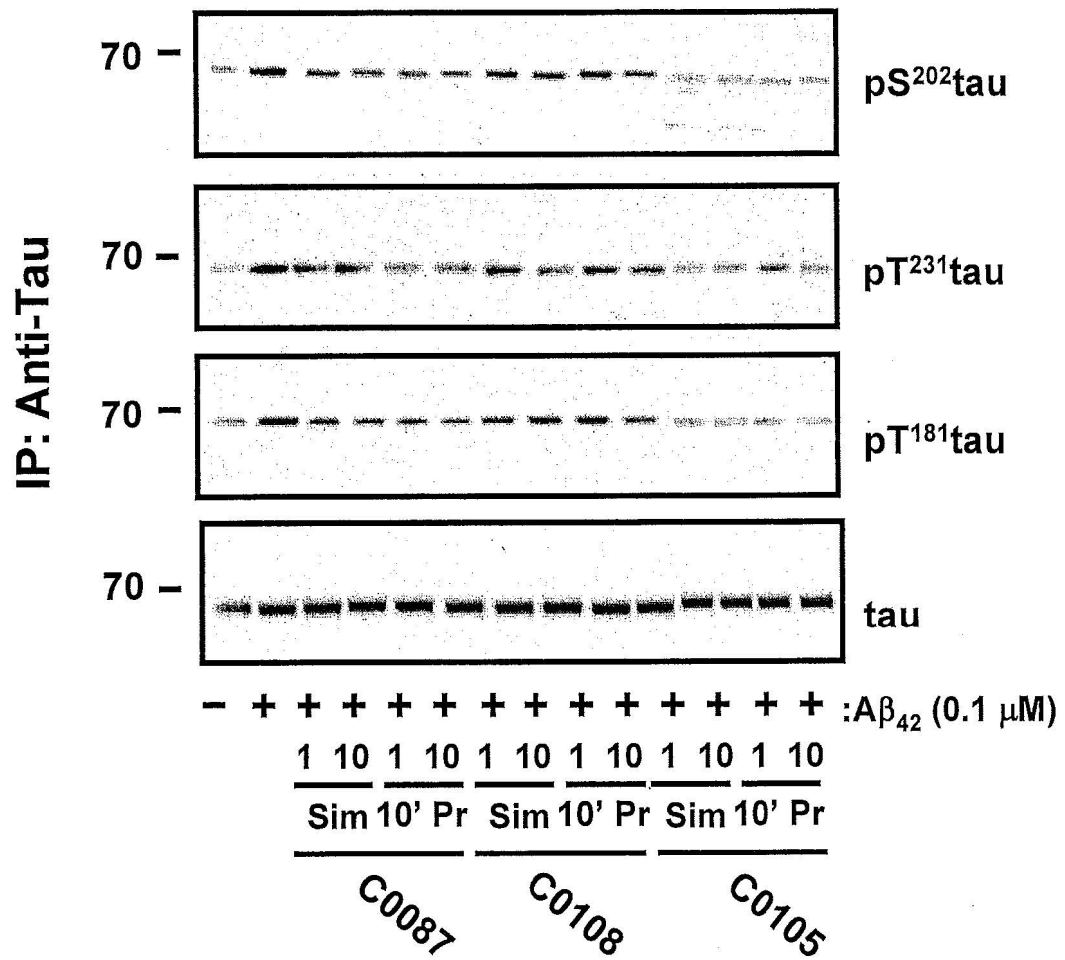


Fig. 44B

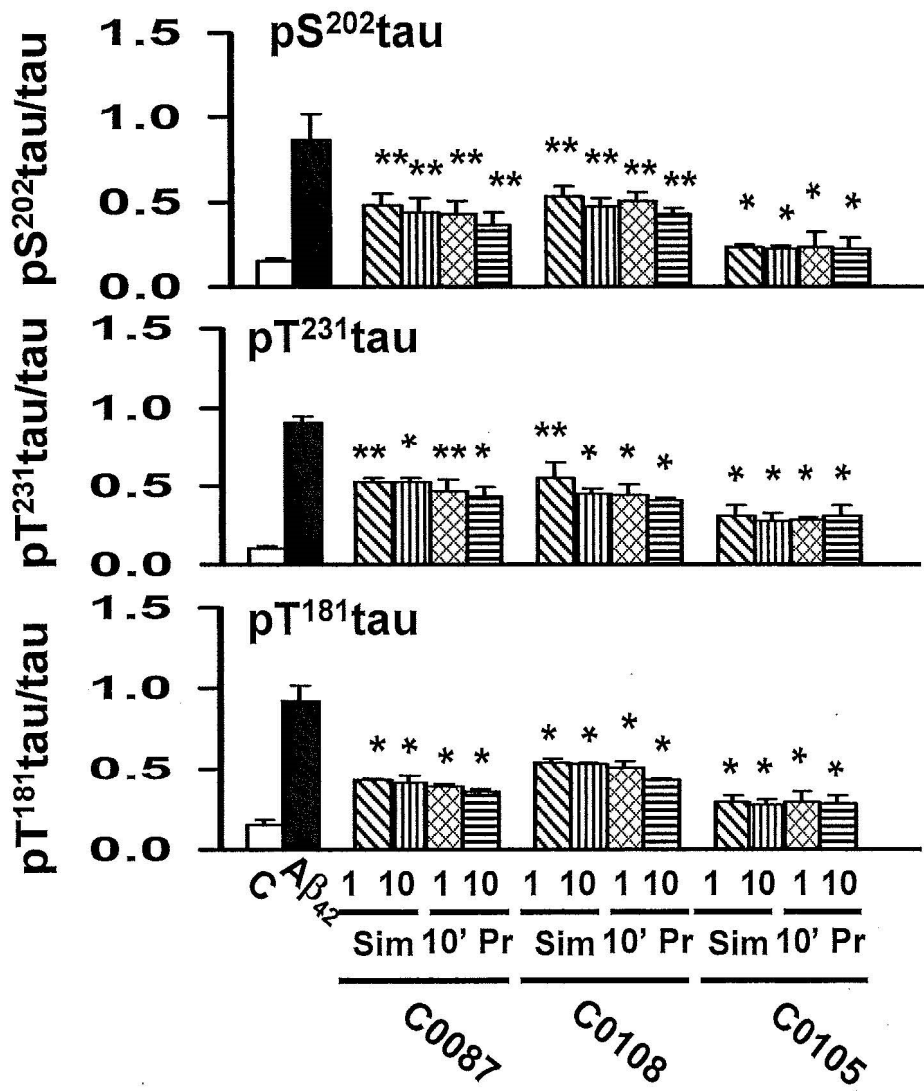


Fig. 45

