

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 997**

51 Int. Cl.:

A61K 31/47 (2006.01) **A61P 39/04** (2006.01)
A61K 31/4709 (2006.01)
A61K 31/4375 (2006.01)
A61K 31/4725 (2006.01)
A61K 31/4412 (2006.01)
A61K 31/517 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
C07D 471/04 (2006.01)
A61P 27/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2007 E 07718737 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2013 EP 2012789**

54 Título: **Método de tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD)**

30 Prioridad:

14.04.2006 US 792278 P

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

15.01.2014

73 Titular/es:

**PRANA BIOTECHNOLOGY LIMITED (100.0%)
LEVEL 2, 369 ROYAL PARADE
PARKVILLE, VIC 3052, AU**

72 Inventor/es:

**BUSH, ASHLEY;
MASTERS, COLIN LOUIS;
HUGGINS, PENELOPE JANE;
PARSONS, JACK GORDON;
KOK, GAIK BENG;
KENCHE, VIJAYA y
EL SOUS, MARIANA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 437 997 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

Método de tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD)

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**CAMPO DE LA INVENCION**

10 La presente invención se refiere en general a compuestos para uso en el tratamiento y la profilaxis de las enfermedades degenerativas de la retina. Más particularmente, la presente invención contempla compuestos para uso en la prevención, reducción del riesgo de desarrollo de, o tratamiento o mejora de otro modo de los síntomas de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) o afecciones retinianas afines en los mamíferos y en particular los humanos. La presente invención proporciona adicionalmente composiciones terapéuticas que permiten la administración dependiente de la dosis o específica de la dosis de agentes útiles en el tratamiento y la profilaxis de la degeneración macular relacionada con la edad o afecciones degenerativas afines de la retina.

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA ANTERIOR

20 La referencia a cualquier técnica anterior en esta memoria descriptiva no es, y no debe considerarse como, un reconocimiento o cualquier forma de sujeción de que la técnica anterior forme parte del conocimiento general común en ningún país.

25 Detalles bibliográficos de referencias en la presente memoria descriptiva se enumeran también al final de la memoria.

30 La degeneración macular es un término clínico que se utiliza para describir una familia de enfermedades que se caracterizan todas ellas por una pérdida progresiva de visión central asociada con anomalías de la membrana de Bruch, la coroides, la retina neural y/o el epitelio del pigmento retiniano. Estos trastornos incluyen afecciones muy comunes que afectan a las personas ancianas - tales como la AMD así como distrofias más raras y de comienzo anterior que en algunos casos pueden detectarse en la primera década de la vida. Otras maculopatías incluyen distrofia macular de Carolina del Norte, distrofia del fundus de Sorsby, enfermedad de Stargardt, distrofia del patrón, enfermedad de Best y Malattia leventinese.

35 La AMD es la causa principal de la pérdida permanente de visión para individuos de edad superior a 65, afectando en la actualidad a aproximadamente 15 millones de Americanos. La AMD afecta a las células fotorreceptoras fotosensibles y las células epiteliales pigmentadas en la mácula, el centro de la retina del ojo. Si bien la misma no puede causar ceguera total, la enfermedad destruye la visión central, haciendo la lectura, la observación de pantallas de monitores electrónicos y la conducción imposibles. No tiene ninguna cura documentada, no ha demostrado en ningún caso remisión espontánea y los tratamientos eficaces son muy limitados.

40 La retina es una red complicada de células nerviosas que cambian la luz en impulsos nerviosos que viajan hasta el cerebro donde los mismos se interpretan como imágenes visuales. La parte central de la retina, denominada la mácula, es responsable de la visión que es necesaria para lectura y otro trabajo de detalle. El deterioro de la mácula da como resultado una visión defectuosa. El proceso más común de la enfermedad que afecta a la mácula es la AMD. En los pacientes con AMD, las células fotorreceptoras retinianas y las células del epitelio pigmentario de la mácula mueren a lo largo del curso de varios años. La muerte celular y la pérdida gradual de visión no comienzan usualmente hasta la edad de 60 o más avanzada, de donde deriva el nombre de degeneración macular relacionada con la edad.

50 Existen dos tipos de AMD: degeneración macular seca y degeneración macular húmeda. La degeneración macular seca, aunque más común, típicamente da como resultado una pérdida de visión menos severa y más gradual. Los pacientes que se ven afectados por la AMD seca experimentan una pérdida gradual de visión central debida a la muerte de células fotorreceptoras y sus asociados próximos, las células retinianas epiteliales pigmentadas (RPE), con deposición de una mixtura amiloide cérica compleja, denominada 'drusas'. Para la visión son esenciales los fotorreceptores, las células de la retina que 'ven' realmente luz. Las células RPE macrofágicas son necesarias para la supervivencia, la función y la renovación de los fotorreceptores.

60 Los pacientes con degeneración macular húmeda desarrollan nuevos vasos sanguíneos bajo la retina. A medida que los fotorreceptores y las células RPE degeneran lentamente, existe cierta tendencia a que crezcan vasos sanguíneos desde su localización normal en la coroides a una localización anormal por debajo de la retina. Este crecimiento anormal de nuevos vasos sanguíneos se conoce como neovascularización coroidal (CNV). Los vasos sanguíneos anormales sufren pérdidas y sangran, causando hemorragia, hinchamiento, tejido de escara, y pérdida severa de visión central. Únicamente el 10% de los pacientes con AMD padecen el tipo húmedo, pero el mismo es responsable del 90% de todos los casos de ceguera resultantes de las AMD.

65

Las células RPE del ojo actúan como macrófagos, que fagocitan y reciclan componentes de los segmentos exteriores membranosos de los fotorreceptores. Si las mitocondrias en el interior de las células RPE se deterioran, el reciclamiento de los fotorreceptores se inhibe, con acumulación resultante de drusas. Las drusas causa un estiramiento lateral de la monocapa RPE y el desplazamiento físico del RPE de su suministro vascular inmediato, el coriocapilaris. Este desplazamiento crea una barrera física que puede impedir la difusión normal de metabolitos y desechos entre el coriocapilaris y la retina.

Dependiendo de la localización, puede administrarse a veces tratamiento con láser para destruir los vasos sanguíneos anormales formados en la AMD húmeda. Únicamente el 15% de los casos de AMD húmeda son elegibles para ser sometidos a tratamiento con láser, dado que los vasos sanguíneos pueden no estar localizados suficientemente cerca de la parte central de la mácula. El láser es un haz de luz que es adsorbido por el pigmento de la sangre, los fármacos y las células RPE, que convierte en energía calorífica que cauteriza los vasos sanguíneos anormales. Frecuentemente la neovascularización se renueva, dado que el estímulo no ha sido eliminado, dando como resultado una pérdida severa de visión. De hecho, la mayoría de los pacientes con AMD, que padecen visión muy deficiente, han perdido la misma debido a secuelas de la neovascularización. La opinión médica actual afirma que no existe ningún tratamiento disponible que evite permanentemente la muerte celular o el crecimiento de vasos sanguíneos anormales que ocurre en la AMD.

Hasta la fecha, no existe ninguna medida específica conocida para prevenir la aparición de la AMD. Para pacientes ya diagnosticados con AMD en uno o ambos ojos, los tratamientos principales actuales incluyen direccionamiento de luz (fototerapia) y/o un suplemento de vitaminas y minerales, cada uno de los cuales es de valor discutible. La fototerapia implica direccionamiento de luz al área macular que contiene la lesión de los vasos sanguíneos defectuosos nacientes para inhibir o deteriorar su función. Un tipo de fototerapia es la terapia fotodinámica (PDT). En la PDT, se administra un agente fotosensible a los vasos de un paciente, después de lo cual se activa el agente en el sitio diana de la lesión de nuevos vasos (mácula) por direccionamiento de luz de baja energía procedente de un láser específicamente a esta área. El agente activado genera radicales libres y otras especies químicas activadas que desestabilizan y destruyen los vasos nuevos.

Se ha informado que la PDT es beneficiosa para los pacientes que padecen AMD. Por ejemplo, un estudio (Arch. Ophthalmol. 117: 1329-1345, 1999) evaluó la PDT en 402 ojos de pacientes diagnosticados con AMD en al menos un ojo. El resultado del tratamiento se evaluó por comparación de la aptitud del paciente para leer exactamente un gráfico de visión convencional (uno que tiene aproximadamente 5 letras por línea) antes del tratamiento y después del tratamiento. A los 12 meses después de la PDT, el 61% de los ojos (246/402) perdían menos de 15 letras (es decir, el paciente perdía menos de aproximadamente 3 líneas de un gráfico visual estándar), mientras que el 46% de los ojos (96/207) de los pacientes que se sometieron a un tratamiento con un placebo perdían menos de 15 letras ($p < 0,001$). A los 24 meses después de la PDT, la agudeza visual y la sensibilidad de contraste se mantenían en los pacientes que recibieron la PDT. Un porcentaje significativamente mayor de estos pacientes (58%) perdían menos de 15 letras, comparados con los pacientes sometidos a tratamiento con un placebo (38%). Sin embargo, solo el 16% de los pacientes que recibieron PDT tenían visión mejorada, comparados con el 7% de los pacientes que recibieron un placebo.

