



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2276485 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 31/427 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 27/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.11.24
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.07.16
(86)	Europeisk søknadsnr	09735906.1
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.04.24
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2011.01.26
(30)	Prioritet	2008.04.24, US, 47729
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Innehaver	Bristol-Myers Squibb Company, Route 206 and Province Line Road P.O. Box 4000, Princeton, NJ 08543-4000, US-USA
(72)	Oppfinner	ALBRIGHT, Charles, F., c/o Bristol-Myers Squibb Company5 Research Parkway, Wallingford, Connecticut 06492, US-USA BARTEN, Donna, Marie, c/o Bristol-Myers Squibb Company5 Research Parkway, Wallingford, Connecticut 06492, US-USA LEE, Francis, Y., c/o Bristol-Myers Squibb CompanyRoute 206 & Province Line RoadPrinceton, New Jersey08543, US-USA
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	ANVENDELSE AV EPOTILON D I BEHANDLING AV TAU-FORBUNDNE SYKDOMMER, INKLUDERT ALZHEIMERS SYKDOM
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A-00/71521 WO-A-99/28324 WO-A-03/074053 WO-A-2004/087672 WO-A-2005/105081 WO-A-2006/033913 ZHANG B ET AL: "Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA USA, vol. 102, no. 1, 4 January 2005 (2005-01-04), pages 227-231, XP002539191 ISSN: 0027-8424

Beskrivelse

OPPFINNELSENS OMRÅDE

[0001] Denne oppfinnelsen vedrører generelt epotilon D, for anvendelse i behandlingen av Tau-assosierte sykdommer og mer spesifikt, i behandling av Alzheimers sykdom.

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

[0002] Alzheimers sykdom (AD) er den vanligste formen for demens, og rammer anslagsvis 27 millioner mennesker over hele verden i 2006. Alder er den største kjente risikofaktoren for AD med en forekomst på 25-50 % hos personer i alderen 85 år eller eldre. Ettersom gjennomsnittsalderen for befolkningen øker, forventes antallet pasienter med AD å stige eksponentielt. AD er den femte største dødsårsaken hos personer i alderen 65 år og eldre, og de fleste pasientene trenger etter hvert sykehjemsomsorg. Følgelig har AD en enorm økonomisk virkning, *f.eks.* var estimerte direkte og indirekte kostnader for 2005 i USA bare 148 milliarder kroner. Foruten de økonomiske kostnadene har AD en ødeleggende virkning på pasienter og familiemedlemmene deres, og forårsaker alvorlig følelsesmessig ubehag og uro.

[0003] Pasientene er diagnostisert med sannsynlig AD basert på nærvær av demens med progressiv forverring av hukommelse og andre kognitive funksjoner og med utelukkelse av andre årsaker til demens. En AD-diagnose kan bare bli bekreftet etter død ettersom den kliniske diagnosen er basert på hjernenevropatologi, diagnosen krever spesielt en evaluering av hjernevevet, inkludert eksistensen og konsentrasjonen av ekstracellulær plakk i hjernen, intracellulære floker, og hjernenevrodegenerering. Demens er også en nødvendig del av diagnosen, ettersom plakk og floker er observert hos kognitivt normale voksne, men vanligvis i mindre grad.

[0004] To klasser av medisiner, kolinesterasehemmere og en N-metyl-D-asparaginsyre (NMDA)-antagonist, er for tiden godkjent for AD. Selv om disse to klassene av legemidler viser noe klinisk nytte, responderer mange pasienter ikke, og disse legemidlene lindrer bare symptomene på AD (*f.eks.* kognitiv funksjon) med liten eller ingen endring av sykdomsprogresjon. Av disse grunnene er identifisering av sykdomsmodifiserende legemidler for denne ødeleggende sykdommen et stort fokus fra den farmasøytiske industrien.

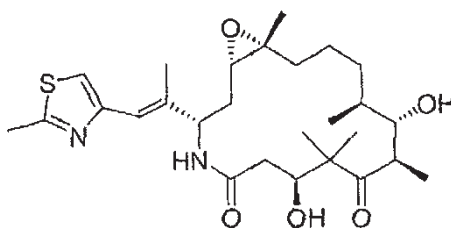
[0005] Mikrotubulstabilisatorer er blitt foreslått som behandlinger for å behandle tauopatii, inkludert AD. Se *for eksempel* Lee et al. (referanselisten, *nedenfor*). I US patent nr. 5,580,898, arkivert mai 1994 og innvilget 3. desember 1996, foreslår Trojanowski et al. anvendelse av paklitaksel (TAXOL®) for å behandle AD-pasienter ved å stabilisere mikrotubuli. Paklitaksel har vist seg å være meget effektiv som et mikrotubulstabiliserende middel ved behandling av kreftpasienter; men presenterer imidlertid hjernepenetrasjon og perifere nevropatiproblemer når den vurderes for AD

(nærmere beskrevet nedenfor), og har ikke vist seg som en levedyktig behandling for å behandle AD.

[0006] I 1995 ble epotilon B rapportert å utøve mikrotubulstabiliserende effekter som ligner på paklitaksel (Bollag et al. 1995). Epotilon A og epotilon B er naturlig-forekommende forbindelser som ble isolert av Hofle et al. fra gjæringsprodukter fra mikroorganismen *Sorangium cellulosum* (f.eks. WO 93/10121). Hofle et al. oppdaget også 37 naturlige epotilonvarianter og beslektede forbindelser som er produsert av *S. cellulosum* og modifiserte stammer, inkludert epotilonene C, D, E, F og andre isomerer og varianter (f.eks. US-patent nr. 6,624,310).

[0007] Unike egenskaper til de naturlige epotilonene genererte mye interesse i deres leting som potensielle anti-kreftlegemidler. Nå har det gått nesten tjue siden den første oppdagelsen av de naturlige epotilonene A og B. Hundrevis av epotilonanaloger har blitt oppdaget og beskrevet i ulike patentsøknader og rik litteratur har publisert under rubrikken, "epotiloner" (se f.eks. Altmann et al., referanselisten, nedenfor, ved 396-423).

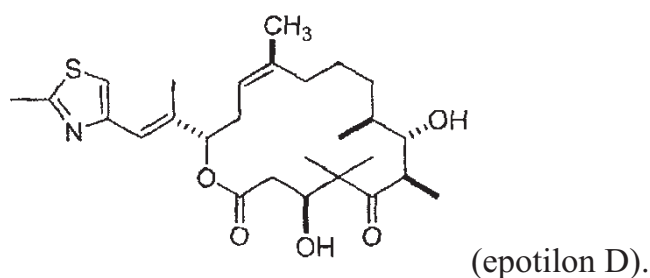
[0008] Oppdragstakeren av den gjeldende søknaden har utviklet iksabepilon (eng.: iksabepilon), en semisyntetisk analog av epotilon B, for behandling av kreft. Iksabepilon har den strukturelle formelen:



[0009] Det kjemiske navnet for iksabepilon er (1*S*,3*S*,7*S*,10*R*,11*S*,12*S*,16*R*)-7,11-dihydroksy-8,8,10,12,16-pentametyl-3-[(1*RE*)-1-metyl-2-(2-metyl-4-tiazolyl)etenyl]-17-oksa-4-azabisyklo[14.1.0]heptadekan-5,9-dion. Se også U.S.-patent nr. 6,605,599, tildelt den midlertidige rettsetterfølgen, Bristol-Myers Squibb Company (BMS). Iksabepilon er et mikrotubulstabiliserende legemiddel som er godkjent av FDA for behandling av metastatisk brystkreft og selges av BMS under varemerket IXEMPRA®. Iksabepilon kan fremstilles som beskrevet i US-patent nr. 6,605,599 eller 7,172,884.

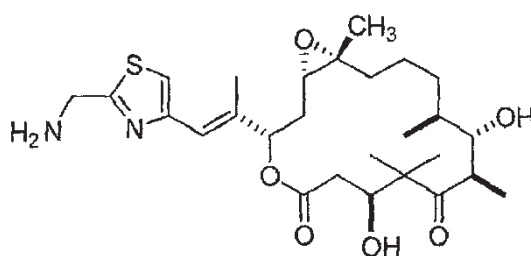
[0010] Andre naturlige epotiloner og analoger er i fremskredne kliniske studier for behandling av kreft, inkludert epotilon B (a/k/a patupilon, eller EPO-906), i fase-III-studier av Novartis Pharma AG, for behandling av eggstokkreft, og sagopilon (eller ZK-EPO), en benzotiazolyl-7-propenyl syntetisk analog av epotilon B, i fase-II-studier fra Bayer Schering AG for behandling av ulike kreftformer, inkludert tumorer i eggstokken, brystet, lungene, prostata og melanoma. I 2007 ble en fase-II-studie med sagopilon startet i USA for behandling av hjernemetastaser fra brystkreft. I tillegg

hadde en epotilon-D-analog, KOS-1584, fremskredet til fase II kliniske studier av Kosan Biosciences, Inc. (nå et heleid datterselskap av BMS) for behandling av ikke-småcellet lungekreft og faste tumorer, og epotilon D hadde fremskredet til fase-II-kliniske studier for behandling av kreft av Kosan i samarbeid med Hoffmann-La Roche, Inc.; imidlertid ble de kliniske studiene med epotilon D for behandling av kreft avbrutt i 2007. Strukturen for epotilon D kan representeres av den følgende formelen:



[0011] Epotilon-D-forbindelsen kreves, som den gjeldende sammensetningen, i US-patentsøknad serie nr. 091313,524 til Hofle et al., og beskrevet i US-patent nr. 6,242,469 og 6,284,781 til Danishefsky et al., der søknaden og patentene ble gjenstand for forstyrrelse nr. 105,298, før USPTO Board of Patent Appeals and Interferences.

[0012] Oppdragstakeren av den gjeldende søknaden har klinisk evaluert BMS-310705 (forbindelse II i dette dokumentet), for kreftbehandling. BMS-310705 ble forfulgt gjennom fase I-kliniske studier for behandling av eggstokkreft; den er en amino-epotilon-F-analog og har den kjemiske strukturen:



[0013] Forbindelse II (BMS 310705), kan fremstilles som beskrevet i US-patent nr. 6,262,094.

[0014] Mens enkelte av epotilonforbindelsene og analoger har blitt klinisk evaluert for behandling av kreft, er det svært uforutsigbart om en kreftmedisin kan anvendes effektivt til å behandle nevrodegenerative sykdommer, inkludert AD. Det er ulike faktorer som påvirker denne uforutsigbarheten. En faktor er den betydelige vanskeligheten med å oppnå god hjernepenetrasjon som følge av blod-hjerne-barrieren (BBB). For at en forbindelse skal være nyttig i behandling av nevrodegenerative hjernesykdommer, er det nødvendig at forbindelsen krysser BBB; imidlertid, siden en

funksjon av BBB er å beskytte hjernen fra eksterne stoffer og toksiner, er det en utfordring å oppdage et nyttig legemiddel som har god BBB-penetrering. I tillegg er BBB-penetrering en uønsket egenskap for et kreftlegemiddel (annet enn hjernekreft-legemidler). Med et kreftlegemiddel forsøker man vanligvis å unngå BBB-penetrering, mens for et legemiddel utviklet for å behandle AD eller andre nevrodegenerative hjernesykdommer, er god BBB-penetrering nødvendig for at forbindelsen skal være effektiv. Derfor, for eksempel, mens paklitaksel er et svært vellykket kreftmedikament, har det ikke oppstått som en nyttig terapi for å behandle hjernesykdommer, som for eksempel AD, ettersom det har en lav hastighet av hjernepenetrasjon gjennom BBB.

[0015] Ytterligere faktorer som påvirker uforutsigbarheten av å evaluere nyttheten av kreftlegemidler, særlig mikrotubulistabiliserende legemidler, for behandling av AD og andre hjernesykdommer involverer et legemiddels evne til å trenge inn i hjernen, for å være inneholdt i hjernen i lange perioder, og å selektivt akkumuleres i hjernen i forhold til perifere vev. Disse parameterne kan måles ved hjelp av hjerne-til-plasmaforhold, hjernehalveringstid, og forholdet mellom mengden legemiddel inneholdt i hjernen i forhold til perifere vev (mest spesielt leveren). I tillegg er måling av hjernepenetrasjon, oppbevaring og selektiv hjerneakkumulering med mikrotubulistabilisatorer komplisert fordi disse forbindelsene vanligvis fjernes raskt fra plasma, men fjerner seg mer langsomt fra mikrotubulholdige vev, noe som gjør det viktig å sette passende tidsvinduer for sammenligninger av plasma- og vevsnivåer. Det hjerne-til-perifere-vev-forholdet er en meget viktig måling gitt at mikrotubulstabiliserende midler ved visse doser er svært cytotoksiske til perifere vev: når mikrotubulstabiliserende midler, for eksempel paklitaksel, administrert ved kjemoterapeutiske doser, oppstår en perifer nevropati og andre bivirkninger ofte (Postma et al. 1999). Disse bivirkningene kan være akseptable i behandling av kreftpasienter, men et annet terapeutisk vindu og akseptabel bivirkningsprofil finnes ved behandling av pasienter som lider av AD og andre hjernesykdommer.

[0016] Likevel involverer ytterligere utfordringer involvert med å se etter kreftlegemidler for mulig påføring til nevrodegenerative sykdommer administreringsmåten og biotilgjengeligheten og cytotoksisiteten forbundet med dette.

[0017] I WO 20051075023 A1, publisert 30. januar 2004, til Andrieux et al. av INSERM, er det foreslått at visse epotiloner og analoger inkludert epotilon A, B, C, D, E og F, og benzotiazolyl, og pyridylepotilon-B- og D-analoger kan være nyttig i behandling av sykdommer som involverer en nevronal tilkoblingsfeil, slik som schizofreni eller autisme. Imidlertid fraskrev Andrieux et al. og lærte derved anvendelsen av disse forbindelsene for behandling av AD, som sier at sykdommer forbundet med nevronale tilkoblingsfeil (dvs. de som er krevet i denne søknaden) "er forskjellig fra progressive demensforstyrrelser som Alzheimers, som involverer nevronal degenerasjon."

[0018] I WO 03/074053 ('053), til Lichtner et al. av Schering AG (publisert 12.09.2003), er det et bredt krav å anvende en bred slekt av epotilonforbindelser og syntetiske analoger for behandling av kreft i hjernen og andre hjernesykdommer, inkludert primær hjernetumor, sekundær hjernetumor, multippel sklerose, og AD.

Lichtner et al. rapporterer visse data på fire forbindelser, nemlig paklitaksel sammenlignet med forbindelsene angitt i disse som forbindelse 1: 4,8-dihydroksy-16-(1-metyl-2-(2-metyl-4-tiazolyl)-etenyl)-1-oksa-7-(1-propyl)-5,5,9,13-tetrametylsykloheksadek-13-en-2,6-dion; forbindelse 2: dihydroksy-3-(1-metyl-2-(2-metyl-4-tiazolyl)-etenyl)-10-propyl-8,8,12,16-tetrametyl-4,17-dioksabisyklo[14.1.0]heptadekan-5,9-dion; og forbindelse 3: 7,11-dihydroksy-3-(2-metylbenzotiazol-5-yl)-10-(prop-2-en-1-yl)-8,8,12,16-tetrametyl-4,17-dioksabisyklo[14.1.0]heptadekan-5,9-dion (se WO '053-publikasjon på side 21).

[0019] Det er verdt å merke seg at Lichtner et al. rapporterer hjerne- og plasma-konsentrasjonsdata for de ovennevnte tre epotilonanalogene, men bare i perioder på opptil 40 minutter. Lichtner et al. er ikke i stand til å rapportere komparative data mot paklitaksel på hjerne-til-plasmanivåer ettersom deres paklitakselhjernnivåer var under deteksjonsgrensen, og de rapporterer ikke data knyttet til hjerne-til-lever-forholdstall, halveringstid, eller hjerneretensjon for noen av forbindelsene (*f.eks.* konsentrasjon av legemiddel i hjernevev over lengre tidsperioder).

[0020] WO 99/28324 og WO 00/7151 offentliggjør en prosess for reduksjon av oksiranylepotiloner til olefinske epotiloner.

[0021] På bakgrunn av det foregående, er det fortsatt et behov innenfor fagområdet for forbindelser for anvendelse i fremgangsmåter for behandling av tauopatier, særlig Alzheimers sykdom.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

[0022] De foreliggende oppfinnerne har oppdaget, basert på *flere in vivo-studier* inkludert atferdsmessige og nevropatologiske studier, at epotilon D oppnår en overraskende fordelaktig profil ved behandling av Tau-assosierte sykdommer, inkludert Alzheimers sykdom. Oppfinnerne har oppdaget at epotilon D oppviser en bemerkelsesverdig kombinasjon av fordelaktige egenskaper, noe som gjør forbindelsen spesielt godt egnet for å behandle slike sykdommer. Disse egenskapene inkluderer ikke bare en høy grad av hjernegjennomtrengning på tvers av BBB, men også en overraskende lang halveringstid i hjernen og en overraskende høy selektiv retensjonsgrad i hjernen sammenlignet med legemiddelnivåer funnet i perifere vev, først og fremst, leveren, over lengre tidsperioder. I tillegg har oppfinnerne videre funnet at overraskende, terapeutiske fordeler i behandling av Tau-assosierte sykdommer, spesielt AD, kan oppnås med lave doseringer av epotilon D, *f.eks.* med doser som er omtrent 100 ganger mindre enn de som administreres for å oppnå

kjemoterapeutiske effekter. Følgelig har oppfinnerne oppdaget metoder som muliggjør terapier i behandling av Tau-assosierte sykdommer med epotilon D, spesielt behandling av AD, uten å forårsake legemiddelinduserte bivirkninger og/eller legemiddelplasmakonsentrasjonsnivåer som ville kreve stopp av anvendelse av epotilon D. Gitt den lave dosen sammenlignet med kjemoterapeutiske behandlinger, blir eventuelle bivirkninger sterkt redusert sammenlignet med bivirkninger som induseres ved administrering av epotilonene og analogene for behandling av kreft.

[0023] Omfanget av oppfinnelsen er definert i kravene. Foreliggende oppfinnelse er rettet mot anvendelsen av epotilon D for fremstilling av et medikament for behandling av Tau-assosierte sykdommer valgt fra frontotemporal demens med parkinsonisme knyttet til kromosom 17 (FTDP-17), progressiv supranukleær parese, kortikobasal degenerering, Picks sykdom, agyrophilic grain disease, Downs syndrom, myoton dystrofi, Niemann-Pick C-sykdom, demens Pugilistica, Blint-sykdom og traumatisk hjerneskade. Foreliggende oppfinnelse er også rettet mot anvendelsen av epotilon D for fremstilling av et medikament for behandling av Alzheimers sykdom.

[0024] Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer videre en farmasøytisk formulering for administrering til en human pasient for anvendelse i behandling av en Tau-assosiert sykdom valgt fra de som er nevnt ovenfor, samt AD, der formuleringen omfatter en doseringsenhet av epotilon D fra 0,0001 - 10 mg/m². Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre epotilon D for anvendelse i behandling av Tau-assosierte sykdommer som er nevnt ovenfor hos en pasient, spesielt AD.

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

[0025]

FIG. 1 viser den grunnleggende utformingen av et forsøk på Tg4510-mus ved hjelp av epotilon D (forbindelse I).

FIG. 2 viser resultatene av en Morris-vannlabyrinttest (MWM-test) av Tg4510-mus ved 2,5 måneder, før dosering med epotilon D (forbindelse I).

FIG. 3 viser resultatene av en MWM-test av Tg4510-mus etter 4,5 måneders, etter 2 måneders dosering med epotilon D (forbindelse I).

FIG. 4 viser probedata 18 timer etter 5 dager med trening i 4,5 måneder gamle Tg4510-mus dosert i 2 måneder med epotilon D (forbindelse I). "TQ" står for målkvadrant, "AR" står for tilstøtende høyre, "AL" står for tilstøtende venstre, og "OP" står for motsatt kvadrant. To mål på ytelse, nemlig % veilengde (A) og antall plattformoverganger (B), er beskrevet.

FIG. 5 viser nevronale tellinger i CA1- og CA3-regionene av hippokampus i Tg4510-mus etter 5,5 måneders behandling med vehikkel, 1 mpk epotilon D (forbindelse I), og 10 mpk epotilon D (forbindelse I).

FIG. 6 viser fosforylert Tau-farging av Tg4510-musen behandlet med vehikkel, 1 mpk epotilon D (forbindelse I), og 10 mpk epotilon D (forbindelse I) i hippokampus.

Representative seksjoner fra 3 mus per gruppe er vist. AT8 positiv farging er mørkegrå og svart.

FIG. 7A-7B viser Gallyas-sølvfarging for nevrofibrillære knuter i Tg4510-mus behandlet med vehikkel, 1 mpk epotilon D (forbindelse I), eller 10 mpk epotilon D (forbindelse I). Figur 7A viser representative mikrografer av kortikal farging, der den sorte sølvfargingen er positiv. Det ble observert en bakgrunn med lysere farge og noe farge på blodkarene i ikke-transgene mus. Figur 7B viser kvantifisering av sølvfargen i både cortex og hippokampus.

FIG. 8A-8D viser konsentrasjonen av forbindelse II (FIG. 8A), iksabepilon (FIG. 8B), paklitaksel (FIG. 8C) og epotilon D (forbindelse I) (FIG. 8D) i plasma, hjerne og lever hos mus etter intravenøs administrering ved forskjellige intervaller på opptil 24 timer.

FIG. 9 viser at konsentrasjonen av epotilon D (forbindelse I) og forbindelse III (som beskrevet i eksempel 7 i dette dokumentet) i hjernen etter oral administrering (35 mpk) opptil 5 til 24 timer etter dosering.

FIG. 10 viser konsentrasjonen av epotilon D i plasma, hjerne og lever i mus etter tidsintervaller opptil en uke etter dosering.

FORKORTELSER

[0026] Det følgende er forkortelser av ulike begreper som anvendes i denne beskrivelsen:

3R = tre gjentakelser

4R = fire gjentakelser

AD = Alzheimers sykdom

APP = β -amyloidforløperprotein

BBB = blod-hjernebarriere

BMS = Bristol-Myers Squibb, Co.

CHCl₃ = kloroform

CH₂Cl₂ = metylenklorid

DMAp = 4-dimetylaminopyridin

EtOAc = etylacetat

HPLC = høytrykksvæskeskromatografi

FDA = US Food and Drug Administration

FTDP-17 = frontotemporal demens med parkinsonisme knyttet til kromosom 17

T, t = time/timer

IP = intraperitoneal

IV = intravenøs

LDA = litiumdiisopropylamid

LLQ = nedre grense for kvantifisering

<LLQ = under LLQ, ikke detekterbar

MAP = mikrotubuliassosiert protein

MeOH = metanol

5 min = minutter

MTs = mikrotubuli

mpk = milligram per kilo

MWM = Morris vannlabyrint

nM = nanomolar

10 NQ = ikke målbar grunnet ett eller flere datapunkter < LLQ

PEG = polyetylen glykol

PGP = P-glykoprotein

PO = per os (oral administrering)

PVP = polyvinylpyrrolidon

15 RT = romtemperatur

SiO₂ = silikagel

TBAF = tetrabutylammoniumfluorid

TBS = Tris-bufret saltløsning

TEA = trietylamin

20 TFA = trifluoreddiksyre

THF = tetrahydrofuran

TPGS = d- α -Tocoferylpolyetylen glykol-1000-suksinat

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

25 Definisjoner

[0027] "Om" eller "omtrent" som anvendt i dette dokumentet betyr innenfor et akseptabelt område av standardavvik for den bestemte verdien som bestemmes av en fagmann på området, med tanke på målingen det gjelder og instrumentet som anvendes for å utføre målingen (dvs. begrensningene i målesystemet). For eksempel kan "om" bety innen ett eller flere standardavvik. Som anvendt i formuleringene og doseringene, kan "om" bety et avvik innenfor 10 %, mer foretrukket innenfor 5 %, og enda mer foretrukket innenfor 2 % av de rapporterte tallene.

[0028] Begrepene "minst x" og "x eller flere" eller "x eller større", der x angir en tallverdi, anvendes om hverandre i dette dokumentet som om de er ment å ha samme betydning.

