

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 519 140**

51 Int. Cl.:

**C07D 249/08** (2006.01)

**A61K 31/4196** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2009** **E 09818145 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014** **EP 2328417**

54 Título: **Compuestos, composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades -amiloides y sinucleinopatías**

30 Prioridad:

**03.10.2008 US 244968**

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

**06.11.2014**

73 Titular/es:

**PROTEOTECH INC. (100.0%)  
12040, 115th Avenue N.E.  
Kirkland, WA 98034-6931, US**

72 Inventor/es:

**ESPOSITO, LUKE A.;  
HUDSON, F. MICHAEL;  
LAKE, THOMAS;  
CUMMINGS, JOEL;  
WEIGELE, MANFRED;  
SNOW, ALAN D. y  
LARSEN, LESLEY**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 519 140 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

Compuestos, composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades -amiloides y sinucleinopatías

5 **Campo técnico**

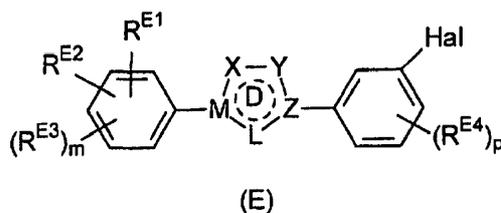
La presente invención se refiere a 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, a composiciones farmacéuticas que contienen 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol y al compuesto 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol para el tratamiento de la enfermedad A $\beta$  amiloide, tal como se observa en la enfermedad de Alzheimer y sinucleinopatías, tal como se observa en la enfermedad de Parkinson y al uso de este compuesto en la fabricación de medicamentos para dicho tratamiento.

**Antecedentes de la invención**

15 La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la acumulación de un péptido de 39-43 aminoácidos denominado la proteína  $\beta$ -amiloide o A $\beta$ , en una forma fibrilar, que aparece como agregados en placas de amiloides extracelulares y como amiloide dentro de las paredes de los vasos sanguíneos del cerebro. Se cree que el depósito de amiloide A $\beta$  fibrilar en la enfermedad de Alzheimer es perjudicial para el paciente y que en último término conduce a toxicidad y muerte de células neuronales, que son el sello característico de la enfermedad de Alzheimer. Cada vez más pruebas implican a los amiloides y más concretamente, a la formación, el depósito, la acumulación y/o la persistencia de agregados de A $\beta$ , como un factor causal principal de la patogenia de la enfermedad de Alzheimer. Adicionalmente, otras enfermedades amiloides, además de la enfermedad de Alzheimer, implican la formación, el depósito, la acumulación y la persistencia de fibrillas de A $\beta$ , incluyendo el síndrome de Down, los trastornos que implican la angiopatía congofílica, tales como pero no limitados a, la hemorragia cerebral hereditaria de tipo holandés y la angiopatía  $\beta$ -amiloide cerebral.

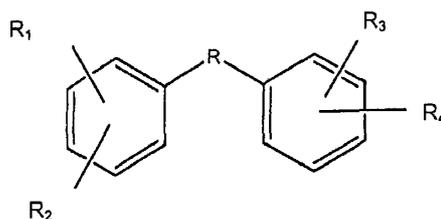
La enfermedad de Parkinson es otro trastorno humano caracterizado por la formación, el depósito, la acumulación y/o la persistencia de depósitos anómalos de proteínas fibrilares que demuestran muchas de las características de los amiloides. En la enfermedad de Parkinson se cree que una acumulación de cuerpos de Lewy citoplásmicos que consisten en agregados de filamentos de  $\alpha$ -sinucleína es importante en la patogenia y como dianas terapéuticas. Se considera que los nuevos agentes o compuestos capaces de inhibir la formación, el depósito, la acumulación, la agregación y/o la persistencia de la  $\alpha$ -sinucleína o que rompen las fibrillas o agregados de  $\alpha$ -sinucleína preformados (o sus porciones) son productos terapéuticos potenciales para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y sinucleinopatías relacionadas. Un fragmento de 35 aminoácidos de la  $\alpha$ -sinucleína que tiene la capacidad para formar fibrillas o agregados de tipo amiloide bien *in vitro* o bien según se observa en los cerebros de pacientes con enfermedad de Parkinson. El fragmento de la  $\alpha$ -sinucleína es una diana terapéutica relativamente importante, puesto que se cree que esta porción de la  $\alpha$ -sinucleína es crucial para la formación de cuerpos de Lewy según se observa en todos los pacientes con enfermedad de Parkinson, sinucleinopatías y trastornos relacionados. Además, la proteína  $\alpha$ -sinucleína que forma fibrillas o agregados y es positiva para el rojo Congo y la tioflavina S (tinciones específicas usadas para detectar agregados fibrilares de amiloides) se encuentra como parte de los cuerpos de Lewy en los cerebros de pacientes con enfermedad de Parkinson, enfermedad de cuerpos de Lewy (Lewy in Handbuch der Neurologie, M. Lewandowski, ed., Springer, Berlín pp. 920-933, 1912; Pollanen et al, J. Neuropath. Exp. Neurol. 52:183-191, 1993; Spillantini et al, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 95:6469-6473, 1998; Arai et al, Neurosci. Lett. 259:83-86, 1999), atrofia de sistemas múltiples (Wakabayashi et al, Acta Neuropath. 96:445-452, 1998), demencia con cuerpos de Lewy y la variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer. En la enfermedad de Parkinson se desarrollan agregados en los cerebros de los pacientes con esta enfermedad que son positivos al rojo Congo y a tioflavina S y que contienen una estructura secundaria plegada en lámina beta predominante.

50 El documento WO 2010/000372 divulga compuestos de fórmula (E):



55 y sus uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad limitada a la agregación de proteínas y/o enfermedad neurodegenerativa.

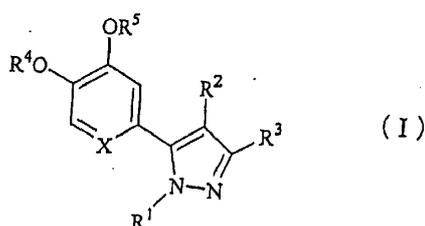
El documento WO 2009/111611 divulga compuestos de la fórmula



y sus uso en el tratamiento de la enfermedad amiloide con polipéptido amiloide de los islotes (IAPP), como se observa en la diabetes de tipo 2.

El documento WO 03/101927 divulga 3,5-bis(3,4-dihidroxi-fenil)-1-metil-2-pirazolina y su uso para el tratamiento de las enfermedades amiloides y sinucleinopatías, tales como la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson.

El documento WO2004/033432 divulga compuestos de la fórmula (i)



y sus uso como una prevención o un remedio para la micosis, en particular micosis asentadas profundamente causadas por hongos asentados profundamente tales como *candida* y *aspergillus* y micosis superficial causada por hongos tales como *trichophyton*.

Amiloide como diana terapéutica para la enfermedad de Alzheimer también supone una enorme carga económica para la sociedad. Un estudio reciente ha estimado que el coste de atender a un único paciente con enfermedad de Alzheimer con deterioros cognitivos graves en el hogar o en una residencia es mayor que 47.000 dólares anuales (*A Guide to Understanding Alzheimer's Disease and Related Disorders*). Para una enfermedad que puede durar de 2 a 20 años, los costes globales de la enfermedad de Alzheimer para las familias y para la sociedad son inmensos. La cuota económica anual de la enfermedad de Alzheimer en EE.UU. en términos de gastos en cuidados sanitarios y pérdidas de salarios tanto de los pacientes como de sus cuidadores se estima que es de 80 a 100 mil millones de dólares (*2003 Progress Report on Alzheimer's Disease*).

El clorhidrato de tacrina ("Cognex"), el primer fármaco aprobado por la FDA para la enfermedad de Alzheimer, es un inhibidor de la acetilcolinesterasa (Cutler y Sramek, *N. Engl. J. Med.* 328:808-810, 1993). No obstante, este fármaco ha demostrado un éxito limitado en la producción de mejora cognitiva en pacientes con enfermedad de Alzheimer e inicialmente tenía efectos secundarios principales tales como toxicidad hepática. El segundo fármaco aprobado por la FDA, donepezilo ("Aricept"), que también es un inhibidor de acetilcolinesterasa, es más eficaz que la tacrina, demostrando una ligera mejora cognitiva en los pacientes con enfermedad de Alzheimer (Barner y Gray, *Ann. Pharmacotherapy* 32:70-77, 1998; Rogers y Friedhoff, *Eur. Neuropsych.* 8:67-75, 1998), pero no se cree que sea una cura. Por tanto, queda claro que existe la necesidad de tratamientos más eficaces para los pacientes con enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por el depósito y la acumulación de un péptido de 39-43 aminoácidos denominado la proteína  $\beta$ -amiloide o  $\beta$ /A4 (Glenner y Wong, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 120:885-890, 1984; Masters et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 82:4245-4249, 1985; Husby et al., *Bull. WHO* 71:105-108, 1993). A $\beta$  se deriva por escisión con proteasas de proteínas precursoras más grandes denominadas proteínas precursoras de  $\beta$ -amiloide (APP) de las que existen varias variantes de empalme alternativas. Las formas más abundantes de APP incluyen proteínas que consisten en 695, 751 y 770 aminoácidos (Tanzi et al., *Nature*, 31:528-530, 1988).

El péptido A $\beta$  pequeño es un componente principal que forma los depósitos de amiloides de las "placas" en los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer. Además, la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la presencia de numerosas "madejas" neurofibrilares, que consisten en filamentos helicoidales apareados que se acumulan de una manera anormal en el citoplasma neuronal (Grundke-Iqbal et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 83:4913-4917, 1986; Kosik et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 83:4044-4048, 1986; Lee et al., *Science*, 251:675-678, 1991). Por tanto la característica patológica de la enfermedad de Alzheimer es la presencia de "placas" y "madejas", estando los  $\beta$ -amiloide depositados en el núcleo central de las placas. El otro tipo de lesión principal que se encuentra en los cerebros con enfermedad de Alzheimer es la acumulación de  $\beta$ -amiloide en las paredes de los vasos sanguíneos, tanto dentro del parénquima cerebral como en las paredes de los vasos meníngeos que se encuentran fuera del cerebro. Los depósitos de  $\beta$ -amiloide localizados en las paredes de los vasos sanguíneos se

denominan amiloides cerebrovasculares o angiopatía congófilica (Mandybur, J. *Neuropath. Exp. Neurol.*, 45:79-90, 1986; Pardridge *et al.*, *J. Neurochem.*, 49:1394-1401, 1987).

5 Durante muchos años se ha ido desarrollando un debate científico acerca de la importancia del "β-amiloide" en la enfermedad de Alzheimer y de si las características "placas" y "madejas" de esta enfermedad eran una causa o simplemente una consecuencia de la enfermedad. En los últimos años, los estudios indican ahora que el β-amiloide es en efecto un factor causal de la enfermedad de Alzheimer y no debe considerarse solo un inocente testigo. Se ha demostrado que la proteína Aβ del Alzheimer en cultivos celulares provoca la degeneración de las células nerviosas en cortos periodos de tiempo (Pike *et al.*, *Br. Res.*, 563:311-314, 1991; *J. Neurochem.*, 64:253-265, 1995). Los estudios sugieren que es la estructura fibrilar (que consiste en una estructura secundaria plegada en lámina β predominante), la que es responsable de los efectos neurotóxicos. También se ha descubierto que la Aβ es neurotóxica en cultivos de cortes de hipocampo (Harrigan *et al.*, *Neurobiol. Aging* 16:779-789, 1995) e induce la muerte de células nerviosas en ratones transgénicos (Games *et al.*, *Nature*, 373:523-527, 1995; Hsiao *et al.*, *Science*, 274:99-102, 1996). La inyección de la Aβ del Alzheimer en el cerebro de rata también produce deterioro en la memoria y disfunción neuronal (Flood *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 88:3363-3366, 1991; *Br. Res.*, 663:271-276, 1994).

20 Probablemente, la prueba más evidente de que el amiloide Aβ está directamente implicado en la patogenia de la enfermedad de Alzheimer procede de los estudios genéticos. Se descubrió que la producción de Aβ puede ser el resultado de mutaciones en el gen que codifica su precursor, la proteína precursora de β-amiloides (Van Broeckhoven *et al.*, *Science*, 248:1120-1122, 1990; Murrell *et al.*, *Science*, 254:97-99, 1991; Haass *et al.*, *Nature Med.*, 1:1291-1296, 1995). La identificación de mutaciones en el gen de la proteína precursora de beta-amiloide que provoca la enfermedad de Alzheimer familiar de aparición temprana es el argumento más fuerte de que el amiloide es fundamental en el proceso patogenético que subyace a esta enfermedad. Se han descubierto cuatro mutaciones publicadas que provocan la enfermedad que demuestran la importancia de Aβ para provocar la enfermedad de Alzheimer familiar (revisado en Hardy, *Nature Genet.* 1:233-234, 1992). Todos estos estudios sugieren que proporcionar un fármaco para reducir, eliminar o evitar la formación, el depósito, la acumulación y/o la persistencia de la Aβ fibrilar en los cerebros de pacientes humanos servirá como un tratamiento terapéutico eficaz.