Otro tipo de fototerapia es la terapia de fotocoagulación. En la terapia de fotocoagulación, luz de alta energía procedente de un láser se dirige específicamente al sitio diana de los nuevos vasos. El calor generado por el láser de alta energía coagula el fluido en y alrededor de los vasos nuevos. La fotocoagulación con láser no es una forma de PDT; es un método de tratamiento independiente. La misma utiliza transmisión lateral del calor, aplicada con un método semejante a un cauterio, para coagular el fluido interno y circundante del vaso, mientras que la PDT utiliza un agente fotosensible activado para generar productos químicos activos que deterioran o destruyen los nuevos vasos que contienen el agente.

Si bien la PDT o la terapia de fotocoagulación de láser se utilizan separadamente para tratar los pacientes con AMD, ninguna de ellas carece de inconvenientes. Un problema con la PDT es que sus efectos son transitorios; los pacientes que reciben PDT tienen que volver a tratarse aproximadamente cada 3 meses. Adicionalmente, los pacientes requieren al menos 5 repeticiones de tratamiento en los dos primeros años, simplemente para estabilizar su afección, y antes de que se produzca ningún efecto terapéutico. Estos tratamientos acumulativos deterioran la retina, reduciendo adicionalmente la agudeza visual del paciente.

Un inconveniente de la fotocoagulación con láser es que la misma no es selectiva, y no actúa como diana solo sobre los vasos sanguíneos nuevos. Por tanto, tiene que administrarse de tal manera que únicamente actúe como diana solo sobre las lesiones, y los tejidos circundantes no afectados no se deterioren. Sin embargo, en aproximadamente la mitad de los pacientes con AMD, los vasos nuevos están localizados en el área subfoveal, lo que dificulta o hace imposible dirigir la coagulación con láser sin deteriorar la retina sensorial. Otro inconveniente es que el tratamiento de fotocoagulación no es permanente y las tasas de recurrencia para la producción de vasos nuevos son altas, alcanzando el 39-76%, usualmente dentro de los dos primeros años. Sin embargo, los tratamientos repetidos pueden inducir realmente el crecimiento de nuevos vasos y membranas nuevos (membranas neovasculares subretinianas y neovascularizaciones coroidales recurrentes) en el sitio del tratamiento. Los tratamientos repetidos

pueden deteriorar también irreversiblemente las áreas de la retina no afectadas, con inclusión de la retina neurosensorial y la RPE. Por tanto, el tratamiento propiamente dicho puede dar como resultado que el paciente padezca una visión aún más reducida durante cierto periodo de tiempo. Específicamente, algunos pacientes sometidos a terapia de fotocoagulación desarrollan escotoma, que es un área de visión deprimida dentro del campo visual, rodeada por un área de visión menos deprimida o de visión normal.

WO 2004/007461 da a conocer derivados de 8-hidroxi-quinolina para uso en el tratamiento, mejora y/o profilaxis de una afección neurológica. Compuestos neurológicamente activos que comprenden dos anillos fusionados de 6 miembros con átomos de nitrógeno en las posiciones 1 y 3, un grupo carboxi en la posición 4 y un grupo hidroxilo en la posición 8, siendo uno de los anillos aromático, se dan a conocer en WO 2005/095360. WO 2004/031161 da a conocer compuestos neurológicamente activos que son compuestos heterocíclicos que tienen dos anillos condensados de 6 miembros con un átomo de nitrógeno en la posición 1 y un grupo hidroxilo o mercapto en la posición 8, siendo al menos uno de los anillos aromático. WO 2004/087160 da a conocer compuestos heterocíclicos para uso en la profilaxis y/o el tratamiento de una afección asociada con o facilitada por estrés oxidante. Agentes antiinflamatorios no esteroideos para uso en el tratamiento de la degeneración macular se dan a conocer en WO 94/21246.

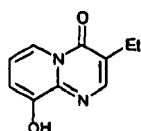
Existe necesidad, por tanto, de desarrollar métodos alternativos para tratar la AMD o afecciones relacionadas.

20 SUMARIO DE LA INVENCIÓN

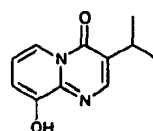
La presente invención está basada en parte en la determinación reciente de que los depósitos proteínicos en la membrana limitante de la retina, a los que se hace referencia como "drusas", comprenden también cinc y cobre y por tanto se ha propuesto que son similares a una placa de tipo amiloide. Por tanto, la presente invención contempla el uso de un compuesto atenuador de metaloproteínas (MPAC) para reducir los niveles de o eliminar de otro modo el exceso de metal de las drusas, restableciendo con ello la homeostasis normal de metales en la retina. Los compuestos de la presente invención son particularmente útiles para tratamiento o prevención o reducción de otro modo el riesgo de desarrollo de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD); sin embargo, la presente invención se extiende a tales compuestos para uso en el tratamiento de cualquier trastorno degenerativo retiniano asociado con agregados, complejos, depósitos o placas de tipo amiloide o cualquier afección asociada con drusas que comprenda exceso de metales.

Los compuestos de la presente invención son útiles con indiferencia de cualquier inhibición de una metaloproteína de la matriz y/o una cantidad específica de la dosis de MPAC que pueda emplearse. Puede administrarse un solo agente o una combinación de dos o más agentes.

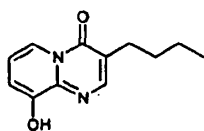
Los presentes agentes comprenden al menos dos anillos condensados de 6 miembros con al menos un átomo de nitrógeno en la posición 1 y un grupo hidroxilo en la posición 8. Los compuestos se seleccionan de los siguientes:



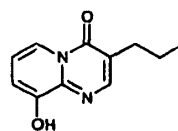
PB 1124



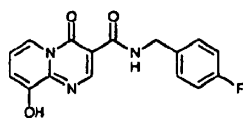
PB 1135



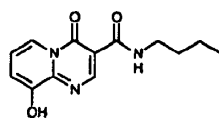
PB 1144



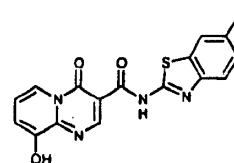
PB 1149



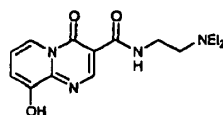
PB 1154



PB 1159



PB 1174



PB 1197

o una sal farmacéuticamente aceptable o derivado de los mismos.

5 Por tanto, un aspecto de la presente invención contempla un compuesto de la invención para uso en el tratamiento o la profilaxis de una afección degenerativa de la retina o trastorno en un individuo, en condiciones eficaces para alterar los niveles de metales en las drusas retinianas o tejido circundante.

10 Las expresiones "alterar los niveles de metal" y "reducir el metal" se utilizan en su sentido más amplio y hacen referencia a un cambio en la distribución de un metal en las drusas retinianas o tejido circundante así como un cambio en la cantidad o actividad de metal en las drusas o tejido circundante. Las expresiones se refieren también a una reducción en la cantidad o actividad de metal en las drusas retinianas o tejido circundante así como a una
15 reducción en la cantidad o actividad de metal en áreas particulares, es decir la distribución de metal en las drusas retinianas o tejido circundante.

La selección de un MPAC es por regla general, pero no exclusivamente indiferente de su aptitud para inhibir una metaloproteinasas. Puede administrarse también una cantidad de dosificación definida o específica.

20 De acuerdo con ello, otro aspecto de la presente invención proporciona un compuesto para uso en el tratamiento o la profilaxis de una afección o trastorno degenerativo retiniano en un individuo, en condiciones eficaces para reducir los niveles de metal en las drusas retinianas o tejido circundante, con indiferencia de cualquier efecto sobre una metaloproteinasas de la matriz.

25 La referencia a "indiferente" significa que pueden inhibirse una sola o más metaloproteinasas o no se inhibe metaloproteinasas alguna.

Los compuestos de la invención pueden utilizarse en terapia de combinación en la cual se administran dos o más de
30 tales compuestos o bien se administra uno solo de tales compuestos y otro principio activo tal como un quelador de metales, citoquina, molécula genética, agente antimicrobiano o antiviral, un antioxidante, un antibiótico y/o un anestésico.