Fig. 45A

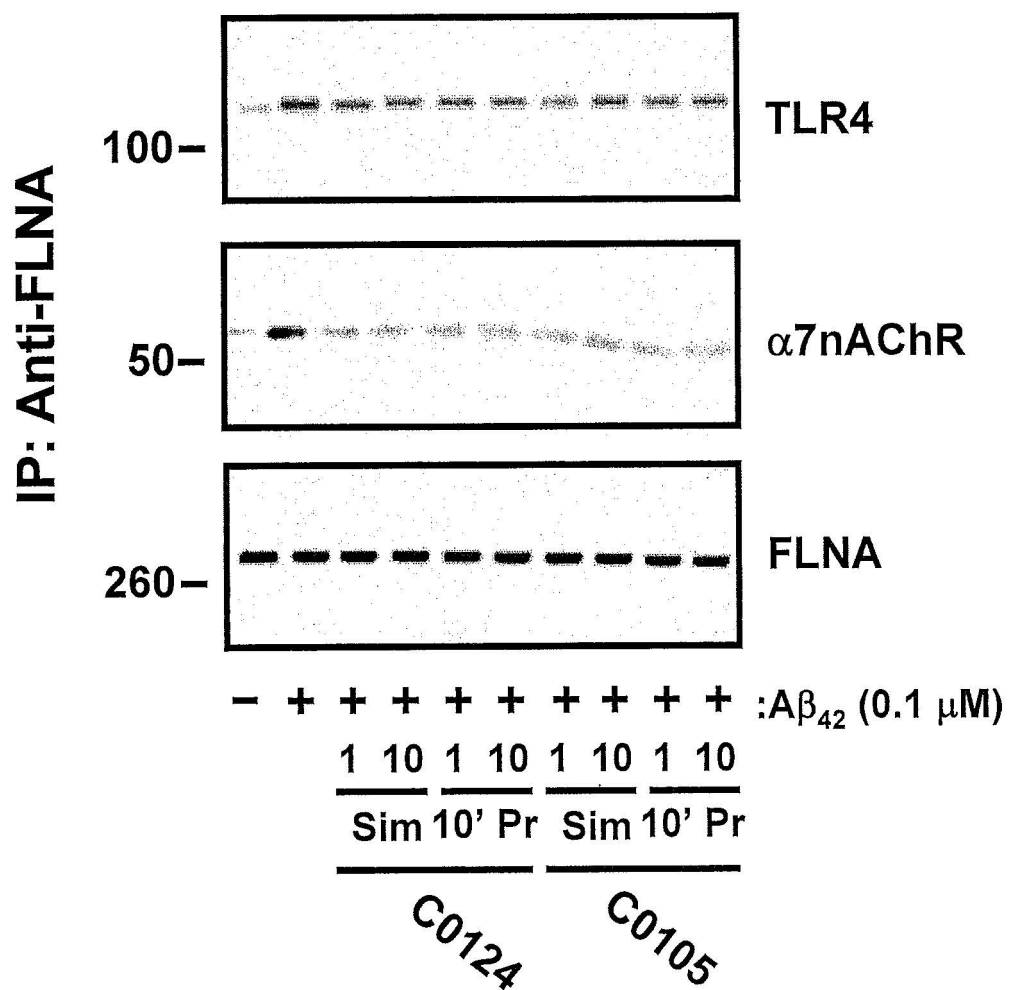


Fig. 45A

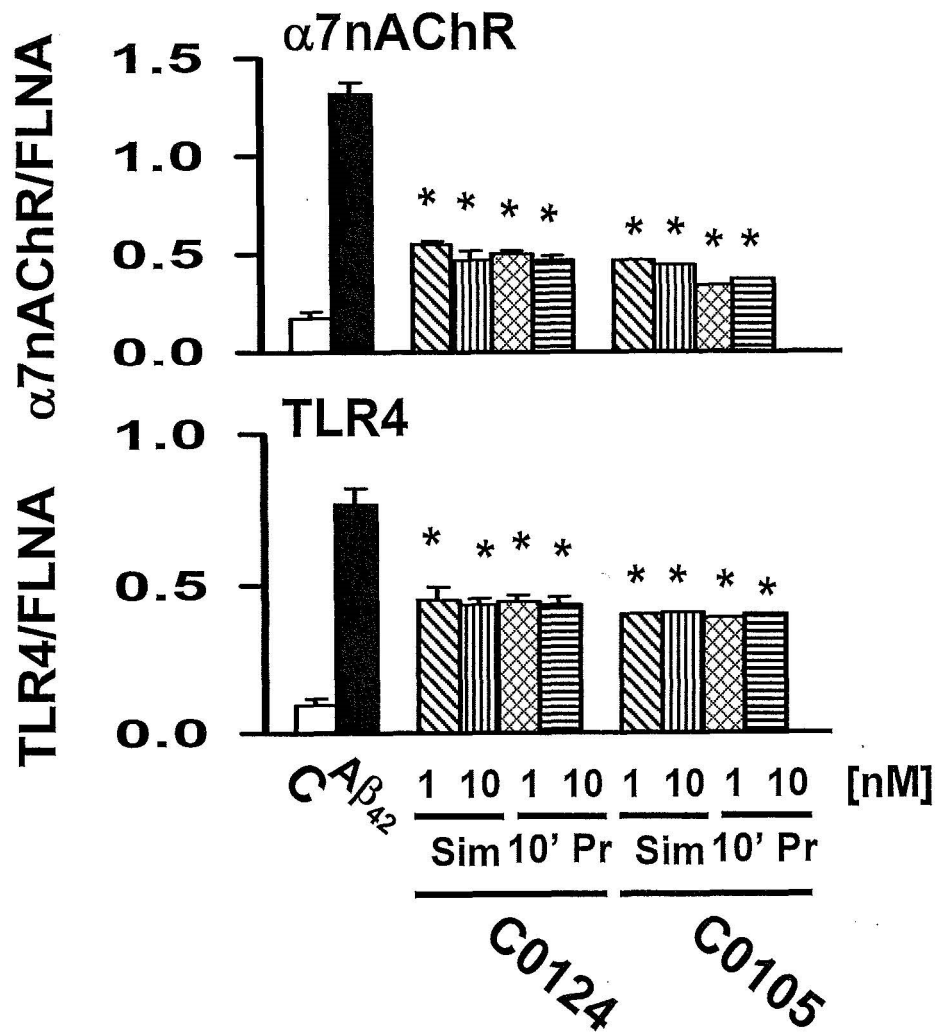