### 30 Enfermedad de Parkinson y sinucleinopatías

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo que se caracteriza patológicamente por la presencia de cuerpos de Lewy intracitoplásmicos (Lewy en *Handbuch der Neurologie*, M. Lewandowski, ed., Springer, Berlín, pp. 920-933, 1912; Pollanen *et al.*, *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 52:183-191, 1993), cuyos componentes principales son filamentos que consisten en α-sinucleína (Spillantini *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 95:6469-6473, 1998; Arai *et al.*, *Neurosci. Lett.* 259:83-86, 1999), una proteína de 140 aminoácidos (Ueda *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90:11282-11286, 1993). Se han descrito dos mutaciones dominantes en una α-sinucleína que provocan la aparición temprana de la enfermedad de Parkinson familiar lo que sugiere que los cuerpos de Lewy contribuyen mecánicamente a la degeneración de las neuronas en la enfermedad de Parkinson y en trastornos relacionados (Polymeropoulos *et al.*, *Science*, 276:2045-2047, 1997; Kruger *et al.*, *Nature Genet.*, 18:106-108, 1998). Recientemente, estudios *in vitro* han demostrado que una α-sinucleína recombinante puede en efecto formar fibrillas o agregados de tipo cuerpos de Lewy (Conway *et al.*, *Nature Med.*, 4:1318-1320, 1998; Hashimoto *et al.*, *Brain Res.*, 799:301-306, 1998; Nahri *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274:9843-9846, 1999). De la manera más importante, ambas mutaciones de α-sinucleína ligadas a la enfermedad de Parkinson aceleran este proceso de agregación, lo que demuestra que estos estudios *in vitro* pueden tener relevancia para la patogenia de la enfermedad de Parkinson. La agregación de alfa-sinucleína y la formación de fibrillas cumplen los criterios de un proceso de polimerización dependiente de la nucleación (Wood *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274:19509-19512, 1999). A este respecto la formación o agregación de fibrillas de α-sinucleína se parece a la de las fibrillas de proteína β-amiloide (Aβ) de la enfermedad de Alzheimer. La proteína recombinante de alfa-sinucleína y el componente no-Aβ (conocido como NAC), que es un fragmento peptídico de 35 aminoácidos de la α-sinucleína, tienen ambos la capacidad para formar fibrillas o agregados cuando se incuban a 37°C y son positivos con tinciones para amiloides, tales como el rojo Congo (que demuestra una birrefringencia roja/verde cuando se observa con luz polarizada) y la tioflavina S (que demuestra fluorescencia positiva) (Hashimoto *et al.*, *Brain Res.*, 799:301-306, 1998; Ueda *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90:11282-11286, 1993).

55 Las sinucleínas son una familia de proteínas neuronales presinápticas pequeñas compuestas por α-, β- y γ-sinucleínas, de la que solo los agregados de α-sinucleína se han asociado con diversas enfermedades neurológicas (Ian *et al.*, *Clinical Neurosc. Res.*, 1:445-455, 2001; Trojanowski y Lee, *Neurotoxicology*, 23:457-460, 2002). El papel de las sinucleínas (y en particular, la alfa-sinucleína) en la etiología de una serie de enfermedades neurodegenerativas ha surgido de varias observaciones. Desde el punto de vista patológico, la sinucleína se identificó como un componente principal de los cuerpos de Lewy, las características inclusiones de la enfermedad de Parkinson y un fragmento de la misma se aisló a partir de placas de amiloides de una enfermedad neurológica diferente, la enfermedad de Alzheimer. Desde el punto de vista bioquímico, se demostró que la α-sinucleína recombinante formaba fibrillas o agregados que recapitulan las características ultraestructurales de la alfa-sinucleína aislada a partir de pacientes con demencia con cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson y atrofia de sistemas múltiples. Además, la identificación de mutaciones dentro del gen de la sinucleína, no obstante en casos raros de la

enfermedad de Parkinson familiar, demostró una conexión inequívoca entre la patología de la sinucleína y las enfermedades neurodegenerativas. La implicación habitual de la  $\alpha$ -sinucleína en un espectro de enfermedades, como la enfermedad de Parkinson, la demencia con cuerpos de Lewy, la atrofia de sistemas múltiples y la variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, ha conducido a la clasificación de estas enfermedades con el término general de "sinucleinopatías".

Las fibrillas o agregados de  $\alpha$ -sinucleína de la enfermedad de Parkinson, al igual que las fibrillas de A $\beta$  de la enfermedad de Alzheimer, consisten ambas en una estructura plegada predominantemente en lámina  $\beta$ . Los compuestos que se ha descubierto que inhiben la formación de fibrillas de amiloide A $\beta$  en la enfermedad de Alzheimer también se ha demostrado que son eficaces para la inhibición de la formación o agregación de fibrillas de  $\alpha$ -sinucleína, como se ilustra en los ejemplos de la presente invención. Por tanto estos compuestos también servirían como productos terapéuticos para la enfermedad de Parkinson y otras sinucleinopatías, además de ser eficaces como productos terapéuticos para la enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer se caracterizan por la acumulación inadecuada de agregados insolubles compuestos principalmente por proteínas mal plegadas que están enriquecidas en una estructura secundaria plegada en lámina  $\beta$  (revisado en Cohen et al., *Nature* 426:905-909, 2003; Chiti et al., *Annu. Rev. Biochem.*, 75:333-366, 2006). En la enfermedad de Parkinson, la  $\alpha$ -sinucleína es el constituyente principal de estos agregados, como parte de los cuerpos de Lewy y se observan mutaciones en la  $\alpha$ -sinucleína que incrementan su tendencia a plegarse erróneamente y a agregarse en la enfermedad de Parkinson familiar (Polymeropoulos et al., *Science* 276:1197-1199, 1997; Papadimitriou et al., *Neurology* 52:651-654, 1999).

La disfunción mitocondrial, específicamente como un resultado del deterioro en el complejo I de la cadena de transporte de electrones, también es una característica habitual de la enfermedad de Parkinson (Schapira et al., *J. Neurochem.*, 54:823-827, 1990; revisado en Greenamyre et al., *IUBMB Life*, 52:135-141, 2001). Evidencia directa de los déficit mitocondriales en la etiología de la enfermedad de Parkinson procedió primero de la observación de que el MPP<sup>+</sup> (1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinio), el metabolito activo de la toxina del parkinsonismo *N*-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) inhibe el complejo I (Nicklas et al., *Life Sci.*, 36:2503-2508, 1985). Después, se mostró que la rotenona, otro inhibidor del complejo I, es un modelo mejorado para la agregación de la  $\alpha$ -sinucleína porque reproduce los agregados intracitoplasmáticos positivos para la  $\alpha$ -sinucleína mencionados anteriormente, además de los cambios conductuales y la pérdida de neuronas dopaminérgicas observados en el modelo de MPTP. La toxicidad de este tipo de la rotenona se observa en sistemas de modelos múltiples, incluyendo ratas (Betarbet et al., *Nat. Neurosci.*, 3:1301-1306, 2000; Panov et al., *J. Biol. Chem.*, 280:42026-42035, 2005), cortes de cerebro de rata (Sherer et al., *J. Neurosci.*, 23:10756-10764, 2003; Testa et al., *Mol. Brain Res.*, 134:109-118, 2005), *C. elegans* (Ved et al., *J. Biol. Chem.*, 280:42655-42668, 2005) y células cultivadas (Sherer et al., *J. Neurosci.*, 22:7006-7015, 2002) y se ha demostrado que es una consecuencia del daño oxidativo incrementado resultante de la inhibición del complejo I.

Para entender mejor la relación entre el daño oxidativo y la patogénesis de la  $\alpha$ -sinucleína mutante, en la técnica se ha establecido una línea celular de neuroblastoma (usando las células BE-M17) que sobreexpresa la  $\alpha$ -sinucleína A53T. En estas células,  $\alpha$ -sinucleína A53T se agrega en respuesta a diversos agentes inductores de estrés oxidativos y potencia la disfunción mitocondrial y la muerte celular (Ostrerova-Golts et al., *J. Neurosci.*, 20:6048-6054, 2000). Estas células son susceptibles al tratamiento con rotenona como un inductor del estrés oxidativo y por tanto, son particularmente útiles para analizar agentes que podrían inhibir la agregación/fibrillogénesis de la  $\alpha$ -sinucleína.

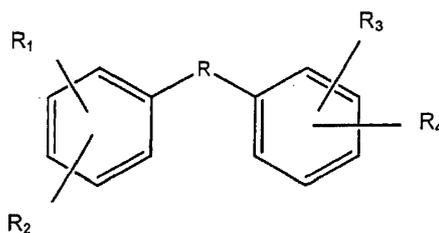
Se está buscando desesperadamente el descubrimiento y la identificación de nuevos compuestos o agentes como productos terapéuticos potenciales para detener la formación, el depósito, la acumulación y/o la persistencia de amiloides que se producen en la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.

### Sumario de la invención

Esta invención se refiere a 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En el presente documento se divulgan compuestos que pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades  $\beta$ -amiloides y sinucleinopatías.

Los compuestos son:

compuestos de la fórmula:



en la que:

- 5 cuando R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son grupos hidroxilo colocados de forma independiente en una de las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 2,3; 2,4; 2,5; 2,6; 3,5; 3,6; 4,5; 4,6 y 5,6 y R se selecciona de sulfonamida, heteroarilo, tricicloalquilo y -C(O)NR' en la que R' se selecciona de H o CH<sub>3</sub> o ésteres o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
- 10 También se proporcionan cualquier derivado farmacéuticamente aceptable, incluyendo sales, ésteres, éteres de enol o ésteres de enol, acetales, cetales, ortoésteres, hemiacetales, hemicetales, solvatos, hidratos o profármacos de 3,5-bis(3,4-dihidroxiifenil)-1,2,4-triazol. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otros, sales de aminas, tales como pero no limitadas a N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, amoniaco, dietanolamina y otras hidroxialquilaminas, etilendiamina, N-metilglucamina, procaína, N-bencilfenetilamina, 1-para-clorobencil-2-pirrolidin-1'-ilmetilbencimidazol, dietilamina y otras alquilaminas, piperazina, tris(hidroximetil)aminometano, sales de metales alcalinos, tales como pero no limitadas a sales de litio, potasio y sodio, sales de metales alcalinotérreos, tales como pero no limitadas a sales de bario, calcio y magnesio, sales de metales de transición, tales como pero no limitadas a sales de cinc y otras sales metálicas, tales como pero no limitadas a hidrógenofosfato de sodio y fosfato disódico e incluyendo también pero no limitadas a, sales de ácidos minerales, tales como pero no limitadas a clorhidratos y sulfatos, sales de ácidos orgánicos, tales como pero no limitadas a acetatos, lactatos, malatos, tartratos, citratos, ascorbatos, succinatos, butiratos, valeratos y fumaratos.

25 También se proporcionan formulaciones farmacéuticas para la administración por una vía adecuada y medios que contienen concentraciones eficaces de 3,5-bis(3,4-dihidroxiifenil)-1,2,4-triazol o derivados farmacéuticamente aceptables, tales como sales, ésteres, enoléteres para ésteres, acetales, cetales, ortoésteres, hemiacetales, hemicetales, solvatos, hidratos o profármacos, de 3,5-bis(3,4-dihidroxiifenil)-1,2,4-triazol que liberan cantidades eficaces para el tratamiento de enfermedades amiloides.

30 Las formulaciones son composiciones adecuadas para la administración mediante cualquier vía deseada e incluyen soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, comprimidos dispersables, píldoras, cápsulas, polvos, polvos secos para inhalación, formulaciones de liberación sostenida, aerosoles para la administración nasal y respiratoria, parches para la administración transdérmica y cualquier otra vía adecuada. Las composiciones deben ser adecuadas para la administración oral, la administración parenteral mediante inyección, incluyendo la vía subcutánea, intramuscular o intravenosa como una solución o emulsión acuosa u oleosa inyectable, la administración transdérmica y otras vías seleccionadas.

40 El uso de 3,5-bis(3,4-dihidroxiifenil)1,2,4-triazol y composiciones del mismo para romper, desagregar y causar la eliminación, la reducción o depuración de fibrillas o agregados de β-amiloide o α-sinucleína se proporciona proporcionando de este modo nuevos tratamientos para enfermedades de β-amiloide y sinucleinopatías.

La invención se refiere a 3,5-bis(3,4-dihidroxiifenil)-1,2,4-triazol para su uso en el tratamiento, prevención o mejora de uno o más síntomas de enfermedades amiloides o amiloidosis, incluyendo pero no limitadas a enfermedades asociadas con la formación, el depósito, la acumulación o la persistencia de las fibrillas de β-amiloide.

45 Las enfermedades amiloides incluyen pero no se limitan a enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis del tipo holandés y angiopatía β-amiloide cerebral.

50 La presente invención también se refiere a 3,5-bis(3,4-dihidroxiifenil)-1,2,4-triazol para su uso en el tratamiento, prevención o mejora de uno o más síntomas de enfermedades de sinucleína o sinucleinopatías. En una realización, el 3,5-bis(3,4-dihidroxiifenil)-1,2,4-triazol inhibe o evita la formación de fibrillas de α sinucleína, inhibe o evita el crecimiento de fibrillas de α sinucleína, y/o produce la desorganización, rotura y/o desagregación de los agregados de α sinucleína preformados y de los depósitos de proteínas asociados a α-sinucleína. Las enfermedades de sinucleína incluyen pero no se limitan a enfermedad de Parkinson, enfermedad de Parkinson familiar, enfermedad de cuerpos de Lewy, la variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer', demencia con cuerpos de Lewy, atrofia de sistemas múltiples y el complejo Parkinsonismo-demencia de Guam.