El sujeto preferido es un humano, aunque la presente invención tiene aplicación en las industrias veterinaria, de las
35 carreras de caballos y la cría de animales.

Las abreviaturas utilizadas en esta memoria se definen en la Tabla 1.

TABLA 1 - ABREVIATURAS

ABREVIATURA	DESCRIPCIÓN
AMD	Degeneración macular relacionada con la edad
BBB	Barrera hematoencefálica
CNV	Neovascularización coroidal
Drusas	Depósitos proteináceos sobre la membrana limitante de la retina
MPAC	Compuesto atenuador de metaloproteinas
PDT	Terapia fotodinámica
Células RPE	Células retinianas epiteliales pigmentadas

40 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

A lo largo de esta memoria descriptiva, a no ser que el contexto requiera otra cosa, el término "comprenden", o
45 variaciones tales como "comprende" o "que comprende", deberían entenderse con la implicación de la inclusión de un elemento o entidad o grupo de elementos o entidades, pero no la exclusión de cualquier otro elemento o entidad o grupo de elementos o entidades.

La referencia a cualquier técnica anterior en esta memoria descriptiva no es, y no debería interpretarse como, un reconocimiento o forma alguna de sugestión de que dicha técnica anterior forme parte del conocimiento general común en ningún país.

5 Debe entenderse que, a no ser que se indique otra cosa, la presente invención no está limitada a componentes de formulación específicos, métodos de fabricación, materiales biológicos o reactivos, regímenes de dosificación y análogos, dado que los mismos pueden variar. Debe entenderse también que la terminología utilizada en esta memoria se emplea con el propósito de describir realizaciones particulares.

10 Como se utilizan en la presente memoria descriptiva, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen los aspectos plurales a no ser que el contexto dicte claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una formulación" incluye una sola formulación, así como dos o más formulaciones; la referencia a "un agente" o "un reactivo" incluye un solo agente reactivo, así como dos o más agentes o reactivos; etcétera.

15 Los términos "agente", "reactivo", "compuesto", "agente farmacológicamente activo", "medicamento", "terapéutico", "principio activo" y "fármaco" se utilizan intercambiamente en esta memoria para hacer referencia a una sola entidad química o biológica que induce o exhibe un efecto deseado tal como mejora de los síntomas de una enfermedad degenerativa retiniana. Los términos abarcan también ingredientes farmacéuticamente aceptables y farmacológicamente activos de aquellos agentes activos mencionados específicamente en esta memoria. Cuando se
20 utilizan los términos "agente", "reactivo", "compuesto", "agente farmacológicamente activo", "medicamento", "terapéutico", "activo" y "fármaco", debe entenderse entonces que esto incluye la entidad activa *per se* así como sales, ésteres, amidas, profármacos, metabolitos, análogos, farmacéuticamente aceptables y farmacológicamente activos, etc.

25 La referencia a un "agente", "agente químico", "compuesto", "agente farmacológicamente aceptable", "medicamento", "terapéutico", "principio activo" y "fármaco" incluye combinaciones de dos o más agentes activos. Una "combinación" incluye también composiciones de partes múltiples tales como una composición de dos partes en la que los agentes se proporcionan por separado y se administran o dispensan separadamente o mezclados uno con otro antes de la dispensación. Por ejemplo, un envase farmacéutico multi-partes puede tener dos o más agentes
30 mantenidos separadamente. Por tanto, este aspecto de la presente invención incluye terapia de combinación. La terapia de combinación incluye la co-administración de un quelador de metales y otro principio activo tal como un compuesto químico, citoquina, molécula genética, agente antimicrobiano o antiviral, un antibiótico y/o un anestésico.

Los términos "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente como se utiliza en esta memoria
35 significan que una cantidad suficiente del agente para proporcionar el efecto o resultado terapéutico o fisiológico deseado. Dicho efecto o resultado incluye la alteración o reducción de la disponibilidad de iones metálicos y/o la reducción de su cantidad en las drusas, reducción de los niveles de amiloide, reducción o prevención de la degeneración macular o una afección relacionada y/o tratamiento o prevención del deterioro de la visión. Efectos indeseables, v.g. efectos secundarios, se manifiestan a veces junto con el efecto terapéutico deseado; por tanto, un
40 especialista debe contrarrestar los beneficios potenciales contra los riesgos potenciales en la determinación de lo que es una "cantidad eficaz". La cantidad exacta requerida variará de un individuo a otro, dependiendo de la especie, edad y estado general del individuo, el modo de administración y factores análogos. Así pues, puede no ser posible especificar una "cantidad eficaz" exacta. Sin embargo, una "cantidad eficaz" en cualquier caso individual puede ser determinada por una persona con experiencia ordinaria en la técnica utilizando únicamente
45 experimentación de rutina.

La cantidad eficaz se considera como la cantidad requerida para prevenir o mejorar los síntomas de la afección de regeneración retiniana tal como la AMD. En una realización, la cantidad de MPAC utilizada es la cantidad requerida para o que es eficaz en la reducción de los niveles de drusas metálico. Ejemplos de metales incluyen cinc y cobre.
50 Cantidades eficaces incluyen desde 1 ng/ml a 1000 mg/ml tales como desde aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 500 mg/ml, o aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 100 mg/ml o cantidades o rangos comprendidos entre éstos.

Los términos "metal" e "ion metálico" pueden utilizarse intercambiamente en este contexto.

55 Por portador, excipiente o diluyente "farmacéuticamente aceptable" se entiende un vehículo farmacéutico constituido por un material que no es biológicamente o bajo ningún otro aspecto indeseable, es decir el material puede ser administrado a un individuo junto con el agente activo seleccionado sin causar ninguna reacción sustancialmente adversa. Los portadores pueden incluir excipientes y otros aditivos tales como diluyentes, detergentes, agentes colorantes, agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH, conservantes, y análogos.
60

Análogamente, una sal "farmacológicamente aceptable" de un compuesto como se proporciona en esta memoria es una sal que no es biológicamente o en ningún otro sentido indeseable.

El "tratamiento" de un individuo puede implicar la prevención de una afección degenerativa retiniana u otro evento fisiológico adverso en un individuo susceptible así como el tratamiento de un individuo clínicamente sintomático por mejora de los síntomas de la afección. En particular, la presente invención contempla una reducción de la formación de placas de tipo amiloide y/o una reducción en el contenido de metales en las drusas para restablecer la homeostasis normal de metales en la retina.

El "individuo" como se utiliza en esta memoria hace referencia a un animal, preferiblemente un mamífero y más preferiblemente un primate con inclusión de un primate inferior o incluso más preferiblemente un humano que puede beneficiarse de las formulaciones y métodos de la presente invención. Un individuo, con indiferencia de si se trata de un humano o un animal no humano puede considerarse como un individuo, paciente, animal, hospedador o receptor. Los compuestos y métodos de la presente invención tienen aplicaciones en medicina humana, medicina veterinaria así como en la cría general de animales, domésticos o salvajes. Por conveniencia, un "animal" incluye una especie de ave tal como un ave de corral (con inclusión de patos, pollos, pavos y gansos), un ave de pajarera o un ave de caza. La afección en un animal no humano puede no ser una afección existente naturalmente, sino inducida por ejemplo en un animal modelo.

Como se ha indicado arriba, los animales preferidos son humanos, primates no humanos tales como titís, babuinos, orangutanes, primates inferiores tales como tupia, animales de ganado, animales de laboratorio de ensayos, animales de compañía o animales salvajes cautivos. Un humano es la diana más preferida. Sin embargo, pueden utilizarse modelos de animales no humanos.

Ejemplos de animales de laboratorio de ensayos incluyen ratones, ratas, conejos, cobayos y hámsters. Conejos y animales roedores, tales como ratas y ratones, proporcionan un sistema de test o modelo animal conveniente, al igual que los primates y primates inferiores. Animales de ganado incluyen ovejas, vacas, cerdos, cabras, caballos y burros. Se contemplan también animales no mamíferos tales como especies de aves, pez cebra, anfibios (con inclusión de sapos de caña) y especies de *Drosophila* tales como *Drosophila melanogaster*. En lugar de un modelo animal vivo, un sistema de test puede comprender también un sistema de cultivo de tejidos.

Una "afección degenerativa retiniana" es una afección que se caracteriza por una pérdida progresiva de visión. Afecciones dentro del alcance de este término incluyen degeneración macular relacionada con la edad (AMD), distrofia macular de Carolina del Norte, distrofia del fundus de Sorsby, enfermedad de Stargardt, distrofia del patrón, enfermedad de Best y Malattia leventinese.