[0029] "Hjernepenetring" refererer til en forbindelses evne til å krysse BBB. På grunn av den raske perifere utskillingen av de fleste mikrotubulistabiliseringsmidlene er det viktig å måle hjerne-til-plasmaforholdet ved relativt korte tider etter dosering,

f.eks. i perioder på omtrent 20 min til 1 time etter doseringen, for å vurdere hjernepenetrasjonen i seg selv. En forbindelse som har god hjernepenetrasjon som definert i dette dokumentet betyr en forbindelse som etter 20 min til 1 t etter dosering vil vise et hjerne-til-plasma-forhold på 0,5 eller større, mer foretrukket 0,8 eller større, og mest foretrukket, et forhold på 1 eller større (igjen, i en tid mellom 20 minutter og 1 time etter dosering). Ved vurdering av om en forbindelse eller legemiddel tilfredsstiller denne standarden med høyt hjerne/plasma-forhold (*f.eks.* som nevnt i kravene i dette dokumentet), må *in vivo ikke*-humane studier stoles på ettersom humant hjernevev ikke kan analyseres for å vurdere legemiddelkonsentrasjonen.

[0030] "Kognitive fordeler" betyr at en forbedring eller reduksjon i svikt av kognitiv funksjon hos minst én pasient som trenger behandling er observert eller rapportert, som kjennetegnes av kognisjonstester, målinger av global funksjon og dagliglivets aktiviteter og atferd. Vanligvis måles kognitive fordeler med kognisjonstester utformet for å måle kognitiv svikt hos en pasient eller gruppe av pasienter. Eksempler på slike tester inkluderer kognisjonstester som ADAS-Cog (Alzheimers sykdoms vurderingsskala, kognitiv delskala) og MMSE (mini-mental tilstandseksamen); atferdstester som NPI (Neuropsychiatric Inventory); dagliglivsaktivitetstester som ADCS-ADL (Alzheimers sykdom samarbeidende studieaktiviteter av dagliv); og globale funksjonstester som CIBIC-plus (klinisk intervjubasert inntrykk av endring), og CDR-summen av bokser (klinisk demensrating).

[0031] "Forlengede tidsperioder" som anvendt i dette dokumentet, betyr perioder på 24 timer eller mer, typisk 24-76 timer.

[0032] "Høy selektiv retensjonsrate" eller "høy selektiv retensjon" som anvendt i dette dokumentet, betyr at legemidlet eller forbindelsen opprettholdes i et vev eller organ, spesielt i hjernen, på et mye høyere nivå enn det som er funnet i andre vev og organer, spesielt i leveren, som målt ved en lengre periode av tid etter dosering. Mer spesielt, som definert i dette dokumentet, betyr en høy selektiv retensjonsgrad at konsentrasjonen av legemidlet i hjernen er 4 eller flere ganger den som finnes i leveren 24 eller flere timer etter dosering, mer foretrukket, ved en faktor på minst 6 eller mer, og mest foretrukket ved en faktor på minst 8 eller mer 24 timer eller mer timer etter dosering. Ved vurdering av om en forbindelse eller legemiddel tilfredsstiller denne standarden med høy selektiv retensjon (*f.eks.* som nevnt i kravene i dette dokumentet), må man naturligvis stole på *ikke*-humane studier ettersom humant hjernevev ikke kan analyseres for å vurdere legemiddelkonsentrasjonen.

[0033] "Virkning på underliggende sykdom" betyr en forbedring i et mål på biomarkører og andre parametere forbundet med sykdomsprosessen, inkludert biokjemiske markører i CSF eller plasma, endringer i hjernevolum, endringer i hjernefunksjon målt ved funksjonell avbildning og endringer i histopatologi eller biokjemi som kan observeres etter obduksjon. Typiske biomarkører som kan anvendes

for AD-kliniske studier inkluderer analytter målt i CSF, slik som Tau, fosfoTau, beta-amyloid, og isoprostaner, samt hjerneavbildningsmodaliteter slik som fluordeoksyglukose-PET og volumetrisk MRI. Ytterligere biomarkører som potensielt kan være nyttige, spesielt de som undersøker synaptisk aktivitet, MT-integritet/funksjon, og oksidativ belastning inkluderer, men er ikke begrenset til: GABA, neuropeptid Y, alfa-synuklein, nevrogranin og vasoaktivt intestinalt peptid, tubulin, Tau-fragmenter, ubiquitinerte proteiner, løselige former av amyloidforløperprotein, kromogranin B, 4-hydroksynonenal, nitrotyrosin og 8-hydrokseydeoksyguanidin.

[0034] Når "intermittent" anvendes med referanse til en doseringsplan betyr det at det er pauser i doseringsplanen som er uregelmessige. For eksempel er en daglig, ukentlig, annenhver ukentlig eller månedlig doseringsplan ikke ansett som intermittent under denne definisjonen, ettersom pausen mellom dosene i hvert tilfelle er vanlig og definert av doseringssyklusen for administrering av legemidlet. Imidlertid vil en mer forseggjort doseringsplan med én eller flere uregelmessige pauser betraktes som intermitterende, som f.eks. 5 dager på, etterfulgt av to dager av; eller en dose administrert på dagene 1, 8 og 15, av en 30 dagers syklus, og så videre.

[0035] "Lang halveringstid" eller "lang hjernehalveringstid" som anvendt i dette dokumentet, betyr at et legemiddel har en halveringstid på 20 eller flere timer etter dosering (som anses som doseuavhengig), og mer foretrukket, i en periode på 30 eller flere timer etter dosering, og mest foretrukket, i en periode på 40 eller flere timer etter dosering. Som med de selektive retensjonsgradene må *in vivo* ikke-humane studier anvendes som grunnlag for å vurdere hvorvidt forbindelsen har en lang hjernehalveringstid.

[0036] "Lav dose" som anvendt i dette dokumentet betyr en dose av epotilon D-forbindelse som er betydelig mindre enn den som administreres for å oppnå kjemoterapeutiske effekter (f.eks. gitt en spesiell administreringsmåte, kliniske forsøk, og/eller forsøk), fortrinnsvis en dose som er 10 ganger eller mindre enn den kjemoterapeutiske dosen, mer foretrukket en dose som er 50 eller flere ganger mindre, og enda mer foretrukket en dose som er 100 eller flere ganger mindre enn den kjemoterapeutiske dosen, dvs. den tidligere vurdert som kjemoterapeutisk effektiv ved å anvende samme administrative metode for det gitte forsøket, undersøkelsen eller prøven. For eksempel, i fase-II-kliniske forsøk med epotilon D, ble en administrert dose på 100 mg/m^2 administrert som en 90 min. infusjon én gang i uken i tre uker hver fjerde uke (3 uker på, 1 uke av), for totalt samlet 300 mg/m^2 administrert hver 4. uke. En lav dose i forhold til denne kliniske studiedosen, som definert i dette dokumentet, ville bety en kumulativ én månedlig dose etter intravenøs administrering på 30 mg/m^2 eller mindre, mer foretrukket en dose på 6 mg/m^2 eller mindre, og enda mer foretrukket en dose på 3 mg/m^2 eller mindre. Dermed, som et alternativt eksempel, ville en lav dose sammenlignet med det ovennevnte kliniske forsøket, når den administreres én

gang hver 4. uke, være en dose på 30 mg/m², mer foretrukket en dose på 6 mg/m² og enda mer foretrukket en dose på 3 mg/m². Ettersom biotilgjengeligheten kan endre seg avhengig av administreringsmåten (*f.eks. oral v. intravenøs administrering, med mindre biotilgjengelighet oppnådd ved oral administrering*), bør de relative dosene

5 (*dvs. vurdering av om en gitt dose er en "lav dose" som definert i dette dokumentet*), baseres på en sammenligning mellom de samme eller tilsvarende administreringsmåtene.

[0037] "Pasient med behov for behandling" som anvendt i dette dokumentet er ment å inkludere anvendelse av epotilon D for en pasient 1) som allerede er diagnostisert med

10 en Tau-assosiert sykdom (inkludert en tauopati, særlig AD) ved et hvilket som helst klinisk stadium, inkludert pasienter som har mild kognitiv svikt til fremskreden demens; og/eller 2) som har tidlige eller prodromale symptomer og tegn på en Tau-assosiert sykdom (inkludert en tauopati, særlig AD); og/eller 3) som har blitt diagnostisert som utsatt for en Tau-assosiert sykdom (inkludert en tauopati, spesielt

15 AD), på grunn av alder, arvelige, eller andre faktorer for hvem et kurs i behandling er medisinsk anbefalt for å forsinke starten eller utviklingen eller forverringen eller forringelsen av symptomene eller tegnene på sykdom.

[0038] "Statistisk signifikante kognitive fordeler" betyr at det er kognitive fordeler (*f.eks. forbedring eller reduksjon i nedgangen av kognitiv funksjon*), etter en

20 periode på 6 måneder til ett år med behandling av minst 10 % eller mer av de evaluerte pasientene, mer foretrukket minst 25 % eller flere pasienter, og enda mer foretrukket 50 % eller mer av pasientgruppen. Fortrinnsvis vurderes forbedringen med en rate sammenlignet med en kontrollgruppe og reflekterer en minimum 10 % forbedring (*f.eks. som evaluert basert på sammenlignende testpoeng mellom placebo og kontroll*,

25 der "forbedring" er ment å inkludere reduksjon i nedgang i pasientens tilstand), mer foretrukket en forbedring der en rate på mer enn 25 % eller mer er observert, og mest foretrukket, med en rate på 35 % eller mer.

[0039] "Tau-assosiert sykdom" som definert i dette dokumentet betyr sykdommer forbundet med abnormiteter i Tau samt sykdommer som er "tauopatier." Tau-assosierte

30 sykdommer er AD, og frontotemporal demens med parkinsonisme knyttet til kromosom 17 (FTDP-17), progressiv supranukleær parese, kortikobasal degenerasjon, Picks sykdom, agyrophilic grain disease, Downs syndrom, myoton dystrofi, Niemann-Picks C-sykdom, demens Pugilistica, Blint-sykdom og traumatisk hjerneskade.

[0040] "Tauopati" som definert i dette dokumentet betyr en nevrodegenerativ sykdom

35 forbundet med fibrillære former av Tau-protein (floker) i hjernen. Disse sykdommene inkluderer AD; imidlertid inkluderer andre tauopatier, men er ikke begrenset til, frontotemporal demens, inkludert undertypen av frontotemporal demens og parkinsonisme knyttet til kromosom 17 (FTDP-17), progressiv supranukleær parese, kortikobasal degenerering, Picks sykdom, og agyrophilic grain disease.

[0041] "Terapeutisk effektiv mengde av epotilon D" betyr en mengde av epotilon D som er tilstrekkelig til:

(1) å bedre eller lindre minst ett symptom på en Tau-assosiert sykdom (fortrinnsvis en tauopati, og mer foretrukket AD), inkludert kognitive funksjoner, slik som demens, hukommelsessvikt, redusert forståelse, og bevegelighet i å utføre daglige gjøremål, og/eller sentralt-medierte effekter, slik som motoriske feil og syn; og/eller

(2) omvende, redusere, forebygge, hemme eller forsinke starten eller forverringen av tap av kognitiv funksjon forbundet med en Tau-assosiert sykdom (fortrinnsvis en tauopati, og mer foretrukket, AD), og/eller omvende, redusere, forebygge, hemme eller forsinke starten eller forverringen av én eller flere sentralt formidlede effekter av sykdommen, inkludert motoriske feil, syn, og så videre. I foretrukne utførelsesformer av oppfinnelsen er den epotilon D-farmasøytiske forbindelsen terapeutisk effektiv til ikke bare å bedre eller lette symptomene av den Tau-forbundne sykdommen (fortrinnsvis en tauopati og mer foretrukket AD), men også effektiv til å ha en virkning på den underliggende sykdommen (*dvs.* som definert ovenfor).

Alternative utførelsesformer.

[0042] De foreliggende oppfinnerne har funnet at epotilon D, administrert for behandling av en Tau-forbundet sykdom, oppnår en overraskende grad av hjernepenetrasjon, lang hjernehalveringstid, og selektiv retensjon, spesielt sammenlignet med andre mikrotubulstabilisatorer. Oppfinnerne har videre oppdaget at bemerkelsesverdige, økte terapeutiske virkninger ved behandling av Tau-forbundne sykdommer (særlig tauopatii, og mer spesielt, AD), oppnås med lave doser av epotilon D. Som sådan kan en relativt lav dose av epotilon D administreres for effektiv behandling av en Tau-assosiert sykdom, fortrinnsvis AD. Oppfinnerne har dermed utviklet en fremgangsmåte for behandling av Alzheimers sykdom som benytter administrering av epotilon D til en pasient med Alzheimers sykdom. Fremgangsmåten er forventet å være terapeutisk effektiv ved behandling av AD i humane pasienter og samtidig utgjøre betydelig mindre alvorlige eller færre bivirkninger sammenlignet med bivirkningene som vanligvis oppstår når mikrotubulstabilisatorer administreres til humane pasienter for kjemoterapi. Slike bivirkninger som er redusert eller eliminert, kan inkludere én eller flere av gastrointestinale plager (inkludert, men ikke begrenset til, kvalme, diaré, stomatitt/mukositt, oppkast, anoreksi, forstoppelse og/eller magesmerter), levertoksisitet, nøytropeni, leukopeni, myelosuppresjon, alopeci, myalgi/leddsmarter, tretthet, muskel-skjelettsmerter, neglforstyrrelse, feber, hodepine, hudpeeling, og/eller nevrosensoriske effekter på ulike nivåer.

[0043] I henhold til en alternativ utførelsesform er det tilveiebrakt en terapeutisk effektiv mengde av epotilon D for anvendelse ved behandling av Alzheimers sykdom, der epotilon D-forbindelsen har to eller flere egenskaper valgt fra god

hjernepenetrasjon, en lang hjerne halveringstid, og en høy selektiv retensjonsgrad, som definert i dette dokumentet, mer foretrukket, der epotilon D demonstrerer alle tre egenskapene av god hjernepenetrasjon, lang hjernehalveringstid, og en selektiv retensjonsrate, slik disse begrepene er definert i dette dokumentet.

5 **[0044]** Ifølge en annen utførelsesform er det tilveiebrakt en terapeutisk effektiv mengde av epotilon D for anvendelse i behandling av Alzheimers sykdom, der epotilon-D-forbindelsen ved administrering har egenskaper valgt fra to eller flere av:

- hjernepenetrasjon på 0,5 eller større, mer foretrukket 0,8 eller større, mest foretrukket 1 eller høyere, som målt 20 min. til 1 t etter dosering; og/eller
- 10 • en hjernehalveringstid på minst 24 t, og mer foretrukket på minst 30 t, og mest foretrukket opptil 40 t eller mer; og/eller
- en hjerne-leverselektiv retensjonsgrad på minst 4 etter 24 t eller mer etter dosering, mer foretrukket ved en rate på 6 eller mer etter 24 timer eller mer, og mest foretrukket, ved en faktor på 8 eller mer 24 eller flere timer etter dosering.

15 **[0045]** Ifølge en annen utførelsesform er det tilveiebrakt en terapeutisk effektiv mengde av epotilon D for anvendelse ved behandling av Alzheimers sykdom, der epotilon-D-forbindelsen ved administrering har egenskaper valgt fra alle tre:

- hjernepenetrasjon på 0,5 eller høyere, mer foretrukket 0,8 eller høyere, mest foretrukket 1 eller høyere, som målt 20 min. til 1 t etter injeksjon; og/eller
- 20 • en hjernehalveringstid på minst 24 t, og mer foretrukket på minst 30 t, og mest foretrukket opptil 40 t eller mer; og/eller
- en hjerne-lever selektiv retensjonsrate på minst 4 24 timer eller mer etter dosering, mer foretrukket, ved en rate på 6 eller mer etter 24 timer eller mer, og mest foretrukket ved en faktor på 8 eller mer etter 24 timer eller flere timer etter dosering.

[0046] Ifølge en annen utførelsesform er det tilveiebrakt en terapeutisk effektiv mengde av epotilon D for anvendelse i behandling av Alzheimers sykdom, uten å forårsake legemiddelinduserte bivirkninger og/eller legemiddel-plasmakonsentrasjonsnivåer som ville kreve anvendelse av behandlingen for å kunne stoppes.

30 **[0047]** Ifølge en annen utførelsesform er det tilveiebrakt en terapeutisk effektiv mengde av epotilon D for anvendelse i behandling av Alzheimers sykdom og gir kognitive fordeler, mer foretrukket, statistisk signifikante kognitive fordeler, i behandling av AD, uten å forårsake legemiddelinduserte bivirkninger og/eller legemiddelplasmakonsentrasjonsnivåer som ville kreve behandling for å kunne stoppes.

35 **[0048]** Ifølge en annen utførelsesform er det tilveiebrakt en terapeutisk effektiv mengde av epotilon D for anvendelse i behandling av Alzheimers sykdom, der behandlingen har en virkning på den underliggende sykdommen, mer foretrukket en

statistisk signifikant virkning på den underliggende sykdommen, uten å forårsake legemiddelinduserte bivirkninger og/eller legemiddelplassmakonsentrasjonsnivåer som ville kreve stopp av behandlingen.

[0049] Ifølge en annen utførelsesform er det tilveiebrakt en terapeutisk effektiv
 5 mengde av epotilon D for anvendelse i behandling av Alzheimers sykdom, der behandlingen har en virkning på underliggende sykdommer, gir kognitive fordeler, og/eller på annen måte er terapeutisk effektive, uten å forårsake bivirkninger som gastrointestinale bivirkninger, leukopeni, og/eller nevrotoksisitet, som ville kreve behandlingen for å kunne stoppes.

[0050] Ifølge en annen utførelsesform er det tilveiebrakt en terapeutisk effektiv
 10 mengde av epotilon D for anvendelse i behandling av Alzheimers sykdom, en terapeutisk effektiv mengde av epotilon D til en pasient, der dosen av epotilon D er en lav dose, som definert i dette dokumentet.

[0051] Ifølge en annen utførelsesform er det tilveiebrakt en terapeutisk effektiv
 15 mengde av epotilon D for anvendelse i behandling av Alzheimers sykdom, der dosen av epotilon D er mellom 0,001 - 10 mg/m² eller alternativt, i en dose på mellom 0,00003-0,3 mpk, administrert på en daglig, ukentlig eller intermittert doseringssyklus.

[0052] Ifølge en annen utførelsesform er det tilveiebrakt en terapeutisk effektiv
 mengde av epotilon D for anvendelse i behandling av Alzheimers sykdom, der epotilon
 20 D administreres via IV, og dosen av epotilon D over en kumulativ månedlig doseringssyklus (*dvs.* total dose av forbindelse som administreres i løpet av en én måneds syklus, uavhengig av tidsplanen, *f.eks.* ukentlig, to ganger ukentlig, hver 3. uke, 1 uke av osv.) er i området mellom 0,001 - 5 mg/m², mer foretrukket mellom 0,01 - 5 mg/m², enda mer foretrukket mellom 0,01 - 3 mg/m², men enda mer
 25 foretrukket mellom 0,1 - 3 mg/m² og mest foretrukket mellom 0,1 - 1 mg/m².

[0053] Ifølge en annen utførelsesform er det tilveiebrakt en terapeutisk effektiv
 mengde av epotilon D for anvendelse i behandling av Alzheimers sykdom, der epotilon
 D administreres oralt, og dosen av epotilon D beregnet på en daglig basis er i området
 mellom 0,001 - 2 mg/m², mer foretrukket mellom 0,01 - 2 mg/m², enda mer foretrukket
 30 mellom 0,1 - 2 mg/m², men enda mer foretrukket mellom 0,2 - 2 mg/m².

[0054] Ifølge en annen utførelsesform er det tilveiebrakt en terapeutisk effektiv
 mengde av epotilon D for anvendelse ved behandling av Alzheimers sykdom, der
 epotilon D administreres oralt, og dosen av epotilon D for en kumulativ månedlig
 basis (*dvs.* at total dose av forbindelsen administreres over en månedlig syklus,
 35 uavhengig av tidsplanen, *f.eks.* daglig, ukentlig, annenhver uke osv.) er i området mellom 0,03 - 60 mg/m², mer foretrukket mellom 0,30 - 60 mg/m², enda mer foretrukket mellom 3 - 60 mg/m², men enda mer foretrukket mellom 6 - 60 mg/m².

[0055] Ifølge en annen utførelsesform er det tilveiebrakt en terapeutisk effektiv
 mengde av epotilon D for anvendelse ved behandling av Alzheimers sykdom, der

epotilon D administreres oralt i en doseringsplan valgt fra én gang daglig, én gang i uken, en gang annenhver uke eller én gang i måneden.

[0056] Ifølge en annen utførelsesform er det tilveiebrakt en terapeutisk effektiv mengde av epotilon D for anvendelse i behandling av Alzheimers sykdom, der epotilon D administreres oralt i en doseringsplan valgt fra én gang daglig, og der den daglige dosen av epotilon D er mellom 0,2 til 2 mg/m².

[0057] Ifølge et annet aspekt av beskrivelsen kan epotilon D anvendes for behandling av de andre tauopatiene, foruten AD, nevnt i det ovenstående i henhold til hvilken som helst av de ovenfor nevnte utførelsesformene. Dermed omfatter en utførelsesform av oppfinnelsen anvendelse av epotilon D, i henhold til hvilket som helst av de ovennevnte utførelsesformene, for å behandle ikke bare AD, men også en sykdom valgt fra frontotemporal demens med parkinsonisme knyttet til kromosom 17 (FTDP-17), progressiv supranukleær parese, kortikobasal degenerasjon, Picks sykdom, og agyrophilic grain disease, Downs syndrom, myoton dystrofi, Niemann-Picks C-sykdom, demens Pugilistica, Blint-sykdom og/eller traumatisk hjerneskade. En foretrukket utførelsesform omfatter epotilon D, i henhold til hvilken som helst av utførelsesformene beskrevet i dette dokumentet, for anvendelse for å behandle en sykdom valgt fra AD, frontotemporal demens med parkinsonisme knyttet til kromosom 17 (FTDP-17), progressiv supranukleær parese, kortikobasal degenerering, Picks sykdom og agyrophilic grain disease.

[0058] Ifølge en annen utførelsesform er det tilveiebrakt epotilon D, for anvendelse ved behandling av en Tau-assosiert sykdom som definert ovenfor i dette dokumentet, mer foretrukket, en tauopati, mest foretrukket AD.

[0059] Det er offentliggjort at hver av de ovennevnte nye medisinske anvendelsene også kan kombineres med én eller flere andre nye medisinske anvendelser, og alle slike ulike kombinasjoner av de ovennevnte nye medisinske anvendelsene er påtenkt i dette dokumentet. For eksempel kan en kombinasjon av de ovennevnte nye medisinske anvendelsene inkludere en terapeutisk effektiv mengde av epotilon D for anvendelse ved behandling av Alzheimers sykdom, der epotilon D er terapeutisk effektiv ved behandling av AD i pasienten uten å forårsake medisinduserte bivirkninger og/eller legemiddelplasmakonsentrasjonsnivåer som vil kreve anvendelse av behandlingen for å bli avviklet; og der dosen av epotilon D er en kumulativ månedlig dose på mellom 0,001 - 5 mg/m², administrert via IV; og/eller der dosen av epotilon D er mellom 0,001 til 2 mg/m², administrert PO daglig; og/eller der dosen av epotilon D er valgt fra en dose innen hvilken som helst av de foretrukne områdene uttrykt ovenfor for oral eller intravenøs administrering.

[0060] Det er også offentliggjort at en hvilken som helst av de nevnte medisinske anvendelsene kan kombineres med den utførelsesformen som involverer epotilon D, for anvendelse i behandling av en tauopati, fortrinnsvis AD, i en human pasient. Derfor

ville f.eks. en utførelsesform som omfatter en kombinasjon av de ovennevnte alternative utførelsesformene omfatte epotilon D for behandling av AD, der anvendelsen er terapeutisk effektiv ved behandling av AD, og der epotilon D administreres til pasienten i en dose på mellom 0,001 - 10 mg/m² eller alternativt i en dose på mellom 0,00003-0,3 mpk, administrert på en daglig, ukentlig eller intermittert doseringssyklus. Nok en annen utførelsesform ville omfatte epotilon D, for behandling av en tauopati, særlig AD, der epotilon D administreres til en human pasient ved en lav dose, og er terapeutisk effektiv i å ha en virkning på den underliggende sykdommen og/eller gi kognitive fordeler.

[0061] Ifølge en annen utførelsesform er det tilveiebrakt en farmasøytisk formulering som omfatter epotilon D som er egnet for administrering til en human pasient som har behov for behandling av en Tau-assosiert sykdom som definert ovenfor i dette dokumentet, fortrinnsvis en tauopati, mer foretrukket, AD, der administrering av formuleringen er terapeutisk effektiv ved behandling av sykdommen hos pasienten, uten å forårsake legemiddelinduserte bivirkninger og/eller legemiddelplasma-konsentrasjonsnivåer som ville kreve anvendelse av epotilon-D-formuleringen for å bli avviklet.