### Breve descripción de las figuras

La figura 1A muestra varios espectros de dicroísmo circular que ilustran que los compuestos analizados en una

proporción de 1:1 en peso/peso rompen las fibrillas de A $\beta$  de la enfermedad de Alzheimer. La figura 1B muestra gráficamente el % de inhibición.

5 La figura 2 muestra espectros de dicroísmo circular comparativo que ilustran que la  $\alpha$ -sinucleína forma una estructura rica en lámina  $\beta$  tras 4 días de agitación a 37°C.

La figura 3 muestra varios espectros de dicroísmo circular que ilustran que los compuestos analizados inhiben la agregación de la  $\alpha$ -sinucleína en una proporción de 1:1 en peso/peso. La figura 3B muestra gráficamente el % de inhibición.

10 La figura 4 muestra varios espectros de dicroísmo circular que ilustran que los compuestos inhiben la agregación de la  $\alpha$ -sinucleína en una proporción de 1:0,1 en peso/peso. La figura 4B muestra gráficamente el % de inhibición.

15 La figura 5 resume gráficamente los resultados, medidos mediante tio T, de los compuestos analizados para inhibir la formación o agregación de fibrillas de A $\beta$ .

La figura 6 resume gráficamente los resultados, medidos mediante rojo Congo, de los compuestos analizados para inhibir la formación o agregación de fibrillas de A $\beta$ .

20 La figura 7 resume gráficamente los resultados, medidos mediante tio T, de los compuestos analizados para inhibir la formación o agregación de fibrillas de  $\alpha$ -sinucleína.

La figura 8 resume gráficamente los resultados, medidos mediante rojo Congo, de los compuestos analizados para inhibir la formación o agregación de fibrillas de  $\alpha$ -sinucleína.

25 Las figuras 9 A-D son ejemplos de microfotografías fluorescentes que demuestran los efectos de la rotenona sobre una serie de agregados positivos a tioflavina S. La figura 9A es vehículo solo, la figura 9B es rotenona 1  $\mu$ M, la figura 9C es 5  $\mu$ M a un aumento bajo y la figura 9D es 5  $\mu$ M a un aumento alto. La figura 9E resume el análisis cuantitativo de la tioflavina S en respuesta al tratamiento con rotenona.

30 Las figuras 10 A-C son ejemplos de microfotografías fluorescentes que demuestran una reducción de los agregados positivos a tioflavina S (fluorescencia verde) tras la aplicación de un compuesto control positivo. La figura 10 A es sin tratamiento, la figura 10 B muestra 500 ng/ml del compuesto control positivo y la figura 10 C muestra 1  $\mu$ g/ml del compuesto control positivo. La figura 10D resume el análisis cuantitativo de la reducción dependiente de la dosis en la agregación.

35 La figura 10D resume el análisis cuantitativo de la reducción dependiente de la dosis en la agregación.

40 Las figuras 11 A-D son ejemplos de microfotografías fluorescentes que demuestran los efectos del compuesto 1 sobre la presencia de agregados positivos a tioflavina S inducidos por rotenona (verde) en las células de un modo dependiente de la dosis. La figura 11 A es sin tratamiento (solo rotenona) y las figuras 11 B-D muestran, respectivamente, 500 ng/ml, 1  $\mu$ g/ml y 2  $\mu$ g/ml del compuesto 1. La figura 11 D resume el análisis cuantitativo de los efectos el compuesto 1.

45 Las figuras 12 A-D son ejemplos de microfotografías fluorescentes que demuestran que el compuesto 2 reduce fuertemente la presencia de agregados positivos a tioflavina S inducidos por rotenona (verde) en las células. La figura 12 A es sin tratamiento (solo rotenona) y las figuras 12 B-D muestran, respectivamente, 500 ng/ml, 1  $\mu$ g/ml y 2  $\mu$ g/ml del compuesto 2. La figura 12 E resume el análisis cuantitativo de los efectos de antiagregación del compuesto 2.

50 Las figuras 13 A-D son ejemplos de microfotografías fluorescentes que demuestran que el compuesto 3 reduce la presencia de agregados positivos a tioflavina S inducidos por rotenona (verde) en las células de un modo dependiente de la dosis. La figura 13 A es sin tratamiento (solo rotenona) y las figuras 13 B-D muestran, respectivamente, 500 ng/ml, 1  $\mu$ g/ml y 2  $\mu$ g/ml del compuesto 3. La figura 13 E resume el análisis cuantitativo de los efectos de antiagregación del compuesto 3.

55 Las figuras 14 A-D son ejemplos de microfotografías fluorescentes que demuestran que el compuesto 4 reduce mínimamente la presencia de agregados positivos a tioflavina S inducidos por rotenona (verde) en las células de un modo dependiente de la dosis. La figura 14 A es sin tratamiento (solo rotenona) y las figuras 14 B-D muestran, respectivamente, 500 ng/ml, 1  $\mu$ g/ml y 2  $\mu$ g/ml del compuesto 4. La figura 14 E resume el análisis cuantitativo de los efectos del compuesto 4.

60 Las figuras 15 A-D son ejemplos de microfotografías fluorescentes que demuestran que el compuesto 5 reduce ligeramente la presencia de agregados positivos a tioflavina S inducidos por rotenona (verde) en las células de un modo dependiente de la dosis. La figura 15 A es sin tratamiento (solo rotenona) y las figuras 15 B-D muestran, respectivamente, 500 ng/ml, 1  $\mu$ g/ml y 2  $\mu$ g/ml del compuesto 5. La figura 15 E resume el análisis cuantitativo de los efectos de antiagregación del compuesto 5.

65 Los efectos de antiagregación del compuesto 5.

5 Las figuras 16 A-D son ejemplos de microfotografías fluorescentes que demuestran que el compuesto 6 afecta mínimamente la presencia de agregados positivos a tioflavina S inducidos por rotenona (verde) en las células de un modo dependiente de la dosis. La figura 16 A es sin tratamiento (solo rotenona) y las figuras 16 B-D muestran, respectivamente, 500 ng/ml, 1 µg/ml y 2 µg/ml del compuesto 6. La figura 14 E resume el análisis cuantitativo de los efectos del compuesto 6.

10 Las figuras 17 A-C son ejemplos de microfotografías fluorescentes que demuestran que el compuesto 7 reduce moderadamente la presencia de agregados positivos a tioflavina S inducidos por rotenona (verde) en las células de un modo dependiente de la dosis. La figura 17 A es sin tratamiento (solo rotenona) y las figuras 17 B-C muestran, respectivamente, 500 ng/ml y 2 µg/ml del compuesto 7. La figura 17 D resume el análisis cuantitativo de los efectos de antiagregación del compuesto 7.

15 Las figuras 18 A-D son ejemplos de microfotografías fluorescentes que demuestran que el compuesto 8 reduce moderadamente la presencia de agregados positivos a tioflavina S inducidos por rotenona (verde) en las células de un modo dependiente de la dosis. La figura 18 A es sin tratamiento (solo rotenona) y las figuras 18 B-D muestran, respectivamente, 500 ng/ml, 1 µg/ml y 2 µg/ml del compuesto 8. La figura 18 E resume el análisis cuantitativo de los efectos de antiagregación del compuesto 8.

20 Las figuras 19 A-D son ejemplos de microfotografías fluorescentes que demuestran que el compuesto 9 reduce la presencia de agregados positivos a tioflavina S inducidos por rotenona (verde) en las células de un modo dependiente de la dosis. La figura 19 A es sin tratamiento (solo rotenona) y las figuras 19 B-D muestran, respectivamente, 500 ng/ml, 1 µg/ml y 2 µg/ml del compuesto 9. La figura 19 E resume el análisis cuantitativo de los efectos antiagregación del compuesto 9, en el que \* $p < 0,05$  respecto a rotenona 1 µM solo.

25 La figura 20 es un gráfico que muestra una reducción del 35-45% de la viabilidad celular tras 2 días de tratamiento con rotenona medida mediante el ensayo de citotoxicidad XTT.

30 La figura 21 es un gráfico que muestra la capacidad del compuesto control positivo para inhibir la toxicidad inducida por rotenona medida mediante el ensayo de citotoxicidad XTT.

La figura 22 A es un gráfico que muestra que el compuesto 1 es no tóxico hasta 10 µg/ml. La figura 22 B es un gráfico que muestra la capacidad del compuesto 1 para proteger frente a la toxicidad inducida por rotenona medida mediante el ensayo de citotoxicidad XTT.

35 La figura 23 A es un gráfico que muestra que el compuesto 2 es no tóxico hasta 25 µg/ml. La figura 23 B es un gráfico que muestra la capacidad del compuesto 2 para proteger frente a la toxicidad inducida por rotenona medida mediante el ensayo de citotoxicidad XTT.

40 La figura 24 A es un gráfico que muestra que el compuesto 3 es no tóxico hasta 50 µg/ml. La figura 24 B es un gráfico que muestra la capacidad del compuesto 3 para proteger frente a la toxicidad inducida por rotenona medida mediante el ensayo de citotoxicidad XTT.

45 La figura 25 A es un gráfico que muestra que el compuesto 4 es no tóxico hasta 25 µg/ml. La figura 25 B es un gráfico que muestra la capacidad del compuesto 4 para proteger frente a la toxicidad inducida por rotenona medida mediante el ensayo de citotoxicidad XTT.

50 La figura 26 A es un gráfico que muestra que el compuesto 5 es no tóxico hasta 25 µg/ml. La figura 26 B es un gráfico que muestra la incapacidad del compuesto 5 para proteger frente a la toxicidad inducida por rotenona medida mediante el ensayo de citotoxicidad XTT.

La figura 27 A es un gráfico que muestra que el compuesto 6 es no tóxico hasta 50 µg/ml. La figura 27 B es un gráfico que muestra la capacidad del compuesto 6 para proteger frente a la toxicidad inducida por rotenona medida mediante el ensayo de citotoxicidad XTT.

55 La figura 28 A es un gráfico que muestra que el compuesto 7 es no tóxico hasta 50 µg/ml. La figura 28 B es un gráfico que muestra la capacidad del compuesto 7 para proteger frente a la toxicidad inducida por rotenona medida mediante el ensayo de citotoxicidad XTT.

60 La figura 29 A es un gráfico que muestra que el compuesto 8 es no tóxico hasta 25 µg/ml. La figura 29 B es un gráfico que muestra la capacidad del compuesto 8 para proteger frente a la toxicidad inducida por rotenona medida mediante el ensayo de citotoxicidad XTT.

65 La figura 30 A es un gráfico que muestra que el compuesto 9 es no tóxico hasta 25 µg/ml. La figura 30 B es un gráfico que muestra la incapacidad del compuesto 9 para proteger frente a la toxicidad inducida por rotenona medida mediante el ensayo de citotoxicidad XTT.