Fig. 46

Fig. 46A

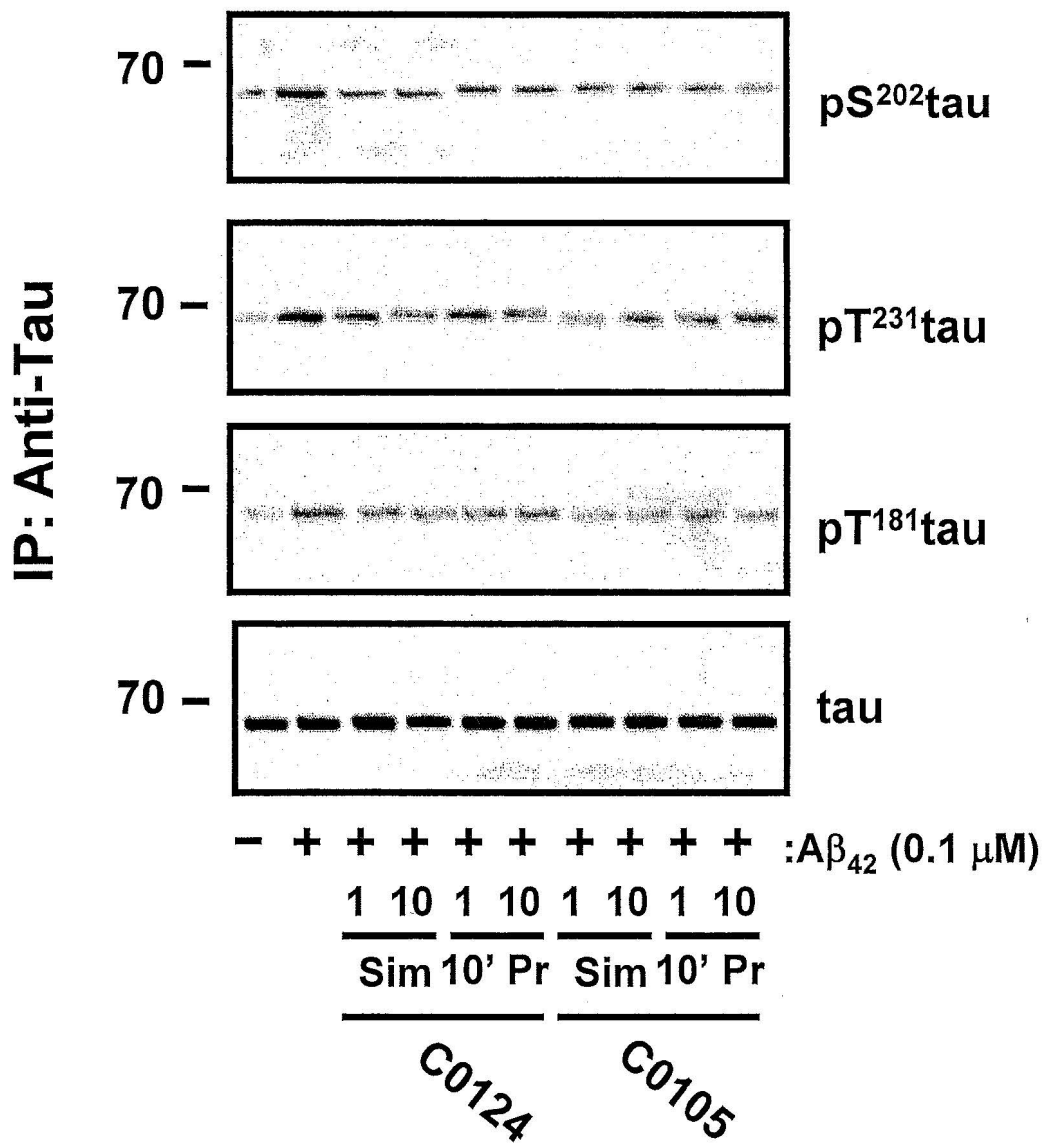


Fig. 46B

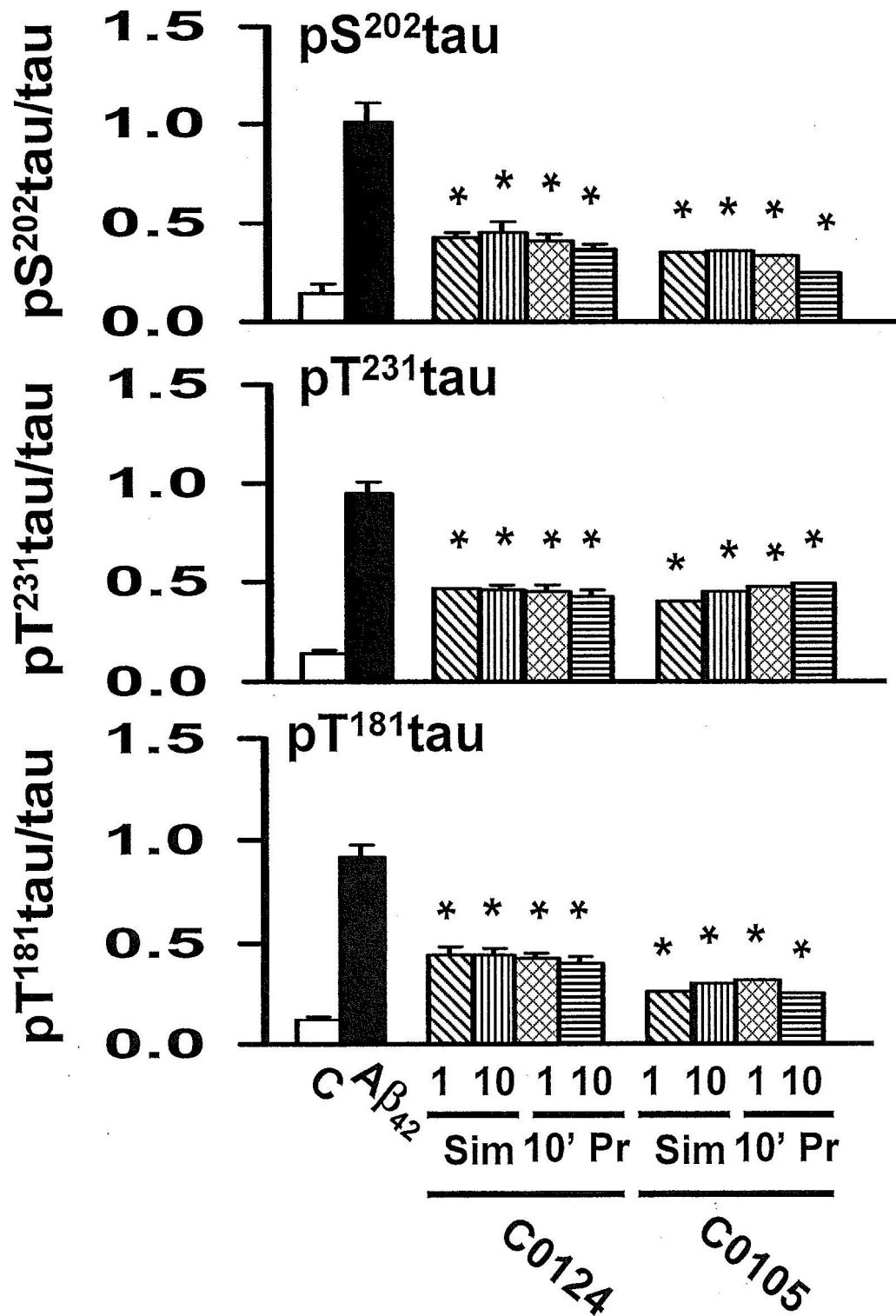