[0062] I henhold til enda en annen utførelsesform er det tilveiebrakt en farmasøytisk formulering som omfatter epotilon D egnet for administrering til en human pasient for behandling av en Tau-assosiert sykdom som definert ovenfor i dette dokumentet, fortrinnsvis en tauopati, mer foretrukket AD, der administrering av formuleringen gir statistisk signifikante kognitive fordeler i behandling av sykdommen, uten å forårsake legemiddelinduserte bivirkninger og/eller legemiddelplasmakonsentrasjonsnivåer som ville kreve anvendelse av epotilon-D-formuleringen for å bli avviklet.

[0063] I henhold til enda en annen utførelsesform er det tilveiebrakt en farmasøytisk formulering omfattende epotilon D som er egnet for administrering til en human pasient for behandling av en Tau-assosiert sykdom som definert ovenfor i dette dokumentet, fortrinnsvis en tauopati, mer foretrukket AD, der formuleringen er effektiv i å gi en virkning på den underliggende sykdommen, uten å forårsake legemiddelinduserte bivirkninger og/eller legemiddelplasmakonsentrasjonsnivåer som ville kreve anvendelse av epotilon-D-formuleringen for å avvikles.

[0064] I henhold til enda en annen utførelsesform er det tilveiebrakt en farmasøytisk formulering egnet for administrering til en human pasient for behandling av en Tau-assosiert sykdom som definert ovenfor i dette dokumentet, fortrinnsvis en tauopati, mer foretrukket, AD, der formuleringen omfatter en doseringsenhet av epotilon D på mellom 0,0001 - 10 mg/m², mer foretrukket mellom 0,001 - 5 mg/m², mer foretrukket mellom 0,001 - 3 mg/m², enda mer foretrukket mellom 0,001 - 11 mg/m², og mest foretrukket mellom 0,001 - 0,5 mg/m².

[0065] I henhold til enda en annen utførelsesform er det tilveiebrakt en farmasøytisk

formulering for administrering til en human pasient, der formuleringen omfatter epotilon D i et farmasøytisk akseptabelt løsningsmiddelsystem omfattende fra omtrent 0 til 50 % propylenglykol, omtrent 1 til 10 % TPGS, omtrent 0,5 til 10 % etanol, omtrent 0-90 % vann, og/eller 5 til 85 % PEG, som f.eks. PEG-400.

- 5 **[0066]** Kombinasjon av hver av de ovennevnte farmasøytiske formuleringene er også offentliggjort i dette dokumentet.

NYTTE

Tauopatier

- 10 **[0067]** Tauopatier er nevrodegenerative sykdommer forbundet med unormale former for Tau-protein i hjernevev. Alzheimers sykdom (AD) var den første nevrodegenerative sykdommen å bli identifisert som å implisere Tau-dysfunksjon. Særlig nevrofibrillære floker – nærværet av dette er ett av kjennetegnspatologiene i AD - ble funnet å inneholde fibrillære, hyperfosforylerte, konformasjonelt endrede former
- 15 av Tau-proteinet. Deretter ble andre tauopatier identifisert, inkludert frontotemporal demens og parkinsonisme knyttet til kromosom 17 (FTDP-17), progressiv supranukleær parese, kortikobasal degenerering, Picks sykdom og agyrophilic grain disease. I tillegg har en link med Tau-abnormiteter (inkludert hyperfosforylert Tau, Tau-aggregater, og/eller en forbindelse med H1/H1-Tau-haplotypen) blitt forbundet
- 20 med Parkinsons sykdom, Downs syndrom, post-encefalisk parkinsonisme, myoton dystrofi, Niemann-Picks C sykdom, demens Pugilistica, Blint-sykdom, prionsykdommer, amyotrofisk lateral sklerose, Parkinsonisme-demenskompleks av Guam, multippel sklerose, glaukom, diabetisk retinopati og traumatisk hjerneskade (Avila et al. 2004; Bartosik-Psujek et al. 2006; Dickey et al. 2006; Wostyn et al. 2008).
- 25 **[0068]** Tau er et 50 til 75 kDa mikrotubulforbundet protein (MAP) som binder og stabiliserer mikrotubuli (MT-er). Det er seks primære sekvensvarianter av Tau, og disse variantene dannes av alternativ spleising (Lace et al. 2007). Skjøtevariantene inneholder null, ett eller to (0N, 1N eller 2N) N-terminale innsetninger i kombinasjon med enten tre gjentakelser (3R) eller fire gjentakelser (4R) av et mikrotubulibindende
- 30 domene. De gjentakende domenene er nødvendige for mikrotubulstabilisering, mens prolinrike regioner på hver side av de gjentakende domenene er nødvendig for binding til mikrotubuliene (Preuss et al. 1997). De gjentakende domenene og de prolinrike regionene fosforyleres av flere kinaser, som fører til dissosiasjon av Tau fra mikrotubuli. N-enden av Tau strekker seg bort fra mikrotubuloverflaten, der det antas å
- 35 hjelpe til å bestemme avstanden mellom mikrotubuliene og i binding av motorproteinet dynaktin til mikrotubuliene (Magnani et al. 2007). I normale celler er det omtrent like nivåer av 3R Tau og 4R Tau til stede. 4R Tau binder tettere til mikrotubuliene enn det 3R Tau gjør.
- [0069]** Tau er mest tallrike i nevroner der det hovedsakelig er lokalisert til aksoner.

Tau er det store mikrotubuli-assosierte proteinet i nevronale aksoner, mens MAP1-familien er meget utbredt i nevroner, og MAP2-familien er overveiende somatodendritisk. Tau stabiliserer aksonale mikrotubuli, og legger dermed til rette for transport av proteiner, organeller, lipider, cellulære komponenter målrettet for nedbrytning, og cellesignalmolekyler begge veier mellom cellekroppen og de synaptiske terminalene. Tau-dysfunksjon kan forstyrre aksonal trafikk og dermed påvirke nevronal funksjon og overlevelse. Tau-genet kan bli slått ut i mus med milde konsekvenser, men hvis både Tau- og MAP 1B-genene er fjernet, dør de doble knockoutmusene som embryoer. Det ser ut til at endringer i uttrykket av noen MAP-er kan erstatte hverandre i mange tilfeller, inkludert utvikling (Avila et al. 2004).

[0070] I noen tilfeller forårsaker mutasjoner i genet som koder for Tau (noen ganger kalt MAPT) tauopatier, spesielt i FTDP-17 og andre frontotemporale demenser. Mange FTDP-17-mutasjoner minsker binding til mikrotubuli *in vitro* og/eller øker deres tilbøyelighet til å danne fibriller (Lace et al. 2007). Andre tauopati-assosierte mutasjoner endrer spleisemønsteret av Tau for å generere hovedsakelig 3R eller 4R Tau. Enda en annen klasse av Tau-mutasjoner på N-enden forandrer evnen til å binde til dynaktin (Magnani et al. 2007). Alle disse mutasjonene har potensiale til å forstyrre normale funksjoner av Tau. I tilfellet med AD er det tenkt at β -amyloid ($A\beta$) fører til abnormiteter i Tau.

[0071] Selv om floker og andre Tau-aggregater er et patologisk trekk ved tauopatier tyder flere linjer av bevis på at en annen, løselig, uidentifisert form for unormal Tau er nevrotoksisk. Dataene som tyder på at Tau samlet i neurofibrillære floker ikke er direkte patogene inkluderer observasjoner av menneskehjerner og musemodeller. For eksempel har undersøkelse av ulike regioner og sykdomsstadier av Alzheimers sykdomshjerner ført til den konklusjonen at nevroner kan overleve og fungere med neurofibrillære floker i flere tiår (Morsch et al. 1999). Likeledes har menneskelige Tau (hTau)-transgene mus floker og alvorlig neurodegenerering, men nevronene med floker viser ikke selektive tegn på stress og er for få i antall for å redegjøre for det dramatiske tapet i nevroner observert i denne modellen (Andorfer et al. 2005). Tg4510, en induserbar Tau-transgenlinje, viser dramatisk og rask flokedannelse, neurodegenerering, og atferdsmessige underskudd når Tau-P301L er indusert (Santacruz et al., 2005). Når Tau-P301L-uttrykkingen undertrykkes, reduseres neurodegenerering og kognitiv svikt sterkt, men flokedannelsen fortsetter. Flere studier som anvender disse musene viser at løselige Tau-multimerer korrelerer med kognitiv svikt. Lignende Tau-multimerer er også observert i FTDP-17- og AD-hjernevev (Berger et al. 2007). Til slutt ble bevis for ikke-fibrillær Tau involvert i adferdsmessige mangler i AD oppnådd ved anvendelse av transgen musoveruttrykking, en mutant form for β -amyloidforløperprotein (APP) (Roberson et al., 2007). Når disse APP-musene ble kryssset med Tau-knockoutmus ble det dannet amyloid plakk, men atferdsmessige mangler og synaptiske

abnormiteter ble forhindret. I denne APP-linjen kunne ikke Tau-abnormiteter påvises i nærvær av synaptiske og adferdsmessige mangler. Til sammen viser disse studiene at en løselig, uidentifisert form for unormal Tau sannsynligvis er de nevrotoksiske artene.

5 Mikrotubulstabilisering for behandling av tauopatier

[0072] Det er to hovedhypoteser for rollen til Tau i nevrodegenerativ sykdom. En hypotese tar for gitt at unormale former for Tau forstyrrer cellefunksjonen, mens den andre hypotesen tar for gitt at tap av funksjonell Tau fører til mikrotubuldestabilisering (Avila et al. 2004; Lace et al. 2007.). Den er basert på den andre hypotesen at mikrotubulstabilisatorer har blitt foreslått som terapier for å behandle tauopatier (Lee et al. 1994; U.S. patent nr. 5,580,898). Upassende forstyrrelser i aksonal trafikk har blitt innblandet i en rekke sykdommer i tillegg til de som er identifisert med abnormiteter i Tau. Disse inkluderer Huntingtons sykdom, Lewy-legemedemens, Charcot-Marie-Tooth sykdom, arvelig spastisk paraplegi og multipel systematrofi (Roy et al. 2005).

[0073] For å teste om mikrotubulstabilisatorene kunne dra fordel av mus som overuttrykker Tau, ble PrP T44 Tau-transgene mus behandlet med paklitaksel (Zhang et al., 2005). PrP T44-mus overuttrykker normalt humant 0N3R Tau i ryggmargs-nevroner og utvikler dermed motoriske mangler på grunn av Tau-overuttrykkingen. Paklitakselbehandling i 3 måneder reduserte motorisk dysfunksjon og økte mikrotubultall og aksonal transport i de ventrale røttene i ryggmargen. Selv om paklitaksel er dårlig CNS-gjennomtrengende, var den i stand til å påvirke de efferente aksonene fra nevroner i ventralhornet av ryggmargen som er utenfor blod-hjernebarrieren. Det er interessant at Tau-patologi i denne modellen (sfæroider) var upåvirket. Ettersom denne modellen ikke viser nevralt tap, kunne ikke effekten av mikrotubulstabilisatorene på nevralt overlevelse vurderes. I tillegg er det uklart om de observerte motorfordelene i ryggmargtauopaien ville omdannes til kognitive fordeler i en kortikal-hippokampustauopati. For eksempel ble de motsatte resultatene observert med kryssingen av to forskjellige tauopatitransgene muselinjer til transgene mus som overuttrykker glykogensyntasekinase 3 (Gsk3). I ryggmargstauopatimodellen hadde de Tau-gsk3-bigeniske dyrene redusert patologi, mens i hjernetauopatimodellen viste de Tau-Gsk3-bigeniske dyrene økt patologi (Spittaels et al. 2000; Terwel et al 2008.).

[0074] Mikrotubulstabilisering er tilbudt som en forklaring på effektene av NAP, et peptid av sekvensen NAPVSIPQ, i flere dyremodeller. Spesielt har NAP nevrotrofiske, anti-inflammatoriske, anti-apoptotiske og nevrobeskyttende aktiviteter i mange cellulære modeller og *in vivo*-modeller, inkludert middels cerebrolarterieokklusjon (slagmodellen), hodeskade, kolinotoksiske lesjoner, aldring og utviklingsmessige mangler i føtalt alkoholsyndrom og apolipoprotein-E-mangelfulle mus (Gozes et al. 2006; Gozes 2007). Som for tauopatier rapporteres NAP-administrering i 3 eller 6

måneder å redusere A β -nivåer, hyperfosforylert Tau, og sarkosyluløselig Tau og samtidig øke løselig Tau i 3xTg-mus (Matsuoka et al. 2007; Matsuoka et al. 2008). 3xTg-mus overuttrykker APP og Tau-P301L (Oddo et al. 2003). Mekanismen for NAP-aktiviteten er ikke fullstendig klarlagt, men det er bevis på, basert på binding av tubulin til en NAP-affinitetskolonne og effekter på mikrotubuldannelse og/eller stabilisering i dyrkede nevroner, at NAP binder til mikrotubuler (Divinski et al. 2006). NAP er også kjent for å hemme A β -aggregering, slik at det kan opptre oppstrøms for Tau i 3xTg-modellen. NAP er ikke sannsynlig å opptre som et typisk mikrotubuli-stabiliserende middel, ettersom det er i stand til å beskytte mot paklitakselindusert perifer nevropati hos rotter (US-patentsøknad, publikasjon nr. 2006/0247168 A1). Når mikrotubulstabiliserende midler, som f.eks. paklitaksel, administreres i høye, kjemoterapeutiske doser, forekommer ofte en perifer nevropati (Postma et al. 1999) som antas å resultere fra over-stabiliseringen og bunten av mikrotubuli i perifere nerver. Ettersom NAP hindrer paklitaksel-indusert perifer nevropati hos rotter, er paklitaksel og NAP usannsynlig å virke gjennom identiske mekanismer.

[0075] Det er også antydninger om at mikrotubulstabilisatorer kunne ha nevrobeskyttende effekter som ikke er relatert til åpenbar Tau-dysfunksjon. Mikrotubulstabiliserende forbindelser beskytter dyrkede nevroner fra flere giftige fornærmelser, inkludert A β 42, oksidativ belastning fra løselig A β 40, lysosomalt avbrudd, kalsiumindusert toksisitet, og glutamatindusert toksisitet (Burke et al. 1994; Furukawa 1995; Sponne et al. 2003; Michaelis et al. 2005; Butler et al. 2007). Det er en hypotese at mikrotubuli spiller en viktig rolle, ikke bare i transportmekanismer, men også i regulering av celledisorganisering, særlig kalsiumsignalisering, eventuelt gjennom forankring av makromolekylære signaleringskomplekser i nærheten av plasmamembranen (Michaelis et al. 2005). Mikrotubulstabiliseringsmidler har også vist seg å forbedre mitokondriefunksjonen ved å redusere reaktiv oksygenartgenerering og øke uttrykking av de oksidative fosforyleringsgenene som er involvert i ATP-produksjonen (Wagner et al. 2008). Mikrotubulstabiliserende midler er også kjent for å bredt påvirke celledisorganisering under avbrudd av den mitotiske spindelen i kreftceller (Bergstralh et al. 2006).

Hjernegjennomtrengende mikrotubulstabilisatorer

[0076] Det terapeutiske målet for mikrotubulstabilisatorer for tauopatier og andre nevrodegenerative sykdommer er mikrotubuler i hjernen. Imidlertid kan mikrotubulstabilisatorer forårsake toksisitet i perifere vev, som f.eks. hemming av celleproliferasjon, spesielt i mage-tarmkanalen og hematopoetiske celler, og perifer nevropati. Det er dermed meget ønskelig å identifisere mikrotubulstabilisatorer med utmerket hjernepenetrasjon og selektiv retensjon i hjernen sammenlignet med perifere vev, for å maksimere den terapeutiske indeksen for tauopatier og andre nevrodegene-

relative sykdommer. Forbindelsenes evne til å binde med en lengre halveringstid til hjernevevet i forhold til perifert vev er en svært ønskelig egenskap.

[0077] Taksanserien av mikrotubulstabilisatorer er substrater av flere multilegemiddelresistenstransportører, slik som P-glykoprotein (PGP), ATP-bindende kassett, flerlegemiddelsresistensprotein, og brystkreftmotstandsprotein. Disse flerlegemiddelresistenstransportørene hindrer forbindelser fra å akkumulere seg i tumor og hjernevev. Flere laboratorier har jobbet for å syntetisere taksaner som ikke er substrater for flerlegemiddelresistenstransportører, særlig PGP, med begrenset suksess (Minderman et al. 2004; Rice et al. 2005; Ballatore et al. 2007). Det er også gjort forsøk på ko-administrering av en PGP-hemmer med paklitaksel (Fellner et al. 2002). Disse forsøkene har vist resultatene av en taksaninntreden i hjernen for å oppnå, for eksempel, omtrent 1/30 av nivåene av paklitaksel i hjernen som i nyrene med en PGP-hemmer, eller hjernenivåene i μM -området med KU-237, men bare i 4 timer etter administrering (Michaelis 2006). Derfor er ikke anvendelse av PGP-hemmere bare en attraktiv metode for å øke hjernepenetrasjon av taksaner.

FREMGANGSMÅTER FOR FREMSTILLING OG FORMULERINGER

[0078] Epotilon D er en kjent forbindelse som er blitt kjemisk syntetisert *de novo*, og også er blitt isolert fra fermenteringer av *Sorangium cellulosum*-stammer som mindre produkter i fermenteringen av *S. cellulosum*. Total syntese av epotilon D er rapportert i US-patent nr. 6,242,469 til Danishefsky et al., og ytterligere fremgangsmåter for fremstilling av epotilon D og andre epotilonforbindelser kan finnes i US patent. nr. 6,204,388, 6,288,237, 6,303,342; WO 03/072730, U.S. patent. nr. 6,410,301; U.S. patentsøknad publikasjon nr. 2002/0137152A1; U.S. patent. nr. 6,867,333, U.S. patentsøknad publikasjon nr. 2006/004065. Syntetiske metoder for fremstilling av epotilon D har blitt karakterisert som upraktisk for fullskalafarmasøytisk utvikling. En alternativ fremstillingsmetode er å drive storskalafermentering av epotilon B, for eksempel, som beskrevet i US-patent nr. 7,172,884 B2, med anvendelse av forbedrede stammer utformet for å gi forholdsvis store utbytter av epotilon B, og epotilon B kan de-epoksideres for å gi epotilon D. Fremgangsmåter for de-epoksidering er godt kjente, men kan også bli funnet i US-patent nr. 6,965,034 (WO 99/43653), til Danishefsky et al., særlig som anvendt på epotilon D.

[0079] Ytterligere fremgangsmåter for fremstilling av epotilon D er fremsatt i US-patent nr. 6,998,256 B2 og 7,067,286, "*Methods of Obtaining Epothilone D using Crystallization and/or By the Culture of Cells in the Presence of Methyl Oleate*", som beskriver den biosyntetiske produksjonen av epotilon D ved anvendelse av *Myxococcus xanthus*-stammene K111-40-1 og K111-72.4.4, og/eller andre rekombinante stammer som er blitt utviklet av Kosan Biosciences Inc. (nå BMS), for å forbedre produksjon av

epotilon D. Fermenterings- og renseforhold for fremstilling av epotilon D er også fremsatt i US-patent nr. 6,998,256 B2 og 7,067,286, så vel som U.S.-patent nr. 6,583,290, 6,858,411, 6,921,650, og 7,129,071, hver av disse er tildelt Kosan (nå BMS, den nåværende stedfortrederen). *Se også* Lau et al., Kosan Biosciences, "Optimizing the Heterologous Production of Epothilone D in Myxococcus xanthus," Biotechnology & Bioengineering, 78(3):280-288 (5. mai 2002).

[0080] Enda ytterligere fremgangsmåter som kan anvendes til å lage epotilon D er illustrert i US-patentsøknad m/serienummer 12/118,432. Denne søknaden offentliggjør en kombinasjon av kjemiske og biosyntetiske trinn for å fremstille epotiloner, som f.eks. epotilon D. For eksempel tilveiebringes fremgangsmåter der ett eller flere mellomprodukter som kan anvendes for epotilonsyntese oppnås ved fermentering av rekombinante celler, og deretter omdannes de biosyntetiserte mellomproduktene med anvendelse av rekombinante celler, offentliggjort der, til de endelige epotilon-forbindelsene via kjemisk syntese.

[0081] Epotilon D kan administreres til en pasient på forskjellige måter kjent i teknikken, f.eks. ved intravenøs (IV) administrering, subkutan administrering, oral administrering, og så videre. For eksempel kan epotilon D formuleres med en farmasøytisk akseptabel vehikkel eller fortynningsmiddel. En farmasøytisk sammensetning omfattende epotilon D kan formuleres på klassisk måte ved å anvende faste eller flytende vehikler, fortynningsmidler og additiver som passer til den ønskede administreringsmåten.

[0082] Eksempler på sammensetninger for parenteral administrering innbefatter injiserbare løsninger eller suspensjoner som kan inneholde, for eksempel, egnede ikke-toksiske, parenteralt akseptable fortynningsmidler eller løsningsmidler, slik som mannitol, 1,3-butandiol, vann, Ringers løsning, en isotonisk natriumkloridløsning (0,9 % natriumkloridinjeksjon [normalt salt] eller 5 % dekstroseinjeksjon), eller andre egnede dispergerende eller fuktende og suspenderende midler, inkludert syntetiske mono- eller diglyserider, og fettsyrer. Farmasøytisk akseptable sammensetninger og/eller fremgangsmåter for administrering av forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan inkludere anvendelse av ko-løsningsmidler inkludert, men ikke begrenset til, etanol, N,N-dimetylacetamid, propylenglykol, glyserol og polyetylenglykoler, f.eks. polyetylenglykol 300 og/eller polyetylenglykol 400. Surfaktanter (farmasøytisk akseptabelt overflateaktivt middel) kan anvendes til å øke en forbindelses spredende eller fuktende egenskaper ved å redusere dens overflatespenning, inkludert uten begrensning, d- α -tokoferylpolyetylenglykol-1000-suksinat (TPGS), Cremophor, Solutol HS 15, polysorbat 80, polysorbat 20, poloksamer, pyrrolidoner, slik som N-alkylpyrrolidon (f.eks. N-metylpyrrolidon) og/eller polyvinylpyrrolidon; imidlertid har anvendelsen av Cremophor ulemper og er ikke foretrukket. Formuleringen kan også omfatte anvendelse av én eller flere "buffere" (f.eks. en bestanddel som meddeler

en evne til å motstå endringer i den effektive surheten eller alkaliteten av et medium ved tilsetning av inkremerter av en syre eller base), inkludert, uten begrensning, natriumfosfat, natriumcitrat, dietanolamin, trietanolamin, L-arginin, L-lysin, L-histidin, L-alanin, glysin, natriumkarbonat, trometamin (a/k/a tris(hydroksymetyl)aminometan eller Tris), og/eller blandinger av disse.

[0083] Formuleringer for administrering av epotilonforbindelser, inkludert formuleringer som unngår anvendelse av ikke-ioniske surfaktanter, slik som Cremophor, er beskrevet i teknikkens stand. For eksempel er en formulering for anvendelse ved intravenøs administrering som omfatter en blanding av propylenglykol og etanol beskrevet i US-patent nr. 6,683,100. Ytterligere formuleringer kan omfatte blandinger av polyetylenglykol/dehydrert alkohol eller propylenglykol eller glyserol/dehydrert alkohol. F.eks. offentliggjør WO 2006/105399 (PCT/U52006/011920) til BMS formuleringer som inkluderer blandinger av omtrent 30 til 70 volumprosent dehydrert alkohol for hver 30 til 70 volumprosent PEG 300 og/eller PEG 400, som kan fortynnes med saltløsnings- eller dekstroseinfusjonsvæsker for intravenøs administrering, og kan påføres for anvendelse i administrering av epotilon D til pasienter via intravenøs administrering. I slike formuleringer er det foretrukket at mengden av etanol minimaliseres for å unngå bivirkninger forbundet med etanoladministreringen. Optimale forhold mellom løsningsmidlene kan lett oppnås av en fagmann på området.