- La figura 31 es un gráfico que muestra tiempos de barra transversal y los efectos del tratamiento con el compuesto. El tratamiento con los compuestos 2 y 7 mejoran el funcionamiento motor en la prueba de barra transversal. A los tres meses de tratamiento, el compuesto 2 mejora el funcionamiento motor (medido mediante una reducción del tiempo para cruzar) en la prueba de barra transversal ( $p < 0,05$ ) en un 49%, respecto a los ratones tratados con vehículo a la misma edad. A los seis meses de tratamiento, el compuesto 7 mejora significativamente el funcionamiento motor en la prueba de barra transversal ( $p < 0,05$ ) en un 35%, respecto a los ratones tratados con vehículo a la misma edad. Además, el compuesto 7 muestra una tendencia general en la mejora del funcionamiento motor en un 30% a los tres meses de tratamiento respecto a los ratones tratados con vehículo a la misma edad.
- La figura 32 es un gráfico que muestra tiempos de giro en la prueba del poste y los efectos del tratamiento con el compuesto. El tratamiento con el compuesto 7 mejora el funcionamiento motor en la prueba del poste. A los 3 meses de tratamiento, el compuesto 7 tiende a mejorar el funcionamiento motor (medido mediante una reducción en el tiempo de giro) en la prueba del poste y a los 6 meses de tratamiento, el compuesto 7 mejora significativamente ( $p < 0,01$ ) en un 41% respecto al funcionamiento antes del tratamiento. Tras 6 meses de tratamiento con el compuesto 7, el funcionamiento es similar al de los ratones no transgénicos de 16 meses. Los ratones tratados con vehículo funcionaron de un modo similar al tratamiento y a los 3 y 6 meses de tratamiento.
- La figura 33 es un gráfico que muestra tiempos de la barra transversal y los efectos del tratamiento con el compuesto 7. A las seis semanas de tratamiento, el compuesto 7 mejora significativamente el funcionamiento motor en la prueba de la barra transversal (medido por una reducción del 36% en el tiempo para cruzar), respecto a los ratones tratados con vehículo a la misma edad ( $**p < 0,01$ ). Las barras representan la media + EEM,  $n=8$  por grupo.
- La figura 34 (Paneles A-F) son microfotografías que muestran que el tratamiento con el compuesto 7 produce una reducción de los niveles de  $\alpha$ -sinucleína en el cerebro de ratones transgénicos de 18 meses de edad según se demuestra mediante inmunohistoquímica. Los ratones tratados con el compuesto 7 (paneles C-D) exhiben significativamente menos  $\alpha$ -sinucleína humana intraneuronal en la corteza frontal en comparación con los ratones tratados con vehículo (paneles A-B). Los cerebros de ratones silvestres no transgénicos están desprovistos de tinción de  $\alpha$ -sinucleína humana y se muestran como un control de la especificidad del anticuerpo por la  $\alpha$ -sinucleína humana derivada de transgenes (E y F). El análisis de imágenes y la cuantificación revela que el tratamiento con el compuesto 7 produce una reducción significativa del 81% de objetos positivos a la  $\alpha$ -sinucleína. Los datos se expresan como un porcentaje del área ocupado por objetos positivos. Las barras representan la media + EEM,  $n=5$  para los ratones tratados con vehículo,  $n=11$  para los ratones tratados con el compuesto 7 y  $n=4$  para los ratones no transgénicos (No Tg).  $***p < 0,001$  respecto a los ratones tratados con vehículo mediante un ANOVA de una vía y análisis post hoc de Tukey-Kramer.
- La figura 35, panel A, es una fotografía de una transferencia de tipo Western que muestra los niveles de  $\alpha$ -sinucleína en la fracción particulada de la porción anterior de los cerebros de ratones transgénicos de  $\alpha$ -sinucleína tratados durante 6 meses con el compuesto 7 o el vehículo control. El Panel B muestra gráficos de barras que representan el promedio de las intensidades de bandas cuantificadas de dos transferencias de tipo Western independientes que indican una reducción global significativa del 69% y una reducción del 58% en hembras de los niveles de monómeros de  $\alpha$ -sinucleína tras el tratamiento con el compuesto 7. Las intensidades de las bandas del monómero de  $\alpha$ -sinucleína se normalizaron contra intensidades de bandas de la banda de 25 kDa (control de carga).  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  respecto a los tratados con vehículo. Las barras representan la media + EEM.
- La figura 36, panel A, es una fotografía de una transferencia de tipo Western que muestra los niveles de  $\alpha$ -sinucleína en la fracción citosólica de la porción anterior de los cerebros de ratones transgénicos de  $\alpha$ -sinucleína tratados durante 6 meses con el compuesto 7 o el vehículo control. El Panel B muestra gráficos de barras que representan las intensidades de bandas cuantificadas de la transferencia de tipo Western en el panel A que indica una reducción global significativa del 73% y una reducción del 48% en hembras de los niveles de monómeros de  $\alpha$ -sinucleína tras el tratamiento con el compuesto 7. Las intensidades de las bandas del monómero de  $\alpha$ -sinucleína se normalizaron contra intensidades de bandas de la banda de  $\beta$ -actina (control de carga).  $*p < 0,05$ , respecto a los tratados con vehículo. Las barras representan la media + EEM.
- La figura 37, panel A, es una fotografía de una transferencia de tipo Western que muestra los niveles de  $\alpha$ -sinucleína en la fracción particulada de la porción anterior de los cerebros de ratones transgénicos de  $\alpha$ -sinucleína de 4-5 meses de edad tratados durante 6 meses con el compuesto 7 o el vehículo control. El Panel B muestra un gráfico de barras que representa el promedio de las intensidades de banda cuantificadas de cuatro transferencias de tipo Western independientes que indica que el tratamiento con el compuesto 7 tiene como resultado una reducción significativa del 45% en los niveles del monómero de  $\alpha$ -sinucleína con respecto a los controles tratados con vehículo. Las intensidades de la banda del monómero de  $\alpha$ -sinucleína se normalizaron contra las intensidades de las bandas de la banda de 25 kDa (control de carga).  $*p < 0,05$ , respecto a los tratados con vehículo. Las barras representan la media + EEM.
- La figura 38, panel A, es una fotografía de una transferencia de tipo Western que muestra los niveles de  $\alpha$ -sinucleína en la fracción citosólica de la porción anterior de los cerebros de ratones transgénicos de  $\alpha$ -sinucleína de 4-5 meses de edad tratados durante 6 meses con el compuesto 7 o el vehículo control. El Panel B muestra un gráfico de barras

que representa el promedio de las intensidades de banda cuantificadas de cuatro transferencias de tipo Western independientes que indica que el tratamiento con el compuesto 7 tiene como resultado una reducción significativa del 71 % en los niveles del monómero de  $\alpha$ -sinucleína con respecto a los controles tratados con vehículo. Las intensidades de la banda del monómero de  $\alpha$ -sinucleína se normalizaron contra las intensidades de la banda de  $\alpha$ -tubulina (control de carga). \*\* $p < 0,01$ , respecto a los tratados con vehículo. Las barras representan la media + EEM.

## Descripción detallada de la invención

### Definiciones

En la presente solicitud, los siguientes términos tendrán los significados siguientes sin considerar si los términos se usan de forma variable en otros lugares de la bibliografía o de otro modo en la técnica conocida.

Como se usa en el presente documento, "enfermedades amiloides" o "amiloidosis" son enfermedades asociadas con la formación, el depósito, la acumulación o la persistencia de fibrillas de A $\beta$  amiloide. Dichas enfermedades amiloides incluyen pero no se limitan a enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés y angiopatía  $\beta$ -amiloide cerebral.

Como se usa en el presente documento, "enfermedades de sinucleína" o "sinucleinopatías" son enfermedades asociadas con la formación, el depósito, la acumulación, la persistencia o la agregación de  $\alpha$ -sinucleína. Dichas enfermedades incluyen pero no se limitan a enfermedad de Parkinson, enfermedad de Parkinson familiar, enfermedad de cuerpos de Lewy, la variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia de sistemas múltiples y el complejo Parkinsonismo-demencia de Guam.

La "fibrillogénesis" se refiere a la formación, el depósito, la acumulación, la agregación y/o la persistencia de fibrillas, filamentos, inclusiones, depósitos de  $\beta$ -amiloide, así como de fibrillas, filamentos, inclusiones, depósitos y agregados o similares de  $\alpha$ -sinucleína.

La "inhibición de la fibrillogénesis" se refiere a la inhibición de la formación, el depósito, la acumulación, la agregación y/o la persistencia de dichas fibrillas de  $\beta$ -amiloides o depósitos o agregados de tipo fibrillas de  $\alpha$ -sinucleína.

La "rotura de las fibrillas o la fibrillogénesis" se refiere a la rotura de agregados fibrillas de  $\beta$ -amiloides o de  $\alpha$ -sinucleína preformados que normalmente existen en una estructura secundaria plegada en lámina  $\beta$  predominante. Esta rotura por los compuestos divulgados en el presente documento puede implicar una reducción marcada o una desintegración de los agregados de amiloides o de sinucleína según se evalúa mediante diversos métodos, como la fluorometría de tioflavina S, la unión de rojo Congo, espectros de difracción circular, ensayos basados en tioflavinas S y en células tales como la agregación de  $\alpha$ -sinucleína y ensayos de citotoxicidad XTT y como se demuestra en los ejemplos presentados en la presente solicitud.

"Neuroprotección" o "neuroprotector" hace referencia a la capacidad de un compuesto para proteger, reducir, aliviar, mejorar y/ atenuar los daños en las células nerviosas (neurodegeneración).

Un "mamífero" incluye mamíferos humanos y no humanos, como animales de compañía (gatos, perros y similares), animales de laboratorio (como ratones, ratas, cobayas y similares) y animales de granja (ganado vacuno, caballos, ovejas, cabras, cerdos y similares).

Un "excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente que es convencionalmente útil para preparar una composición farmacéutica que en general es segura, no tóxica y deseable e incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario o para uso farmacéutico humano. Estos excipientes pueden ser sólidos, líquidos, semisólidos o, en el caso de una composición en aerosol, gaseosos.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad que, cuando se administra a un sujeto o a un animal para tratar una enfermedad, es suficiente para lograr el grado deseado de tratamiento, prevención o mejora de los síntomas para la enfermedad. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "dosificación terapéuticamente eficaz" en ciertas realizaciones inhibe, reduce, rompe o desintegra la formación, el depósito, la acumulación y/o la persistencia de agregados de  $\beta$ -amiloides o de  $\alpha$ -sinucleína, o trata, evita o mejora uno o más síntomas de una enfermedad asociada a estas afecciones, tal como una enfermedad amiloide o una sinucleinopatía, en una cantidad mensurable en una realización en al menos 20%, en otra realización en al menos 40%, en otra realización en al menos 60% y en otra realización en al menos 80%, en relación a un sujeto sin tratar. Las cantidades eficaces de 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol o la composición del mismo para el tratamiento de un sujeto mamífero son de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal del sujeto/día, tal como de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg/kg/día, en otra realización de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mg/kg/día. Se cree que una amplia gama de dosificaciones de la composición descrita son tanto seguras como eficaces.

La expresión "componente de liberación sostenida" se define en el presente documento como un compuesto o compuestos que incluyen, pero no se limitan a, polímeros, matrices poliméricas, geles, membranas permeables, liposomas, microesferas o similares, o una combinación de estos, que facilita la liberación sostenida del ingrediente activo.

5 Si el complejo es hidrosoluble puede formularse en un tampón apropiado, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato u otras soluciones fisiológicamente compatibles. Como alternativa, si el complejo resultante tiene baja solubilidad en disolventes acuosos, puede formularse con un tensioactivo no iónico, tal como Tween, o polietilenglicol. Por tanto el compuestos y sus disolventes fisiológicos pueden formularse para la administración  
10 mediante inhalación o insuflación (bien a través de la boca o bien de la nariz) o mediante administración oral, bucal, parenteral o rectal, como ejemplos.

Tal como se emplean en el presente documento, los derivados farmacéuticamente aceptables de un compuesto incluyen las sales, ésteres, éteres de enol, ésteres de enol, acetales, cetales, ortoésteres, hemiacetales,  
15 hemicetales, solvatos, hidratos o profármacos de los mismos. Tales derivados pueden prepararse por los expertos en la técnica con facilidad utilizando métodos para dicha derivatización. Los compuestos producidos pueden administrarse a animales o seres humanos sin efectos tóxicos sustanciales y bien son farmacéuticamente activos o bien son profármacos. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de aminas, tales como pero no limitadas a N,N'-dibenciletildiamina, cloroprocaína, colina, amoníaco, dietanolamina y otras  
20 hidroxialquilaminas, etilendiamina, N-metilglucamina, procaína, N-bencilfenetilamina, 1-para-clorobencil-2-pirrolidin-1'-ilmetilbencimidazol, dietilamina y otras alquilaminas, piperazina y tris(hidroximetil)aminometano, sales de metales alcalinos, tales como pero no limitadas a sales de litio, potasio y sodio, sales de metales alcalinotérreos, tales como pero no limitadas a sales de bario, calcio y magnesio, sales de metales de transición, tales como pero no limitadas a sales de cinc y otras sales metálicas, tales como pero no limitadas a hidrógenofosfato de sodio y fosfato disódico; e  
25 incluyendo también, pero no limitadas a, sales de ácidos minerales, tales como pero no limitadas a clorhidratos y sulfatos y sales de ácidos orgánicos, tales como pero no limitadas a acetatos, lactatos, malatos, tartratos, citratos, ascorbatos, succinatos, butiratos, valeratos y fumaratos. Ésteres farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, ésteres de alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, aralquilo, heteroaralquilo, cicloalquilo y heterociclilo de grupos ácidos, incluyendo, pero no limitados a, ácidos carboxílicos, ácidos fosfóricos, ácidos fosfínicos, ácidos sulfónicos, ácidos sulfínicos y ácidos bóricos. Éteres de enol farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, derivados de fórmula  $C=C(OR)$  en la que R es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo,  
30 aralquilo, heteroaralquilo, cicloalquilo o heterociclilo. Ésteres de enol farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, derivados de fórmula  $C=C(OC(O)R)$  en la que R es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, aralquilo, heteroaralquilo, cicloalquilo o heterociclilo. Solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables son complejos de un compuesto con una o más moléculas de disolvente o de agua, o de 1 a aproximadamente 100,  
35 o de 1 a aproximadamente 10, o de una a aproximadamente 2, 3 o 4, moléculas de disolvente o de agua.

Tal como se emplea en el presente documento, el tratamiento significa cualquier manera en la que uno o más de los síntomas de una enfermedad o trastorno son mejorados o alterados de otra manera beneficiosa. El tratamiento de  
40 una enfermedad también incluye evitar que la enfermedad aparezca en un sujeto que pueda estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no ha experimentado o mostrado síntomas de la enfermedad (tratamiento profiláctico), inhibir la enfermedad (frenar o detener su desarrollo), proporcionar alivio de los síntomas o los efectos secundarios de la enfermedad (incluyendo el tratamiento paliativo) y aliviar la enfermedad (provocar la regresión de la enfermedad), como mediante la rotura de los agregados de  $\beta$ -amiloides o de  $\alpha$ -sinucleína preformados. Tal como se  
45 emplea en el presente documento, la mejora de los síntomas de un trastorno concreto mediante la administración de un compuesto o una composición farmacéutica concretos se refiere a cualquier disminución, tanto permanente como temporal, que dure o que sea transitoria, que pueda atribuirse o estar asociada con la administración de la composición.

50 Tal como se emplea en el presente documento, se cree que la inhibición de la formación, la acumulación, la agregación y/o la persistencia de fibrillas de  $\alpha$ -sinucleína es un tratamiento eficaz de una serie de enfermedades que implican la  $\alpha$ -sinucleína, tal como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de cuerpos de Lewy y la atrofia de sistemas múltiples.