Una afección particular para la cual los agentes de la presente invención pueden ser eficaces es la AMD. Sin embargo, la presente invención se extiende a cualquier enfermedad degenerativa retiniana asociada con o caracterizada por agregados, depósitos o placas de tipo amiloide.

Por tanto, un aspecto de la presente invención contempla un compuesto para uso en el tratamiento o la profilaxis de una afección degenerativa retiniana o trastorno en un individuo, en condiciones eficaces para alterar los niveles de metales en las drusas retinianas o tejido circundante. En una realización, los niveles alterados de metales son niveles reducidos de metales.

En otra realización, la presente invención proporciona un compuesto para uso en el tratamiento o la profilaxis de una afección o trastorno degenerativo retiniano en un individuo, en condiciones eficaces para alterar los niveles de metales en las drusas retinianas o tejido circundante, con indiferencia de cualquier efecto sobre una metaloproteinasas de la matriz. En una realización, los niveles alterados de metales son niveles reducidos de metales.

La presente invención proporciona también el uso de un compuesto en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la AMD en un individuo.

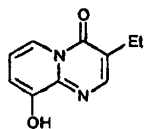
Los agentes de la presente invención comprenden al menos dos anillos condensados de 6 miembros con al menos un nitrógeno en la posición 1 y un grupo hidroxilo en la posición 8. A los agentes de la presente invención se hace referencia colectivamente como compuestos atenuadores de las proteínas metálicas o MPACs, y tienen una o más de las propiedades siguientes: actuar como ionóforos (es decir capturar y transferir metales en las células), es un aglutinante de metales, atraviesa la barrera hematoencefálica (BBB), exhibe una toxicidad celular reducida, es capaz de disolver o alterar los depósitos, agregados o placas de proteínas de tipo amiloide y es estable en ambientes acuosos. Preferiblemente, los agentes tienen 2 o más, 3 o más, o 4 o más o 5 o más de las propiedades arriba indicadas.

Compuestos particularmente útiles, definidos más adelante en esta memoria, incluyen los de la Tabla 8, tales como PB-1135 y PB-1149 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

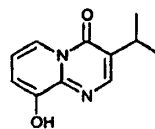
La presente invención proporciona también un compuesto para uso en la reducción de los niveles de un metal de las drusas retinianas en un fluido para mejorar con ello los síntomas de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD).

5 Ejemplos de metales incluyen cinc y cobre.

Los agentes de la presente invención se seleccionan de los siguientes:

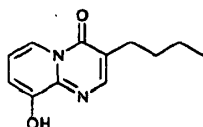


PB 1124

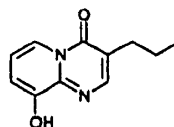


PB 1135

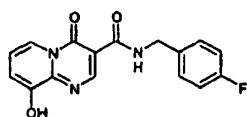
10



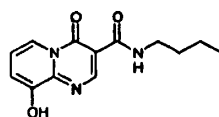
PB 1144



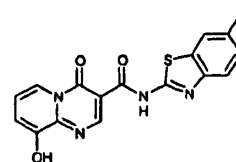
PB 1149



PB 1154

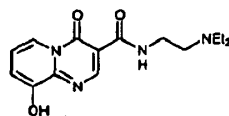


PB 1159



PB 1174

15



PB 1197

20 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para uso en el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad en un individuo.

25 El grupo 8-hidroxilo en los compuestos anteriores puede estar bloqueado formando un profármaco, en particular un profármaco éster. El grupo 8-hidroxilo representa un sitio principal de metabolismo para los compuestos anteriores: la conjugación con ácido glucurónico o sulfato da una especie química hidrófila lista para ser excretada.

30 El término "antioxidante" se utiliza en esta memoria en su sentido más amplio y hace referencia a un grupo que tiene la capacidad de reaccionar con una especie química reactiva de oxígeno tal como un radical hidroxilo de tal manera que genere un producto no tóxico. Ejemplos incluyen fenoles tales como 3,4,5-trimetoxifenilo y 3,5-di-ter-butyl-4-hidroxifenilo, o indol-aminas tales como melatonina y flavonoides. Otros ejemplos pueden encontrarse en la bibliografía (Wright et al, J Am Chem Soc 123: 1173-1183, 2001).

35 El término "resto diana" se utiliza en esta memoria en su sentido más amplio y hace referencia a un grupo que facilitará el suministro del fármaco al cerebro por la vía de un mecanismo de transporte activo. El resto diana es reconocido por enzimas transportadoras específicas integrales a la barrera hematoencefálica, y estas enzimas transportadoras proporcionan luego un mecanismo para que el fármaco se importe en el cerebro. Típicamente, tales transportadores son dependientes de sodio y sus sustratos contienen ácidos carboxílicos tales como ácido ascórbico y L-glutamato. La conjugación del resto diana con el fármaco tiene lugar de tal modo que retiene el resto ácido.

40 El término "quelador de metales" como se utiliza en esta memoria, se distingue del concepto previamente conocido de "terapia de quelación". La "terapia de quelación" es un término asociado químicamente con la eliminación de las acumulaciones de metal tales como en la enfermedad de Wilson, la talasemia β y la hemocromatosis.

Las sales de los compuestos anteriores son con preferencia farmacéuticamente aceptables, pero se apreciará que sales no aceptables farmacéuticamente caen también dentro del alcance de la presente invención, dado que estas son útiles como compuestos intermedios en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de cationes farmacéuticamente aceptables tales como sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, amonio y alquilamonio; sales de adición de ácido de ácidos inorgánicos farmacéuticamente aceptables tales como los ácidos clorhídrico, ortofosfórico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, carbónico, bórico, sulfámico y bromhídrico; o sales de ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables tales como los ácidos acético, propiónico, butírico, tartárico, maleico, hidroximaleico, fumárico, cítrico, láctico, mícico, glucónico, benzoico, succínico, oxálico, fenilacético, metanosulfónico, trihalometanosulfónico, toluenosulfónico, bencenosulfónico, salicílico, sulfanílico, aspártico, glutámico, edético, esteárico, palmítico oleico, láurico, pantoténico, tánico, ascórbico y valérico.

Adicionalmente, algunos de los compuestos de la presente invención pueden formar solvatos con agua o disolventes orgánicos comunes. Tales solvatos están abarcados dentro del alcance de la presente invención.

El término "tautómero" se utiliza en esta memoria en su sentido más amplio para incluir los compuestos anteriores que son capaces de existir en un estado de equilibrio entre dos formas isómeras. Tales compuestos pueden diferir en el enlace que conecta dos átomos o grupos y en la posición de estos átomos o grupos en el compuesto.

Las composiciones de la presente invención comprenden al menos uno de los compuestos anteriores junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables y opcionalmente otros agentes terapéuticos. Cada portador, diluyente, adyuvante y/o excipiente tiene que ser farmacéuticamente "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la composición y no lesivo para el individuo. Composiciones incluyen aquéllas que son adecuadas para administración oral, rectal, nasal, tópica (con inclusión de bucal y sublingual), vaginal o parenteral (con inclusión de la administración subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). Las composiciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosis unitaria y se pueden preparar por métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Tales métodos incluyen el paso de poner en asociación al ingrediente activo con el portador que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones se preparan por puesta en asociación uniforme e íntima del ingrediente activo con portadores, diluyentes, adyuvantes y/o excipientes líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y posteriormente, en caso necesario, conformación el producto.

Los compuestos arriba indicados pueden administrarse por vías oral, tópica, o parenteral en formulaciones de dosis unitarias que contienen portadores, adyuvantes y vehículos convencionales no tóxicos y farmacéuticamente aceptables. El término parenteral, tal como se utiliza en esta memoria, incluye inyecciones subcutáneas, aerosoles para administración a los pulmones o la cavidad nasal, técnicas de administración intravenosa, intramuscular, intratecal, intracraneal, de inyección o infusión. Es particularmente útil la administración intraocular.