[0084] Ytterligere foretrukne formuleringer spesielt utviklet for å administrere epotiloner D og analoger er offentliggjort i US-patent 7,091,193 (også publisert som US-patentsøknadspublikasjon nr. 2005/0148543), til Kosan (nå BMS). Dette patentet beskriver en formulering der epotilon D og et hydroksypropyl-beta-syklodekstrin er kombinert i en alkohol-vann-løsning som deretter lyofiliseres. Utførelsesformer involverer anvendelse av omtrent 10 mg epotilon D og omtrent 0,4 g hydroksypropyl-beta-syklodekstrin kombinert i en 60 % *tert*-butanol-vann-løsning som deretter lyofiliseres (bestanddelene kan reduseres proporsjonalt for fremstilling av individuelle, lavere doseringsenheter, i henhold til den foreliggende oppfinnelsen). Det lyofiliserte virkestoffet "kake" kan deretter rekonstitueres for IV-administrering ved anvendelse av vann, etanol, og/eller glykol, som kan inkludere propylenglykol, polyetylenglykol 400, polyoksyetylsorbitanmonooleat (solgt under handelsnavnet TWEEN 80), og relaterte oksygenhydrokarboner. Det skal forstås at glykoler med forskjellige kjedelengder og molekylvekter (*f.eks.* polyetylenglykol 1000, andre TWEEN-forbindelser) kan anvendes.

[0085] Som et mer spesifikt eksempel kan en formulering som kan anvendes for å levere epotilon D til en pasient i henhold til oppfinnelsen omfatte omtrent 0 til 50 % propylenglykol, omtrent 1 til 10 % TPGS, omtrent 0,5 til 10 % etanol, omtrent 0-90 %

vann, og/eller omtrent 5 til 85 % PEG, som f.eks. PEG-400. Nærmere bestemt kan en formulering omfatte:

50 % propylenglykol, 10 % TPGS, 10 % etanol, 30 % vann; eller

10 % propylenglykol, 40 % PEG-400, 5 % TPGS, 5 % etanol, 40 % vann; eller

5 85 % PEG-400, 10 % TPGS, 5 % etanol; eller

8,5 % PEG-400, 1 % TPGS, 0,5 % etanol, 90 % vann.

[0086] En foretrukket fremgangsmåte for å administrere epotilon D involverer oral administrering. US-patent nr. 6,576,651 offentliggjør fremgangsmåter for oral administrering av epotiloner med anvendelse av ett eller flere farmasøytisk akseptable syrenøytraliserende buffere. Imidlertid vil en foretrukket administrasjonsmåte innebære anvendelse av en tablett eller kapsel, inkludert en fast tablett eller kapsel eller væske- eller gelatinfylt kapsel. En fast tablett eller kapsel av epotilon D kan fremstilles med ett eller flere enteriske belegg. Enteriske belegg er blitt anvendt i mange år for å stanse frigjøring av legemidlet fra oralt inntagbare doseringsformer. Avhengig av sammensetningen og/eller tykkelsen, er de enteriske beleggene motstandsdyktige mot magesyre for de nødvendige tidsrommene før de begynner å gå i oppløsning og tillate langsom frigjøring av legemidlet i den nedre delen av magen eller den øvre delen av tynntarmen. Eksempler på noen enteriske belegg er offentliggjort i US-patent nr. 6,224,910, 5,225,202, 2,809,918, 3,835,221, 4,728,512 og 4,794,001.

[0087] En enterisk belagt tablett rettet mot anvendelse av epotilon D er beskrevet i US-patentsøknad m/serienummer 11/281,834 som kan anvendes til å formulere tabletter av kapsler av epotilon til å praktisere oppfinnelsen. Denne formuleringen omfatter anvendelse av en inaktiv basepartikkel, som f.eks. en sukkerperle, som den aktive bestanddelen (*dvs.* epotilon D), påføres til, som deretter innkapsles av en enterisk beleggpolymer, og/eller ett eller flere grunningslag. Perlene inkluderes deretter i en kapsel. Enteriske belegg for anvendelse i formulering av epotilon D-tabletter eller kapsler kan omfatte enteriske beleggspolymerer, slik som f.eks. hydroksypropylmetylcelluloseftalat, polyvinylacetatftalat, celluloseacetatftalat, akrylsyrekopolymerer, og metakrylsyrekopolymerer. Et eksempel på en metakrylsyrekopolymer som kan anvendes for å danne et enterisk belegg er EUDRAGIT® L-30-D 55 vandig kopolymerdispersjon, som omfatter en anionisk kopolymer avledet fra metakrylsyre og etylakrylat med et forhold mellom de frie karboksylgruppene til etylestergruppene på omtrent 1:1, og en gjennomsnittlig molekylvekt på omtrent 250.000, som leveres som en vandig dispersjon inneholdende 30 vekt-% faststoffer. EUDRAGIT® L-30-D 55 vandig kopolymerdispersjon leveres av Rohm-Pharma Co., Tyskland.

[0088] Ved fremstilling av enterisk belagte perler for å danne kapsler med epotilon D kan det være ønskelig å inkludere ett eller flere grunningslag som ligger mellom epotilon-D-kjernen og det enteriske belegget for å minimere kontakt mellom disse lagene. For eksempel inkluderer egnede materialer for å danne grunningslaget

stivelse; gelatin; sukkere, slik som sukrose, glukose, dekstrose, melasse og laktose; naturlige og syntetiske gummier, slik som akasie, natriumalginat, metylcellulose, karboksymetylcellulose og polyvinylpyrrolidon-(PVP)-polymerer og kopolymerer, slik som PVP-PVA-kopolymerer; celluloser, slik som etylcellulose, hydroksypropylcellulose og hydroksypropylmetylcellulose; polyetylglykol; og voks. Grunningslaget kan videre omfatte én eller flere myknere, som f.eks. polyetylglykol, propylenglykol, trietylcitrat, triacitin, dietylfталat, tributylsebecat eller kombinasjoner av disse.

[0089] Tabletten eller kapselen av epotilon D kan eventuelt omfatte andre materialer, som f.eks. smaksmidler, konserveringsmidler eller fargemidler som kan være nødvendig eller ønskelig.

[0090] En passende dosering av epotilon D kan bestemmes av en fagmann på området, tatt i betraktning resultatene som er beskrevet i dette dokumentet, sammen med typiske faktorer som kroppsvekten til pasienten, den fysiske tilstanden til pasienten, og så videre. Doseringen bør inneholde epotilon D i en mengde som er effektiv for behandling av Tau-assosierte sykdommer, inkludert tauopatier, som f.eks. AD. Vanligvis anses et område for doseringen av epotilon D administrert for behandling av Tau-assosierte sykdommer (inkludert tauopatier, som f.eks. AD) å være mellom $0,0001 - 10 \text{ mg/m}^2$, mer foretrukket mellom $0,001 - 5 \text{ mg/m}^2$. Andre, mer foretrukne doseringsområder for PO og intravenøs administrering er fremsatt ovenfor i den alternative utførelsesformdelen. Enhetene mg/m^2 , anvendes i dette dokumentet, med henblikk på sammenligning med de kjemoterapeutiske dosene tidligere administrert med epotiloner og deres analoger. Imidlertid kan enhetene mg/m^2 lett omdannes til mpk, tatt i betraktning dyreartene som mottar (eller som har mottatt) legemidlet og pasientens kroppsvekt og/eller høyde. For eksempel, for en human pasient som veier omtrent 70 kg, omdannes doseområdet fra $0,0001 - 10 \text{ mg/m}^2$ til omtrent $0,00003 - 0,3 \text{ mpk}$. Ytterligere informasjon om doseomdanninger kan bli funnet på www.rphworld.com/viewlink-25045.html, og i Freireich et al., Cancer Chemother. Reports, 50(4):219 (1966).

[0091] Legemidlet kan administreres daglig, ukentlig, eller på en intermittent basis. For eksempel kan legemidlet administreres i tre uker på, fulgt av en uke av, eller i to uker på, etterfulgt av én uke av, eller under andre doseringsplaner som kan bestemmes av en fagmann på området. Den valgte bestemte dosen vil avhenge av administreringsmåten og doseringstidsplanen som velges. En foretrukket tidsplan er en én gang daglig oral doseringsplan. Når lengre tidsperioder er foreskrevet mellom hver påføring (typisk tilfellet for IV-administrering), kan hver enhetsdose være større enn når daglige doser er gitt.

[0092] Spesielt var dosen av epotilon D som ble administrert til pasienter for behandling av kreft i visse fase-II-kliniske forsøk 100 mg/m^2 administrert som en

90 minutters infusjon gitt ukentlig i 3 av 4 uker (*dvs.* på dagene 1, 8 og 15, hver 4. uke), etter fase-I-forsøk som involverer doseøkninger på fra 9 til 150 mg/m² for hver dose. Dosen av legemidlet som er påtenkt for behandling av AD er omtrent ti ganger mindre, og mer sannsynlig, omtrent 100 ganger mindre, og i en annen påtenkt

utførelsesform, mer enn 1000 ganger mindre, enn den terapeutiske dosen av epotilon D som ble administrert for behandling av kreftpasienter i kliniske fase II-forsøk, selv om doseringsplanen og administreringsmåten vil påvirke dosen.

[0093] Foreliggende oppfinnelse vil bli forklart i ytterligere detalj ved hjelp av ikke-begrensende eksempler nedenfor, som gjør henvisning til de vedlagte tegningene. De følgende fremgangsmåtene ble anvendt i forsøkene beskrevet i eksemplene som følger beskrivelsen av fremgangsmåtene.

Forsøksfremgangsmåter (eksemplene 1 til 5)

[0094] Opprettelsen av Tg45 10, en aggressiv Tau-transgen muselinje, ble nylig beskrevet (Santacruz et al., 2005; Berger et al., 2007). Tg4510-linjen uttrykte Tau-P301L, en Tau-mutant funnet i FTDP-17, ved hjelp av kalmodulinkinase-II-promotoren. Tg4510-linjen var unik på flere måter:

1. Høyt nivå Tau-uttrykking (13 ganger i forhold til muse-Tau);
2. Tau-uttrykkingen er begrenset til panne- og tinninglappene (og unngår dermed de motoriske manglene som hadde preget tidligere Tau-linjer som uttrykte Tau i ryggmargen); og
3. Rask og omfattende nevrodegenerering (60 % av CA1-nevronene var tapt etter 5,5 måneder) innledet med kognitiv svikt som kan måles etter 4,5 måneder.

Legemiddelfremstilling for Tg4510-studien

[0095] Epotilon D (forbindelse I) ble dosert intraperitonealt med en 26-gauge nål, i 10 % etanol, 90 % vann, 10 ml/kg ved 0 (vehikkel), 1 mpk, og 10 mpk. En 10 x stamløsning ble laget i 100 % etanol og fortynnet like før dosering. Musene ble dosert i 3 kull og dataene ble kombinert for å gi en endelig N på 12, 9, og 15 for henholdsvis vehikkel-, 1 mpk-, og 10 mpk-gruppene. Musene ble dosert i en kjemisk avtrekkshette.

Injeksjons- og atferdstesttidsplan for Tg4510-studien

[0096] Tg4510-musene ble anvendt i denne studien. Disse musene er en godt karakterisert, aggressiv modell av tauopati som overuttrykker human P301L mutant Tau i hjernen (Santacruz et al., 2005; Berger et al., 2007). Musene er preget av ansamlinger av unormale former for Tau, inkludert floker tilsvarende de som er observert i AD-hjernen, adferdsmessige mangler, og til slutt nevronalt tap. Etter 9 uker (+/- 15 dager) ble musene akklimatisert til håndtering med en enkelt narreinjeksjon av fosfatbufret saltløsning, utført innenfor en kjemisk avtrekkshette. Musene ble så huset i

bur holdt innenfor den kjemiske avtrekkshetten i 48 timer. Etter 48-timers perioden ble musene overført til rensebur og brakt til en adferdspakke for testing.

[0097] Musene ble deretter testet i en Morris-vannlabyrint (MWM) i seks dager.

Musene ble fordelt i behandlingsgruppene basert på resultatene av atferdsanalysen ved hjelp av rangpoengene for ringromkryssingsindeksen for probeforsøk 2. Musene var 11 uker (+/- 15 dager) gamle ved oppstart av doseringen og ble dosert én gang ukentlig. Et panel av nevrologiske og fysiske tilbøyelighetstester (modifisert SHIRPA) ble utført etter første uke etter dosering, inkludert analyse av kroppsstilling, skjelving, pelsens utseende, ganglag, berøringsflukt, posisjonspassivitet, lemgrep, og opprettingsrefleks.

Musene ble i tillegg undersøkt 48 timer etter hver ukentlige dose for pelsens utseende, lemgrep, opprettingsrefleks og for en åpenbar stereotypisk atferd. Ingen tegn på åpenbar toksisitet, vekttap, eller motoriske mangler ble observert i løpet av studien.

[0098] Musene ble igjen testet i MWM etter den åttende dosen (19 uker gamle +/- 15 dager) i seks dager. Etter atferdstesting ble doseringen gjenopptatt inntil dyrene var 5,5 måneder gamle på tidspunktet for innhøsting. Dyrene ble huset og behandlet i henhold til standardene til Institutional Care and Animal Use Committee and National Institutes of Health.

Morris-vannlabyrintprotokoll

[0099] Musene ble testet i Morris-vannlabyrint (MWM) ved to anledninger, én gang før dosering, og én gang to måneder etter doseringen begynte. Den andre runden med vannlabyrinttestingen ble utført i et annet testrom. Musene ble akklimatisert til forsøksrommet i 2-3 dager før testingen. Musene ble anbragt i en vannlabyrint på 1,5 m diameter, med en 16 cm diameter plattform plassert 0,5 - 1,0 cm under overflaten av vannet. Vannet ble gjort ugjennomsiktig med ikke-toksisk hvit maling og vann-temperaturen ble regulert mellom 22-25 °C.

[0100] Musene fikk 4 forsøk per dag av opptil 90 sekunder hver med en 10 sekunders hvileperiode på plattformen etter hvert forsøk. Hvis musen ikke fant plattformen i løpet av 90 sekunder, ble musen forsiktig ledet til plattformen og tillatt å forbli der i 10 sekunder. Testrommene hadde store eksterne signaler for å tillate musene å orientere seg mens de lærte plasseringen av plattformen. Musene ble plassert under en varmelampe for å hindre hypotermi etter hvert forsøk. Intervallet mellom forsøkene varierte fra 25 til 45 minutter. Musene ble sporet ved hjelp av HVS Image Advanced Tracker VP200-programmet (Buckingham, UK) og den totale distansen du går gjennom inntil du kommer til den bestemte plattformen.

[0101] Statistisk analyse for ervervelsesveiledningen fra de fem forsøkene involverte gjentatte tiltak av variansanalyse. Den statistiske modellen inkluderte "behandling" (0, 1 mpk eller 10 mpk av epotilon D (forbindelse I)) som et mellomdyrbegrep, og de 5 forsøkene som gjentatte målinger på hvert dyr. Dersom analysen indikerte en

signifikant effekt av behandlingen, eller en behandling-av-prøve-interaksjon, ble forskjellene mellom 1 mpk- og 10 mpk-gruppene sammenlignet med vehikkelgruppen ved hjelp av Dunnetts test. Probeveilengdene i hver kvadrant, og antallet plattformkryssinger i hver kvadrant ble analysert ved hjelp av Dunnetts test. I alle tilfellene ble 1
 5 mpk- og 10 mpk-gruppene sammenlignet med vehikkelgruppen. Alle beregningene ble gjort i SAS, versjon 9.1, under Windows XP Professional-operativsystemet.

[0102] Innsamlingstreningen ble utført i 5 påfølgende dager. Et probeforsøk ble utført 18 timer etter den siste innsamlingstreningen på dag 6. I løpet av disse 60 andre forsøkene ble plattformen fjernet, og avstanden musen anvendte i målkvadranten og
 10 antall kryssinger av et område der plattformen tidligere var plassert ble målt. Svømmehastigheten ble overvåket for alle dyrene; legemiddelbehandlingen førte ikke til noen endringer i svømmehastigheten i samsvar med at legemidlet ikke påvirket den motoriske atferden. Flyttiden (svømmehastigheter på < 5 cm/sek) varierte heller ikke mellom behandlingsgruppene.

Vevshøsting

[0103] Musene ble avlivet ved cervical dislokasjon etter 5,5 måneder etterfulgt av halshugging. Hjernene ble umiddelbart fjernet og delt ned midtlinjen i to halvkuler. Den høyre hemisfæren ble plassert i 20 ml 4 % paraformaldehyd (fremstilt friskt på
 20 avlivningsdagen) og lagret over natten ved 4 °C. Den neste dagen ble hjernene overført til et rør inneholdende 20 ml TBS (pH 7,4, 20 mM TRIS, 100 mM NaCl), og deretter lagret ved 4 °C inntil behandling. Høyre hjernehalvdel ble dyppet i parafin, skåret med 5 mikron, og montert på positivt ladede objektglass. Objektglassene ble tørket over natten i en 60 °C ovn og lagret ved romtemperatur inntil de ble farget. Den venstre
 25 hjernehalvdelen ble fryst (i løpet av 2 minutter) på tørris.

Gallyas-metode

[0104] Gallyas-fargemetoden ble anvendt til å oppdage sølv-positive nevrofibrillære floker og dystrofe neuritter. Parafininnstøpte tynne snitt (5 mikron) montert på
 30 objektglass ble avparafinisert og rehydrert via seriell inkubasjon i xylen (to ganger i 10 minutter hver), 100 % etanol (to ganger i 10 minutter hver), 95 % MeOH/5 % H₂O₂ (30 minutter), 95 % etanol (to ganger i 5 minutter hver), 80 % etanol (to ganger i 5 minutter hver), 50 % etanol (to ganger i 5 minutter hver), og vann (to ganger i 5 minutter hver). Snittene ble deretter plassert i 5 % perjodsyre i 5 minutter, vasket i
 35 dH₂O to ganger i 5 minutter hver gang, og plassert i alkalisk sølv-jodid-løsning (inneholdende 1 % sølvnitrat) i 1 minutt.

[0105] Snittene ble vasket i 0,5 % eddiksyre i 10 minutter, plassert i nylaget fremkallerløsning i 15 minutter, og vasket på nytt i 0,5 % eddiksyre i 5 minutter. Etter skylling i avionisert vann ble snittene plassert i 0,1 % gullklorid i 5 minutter og skyllet

igjen i deionisert vann. Snittene ble inkubert i 1 % natriumtiosulfat (hypo) i 5 minutter og deretter skylt i vann fra springen. Motfargingen ble utført i 0,1 % kjernefast rødt i 2 minutter. Snittene ble deretter skylt i vann fra springen, dehydrert i graderte serier av alkohol (95 %, 100 %, 100 %) i 2 minutter, og utskilt i 3 endringer av xylen, 10 dypp hver. Til slutt ble Cytoseal 60-monteringsmediet og dekkglass tilsatt til objektglassene (Richard-Allan Scientific of Kalamazoo, MI). Statistikk ble utført ved hjelp av den ikke-parametriske Kruskal-Wallis-testen, etterfulgt av Dunns multiple sammenligningstest ved hjelp av Graphpad Prism 4. De samme resultatene ble oppnådd med den parametriske ANOVA-en etterfulgt av Dunnetts post-hoc-test.

Immunhistokjemi

[0106] Parafininnstøpte tynne snitt (5 mikron) ble avparafinisert og rehydratisert til vann i 3 endringer av xylen, to endringer av 100 % etanol, og 1 endring av 95 % etanol, etterfulgt av skylling i vann. Antigengjenfinning ble utført ved å dampe objektglassene i 10 mM natriumcitratbuffer, pH 6,0 i 30 minutter i en Black and Decker-dampmaskin (modell # HS900) og deretter avkjølt i 30 minutter. Endogen peroksidaseaktivitet ble fjernet ved inkubasjon i 0,6 % hydrogenperoksid i 90 % MeOH i 15 minutter. Etter vasking i TBS ble objektglassene blokkert i 10 % normalt geiteserum i TBS i én time. Dette etterfølges av inkubering av AT8-fosfoTau-antistoffet (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, Goedert et al., 1995) fortynnet i blokkeringsløsningen over natten ved 4 °C. Etter 3 vaskinger i TBS ble objektglassene inkubert med et anti-mus-IgG-antistoff i 1 time ved romtemperatur. Etter å ha vasket i TBS ble signalet oppdaget ved hjelp av et Vectastain ABC Elite Kit (Vector Labs Burlingame, CA) i 1 time etterfulgt av deteksjon ved hjelp av diaminobenzadinreagensen fra Vector laboratorier. Kjernene ble motfarget blå med hematoksylin, etterfulgt av å dyppe objektglassene 2 ganger i Scotts springvannerstatning (Surgipath # 02900, Richmond, IL) og deretter skylling i vann fra springen. Snittene ble deretter dehydrert i graderte serier av alkohol (95 %, 100 %, 100 %) og deretter utskilt i 3 endringer av xylen. Dekkglassene og Cytoseal 60-monteringsmediet ble deretter tilsatt.

Stereologi

[0107] Nissl-fargede lysbilder ble skannet og digitalisert ved hjelp av Aperio ScanScope (Aperio Technologies, Inc., Vista, CA). Bilder av hele hjernesnittet ble tatt med høy oppløsning og lagret som filer i Spectrum (Aperio-programvare). For å behandle bilder ble et område på 4000 X 4000 piksler inkludert hele hippokampus tatt ved hjelp av ekstraktverktøyet og lagret som en JPEG-fil for import til Metamorph (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) for kvantifisering av celletap innenfor CA1- og CA3-regionene av hippokampus. En modifisert versjon av den ene enkeltdissektor-

metoden (Moller et al. 1990) ble benyttet for å kvantifisere celletap på grunn av sin egnethet for tynne, parafininnstøpte vevssnitt. For å oppnå relative antall celler ble hvert femte snitt samlet når de parafininnstøpte hjernene ble kuttet sagittalt mellom Bregma og omtrent 0,75 mm lateralt. De tre regionene ble trukket og telt per snitt ved hjelp av Metamorph-programvaren. De samme regionene ble anvendt for hvert bilde og 5 snitt ble regnet per dyr, 5 lysbilder fra hverandre. Statistikk ble utført ved hjelp av ANOVA etterfulgt av Dunnetts posthoc-test.

EKSEMPEL 1

[0108] Utformingen av Tg4510-forsøket med epotilon D (forbindelse I) som beskrevet ovenfor, er avbildet i FIG. 1. I dette forsøket ble musene testet etter 2,5 måneder i MWM-en og tilordnet én av tre grupper (N = 12, 13, 16), slik at forbehandlingsytelsen til hver gruppe ble bestemt til å være lik. Fra 2,5 måneders alderen ble musene gitt en ukentlig intraperitoneal (IP) injeksjon av enten vehikkel alene eller vehikkel med 1 mpk eller 10 mpk av epotilon D (forbindelse I). Ved 4,5 måneders alderen ble musene testet på nytt i MWM for å bestemme effekten av behandlingen på kognitiv ytelse. Etter 5,5 måneder ble musene avlivet og hjernene ble samlet inn for nærmere analyse.

[0109] I tumorxenograftforsøk administrerer etterforskere vanligvis epotilon D (forbindelse I) intraperitonealt ved 30 mpk annenhver dag i 5 dager, noe som gir en kumulativ dose på 150 mpk. (Chou et al., 1998). Derfor anses behandling med 1 mpk epotilon D (forbindelse I) i 12 uker, som beskrevet i dette dokumentet, å være omtrent 100 ganger lavere enn onkologidosen, der behandling ved 10 mpk er rundt 10 ganger under den typiske onkologidosen administrert i denne type forsøk. Når musene ble dosert én gang ukentlig intraperitonealt med 1 mpk og 10 mpk epotilon D (forbindelse I) i 2 eller 6 måneder, ble det ikke observert noen histopatologiske abnormiteter i flere vev, inkludert lever, nyre, hjerte, testiklene, binyrene, benmargen, perifer nerve, mage, og tynntarmen og tykktarmen.

[0110] FIG. 2 viser resultatene av en MWM-test av Tg4510-musene etter 2,5 måneder, før dosering med epotilon D (forbindelse I) eller med vehikkel. Det var ingen statistisk signifikante forskjeller mellom gruppene før dosering i anskaffelse eller under probeforsøk, som var grunnlaget for å separere dyrene i grupper. Med andre ord opererer FIG. 2 som en kontroll i å vise at forbehandlingsytelsen til hver gruppe var tilsvarende.