55 Tal como se emplea en el presente documento, un profármaco es un compuesto que, tras la administración *in vivo*, se metaboliza mediante una o más etapas o procesos o se convierte de otro modo a la forma biológica, farmacéutica o terapéuticamente activa del compuesto. Para producir un profármaco, el compuesto farmacéuticamente activo se modifica de un modo tal que el compuesto activo se regenerará mediante procesos metabólicos. El profármaco se puede diseñar para alterar la estabilidad metabólica o las características de transporte de un fármaco, para  
60 enmascarar los efectos secundarios o la toxicidad, para mejorar el sabor de un fármaco o para alterar otras características o propiedades de un fármaco. En virtud de los conocimientos sobre los procesos farmacodinámicos y el metabolismo de los fármacos *in vivo*, los expertos en la técnica, una vez que se conoce el compuesto farmacéuticamente activo, pueden diseñar profármacos del compuesto (véase, por ejemplo, Nogrady (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, Nueva York, páginas 388-392).

65 Se muestran las estructuras químicas para algunos de los compuestos divulgados en el presente documento. Los

5 nombres de los compuestos son de distintas formas nombres de la IUPAC (nombres derivados de acuerdo con el sistema aceptado de la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) establecido por la coalición de la Commission on Nomenclature of Organic Chemistry y la Commission on Physical Organic Chemistry, como se puede encontrar en <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac>), nombres derivados de nombres de la IUPAC mediante  
 10 adición o sustitución (por ejemplo mediante el uso de "3,4-metilendioxfenilo" derivado de "fenilo" en lugar de "benzo[1,3]dioxol-5-ilo") y nombres derivados de los nombres de los reactantes (por ejemplo, mediante el uso de "ácido 3,4-dihidroxibenzoico 3,4-dihidroxianilida" en lugar de "N-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidroxibenzamida"). No obstante, los nombres usados equivalen explícitamente a estructuras químicas y se cree que un experto en la técnica los entenderá fácilmente.

15 Un "agente farmacéutico" o "agente farmacológico" o "composición farmacéutica" hace referencia a un compuesto o combinación de compuestos usados para el tratamiento, preferentemente en una forma pura o casi pura. En la memoria descriptiva, agentes farmacéuticos o farmacológicos incluyen el compuesto 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol. El compuesto se purifica deseablemente hasta una homogeneidad del 80% y preferentemente hasta una homogeneidad del 90%. Se cree que los compuestos y composiciones purificados al 99,9% de homogeneidad son ventajosos. Como análisis o confirmación, un compuesto homogéneo adecuado sobre HPLC proporcionaría lo que los expertos en la técnica identificarían como una banda de un único pico agudo.

20 Debe entenderse que los compuestos divulgados en el presente documento pueden contener centros quirales. Dichos centros quirales pueden tener la configuración (R) o (S), o pueden ser una mezcla de ambas. Por tanto, los compuestos divulgados en el presente documento pueden ser enantioméricamente puros o ser mezclas estereoisómeras o diastereómeras. En el caso de residuos aminoacídicos, tales restos pueden tener la forma L o D. La configuración de los restos aminoacídicos naturales es en general L. Cuando no se especifica el residuo tiene la forma L. Tal como se emplea en el presente documento, el término "aminoácido" se refiere a  $\alpha$ -aminoácidos que son  
 25 racémicos, o con la configuración D o L. La denominación "d" antes de denominar un aminoácido (por ejemplo, dAla, dSer, dVal, etc.) se refiere al isómero D del aminoácido. La denominación "dl" antes de denominar un aminoácido (por ejemplo, dlPip) se refiere a una mezcla de los isómeros L y D del aminoácido. Debe entenderse que los centros quirales de los compuestos divulgados en el presente documento pueden sufrir epimerización *in vivo*. Como tales, los expertos en la técnica reconocerán que la administración de un compuesto en su forma (R) es equivalente, para  
 30 los compuestos que sufren epimerización *in vivo*, a la administración del compuesto en su forma (S).

Tal como se emplea en el presente documento, sustancialmente puro significa suficientemente homogéneo para aparecer libre de impurezas detectables con facilidad, según se determina mediante métodos convencionales de análisis, tales como cromatografía en capa fina (TLC), electroforesis en gel, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrometría de masas (MS), empleadas por los expertos en la técnica para evaluar esta pureza, o  
 35 suficientemente puro de forma que otra purificación no altere de manera detectable las propiedades físicas y químicas, tales como las actividades enzimáticas y biológicas, de la sustancia. Los métodos para la purificación de los compuestos divulgados para producir compuestos sustancialmente puros desde el punto de vista químico se conocen por los expertos en la técnica. Sin embargo, un compuesto sustancialmente puro desde el punto de vista químico puede ser una mezcla de estereoisómeros. En estos casos, otra purificación puede aumentar la actividad específica del compuesto.

40 Tal como se emplea en el presente documento, las cadenas carbonadas de alquilo, alqueno y alquino, si no se especifica, contienen de 1 a 20 carbonos, o de 1 o 2 a 16 carbonos y son lineales o ramificadas. Las cadenas carbonadas de alqueno de 2 a 20 carbonos, en ciertas realizaciones, contienen de 1 a 8 dobles enlaces y las cadenas carbonadas de alqueno de 2 a 16 carbonos, en ciertas realizaciones, contienen de 1 a 5 dobles enlaces. Las cadenas carbonadas de alquino de 2 a 20 carbonos, en ciertas realizaciones, contienen de 1 a 8 triples enlaces y las cadenas carbonadas de alquino de 2 a 16 carbonos, en ciertas realizaciones, contienen de 1 a 5 triples enlaces. Ejemplos de grupos alquilo, alqueno y alquino en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, a metilo, etilo, propilo, isopropilo, isobutilo, n-butilo, sec-butilo, terc-butilo, isopentilo, neopentilo, terc-pentilo, isohexilo, alilo (propenilo) y propargilo (propinilo). Tal como se emplea en el presente documento, alquilo inferior, alqueno inferior y alquino inferior se refieren a cadenas carbonadas que tienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 carbonos hasta aproximadamente 6 carbonos. Tal como se emplea en el presente documento, "alqu(en)(in)ilo" se refiere a un grupo alquilo que contiene al menos un doble enlace y al menos un triple enlace.

55 Tal como se emplea en el presente documento, "cicloalquilo" se refiere a un sistema de anillo mono o multicíclico saturado, en determinadas realizaciones, de 3 a 10 átomos de carbono, en otras realizaciones de 3 a 6 átomos de carbono; cicloalqueno y cicloalquino hacen referencia a sistemas de anillos mono o multicíclicos que incluyen, respectivamente, al menos un doble enlace y al menos un triple enlace. Grupos de cicloalqueno y cicloalquino pueden, en determinadas realizaciones, contener de 3 a 10 átomos de carbono, conteniendo los grupos cicloalqueno, en otras realizaciones, de 4 a 7 átomos de carbono y conteniendo los grupos cicloalquino, en otras realizaciones, de 8 a 10 átomos de carbono. Los sistemas de anillo de los grupos cicloalquilo, cicloalqueno y cicloalquino pueden estar compuestos por un anillo o dos o más anillos que pueden estar unidos de un modo condensado, unido por puentes o conectado por espiro. "Cicloalqu(en)(in)ilo" se refiere a un grupo cicloalquilo que  
 60 contiene al menos un doble enlace y al menos un triple enlace.  
 65

Tal como se emplea en el presente documento, "arilo" se refiere a grupos aromáticos monocíclicos o multicíclicos que contienen de 6 a 19 átomos de carbono. Los grupos arilo incluyen, entre otros, grupos tales como fluorenilo sustituido o no sustituido, fenilo sustituido o no sustituido y naftilo sustituido o no sustituido

- 5 Tal como se emplea en el presente documento, "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillo aromático monocíclico o multicíclico, en determinadas realizaciones, de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 miembros, en los que uno o más, en una realización, de 1 a 3, de los átomos en el sistema de anillo son un heteroátomo, es decir un elemento distinto al carbono, incluyendo, entre otros, nitrógeno, oxígeno o azufre. El grupo heteroarilo puede estar opcionalmente condensado a un anillo de benceno. Grupos heteroarilo incluyen, pero no se limitan a, furilo, imidazolilo, pirimidinilo, tetrazolilo, tienilo, piridilo, pirrolilo, tiazolilo, isotiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, triazolilo, quinolinilo e isoquinolinilo, imidazol, triazol y pirazol.

- 15 Tal como se emplea en el presente documento, "heterociclilo" se refiere a un sistema de anillo no aromático monocíclico o multicíclico, en una realización, de 3 a 10 miembros, en otra realización de 4 a 7 miembros, en una realización adicional de 5 a 6 miembros, en el que uno o más, en determinadas realizaciones, de 1 a 3, de los átomos en el sistema de anillo es un heteroátomo, es decir, un elemento distinto al carbono, incluyendo pero no limitado a, nitrógeno, oxígeno o azufre. En realizaciones en las que el(los) heteroátomo(s) es (son) nitrógeno, el nitrógeno está opcionalmente sustituido con alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, aralquilo, heteroaralquilo, cicloalquilo, heterociclilo, cicloalquilalquilo, heterocicilalquilo, acilo, guanidino, o el nitrógeno puede cuaternizarse para formar un grupo amónico en el que los sustituyentes se seleccionan como se ha indicado anteriormente.

Tal como se emplea en el presente documento, "aralquilo" hace referencia a un grupo alquilo en el que uno de los átomos de hidrógeno del alquilo está sustituido por un grupo arilo.

- 25 Tal como se emplea en el presente documento, "heteroaralquilo" hace referencia a un grupo alquilo en el que uno de los átomos de hidrógeno del alquilo está sustituido por un grupo heteroarilo.

Tal como se usa en el presente documento, "halo", "halógeno" o "haluro" se refiere a F, Cl, Br o I.

- 30 Tal como se usa en el presente documento, grupos pseudohaluros o pseudohalo son grupos que se comportan de un modo sustancialmente similar a los haluros. Dichos compuestos se pueden usar del mismo modo y tratar del mismo modo que los haluros. Seudohaluros incluyen, entre otros, cianuro, cianato, tiocianato, selenocianato, trifluorometoxi y azida.

- 35 Tal como se emplea en el presente documento, "haloalquilo" hace referencia a un grupo alquilo en el que uno o más de los átomos de hidrógeno están sustituidos por halógeno. Dichos grupos incluyen, pero no se limitan a, clorometilo, trifluorometilo y 1-cloro-2-fluoroetilo.

- 40 Tal como se emplea en el presente documento, "haloalcoxi" hace referencia a RO- en el que R es un grupo haloalquilo.

Tal como se emplea en el presente documento, "sulfínilo" o "tionilo" hace referencia a -S(O)-. Tal como se emplea en el presente documento, "sulfoinilo" o "sulfurilo" hace referencia a -S(O)<sub>2</sub>-. Tal como se emplea en el presente documento, "sulfo" hace referencia a -S(O)<sub>2</sub>O-.

- 45 Tal como se usa en el presente documento, "carboxi" hace referencia a un radical divalente -C(O)O-.

Tal como se emplea en el presente documento, "aminocarbonilo" hace referencia a -C(O)NH<sub>2</sub>.

- 50 Tal como se emplea en el presente documento, "alquilaminocarbonilo" hace referencia a --C(O)NHR en el que R es alquilo, incluido alquilo inferior.

- 55 Tal como se emplea en el presente documento, "dialquilaminocarbonilo" hace referencia a -C(O)NR'R en la que R' y R son cada uno de forma independiente alquilo, incluido alquilo inferior; "carboxamida" hace referencia a grupos de la fórmula -NR'COR en la que R' y R son cada uno de forma independiente alquilo, incluido alquilo inferior.

Tal como se emplea en el presente documento, "arilaquilaminocarbonilo" hace referencia a -C(O)NRR', en la que uno de R y R' es arilo, incluido arilo inferior, tal como fenilo y el otro de R y R' es alquilo, incluido alquilo inferior.

- 60 Tal como se emplea en el presente documento, "arilaminocarbonilo" hace referencia a -C(O)NHR en la que R es arilo, incluido arilo inferior, tal como fenilo.

Tal como se emplea en el presente documento, "hidroxicarbonilo" hace referencia a -COOH.

- 65 Tal como se emplea en el presente documento, "alcoxicarbonilo" hace referencia a -C(O)OR en la que R es alquilo, incluido alquilo inferior.

Tal como se emplea en el presente documento, "ariloxicarbonilo" hace referencia a  $-C(O)OR$  en la que R es arilo, incluido arilo inferior, tal como fenilo.

- 5 Tal como se emplea en el presente documento, "alcoxi" y "alquiltio" hacen referencia a RO- y RS-, en la que R es alquilo, incluido alquilo inferior.

Tal como se emplea en el presente documento, "ariloxi" y "ariltio" hacen referencia a RO- y RS-, en la que R es arilo, incluido arilo inferior, tal como fenilo.