La presente invención proporciona también formulaciones farmacéuticas tópicas, orales y parenterales adecuadas. Los compuestos de la presente invención pueden administrarse por vía oral como tabletas, suspensiones acuosas o aceitosas, pastillas, trociscos, polvos, gránulos, emulsiones, cápsulas, jarabes o elixires. La composición para uso oral puede contener uno o más agentes seleccionados del grupo de agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y agentes conservantes a fin de producir preparaciones farmacéuticamente elegantes y agradables al paladar. Edulcorantes adecuados incluyen sacarosa, lactosa, glucosa, aspartamo o sacarina. Agentes desintegrantes adecuados incluyen almidón de maíz, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, goma de xantano, bentonita, ácido algínico o agar. Agentes saborizantes adecuados incluyen aceite de menta, aceite de gaulteria, y saborizante de cereza, naranja o frambuesa. Conservantes adecuados incluyen benzoato de sodio, vitamina E, alfatocoferol, ácido ascórbico, metil-parabén, propil-parabén o bisulfito de sodio. Lubricantes adecuados incluyen estearato de magnesio, ácido esteárico, oleato de sodio, cloruro de sodio o talco. Agentes de retardo temporal adecuados incluyen monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. Las tabletas contienen el ingrediente activo en mixtura con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables que son adecuados para la fabricación de tabletas.

Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, (1) diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; (2) agentes granulantes y desintegrantes, tales como almidón de maíz o ácido algínico; (3) agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o goma arábiga; y (4) agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Estas tabletas pueden carecer de revestimiento o estar revestidas por técnicas conocidas para retardar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal, y proporcionar por consiguiente una acción sostenida durante un periodo más largo. Por ejemplo, puede emplearse un material de retardo temporal tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. El revestimiento puede realizarse también utilizando técnicas descritas en las Patentes U.S. Núms. 4.256.108; 4.160.452; y 4.265.874 para formar tabletas terapéuticas osmóticas para liberación controlada.

Los compuestos anteriores, así como el agente farmacéuticamente activo pueden administrarse, para aplicación *in vivo*, por vía parenteral por inyección o por perfusión gradual a lo largo del tiempo independientemente o juntos. La administración puede ser intra-ocular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea,

intracavitaria, transdérmica o por infusión mediante, por ejemplo, bombas osmóticas. Para estudios *in vitro*, los agentes pueden añadirse o disolverse en un tampón apropiado biológicamente aceptable y añadirse a una célula o tejido.

5 Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones, y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Portadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólico/acuosas, con inclusión de solución salina y medios tamponados. Vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, vehículos intravenosos de Ringer lactados incluyen reestablecedores de fluidos y nutrientes, reestablecedores de electrolitos tales como los basados en dextrosa de Ringer), y análogos. Pueden estar presentes también conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, factores de crecimiento y gases inertes y análogos.

15 La presente invención incluye diversas composiciones farmacéuticas útiles para la mejora de enfermedades. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con una realización de la invención se preparan poniendo un compuesto arriba indicado, análogos, derivados o sales de los mismos, o combinaciones de los compuestos anteriores y uno o más agentes farmacéuticamente activos en una forma adecuada para administración a un individuo utilizando portadores, excipientes y aditivos o adyuvantes. Portadores o adyuvantes utilizados frecuentemente incluyen carbonato de magnesio, dióxido de titanio, lactosa, manitol y otros azúcares, talco, proteína de leche, gelatina, almidón, vitaminas, celulosa y sus derivados, aceites animales y vegetales, polietilenglicoles y disolventes, tales como agua estéril, alcoholes, glicerol y alcoholes polivalentes. Vehículos intravenosos incluyen reestablecedores de fluidos y nutrientes. Los conservantes incluyen antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes. Otros portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas, excipientes no tóxicos, con inclusión de sales, conservantes, tampones y análogos, como se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, edición 20ª, Williams and Wilkins (2000) y en el British National Formulary, edición 43ª (British Medical Association and Royal Pharmaceutical Society de Gran Bretaña, 2002; <http://bnf.rhn.net>). El pH y la concentración exacta de los diversos componentes de la composición farmacéutica se ajustan de acuerdo con habilidades de rutina conocidas en la técnica. Véase Goodman y Gilman's, The Pharmacological Basis for Therapeutics (7ª edición, 1985).

Las composiciones farmacéuticas se preparan y administran preferiblemente en unidades de dosificación. Unidades de dosificación sólidas pueden ser tabletas, cápsulas y supositorios. Para el tratamiento de un individuo, dependiendo de la actividad del compuesto, el modo de administración, la naturaleza y gravedad del trastorno, la edad y el peso corporal del individuo, pueden utilizarse dosis diarias diferentes. En ciertas circunstancias, sin embargo, pueden ser apropiadas dosis diarias mayores o menores. La administración de la dosis diaria puede llevarse a cabo por administración simple en la forma de una unidad de dosificación individual o bien varias unidades de dosis más pequeñas así como por administración múltiple de dosis subdivididas a intervalos específicos.

40 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden administrar local o sistémicamente en una dosis terapéuticamente eficaz. Las cantidades eficaces para este uso dependerán, por supuesto, de la gravedad de la enfermedad y del peso y el estado general del individuo. Típicamente, las dosis utilizadas *in vitro* pueden proporcionar orientación útil en las cantidades útiles para administración *in situ* de la composición farmacéutica, y pueden utilizarse modelos animales para determinar las dosis eficaces para el tratamiento de los efectos citotóxicos secundarios. Diversas consideraciones se describen, v.g., en Langer, Science, 249: 1527, (1990). Las formulaciones para uso oral pueden encontrarse en forma de cápsulas de gelatina dura, en las que el ingrediente activo está mezclado con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín. Las mismas pueden encontrarse también en forma de cápsulas de gelatina blanda en las que el ingrediente activo está mezclado con agua o un medio aceitoso, tal como aceite de cacahuete, aceite de parafina o aceite de oliva.

50 Las suspensiones acuosas contienen normalmente los materiales activos en mixtura con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes pueden ser (1) agente de suspensión tal como carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga; (2) agentes dispersantes o humectantes que pueden ser (a) un fosfático existente naturalmente tal como lecitina; (b) un producto de condensación de un óxido de alquileo con un ácido graso, por ejemplo, poli(estearato de oxi-etileno); (c) un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga, por ejemplo, heptadecaetilenoicetanol; (d) un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y hexitol tal como monooleato de polioxietilen-sorbitol, o (e) un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de polioxietilen-sorbitán.

Las composiciones farmacéuticas pueden encontrarse en la forma de una suspensión inyectable estéril acuosa u oleaginosa. Esta suspensión puede formularse de acuerdo con métodos conocidos utilizando aquellos agentes adecuados dispersantes o humectantes y agentes de suspensión que han sido mencionados anteriormente. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión estéril inyectable en un diluyente o

disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran agua, solución de Ringer, y solución isotónica de cloruro de sodio. Se emplean además convencionalmente como disolvente o medio de suspensión aceites estériles fijos. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo no irritante con inclusión de mono-
5 o diglicéridos sintéticos. Adicionalmente, ácidos grasos tales como ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables.

Los compuestos anteriores se pueden administrar también en la forma de sistemas de suministro de liposomas, tales como pequeñas vesículas unilaminares, vesículas unilaminares grandes, y vesículas multilaminares. Los liposomas pueden formarse a partir de una diversidad de fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina, o fosfatidilcolinas.
10

Los compuestos anteriores se pueden presentar también para uso en la forma de composiciones veterinarias, que pueden prepararse, por ejemplo, por métodos que son convencionales en la técnica. Ejemplos de tales composiciones veterinarias incluyen las adaptadas para:
15

(a) administración oral, aplicación externa, por ejemplo pociones (v.g. soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas); tabletas o bolos; polvos, gránulos o pelets para mixtura con piensos; pastas para aplicación a la lengua;
20

(b) administración parenteral, por ejemplo por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa, v.g., como una solución o suspensión estéril; o (en caso apropiado) por inyección intramamaria donde se introduce una suspensión o solución en la ubre a través del pezón;

(c) aplicaciones tópicas, v.g. como una crema, ungüento o spray aplicado a la piel; o
25

(d) intravaginalmente, v.g. como un pesario, crema o espuma.