[0111] Tag4510-musene ble deretter administrert epotilon D (forbindelse I) én gang ukentlig intraperitonealt på 1 mpk, 10 mpk, og med vehikkel, og MWM-testen ble utført etter 4,5 måneder, etter denne ukentlige doseringen over 12 uker. Resultatene som er rapportert i FIG. 3 viste at mus som ble behandlet med 1 mpk epotilon D (forbindelse I) var i stand til å lokalisere den skjulte plattformen i MWM raskere

(dvs. på en statistisk signifikant måte ($p < 0,01$)), enn det mus som ble behandlet med vehikkelen kunne gjøre. 10 mpk-behandlingsgruppen viste en tendens mot forbedring sammenlignet med vehikkelgruppen. Disse funnene viser at behandling av Tg4510-mus med epotilon D (forbindelse I) førte til en statistisk signifikant forbedret kognitiv funksjon i forhold til vehikkelbehandlingen, og i tillegg at den nedre dosen på 1 mpk genererte forbedrede resultater sammenlignet med den høyere dosen (10 mpk). Det er verdt å merke seg at oppfinnerne i dette dokumentet ytterligere bekreftet at eksponeringen som anvendte dette paradigmet var doseavhengig basert på separate forsøk som sammenligner 1 mpk- og 10 mpk-dosene hos mus. Av denne grunnen var den reduserte atferdsforbedringen i 10 mpk-gruppen, i forhold til 1 mpk-gruppen, ikke grunnet uforutsette, reduserte legemiddelnivåer i de 10 mpk-behandlede dyrene.

EKSEMPEL 2

[0112] FIG. 4 viser probedata 18 t etter 5 dager med trening i 4,5 måneder gamle Tag4510-mus dosert i 2 måneder med epotilon D (forbindelse I) ved 1 mpk, 10 mpk og med vehikkel. I FIG. 4 står "TQ" for målkvadranten, "AR" står for tilstøtende høyre, "AL" står for tilstøtende venstre, og "OP" står for motsatt kvadrant. To mål på ytelse, nemlig % veilengde (A) og antall plattformoverganger (B) i hver kvadrant, er indikert i FIG. 4. En preferanse for målkvadranten indikerer at musen husket stedet plattformen var plassert under innsamlingsfasen av studien. Som det kan ses fra dataene viste de vehikkelbehandlede musene tilfeldig oppførsel med lignende resultater for hver av TQ, AR, AL og OP, for både veilengdemålingene (A) og plattformkryssmålingene (B), og de viste ingen kvadrantpreferanse. Imidlertid viste musene som ble behandlet med 1 mpk (forbindelse I) statistisk signifikante forskjeller i begge målingene sammenlignet med vehikkelgruppen i minne, *f.eks.* ved å erindre at plattformen hadde blitt plassert på TQ. I tillegg viste 10 mpk gruppen betydelig større ytelse sammenlignet med vehikkelgruppen i % veilengdemål (A), men ikke ved hjelp av antallet plattformovergangsmål (B).

EKSEMPEL 3

[0113] For å bestemme effekten av epotilon D (forbindelse I) i hjernepatologi ble hjernevevet undersøkt fra en undergruppe ($N = 5$) av Tg4510-musene fra det foregående forsøket. Tidligere studier har vist at Tg4510-musene mistet omtrent 60 % av nevronene sine i CA1-regionen i hippokampus etter 5,5 måneder (Santacruz et al. 2005). Dermed undersøkte de foreliggende oppfinnerne først antallet nevroner i CA1-området av hippokampus, etterfulgt av undersøkelse av CA3-området. FIG.5 avbilder nevronale tellinger i CA1- og CA3-områdene av hippokampus i musene etter 5,5 måneder etter behandling med vehikkel, 1 mpk av epotilon D (forbindelse I), og 10 mpk av epotilon D (forbindelse I).

[0114] Overraskende, som det kan sees i FIG. 5, hadde Tg4510-musene behandlet med 1 mpk epotilon D (forbindelse I) betydelig flere CA1-nevroner enn de vehikkelbehandlede dyrene. Faktisk viser forskjellen mellom musene som ble behandlet med vehikkel og musene som ble behandlet med 1 mpk av epotilon D (forbindelse I) at 1 mpk av epotilon D (forbindelse I) forhindret nevronalt tap med en statistisk signifikant forskjell fra vehikkel ($p < 0,01$). Musene behandlet med 10 mpk av epotilon D (forbindelse I) hadde CA1-nevronale nivåer som var mellomliggende mellom de vehikkelbehandlede musene og musene som ble behandlet med 1 mpk av epotilon D (forbindelse I). Disse resultatene er i overensstemmelse med og forsterker resultatene fra de atferdsmessige studiene av eksempel 1 og 2, *dvs.* som viser at den 100 ganger lavere dosen (*dvs.* enn de kjemoterapeutiske doseringene administrert i tumorxenograftforsøk) konsekvent produserte betydelig forbedrede resultater i behandling av tauopati.

[0115] En lignende tendens ble også observert for det totale celleantallet på CA3-regionene av hippokampus, med betydelige forskjeller mellom de 1 mpk- og ikke-transgene musene i forhold til de vehikkelbehandlede musene. Forhøyelsen i celleantallet på CA3-regionen i den behandlede gruppen var mindre markert enn i CA1-regionen der det er mer nevrodegenerering ved denne alderen; imidlertid viser disse resultatene en virkning på den underliggende sykdommen i flere områder av hjernen.

EKSEMPEL 4

[0116] Effekten av behandlingen på fosforylert Tau-farging i CA1-regionen ble også undersøkt. AT8-antistoffet gjenkjenner Tau som fosforyleres på både 202- og 205-restene. Denne formen for hyperfosforylert Tau er sterkt anriktet på AD og andre tauopatipasienthjerner. (Goedert et al, 1995).

[0117] FIG. 6 viser AT8-fosfoTau-farging av Tg4510-musene behandlet med vehikkel, 1 mpk epotilon D (forbindelse I), og 10 mpk epotilon D (forbindelse I) som beskrevet ovenfor. FosfoTau-farging er angitt i mørkesort. Overraskende ble musene behandlet med 1 mpk av epotilon D (forbindelse I), viste mye mindre fosfoTau-farging, spesielt sammenlignet med de vehikkelbehandlede musene. Musene som ble behandlet med 10 mpk av epotilon D (forbindelse I) viste mellomliggende nivåer av fosfoTau-farging.

EKSEMPEL 5

[0118] Effekten av behandling med epotilon D (forbindelse I) på nevrofibrillær flokedannelse i cortexen ble undersøkt med Gallyas-sølvfarging. FIG. 7A viser Gallyas-sølvfarging for nevrofibrillære floker i frontcortex av Tg4510-musene behandlet med vehikkel, 1 mpk av epotilon D (forbindelse I), og 10 mpk av epotilon D (forbindelse I) som beskrevet ovenfor. I FIG. 7A er sølvfargingen i sort (positiv), og

"NT" står for ikke-transgen, som viser litt ikke-spesifikk farging forbundet med blodkar. Som det kan ses i FIG. 7A hadde musene som ble behandlet med 1 mpk av epotilon D (forbindelse I) mye lavere nivåer av nevrofibrillære floker enn hva vehikkelbehandlede mus hadde; dette kvantifiseres for alle dyrene i studien i FIG. 7B. En betydelig virkning på underliggende sykdom i både cortexen og hippokampus ble observert på mpk-dosen, der 10 mpk-dosen igjen viste en tendens mot forbedring.

[0119] Som beskrevet i de foregående eksemplene forbedret behandling av Tg4510-mus med epotilon D (forbindelse I) kognitiv svikt og forbedret kognitiv funksjon over tid sammenlignet med de ubehandlede Tg4510-musene. Videre viser nevropatologiske tester som mål på virkningen av en underliggende sykdom (*dvs.* celleantall-, fosfoTau-farging- og sølvfargingstester) at behandling med epotilon D forhindrer nevronalt tap, reduserer akkumulering av unormal Tau, og hindrer dannelsen av nevrofibrillære floker på statistisk signifikante nivåer sammenlignet med ubehandlede Tg4510-mus. Dermed mener oppfinnerne i dette dokumentet at de er de første til å oppdage og demonstrere forebyggingen av kognitivt tap, Tau-patologi og nevrodegenerering ved behandling med en mikrotubulstabiliserende forbindelse, nemlig epotilon D.

[0120] I tillegg har oppfinnerne i dette dokumentet oppdaget at de terapeutiske effektene som kan oppnås ved behandling med epotilon D sannsynligvis er ikke-lineært doseavhengige. Nærmere bestemt ble de konsistente doseavhengige resultatene gjentatte ganger oppnådd i hver av de rapporterte atferdsmessige og nevropatologiske studiene, der ved den lavere dosen (1 mpk) (omtrent 100 ganger mindre enn den kjemoterapeutiske dosen i tumorxenograftforsøk), en vesentlig forbedret fordelaktig effekt ble oppnådd i alle tiltak sammenlignet med vehikkelen, mens den høyere dosen (10 mpk), viste en tendens mot effekt med de fleste tiltakene og en statistisk signifikant forskjell over vehikkel i et mål på MWM-probetesten.

EKSEMPEL 6

Epotilon D-tytelse sammenlignet med andre mikrotubul-stabilisatorer i bolus-IV-forsøk

[0121] I én forsøksgruppe ble iksabepilon (aza-epotilon-B-analog), forbindelse II (BMS 310705, 21-aminoepotilon F), og epotilon D (forbindelse I) undersøkt og sammenlignet med paklitaksel etter bolusintravenøsadministrering inn i haleårene av nakne mus i doser på 1 til 12 mpk med 3 mus/gruppe. Hver av de fire forbindelsene ble dosert ved 5 ml/kg under anvendelse av 10 % Cremophor, 10 % etanol og 80 % vann inneholdende 5 % dekstrose. For å bestemme den relative hjernepenetransen av hver forbindelse ble plasma-, hjerne- og levernivåene av forbindelsene målt ved forskjellige tidspunkter etter en enkeltdose ved hjelp av væskechromatografi med tandemmasse-spektrometri (LC:MS:MS) etter en organisk faseekstraksjon, som rapportert i FIG. 8A-

8D og tabell 1. Levernivåene ble ikke målt i de paklitakselbehandlede musene.

[0122] FIG. 8A viser konsentrasjonen av forbindelse II i plasmaet, hjernen og leveren hos mus etter intravenøs administrering ved 1 mpk til ulike tidspunkter.

[0123] FIG. 8B viser konsentrasjonen av iksabepilon i plasmaet, hjernen og leveren hos mus etter intravenøs administrering ved 12 mpk til ulike tidspunkter.

[0124] FIG. 8C viser konsentrasjonen av paklitaksel i plasmaet og hjernen til mus etter intravenøs administrering ved 4 mpk til ulike tidspunkter.

[0125] FIG. 8D viser konsentrasjonen av epotilon D (forbindelse I) i plasmaet, hjernen og leveren hos mus etter intravenøs administrering ved 5 mpk til ulike tidspunkter.

[0126] Dataene viste at forbindelse II og iksabepilon hadde beskjedne hjernenivåer i forhold til perifert vev som målt ved forholdet for hjerne-til-leverforbindelsesnivåene, spesielt på senere tidspunkt etter den første fordelingen og utskillelsen av plasma-legemidler. Som forventet var paklitakselhjernennivåene lave. Nærmere bestemt oversteg ikke paklitakselhjernennivåene plasmalegemiddelnivåer i minst 24 timer etter dosering. Uventet hadde epotilon D (forbindelse I) de kombinerte egenskapene av bemerkelsesverdig bedre hjernepenetrasjon og selektiv retensjon enn forbindelsene som ble testet i dette forsøket, som vist ved høye hjernenivåer som oversteg levernivåene 6 og 24 timer etter dosering. Dette demonstrerer uventet retensjon av epotilon D (forbindelse I) i målorganet (hjerne) i forhold til periferien, inkludert plasma og vev, særlig i leveren, noe som er et potensielt sete for toksisitet.

[0127] Nærmere bestemt rapporterer tabell 1 komparative hjernepenetrasjonsdata for fire mikrotubulstabilisatorer - paklitaksel, forbindelse II (BMS 310705), iksabepilon og epotilon D -- etter bolus-IV-dosering (variert mpk, som rapportert i tabellen) ved hjelp av nakne mus, disse dataene gjenspeiles også i figurene 8A-8D. Hjerne-til-plasma-forholdet øker generelt med tiden etter dosering for hver forbindelse på grunn av det hurtige tapet fra plasmaet og oppbevaringen av legemidlet i hjernen ved binding til mikrotubulene. Hjerne-til-plasma-forholdet kan så falle for forbindelser der det er mindre retensjon i hjernen, slik som det som er observert for forbindelse II som viser en reduksjon på mellom 6 og 24 timer. Til tross for forandringen i hjerne-til-plasma-forholdet med tiden, gir dette forholdet et mål på den iboende hjernegjennomtrengningen for en forbindelse når data fra korte tider etter dosering (f.eks. mellom 20-60 minutter etter dosering) sammenlignes. I tabellene i dette dokumentet ble hjerne-til-plasma- og hjerne-til-leverforholdene beregnet ved først å beregne forholdet for hvert dyr, og deretter å bestemme gjennomsnittet av forholdene; tabellene i dette dokumentet rapporterer de dermed oppnådde gjennomsnittsverdiene.

TABELL 1

Forbindelse	Dose (mpk)	Tid (t)	Plasma-kons. (nM)	Hjerne-kons. (nM)	Hjerne-til-plasma-forhold	Hjerne-til-lever-forhold
Paklitaksel	4	1	447	47	0,10	NQ
		6	43	16	0,37	NQ
		24	12	15	1,25	NQ
Forbindelse II	1	6	3	6,8	2,1	0,01
		24	1	1,3	1,2	0,02
Iksabepilon	12	0,12	11,236	579	0,05	0,05
		0,33	3057	495	0,16	0,09
		1	390	284	0,73	0,07
		2	171	360	2,1	0,11
		6	53	371	7,0	0,30
		24	8	236	30	1,2
Epotion D	5	6	6	2794	470	149
		24	1	2046	2046	1204

[0128] Når vi ser på tabell 1 er paklitaksel dårlig hjernegjennomtrengende som dokumentert av et hjerne-til-plasmaforhold på 0,1 1 time etter dosering; iksabepilon er mer hjernegjennomtrengelig enn paklitaksel med et hjerne-til-plasma-forhold på 0,73 1 time etter dosering (tabell 1). Ved tidspunkter fra 6-24 timer etter dosering er hjerne-til-plasma-forholdet en refleksjon av både iboende hjernepenetrasjon og retensjon (halveringstid) i hjernen. Dataene ved 6 og 24 timer etter dosering av epotion D viser minst en 60-gangers økning i hjerne-til-plasma-forhold over iksabepilon, forbindelsen med det nest høyeste hjerne-til-plasma-forholdet i denne gruppen.

[0129] Hjerne-til-leverforholdene tilveiebringer ikke bare et mer enhetlig mål på hjerneretensjon og halveringstid, men også selektiv retensjon i forhold til perifert vev. Dette er verdifullt fordi leveren, som i stor grad er valgt fordi den er godt perfundert og har en tendens til å ha høyere nivåer enn mange andre perifere vev, inneholder mikrotubuli der forbindelsen kan opprettholdes, i motsetning til det ikke-cellulære plasmaet. I motsetning til hjerne-til-plasma-forholdet, der den optimale måletiden er i området 20 - 60-minuttersleiet, er det å foretrekke å sammenligne hjerne-til-leverforholdene på senere tidspunkt etter dosering (*f.eks.* 24 t eller mer), når plasmanivåene er betydelig redusert, for derved å tillate en mer nøyaktig måling av legemidlet som er spesielt fastholdt i hjerne- og levercellene. En sammenligning av hjerne-til-leverforholdene viser at epotion D er høyt, selektivt inneholdt i hjernen i

forhold til leveren. For eksempel er 24 timers hjerne-til-leverforholdet av epotilon D 1204 et bemerkelsesverdig mye høyere forhold sammenlignet med de lavere forholdstallene for iksabepilon (1,2) og forbindelse II (0,02) i det samme forsøkssettet. **[0130]** I et separat forsøk ble epotilon-D-plasma- og hjernekonsentrasjonene evaluert for lengre perioder av gangen, dvs. opp til 168 t, etter bolusintravenøsadministrering, ved hjelp av en lignende protokoll som beskrevet ovenfor, men med middelaldrende trippeltransgene mus (Oddo et al. 2003), i hendene på ulike forskere. Resultatene av dette forsøket er oppført nedenfor i tabell 2 og i FIG. 10.

TABELL 2 (KUN EPOTILON D)

Tid (t)	Plasmakons. (nM)	Hjerne-kons. (nM)	Hjerne-/plasma-forhold	Hjerne-/lever-forhold
0,05	25100	1127	0,04	0,42
0,17	2003	595	0,28	1,1
0,33	549	529	0,86	0,38
1	325	422	1,2	0,42
3	70	468	6,1	0,30
6	43	141	3,3	0,24
16	0,8	210	265	NQ
24	0,9	82,7	89	NQ
96	<LLQ (0,6 nM)	25,2	NQ	NQ
168	<LLQ (0,6 nM)	16,3	NQ	NQ

[0131] Disse dataene viser den forlengede retensjonen av epotilon D i hjernevev i minst 168 timer (7 dager) etter en enkelt dose. De absolutte hjernenivåene og forholdene i tabell 1 og 2 for epotilon D varierer; det er viktig å merke seg at forsøkene som er beskrevet i tabellene 1 og 2 ble utført hver for seg på forskjellige tidspunkter av forskjellige forskere med forskjellige stammer av mus. Oppfinnerne har observert at små forskjeller i IV-injeksjonstiden kan endre den nøyaktige eksponeringsprofilen, særlig den maksimale plasmakonsentrasjonen, som vil påvirke hjernekonsentrasjonen, og videre, at den intravenøse injeksjonstiden kan variere mellom forskere. Av denne grunn er det best å sammenligne resultatene i et enkelt forsøk. Til tross for dette problemet er de samlede tendensene og relative karakteristikkene av mikrotubul-stabilisatorene sammenlignet med hverandre konsistente, og disse resultatene viser at epotilon D er meget hjernegjennomtrengelig med vesentlig forbedret hjernepenetrasjon og retensjon, sammenlignet med forbindelse II, iksabepilon og paklitaksel. For

eksempel, selv når man deltar i en sammenligning av data oppnådd fra to adskilte forsøk, var hjerne-til-plasmaforholdet for epotilon D 6 timer etter dosering 2046 i tabell 1 og 89 i tabell 2, fremdeles vesentlig bedre enn forholdene på samme tidspunkt for paklitaksel (0,37), og forbindelse II (2,1) i tabell 1. Ettersom levernivåene i studien beskrevet i tabell 2 falt under det nedre nivået for kvantifisering (LLQ på 49 nM i denne studien) etter 24 timer, var ikke et hjerne-til-leverforhold kvantifiserbart (NQ) på dette tidspunktet.

[0132] WO 03/074053 A1 offentliggjør bredt anvendelsen av visse epotiloner for behandling av hjernesykdommer. Ifølge denne publikasjonen ble plasma- og hjernenivåene for tre epotiloner (ikke inkludert epotilon D) målt i løpet av de første 40 minuttene etter bolusintrasvenøsadministrering ved 5 mpk. Hjerne- og plasma-konsentrasjonsdataene rapportert i WO 03/074053 A1 for det som er identifisert der som forbindelse 1: 4,8-dihydroksey-16-(1-metyl-2-(2-metyl-4-tiazolyl)-etenyl)-1-oksa-7-(1-propyl)-5,5,9,13-tetrametyl-sykloheksadek-13-en-2,6-dion, og paklitaksel, er gjengitt i tabell 1 nedenfor. Dataene ble rapportert i WO 03/074053 i henhold til enhetene, µg/ml, og i minutter; disse dataene ble omdannet til nM, og er rapportert i tabell 3 i nM, og timer, for sammenligning. Disse dataene (per tabell 3) ble ikke uavhengig bekreftet av oppfinnerne i dette dokumentet, men de ble heller gjengitt basert på de verdiene som er presentert i denne publikasjonen (som omdannet til t og nM). I tillegg er det bemerket at stereoisomeri og/eller en fremstillingsmetode ikke er rapportert for forbindelse 1 i WO 03/074053, og en 13 E/Z-blanding er referert (*se* side 13, linje 15).

TABELL 3

Forbindelse	Tid (t)	Plasmakons. (nM)	Hjernekons. (nM)	Hjerne-til-plasma-forhold
Forbindelse III	0,17	1540	580	0,4
	0,33	1150	1540	1,3
	0,67	580	1150	2
Paklitaksel	0,17	940	<LLQ	NQ
	0,33	700	<LLQ	NQ
	0,67	230	<LLQ	NQ

[0133] Fordi dataene ble rapportert til bare 40 minutter kan bare hjernepenetrasjon vurderes fra denne studien ved å undersøke hjerne-til-plasmaforholdet. Paklitaksel er antatt å ha dårlig hjernepenetrasjon (samsvarer med dataene i tabell 1) fordi hjernenivåene er under LLQ, selv om nivået av deteksjonen ikke ble offentliggjort. Målinger av hjerneretensjon som må måles i minst 24 timer etter dosering, og selektiv

hjernepenetrasjon ved sammenligning med perifere vev ble ikke omtalt i WO 03/074053 A1.

EKSEMPEL 7

5 **Epotilon D-ytelse etter oral administrering**

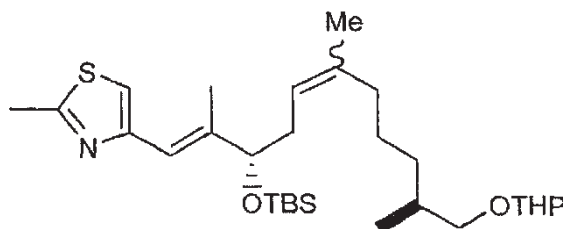
[0134] For å analysere epotilon D-ytelsen ytterligere ved behandling av tauopatier ble forbindelsen vurdert i to forsøk som involverer administrering til C57BL/6-mus ved henholdsvis 10 mpk og 35 mpk ved oral tvangsfôring. I tillegg, i disse forsøkene, ble en isomer av 4,8-dihydroksy-16-(1-metyl-2-(2-metyl-4-tiazolyl)-etenyl)-1-oksa-7-(1-
10 propyl)-5,5,9,13-tetrametyl-sykloheksadek-13-en-2,6-dion (forbindelse III i dette dokumentet), også undersøkt, og en side-ved-side-sammenligning ble foretatt mellom epotilon D og forbindelse III. Nedenfor rapporterer vi først forsøksdetaljene for fremstilling og isolering av forbindelse III, og deretter blir de biologiske *in vivo*-dataene beskrevet.

15

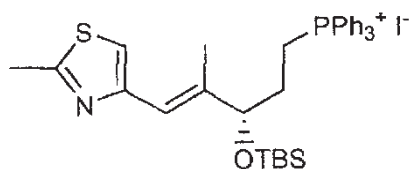
Generell forsøksinformasjon:

[0135] I de følgende prosedyrene er alle temperaturene gitt i grader Celsius. ¹H-NMR-spektra ble kjørt på et Bruker 500-, 400- eller 300 MHz-instrument, og kjemiske skift ble rapportert i ppm (δ) med referanse til tetrametylsilan ($\delta = 0,0$). Alle
20 fordampningene ble utført under redusert trykk. Med mindre annet er angitt ble LC/MS-analysene utført på et Waters-instrument ved hjelp av en Phenomenex Luna 3,0x50mm S 10 reversfasekolonne som benytter en strømningshastighet på 4 ml/min ved hjelp av en 0,1 % TFA i MeOH/vanngradient [0-100 % i 3 min, med 4 min kjøretid], og en UV-detektor innstilt på 220 nm eller Phenomenex-Luna 3,0 x 50 mm
25 10u-reversfasekolonne som benytter en strømningshastighet på 5 ml/min ved hjelp av en 10 mM ammoniumacetatacetonitril/vanngradient [5-95 % i 3 min, med 4 min kjøretid] og en UV-detektor innstilt på 220 nm. Med mindre annet er angitt ble rensingene gjort på 40-63-mesh silikagelkolonner eller ved hjelp av et BIOTAGE® Horizon-system, eller ved hjelp av spesifisert HPLC-utstyr og forhold.