- 10 Tal como se emplea en el presente documento, "alquilenno" hace referencia a un grupo hidrocarburo alifático divalente lineal, ramificado o cíclico, en determinadas realizaciones lineal o ramificado, teniendo en una realización de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, teniendo en otra realización de 1 a 12 carbonos. En una realización adicional alquilenno incluye alquilenno inferior. Pueden haber, opcionalmente insertados a lo largo del grupo alquilenno uno o más grupos de oxígeno, azufre, incluyendo  $S(=O)$  y  $S(=O)_2$ , o átomos de nitrógeno sustituidos o no sustituidos, incluyendo los grupos -NR- y -N<sup>+</sup>RR-, en los que el o los sustituyentes de nitrógeno es (son) alquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo, heteroaralquilo o COR', en el que R' es alquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo, heteroaralquilo, -OY o -NYY, en el que Y es hidrógeno, alquilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterociclilo. Los grupos alquilenno incluyen, pero no se limitan a, metileno ( $-CH_2-$ ), etileno ( $-(CH_2CH_2)-$ ), propileno ( $-(CH_2)_3-$ ), metilendioxi ( $-O-CH_2-O-$ ) y etilendioxi ( $-O-(CH_2)_2-O-$ ). La expresión "alquilenno inferior" se refiere a grupos alquilenno que tienen de 1 a 6 carbonos. En determinadas realizaciones, los grupos alquilenno son alquilenno inferior, incluyendo alquilenno de 1 a 3 átomos de carbono.
- 15
- 20

- 25 Tal como se emplea en el presente documento, "azaalquilenno" hace referencia a  $-(CRR)_n-NR-(CRR)_m-$ , en la que n y m son, cada uno de forma independiente, un número entero de 0 a 4. Tal como se emplea en el presente documento, "oxaalquilenno" hace referencia a  $-(CRR)_n-O-(CRR)_m-$ , en la que n y m son, cada uno de forma independiente, un número entero de 0 a 4. Tal como se emplea en el presente documento, "tiaalquilenno" hace referencia a  $-(CRR)_n-S-(CRR)_m-$ ,  $-(CRR)_n-S(=O)-(CRR)_m-$  y  $-(CRR)_n-S(O)_2-(CRR)_m-$ , en la que n y m son, cada uno de forma independiente, un número entero de 0 a 4.

- 30 Tal como se emplea en el presente documento, "alquilenno" hace referencia a un grupo hidrocarburo alifático divalente lineal, ramificado o cíclico, en una realización lineal o ramificado, que tiene en ciertas realizaciones de 2 a aproximadamente 20 átomos de carbono y al menos un doble enlace, en otras realizaciones de 1 a 12 carbonos. En otras realizaciones, los grupos alquilenno incluyen alquilenno inferior. Puede haber opcionalmente insertados a lo largo del grupo alquilenno uno o más átomos de oxígeno, azufre o nitrógeno sustituido o no sustituido, en los que el sustituyente de nitrógeno es alquilo. Los grupos alquilenno incluyen, entre otros,  $-CH=CH-CH=CH-$  y  $-CH=CH-CH_2-$ . La expresión "alquilenno inferior" se refiere a grupos alquilenno que tienen de 2 a 6 carbonos. En determinadas realizaciones, los grupos alquilenno son alquilenno inferior, incluyendo alquilenno de 3 a 4 átomos de carbono.
- 35

- 40 Tal como se emplea en el presente documento, "alquilenno" hace referencia a un grupo hidrocarburo alifático divalente lineal, ramificado o cíclico, en ciertas realizaciones lineal o ramificado, en una realización que tiene de 2 a aproximadamente 20 átomos de carbono y al menos un triple enlace, en otra realización de 1 a 12 carbonos. En una realización adicional, alquilenno incluye alquilenno inferior. Puede haber opcionalmente insertados a lo largo del grupo alquilenno uno o más átomos de oxígeno, azufre o nitrógeno sustituido o no sustituido, en los que el sustituyente de nitrógeno es alquilo. Los grupos alquilenno incluyen, entre otros,  $-C=C-C=C-$ ,  $-C\equiv C-$  y  $-C\equiv C-CH_2-$ . La expresión "alquilenno inferior" se refiere a grupos alquilenno que tienen de 2 a 6 carbonos. En determinadas realizaciones, los grupos alquilenno son alquilenno inferior, incluyendo alquilenno de 3 a 4 átomos de carbono.
- 45

- 50 Tal como se emplea en el presente documento, "alqu(en)(in)lenno" hace referencia a grupo hidrocarburo alifático divalente lineal, ramificado o cíclico, en ciertas realizaciones lineal o ramificado, en una realización que tiene de 2 a aproximadamente 20 átomos de carbono y al menos un triple enlace y al menos un doble enlace; en otra realización de 1 a 12 carbonos. En realizaciones adicionales, alqu(en)(in)lenno incluye alqu(en)(in)lenno inferior. Puede haber opcionalmente insertados a lo largo del grupo alquilenno uno o más átomos de oxígeno, azufre o nitrógeno sustituido o no sustituido, en los que el sustituyente de nitrógeno es alquilo. Grupos alqu(en)(in)lenno incluyen, entre otros,  $-C=C-(CH_2)_n-C\equiv C-$ , en el que n es 1 o 2. La expresión "alqu(en)(in)lenno inferior" hace referencia a grupos alqu(en)(in)lenno que tienen hasta 6 carbonos. En determinadas realizaciones, grupos alqu(en)(in)lenno tienen aproximadamente 4 átomos de carbono.
- 55

- 60 Tal como se emplea en el presente documento, "cicloalquilenno" se refiere a un sistema de anillo mono o multicíclico saturado divalente, en determinadas realizaciones, de 3 a 10 átomos de carbono, en otras realizaciones de 3 a 6 átomos de carbono; cicloalquilenno y cicloalquilenno hacen referencia a sistemas de anillos mono o multicíclicos divalentes que incluyen respectivamente al menos un doble enlace y al menos un triple enlace. Grupos de cicloalquilenno y cicloalquilenno pueden, en ciertas realizaciones, contener de 3 a 10 átomos de carbono, con grupos cicloalquilenno, en ciertas realizaciones conteniendo de 4 a 7 átomos de carbono y grupos cicloalquilenno en ciertas realizaciones conteniendo de 8 a 10 átomos de carbono. Los sistemas de anillo de los grupos cicloalquilenno, cicloalquilenno y cicloalquilenno pueden estar compuestos por un anillo o dos o más anillos que
- 65

pueden estar unidos de un modo fundido, unido por puentes o conectado por espiro. "Cicloalqu(en)(in)ileno" se refiere a un grupo cicloalquilo que contiene al menos un doble enlace y al menos un triple enlace.

5 Tal como se emplea en el presente documento, "arileno" hace referencia a un grupo aromático divalente, monocíclico o policíclico, en determinadas realizaciones monocíclico, en una realización que tiene de 5 a aproximadamente 20 átomos de carbono y al menos un anillo aromático, en otra realización de 5 a 12 carbonos. En realizaciones adicionales, arileno incluye arileno inferior. Grupos arileno incluyen, entre otros, 1,2-, 1,3- y 1,4-fenileno. La expresión "arileno inferior" se refiere a grupos arileno que tienen 6 carbonos.

10 Tal como se emplea en el presente documento, "heteroarileno" se refiere a un sistema de anillo aromático monocíclico o multicíclico divalente, en una realización de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 miembros en el/los anillos, en los que uno o más, en determinadas realizaciones de 1 a 3, de los átomos en el sistema de anillo es un heteroátomo, es decir un elemento distinto al carbono, incluyendo, pero no limitado a, nitrógeno, oxígeno o azufre. La expresión "heteroarileno inferior" hace referencia a grupos heteroarileno que tienen 5 o 6 átomos en el anillo.

15 Tal como se emplea en el presente documento, "heterociclileno" hace referencia a un sistema de anillo no aromático monocíclico o multicíclico divalente, en determinadas realizaciones de 3 a 10 miembros, en una realización de 4 a 7 miembros, en otra realización de 5 a 6 miembros, en el que uno o más, incluyendo de 1 a 3, de los átomos en el sistema de anillo es un heteroátomo, es decir un elemento distinto al carbono, incluyendo, entre otros, nitrógeno, oxígeno o azufre.

20 Tal como se emplea en el presente documento, "alquilo sustituido" "alquenilo sustituido," "alquinilo sustituido," "cicloalquilo sustituido," "cicloalquenilo sustituido," "cicloalquinilo sustituido," "arilo sustituido," "heteroarilo sustituido," "heterociclilo sustituido," "alquileo sustituido," "alquenileno sustituido," "alquinileno sustituido," "cicloalquileno sustituido," "cicloalquenileno sustituido," "cicloalquinileno sustituido," "arileno sustituido," "heteroarileno sustituido" y "heterociclileno sustituido" hacen referencia a grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, cicloalquinilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, alquileo, alquenileno, alquinileno, cicloalquileno, cicloalquenileno, cicloalquinileno, arileno, heteroarileno y heterociclileno, respectivamente, que están sustituidos con uno o más sustituyentes, en ciertas realizaciones uno, dos, tres o cuatro sustituyentes, en los que los sustituyentes son según se definen en el presente documento, en una realización seleccionada de Q<sup>1</sup>.

25 Tal como se emplea en el presente documento, "alquilideno" hace referencia a un grupo divalente, tal como -CR'R", que está unido a un átomo de otro grupo, formando un doble enlace. Los grupos alquilideno incluyen entre otros, metilideno (=CH<sub>2</sub>) y etilideno (=CHCH<sub>3</sub>). Tal como se emplea en el presente documento, "arilalquilideno" hace referencia a un grupo alquilideno en el que bien R' o bien R" es un grupo arilo. Grupos "cicloalquilideno" son aquellos en los que R' y R" están unidos para formar un anillo carbocíclico. Grupos "heterociclilideno" son aquellos en los que al menos uno de R' y R" contienen un heteroátomo en la cadena y R' y R" están unidos para formar un anillo heterocíclico.

30 Tal como se usa en el presente documento, "amido" se refiere a un grupo divalente -C(O)NH-. "Tioamido" se refiere al grupo divalente -C(S)NH-. "Oxiamido" se refiere al grupo divalente -OC(O)NH-. "Tiamido" se refiere al grupo divalente -SC(O)NH-. "Ditiamido" se refiere al grupo divalente -SC(S)NH-. "Ureido" se refiere al grupo divalente -HNC(O)NH-. "Tioureido" se refiere al grupo divalente -NC(S)NH-.

35 Tal como se emplea en el presente documento, "semicarbazida" hace referencia a -NHC(O)NHNH-. "Carbazato" se refiere al grupo divalente -OC(O)NHNH-. "Isotiocarbazato" se refiere al grupo divalente -SC(O)NHNH-. "Tiocarbazato" se refiere al grupo divalente -OC(S)NHNH-. "Sulfonilhidrazida" se refiere al grupo divalente -SO<sub>2</sub>NHNH-. "Hidrazida" se refiere al grupo divalente -C(O)NHNH-. "Azo" se refiere al grupo divalente -N=N-. "Hidrazinilo" se refiere al grupo divalente -NH-NH-.

40 Tal como se emplea en el presente documento, "sulfonamida" se refiere a un grupo sulfona -RSO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>- conectado a un grupo amina.

45 Tal como se emplea en el presente documento, "imidazol" se refiere a un compuesto orgánico aromático heterocíclico que tiene una fórmula general de C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>.

50 Tal como se emplea en el presente documento, "triazol" se refiere a un par de compuestos químicos isoméricos con la fórmula molecular de C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N<sub>3</sub>.

55 Tal como se emplea en el presente documento, "pirazol" se refiere a un anillo heterocíclico de 5 miembros compuesto de tres carbonos y dos átomos de nitrógeno en posiciones adyacentes.

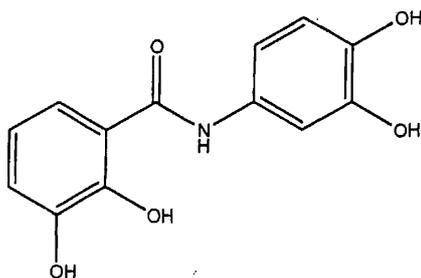
60 Tal como se emplea en el presente documento, "adamantano" se refiere a un tricicloalquilo que tiene una fórmula general de C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>.

Cuando el número de cualquier sustituyente dado no se especifica (por ejemplo, haloalquilo), puede haber uno o más sustituyentes presentes. Por ejemplo, "haloalquilo" puede incluir uno o más de los mismos o diferentes halógenos. Como otro ejemplo, "alcoxifenilo C<sub>1-3</sub>" puede incluir uno o más de los mismos o diferentes grupos alcoxi que contienen uno, dos o tres carbonos.

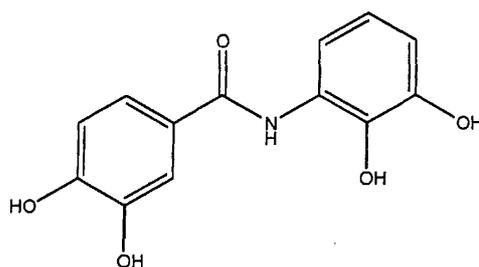
5 Tal como se emplea en el presente documento, las abreviaturas para cualesquiera grupos protectores, aminoácidos y otros compuestos son, a menos que se indique lo contrario, de acuerdo con su uso habitual, abreviaturas reconocidas, o se utiliza la Commission on Biochemical or Biochemical Nomenclature de la IUPAC-IUB (véase (1972) Biochem. 11:942-944).

