

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 573**

51 Int. Cl.:
C07D 251/70 (2006.01)
A61K 31/53 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
B01J 20/22 (2006.01)
B01J 20/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05762896 .8**
96 Fecha de presentación: **25.07.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1786788**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.05.2007**

54 Título: **Triazinas sustituidas como ligandos de proteínas priónicas y su uso para detectar o eliminar priones**

30 Prioridad:
27.07.2004 GB 0416699

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.07.2012

73 Titular/es:
**PROMETIC BIOSCIENCES LTD
FREEPORT
BALLASALLA, ISLE OF MAN IM9 2AP, GB**

72 Inventor/es:
**PEARSON, James Christopher;
TATTON, Helen Rosemary y
GURGEL, Patrick Vasconcelos**

74 Agente/Representante:
Linage González, Rafael

ES 2 384 573 T3

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

DESCRIPCIÓN

Triazinas sustituidas como ligandos de proteínas priónicas y su uso para detectar o eliminar priones

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere al campo de interacciones proteína-ligando y más particularmente a compuestos que se unen a proteínas priónicas ("ligandos de proteínas priónicas") y a métodos de uso de los compuestos para detectar o eliminar priones de las muestras biológicas.

10

Antecedentes de la invención

La proteína priónica nativa o celular "PrPc" está ampliamente distribuida en todos los mamíferos y tiene una estructura de proteína y una secuencia de aminoácidos particularmente bien conservadas. Se piensa que los priones infecciosos están compuestos por una forma modificada de la proteína priónica celular normal (PrPc) y se denominan "PrPsc". Los priones tienen algunas propiedades en común con otros patógenos infecciosos, pero no parecen contener ácido nucleico. En cambio, se propone que está implicado un cambio conformacional tras la traducción en la conversión de PrPc no infecciosa en PrPsc infecciosas durante el cual las hélices α se transforman en láminas β . PrPc contiene tres hélices α y tiene una estructura de láminas β pequeñas; por el contrario, PrPsc es rica en láminas β . Se cree que la conversión de PrPc en PrPsc conduce al desarrollo de encefalopatías espongiiformes transmisibles (TSE) durante las que se acumula PrPsc en el sistema nervioso central (SNC) y van acompañadas por cambios neuropatológicos y disfunción neurológica. PrPsc, denominado a menudo la forma de "tembladera" de la proteína priónica, se considera necesario y posiblemente suficiente para la transmisión y patogénesis de estas enfermedades neurodegenerativas transmisibles de animales y seres humanos.

25

Los ejemplos específicos de TSE incluyen tembladera, que afecta a ovejas y cabras; encefalopatía espongiiforme bovina (BSE), que afecta al ganado; encefalopatía transmisible del visón; encefalopatía espongiiforme felina; y enfermedad consuntiva crónica (CWD) de ciervo mulo, ciervo de cola blanca, ciervo de cola negra y alce. En seres humanos, las enfermedades de TSE pueden presentarse como kuru, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), síndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS), insomnio letal y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob variante (CJDv). CJDv surgió recientemente en seres humanos como resultado de la epidemia de BSE en Gran Bretaña y se produjo lo más probablemente por el consumo de productos alimenticios derivados de ganado infectado con BSE o "enfermedad de las vacas locas". Un número desconocido de personas en el RU ingirió alimento potencialmente contaminado con tejido nervioso de ganado infectado con BSE durante mediados de la década de 1980 a principios de la década de 1990. Debido a que el periodo de incubación para la enfermedad contraída por vía oral puede ser de más de 20 años en seres humanos, la verdadera incidencia de CJDv puede no ser evidente durante muchos años. Hasta la fecha, se sabe que más de 150 personas han contraído la enfermedad, principalmente en el RU; sin embargo, se han notificado casos en Canadá, Francia, Hong Kong, Irlanda, Italia y los EE.UU. La exportación de productos alimenticios bovinos contaminados del RU a todo el mundo indica una posible presencia global de BSE y por tanto la probabilidad de CJDv. La detección de BSE en la mayoría de los países europeos, Canadá, EE.UU., Japón e Israel concuerda con estas observaciones. Por consiguiente, la capacidad de detectar y eliminar proteína priónica infecciosa de una variedad de materiales incluyendo productos alimenticios es de gran importancia.

45

Históricamente, el diagnóstico de TSE se basó en la aparición de signos clínicos de la enfermedad y pudo confirmarse sólo mediante examen histológico cadavérico de tejido cerebral. Una característica de todas las TSE es la falta de una respuesta inmunitaria del huésped medible al agente. Por tanto, no se producen anticuerpos y no puede usarse una prueba serológica convencional para identificar animales infectados. Recientemente, la identificación de una proteína priónica en el cerebro ha mejorado la capacidad de obtener un diagnóstico de enfermedad.

50

Además de la ingestión de productos infectados de origen bovino, la transfusión de sangre y el trasplante de órganos representan otro posible modo de transmisión de CJDv entre seres humanos. Se han producido dos casos sospechosos de transmisión de CJDv por transfusión de sangre en el RU. Actualmente se desconoce la infectividad de CJDv en seres humanos por transfusión de sangre, pero existe una preocupación creciente de que esto pueda ser un medio más eficaz de transmisión de CJDv en comparación con la ingestión. Esto concuerda con datos de modelos animales experimentales incluyendo transmisión a partir de ovejas. A diferencia de otras TSE humanas, PrPsc está presente en el sistema linforreticular de pacientes con CJDv, aumentando así la probabilidad de que el agente infeccioso esté en la sangre y de su transmisión a través de la transfusión de sangre. Otros factores que aumentan la preocupación con respecto al riesgo de transmisión por transfusión incluyen el número desconocido, pero presumiblemente alto de personas expuestas a BSE y la falta de una prueba de diagnóstico preclínico para CJDv. Además, la virulencia de CJDv parece aumentarse tras la adaptación de especies en primates y ratones, lo que sugiere que la transmisión de ser humano a ser humano puede ser más eficaz que de vaca a ser humano. Por tanto, existe una necesidad urgente de métodos para evitar la transmisión de CJDv por transfusión de sangre. Tales medidas pueden incluir una identificación temprana de donantes infectados y la eliminación e inactivación de agentes de TSE en alimento derivado de animales y productos sanitarios destinados para el consumo o aplicaciones

65

en animales o seres humanos, productos derivados de sangre bovina y humana y trasplantes de órganos. Desgraciadamente, PrPsc es notablemente resistente a métodos químicos y físicos de inactivación, y un método de inactivación selectivo es difícil de obtener.

5 La eliminación de priones a través de la interacción específica con ligandos parece más prometedora. Ya se han identificado varios ligandos que se unen a proteínas priónicas. Se han examinado bibliotecas combinatorias de péptidos para ligandos que se unen a la secuencia de repetición octapeptídica (PHGGGWGQ) encontrada en todas las proteínas priónicas de mamíferos conocidas y se descubrió una serie de ligandos, tal como se describe en el documento WO 01/77687. Otros materiales incluyen una variedad de polímeros, por ejemplo polimetacrilato de amino de TosoBioSep, generalmente resinas de intercambio iónico (véase la patente estadounidense n.º 5.808.011 de Gawryl *et al*), ligandos que interactúan con placa amiloide por ejemplo rojo Congo (Ingrosso *et al*, J. Virology 69:506-508 (1995)), 4-yodo,4-desoxidorubicina (Tagliavini *et al*, Science 276:1119-1122 (1997)), anfotericina B, porfirinas y ftalocianinas (Priola *et al*, Science 287:1503-1506 (2000)), metales (Stockel *et al*, Biochemistry, 37, 7185-7193 (1998)), péptidos que interactúan con PrP para formar complejos (véase la patente estadounidense 5.750.361 de Prusiner *et al* y Soto *et al*, Lancet, 355:192-197 (2000)), heparina y otros polianiones polisulfatados (Caughey *et al*, Binding of the Protease-sensitive form of prion protein PrP to Sulphated Glycosaminoglycan and Congo Red, J. Virology 68:2135-2141(1994)), anticuerpos (Kascsak *et al*, Immunological Invest. 26:259-268 (1997)), y otras proteínas, por ejemplo plasminógeno (Fischer *et al*, Nature 408:479-483 (2000)). Actualmente, no se ha caracterizado completamente ningún ligando ni se ha encontrado que pueda unirse a priones a partir de una amplia variedad de medios, aunque algunos pueden ser útiles en circunstancias específicas (véase la patente estadounidense n.º 5.808.011 de Gawryl *et al*). En E. N. Soto Renou *et al*, Journal of Molecular Recognition 2004, 17, 248-261, se dan a conocer ligandos de afinidad para proteínas priónicas.

25 Hasta la fecha, las enfermedades de TSE humanas son mortales en un 100%. Desgraciadamente, aún cuando se han notificado varios compuestos incluyendo anfotericinas, polianiones sulfatados, colorante rojo Congo y antibióticos de antraciclina como agentes terapéuticos prospectivos, todos han demostrado sólo un potencial moderado para impedir la propagación priónica, y ninguno ha demostrado tener algún efecto sobre la eliminación de priones preexistentes de un huésped infectado. Por tanto, sigue habiendo una necesidad urgente de nuevos agentes terapéuticos.

30 Se piensa que el ensamblaje y desensamblaje de proteínas normalmente solubles dando lugar a formas insolubles y alteradas de manera conformacional es un procedimiento causativo en una variedad de otras enfermedades, muchas de las cuales son enfermedades neurológicas. Se entiende poco la relación entre la aparición de la enfermedad y la transición desde la proteína normal hasta la alterada de manera conformacional. Los ejemplos de tales proteínas insolubles además del prión incluyen: péptido β -amiloide en placas amiloides de la enfermedad de Alzheimer y la angiopatía amiloide cerebral (CAA); depósitos de α -sinucleína en cuerpos de Lewy de la enfermedad de Parkinson; tau en marañas neurofibrilares en la demencia frontotemporal y la enfermedad de Pick; superóxido dismutasa en la esclerosis lateral amiotrófica; y huntingtina en la enfermedad de Huntington.

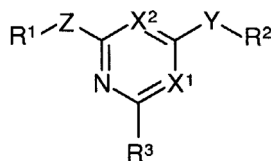
40 A menudo estas proteínas altamente insolubles forman agregados compuestos por fibrillas que no se ramifican con la característica común de una conformación de láminas β plegadas. En el sistema nervioso central, la proteína amiloide puede estar presente en vasos sanguíneos cerebrales y meníngeos (depósitos cerebrovasculares) y en el parénquima cerebral (placas). Estudios neuropatológicos en modelos humanos y animales indican que las células proximales a depósitos de amiloide tienen sus funciones normales alteradas.