Fig. 47

Fig. 47A

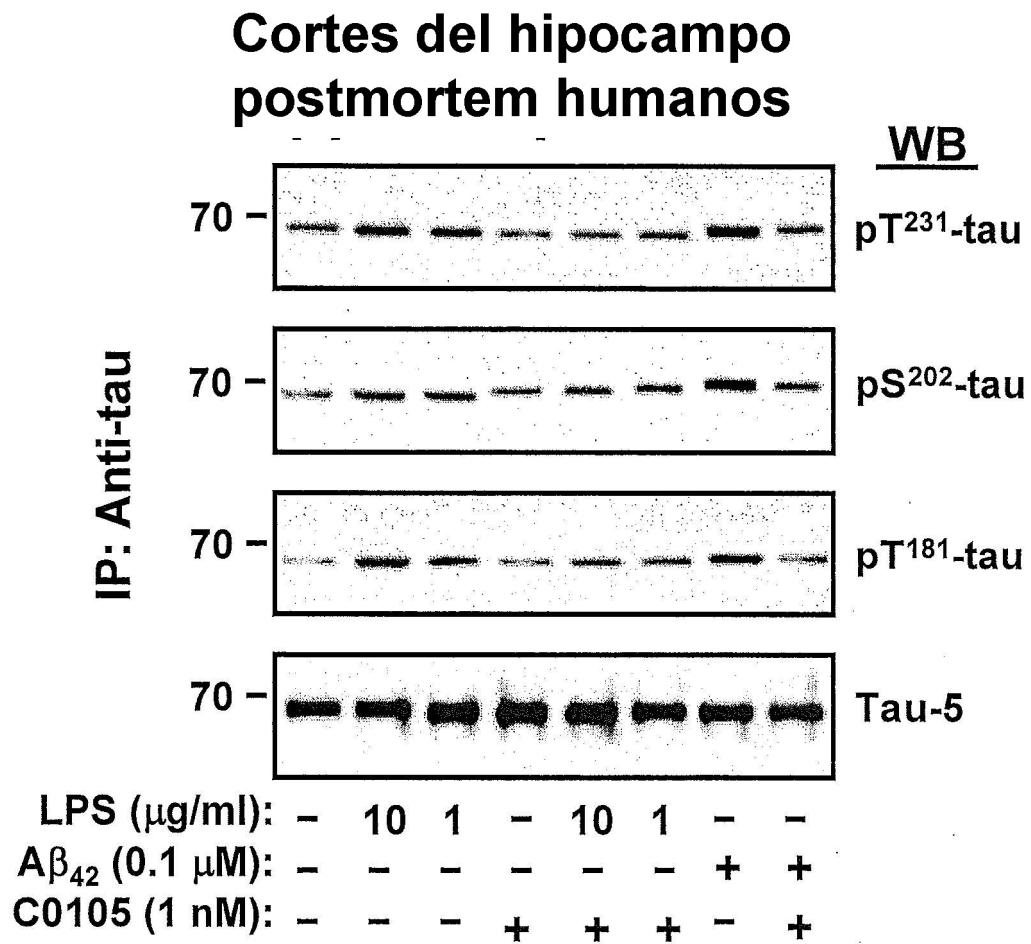


Fig. 47B