10 Compuestos

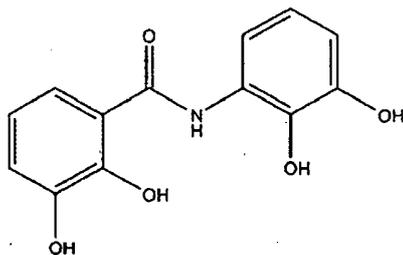
En el presente documento se divulgan una serie de compuestos:



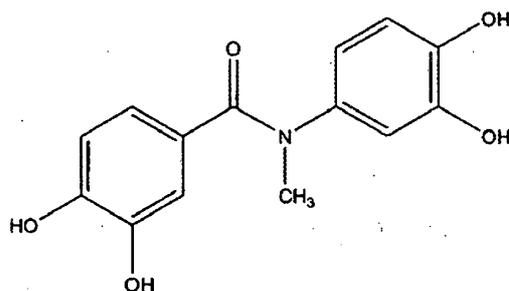
3,4-dihydroxianilida de ácido 2,3-dihidroxi benzoico (Compuesto 1),



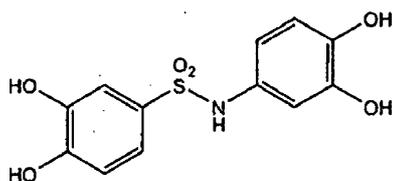
3,4-dihydroxianilida de ácido 2,3-dihidroxi benzoico (Compuesto 2),



2,3-dihydroxianilida de ácido 2,3-dihidroxi benzoico (Compuesto 3),

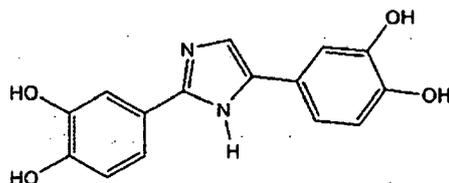


3,4-dihidroxi N-metil anilida de ácido 3,4 dihidroxi benzoico (Compuesto 4).



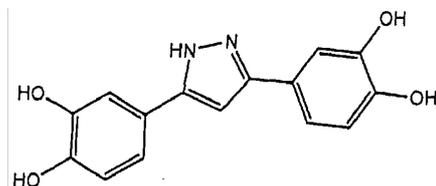
3,4 dihidroxifenilsulfonamida de ácido 3,4-dihidroxi-bencenosulfónico (Compuesto 5),

5

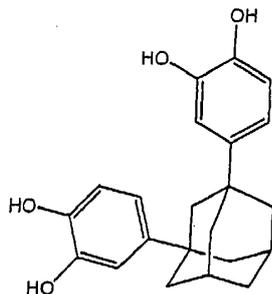


2,4 bis (3,4 dihidroxifenil) imidazol (Compuesto 6),

10

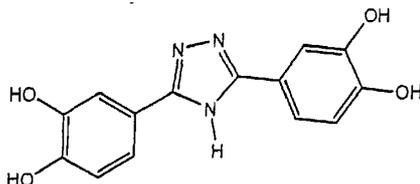


3,5 bis (3,4 dihidroxifenil) pirazol (Compuesto 8),



15 1,3 bis (3,4 dihidroxifenil) adamantano (Compuesto 9).

El compuesto de la invención es:



20

3,5 bis (3,4 dihidroxifenil)1,2,4-triazol (Compuesto 7).

#### Síntesis de los compuestos

25 Los compuestos divulgados en el presente documento pueden prepararse mediante métodos generalmente conocidos por el experto en la técnica considerando los conocimientos y la divulgación de la presente solicitud incluidos los Ejemplos 1-5.

30 Los materiales de partida y los reactivos utilizados para preparar estos compuestos están disponibles de suministradores comerciales, como Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Bachem (Torrance, CA), Sigma (San Luís, MO), o Lancaster Synthesis Inc. (Windham, NH), o se preparan mediante métodos bien conocidos para un experto en la técnica, siguiendo procedimientos descritos en dichas referencias, como Fieser y Fieser's Reagents for Organic Synthesis, vols. 1-17, John Wiley and Sons, Nueva York, NY, 1991; Rodd's Chemistry of Carbon Compounds, vols. 1-5 y supl., Elsevier Science Publishers, 1989; Organic Reactions, vols. 1-40, John Wiley and

Sons, Nueva York, NY, 1991; March J. *Advanced Organic Chemistry*, 4ª ed., John Wiley and Sons, Nueva York, NY; y Larock: *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers, Nueva York, 1989.

5 En la mayoría de los casos, se introducen grupos protectores para los grupos hidroxilo y finalmente se retiran. Los grupos protectores adecuados se describen en Greene *et al.*, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2ª edición, John Wiley and Sons, Nueva York, 1991. Otros materiales de partida o intermedios tempranos pueden prepararse mediante la elaboración de los materiales indicados anteriormente, por ejemplo mediante métodos muy conocidos por los expertos en la técnica.

10 Los materiales de partida, los intermedios y los compuestos divulgados en el presente documento pueden aislarse y purificarse utilizando técnicas convencionales, incluyendo la precipitación, la filtración, la destilación, la cristalización, la cromatografía y similares. Los compuestos pueden caracterizarse utilizando métodos convencionales, incluyendo las constantes físicas y los métodos espectroscópicos.

### 15 Farmacología y utilidad

El 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol se puede usar como tal, administrar en forma de sales farmacéuticamente aceptables derivadas de ácidos inorgánicos u orgánicos o usarse en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" significa las sales que son, dentro del alcance del firme juicio médico, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares y que son proporcionales a una razonable proporción de beneficios/riesgos. Sales farmacéuticamente aceptables son muy conocidas en la técnica. Las sales se pueden preparar bien *in situ* durante el aislamiento final y la purificación de 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol o bien por separado, haciendo reaccionar la sustancia farmacológica ácida o básica con una base o ácido adecuado respectivamente. Sales típicas derivadas de sales de ácidos orgánicos o inorgánicos incluyen, pero no se limitan a, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bisulfato, gluconato, fumarato, yodhidrato, lactato, maleato, oxalato, palmitoato, pectinato, succinato, tartrato, fosfato, glutamato y bicarbonato. Sales típicas derivadas de bases orgánicas e inorgánicas incluyen, pero no se limitan a litio, sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, monoalquilamonio tales como meglumina, dialquilamonio, trialquilamonio y tetraalquilamonio.

30 Niveles de dosificaciones reales de los principios activos y el modo de administración de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento se pueden variar con el fin de lograr la respuesta terapéutica eficaz para un paciente concreto. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" del compuesto proporcionado en el presente documento significa una cantidad suficiente del compuesto para tratar trastornos, en una proporción beneficios/riesgos razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. No obstante, se entenderá que el uso diario total del compuesto 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol y las composiciones proporcionadas se decidirán por el médico responsable dentro del alcance de un juicio médico sólido. La dosis diaria total del compuesto 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol puede variar de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1.000 mg/kg/día. Para los fines de la administración oral, las dosis pueden estar en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 mg/kg/día. Si se desea, la dosis diaria eficaz se puede dividir en múltiples dosis para los fines de administración; en consecuencia, las composiciones de una sola dosis pueden contener dichas cantidades o submúltiplos de las mismas para formar la dosis diaria. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz para cualquier paciente concreto dependerá de una diversidad de factores incluyendo el trastorno que se esté tratando y la gravedad del trastorno, el historial médico del paciente, la actividad del compuesto 3,5-bis(3,4- dihidroxifenil)-1,2,4-triazol; la composición específica usada, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta del paciente, el momento de la administración, la vía de la administración, la duración del tratamiento, la tasa de excreción del compuesto 3,5-bis(3,4- dihidroxifenil)-1,2,4-triazol, los fármacos usados en combinación con o a la vez que el compuesto 3,5-bis(3,4- dihidroxifenil)-1,2,4-triazol usado; y similares.

50 El compuesto 3,5-bis(3,4- dihidroxifenil)-1,2,4-triazol se puede formular junto con uno o más diluyentes, vehículos, adyuvantes y agentes antibacterianos y antifúngicos no tóxicos farmacéuticamente aceptables tales como parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. En algunos casos, con el fin de prolongar el efecto de un fármaco, es deseable disminuir la velocidad de absorción del fármaco de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede conseguir suspendiendo la sustancia farmacológica cristalina o amorfa en un vehículo que tenga una mala solubilidad en agua tal como aceites. Por tanto la velocidad de absorción del fármaco depende de su tasa de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y de la forma cristalina. La absorción prolongada de una forma farmacéutica inyectable se puede efectuar mediante el uso de agentes retardantes de la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

65 El compuesto 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol se puede administrar por vía enteral o parenteral en formas sólidas o líquidas. Las composiciones adecuadas para inyección parenteral pueden comprender soluciones acuosas o no acuosas isotónicas estériles fisiológicamente aceptables, dispersiones, suspensiones o emulsiones y polvos estériles para reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles. Ejemplos de portadores, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (propilenglicol,

5 polietilenglicol, glicerol y similares), mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tales como aceite de oliva), ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo y mezclas adecuadas de los mismos. Estas composiciones pueden también contener adyuvantes, tales como agentes conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión tales como alcoholes de isoestearilo etoxilado, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y goma de tragacanto, o mezclas de estas sustancias..

10 El compuesto 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol también se puede administrar por inyección o infusión, bien subcutáneamente o bien intravenosamente, o bien muscularmente, o intraesternalmente, o intranasalmente, o mediante técnicas de infusión en forma de suspensión inyectable estéril u oleaginoso. El compuesto puede estar en forma de suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles. Estas suspensiones se pueden formular de acuerdo con la técnica conocida usando los agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión que se han descrito anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico por ejemplo, en forma de una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están agua, solución de Ringer y solución de cloruro sódico isotónica. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos, estériles, en forma de un disolvente o un medio de suspensión. Para este fin se puede emplear convencionalmente cualquier aceite fijo suave incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además ácidos grasos tales como ácido oleico encuentran uso en la preparación de sustancias inyectables. Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se puede administrar varias dosificaciones divididas a diario o la dosificación puede reducirse proporcionalmente tal como indican las exigencias de la situación terapéutica.

25 Las formas de depósito inyectables se fabrican formando matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables, tales como poliláctido-poliglicólido. Dependiendo de la proporción entre el fármaco y el polímero y la naturaleza del polímero concreto empleado, se puede controlar la velocidad de liberación del fármaco. Ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones de depósito inyectables también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con tejidos corporales. Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar mediante, por ejemplo, filtración a través de un filtro de retención de bacterias o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver o dispersar en agua estéril u otro medio inyectable estéril justo antes de usar.

35 Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas de dosificación sólidas, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente o vehículo inerte farmacéuticamente aceptable tal como citrato sódico o fosfato dicálcico y/o a) cargas o expansores tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico; b) aglutinantes tales como carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga; c) humectantes tales como glicerol; d) agentes disgregantes tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o de tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato sódico; e) agentes retardantes de la disolución tales como parafina; f) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario; g) agentes humectantes tales como alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; h) absorbentes tales como caolín y arcilla bentonita e i) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato sódico; y mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos o píldoras, la forma de dosificación puede también comprender agentes tampón. Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden usar como cargas en cápsulas de gelatina rellenas duras y blandas, usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

50 Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y coberturas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. Opcionalmente pueden contener agentes opacificadores y también pueden ser de una composición tal que liberen el o los ingredientes activos únicamente o, preferentemente, en una determinada parte del tracto intestinal, opcionalmente, de un modo retardado. Ejemplos de incluir composiciones que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras. Los comprimidos comprenden el compuesto mezclado con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos, que son adecuados para fabricar comprimidos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes de granulación y disgregantes, por ejemplo, almidón de maíz, o ácido algínico; agentes aglutinantes, por ejemplo almidón de maíz, gelatina o goma arábiga y agentes lubricantes, por ejemplo estearato de magnesio o ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden estar sin recubrir o pueden recubrirse mediante técnicas que se sabe que retrasan la disgregación y absorción en el tracto gastrointestinal y de este modo, proporcionan una acción sostenida durante un periodo de tiempo largo. Por ejemplo, se puede emplear un material de retraso de tiempo tal como monoestearato de glicerol o diestearato de glicerol. Las formulaciones para uso oral se pueden presentar como cápsulas de gelatina dura en las que el compuesto se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo carbonato cálcico, fosfato cálcico o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda en las que el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo aceite de cacahuètes, parafina líquida o aceite de oliva.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del compuesto activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyente inerte de uso habitual en la técnica, tal como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular aceites de semilla de algodón, de cacahuete, de maíz, de germen, de oliva, de ricino y de sésamo), glicerol, alcohol de tetrahidrofurilo, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano y mezclas de los mismos. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes.

Las suspensiones acuosas contienen el compuesto mezclado con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábica; los agentes de dispersión o humectación pueden ser una fosfatida natural, por ejemplo lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilen-oxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos tales como hexitol tal como monooleato de polioxietilensorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de polioxietilensorbitano. Las suspensiones acuosas pueden también contener uno o más conservantes, por ejemplo etilo, o p-hidroxi-benzoato de n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes o uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

Las suspensiones oleosas se pueden formular suspendiendo el compuesto en un aceite vegetal, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo, aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Se pueden añadir agentes edulcorantes, tales como los que se exponen más adelante y agentes aromatizantes para proporcionar una preparación oral agradable al gusto. Estas composiciones se pueden conservar mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico. Polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el ingrediente activo en mezcla con un agente de dispersión o agente humectante, un agente de suspensión y uno o más conservantes. Tales agentes de dispersión o agentes humectantes y agentes de suspensión adecuados se ejemplifican por los que ya se han descrito anteriormente. También pueden estar presentes excipientes adicionales, por ejemplo edulcorantes, aromatizantes y agentes.

El compuesto 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol también puede estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de oliva o aceites de cacahuete, o un aceite mineral, por ejemplo parafina líquida o mezclas de estos. Agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas naturales, por ejemplo goma arábica o goma de tragacanto, fosfátidas naturales, por ejemplo soja, lecitina y fosfátidas que se dan, por ejemplo soja, lecitina y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de sorbitano y productos de condensación de estos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo monooleato de polioxietileno sorbitano. La emulsión puede también contener agentes edulcorantes y aromatizantes. Los jarabes y elixires se pueden formular con agentes edulcorantes, por ejemplo glicerol, sorbitol o sacarosa. Dichas formulaciones pueden también contener un demulcente, un conservante y agentes aromatizantes y colorantes.