Trinn 1:
[0136]



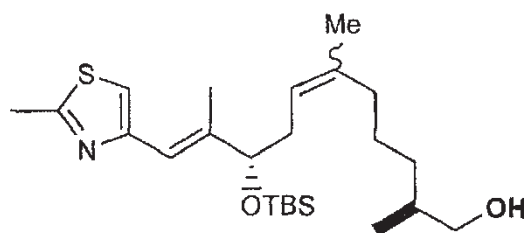
Syntesemellomprodukt-1



Fosfoniums salt A

[0137] Til en løsning av fosfoniums salt A (fremstilt ifølge Nicolaou et al., J. Am. Chem. Soc., 119:7974-7991 (1997); 40,5g, 57,9 mmol) i 300 ml THF ved 0 °C ble det tilsatt natriumbis(trimetylsilyl)amid (63,7 ml, 63,7 mmol), og løsningen ble omrørt i 5 min. En løsning av (6S)-6-metyl-7-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oksy)heptan-2-on (fremstilt i henhold til US 7,326,798; 14,54g, 63,7 mmol) i 50 ml THF ble tilsatt raskt, og blandingen ble tillatt oppvarming til romtemperatur i løpet av 16 timer. Reaksjonsblandingen ble helt over i mettet NH₄Cl og ekstrahert med EtOAc (300 ml). Det organiske laget ble vasket med saltløsning, tørket over magnesiumsulfat, filtrert og fordampet *under vakuum*. Råproduktet ble rensset på en silikagelkolonne (EtOAc/heksan, 0-10 %) for å gi 16 g (30,7 mmol, 53 %) av syntesemellomprodukt 1. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 6,90 (s, 1H), 6,43 (s, 1H), 5,20-5,05 (m, 1H), 4,6-4,5 (m, 1H), 4,15-4,00 (m, 1H), 3,9-3,8 (m, 1H), 3,6-3,3 (m, 2H), 3,25-3,05 (m, 1H), 2,70 (s, 3H), 2,35-2,15 (m, 2H), 2,05 -1,90 (m, 5H), 1,90-1,75 (m, 1H), 1,75 -1,65 (m, 3H), 1,65 - 1,45 (m, 6H), 1,45 -1,25 (m, 3H), 1,15 -1,00 (m, 1H), 1,00-0,80 (m, 12H), 0,05 - -0,05 (dd, 6H), MS (LCMS) [M+H] = 522,44, [M+Na] = 544,42.

Trinn 2:
[0138]

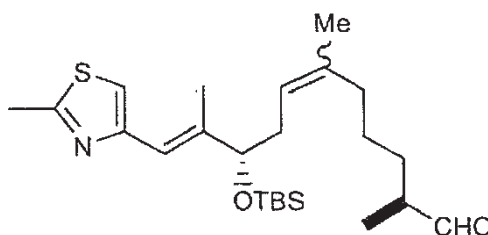


Syntesemellomprodukt 2

[0139] Til en løsning av syntesemellomprodukt-1 (16 g, 30,7 mmol) i 300 ml etanol ved RT ble det tilsatt p-toluensulfonsyre-monohydrat (5,83 g, 30,7 mmol). Blandingen ble omrørt i 7 timer, helt over i mettet NaHCO₃ og ekstrahert to ganger med metylenklorid (300 ml). De kombinerte organiske lagene ble vasket med saltløsning og tørket over magnesiumsulfat. Etter filtrering og fjerning av løsningsmidlet, ble det rå materialet rensert ved hjelp av et BIOTAGE-system (EtOAc/heksan, 10-45 %) for å gi 9,8 g (22,4 mmol, 73 %) av syntesemellomprodukt 2.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 6,92-6,90 (m, 1H), 6,45-6,40 (m, 1H), 5,15-5,00 (m, 1H), 4,10-4,00 (m, 1H), 3,50-3,30 (m, 2H), 2,69 (s, 3H), 2,35-2,15 (m, 2H), 2,1-1,9 (m, 5H), 1,75 - 1,50 (m, 5H), 1,50-1,25 (m, 3H), 1,10-0,75 (m, 13H), 0,05 - -0,05 (dd, 6H), MS (LCMS) [M+H] = 438,29, [M+Na] = 460,24.

Trinn 3:
[0140]



Syntesemellomprodukt 3

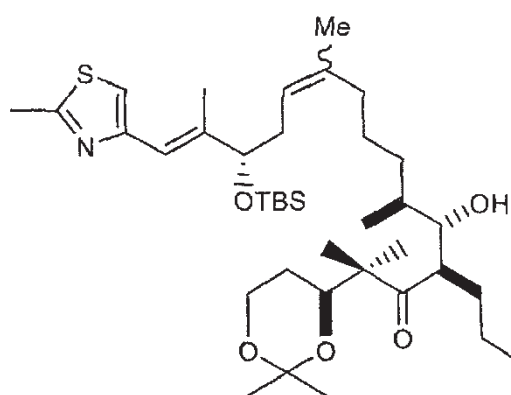
[0141] Til en løsning av oksalyklorid (2,94 ml, 33,6 mmol) i 100 ml metylenklorid ble det tilsatt DMSO (4,88 ml, 68,8 mmol) langsomt ved -78 °C. Etter omrøring i 10 minutter ble syntesemellomprodukt 2 (7 g, 15,99 mmol) i 100 ml metylenklorid tilsatt, og omrøring ble fortsatt i 30 min. TEA (11,14 ml, 80 mmol) ble tilsatt, og blandingen ble tillatt oppvarming til -10 °C. Etter mettet NaHCO₃ ble tilsatt ble reaksjonsblandingen ekstrahert to ganger med metylenklorid (100 ml). De kombinerte

organiske lagene ble vasket med saltløsning, tørket over Na₂SO₄, filtrert og fordampet for å gi råproduktet som en gul olje. Filtrering gjennom en kort SiO₂-kolonne, ved eluering med 15 % EtOAc/heksanoløsningsmiddel, og konsentrering *under vakuum* ga 7 g (16 mmol, 100 %) av syntesemellomprodukt 3 som en fargeløs olje.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 9,6-9,5 (d, 1H), 6,9 (m, 1H), 6,4 (m, 1H), 5,2-5,1 (m, 1H), 4,1-4,0 (m, 1H), 2,7 (s, 3H), 2,3-2,2 (m, 3H), 2,2-1,8 (m, 5H), 1,7-1,5 (m, 4H), 1,4-1,2 (m, 3H), 1,1-1,0 (m, 3H), 0,87 (s, 9H), 0,03 (s, 3H), 0,01 (s, 3H).

Trinn 4:

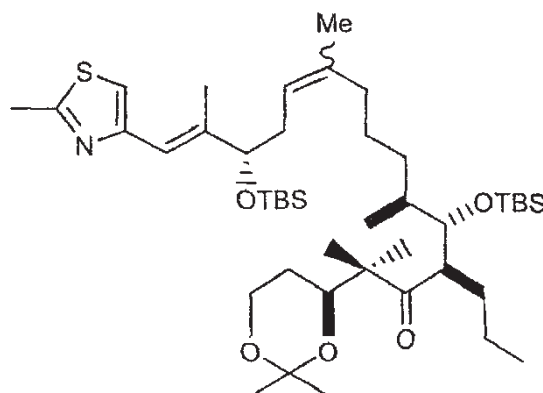
[0142]



Syntesemellomprodukt 4

[0143] Fremgangsmåten til Klar et al. (Angew. Chem. Int. Ed., 45:7942-7948 (2006)) ble fulgt. Til 200 ml THF ved -78 °C ble det tilsatt 70 ml 0,5 M nylaget LDA (35 mmol), fulgt av 8,48 g (35 mmol) (S)-2-(2,2-dimetyl-1,3-dioksan-4-yl)-2-metylheptan-3-on (Klar et al., Synthesis, 2:301-305 (2005)). Omrøringen ble fortsatt i 30 minutter ved -30 °C. Etter avkjøling til -78 °C ble en løsning av 1,0 M ZnCl₂ (35,0 ml, 35 mmol) tilsatt, og den resulterende løsningen ble omrørt i 20 min. En løsning av syntesemellomprodukt 3 (7 g, 16,06 mmol) i 50 ml THF ble tilsatt i løpet av 20 min. Blandingen ble omrørt i ytterligere 8 timer ved -78 °C. Blandingen ble helt over i mettet NH₄Cl og ekstrahert to ganger med EtOAc (300 ml). De organiske lagene ble vasket med saltløsning, tørket over Na₂SO₄ og konsentrert *under vakuum*. Resten ble rensert ved hjelp av en SiO₂-kolonne (EtOAc/heksan, 0-10 %) for å gi 7,5 g (11 mmol, 69 %) av syntesemellomprodukt 4 som den første eluerende isomeren og den store aldolisomeren. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 6,90 (m, 1H), 6,43 (m, 1H), 5,15-5,05 (m, 1H), 4,15-4,00 (m, 2H), 4,00-3,80 (m, 2H), 3,50-3,40 (m, 1H), 3,30-3,20 (m, 1H), 2,85-2,75 (m, 1H), 2,69 (s, 3H), 2,35-2,15 (m, 2H), 2,10-1,90 (m, 5H), 1,75-0,75 (m, 41H), 0,05-0,05 (d, 6H). MS (LCMS) [M+H] = 678,47, [M+Na] = 700,44.

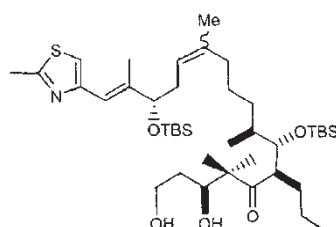
Trinn 5:
[0144]



Syntesemellomprodukt 5

[0145] Til en løsning av syntesemellomprodukt 4 (8 g, 11,8 mmol) i 200 ml metylenklorid ved 0 °C ble det tilsatt 2,6-lutidin (6,87 ml, 59 mmol), etterfulgt av *tert*-butyldimetylsilyl-trifluormetansulfonat (8,13 ml, 35,4 mmol). Blandingen ble tillatt å varme seg opp til RT over 16 timer, helt over i mettet NaHCO₃ og ekstrahert med metylenklorid. De organiske lagene ble vasket med saltløsning, tørket over Na₂SO₄ og løsningsmidlene ble fjernet *under vakuum*. Resten ble rensert på en SiO₂-kolonne (EtOAc/heksan, 5-10 %) for å gi syntesemellomprodukt 5 (7,8 g, 9,84 mmol, 83 %). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 6,90 (s, 1H), 6,44 (s, 1H), 5,15 -5,05 (m, 1H), 4,25 -4,20 (m, 1H), 4,10 -4,00 (m, 1H), 4,00-3,90 (m, 1H), 3,90 - 3,75 (m, 1H), 3,75 - 3,70 (m, 1H), 3,10 -3,00 (, 1H), 2,70 (s, 3H), 2,35 -2,15 (m, 2H), 2,00-1,85 (m, 5H), 1,70 - 0,75 (m, 50H), 0,10 - -0,05 (m, 12H). MS (LCMS) [M+H] = 792,48, [M+Na] = 814,44.

Trinn 6:
[0146]



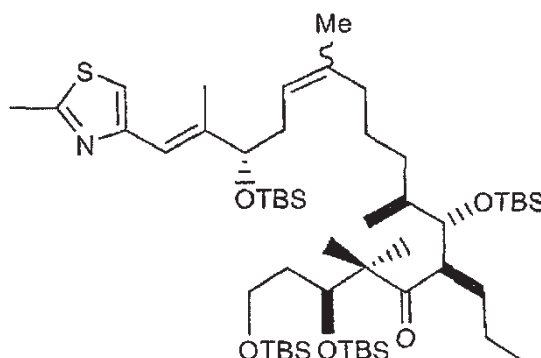
Syntesemellomprodukt 6

[0147] Til en løsning av syntesemellomprodukt 5 (6,8 g, 8,58 mmol) i 100 ml etanol ved RT ble det tilsatt *p*-toluensulfonsyremonohydrat (1,8 g, 9,44 mmol). Etter omrøring i 6 timer ble det tilsatt mettet NaHCO₃ og blandingen ble ekstrahert med

EtOAc. De organiske lagene ble vasket med saltløsning, tørket over Na₂SO₄ og konsentrert *under vakuum*. Reaksjonen ble gjentatt ved anvendelse av 1 g syntesemellomprodukt 5. De kombinerte råproduktene ble rensert ved hjelp av et BIOTAGE-system (EtOAc/heksan, 10-40 %) for å gi syntesemellomprodukt 6 (5 g, 6,65 mmol, 68 %).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 6,9 (s, 1H), 6,44 (s, 1H), 5,15 -5,05 (m, 1H), 4,15-4,00 (m, 1H), 4,00-3,90 (m, 1H), 3,90-3,80 (m, 1H), 3,75-3,65 (m, 1H), 3,65-3,55 (m, 1H), 3,10-2,90 (m, 2H), 2,69 (s, 3H), 2,25-2,15(m, 2H), 2,00-0,75 (m, 50H), 0,10-0,05 (m, 12H). MS (LCMS) [M+H] = 752,42.

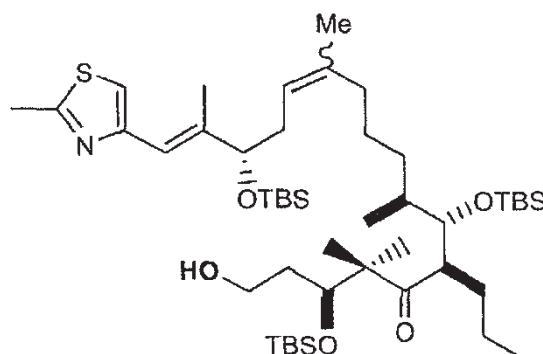
Trinn 7: [0148]



Syntesemellomprodukt 7

[0149] Til en løsning av syntesemellomprodukt 6 (5 g, 6,65 mmol) i 200 ml metylenklorid ved 0 °C ble det tilsatt 2,6-lutidin (7,7 ml, 66,5 mmol), etterfulgt av *tert*-butyldimetylsilyl-trifluormetansulfonat (9,16 ml, 39,9 mmol). Blandingen ble tillatt å varme seg opp til romtemperatur over 16 timer og deretter helt over i mettet NaHCO₃ og ekstrahert med metylenklorid. Det organiske løsningsmidlet ble fordampet og den urene blandingen ble filtrert gjennom et lag av SiO₂ med EtOAc/heksan (10-20 %) for å gi syntesemellomprodukt 7 som en olje (6,9 g, 100 %), ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 6,9 (s, 1H), 6,44 (s, 1H), 5,20-5,05 (m, 1H), 4,10 - 4,00 (m, 1H), 3,95 - 3,85 (m, 1H), 3,80 - 3,75 (m, 1H), 3,70 -3,60 (m, 1H), 3,60 - 3,50 (m, 1H), 3,10 - 3,00 (m, 1H), 2,69 (s, 3H), 2,25 - 2,15 (m, 2H), 2,00 - 0,75 (m, 67H), 0,10 - -0,05 (m, 24H).

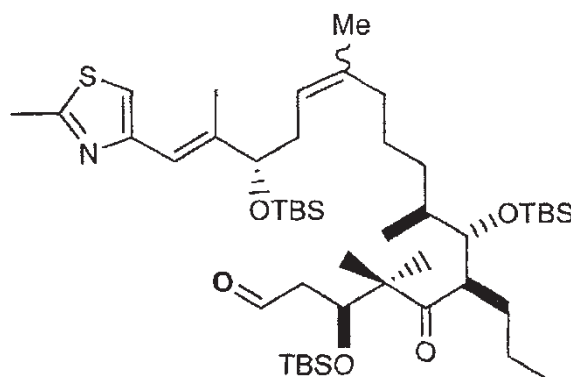
Trinn 8:
[0150]



Syntesemellomprodukt 8

[0151] Til en løsning av syntesemellomprodukt 7 (5 g, 5,1 mmol) i 80 ml metylenklorid og 40 ml MeOH ved 0 °C ble det tilsatt (+/-)-kamfer-10-sulfonsyre (1,18 g, 5,1 mmol). Blandingen ble omrørt i 6 timer ved 0 °C, helt over i mettet NaHCO₃ og ekstrahert med metylenklorid. De organiske lagene ble vasket med saltløsning, tørket over Na₂SO₄ og konsentrert for å gi syntesemellomprodukt 8 som en olje (3,6 g, 4,15 mmol, 81 %). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 6,90 (s, 1H), 6,44 (s, 1H), 5,2-5,1 (m, 1H), 4,1-4,0 (m, 2H), 3,85-3,75 (m, 1H), 3,7-3,6 (m, 2H), 3,1-3,0 (m, 1H), 2,7 (s, 3H), 2,3-2,2 (m, 2H), 2,0-1,9 (m, 6H), 1,7-1,5 (m, 5H), 1,5-1,3 (m, 3H), 1,3-1,1 (m, 6H), 1,1-1,0 (m, 4H), 1,0-0,8 (m, 35H), 0,1- -0,1 (m, 18H). MS (LCMS) [M+H] = 866,49.

Trinn 9:
[0152]



Syntesemellomprodukt 9

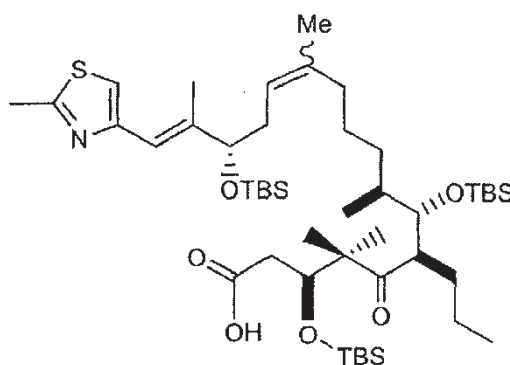
[0153] Til en løsning av oksalyklorid (0,8 ml, 9,14 mmol) i 40 ml metylenklorid ved

-78 °C ble det tilsatt DMSO (1,24 ml, 17,5 mmol). Etter omrøring i 10 mm ble en
 løsning av syntesemellomprodukt 8 (3,6 g, 4,15 mmol) i 40 ml metylenklorid
 tilsatt. Etter 30 min ble TEA (3,76 ml, 27,0 mmol) tilsatt og reaksjonsblandingen ble
 tillatt å varme seg opp til 0 °C i løpet av 2 timer. Mettet NaHCO₃ ble tilsatt og
 5 blandingen ble ekstrahert med metylenklorid. De organiske lagene ble vasket med
 saltløsning, tørket over Na₂SO₄ og konsentrert *under vakuum* for å gi
 syntesemellomprodukt 9 som en olje (3,6 g, 4,16 mmol, 100 %).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 9,77 (m, 1H), 6,9 (s, 1H), 6,44 (s, 1H), 5,3 (s, 1H),
 5,2-5,1 (m, 1H), 4,5-4,4 (m, 1H), 4,1-4,0 (m, 1H), 3,8-3,7 (m, 1H), 3,1-3,0 (m, 1H), 2,7
 10 (s, 3H), 2,6-2,1 (m, 4H), 2,0-1,9 (m, 4H), 1,7-1,5 (m, 4H), 1,5 -1,3 (m, 5H), 1,3-1,1 (m,
 5H), 1,1-1,0 (m, 3H), 1,0-0,8 (m, 35H), 0,1- -0,1 (m, 18H).

Trinn 10:

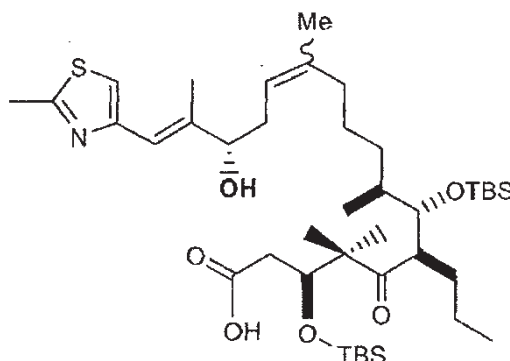
[0154]



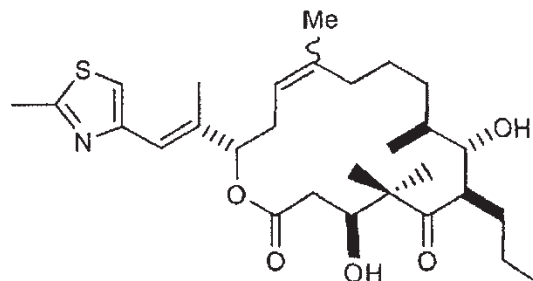
Syntesemellomprodukt 10

20 **[0155]** Til en løsning av syntesemellomprodukt 9 (3,6 g, 4,16 mmol) i 120 ml *t*-BuOH
 og 85 ml THF ved 0 °C ble det tilsatt 30 ml vann, 2-metylbut-1-en (18,5 g, 264 mmol),
 natriumdihydrogenfosfat (1,6 g, 13,2 mmol) og natriumkloritt (2,98 g, 26,4 mmol).
 Etter omrøring i 2 timer ved 0 °C ble blandingen helt over i mettet Na₂S₂O₃-løsning
 (100 ml) og ekstrahert tre ganger med EtOAc (300 ml). De kombinerte organiske
 25 lagene ble vasket med saltløsning, tørket over Na₂SO₄ og konsentrert *under vakuum*.
 Resten ble rensset ved hjelp av et BIOTAGE®-system (EtOAc/heksan, 10-50 %) for å
 gi syntesemellomprodukt 10 som en fargeløs olje (2,8 g, 3,18 mmol, 72 %).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 6,93 (s, 1H), 6,66 (s, 0,5H), 6,46 (s, 0,5H), 5,25-
 5,0 (m, 1H), 4,4 -4,3 (m, 1H), 4,2-4,0 (m, 1H), 3,9-3,7 (m, 1H), 3,2-3,0 (m, 1H), 2,7 (d,
 30 3H), 2,6 -2,4 (m, 1H), 2,4-2,0 (m, 3H), 2,0-1,0 (m, 23H), 1,0-0,8 (m, 35H), 0,1- -0,1
 (m, 18H). MS (LCMS) [M+H] = 881,53.

Trinn 11:**[0156]****Syntesemellomprodukt 11**

[0157] Til en løsning av syntesemellomprodukt 10 (2,8 g, 3,18 mmol) i 5 ml THF ved romtemperatur ble det tilsatt TBAF (42 ml, 1,0 M). Blandingen ble omrørt i 6 t og deretter helt over i mettet NH_4Cl og ekstrahert to ganger med EtOAc (300 ml). De kombinerte organiske lagene ble vasket med HCl (1,0 N, 200 ml), mettet NaHCO_3 og saltløsning, og tørket over Na_2SO_4 for å gi syntesemellomprodukt 11 som en viskøs olje (2,6 g, 3,3 mmol, 100 %). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 6,9 (s, 1H), 6,6-6,5 (m, 1H), 5,2-5,1 (m, 1H), 4,4-4,3 (m, 1H), 4,15-4,05 (m, 1H), 3,8-3,7 (m, 1H), 3,4-3,2 (m, 1H), 3,1-3,0 (m, 1H), 2,8-2,7 (m, 2H), 2,66 (d, 3H), 2,5-2,4 (m, 1H), 2,4-2,3 (m, 2H), 2,3-2,2 (m, 1H), 2,0-0,8 (m, 46H), 0,1-0,0 (m, 12H), MS (LCMS) $[\text{M}+\text{H}] = 766,3$, $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}] = 748,3$.

Trinn 12:**[0158]****13 E/Z-blanding av forbindelse III**

[0159] Til en løsning av syntesemellomprodukt 11 (2,6 g, 3,3 mmol) i 27 ml THF ved RT ble det tilsatt TEA (2,36 ml, 17 mmol), etterfulgt av 2,4,6-triklorbenzoylchlorid, (3,31 g, 13,57 mmol). Reaksjonsblandingen ble omrørt i 20 min, deretter fortynnet med

260 ml toluen. Toluensløsningen ble tilsatt langsomt til en omrørt blanding av DMAP (3,86 g, 31,6 mmol) i 1400 ml toluen i løpet av 4 t, hvoretter TLC indikerte fullføring. HCl (4,0N, 12,5 ml) ble tilsatt, og løsningsmidlet ble fjernet *under vakuum*. Resten ble delvis rensert ved anvendelse av et BIOTAGE®-system (EtOAc/heksan, 0-10 %), noe som gir en blanding som inneholdt et mono-silyl-produkt og den ovennevnte blandingen (13 E/Z-isomerer) inkludert forbindelse III (1,1 g). MS (LCMS) (520,2, 634,2). Dette materialet ble underkastet avbeskyttelse uten ytterligere rensing.

Trinn 13: Forbindelse III

[0160] Til en løsning av reaksjonsblandingen ovenfor (102 mg) ved -20 °C ble det tilsatt 1 ml TFA/CH₂Cl₂ (20 volum-%). Reaksjonsblandingen ble overført til et isbad og omrørt i 1 time. Løsningsmidlet ble fjernet *under vakuum*, det ble tilsatt små porsjoner av toluen og deretter re-fordampet, noe som ga et hvitt faststoff. Den samme reaksjonen ble gjentatt med 125 mg av den delvis rensede blandingen. De to reaksjonsrestene ble kombinert og rensert på en SiO₂-kolonne (EtOAc/heksan, 20-35 %) som ga et hvitt faststoff (180 mg). Det hvite faststoffet ble tatt opp i 5 ml MeOH og rensert ved HPLC (Varian, Dynamax PDA-2-detektor; Waters C18-kolonne; A: vann med 0,05 % TFA, B: acetonitril med 0,05 % TFA, isokratisk). To hovedtopper ble oppsamlet (topp 1, 73,4 mg, 38 %; og topp 2, 41,8 mg, 22 %).