45 El mecanismo preciso mediante el que se forman placas neuríticas y la relación de la formación de las placas con los procesos neurodegenerativos asociados con la enfermedad se desconocen en gran parte. Son necesarias metodologías que puedan separar fácilmente o que puedan distinguir entre dos o más formas conformacionales diferentes de una proteína, por ejemplo PrPc y PrPsc, para entender el proceso de conversión y para encontrar estructuras que interactuarán de manera específica con la forma asociada con la enfermedad. Las metodologías actuales para separar o distinguir entre isoformas incluyen: movilidad diferencial en geles de poliacrilamida en presencia de un caótopo tal como urea, es decir geles de gradiente transversal de urea (TUG); sensibilidad diferencial al tratamiento con proteasa, por ejemplo proteinasa K (PK) y la detección del producto de digestión resistente a PK de PrPsc denominado PrPres; estabilidad de temperatura diferencial; solubilidad relativa en detergentes no iónicos; y la capacidad de las estructuras fibrilares para unirse a determinados productos químicos, por ejemplo rojo Congo e isoflavina S. Sin embargo, sigue habiendo una necesidad aún por resolver de identificar reactivos de alta afinidad que sean específicos para la proteína alterada de manera conformacional y formas especialmente asociadas con la enfermedad. Tales reactivos pueden ser útiles para desarrollar kits de diagnóstico, para la separación y la purificación de las diferentes formas de la proteína, para la eliminación de formas infecciosas de la enfermedad de agentes terapéuticos, productos biológicos, vacunas y productos alimenticios y para la terapia.

Sumario de la invención

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona el uso, *ex vivo*, de un compuesto de fórmula (I):

65



(I)

en la que:

- 5 R³ es hidrógeno o un sustituyente de grupo arilo o R³ es un soporte sólido opcionalmente unido a través de un espaciador;

Z representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o NR⁴;

- 10 Y representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o NR⁵;

en las que R⁴ y R⁵, que pueden ser iguales o diferentes, representan hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, fenilo opcionalmente sustituido, bencilo opcionalmente sustituido o β-feniletilo opcionalmente sustituido;

- 15 uno de X¹ y X² representa un átomo de nitrógeno y el otro de X¹ y X² representa un átomo de nitrógeno o CR⁶, en el que R⁶ representa hidrógeno o un sustituyente de grupo arilo;

y en la que:

- 20 R¹ representa un grupo -(CH₂)_m-Q¹, en el que m es desde 0 hasta 7, y Q¹ representa -NR¹¹R¹², en el que R¹¹ y R¹² junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un grupo heterocicloalquilo opcionalmente sustituido; y

- 25 R² representa un grupo -(CH₂)_n-Q², en el que n es desde 0 hasta 7, y Q² representa -CR²¹R²²R²³ o -NR²¹R²², en los que R²³ representa hidrógeno, alquilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo, y R²¹, R²², junto con el átomo de carbono o nitrógeno al que están unidos, forman un grupo cicloalquilo opcionalmente sustituido o heterocicloalquilo opcionalmente sustituido;

para la unión por afinidad de una proteína priónica.

- 30 Los compuestos de fórmula (I) pueden ser útiles para detectar o eliminar una proteína priónica de una muestra, tal como un fluido biológico o una muestra ambiental. Los compuestos se usan para detectar o eliminar toda la proteína priónica de la muestra o pueden elegirse selectivamente para detectar o eliminar una forma individual de proteína priónica y por tanto pueden usarse para distinguir entre proteína priónica infecciosa y no infecciosa en la muestra de pacientes aquejados de TSE humana y animales aquejados de tembladera, BSE o CWD. Los compuestos son útiles en métodos para detectar proteínas priónicas en una muestra, tal como un fluido biológico derivado de ser humano o animal o una muestra ambiental, así como en métodos para diagnosticar y tratar enfermedad priónica. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden ser útiles en el tratamiento o el diagnóstico de patologías tales como CJD, CJDv, GSS, insomnio letal, tembladera, BSE y CWD y otras TSE usando sangre completa, componentes de la sangre, células, suero, plasma, derivados de plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, lágrimas, amígdalas, apéndice y otros tejidos. Los compuestos también pueden ser útiles para la eliminación de proteínas priónicas de una muestra, tal como una muestra de sangre, componentes de la sangre, células, suero, plasma, derivados de plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, lágrimas, amígdalas, apéndice y otros materiales.

- 45 En otro aspecto, la invención proporciona un método para detectar una proteína priónica en una muestra, y/o eliminar una proteína priónica de una muestra, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con un compuesto de fórmula (I) tal como se definió anteriormente.

- 50 Los compuestos de fórmula (I) que no se unen a un soporte sólido, pero en la que R³ representa hidrógeno o un sustituyente, también pueden ser útiles en el tratamiento o retardo del desarrollo de una patología asociada con priones en un sujeto. Por ejemplo, los ligandos de la invención pueden ser útiles en el tratamiento de patologías tales como CJD, CJDv, GSS, insomnio letal, tembladera, BSE y CWD. Sin querer restringirse a ninguna teoría, tales ligandos pueden actuar inhibiendo la polimerización de PrPsc o a través de la inhibición de la interacción de PrPsc y PrPc ralentizando así el desarrollo de PrPsc adicionales.

- 55 Por tanto, en un aspecto adicional de la invención, se proporciona un uso de un compuesto de fórmula (I) que no se une a un soporte sólido en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una patología asociada con priones.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las realizaciones preferidas.

5 Descripción detallada de la invención

Definiciones

10 Los términos “un,” “una” y “el/la” tal como se usan en el presente documento se definen que significan “uno o más” e incluyen el plural a menos que el contexto sea inapropiado.

15 El término “3F4” se refiere al anticuerpo monoclonal específico frente a formas nativas de PrPc, pero no PrPsc o PrPres nativas. El anticuerpo tiene especificidad por formas desnaturalizadas de PrPc, PrPsc y PrPres de hámster y ser humano.

20 El término “alqueno” se refiere a un grupo de hidrocarburo alifático que contiene un doble enlace carbono-carbono y que puede ser lineal o ramificado. Los grupos alqueno preferidos tienen de 2 a 12 átomos de carbono en la cadena, y más preferiblemente de 2 a 6 átomos de carbono en la cadena, por ejemplo propeno, n-butenilo, iso-butenilo, 3-metilbut-2-enilo, n-pentenilo y heptenilo. Los términos “cicloalqueno” y “heterocicloalqueno” son análogos.

25 El término “alcoxilo” se refiere a un grupo alquil-O- en el que el alquilo es tal como se describe en el presente documento. Los ejemplos incluyen metoxilo, etoxilo, propoxilo, isopropoxilo, butoxilo y pentoxilo.

30 El término “alquilo” tal como se usa en el presente documento, solo o en combinación, se refiere a un hidrocarburo saturado lineal o ramificado que tiene de 1 a 15 átomos de carbono. Se prefieren grupos alquilo inferiores con de 1 a 6 carbonos, por ejemplo metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, isobutilo, terc-butilo, n-pentilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, n-hexilo, 4-metilpentilo, neopentilo y 2,2-dimetilpropilo. Cuando se describe un grupo alquilo como “opcionalmente sustituido” entonces este grupo puede estar sustituido con uno o más sustituyentes, particularmente con uno o más “sustituyentes de grupo alquilo” tal como se define en el presente documento.

35 El término “sustituyente de grupo alquilo” se refiere, a menos que se defina lo contrario, a hidroxilo, amino, alquilo, halógeno, hidroxialquilo, amida, acilo, acilamino, alcoxilo, alcoxycarbonilo, alquilendioxilo, alquilsulfino, alquilsulfonilo, alquiltio, aroilo, aroilamino, arilo, arilalcoxilo, arilalcoxycarbonilo, arilalquiltio, ariloxilo, ariloxycarbonilo, arilsulfino, arilsulfonilo, ariltio, carboxilo (o un bioisómero ácido), ciano, heteroarilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, heteroarilalquilo, heteroarilamino, heteroariloxilo, nitro o trifluorometilo.

40 El término “arilo” se refiere a un grupo aril-CO- en el que el grupo arilo es tal como se describe en el presente documento, por ejemplo benzoilo, y 1- y 2-naftoilo.

El término “arilo” como un grupo o parte de un grupo se refiere a:

45 a) un resto carbocíclico aromático monocíclico o multicíclico opcionalmente sustituido de 6 a 18 átomos de carbono, tal como fenilo, naftaleno, aceantrileno, acenaftileno, acefenaftileno, azuleno, criseno, indaceno, indeno, flúor, fenaleno y fenantreno; o

b) un resto carbocíclico aromático multicíclico parcialmente saturado opcionalmente sustituido en el que se condensan un arilo y cicloalquilo, cicloalqueno, heterocicloalquilo o heterocicloalqueno juntos para formar una estructura cíclica, tal como un anillo de indolinilo, tetrahidronaftilo, indenilo o indanilo.

50 Los grupos arilo preferidos son grupos fenilo opcionalmente sustituidos.

55 Cuando se describe un grupo arilo como “opcionalmente sustituido”, entonces este grupo puede estar sustituido con uno o más sustituyentes, particularmente con uno o más “sustituyentes de grupo arilo” tal como se define en el presente documento.

60 Un “sustituyente de grupo arilo” se refiere, a menos que se defina lo contrario, a un hidroxilo, amino, alquilo, halógeno, hidroxialquilo, amida, acilo, acilamino, alcoxilo, alcoxycarbonilo, alquilendioxilo, alquilsulfino, alquilsulfonilo, alquiltio, aroilo, aroilamino, arilo, arilalcoxilo, arilalcoxycarbonilo, arilalquiltio, ariloxilo, ariloxycarbonilo, arilsulfino, arilsulfonilo, ariltio, carboxilo (o un bioisómero ácido), ciano, heteroarilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, heteroarilalquilo, heteroarilamino, heteroariloxilo, nitro, oxo o trifluorometilo.

65 Tal como se usa en el presente documento, el término “composiciones derivadas de sangre” pretende incluir sangre completa, concentrado de glóbulos rojos, plasma, suero, fracciones pobres en plaquetas y ricas en plaquetas, concentrados de plaquetas, glóbulos blancos, precipitados de plasma sanguíneo, precipitados de fraccionamiento de plasma sanguíneo y sobrenadantes, preparaciones de inmunoglobulina incluyendo IgA, IgE, IgG e IgM, concentrados del factor de coagulación purificados, concentrado de fibrinógenos, u otras diversas composiciones

que se derivan de seres humanos o animales. También incluyen proteínas derivadas de sangre purificadas preparadas mediante cualquiera de diversos métodos comunes en la técnica incluyendo intercambio iónico, afinidad, permeación en gel, y/o cromatografía hidrófoba o mediante precipitación diferencial.