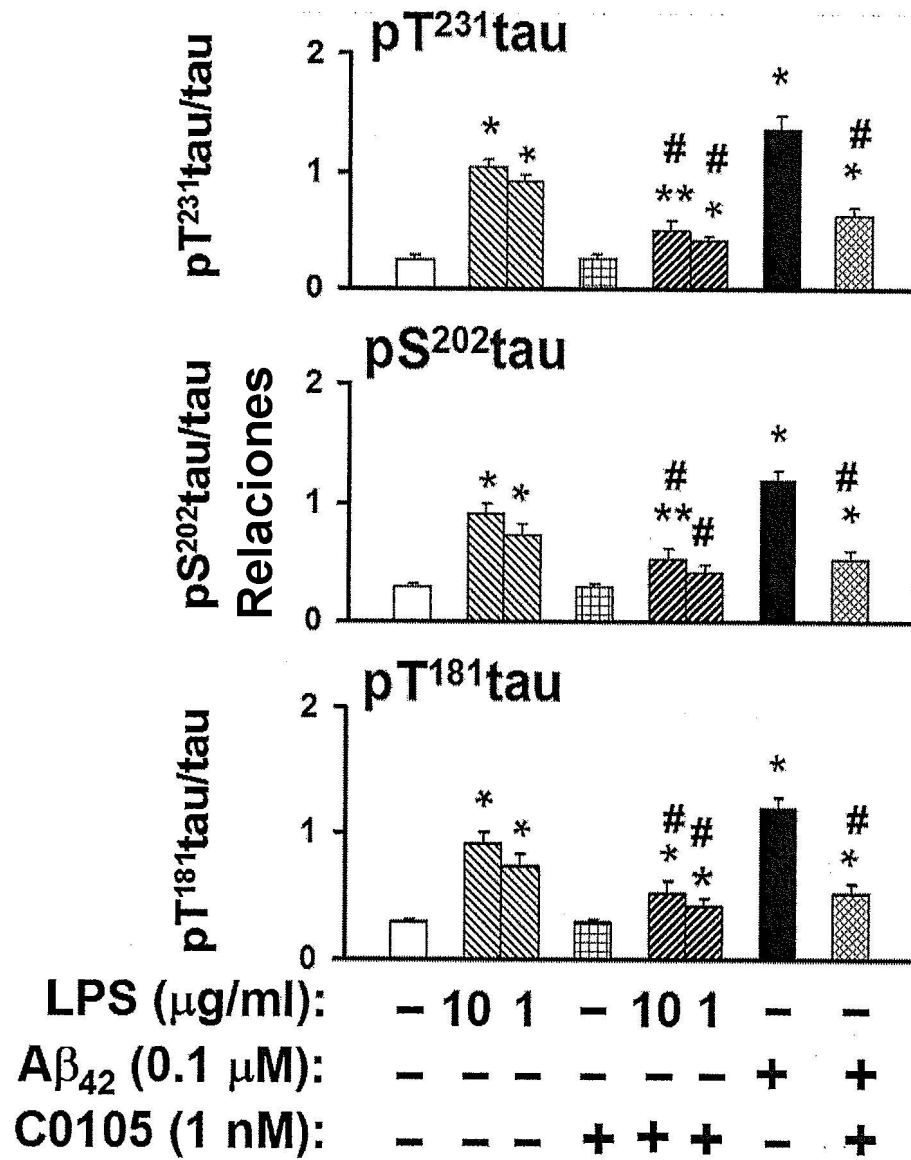


Fig. 47C

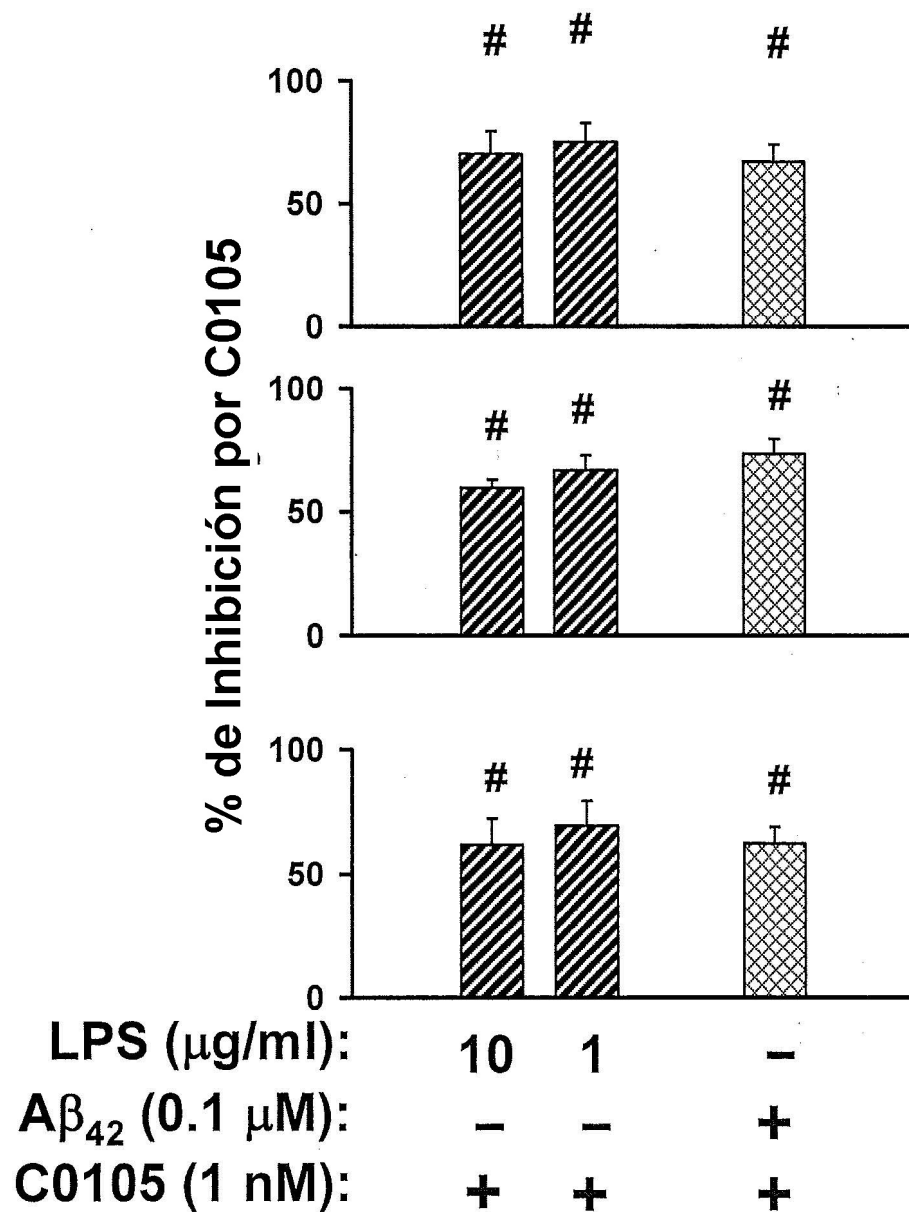


Fig. 48

Fig. 48A