[0161] Topp 1 ble bestemt til å være 13-Z (1-oksanummerering) isomeren ved observasjon av NOE mellom det C-14-olefine protonet og C-13-metylet. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,14 (s, 1H), 6,75 (s, 1H), 5,15-5,05 (m, 1H), 5,05-5,00 (m, 1H), 4,45-4,35 (m, 1H), 3,65-3,55 (m, 1H), 3,35-3,25 (m, 1H), 2,92 (s, 3H), 2,55-2,45 (m, 2H), 2,35-2,25 (m, 2H), 2,25-2,15 (m, 1H), 2,00 (s, 3H), 1,90-1,80 (m, 1H), 1,80-1,65 (m, 5H), 1,60-1,45 (m, 2H), 1,45-1,30 (m, 5H), 1,25-1,15 (m, 3H), 1,05-0,95 (m, 6H), 0,90-0,85 (t, 3H), MS (LCMS) [M+H] = 520,3.

[0162] Topp 2 ble bestemt å være 13 E-isomer (forbindelse III i eksempel-7-forsøket, nedenfor) ved fravær av NOE mellom det C-14-olefine protonet og C-13-metylet.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,03 (s, 1H), 6,65 (s, 1H), 5,3-5,2 (m, 1H), 5,05-5,00 (m, 1H), 4,45-4,40 (m, 1H), 3,65-3,60 (m, 1H), 3,4-3,3 (m, 1H), 2,77 (s, 3H), 2,6-2,3 (m, 4H), 2,15-2,05 (m, 1H), 1,99 (s, 3H), 1,95-1,85 (m, 1H), 1,8-1,7 (m, 2H), 1,57 (s, 3H), 1,50-1,35 (m, 4H), 1,29 (s, 3H), 1,25-1,10 (m, 3H), 1,0-0,9 (m, 6H), 0,9-0,8 (t, 3H), MS (LCMS) [M+H] = 520,3.

Orale *in-vivo*-studier med epotilon D og forbindelse III

[0163] For hver forbindelse (epotilon D og forbindelse III, fremstilt og beskrevet i henhold til forsøket rett ovenfor), ble tre mus pr gruppe (10 mpk og 35 mpk) dosert ved 10 ml/kg ved hjelp av 85 % PEG-400, 10 % TPGS, og 5,0 % etanol. Ved forskjellige intervaller etter dosering ble plasma-, hjerne- og leverforbindelsesnivåene målt etter

vevshomogenisering, ekstraksjon med acetonitril, og væskechromatografi med tandemmassespektrometri (LC/MS/MS). Resultatene fra undersøkelsene er oppsummert i tabell 4 og 5, og resultatene av 35 mpk studien er også rapportert i figur 9. Spesifikt rapporterer tabell 4 konsentrasjonen av epotilon D (forbindelse 1) og
 5 forbindelse III i hjernen etter oral administrering (10 mpk) opptil 24 timer etter dosering (for forbindelse III, i den utstrekning at den fremdeles er detekterbar gitt LLQ), og tabell 5 rapporterer og FIG. 9 plotter konsentrasjonen av epotilon D (forbindelse 1) og forbindelse III i hjernen etter oral administrering (35 mpk) opp til 5 til 24 timer etter dosering (igjen, for forbindelse III, i den grad den er detekterbar). (Et
 10 plott ble ikke fremstilt for dataene i tabell 4 ettersom bare én hjernekonsentrasjonsverdi var detekterbar for forbindelse III). I tabell 4 og 5, nedenfor, der verdiene var <LLQ, er LLQ-verdien notert i parentes.

TABELL 4

Forbindelse	Tid (t)	Plasma-kons. (nM)	Hjerne-kons. (nM)	Hjerne-/plasma-forhold	Hjerne-/leverforhold
Forbindelse III	1	12,3	9,6	0,8	0,1
	5	1,3	<LLQ (3,7 nM)	NQ	NQ
	7	1,2	<LLQ (3,7 nM)	NQ	NQ
	24	<LLQ (0,2 nM)	<LLQ (3,7 nM)	NQ	NQ
Epotilon D	1	15,1	10,6	0,7	0,4
	3	3,9	7,0	1,8	1,3
	4	2,5	9,9	4,0	3,4
	8	1,4	6,4	4,6	1,8
	13	0,1	6,3	47,3	5,1
	24	0,2	9,1	44,5	8,0
	48	<LLQ (0,1 nM)	5,4	NQ	NQ
	96	<LLQ (0,1 nM)	3,0	NQ	NQ

TABELL 5

Forbindelse	Tid (t)	Plasma-kons. (nM)	Hjerne-kons. (nM)	Hjerne-/plasmaforhold	Hjerne-/leverforhold
Forbindelse III	1	47,7	67,7	2,3	0,4
	5	3,0	4,6	1,4	NQ
	24	0,7	<LLQ	NQ	NQ
Epotilon D	1	52,7	61,3	1,1	0,5
	5	3,6	76,9	25,2	11,3
	24	<LLQ (0,5 nM)	118	NQ	18,7

[0164] Som man kan se, for forbindelse III, viser vevsnivåene fra senere tidspunkter (*dvs.* etter 1 time eller mer), at forbindelse-III-nivåene falt raskt i hjernevev. Derfor har forbindelse III dårlig hjerneretensjon som observert i mangelen på målbare hjernenivåer ved 24 timer i begge forsøkene. Oral dosering med epotilon D avslørte hjerne-til-plasmaforhold på 0,7 og 1,1 etter 1 time, noe som gjenspeiler god hjernepenetrasjon. I motsetning til forbindelse III ble hjernenivåene av epotilon D opprettholdt i mer enn 24 timer (tabell 2, 4 og 5, fig. 9-10). Hjerne-til-leverforholdet for oral dosering av epotilon D indikerer at epotilon D blir selektivt holdt tilbake i hjernen, i overensstemmelse med dataene i tabell 1 og 2 etter intravenøs dosering. Spesielt var hjerne-til-leverforholdet for epotilon D 8 og 19 24 timer etter dosering ved henholdsvis 10 mpk og 35 mpk (tabell 4 og 5). Disse verdiene gjenspeiler bemerkelsesverdig høye selektive hjerne-til-leverretensjonsgrader for epotilon D.

EKSEMPEL 8

Epotilon D-halveringstidsdata etter IV-, oral-, og IP-administrering

[0165] For ytterligere å evaluere epotilon D's egenskaper for behandling av tauopatier, ble hjernehalveringstiden for epotilon D beregnet fra flere undersøkelser, og resultatene er rapportert i tabell 6. For å beregne en nøyaktig hjernehalveringstid for en lang halveringstidsforbindelse må målinger tas i flere halveringstider etter en enkeltdose. Fra studien beskrevet i tabell 2, der hjernekonsentrasjonene ble målt gjennom 7 dager etter en enkelt dose, er hjernehalveringstiden av epotilon D (forbindelse I) etter intravenøs dosering 61 timer (tabell 6). Hjernehalveringstiden hos mus etter flere administreringsveier og doseringer var i gjennomsnitt 46,0 +/- 7 t (tabell 6).

Tilsvarende var halveringstiden etter intravenøs dosering hos rotter 31 t (tabell 6). I motsetning til dette var halveringstiden av forbindelse III klart signifikant kortere enn epotilon D, noe som reflekteres i FIG. 9. Som en ytterligere illustrasjon av epotilon D-halveringstiden tilveiebringes FIG. 10 som plotter resultatene av en studie (data rapportert i tabell 2 ovenfor), og viser hjernekoncentrasjonsnivåer i tidsperioder på opptil 175 t etter dosering, etter en 5 mpk bolusintravenøs-administrering.

TABELL 6

Arter	Vei	Dose (MPK)	Halveringstid (timer)
Mus	IV	5	61
Mus	Oral	10	46
Mus	IP	1	44
	IP	10	41, 37, 45, 46
Rotte	IV	1	31

Liste over siteringer

[0166]

Altmann et al., "The Chemistry and Biology of Epothilones - The Wheel Keeps Turning", Chem. Med. Chem., Vol. 2 (2007).

Andorfer, C. et al., "Cell-cycle reentry and cell death in transgenic mice expressing nonmutant human tau isoforms", J. Neurosci., 25(22):5446-5454 (2005).

Andrieux, A. et al., "Microtubule stabilizer ameliorates synaptic function and behavior in a mouse model for schizophrenia", Biol. Psychiatry, 60(11):1224-1230(2006).

Avila, J. et al., "Role of tau protein in both physiological and pathological conditions", Physiol. Rev., 84(2):361-384 (2004).

Ballatore, C. et al., "Paclitaxel C-10 carbamates: potential candidates for the treatment of neurodegenerative tauopathies", Bioorg. Med. Chem. Lett., 17(13):3642-3646 (2007).

Bartosik-Psujek, H. et al., "The CSF levels of total-tau and phosphotau in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis", J. Neural. Transm., 113(3):339-345 (2006).

Berger, Z. et al., "Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy", J. Neurosci., 27(14):3650-3662 (2007).

Bergstralh, D.T. et al., "Microtubule stabilizing agents: their molecular signaling consequences and the potential for enhancement by drug combination", *Cancer Treat. Rev.*, 32(3):166-179 (2006).

Bollag, D.M. et al., "Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action", *Cancer Res.*, 55(11):2325-2333 (1995).

Burke, W.J. et al., "Taxol protects against calcium-mediated death of differentiated rat pheochromocytoma cells", *Life Sci.*, 55(16):313-319 (1994).

Butler, D. et al., "Microtubule-stabilizing agent prevents protein accumulation-induced loss of synaptic markers", *Eur. J. Pharmacol.*, 562(1-2):20-27 (2007).

Chou, T.C. et al., "Desoxyepothilone B : An efficacious microtubule-targeted antitumor agent with a promising in vivo profile relative to epothilone B", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:9642-9647 (1998).

Dickey, C.A. et al., "Current strategies for the treatment of Alzheimer's disease and other tauopathies", *Expert Opin. Ther. Targets*, 10(5):665-676 (2006).

Divinski, I. et al., "Peptide neuroprotection through specific interaction with brain tubulin", *J. Neurochem.*, 98(3):973-984 (2006).

Fellner, S. et al., "Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo", *J. Clin. Invest.*, 110(9):1309-1318 (2002).

Furukawa, K. et al., "Taxol stabilizes $[Ca^{2+}]_i$ and protects hippocampal neurons against excitotoxicity", *Brain Res.*, 689(1):141-146 (1995).

Gerth et al. "Epothilons A and B: Antifungal and Cytotoxic Compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria)," *J. Antibiotics*, 49(6):560-563 (June 1996),

Goedert, M. et al., "Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205", *Neurosci. Lett.*, 189:167-170 (1995).

Gozes, I., "Activity-dependent neuroprotective protein: from gene to drug candidate", *Pharmacol. Ther.*, 114(2):146-154 (2007).

Gozes, I. et al., "Neurotrophic effects of the peptide NAP: a novel neuroprotective drug candidate", *Curr. Alzheimer Res.*, 3(3):197-199 (2006).

Kolman, A., "Epothilone D (Kosan/Roche)", *Curr. Opin. Investing. Drugs*, 5(6):657-667 (2004).

Lace, G.L. et al., "A brief history of tau: the evolving view of the microtubule-associated protein tau in neurodegenerative diseases", *Clin. Neuropathol.*, 26(2):43-58 (2007).

Lee et al., "Microtubule stabilizing drugs for the treatment of Alzheimer's disease", *Neurobiol. Aging*, 15(Supp. 2):S87-S89 (1994).

Magnani, E. et al., "Interaction of tau protein with the dynactin complex", *EMBOJ.*, 26(21):4546-4554 (2007).

Matsuoka, Y. et al., "Intranasal NAP administration reduces accumulation of amyloid peptide and tau hyperphosphorylation in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease at early pathological stage", *J. Mol. Neurosci.*, 31(2):165-170 (2007).

5 Matsuoka, Y. et al., "A neuronal microtubule-interacting agent, NAPVSIPQ, reduces tau pathology and enhances cognitive function in a mouse model of Alzheimer's disease", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 325(1):146-153 (2008).

Michaelis, M.L., "Ongoing in vivo studies with cytoskeletal drugs in tau transgenic mice", *Curr. Alzheimer Res.*, 3(3):215-219 (2006).

10 Michaelis, M.L. et al., "{beta}-Amyloid-induced neurodegeneration and protection by structurally diverse microtubule-stabilizing agents", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 312(2):659-668 (2005).

Michaelis, M.L. et al., "Cytoskeletal integrity as a drug target", *Curr. Alzheimer Res.*, 2(2):227-229 (2005).

15 Minderman, H. et al., "Broad-spectrum modulation of ATP-binding cassette transport proteins by the taxane derivatives ortataxel (IDN-5109, BAY 59-8862) and tRA96023", *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 53(5):363-369 (2004).

Moller, A. et al., "Efficient estimation of cell volume and number using the nucleator and the disector", *J. Microsc.*, 159(Pt. 1):61-71 (1990).

20 Morsch, R. et al., "Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles", *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 58(2):188-197 (1999).

Oddo, S. et al., "Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction", *Neuron*, 39(3):409-421 (2003).

25 Postma, T.J. et al., "Peripheral neuropathy due to biweekly paclitaxel, epirubicin and cisplatin in patients with advanced ovarian cancer", *J. Neuro-Oncology*, 45:241-246 (1999).

Preuss, U. et al., "The 'jaws' model of tau-microtubule interaction examined in CHO cells", *J. Cell Sci.*, 110(Pt. 6):789-800 (1997).

30 Rice, A. et al., "Chemical modification of paclitaxel (Taxol) reduces P-glycoprotein interactions and increases permeation across the blood-brain barrier in vitro and in situ", *J. Med. Chem.*, 48(3):832-838 (2005).

Roberson, E.D. et al., "Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model." *Science*, 316(5825):750-754 (2007).

35 Roy, S. et al., "Axonal transport defects: a common theme in neurodegenerative diseases", *Acta Neuropathol.*, 109(1):5-13 (2005).

Santacruz, K. et al., "Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function", *Science*, 309(5733):476-481 (2005).

Spittaels, K. et al., "Glycogen synthase kinase-3 β phosphorylates protein tau and rescues the axonopathy in the central nervous system of human four-repeat tau transgenic mice", *J. Biol. Chem.*, 275(52):41340-41349 (2000).

5 Sponne, I. et al., "Apoptotic neuronal cell death induced by the non-fibrillar amyloid-beta peptide proceeds through an early reactive oxygen species-dependent cytoskeleton perturbation", *J. Biol. Chem.*, 278(5):3437-3445 (2003).

Terwel, D. et al., "Amyloid activates GSK-3 β to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice", *Am. J. Pathol.*, 172(3):786-798 (2008).

10 Wagner, B.K et al., "Large-scale chemical dissection of mitochondrial function", *Nat. Biotech.*, 26(3):343-351 (2008).

Wostyn, P. et al., "Alzheimer's disease-related changes in diseases characterized by elevation of intracranial or intraocular pressure", *Clin. Neurol. Neurosurg.*, 110(2):101-109 (2008).

15 Zhang, B. et al., "Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(1):227-231 (2005).

P a t e n t k r a v

1. Anvendelse av epotilon D i fremstilling av et medikament for behandling av Alzheimers sykdom i en human pasient med behov for behandling av dette.

5

2. Anvendelse av epotilon D i fremstilling av et medikament for behandling av Tau-assosiert sykdom i en human pasient med behov for behandling derav, der den Tau-assosierte sykdommen er valgt fra frontotemporal demens med parkinsonisme knyttet til kromosom 17 (FTDP-17), progressiv supranukleær parese, kortikobasal degenerasjon, Picks sykdom, agyrophilic grain disease, Downs syndrom, myoton dystrofi, Niemann-Pick C-sykdom, demens Pugilistica, Blint-sykdom og traumatisk hjerneskade.

10

3. Anvendelsen av epotilon D i henhold til krav 1 eller 2, der epotilon D skal administreres intravenøst.

15

4. Anvendelsen av epotilon D i henhold til krav 3, der den kumulative månedlige dosen av epotilon D for å administreres til en human pasient er 30 mg/m^2 eller mindre.

5. Anvendelsen av epotilon D i henhold til krav 4, der den kumulative månedlige dosen av epotilon D som skal administreres til den humane pasienten er 6 mg/m^2 eller mindre.

20

6. Anvendelsen ifølge krav 3, der dosen av epotilon D som skal administreres intravenøst i løpet av en månedssyklus, uavhengig av tidsplanen, er i området mellom $0,01 - 5 \text{ mg/m}^2$.

25

7. Anvendelsen av epotilon D i henhold til krav 6, der dosen av epotilon D som skal administreres intravenøst i løpet av en månedssyklus, uavhengig av tidsplanen, er i området mellom $0,1 - 3 \text{ mg/m}^2$.

30

8. Anvendelsen ifølge krav 1 eller krav 2, der epotilon D skal administreres oralt.

9. Anvendelsen av epotilon D i henhold til krav 8, der dosen av epotilon D som skal administreres oralt i løpet av en månedssyklus, uavhengig av tidsplanen, er i området mellom $0,03$ til 60 mg/m^2 .

35

10. Farmasøytisk formulering for administrering til en human pasient for anvendelse i behandling av Alzheimers sykdom, der formuleringen omfatter en doseringsenhet av epotilon D på 0,0001 - 10 mg/m².

5 **11.** Farmasøytisk formulering for administrering til en human pasient for anvendelse i behandling av en Tau-assosiert sykdom valgt fra frontotemporal demens med parkinsonisme knyttet til kromosom 17 (FTDP-17), progressiv supranukleær parese, kortikobasal degenerering, Picks sykdom, agyrofil kornsykdom, Downs syndrom, myoton dystrofi, Niemann-Pick C-sykdom, demens Pugilistica, Blint-
10 sykdom og traumatisk hjerneskade, der formuleringen omfatter en doseringsenhet av epotilon D på 0,0001 - 10 mg/m².

12. Epotilon D for anvendelse ved behandling av Alzheimers sykdom.

15 **13.** Epotilon D for anvendelse i behandling av en Tau-assosiert sykdom valgt fra frontotemporal demens med parkinsonisme knyttet til kromosom 17 (FTDP-17), progressiv supranukleær parese, kortikobasal degenerering, Picks sykdom, agyrofil kornsykdom, Downs syndrom, myoton dystrofi, Niemann-Pick C-sykdom, demens Pugilistica, Blint-sykdom og traumatisk hjerneskade.