5 El término "biblioteca combinatoria" se refiere a una colección de productos químicos que se han sintetizado mediante técnicas de química combinatoria en fase sólida. Esta definición abarca usar un método de división-acoplamiento-recombinación que genera millones de compuestos aleatorios o puede diseñarse para incluir estructuras definidas. Los elementos estructurales pueden ser estructuras de triazina, y similares.

10 El término "cicloalquilo" se refiere a un sistema de anillos monocíclico, bicíclico o policíclico saturado de 3 a 12 átomos de carbono, con o sin una cadena lateral, y opcionalmente interrumpido por $-(C=O)-$. Los grupos cicloalquilo preferidos son monocicloalcanos, por ejemplo ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo; bicicloalcanos que se conectan a un carbono, por ejemplo espriononano; y sistemas de anillos en puente saturados incluyendo bicicloalcanos que se conectan a dos carbonos, por ejemplo norbornano, biciclo[4.3.2]undecano,
15 biciclo[4.1.0]heptano y decalina, y sistemas en puente policíclicos, por ejemplo adamantina. Más preferiblemente, el grupo cicloalquilo es un monocicloalcano o sistema de anillos en puente. Lo más preferiblemente, el grupo cicloalquilo es ciclohexilo, norbornano o adamantano.

20 Cuando se describe un grupo cicloalquilo como "opcionalmente sustituido" entonces este grupo puede estar sustituido con uno o más sustituyentes, particularmente con uno o más "sustituyentes de grupo alquilo" tal como se define en el presente documento.

El término "halógeno" significa flúor, cloro, bromo o yodo.

25 El término "heteroarilo" como un grupo o parte de un grupo se refiere a:

a) un arilo monocíclico opcionalmente sustituido en el que uno o más de los miembros de anillo es/son elemento(s) distintos de carbono, por ejemplo N, O o S, y ejemplos preferidos son, por ejemplo grupos bencimidazoilo, benzotiazolo, furilo, imidazoilo, indolilo, indolizínilo, isoxazoilo, isoquinolilo, isotiazolo, oxadiazolo, piranilo, pirazinilo, piridazinilo, pirazoilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, tiazolilo, tienilo y triazolilo, monocíclicos o bicíclicos opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes de grupo arilo tal como se define en el presente documento, a menos que se defina lo contrario; o

b) un resto heterocarbocíclico multicíclico parcialmente saturado opcionalmente sustituido en el que un grupo heteroarilo y un cicloalquilo, cicloalquenilo, heterocicloalquilo o heterocicloalquenilo se condensan juntos para formar una estructura cíclica (ejemplos de tales grupos incluyen grupos pirindanilo, opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes de grupo arilo tal como se define en el presente documento, excepto cuando se defina lo contrario).

40 Cuando se describe un grupo heteroarilo como "opcionalmente sustituido" entonces este grupo puede estar sustituido con uno o más sustituyentes, particularmente con uno o más "sustituyentes de grupo arilo" tal como se define en el presente documento.

45 El término "heterocicloalquilo" se refiere a un grupo cicloalquilo con al menos un átomo de carbono del anillo sustituido por un heteroátomo o grupo que contiene heteroátomo, por ejemplo O, S, N o NR^7 , en el que R^7 es hidrógeno o alquilo. Los grupos heterocicloalquilo preferidos contienen uno o más átomos de N, por ejemplo imidazolidina, piperidina, morfolina, piperazina, piroolidinona, pirazolidina y quinuclidina. Ejemplos más preferidos son heteromonocicloalcanos con uno o más átomos de N, por ejemplo piperidina y piperazina. Cuando se describe un grupo heterocicloalquilo como "opcionalmente sustituido" entonces este grupo puede estar sustituido con uno o más sustituyentes, particularmente con uno o más "sustituyentes de grupo alquilo" tal como se define en el presente documento.

55 El término "grupo hidrófobo" se refiere a un grupo lipófilo que es habitualmente eléctricamente neutro y no polar. Los grupos hidrófobos prefieren disolventes neutros y no polares o entornos moleculares, en contraposición de entornos o disolventes acuosos. Por tanto, un grupo hidrófobo tendrá una afinidad por otros grupos hidrófobos en un entorno fisiológico normal. Los ejemplos de grupos hidrófobos habitualmente incluyen grupos alquilo y cicloalquilo, preferiblemente no sustituidos, y grupos arilo.

60 Los compuestos descritos en la invención generalmente se usarán a un pH que es igual, o próximo, al pH fisiológico. El carácter hidrófobo de los compuestos, o de restos particulares dentro de estos compuestos, determinará si el resto implicado está cargado a un pH de este tipo. Por ejemplo 1-(2-aminoetil)piperidina es un grupo hidrófobo cuando, a pH fisiológico, el nitrógeno está descargado.

65 El término "ligando" se refiere a una molécula a la que se une una proteína, péptido o polipéptido. Los ligandos de la presente invención son compuestos heteroaromáticos sustituidos tales como triazinas.

El término "PrPc" se refiere a la molécula de proteína priónica nativa que se expresa natural y ampliamente dentro del cuerpo del mamífero. Su estructura está altamente conservada y no está asociada con un estado patológico.

5 El término "PrPsc" se refiere a la forma alterada de manera conformacional de la molécula de PrPc que se piensa que es infecciosa y está asociada con TSE/enfermedad priónicas, incluyendo CJDv, CJD, kuru, insomnio letal, GSS, tembladera, BSE, CWD, y otras TSE poco comunes de animales cautivos y experimentales. Tiene la misma secuencia de aminoácidos que PrPc celular normal, pero parte de la hélice α se convierte en lámina β y está asociada con un estado patológico.

10 El término "PrPres" se refiere a los derivados resistentes a proteinasa de la proteína PrPsc de 27-30 kDa que permanecen tras la digestión parcial de PrPsc con PK.

El término "PrP" se refiere a una proteína priónica en general.

15 El término "espaciador" se refiere a un resto opcional que conecta el ligando de afinidad a una matriz de soporte. Una clase preferida de espaciador se representa por la fórmula general (II):



20 en la que:

T representa O, S o NR^7 ;

25 V representa un -O-, -S-, -COO-, -CONH- o -NHCO-, -PO₃H-, -NH- arilen-SO₂-CH₂CH₂- o -NR⁷-;

L representa un enlace de hidrocarburo opcionalmente sustituido que contiene de 2 a 20 átomos de carbono; y

a es 0 ó 1.

30 El término "matriz de soporte" se refiere a cualquier compuesto o material, ya sea particulado o no particulado, soluble o insoluble, poroso o no poroso, que puede usarse para formar un conjugado de matriz-ligando de afinidad según la invención y que proporciona un medio conveniente de separar los ligandos de afinidad de solutos en una disolución. Por tanto, la matriz de soporte puede adoptar la forma de una columna, perlas, partículas pequeñas, una membrana o una malla, por ejemplo.

35 Los ejemplos de matrices de soporte incluyen matrices de soporte solubles tales como polímeros que se producen de manera natural, por ejemplo un polipéptido o una proteína tal como albúmina reticulada o un polisacárido tal como agarosa, alginato, carragenano, quitina, celulosa, dextrano o almidón; polímeros sintéticos tales como poli(acrilamida), poliestireno, poli(acroleína), poli(alcohol vinílico), polimetilacrilato, perfluorocarbono; compuestos inorgánicos tales como sílice, vidrio, tierra de diatomeas, alúmina, óxido de hierro u otros óxidos metálicos, o copolímeros que consisten en cualquier combinación de dos o más polímeros que se producen de manera natural, polímeros sintéticos o compuestos inorgánicos.

40 También se incluyen en la definición de matrices de soporte matrices de soporte solubles que comprenden polímeros tales como dextrano, polietilenglicol, poli(alcohol vinílico) o almidón hidrolizado que proporcionan conjugados de matriz-ligando de afinidad para su uso en la división de líquidos; o matrices de soporte sólidas que comprenden compuestos tales como perfluorodecalina que proporcionan conjugados de matriz-ligando de afinidad para su uso en la formación de emulsiones de afinidad.

50 Se incluyen adicionalmente en la definición de matrices de soporte matrices de soporte tales como agarosa, celulosa, dextrano, almidón, alginato, carragenano, polímeros sintéticos, sílice, vidrio y óxidos metálicos que se han modificado o están modificados mediante tratamiento con un agente de activación antes de, o durante, la unión al ligando.

55 Las matrices de soporte son preferiblemente agarosa, sílice, celulosa, vidrio, metacrilato, hidroxietilmetacrilato, poli(acrilamida), estirendivinilbenceno, Hiper D o perfluorocarbonos opcionalmente activados. Lo más preferiblemente, la matriz de soporte es un material de metacrilato, del tipo vendido con el nombre comercial Toyopearl (disponible de Tosoh Bioscience LLC, 156 Keystone Drive, Montgomeryville, PA 18936, EE.UU.).

60 El documento WO 97/10887 describe métodos de unir los ligandos de afinidad a matrices de soporte, por ejemplo el uso de métodos de activación, y métodos de unir el ligando de afinidad a una matriz a través de un espaciador, por ejemplo mediante reacciones de condensación, para formar conjugados de matriz-ligando de afinidad.

Se prefieren los compuestos de fórmula (I) en la que tanto X¹ como X² representan átomos de nitrógeno.

65

Se prefieren los compuestos de fórmula (I) en la que tanto Z como Y representan NR^4 , en particular en la que R^4 es hidrógeno.

En un primer grupo de compuestos particularmente preferidos de fórmula general (I):

- 5 a) X^1 y X^2 son ambos preferiblemente nitrógeno;
- b) tanto Z como Y preferiblemente representan NR^4 , en particular en la que R^4 es hidrógeno;
- 10 c) m es preferiblemente desde 0 hasta 4, más preferiblemente desde 0 hasta 3, y lo más preferiblemente desde 1 hasta 3;
- d) Q^1 es $-NR^{11}R^{12}$; y R^{11} y R^{12} forman, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, un grupo heterocicloalquilo;
- 15 e) n es preferiblemente desde 0 hasta 4, más preferiblemente desde 0 hasta 2, y lo más preferiblemente es 0; y
- f) R^{21} y R^{22} forman, junto con el átomo de carbono o el átomo de nitrógeno al que están unidos, un grupo cicloalquilo o heterocicloalquilo.
- 20

Los grupos particularmente preferidos que Q^2 puede representar incluyen grupos cicloalquilo y heterocicloalquilo hidrófobos, especialmente con sistemas de anillos que comprenden al menos seis átomos. Los ejemplos de tales grupos incluyen ciclohexilo, piperidilo, particularmente 1-piperidilo, y sistemas de anillos carbocíclicos en puente, por ejemplo norbornilo. Tales grupos están preferiblemente no sustituidos, particularmente no sustituidos con cualquier sustituyente polar.