La presente invención se describe adicionalmente por los ejemplos que siguen.
30

EJEMPLO 1

Disolución mediada por el compuesto PB de abeta 1-42 agregado

Abeta 1-42 está disponible de Keck Laboratory, Yale University School of Medicine. PBS(pH 6.6): Sigma Cat# D-8662. Zn(ZnCl₂): BDH Cat# 100884E. (Disuelto en agua en concentración 1 mM) DMSO: Ajax Cat# 2225. Tioflavina T: Sigma Cat# T-3516. (Disuelta en agua en concentración 1 mM).
35

A modo de ejemplo de una composición amiloide, se disuelve Abeta en agua destilada y se evalúa la concentración de péptido por medida de la absorción a 214 nm en un espectrómetro UV. Una mixtura reactiva de agregación (para una concentración de un compuesto de test) se prepara como sigue: Abeta: 25 µM, ZnCl₂ 50 µM, ThT 50 µM, PBS para completar hasta 500 µl. El tubo se envuelve con papel metalizado y se incuba a 37 grados por rotación durante 24 horas. Se hace una dilución seriada de cada compuesto de test en DMSO, por ejemplo: 100 µM, 500 µM, 1000 µM, 2500 µM y 5000 µM. Las concentraciones finales son 1, 5, 10, 25 y 50 µM. Se ponen 5 µl de cada uno de estos compuestos en un tubo de centrifuga y se añaden 5 µl de DMSO a los tubos de control tanto negativos como positivos. Se añaden 495 µl de agregados (después de 24 horas de incubación) al tubo de centrifuga. El control negativo es PBS más ZnCl₂ y ThT y DMSO. El control positivo consiste en agregados más DMSO. Los tubos se incuban a 37 grados durante 2 horas más con rotación. Las muestras se miden respecto a fluorescencia ThT utilizando un fluorímetro LS55 (Perkin Elmer) en una cubeta (volumen de 500 µl). La longitud de onda de excitación es 450 nm y la longitud de onda de emisión es 480 nm. Los datos se analizan utilizando un programa de Prisma GraphPad. Los compuestos testados incluían los denominados compuestos "PB".
40
45
50

EJEMPLO 2

Cribado post-mortem

Se ha adoptado el ensayo BAS para la retina post-mortem. Utilizando un trépano, se diseccionan regiones de 6 mm de diámetro de la retina periférica de ojos congelados de donantes. Después de la descongelación, la retina neuronal y las células RPE se separan por agitación suave en tampón PBS. Después de la separación de las células RPE, se cortan del ojo tiras de la membrana de Bruch.
55
60

Se preparan cuatro muestras:

1) control
65

2) TPEN 100 μ M

3) PB-1033 100 μ M

5 4) PB-1033 250 μ M

Después de 30 minutos de incubación, se lavan 3 veces las muestras con PBS y se realiza luego una aplicación de ZB1 10 μ M (sensor de fluorescencia para cinc) durante 10 minutos.

10 Se lavan luego 3 veces las muestras y se visualiza el marcador utilizando un microscopio de fluorescencia y confocal.

Se realiza una repetición de este procedimiento con la excepción de que las muestras se incuban durante un periodo de 15 horas antes del lavado para determinar la fijación diferencial de metal durante este periodo más largo.

15 Los resultados del test se presentan en forma de imágenes de fluorescencia obtenidas en un microscopio confocal de las 4 muestras testadas en este ejemplo después de 15 horas de incubación de la muestra. Los resultados demostraron que TPEN inhibía la marcación con ZP1, indicando la eficacia del ensayo.

20 EJEMPLO 3

Prueba clínica

25 Se seleccionan pacientes AMD y se les administra un compuesto de test (con inclusión de un compuesto PB) a una concentración de 500 mg/día durante un mes. Se toman lecturas en la línea base y luego al cabo de un mes, que incluyen:

1. microperimetría; y

30 2. retinografía multifocal.

Si las retinas se liberan de estrés oxidante después del tratamiento con MPAC, ello se vería reflejado por la estabilización de estos marcadores de salud retiniana.

35 EJEMPLO 4

Evaluación de los Compuestos

Se utilizaron los ensayos siguientes en la evaluación de los compuestos.

40

Ensayo 1. Ensayo Fluorométrico de H₂O₂

45 Se utilizó un ensayo fluorométrico para testar la capacidad de un compuesto de test para inhibir la generación de peróxido de hidrógeno por A β en presencia de cobre basado en diacetato de diclorofluoresceína (DCF; Molecular Probes, Eugene, OR). La solución de DCF (5 mM) en dimetil-sulfóxido 100% (purgada previamente con argón durante 2 horas a 20°C) se desacetiló en presencia de NaOH 0,25 M durante 30 min y se neutralizó a pH 7,4 hasta una concentración final de 1 mM. Se preparó solución stock de peroxidasa de rábano picante (HRP) a 1 μ M a pH 7,4. Las reacciones se llevaron a cabo en PBS, pH 7,4 en una placa de 96 pocillos (volumen total = 250 μ l/pocillo). Las soluciones de reacción contenían A β 1-42 a concentraciones comprendidas en el rango de 50 nM a 1 μ M, se preparó quelato de cobre-glicina (Cu-Gly), por adición de CuCl₂ a glicina en la ratio de 1:6 y se añadió al A β en la proporción 2 Cu-Gly:1A β), pudiendo estar presentes agentes reductores con inclusión de dopamina (5 μ M) o ácido ascórbico, DCF desacetilado 100 μ M, y HRP, 0,1 μ M. Puede estar presente también EDTA 1-10 μ M u otro quelante como control para cobre libre, pero no era necesario para que funcionara el ensayo. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 60 min. Pueden incluirse estándares de catalasa (4000 unidades/ml) y H₂O₂ (1-2,5 μ M) en PBS de pH 7,4 como controles positivos. La fluorescencia se registró utilizando un lector de placas con filtros de excitación y emisión a 485 nM y 530 nM respectivamente. La concentración de H₂O₂ puede establecerse por comparación de la fluorescencia con los estándares de H₂O₂. La inhibición de la producción de A β H₂O₂ se ensayó con inclusión de una concentración dada de compuesto(s) de test en los pocillos de test.

60 **Ensayo 2. Ensayos de Neurotoxicidad**

Cultivos primarios de neuronas corticales

65 Se prepararon cultivos corticales como se ha descrito previamente (White et al., J Neuroscience 18: 6207-6217, 1998). Se separaron cortezas de embrión de ratón de 14 días BL6Jx129sv, se disecaron exentas de meninges y se

5 disociaron en tripsina al 0,025% (peso/vol). Las células disociadas se extendieron en placas de cultivo de 48 pocillos a una densidad de 2×10^6 células/ml en MEM con FCS al 25% (vol/vol) y HS al 5% (vol/vol) y se incubaron a 37°C durante 2 horas. El medio se reemplazó luego con medio Neurobasal (Invitrogen Life Technologies) y suplementos de B27 (Invitrogen Life Technologies). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en CO₂ al 5%. Antes de la experimentación, el medio de cultivo se reemplazó con medio Neurobasal y antioxidantes B27 minus (Invitrogen Life Technologies).

Ensayo 3. Ensayo MTS para Viabilidad Celular

10 La viabilidad celular se determina utilizando el ensayo MTS. El medio de cultivo se reemplaza con medio neurobasal reciente más suplementos B27 menos antioxidantes. Se añaden 1/10 en volumen de solución MTS (Cell Titre 96 Aqueous One, Promega Corporation) y se incuba a 37°C, 2 horas. Se miden partes alícuotas de 200 microlitros con un espectrofotómetro a 560 nm.

15 **Ensayo 4. Ensayo para Citotoxicidad de los Compuestos de Test**

Se cultivaron células corticales neuronales durante 5 días como para el Ensayo 2 en medio NB y suplemento B27.

20 El día 6, se añadieron los compuestos de test a los cultivos de células neuronales en medio NB y suplemento B27 menos antioxidantes.

Los compuestos se disolvieron en 100% DMSO a una concentración de 2,5 mM (1,0 mM si se pesó el exceso de compuesto por vial - y se diluyó luego a 2,5 mM). Se diluyó en serie solución stock 2,5 mM en ratio 1 a 10 para dar soluciones de trabajo de 250 µM, 25 µM, y 2,5 µM.

25 Los compuestos de test no se añadieron directamente a las células, sino que en su lugar se añadieron a una 'placa de fármaco' de 48 pocillos como se especifica a continuación:

Preparación de la "Placa de Fármaco":

30 Se añaden a una placa de 48 pocillos:

Pocillo 1: 576 µl NB+B27(sin antioxidante)* + 24 µl 2,5µM compuesto de test

35 Pocillo 2 : 576 µl NB+B27(sin antioxidante) + 24 µl 25µM compuesto de test

Pocillo 3 : 576 µl NB+B27(sin antioxidante) + 24 µl 250µM compuesto de test

40 Pocillo 4 : 576 µl NB+B27(sin antioxidante) + 24 µl 2,5µM compuesto de test

Pocillo 5 : 576 µl NB+B27(sin antioxidante) + 24 µl 25µM compuesto de test

Pocillo 6 : 576 µl NB+B27(sin antioxidante) + 24 µl 250µM compuesto de test

45 Pocillo 7 : 576 µl NB+B27(sin antioxidante) + 24 µl diluyente del compuesto de test **

Pocillo 8 : 600 µl NB+B27(sin antioxidante)

50 La Placa de Fármaco se incubó a 37°C durante 15 min. Se añadieron 200 µl de cada pocillo por triplicado a la placa de células correspondiente. La placa de células se incubó a 37°C durante 4 días.