FIG. 1

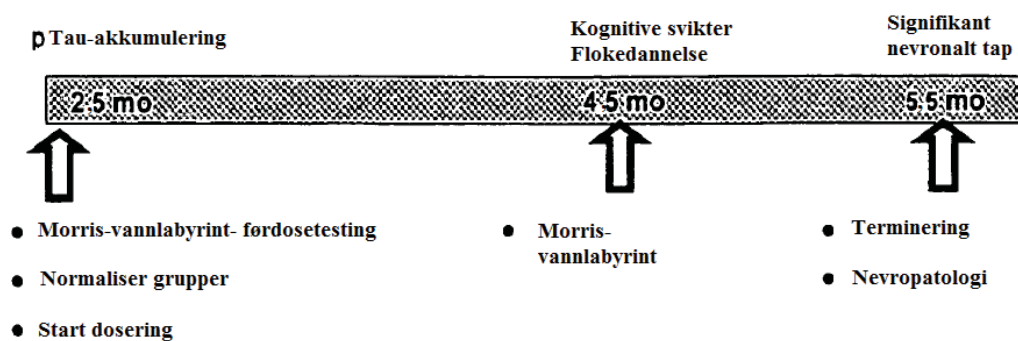


FIG. 2

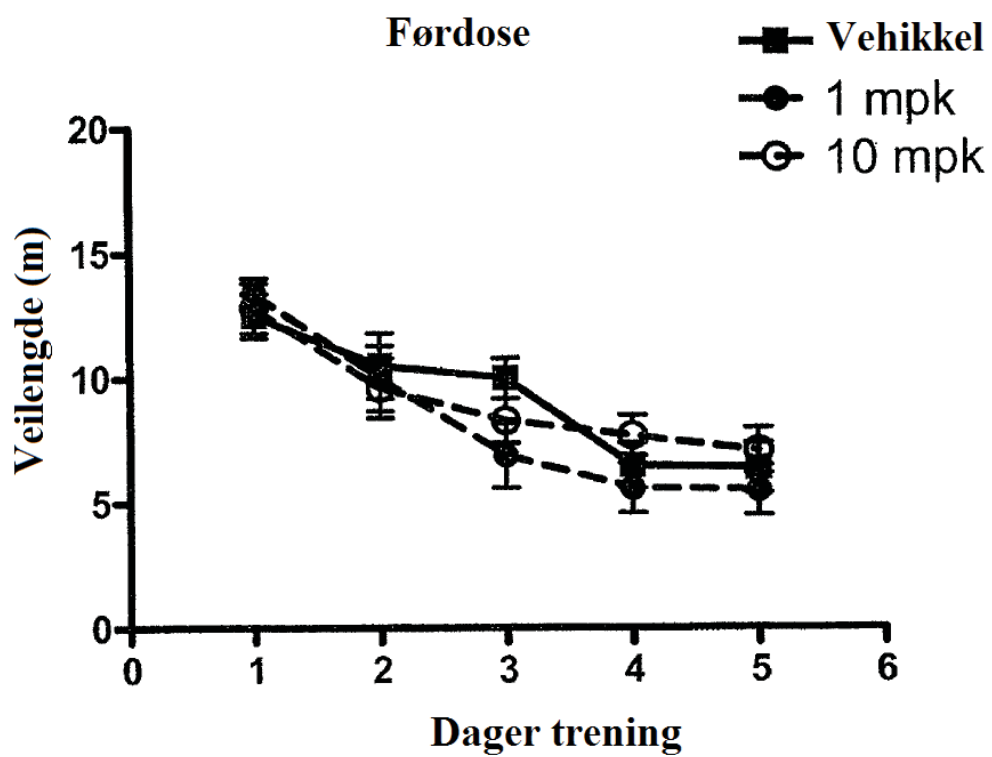


FIG. 3

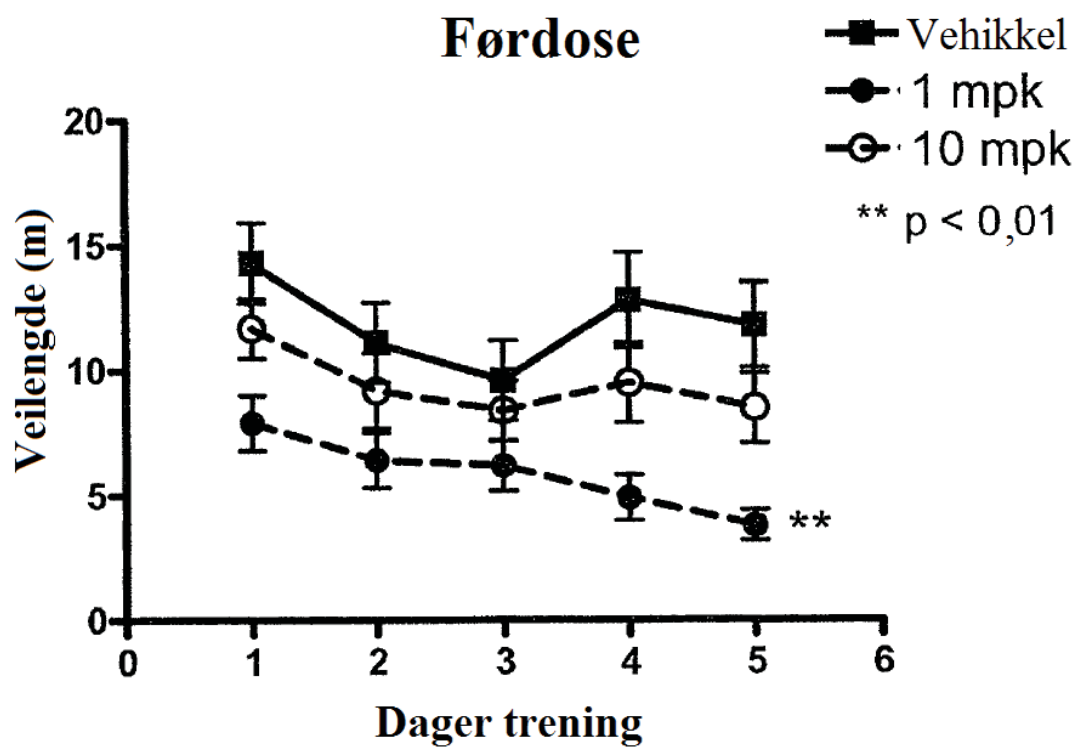


FIG. 4

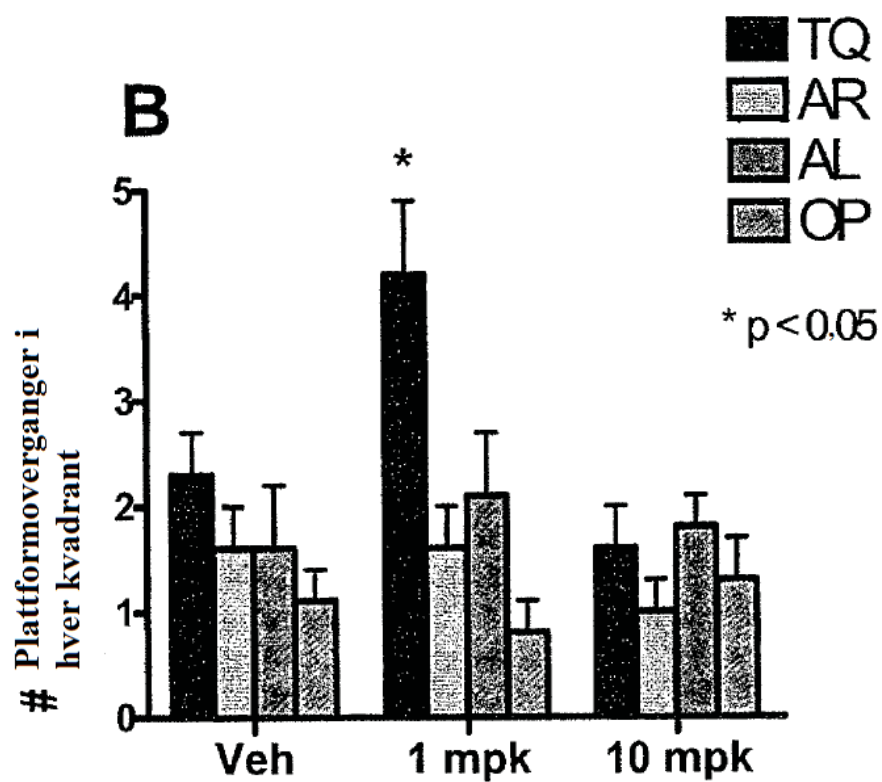
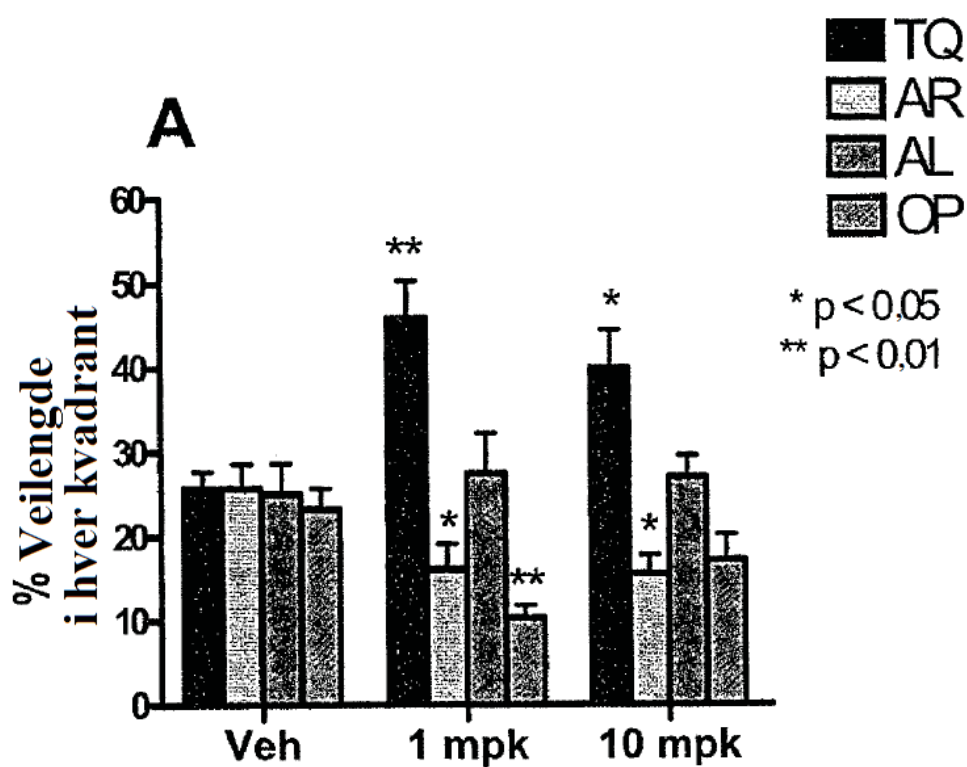


FIG. 5

Totale celler i CA1- eller CA3-regionene til hippokampus

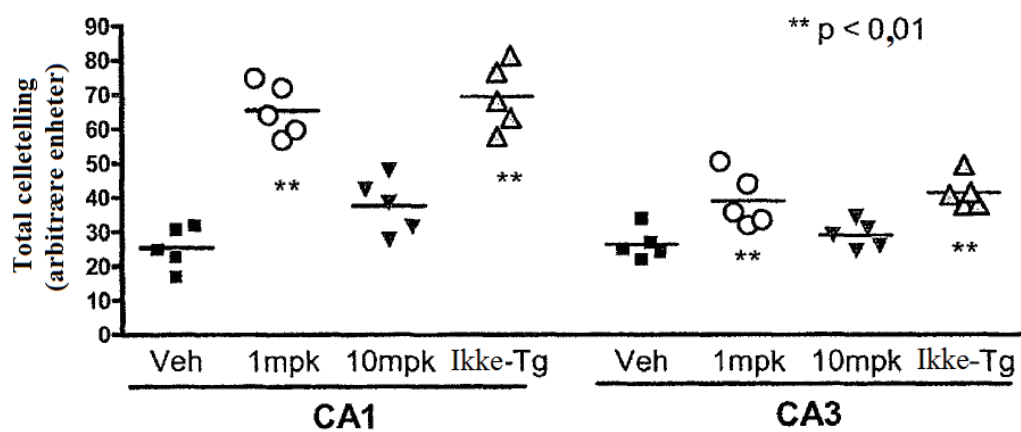


FIG. 6

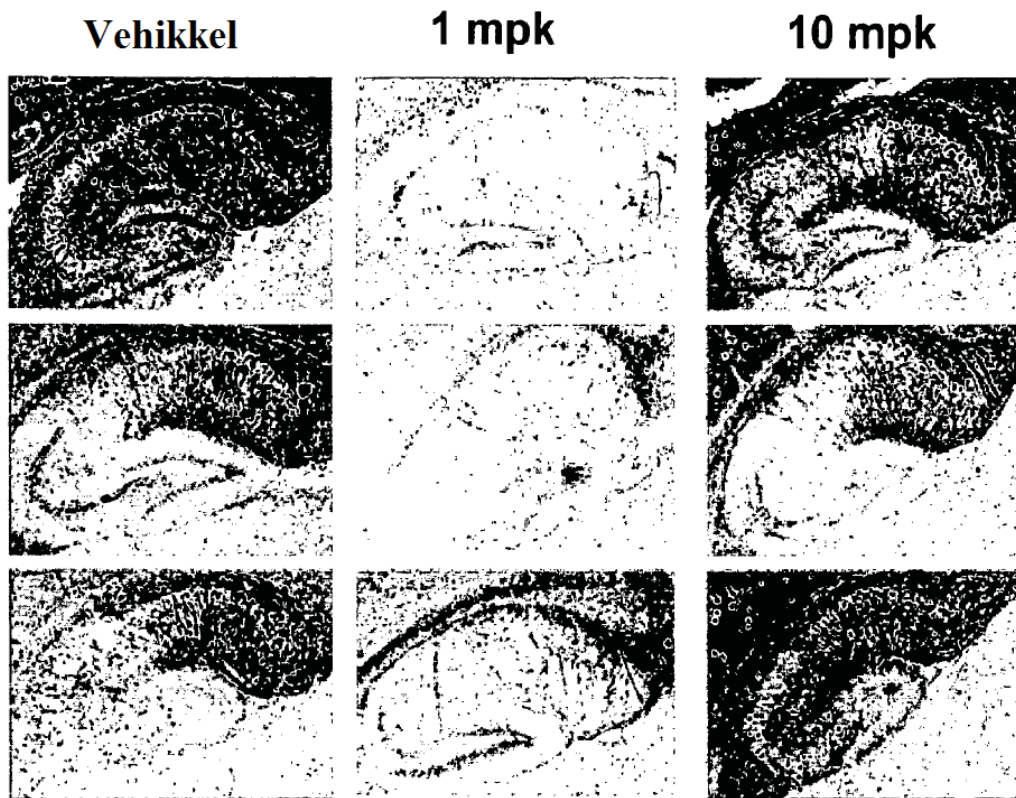


FIG. 7A

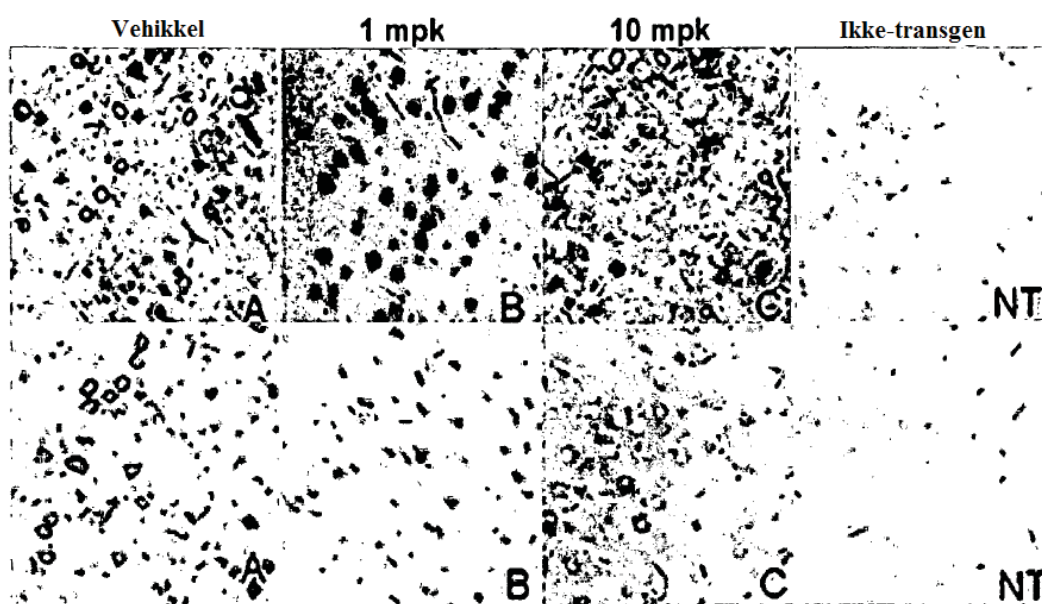


FIG. 7B

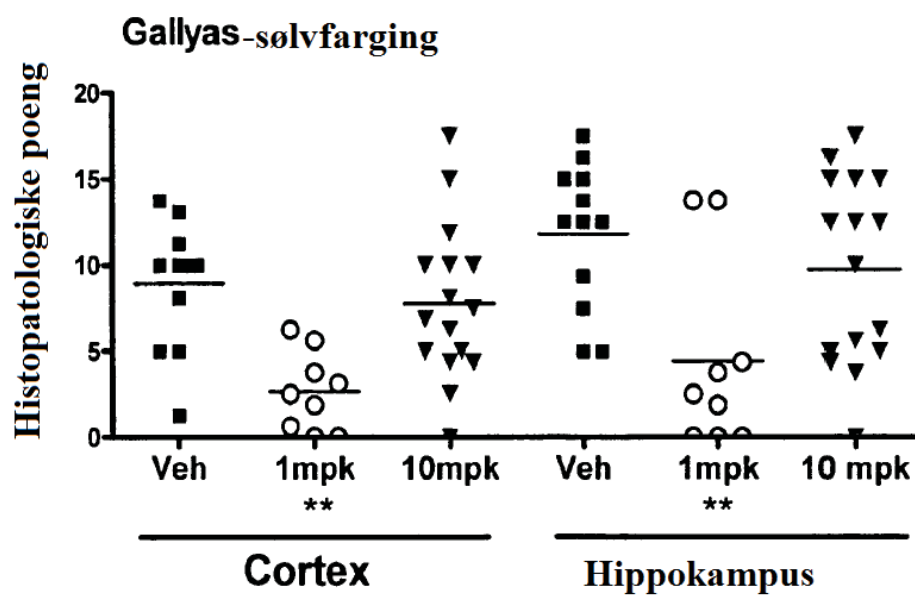


FIG. 8A

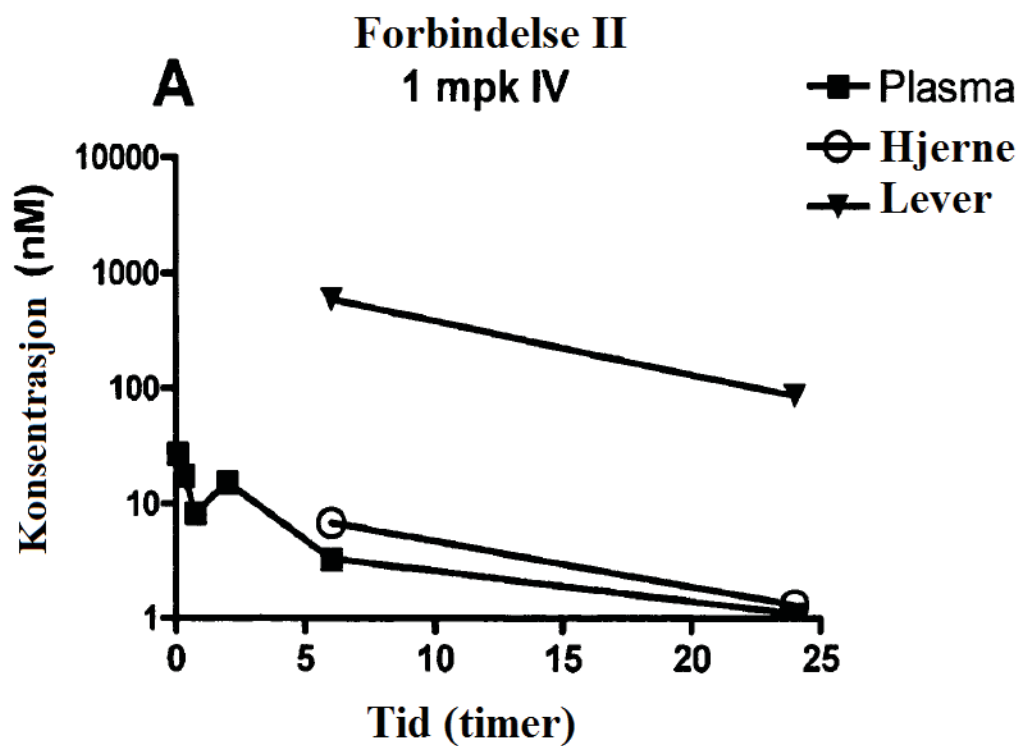


FIG. 8B

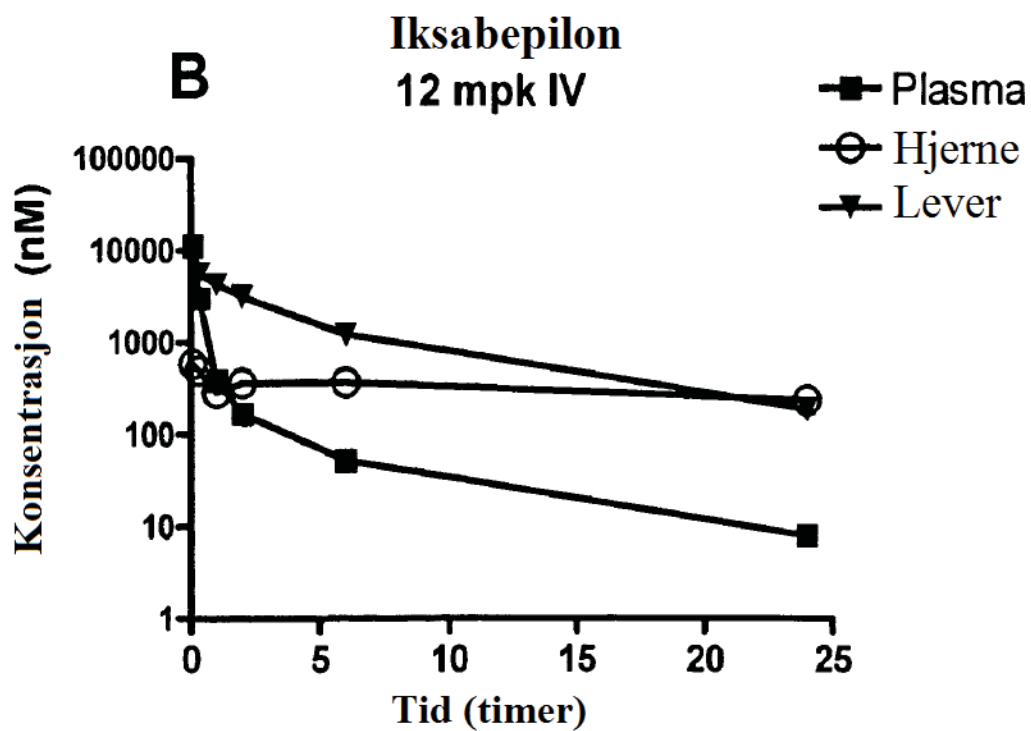


FIG. 8C

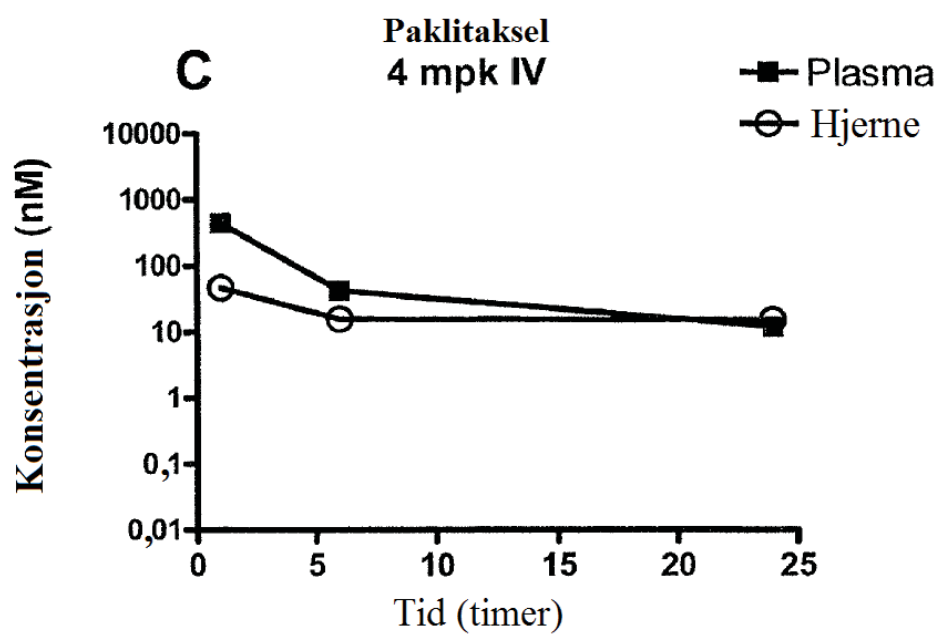


FIG. 8D

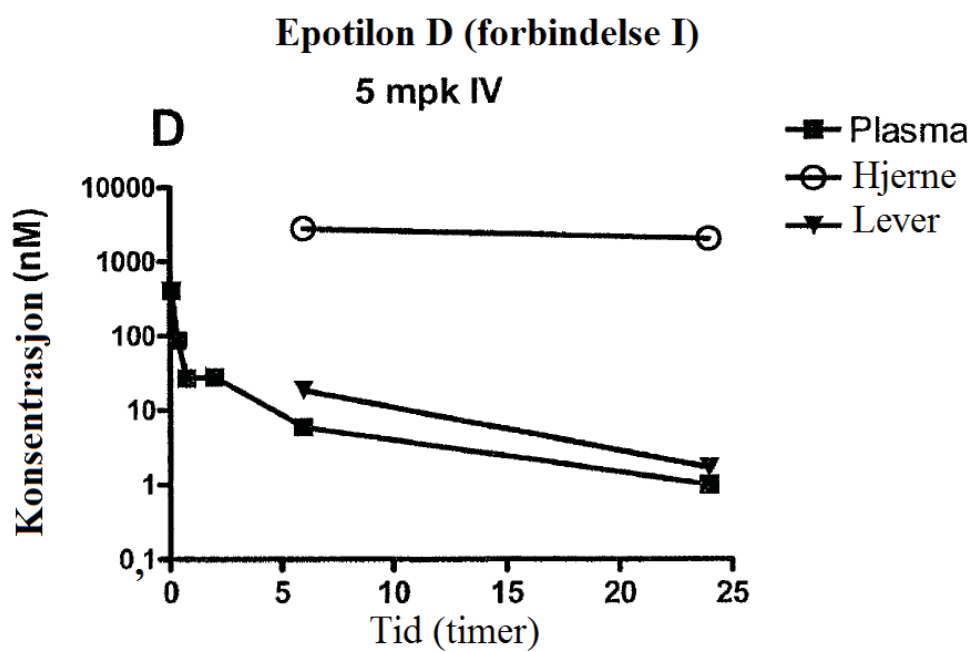


FIG. 9

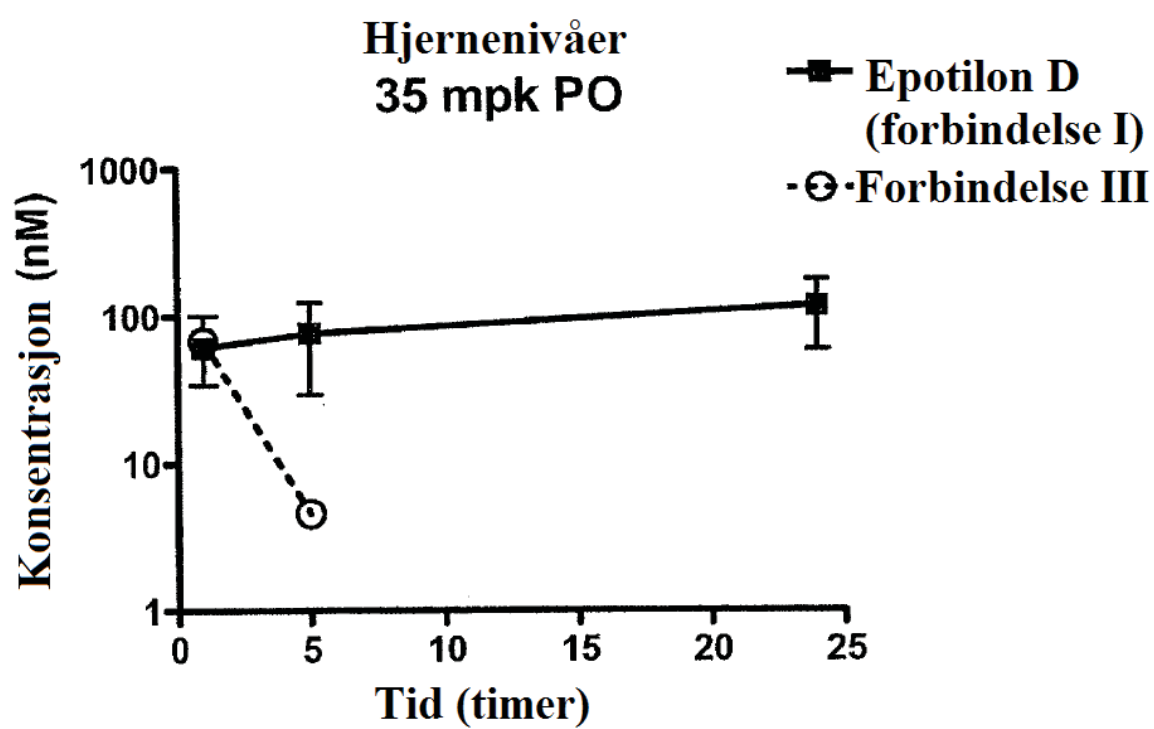


FIG. 10

Epotilon D (forbindelse I)
5 mpk IV