25

Los grupos particulares que Q^1 puede representar incluyen grupos heterocicloalquilo, especialmente piperidilo, particularmente 1-piperidilo, y piperazinilo, particularmente 1-piperazinilo.

- 30 Un conjunto de compuestos específicos de fórmula (I) que se han encontrado que son útiles en la invención son compuestos en los que:

R^3 es tal como se definió anteriormente;

- 35 X^1 y X^2 son ambos N;

Y y Z representan ambos NH;

m representa 2;

- 40 Q^1 representa piperidilo o piperazinilo;

n representa 0 ó 2; y

- 45 Q^2 representa 1-piperidilo o adamantilo.

Descripción de realizaciones preferidas

- 50 Las realizaciones preferidas de la presente invención, se describirán ahora, sólo a modo de ilustración, con referencia a las siguientes metodologías y ejemplos.

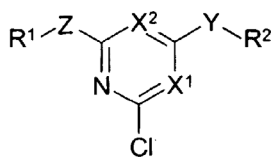
SÍNTESIS DE LIGANDOS

- 55 Los métodos mediante los cuales pueden prepararse los compuestos de fórmula (I) en general resultarán evidentes para los expertos en la técnica. Puede hacerse referencia, por ejemplo, a los métodos de síntesis dados a conocer en el documento WO 97/10887.

Un método mediante el cual pueden prepararse los compuestos de fórmula (I) implica una reacción de un compuesto de fórmula general (II)

60

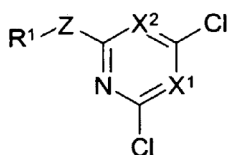
18



(II)

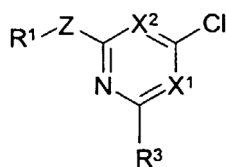
en la que R¹, Z, R², Y, X¹ y X² son tal como se definió anteriormente con respecto a la fórmula (I), con una matriz de soporte que contiene amina.

5 Otro método mediante el cual pueden prepararse los compuestos de fórmula (I) implica la reacción de un compuesto de fórmula (III)



(III)

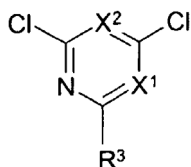
10 en la que R¹, Z, X¹ y X² son tal como se definió anteriormente con respecto a la fórmula (I), con una matriz de soporte que contiene amina para formar un compuesto de fórmula (IV)



(IV)

15 en la que R¹, Z, X¹ y X² son tal como se definió anteriormente con respecto a la fórmula (I) y R³ representa la matriz de soporte opcionalmente unida a través de un espaciador, seguido por la reacción del compuesto de fórmula (IV) con un compuesto de fórmula H-Y-R².

20 En un método preparativo general adicional, un compuesto de fórmula (V)



(V)

25 en la que X¹ y X² son tal como se definió anteriormente con respecto a la fórmula (I) y R³ representa una matriz de soporte opcionalmente unida a través de un espaciador, se hace reaccionar secuencialmente con compuestos de fórmula H-Z-R¹ y H-Y-R².

IDENTIFICACIÓN DE LIGANDOS

30 Los ligandos pueden identificarse tal como sigue. Se sintetizan bibliotecas miméticas y se examinan para determinar la capacidad de unirse a los analitos priónicos. Se hace pasar el analito priónico a través de la columna y se detecta el analito unido usando métodos convencionales tal como mediante un anticuerpo marcado específico para la proteína priónica. Se identifican perlas a las que se ha unido el analito como ligandos adecuados.

35 USO DE LIGANDOS PARA ELIMINAR PRIONES

Los ligandos que se unen a priones o fragmentos de priones son útiles para una variedad de aplicaciones analíticas,

preparativas y de diagnóstico. Los ligandos que se unen a priones pueden inmovilizarse sobre un soporte tal como una perla o membrana, y pueden usarse para unir y eliminar priones de una muestra. Se permite que la fase sólida a la que están unidos los ligandos entre en contacto con la muestra, tal como un fluido biológico, en condiciones suficientes para provocar la formación de una estructura compuesta prión-ligando, y que una proteína priónica en la muestra se una al ligando. Entonces se separa la fase sólida de la muestra, eliminando así la proteína priónica unida al ligando, que está unido a la fase sólida, de la muestra. Por ejemplo, se conocen bien en la técnica resinas y membranas para eliminar contaminantes tal como las descritas en la patente estadounidense n.º 5.834.318 de Baumbach *et al* y el documento WO 01/77687.

Los ejemplos de muestras biológicas incluyen, pero no se limitan a, sangre, composiciones derivadas de sangre y suero. Las muestras biológicas adicionales incluyen líquido cefalorraquídeo, orina, saliva, leche, líquido ductal, lágrimas o semen. Otras muestras pueden contener colágeno, extractos de cerebro y glándulas.

Se conocen en la técnica muchos métodos para inmovilizar moléculas a una variedad de superficies sólidas. Por ejemplo, la superficie sólida puede ser una membrana (por ejemplo de nitrocelulosa), una placa de microtitulación (por ejemplo de PVC, polipropileno o poliestireno), un tubo de ensayo (de vidrio o plástico), una tira reactiva (por ejemplo de vidrio, PVC, polipropileno, poliestireno, látex, y similares), a tubo de microcentrífuga, o una perla de vidrio, de sílice, de plástico, de metal o polímero. El componente deseado puede unirse de manera covalente, o unirse de manera no covalente a través de la unión no específica.

Puede emplearse una amplia variedad de polímeros orgánicos e inorgánicos, tanto naturales como sintéticos como el material para la superficie sólida. Los polímeros ilustrativos incluyen polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(acrilato, poli(tereftalato de etileno), rayón, nailon, poli(butirato de vinilo)), poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF), siliconas, poliformaldehído, celulosa, acetato de celulosa, nitrocelulosa y similares. Otros materiales que pueden emplearse, incluyen papel, vidrios, cerámicas, metales, metaloides, materiales semiconductores, cementos o similares. Además, pueden usarse sustancias que forman geles, tales como proteínas (por ejemplo gelatinas), lipopolisacáridos, silicatos, agarosa y poli(acrilamidas). También son adecuados polímeros que forman varias fases acuosas, tales como dextranos, polialquilenglicoles o tensioactivos, tales como fosfolípidos, sales de alquilamonio de cadena larga (12-24 átomos de carbono) y similares. Cuando la superficie sólida es porosa, pueden emplearse diversos tamaños de poros dependiendo de la naturaleza del sistema. Además, puede incorporarse el péptido durante la polimerización de la superficie sólida.

En la preparación de la superficie, puede emplearse una pluralidad de diferentes materiales, por ejemplo como laminados, para obtener diversas propiedades. Por ejemplo, pueden usarse recubrimientos proteicos, tales como gelatina para evitar la unión no específica, simplificar la conjugación covalente, y potenciar la detección de señales o similares.

Si se desea la unión covalente entre un compuesto y la superficie, la superficie será habitualmente polifuncional o podrá polifuncionalizarse. Los grupos funcionales que pueden estar presentes en la superficie y usarse para la unión pueden incluir ácidos carboxílicos, aldehídos, grupos amino, grupos ciano, grupos etilénicos, grupos hidroxilo, grupos mercapto y similares. Se conoce bien la manera de unir una amplia variedad de compuestos a diversas superficies y se ilustra ampliamente en la bibliografía.

También pueden separarse las proteínas priónicas de otras proteínas en una muestra usando cromatografía de afinidad. Los ligandos según la invención pueden unirse a un soporte sólido, tal como una resina o membrana, y usarse para unir y eliminar el prión de la disolución. En este caso, el ligando puede acoplarse a un soporte sólido, por ejemplo un soporte inerte tal como una membrana o una resina, y la proteína priónica se une al agente inmovilizado. Puede detectarse el agente inmovilizado/prión por medio de anticuerpos. Si se desea, puede inmovilizarse una o más de las secuencias obtenidas de la selección inicial en una resina, tal como polimetacrilato o agarosa. Otros tipos de resina que pueden usarse incluyen, por ejemplo Sepharose, agarosa reticulada, polisacáridos reticulados compuestos, Celite, PVDF, acrilato, poliestireno y celulosa. Pueden usarse membranas tales como, por ejemplo, de nailon y celulosa. La resina puede ser una resina de polimetacrilato.

USO DE LIGADOS PARA DETECTAR PRIONES

Los ligandos descritos en el presente documento también son útiles en un método de detectar la presencia de o cuantificar una proteína priónica en una muestra biológica. Se pone en contacto una muestra biológica tal como, pero sin limitarse a, las mencionadas anteriormente, con un ligando en condiciones suficientes para provocar la formación de un complejo entre la proteína priónica y el ligando. Entonces se detecta el complejo mediante métodos convencionales, detectando así la presencia del prión en la muestra biológica.

Se detecta el complejo marcando el ligando, combinando el ligando marcado con la muestra, y detectando el complejo ligando marcado-prión. Se marca el ligando durante la producción del ligando, tal como durante la síntesis peptídica, o se conjuga un marcador con el ligando uniéndolo al ligando, de manera o bien covalente o bien no covalente. Alternativamente, se marca una molécula de unión específica para el ligando, tal como un anticuerpo, y se detecta el complejo indirectamente. Se conocen una amplia variedad de marcadores y técnicas de conjugación y

se notifican ampliamente tanto en la bibliografía científica como de patentes. Los marcadores adecuados incluyen radionucleótidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, restos fluorescentes, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares.

5 La detección puede realizarse mediante cualquier método conocido, tal como inmunotransferencia, análisis de tipo Western, ensayos de desplazamiento de movilidad en gel, análisis de hibridación *in situ* fluorescente (FISH), seguimiento de marcadores radioactivos o bioluminiscentes, resonancia magnética nuclear, resonancia paramagnética de electrones, espectroscopía de flujo detenido, cromatografía en columna, electroforesis capilar u otros métodos que siguen una molécula basándose en una alteración de tamaño y/o carga. El marcador particular o grupo detectable usado en el ensayo no es un aspecto crítico de la invención. El grupo detectable puede ser cualquier material que tiene una propiedad física o química detectable. Tales marcadores detectables están bien desarrollados y, en general, puede aplicarse cualquier marcador útil en tales métodos al presente método. Por tanto, un marcador es cualquier composición detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los marcadores útiles en la presente invención incluyen colorantes fluorescentes (por ejemplo isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina y similares), radiomarcadores (por ejemplo ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C o ^{32}P), enzimas (por ejemplo LacZ, CAT, peroxidasa del rábano, fosfatasa alcalina y otras, comúnmente usadas como enzimas detectables, o bien en un EIA o bien en un ELISA), y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal o perlas de vidrio o plástico coloreadas (por ejemplo poliestireno, polipropileno, látex, etc.). El marcador puede acoplarse directa o indirectamente al componente deseado del ensayo según métodos bien conocidos en la técnica. Tal como se indicó anteriormente, puede usarse una amplia variedad de marcadores, dependiendo la elección de un marcador de la sensibilidad requerida, la fácil conjugación del compuesto, los requisitos de estabilidad, la instrumentación disponible y las provisiones de eliminación.