* Medio NB y B27 (sin antioxidantes),

55 ** Diluyente PBT al 10% de DMSO en NB + B27 (sin antioxidantes)

Una vez completado el ensayo, se añadió 1/10 en volumen de MTS por pocillo de placa (es decir 25 µl/250 µl). Las placas se incubaron a 37°C durante 2 horas, después de lo cual se leyó la absorbancia a 560 nm.

60 **Ensayo 5. Ensayo de Solubilización del Amiloide Cerebral Humano**

Este ensayo se realizó a fin de evaluar la capacidad de un compuesto de test para movilizar Aβ, como forma de ejemplo de amiloide, de la fase insoluble a la fase soluble de un extracto de tejido de cerebro AD humano (*post mortem*).

65

Hasta 0,5 g de corteza portadora de placa sin meninges se homogeneizaron utilizando un homogeneizador DIAx 900 (Heudolph and Co., Kelheim, Alemania) u otro dispositivo adecuado durante 3 periodos de 30 segundos a plena velocidad en 2 ml de solución salina tamponada con fosfato y enfriada en hielo, pH 7,4. Para obtener la fracción extraíble con la solución salina tamponada con fosfato, el homogeneizado se centrifugó a 100.000 x g durante 30 min y se retiró el sobrenadante. Alternativamente, el tejido se liofilizó y se pulverizó luego para formar un polvo que se fraccionó luego en partes alícuotas pesadas para extracción como anteriormente. El sobrenadante, liofilizado y resuspendido o en forma no concentrada, se disolvió en 200 µl de tampón de muestra dodecilsulfato de sodio Tris-Tricina (SDS) de pH 8,3 que contenía SDS al 8% y 2-mercaptoetanol al 10%. Se hirvieron luego partes alícuotas (10 µl) durante 10 minutos antes de electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. La fracción insoluble de las muestras corticales se obtuvo por resuspensión de la muestra inicial dividida en pelets en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato. Se hirvió luego una parte alícuota de 50 µl de esta suspensión en 200 µl de tampón de muestra como anteriormente.

Se realizó la electroforesis en gel Tris-Tricina-poliacrilamida por carga de muestras adecuadamente diluidas en geles de gradiente 10 a 20% (Novex, San Diego, CA) seguido por transferencia a membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm (BioRad Hercules, CA). Se detectó Aβ utilizando el anticuerpo monoclonal W02, que detecta residuos 5 a 8, 17 (u otro anticuerpo adecuado) en conjunción con IgG anti-ratón de conejo conjugado a peroxidasa de rábano picante (Dako, Dinamarca), y se visualizó utilizando quimioluminiscencia mejorada (v.g. ECL; Amersham Life Science, Buckinghamshire, Reino Unido). Cada gel incluía 3 pistas que contenían 0,5, 1, y 2 ng de Aβ₄₀ sintético (Keck Laboratory, Yale University, New Haven, CT) como estándares de referencia.

Se escanearon films de transferencia utilizando un sistema de imágenes adecuado tal como el sistema de documentación de gel UVP, y se realizó la densitometría utilizando software adecuado, v.g. UVP Labworks. El rango dinámico del film/escáner se determinó utilizando una Tableta Step (No. 911 ST600, Kodak, Rochester, NY), un film calibrado expuesto por el fabricante a Steps proporcionados de intensidad creciente conocida. El rango cuantificable de intensidad de señal para análisis densitométrico de las bandas mono- y diméricas de Aβ estaba basado en la comparación con una curva obtenida por escaneo y densitometría de la paleta de pasos. Las muestras en las que la intensidad de señal es baja después del ensayo preliminar pueden re-ensayarse utilizando estándares sintéticos de concentración menor o mayor.

Todas las muestras se analizaron al menos dos veces, y las cargas de y diluciones del gel se ajustaron para adaptarlas a la región cuantificable de la curva estándar. La proporción de Aβ 'soluble' a 'insoluble' puede utilizarse para determinar la eficiencia de extracción de un compuesto de test comparada con la eficiencia de un compuesto conocido. El Aβ insoluble está constituido por la fracción reducible a pelets derivada de la placa de amiloide insoluble procedente de las muestras corticales anteriores, y comprendiendo la fracción soluble Aβ soluble monómero y/o oligómero.

Ensayo 6. Efecto de la Administración de los Compuestos de Test Sobre los Depósitos Aβ en Animales Transgénicos

Están disponibles modelos de ratón transgénico para numerosos trastornos neurológicos, que incluyen la enfermedad de Alzheimer; enfermedad de Parkinson; Esclerosos Lateral Amiotrófica Familiar (ALS); enfermedad de Huntington; y enfermedad de Creutzfeld-Jakob (CJD). Se encontró que uno de los modelos transgénicos para la enfermedad de Alzheimer, el ratón transgénico APP2576 tiene también una incidencia elevada de catarata. Estos modelos animales eran adecuados para testar los métodos de la invención.

Se utilizaron ratones transgénicos de la variedad APP2576. Se seleccionaron ratones hembra de 8 a 9 meses de edad y se dividieron en grupos para tratamiento.

Los ratones se sacrificaron a intervalos, y se examinaron sus cerebros para determinar si el tratamiento con los compuestos de test reducía la formación de amiloide cerebral, y la identificación del protocolo de administración más eficaz.

Otros ratones de cada grupo se testaron a lo largo de un periodo de hasta 8 meses para eficiencia cognitiva, utilizando un laberinto de agua de Morris de acuerdo con métodos estándar. Se midieron también cada día el estado general de salud y el bienestar de los animales por un operador mantenido a ciegas, utilizando una escala de 5 puntos enteros que valora subjetivamente una combinación de características, con inclusión de actividad motora, estado de alerta y signos de salud generales.

Ensayo 7. Ensayo de Solubilidad

Se prepararon soluciones stock de compuestos de fórmula I o II (1 mM) en dimetil-sulfóxido. Los compuestos que no se disolvían se clasificaron como no solubles (N). Las soluciones stock de DMSO se diluyeron en ratio 1 a 100 en PBS de pH 7,4. Los compuestos que producían una solución clara se clasificaron como solubles (Y), mientras que

aquellos compuestos que daban una suspensión translúcida después de disolución en DMSO se clasificaron como "desmenuzados" (C).

Ensayo 8. Propiedades Físicoquímicas

5

Cálculos del Área de la Superficie Polar (PSA)

Los valores de área de la superficie polar se calcularon utilizando el programa basado en la web disponible de "Molinspiration", un paquete para cálculo de propiedades moleculares.

10

Medidas de Solubilidad Turbidimétricas

Se midió la estimación de solubilidad a pH 2,0 y pH 6,5. Estos valores están dentro del rango de pH que puede anticiparse a lo largo del tracto gastrointestinal proximal en humanos.

15

Los compuestos se disolvieron en DMSO a concentraciones apropiadas y se impurificaron luego en HCl 0,01 M (aproximadamente pH = 2,0) o tampón de fosfato isotónico de pH 6,5, siendo la concentración final de DMSO 1%. Las muestras se analizaron luego por Nefelometría para determinar un rango de solubilidad (Bevan y Lloyd, Anal. Chem. 72: 1781-1787, 2000).

20

Valores cLog P

Se determinaron los valores teóricos de Log P utilizando el software ACD Log P. Los valores citados se han calculado a partir de una base de datos no entrenada y se refieren a la especie no ionizada.

25

ELogD

Se midieron los valores eficaces Log D utilizando un método cromatográfico que empleaba una columna SUPELCOSIL LC-ABZ, utilizando una fase móvil saturada con octanol a pH 7,4. Véase F. Lombardo et al, J. Med. Chem. 2000, 43, 2922-2928.

30

EJEMPLO 5

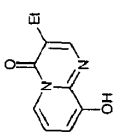
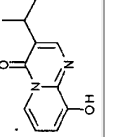
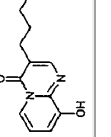
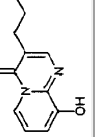
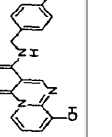
Propiedades de los Compuestos PBT

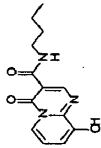
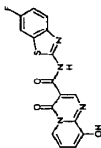
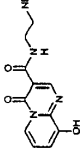
35

La Tabla 8 proporciona las propiedades y estructuras de los compuestos PBT que caen dentro del alcance de la presente invención.