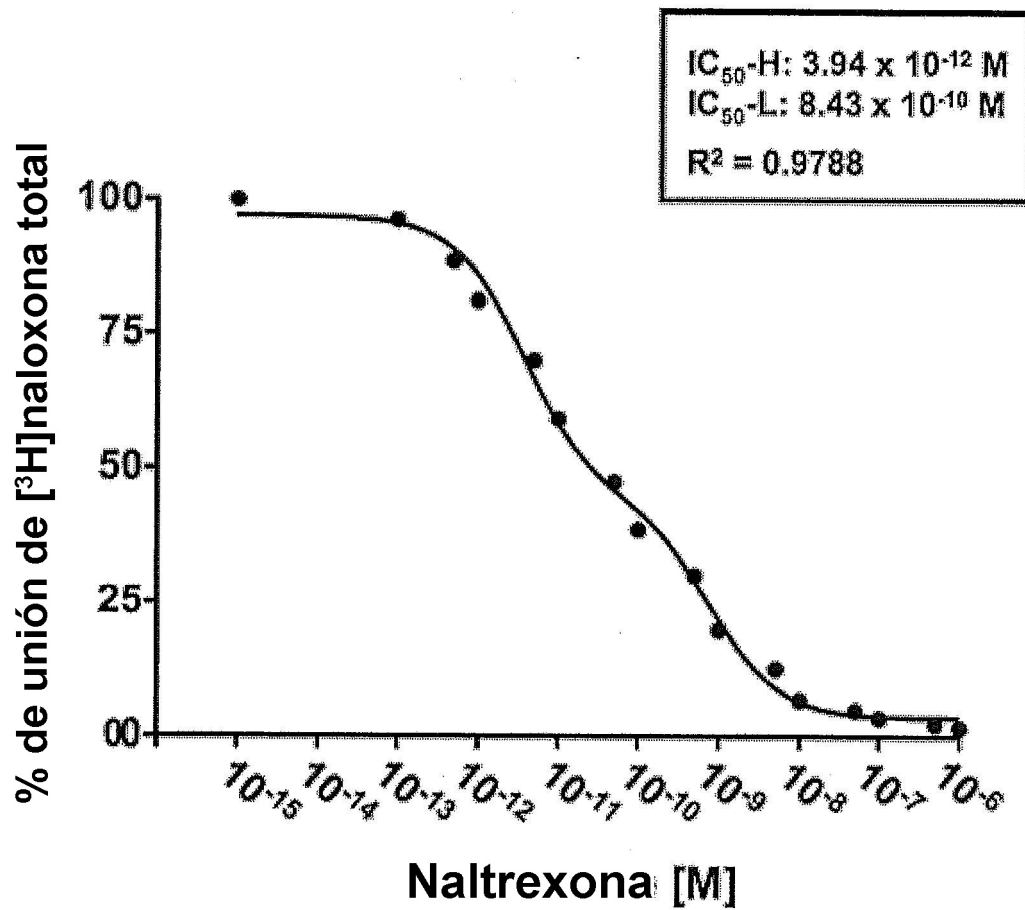


Fig. 48B

EC50_1	4.3480e-013
EC50_2	2.2550e-010
R ²	0.9930