A menudo los marcadores no radioactivos se unen mediante medios indirectos. Generalmente, una molécula de ligando (por ejemplo biotina) se une de manera covalente a la molécula. Entonces el ligando se une a una molécula anti-ligando (por ejemplo estreptavidina) que o bien puede detectarse de manera inherente o bien puede unirse de manera covalente a un sistema de señales, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente, o un compuesto quimioluminiscente. Pueden usarse varios ligandos y anti-ligandos. Cuando un ligando tiene un anti-ligando natural, por ejemplo, biotina, tiroxina y cortisol, puede usarse conjuntamente con los anti-ligandos que se producen de manera natural marcados. Alternativamente, puede usarse cualquier compuesto hapténico o antigénico en combinación con un anticuerpo.

Las moléculas también pueden conjugarse directamente con compuestos que generan señales, por ejemplo mediante conjugación con una enzima o fluoróforo. Las enzimas de interés como marcadores principalmente serán hidrolasas, particularmente fosfatasas, esterasas y glicosidasas u oxidorreductasas, particularmente peroxidasas. Los compuestos fluorescentes incluyen fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, etc. Los compuestos quimioluminiscentes incluyen luciferina, y 2,3-dihidroftalazindionas, por ejemplo luminol.

Los expertos en la técnica conocen bien medios de detección de marcadores. Por tanto, por ejemplo, cuando el marcador es un marcador radioactivo, los medios de detección incluyen un contador de centelleo o película fotográfica como en autorradiografía. Cuando el marcador es un marcador fluorescente, puede detectarse excitando el fluorocromo con la longitud de onda apropiada de luz y detectando la fluorescencia resultante, por ejemplo mediante microscopía, inspección visual, a través de película fotográfica, mediante el uso de detectores electrónicos tales como dispositivos acoplados por carga (CCD) o fotomultiplicadores y similares. De manera similar, los marcadores enzimáticos se detectan proporcionando sustratos apropiados para la enzima y detectando el producto de reacción resultante. Finalmente, pueden detectarse marcadores colorimétricos simples simplemente observando el color asociado con el marcador. Por tanto, en diversos ensayos con tira reactiva, el oro conjugado a menudo aparece rosa, mientras que diversas perlas conjugadas aparecen del color de la perla.

Los ligandos de la invención también pueden usarse para detectar dianas extraídas en disolución de un material sólido. Por ejemplo, puede extraerse una muestra sólida con un disolvente orgánico, acuoso o un fluido crítico y puede ponerse en contacto el sobrenadante resultante con el ligando. Los ejemplos de muestras sólidas incluyen productos derivados de animales, particularmente aquellos que se han expuesto a agentes que transmiten priones, por ejemplo harina de hueso derivada de fuentes bovinas. En algunas realizaciones pueden usarse ligandos para detectar la presencia de proteína priónica en el suelo. Otras muestras sólidas incluyen tejido cerebral, tejido corneal, materia fecal, harina de hueso, subproductos de carne vacuna, oveja, subproductos de oveja, ciervo y alce, subproductos de ciervo y alce, y otros animales y productos derivados de animal.

Alternativamente, pueden tratarse los complejos príon-ligando con PK. PrPc es altamente sensible a PK, mientras que PrPsc se digiere parcialmente para formar PrPres. La molécula de PrPres por sí misma es altamente resistente a proteólisis. Por tanto, el tratamiento con PK digerirá PrPc, y convertirá PrPsc sensible a PK en PrPres. Tras la eliminación de PK, puede desnaturalizarse PrPres y detectarse mediante anticuerpos tales como 3F4.

En otra realización, pueden usarse ligandos según la invención para determinar la concentración selectiva de PrPsc con respecto a PrPc.

USO DE LIGANDOS PARA CUANTIFICAR PRIONES

5 Un complejo ligando-prión, o alternativamente, un anticuerpo frente al ligando o complejo ligando-prión, puede detectarse y cuantificarse mediante cualquiera de varios medios bien conocidos para los expertos en la técnica. Estos incluyen métodos bioquímicos analíticos tales como espectrofotometría, radiografía, electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía de hiperdifusión, y similares, y diversos métodos inmunológicos tales como reacciones de precipitación en gel o fluido (simples o dobles), inmunolectroforesis, radioinmunoensayos (RIA), ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), ensayos inmunofluorescentes, y similares.

REDUCCIÓN DE LA UNIÓN NO ESPECÍFICA

15 Un experto apreciará que a menudo es deseable reducir la unión no específica en ensayos y durante la eliminación del analito de una muestra. Cuando el ensayo implica un ligando u otro agente de captura inmovilizado en un sustrato sólido, es deseable minimizar la cantidad de unión no específica al sustrato sólido. Los expertos en la técnica conocen bien medios de reducir tal unión no específica. Normalmente, esto implica recubrir el sustrato con una composición proteínica. En particular, se usan ampliamente composiciones proteicas tales como albúmina de suero humano y bovino (BSA), leche en polvo desnatada, y gelatina.

OTROS FORMATOS DE ENSAYO

25 También puede usarse análisis de inmunotransferencia de tipo Western para detectar y cuantificar la presencia de proteína priónica en una muestra. La técnica generalmente implica separar los productos de muestra mediante electroforesis en gel basándose en el peso molecular en presencia de SDS, transferir las proteínas separadas a un soporte sólido adecuado (tal como un filtro de nitrocelulosa, un filtro de nailon, o un filtro de nailon derivatizado), e incubar la muestra unida con los ligandos descritos en el presente documento. Los ligandos se unen específicamente a un péptido priónico fijado en el soporte sólido. Estos ligandos se marcan directamente o, de manera alternativa, pueden detectarse posteriormente usando anticuerpos marcados que se unen específicamente al ligando.

35 Otros formatos de ensayo incluyen inmunoensayos de liposomas (LIA), que usan liposomas diseñados para unirse a moléculas específicas (por ejemplo ligandos) y liberan marcadores o reactivos encapsulados. Entonces se detectan los productos químicos liberados según técnicas convencionales.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

40 Los ligandos descritos en el presente documento que no se acoplan a una matriz de soporte son útiles en aplicaciones terapéuticas y profilácticas para el tratamiento de TSE provocadas por infección de un mamífero con organismos priónicos. El ligando puede prevenir la polimerización de PrPsc a través de la inhibición de la unión de PrPsc a PrPsc. Además puede evitar la inhibición de la unión de PrPsc a PrPc, reduciendo así la conversión mediada por PrPsc de PrPc a PrPsc y retrasando de ese modo la aparición de síntomas clínicos. Además, los propios ligandos pueden modificarse mediante la adición de un agente reactivo para dirigir esta molécula al sitio de acumulación de PrPsc. Tales composiciones son adecuadas para su uso en una variedad de sistemas de administración de fármaco.

Las enfermedades que van a tratarse según el método incluyen, pero no se limitan a, BSE, encefalopatía transmisible del visón, encefalopatía espongiiforme felina, CWD, CJD, GSS, insomnio letal y CJDv.

50 Las composiciones farmacéuticas están destinadas para la administración parenteral, tópica, oral o local. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se administran por vía parenteral, por ejemplo por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intradérmica, por vía intranasal o por vía intramuscular. Por tanto, la invención proporciona composiciones para la administración parenteral que comprenden una disolución de los agentes descritos anteriormente disueltos o suspendidos en un vehículo aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso. Puede usarse una variedad de vehículos acuosos, por ejemplo agua, agua tamponada, solución salina al 0,4%, glicina al 0,3%, ácido hialurónico, sellante de fibrina y similares. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización bien conocidas convencionales, o puede filtrarse para que sean estériles. Las disoluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso como tales, o pueden liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una disolución estéril antes de su administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables tal como se requiere para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste de pH y de tamponamiento, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitano, oleato de trietanolamina, etc.

65 Para las composiciones sólidas, pueden usarse vehículos sólidos no tóxicos convencionales que incluyen, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco,

celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio, y similares. Para la administración oral, se forma una composición no tóxica farmacéuticamente aceptable incorporando cualquiera de los excipientes normalmente empleados, tales como los vehículos mencionados anteriormente, y generalmente el 1-95% de principio activo y más preferiblemente a una concentración del 25%-75%.

5 Para la administración en aerosol, se suministran preferiblemente los principios activos en forma finamente dividida junto con un tensioactivo y un propelente. El tensioactivo debe ser, por supuesto, no tóxico, y preferiblemente soluble en el propelente. Ejemplos representativos de tales agentes son los ésteres o ésteres parciales de ácidos grasos que contienen desde 6 hasta 22 átomos de carbono, tales como ácidos caproico, octanoico, láurico, 10 palmítico, esteárico, linoleico, linolénico, olestérico y oleico con un alcohol polihidroxilado alifático o su anhídrido cíclico. Pueden emplearse ésteres mixtos, tales como glicéridos mixtos o naturales. También pueden incluir un vehículo, según se desea, como con, por ejemplo lecitina para la administración intranasal.

15 La cantidad administrada variará dependiendo de qué está administrándose, del estado del mamífero que recibe tratamiento y de la manera de administración. En aplicaciones terapéuticas, se administran las composiciones a un mamífero que ya padece infección priónica en una cantidad suficiente para inhibir la propagación de los priones, o al menos detener parcialmente los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para realizar esto se define como "dosis terapéuticamente eficaz." Las cantidades eficaces para este uso dependerán de 20 la gravedad de la enfermedad, de la composición particular y del peso y estado general del receptor. Generalmente, la dosis estará en el intervalo de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 5 mg al día, preferiblemente de aproximadamente 100 mg al día, para un paciente de 70 kg.

En los siguientes ejemplos todos los ligandos no incluidos en la fórmula (I) según la reivindicación 1 son ejemplos de referencia no según la invención.