Resultados en los compuestos AMD

40

	Perfil de Eficacia In Vitro					Propiedades Físico-químicas			Perfil de Eficacia y Seguridad In Vivo		
	H ₂ O ₂ CI ₅₀ (μ M) ^a	Citotox. (%viable a 1 y 10 μ M) ^b	CuTy ^c BAS ^d	Desagregación ^e	MW/ PSA Originario	ClogP ElogD (E) o ClogD (C)	Toxicidad ^f a 30 mg/kg	Concentración en plasma de ratón ^g	Ratones Tg ^h		
PB 1124	0,40	Células M. 17: 96,1, 27,1		>20, 8,4	190,2	0,84					
											
PB 1135	0,27	Células M. 17: 99,7, 45,6	CuTy: 90% inhibición	>20, 31	204,2	1,24	10 días, nula	Hasta 409 ng/ml			
											
PB 1144	0,32	Células M. 17: 73,6, 37		9,1, 15,5	218,25	1,90	10 días, nula				
											
PB 1149	0,30	Células M. 17: 79,1, 45,2 Células nerviosas 86,2, 12,4	CuTy: 95% inhibición	5, 49	204,23	1,37	10 días, nula	Hasta 690 ng/ml	Ningún cambio en insol. sol., - 45% de placa		
											
PB 1154	0,64	Células M. 17: 76,7, 54,2		>20, 31	313,28	1,31					
											

PB 1159		0,68	Células M 17: 115, 41,1	5,06, 49,9	261,28	0,78		
PB 1174		0,96	Células M 17: 60,1, 34,2	14,7, 22	356,34	1,45		
PB 1197		1,64	Células M 17: 115,2, 102,7	>20, 20,4	304,34	0,66		

- concentración en μM de compuesto de ensayo requerida para inhibir el 50% de la producción de H_2O_2 por $\text{A}_{\beta\text{eta}}$

b- viabilidad de las neuronas cultivadas corticales primarias (células Neuronales) o células de neuroblastoma humano M17 (células M17) en presencia del compuesto de test a concentraciones de 1 y 10 μM .

c- % de inhibición de la oligomerización de ditirosina con referencia al estándar interno (ajustado como 100% de inhibición)

d- proporción en la que el compuesto de test moviliza $\text{A}_{\beta\text{eta}}$ de la fase insoluble a la fase soluble de un extracto de tejido procedente de un cerebro AD humano post-mortem. Los resultados se expresan como referencia a PBS de la línea base y se evalúan como el efecto máximo alcanzado a través del rango de concentraciones seguido por la concentración o rango de concentraciones para el cual se observa un efecto

e- Desagregación de los Agregados Sintéticos $\text{A}_{\beta\text{eta}}:\text{Zn}$ (25:50 μM); primer valor = CE_{50} (μM), segundo valor = % de reducción de los Agregados a 5 μM

f- Observaciones visuales durante el experimento de toxicidad aguda en ratones o ratones Tg o estudios PK en ratas

g- Confirmación de la presencia del compuesto en plasma en uno o dos momentos puntuales (entre 30 min y 4 h) después de dosis oral simple o repetida de 30 mg/kg (a no ser que se especifique otra cosa)

h- % de diferencia del control en carga de amiloide cerebral insoluble/soluble y % de diferencia del control en abundancia de placa de Amiloide después de sonda esofágica oral diaria a 30 mg/kg (a no ser que se especifique otra cosa) durante 9 semanas en ratones transgénicos viejos de 13-14 meses. Únicamente se expresan como valores porcentuales los resultados estadísticamente significativos ($p < 0,05$), indicándose las tendencias sin números.

BIBLIOGRAFÍA

Arch. Ophthalmol. 117:1329-1345, 1999

Bevan and Lloyd, Anal. Chem. 72:1781-1787, 2000

Goodman and Gilman's, The Pharmacological Basis for Therapeutics 7th ed, 1985

Langer, Science, 249:1527, 1990

Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed, Williams and Wilkins, 2000

The British National Formulary 43rd ed, British Medical Association and Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, 2002

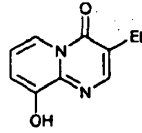
WO 02/055081

White et al., J Neuroscience 18:6207-6217, 1998

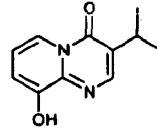
Wright et al, J Am Chem Soc 123:1173-1183, 2001

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado de los siguientes:

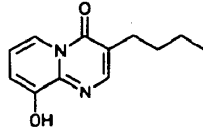


PB 1124

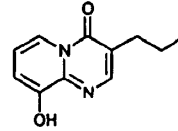


PB 1135

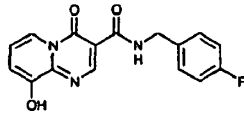
5



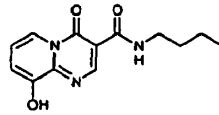
PB 1144



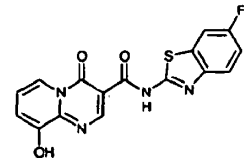
PB 1149



PB 1154

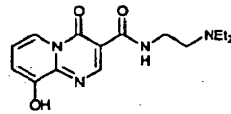


PB 1159



PB 1174

10

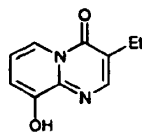


PB 1197

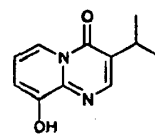
15

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad en un individuo.

2. Un compuesto seleccionado de los siguientes:

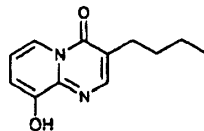


PB 1124

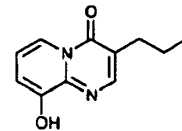


PB 1135

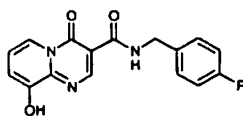
20



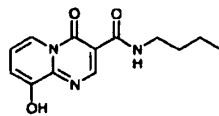
PB 1144



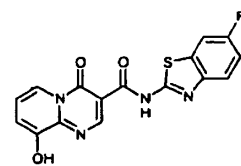
PB 1149



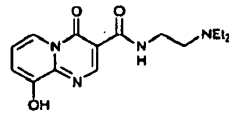
PB 1154



PB 1159



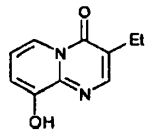
PB 1174



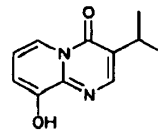
PB 1197

5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en la reducción de los niveles de un metal de las drusas retinianas de un individuo a fin de mejorar con ello los síntomas de la degeneración macular relacionada con la edad.

3. Uso de un compuesto seleccionado de los siguientes:

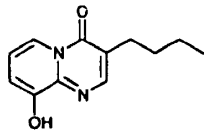


PB 1124

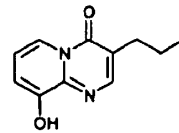


PB 1135

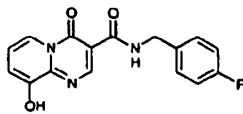
10



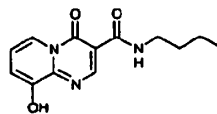
PB 1144



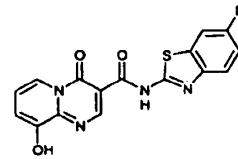
PB 1149



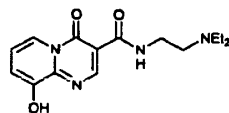
PB 1154



PB 1159



PB 1174



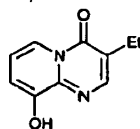
PB 1197

15

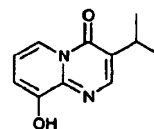
una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) en un individuo.

20 4. Uso de la reivindicación 3, en donde la cantidad del compuesto es una cantidad que reduce los niveles de un metal en las drusas retinianas.

5. Un compuesto seleccionado de los siguientes:

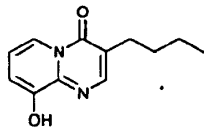


PB 1124

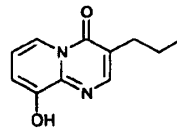


PB 1135

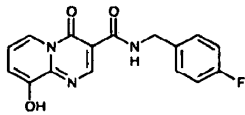
25



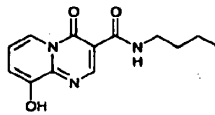
PB 1144



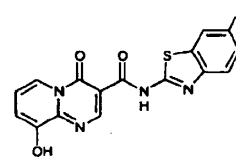
PB 1149



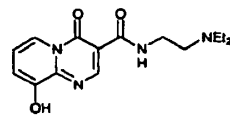
PB 1154



PB 1159



PB 1174



PB 1197

5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 6. El compuesto de la reivindicación 1, 2 ó 5, que es PB 1135 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. El compuesto de la reivindicación 1, 2 ó 5, que es PB 1149 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15