♦ C0105

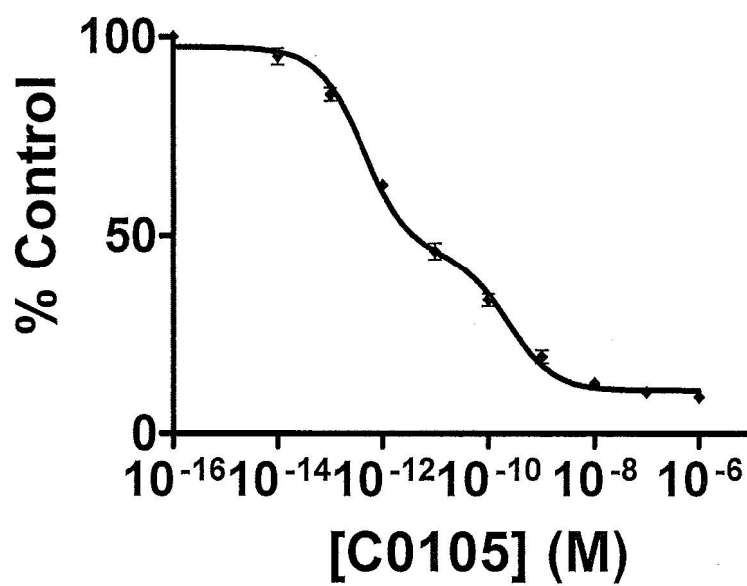


Fig. 48C

EC50_1	2.0140e-013
EC50_2	1.1140e-010