25 **Ejemplo 1**

Identificación de ligandos de unión de priones

30 Se identificaron los ligandos de unión de priones descritos en las tablas a continuación tal como sigue.

Síntesis de biblioteca mimética

35 Se sintetizaron dos bibliotecas combinatorias 8 x 8 de ligandos miméticos en Purabead 6XL activado por epóxido (biblioteca A y biblioteca B). PuraBead 6XL es un soporte de agarosa con perlas porosas que se reticula para contribuir a la durabilidad. Los métodos de síntesis fueron similares a los descritos en el documento WO 97/10887, y podían repetirse fácilmente por un médico experto en la técnica. En resumen, tras la finalización de la síntesis, cada elemento de la biblioteca comprendía un resto de triazina unido a Purabead 6XL mediante un espaciador aminado flexible. Se sustituyó adicionalmente el componente de triazina de cada elemento de la biblioteca con dos aminas 40 más.

Biblioteca A

45 El espaciador aminado flexible para esta biblioteca tenía tres átomos de carbono de longitud, y se introdujo mediante reacción secuencial de Purabead 6XL reticulado con epiclorhidrina y amoniaco. La tabla 1 resume las dos aminas adicionales incorporadas en la triazina de cada elemento de la biblioteca, correspondiendo estas aminas a los grupos -Z-R¹ y -Y-R² de fórmula (I). Las aminas se denominan, mediante los siguientes números, comprendiendo el ligando identificado como 1/1 dos grupos 2-adamantamina, comprendiendo el identificado como 2/1 un grupo 4-(2-aminoetil)-morfolina y un grupo 2-adamantamina, etc.:

- 50 1 = 2-Adamantamina
- 2 = 4-(2-Aminoetil)-morfolina
- 55 3 = 1-(2-Aminoetil)-piperidina
- 4 = 1-(2-Aminoetil)-piperazina
- 5 = (+/-)-2-Aminonorborno
- 60 6 = 1-(2-Aminopropil)-2-pirrolidinona
- 7 = 3-Aminoquinuclidina
- 65 8 = 1-(2-Hidroxietil)-piperazina

9 = *N,N*-Dimetiletilendiamina

Tabla 1

1/1	2/1	3/1	5/1	6/1	7/1	8/1	9/1
1/2	2/2	3/2	5/2	6/2	7/2	8/2	9/2
1/3	2/3	3/3	5/3	6/3	7/3	8/3	9/3
1/4	2/4	3/4	5/4	6/4	7/4	8/4	9/4
1/5	2/5	3/5	5/5	6/5	7/5	8/5	9/5
1/6	2/6	3/6	5/6	6/6	7/6	8/6	9/6
1/7	2/7	3/7	5/7	6/7	7/7	8/7	9/7
1/8	2/8	3/8	5/8	6/8	7/8	8/8	9/8

- 5 La carga del ligando sobre la resina era de 12 mmol/g de resina sedimentada, tal como se determina mediante el ensayo de amina libre tras la adición del espaciador aminado, y el ensayo de liberación de cloruro tras la adición de triclorotriazina al espaciador aminado.

Biblioteca B

- 10 El espaciador aminado flexible para esta biblioteca tenía diez átomos de carbono de longitud, y se introdujo mediante reacción secuencial de Purabead 6XL reticulado con 1,4-butanodioldiglicidil éter y amoníaco. La tabla 2 resume las dos aminas adicionales incorporadas en la triazina de cada elemento de la biblioteca, denominándose las aminas por los siguientes números:

- 15 10 = β -Alanina
 11 = 2-Aminoetil-piridina
 20 12 = Alcohol 3-aminobencílico
 13 = Fenetilamina
 25 14 = Tiramina
 15 - 4-Fluorobencilamina
 16 - 4-Metilbencilamina
 30 17 - 2-(4-Clorofenil)-etilamina
 18 - Triptamina 1
 19 - Glicina
 35 20 - Ácido L-glutámico
 21 - DL-Valina
 40 22 - Ácido 5-aminovalérico
 23 - Ácido 4-aminobutírico
 45 24 - L-Tirosina
 25 - Ácido ϵ -aminocaproico

Tabla 2

10/11	19/11	20/11	21/11	22/11	23/11	24/11	25/11
10/12	19/12	20/12	21/12	22/12	23/12	24/12	25/12
10/13	19/13	20/13	21/13	22/13	23/13	24/13	25/13

10/14	19/14	20/14	21/14	22/14	23/14	24/14	25/14
10/15	19/15	20/15	21/15	22/15	23/15	24/15	25/15
10/16	19/16	20/16	21/16	22/16	23/16	24/16	25/16
10/17	19/17	20/17	21/17	22/17	23/17	24/17	25/17
10/18	19/18	20/18	21/18	22/18	23/18	24/18	25/18

La carga del ligando sobre la resina era de 19 mmol/g de resina sedimentada, tal como se determina mediante el ensayo de amina libre tras la adición del espaciador aminado, y el ensayo de liberación de cloruro tras la adición de triclorotriazina al espaciador aminado.

5

Examen de unión de biblioteca mimética

Se invirtió la biblioteca varias veces, se dejó sedimentar y se drenó mediante gravedad, seguido por 2 lavados con 1 ml de agua y 1 lavado con 1 ml de PBS 10 mM, pH 7,4 por pocillo. Se detuvieron los pocillos y se añadieron 0,5 ml de PBS por pocillo. Se almacenó la biblioteca durante la noche con refrigeración. Se retiraron dos tubos que contenían cada uno 1,8 ml de un homogeneizado de cerebro de hámster al 10% (HaBH) del almacenamiento en nitrógeno líquido y se descongelaron. Se añadieron 180 µl de sarcosilo al 5% a cada tubo. Se incubó la suspensión con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido por centrifugación durante 10 minutos a 13.400 rpm en una microcentrífuga Benchtop. Se recogió el sobrenadante, y se diluyó 1:10 con PBS (dilución final de HaBH: 1:100). Se drenó la biblioteca mediante gravedad, y se añadieron 500 µl de la disolución de HaBH por pocillo, y se drenó mediante gravedad a una placa de recogida. Una vez que los pocillos se habían drenado, se lavó cada pocillo con 500 µl de PBS adicional, que se recogieron en la misma placa de recogida. Se marcó esta placa de recogida como "no unida". Se añadieron 500 µl de NaCl 1 M en PBS a cada pocillo, y se recogieron en otra placa de recogida marcada "elución con sal", seguido por 500 µl de disolución de ácido acético al 2%, que también se recogió en una placa de recogida marcada "elución con ácido acético". Se transfirieron alícuotas de 26 µl de cada resina a tubos de microcentrífuga, y se almacenaron para el análisis del prión unido restante. Se congelaron las disoluciones no unida, de elución con sal y de elución con ácido acético en las placas de recogida.

Se usaron diluciones de la disolución de HaBH a concentraciones finales de 1:200 y 1:500 como controles para SDS-PAGE e inmunotransferencias de tipo Western.

25

Análisis de inmunotransferencia de tipo Western y SDS PAGE de fracciones no unidas

Se añadieron 50 µl de cada una de las muestras "no unida" a 50 µl de un tampón de muestra 2X / agente reductor (mezcla de tampón de muestra de NuPAGE LDS 4X de Invitrogen (25 µl), agente reductor de muestra de Invitrogen NuPAGE (10 µl), y agua de calidad ACS (15 µl)). Se calentó cada tubo a 90°C durante 10 minutos.

30

Se procesaron geles por duplicado para permitir el análisis de inmunotransferencia de tipo Western y SDS PAGE de la proteína total. El formato de las muestras en cada gel de 17 pocillos fue el siguiente

35

Pocillo	Analito	Volumen (µl)
1	Marcadores de peso molecular SeeBlue Plus 2 de Invitrogen (n.º de cat. LC5925)	5
2	Homogeneizado de cerebro de hámster (1:200)	10
3	Homogeneizado de cerebro de hámster (1:500)	10
4-17	14 muestras "no unidas" diferentes	10

Se enjuagó un cartucho de gel NuPAGE de 17 pocillos con agua desionizada. Se retiraron la tira de cinta blanca y el peine, se enjuagaron los carriles con tampón de procesamiento 1X NuPAGE MES (n.º de cat. NP0002), y se colocó el cartucho en el depósito de gel de un módulo Xcell Mini-Gel (o compatible). Se cargó el depósito central con 200 ml de tampón de procesamiento MES 1X NuPAGE que contenía 500 µl de antioxidante NuPAGE (n.º de cat. NP0005). Tras comprobar las fugas, se cargó el depósito externo con tampón de procesamiento 1X NuPAGE MES (sin antioxidante añadido). Se unió el módulo Mini-Gel a una fuente de alimentación compatible, y se procesaron los geles durante aproximadamente 45 minutos a 200 V constantes hasta que el frente del colorante estaba dentro de 0,5 cm del fondo del gel.

40

45

SDS PAGE

Se retiró el gel del cartucho de gel y se enjuagó tres veces con agua ACS (25 ml, 5 minutos). Se tiñó el gel a lo largo de una hora con SimplyBlue Safestain de Invitrogen, antes de eliminar la tinción con tres lavados con agua ACS (25

ml, 1 hora).

Inmunotransferencia de tipo Western

5 Se enjuagó un cartucho de gel NuPAGE de 17 pocillos (n.º de cat. NP0349) con agua desionizada y se enjuagaron los carriles con tampón de procesamiento 1X NuPAGE. Se colocó el gel en un módulo Xcell Mini-Gel (n.º de cat. EI0001 de Invitrogen) o aparato compatible. Se cargó la cámara inferior con tampón de procesamiento 1X de la disolución madre (tampón de procesamiento 20X NuPAGE MES de Invitrogen n.º de cat. NP0002 o n.º NP0002-02). Se cargó la cámara superior con tampón de procesamiento 1X que contenía antioxidante (n.º de cat. de Invitrogen NP0005).

15 A cada muestra se le añadió tampón de muestra que contenía el agente reductor (n.º de cat. NP0007 y n.º de cat. NP0004 de Invitrogen), y se calentaron las muestras a 90°C durante 10 minutos, se centrifugaron brevemente, y se cargaron 5 µl de cada muestra. También se cargaron 5 µl del marcador de peso molecular (n.º de cat. LC5925 de Invitrogen). Se sometió a electroforesis el gel durante 45 minutos a 200 V constantes. Tras haberse completado el procesamiento, se retiró el cartucho de la unidad, se abrió, y se retiró el gel. Se empapó el gel en un tampón de transferencia enfriado durante 5 minutos.

20 Se humedeció la membrana de transferencia en metanol, se transfirió a un tampón de transferencia, y se incubó durante 2 X 10 minutos con agitación. Se preparó el tampón de transferencia de electrodos a partir de la disolución madre (n.º de cat. NP0006-1 de Invitrogen) con la adición de metanol al 20% y antioxidante, y se enfrió antes de su uso. Se llenó a la mitad del depósito de la cámara de transferencia (n.º de cat. 170-4070 de BioRad) con tampón de electrotransferencia enfriado. Se preparó un cartucho de unidad de transferencia de BioRad en una bandeja de cartuchos de transferencia de BioRad de plástico ya con volúmenes adecuados de tampón de electrotransferencia enfriado. Se preparó el intercalado de transferencia mediante formación de capas en secuencia de esponja, papel de filtro, PVDF membrana de transferencia (n.º de cat. LC2005 de Invitrogen), gel, papel de filtro y esponja. Se plegó el cartucho y se cerró con abrazadera. Se transfirieron los geles durante 45 minutos a 100 V constantes, con la cámara a temperatura ambiente.

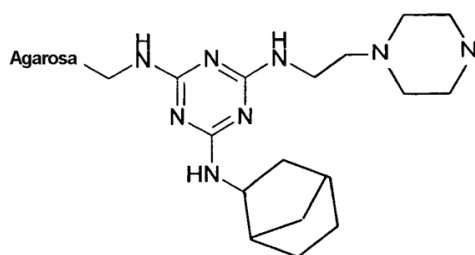
30 Tras la transferencia, se colocó la membrana en una placa limpia y se incubó durante 1 hora, en una plataforma basculante, a temperatura ambiente, en 25 ml de agente bloqueante Western Breeze del kit de quimioluminiscencia Western Breeze de Invitrogen, anti-ratón (n.º de cat. WB7104).

35 Entonces se incubó la membrana en una dilución 1:10000 de disolución madre de anticuerpo monoclonal de ratón 3F4 frente a anticuerpo primario 3F4 Signet (SIGNET, n.º de cat. 9620) en 20 ml de diluyente de anticuerpo primario Western Breeze nuevo durante la noche, con refrigeración, en una plataforma basculante. Se enjuagó la transferencia 3 veces en 20 ml de lavado de anticuerpo Western Breeze y entonces se incubó la membrana en anticuerpo secundario KPL-AP 1:10.000 (KPL, n.º de cat. 075-1802) en 20 ml de diluyente de anticuerpo primario Western Breeze durante 60 minutos a temperatura ambiente en una plataforma basculante. Se enjuagó la transferencia como anteriormente entonces se lavó con 20 ml de Tris-HCl 20 mM, MgCl₂ 1 mM a pH 9,8 durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se transfirió la membrana a una placa limpia seca y se empapó con 5 ml de sustrato de quimioluminiscencia mezclado previamente de Western Breeze (CDP Star) durante 5 minutos con agitación suave. Se dejó que la fosfatasa alcalina reaccionara durante 30 minutos. Se transfirió la transferencia en un protector laminar a un cartucho de película y se expuso a película (n.º de cat. RPN-3130K de Amersham) durante 45 5 min. a temperatura ambiente y se reveló en un revelador.

Ejemplo 2

Uso de ligando 5/4 unido a agarosa para la captura de PrPc a partir de concentrado de glóbulos rojos

50 Se sintetizó un adsorbente que comprendía un ligando 5/4 unido a una matriz de base Purabead 6XL tal como se describió en el ejemplo 1 para proporcionar un compuesto de fórmula (VI):



(VI)

55 Se descongeló una muestra de homogenizado de cerebro de hámster normal al 10% p/v en tampón PBS (100 µl) y

se añadieron 10 μ l de sarcosilo al 10% (w/v), se mezcló con vórtex y se almacenó en hielo común durante 30 minutos. Se centrifugó la mezcla a 14.000 rpm durante 5 minutos a +4°C y se retiró el sobrenadante. Se mezcló el concentrado de glóbulos rojos humanos (RBCC; 250 ml) con Adsol (110 ml) y se mezcló suavemente mediante inversión. Se retiró el RBCC diluido (1,8 ml) y se mezcló con 0,2 ml de disolución de homogenizado de cerebro de hámster.

Se añadió una suspensión 1:1 (400 μ l) del compuesto (VI) suspendido en tampón de citrato 40 mM / NaCl 280 mM pH 7,0, a una microcolumna de 1,0 ml y se dejó que drenara por gravedad. Se pipeteó el homogenizado de cerebro de hámster en RBCC (1 ml) sobre el adsorbente de afinidad sedimentado y se dejó que drenara. Posteriormente se lavó el adsorbente con 1 ml de tampón de suspensión y se dejó que drenara. Se recogieron ambas fracciones no retenidas, se combinaron y se almacenaron a -20°C.

Se retiró el adsorbente de afinidad de la columna suspendiendo en 0,5 ml de tampón de suspensión y se transfirió a un criovial. Se registró el volumen del adsorbente de afinidad transferido tras dejar que sedimentaran los contenidos en el vial y se ajustó el volumen de sobrenadante para proporcionar una suspensión 1:1. Se transfirió una muestra (200 μ l) a un vial de microcentrifuga para su uso en el análisis de SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western de príon unido tal como se describió en el ejemplo 1.

La presencia de bandas fuertes mediante inmunotransferencia de tipo Western correspondientes a PrPc de hámster indicó que el ligando 5/4 unido a Purabead 6XL (matriz de agarosa en perlas) podía unirse a PrPc selectivamente a partir del concentrado de glóbulos rojos humanos.

Ejemplo 3

Preparación de ligandos de unión a príon unidos a perlas de resina de polimetacrilato

Este ejemplo describe la preparación de varios ligandos que contienen aminos usadas en las bibliotecas A y B, pero en soportes de polimetacrilato aminado (Toyopearl 650 M), en vez de agarosa.

3.1 Derivado de diclorotriazina de Toyopearl aminado 650 M

Se lavó Toyopearl AF - amino-650 M (36 g) en un embudo sinterizado con diez partes (36 ml) de agua obtenida por ósmosis inversa, entonces se drenó el gel y se resuspendió en fosfato de potasio 1 M pH 7,0 (36 ml). Se dejó que el gel se drenara y entonces se resuspendió en fosfato de potasio 1 M pH 7,0 (27 ml) y agua obtenida por ósmosis inversa (27 ml). Se transfirió esta mezcla a un recipiente de reacción de vidrio con agitación y se añadieron 54 ml de acetona. Se enfrió la mezcla hasta 0°C, luego a esto se le añadió cloruro cianúrico (2,7 g) disuelto en acetona (27 ml) fría (0°C) y se agitó la mezcla durante 1 h a 0-4°C. Se vertió la suspensión resultante de producto activado con diclorotriazina en una frita de vidrio y se lavó con acetona acuosa (50% v/v, 180 ml), agua obtenida por ósmosis inversa (180 ml), acetona acuosa (50% v/v, 180 ml) y agua obtenida por ósmosis inversa (360 ml).

3.2 Productos intermedios de monoclorotriazina

Se prepararon diversos productos intermedios de monoclorotriazina a partir del Toyopearl 650 M activado por diclorotriazina tal como sigue:

3.2.1 Se preparó el aducto de Toyopearl 650 M aminado con monoclorotriazina de 1-(2-aminoetil)piperidina (amina 3) disolviendo 1-(2-aminoetil)piperidina (0,47 g) en agua obtenida por ósmosis inversa (28,8 ml) y enfriando la disolución hasta 4°C. Se añadió esta mezcla a 7 g de Toyopearl aminado activado con diclorotriazina que se había drenado en agua sobre una frita de vidrio, se transfirió a un recipiente de reacción de plástico y se enfrió hasta 4°C. Se agitó la mezcla a 4°C durante 2 h, entonces se vertió la mezcla en una frita de vidrio, se lavó con DMF acuosa (50% v/v, 35 ml), agua obtenida por ósmosis inversa (70 ml), entonces se dejó que se drenara en la frita.

3.2.2 Se preparó el aducto de Toyopearl 650 M aminado con monoclorotriazina de (+/-) 2-aminonorborno (amina 5) disolviendo (+/-) 2-aminonorborno (0,82 g) en DMF acuosa (13,3% v/v, 57,68 ml), y enfriando la disolución hasta 4°C. Se añadió esta mezcla a 14 g de Toyopearl aminado activado con diclorotriazina que se había drenado en agua sobre una frita de vidrio, se transfirió a un recipiente de reacción de plástico y se enfrió hasta 4°C. Se agitó la mezcla durante 2 h a 4°C, entonces se vertió la mezcla en una frita de vidrio y se lavó con DMF acuosa (50% v/v, 70 ml), agua obtenida por ósmosis inversa (140 ml), entonces se dejó que se drenara en la frita.

3.2.3 Se preparó el aducto de Toyopearl 650 M aminado con monoclorotriazina de ácido L-glutámico (amina 20) disolviendo ácido L-glutámico (0,515 g) en DMF acuosa (50% v/v, 28,0 ml) e hidróxido de sodio acuoso (10 M, 0,7 ml) luego enfriando la disolución hasta 4°C. Se añadió esta mezcla a Toyopearl aminado activado con diclorotriazina (7 g) que se había drenado en agua sobre una frita de vidrio, se transfirió a un recipiente de reacción de plástico y se enfrió hasta 4°C. Se agitó la mezcla durante 70 min. a 4°C, entonces se vertió la mezcla en una frita de vidrio y se lavó con DMF acuosa (50% v/v, 70 ml), agua obtenida por ósmosis inversa (140 ml), entonces se dejó que se drenara en la frita.

- 3.2.4 Se preparó el aducto de Toyopearl 650 M aminado con monoclorotriazina de ácido 5-aminovalérico (amina 22) disolviendo ácido 5-aminovalérico (0,41 g) en DMF acuosa (50% v/v, 28,5 ml) e hidróxido de sodio acuoso (10 M 0,35 ml) y enfriando la disolución hasta 4°C. Se añadió esta mezcla a 7 g de Toyopearl aminado activado con diclorotriazina que se había drenado en agua sobre una frita de vidrio, se transfirió a un recipiente de reacción de plástico y se enfrió hasta 4°C. Se agitó la mezcla durante 60 min. a 4°C, entonces se vertió la mezcla en una frita de vidrio y se lavó con DMF acuosa (50% v/v, 70 ml), agua obtenida por ósmosis inversa (140 ml), entonces se dejó que se drenara en la frita.
- 3.2.5 Se preparó el aducto de Toyopearl 650 M aminado con monoclorotriazina de glicina (amina 19) disolviendo glicina (0,563 g) en DMF acuosa (50% v/v, 61,4 ml) e hidróxido de sodio acuoso (10 M, 0,75 ml) y enfriando la disolución hasta 4 X. Se añadió esta mezcla a 15 g de Toyopearl aminado activado con diclorotriazina que se había drenado en agua sobre una frita de vidrio, se transfirió a un recipiente de reacción de plástico y se enfrió hasta 4°C. Se agitó la mezcla durante 60 min. a 4°C, entonces se vertió la mezcla en una frita de vidrio y se lavó con DMF acuosa (50% v/v, 75 ml), agua obtenida por ósmosis inversa (150 ml), entonces se dejó que se drenara en la frita.