R ²	0.9806

♦ C0105

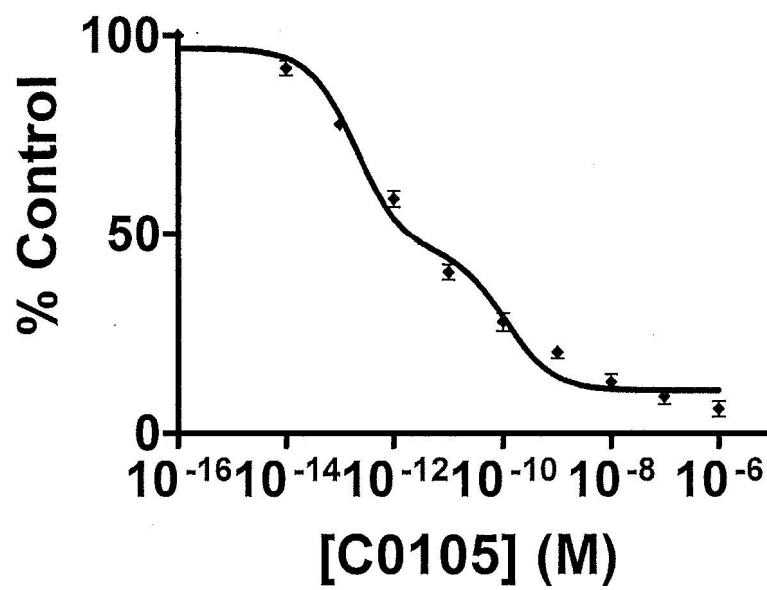


Fig. 48D

EC50	2.7640e-012
R ²	0.9463