3.3 Productos finales

Se prepararon disoluciones de aminas para las reacciones de segunda fase tal como sigue:

- 3.3.1 Se disolvió 1-(2-aminoetil)piperidina (amina 3; 0,94 g) en agua obtenida por ósmosis inversa (10,8 ml).
- 3.3.2 Se disolvió 1-(2-aminoetil)piperazina (amina 4; 1,90 g) en agua obtenida por ósmosis inversa (21,6 ml), entonces se dividió en dos partes (11,8 ml cada una).
- 3.3.3 Se disolvió 2-(2-aminoetil)piridina (amina 11; 0,84 ml) en DMF acuosa (50% v/v, 10,9 ml).
- 3.3.4 Se disolvió feniletilamina (amina 13; 0,88 ml) en DMF acuosa (50% v/v, 10,9 ml), preparada en dos partes iguales.
- 3.3.5 Se disolvió tiramina (amina 4; 0,96 g) en DMF (10,8 ml).

Se ensamblaron las mezclas de reacción a partir de combinaciones del producto intermedio de monoclorotriazina apropiado y amina de segunda fase, preparadas en recipientes de reacción de plástico que contenía el producto intermedio de monoclorotriazina (7 g) y la disolución de amina hasta un volumen de disolvente total de 35 ml, incluyendo 5,75 ml de agua obtenida por ósmosis inversa en 7 g de producto intermedio de monoclorotriazina. Se agitó cada recipiente a 60°C durante 24 h. Entonces se lavaron los geles con DMF acuosa (50% v/v, 35 ml), agua obtenida por ósmosis inversa (35 ml), ácido clorhídrico 0,1 M (35 ml), isopropanol acuoso (30% v/v) que contenía hidróxido de sodio (0,2 M) (35 ml), agua obtenida por ósmosis inversa (70 ml) y etanol acuoso (20% v/v, 21 ml) y se almacenó en etanol acuoso (20% v/v) a 4°C.

Ejemplo 4

Uso de ligandos de unión de príon unidos a resina de polimetacrilato para la captura de PrPsc a partir de concentrado de glóbulos rojos

Se sintetizaron los compuestos que comprendían los ligandos de afinidad unidos a una matriz de polimetacrilato en perlas (Toyopearl) tal como se describió en el ejemplo 3. Se preparó un extracto (1% p/v) de adiciones conocidas de cerebro de hámster infectado con tembladera en concentrado de glóbulos rojos humanos (RBCC) usando el procedimiento descrito para homogenizado de cerebro de hámster normal (ejemplo 2). Se evaluó la unión de PrPsc mediante adsorbentes de afinidad de polimetacrilato empaquetando suspensiones de adsorbente en microcolumnas de 1 ml y exponiendo con adiciones conocidas de RBCC usando el procedimiento descrito en el ejemplo 2. Se realizaron SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western de muestras extraídas a partir de los adsorbentes de afinidad tal como se describió en el ejemplo 1 con la excepción de que se trató un segundo conjunto de alícuotas de muestra con proteinasa K antes del mezclado con tampón reductor de SDS-PAGE.

El análisis de inmunotransferencia de tipo Western indicó que las resinas de polimetacrilato que contenían los ligandos 5/4, 19/13, 5/3, 22/13 y 19/14 demostraron todas alta afinidad por PrPsc en presencia de concentrado de glóbulos rojos humanos. Se confirmó la unión de PrPsc mediante comparación del patrón de bandas de la inmunotransferencia de tipo Western obtenido mediante tratamiento con +/- proteinasa K. La presencia de bandas claramente visibles de peso molecular ligeramente inferior para la muestra tratada con proteinasa K en comparación con la muestra no tratada confirmó la unión de la forma resistente a proteinasa K (forma infecciosa) de PrP.

Ejemplo 5**Uso de ligandos de unión a prión unidos a resina de polimetacrilato para la captura del prión causante de CJD esporádica humana a partir de concentrado de glóbulos rojos**

Se repitió el experimento descrito en el ejemplo 4 usando adiciones conocidas de RBCC con homogenizado de cerebro con CJD esporádica humana al 1% (p/v). El análisis de inmunotransferencia de tipo Western indicó que las resinas de polimetacrilato que contenían los ligandos 5/4, 19/13, 5/3, 22/13 y 3/4 demostraron todas alta afinidad por PrP de cerebro con CJD esporádica humana en presencia de concentrado de glóbulos rojos humanos.

Ejemplo 6**Uso del ligando 5/4 unido a perlas de resina de polimetacrilato para la captura de PrPsc a partir de plasma humano y sangre humana**

Se sintetizó un adsorbente de afinidad que comprende un ligando 5/4 unido a una matriz de polimetacrilato en perlas (Toyopearl) tal como se describió en el ejemplo 3. Se prepararon los extractos (1% p/v) de adiciones conocidas de cerebro de hámster infectado con tembladera en plasma mezclado humano y sangre completa humana usando el procedimiento descrito para el homogenizado de cerebro de hámster normal y RBCC (ejemplo 2). Se evaluó la unión de PrPsc mediante adsorbentes de afinidad de polimetacrilato empaquetando suspensiones de adsorbente en microcolumnas de 1 ml y exponiendo con adiciones conocidas de muestras de plasma y sangre completa usando el procedimiento descrito en el ejemplo 2. Se realizaron SDS-PAGE e inmunotransferencias de tipo Western de muestras extraídas a partir de los adsorbentes de afinidad tal como se describió en el ejemplo 1 con la excepción de que se trató un segundo conjunto de alícuotas de muestra con proteinasa K antes del mezclado con tampón reductor de SDS-PAGE.

El análisis de inmunotransferencia de tipo Western indicó que las resinas de polimetacrilato que contenían ligandos 5/4 demostraron alta afinidad por PrPsc en presencia de plasma humano y sangre completa humana. Se confirmó la unión de PrPsc mediante comparación del patrón de bandas de la inmunotransferencia de tipo Western obtenido mediante tratamiento con +/- proteinasa K. La presencia de bandas claramente visibles de peso molecular ligeramente inferior para la muestra tratada con proteinasa K en comparación con la muestra no tratada confirmó la unión de la forma resistente a proteinasa K (forma infecciosa) de PrP.

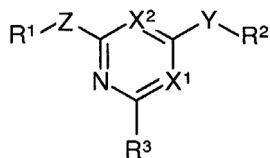
Resultará evidente para el experto en la técnica que el ligando 5/4 y otros ligandos descritos en el presente documento unidos a una matriz de soporte tal como polimetacrilato son especialmente útiles para la captura y concentración de una amplia variedad de formas de proteína priónica a partir de diversos componentes de la sangre, incluyendo sangre completa, RBCC y plasma. Por tanto, tales materiales son de valor excepcional para la eliminación de PrP de tales componentes y como medios de concentración de PrP para ayudar a la posterior detección y cuantificación.

Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o las pruebas de la presente invención, se describieron anteriormente métodos y materiales adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias citadas mencionadas en el presente documento se incorporan como referencia en su totalidad. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

La descripción anterior se facilita para describir diversas realizaciones relacionadas con la invención.

REIVINDICACIONES

1. Uso, *ex vivo*, de un compuesto de fórmula (I):



(I)

5

en la que:

10 R^3 es hidrógeno o un sustituyente de grupo arilo o R^3 es un soporte sólido opcionalmente unido a través de un espaciador;

Z representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o NR^4 ;

15 Y representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o NR^5 ;

en las que R^4 y R^5 , que pueden ser iguales o diferentes, representan hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, fenilo opcionalmente sustituido, bencilo opcionalmente sustituido o β -feniletilo opcionalmente sustituido;

20 uno de X^1 y X^2 representa un átomo de nitrógeno y el otro de X^1 y X^2 representa un átomo de nitrógeno o CR^6 , en el que R^6 representa hidrógeno o un sustituyente de grupo arilo;

y en la que:

25 R^1 representa un grupo $-(CH_2)_m-Q^1$, en el que m es desde 0 hasta 7, y Q^1 representa $-NR^{11}R^{12}$, en el que R^{11} y R^{12} junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un grupo heterocicloalquilo opcionalmente sustituido; y

30 R^2 representa un grupo $-(CH_2)_n-Q^2$, en el que n es desde 0 hasta 7, y Q^2 representa $-CR^{21}R^{22}R^{23}$ o $-NR^{21}R^{22}$, en los que R^{23} representa hidrógeno, alquilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo, y R^{21} , R^{22} , junto con el átomo de carbono o nitrógeno al que están unidos, forman un grupo cicloalquilo opcionalmente sustituido o heterocicloalquilo opcionalmente sustituido;

35 "sustituyente de grupo arilo" se refiere, a menos que se defina lo contrario, a un hidroxilo, amino, alquilo, halógeno, hidroxialquilo, amida, acilo, acilamino, alcoxilo, alcocarbonilo, alquilendioxilo, alquilsulfino, alquilsulfonilo, alquiltio, aroilo, aroilamino, arilo, arilalcoxilo, arilalcoxycarbonilo, arilalquiltio, ariloxilo, ariloxycarbonilo, arilsulfino, arilsulfonilo, ariltio, carboxilo (o un bioisómero ácido), ciano, heteroarilo, heteroarilo, heteroarilaquilo, heteroarilamino, heteroariloxilo, nitro, oxo o trifluorometilo;

40 para la unión por afinidad de una proteína priónica.

2. Método para detectar una proteína priónica en una muestra, y/o eliminar una proteína priónica de una muestra, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1.

45 3. Compuesto de fórmula (I), según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento o retardo del desarrollo de, una patología asociada con priones en un sujeto humano o animal.

4. Uso de un compuesto de fórmula (I), según la reivindicación 1, que no se une a un soporte sólido en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una patología asociada con priones.

50 5. Compuesto de fórmula (I), según la reivindicación 1, en la que:

R^3 es según la reivindicación 1;

55 X^1 y X^2 son ambos N;

Y y Z representan ambos NH;

m representa 2;

Q¹ representa piperidilo o piperazinilo;

n representa 0 ó 2; y

5

Q² representa 1-piperidilo o adamantilo.

6. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, en la que:

10 R³ es según la reivindicación 1;

X¹ y X² son ambos N;

Y y Z representan ambos NH;

15

m representa 2;

Q¹ representa piperazinilo;

20

n representa 0; y

Q² representa norbornilo.

7. Uso o método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el compuesto de fórmula (I) es un compuesto según la reivindicación 5 o la reivindicación 6.

25