En una realización, 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol se formula en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que se van a tratar; conteniendo cada uno una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto y al menos un excipiente farmacéutico. Un producto farmacéutico comprenderá una forma de unidad de dosificación dentro de un recipiente que está marcado o acompañado de una etiqueta que indique el método de tratamiento previsto, tal como el tratamiento de una enfermedad  $\beta$ -amiloidé, por ejemplo una amiloidosis tal como enfermedad de Alzheimer o una enfermedad asociada con la formación de fibrillas de  $\alpha$ -sinucleína tal como la enfermedad de Parkinson. Las composiciones para administración rectal o vaginal son preferentemente supositorios que se pueden preparar mezclando los compuestos proporcionados en el presente documento con excipientes o vehículos no irritantes adecuados tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorio que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a temperatura corporal y por tanto se funden en el recto o la cavidad vaginal y liberan el compuesto activo. El 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol también se puede administrar en forma de liposomas. Los métodos para formar liposomas se conocen en la técnica (Prescott, ed., *Methods in Cell Biology*, 1976, volumen XIV, Academic Press, Nueva York, N.Y.). Como se conoce en la técnica, los liposomas se derivan en general a partir de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas. Los liposomas están formados por cristales líquidos hidratados mono- o multilaminares que están dispersados en un medio acuoso. Puede utilizarse cualquier lípido fisiológicamente aceptable y metabolizable, no tóxico capaz de formar liposomas.

Las presentes composiciones en forma de liposomas pueden contener, además de 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol, estabilizantes, conservantes, excipientes y similares. Los lípidos preferidos son fosfolípidos y fosfatidilcolinas (lecitinas) naturales y sintéticos.

- 5 El compuesto 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol también puede ser adecuado para la administración en forma de un "profármaco" en el que los ingredientes farmacéuticos activos, se liberan *in vivo* tras el contacto con las enzimas hidrolíticas tales como esterases y fosfatasas en el cuerpo. La expresión "profármacos farmacéuticamente aceptables" como se usan en el presente documento representan los profármacos del compuesto que son, dentro del alcance del firme juicio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, proporcionales a una proporción de beneficios/riesgos razonable y eficaces para su uso previsto. En T. Higuchi y V. Stella (Higuchi, T. y Stella, V. Pro-drugs as Novel Delivery Systems, V. 14 of the A.C.S. Symposium Series; Edward B. Roche, Ed., Bioreversible Carriers in Drug Design 1987, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press) se proporciona una discusión exhaustiva.
- 10
- 15 El compuesto 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol, o derivados farmacéuticamente aceptables del mismo, también pueden formularse para dirigirse a un tejido, receptor concretos, u otra área del cuerpo del sujeto que se va a tratar. Muchos de estos métodos de transporte dirigido se conocen bien por los expertos en la técnica. Véanse para ejemplos no limitantes de métodos de transporte dirigido, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.ºs: 6.316.652, 6.274.552, 6.271.359, 6.253.872, 6.139.865, 6.131.570, 6.120.751, 6.071.495, 6.060.082, 6.048.736, 6.039.975, 20 6.004.534, 5.985.307, 5.972.366, 5.900.252, 5.840.674, 5.759.542 y 5.709.874.

- Las suspensiones de liposomas, incluyendo los liposomas dirigidos a tejidos, tales como los liposomas dirigidos a tumores, también pueden ser adecuados como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse según métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las formulaciones de liposomas pueden prepararse como se describe en la patente de EE.UU. N.º: 4.522.811. Brevemente, pueden formarse liposomas, tales como vesículas multilaminares (MLV), secando fosfatidilcolina de huevo y fosfatidilserina de cerebro (proporción molar 7:3) en el interior de un matraz. Se añade una solución de un compuesto divulgado en el presente documento en solución salina tamponada con fosfato sin cationes divalentes (PBS) y el matraz se agita hasta que la película lipídica se dispersa. Las vesículas resultantes pueden lavarse para eliminar el compuesto no encapsulado, sedimentarse mediante centrifugación y después resuspenderse en PBS.
- 25
- 30

#### Formulaciones de liberación sostenida

- También se divulga el uso de formulaciones de liberación sostenida para administrar los compuestos divulgados en el presente documento en la diana deseada (es decir, el cerebro o los órganos sistémicos) a altos niveles en circulación (entre  $10^{-9}$  y  $10^{-4}$  M). Para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o de Parkinson, los niveles en circulación de los compuestos se pueden mantener hasta  $10^{-7}$  M. Los niveles pueden estar bien en circulación en el paciente de forma sistémica, o bien estar presentes en el tejido cerebral y en determinadas circunstancias, localizados en los depósitos de fibrillas de  $\beta$ -amiloides o de  $\alpha$ -sinucleína en el cerebro u otros tejidos.
- 35
- 40

- Se entiende que los niveles del compuesto se pueden mantener a lo largo de cierto periodo de tiempo según se desee y pueden ser determinados con facilidad por los expertos en la técnica usando esta divulgación y los compuestos divulgados en el presente documento. En el presente documento se divulga una característica única de la administración que comprende una formulación de liberación sostenida de forma que un nivel constante del compuesto terapéutico se puede mantener entre  $10^{-8}$  y  $10^{-6}$  M entre 48 a 96 horas en los sueros.
- 45

- Dichas formulaciones de liberación sostenida y/o prolongada se pueden preparar por medios de liberación sostenida o dispositivos de liberación que son bien conocidos para los expertos en la técnica, como los descritos en las patentes de EE.UU. N.ºs: 3.845.770; 3.916.899; 3.536.809; 3.598.123; 4.008.719; 4.710.384; 5.674.533; 5.059.595; 5.591.767; 5.120.548; 5.073.543; 5.639.476; 5.354.556 y 5.733.566.
- 50

- Estas composiciones farmacéuticas pueden utilizarse para proporcionar una liberación lenta o sostenida de uno o más de los compuestos divulgados utilizando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa, otras matrices poliméricas, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos, revestimientos de múltiples capas, micropartículas, liposomas, microesferas o similares. Las formulaciones de liberación sostenida adecuadas conocidas para los expertos en la técnica, incluidas las descritas en el presente documento, se pueden seleccionar fácilmente para su uso con las composiciones farmacéuticas de la invención. Por tanto, las formas de dosificación monodosis para administración oral, tales como, entre otras, comprimidos, cápsulas, cápsulas blandas, comprimidos oblongos, polvos y similares, que están adaptados para liberación sostenida se divulgan en el presente documento.
- 55
- 60

- La formulación de liberación sostenida puede contener compuesto activo, tal como, pero no limitado a, celulosa microcristalina, maltodextrina, etilcelulosa y estearato de magnesio.

- La formulación de liberación sostenida puede encapsularse mediante partículas o gránulos de revestimiento de la composición farmacéutica divulgada en el presente documento con diversos espesores de polímeros de solubilización lenta o mediante microencapsulación. La formulación de liberación sostenida puede encapsularse con
- 65

un material de revestimiento de espesor variable (por ejemplo, de aproximadamente 1 micrómetro a 200 micrómetros) que permite la disolución de la composición farmacéutica de aproximadamente 48 horas a aproximadamente 72 horas después de la administración a un mamífero. El material de revestimiento es un aditivo aprobado para su utilización alimentaria.

5 La formulación de liberación sostenida es un dispositivo de disolución de matriz que se prepara comprimiendo el fármaco con un vehículo de polímero de solubilidad lenta para producir un comprimido. Las partículas recubiertas tienen un intervalo de tamaño entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 300 micrómetros, según se divulga en las patentes de EEUU N.<sup>os</sup>:4.710.384 y 5.354.556.

10 Cada una de las partículas puede estar en forma de una micromatriz, estando el ingrediente activo distribuido uniformemente a través del polímero.

15 Se divulgan formulaciones de liberación sostenida tales como las descritas en la patente de EEUU N.º: 4.710.384, que tienen un porcentaje relativamente alto de plastificante en el recubrimiento con el fin de permitir una flexibilidad suficiente para evitar la rotura sustancial durante la compresión. La cantidad específica de plastificante varía dependiendo de la naturaleza del recubrimiento y del plastificante concreto utilizado. La cantidad puede determinarse con facilidad de modo empírico analizando las características de liberación de los comprimidos formados. Si el medicamento se libera demasiado rápido, entonces se emplea más plastificante. Las características de liberación también son una función del espesor del recubrimiento. Cuando se emplean cantidades sustanciales del plastificante, disminuye la capacidad de liberación sostenida del recubrimiento. Por tanto, el espesor del recubrimiento puede aumentarse ligeramente para preparar un aumento en la cantidad de plastificante. En general, el plastificante en una realización tal estará presente en una cantidad de aproximadamente el 15% al 30% del material de liberación sostenida en el recubrimiento, preferentemente del 20% al 25% y la cantidad de recubrimiento será del 10% al 25% del peso del material activo, preferentemente del 15% al 20%. Cualquier plastificante farmacéuticamente aceptable convencional puede incorporarse al recubrimiento.

20 El 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol puede formularse como una formulación de liberación sostenida y/o programada. Todos los productos farmacéuticos de liberación sostenida tienen el objetivo común de mejorar la terapia de fármacos con respecto a lo que se obtiene con sus homólogos de liberación no sostenida. De manera ideal, el uso de una preparación de liberación sostenida óptimamente diseñada en un tratamiento médico se caracteriza por emplear un mínimo de sustancia de fármaco para curar o controlar la afección. Las ventajas de las formulaciones de liberación sostenida pueden incluir: 1) actividad prolongada de la composición; 2) frecuencia de dosificación reducida; y 3) cumplimiento por parte del paciente incrementado. Además, las formulaciones de liberación sostenida pueden utilizarse para afectar al momento de aparición de la acción u otras características, como los niveles en sangre de la composición y por tanto pueden afectar a la aparición de efectos secundarios.

30 Las formulaciones de liberación sostenida divulgadas se diseñan para liberar inicialmente una cantidad de la composición terapéutica que produce rápidamente el efecto terapéutico deseado y para liberar gradual y continuamente otras cantidades de las composiciones para mantener este nivel de efecto terapéutico a lo largo de un periodo de tiempo prolongado. Para mantener este nivel constante en el cuerpo, la composición terapéutica debe liberarse de la forma de dosificación con una velocidad que sustituya a la composición que se ha metabolizado y excretado del cuerpo.

45 La liberación sostenida de un ingrediente activo se puede estimular mediante varios inductores, por ejemplo pH, temperatura, enzimas, agua u otras condiciones o compuestos fisiológicos. La expresión "componente de liberación sostenida" en el contexto de la presente divulgación se define en el presente documento como un compuesto o compuestos que incluyen, pero no se limitan a, polímeros, matrices poliméricas, geles, membranas permeables, liposomas, microesferas o similares, o una combinación de los mismos, que facilite la liberación sostenida del ingrediente activo.

50 Si el complejo es hidrosoluble puede formularse en un tampón apropiado, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato u otras soluciones fisiológicamente compatibles. Como alternativa, si el complejo resultante tiene baja solubilidad en disolventes acuosos, puede formularse con un tensioactivo no iónico tal como Tween, o polietilenglicol. Por tanto, los compuestos y sus disolventes fisiológicos pueden formularse para la administración mediante inhalación o insuflación (bien a través de la boca o bien de la nariz) o mediante administración oral, bucal, parenteral o rectal, como ejemplos.

60 Las preparaciones para administración oral se pueden formular adecuadamente para proporcionar una liberación controlada del compuesto activo. Los compuestos divulgados en el presente documento se pueden formular como polvos de liberación controlada de micropartículas discretas que pueden formularse con facilidad en forma líquida. El polvo de liberación sostenida comprende partículas que contienen un ingrediente activo y opcionalmente, un excipiente con al menos un polímero no tóxico.

65 El polvo puede dispersarse o suspenderse en un vehículo líquido y mantendrá sus características de liberación sostenida durante un periodo de tiempo útil. Estas dispersiones o suspensiones tienen estabilidad química y

estabilidad en términos de velocidad de disolución. El polvo puede contener un excipiente que comprende un polímero, que puede ser soluble, insoluble, permeable, impermeable, o biodegradable. Los polímeros pueden ser polímeros o copolímeros. El polímero puede ser un polímero natural o sintético. Los polímeros naturales incluyen polipéptidos (por ejemplo, zeína), polisacáridos (por ejemplo, celulosa) y ácido alginico. Los polímeros sintéticos representativos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la columna 3, líneas 33-45 de la patente de EEUU N.º: 5.354.556.

Los polímeros particularmente adecuados incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la columna 3, línea 46-columna 4, línea 8 de la patente de EEUU N.º: 5.354.556.

Los compuestos de liberación sostenida divulgados en el presente documento pueden formularse para la administración parenteral, por ejemplo, mediante inyecciones intramusculares o implantes para tejidos subcutáneos y diversos dispositivos para cavidades corporales y transdérmicos. Las inyecciones intramusculares se pueden formular como suspensiones acuosas u oleosas. En una suspensión acuosa, el efecto de liberación sostenida se debe, en parte, a una reducción en la solubilidad del compuesto activo tras la formación de complejos o a una disminución en la velocidad de disolución. Se emplea una estrategia similar con suspensiones y disoluciones oleosas, en las que la velocidad de liberación de un compuesto activo se determina extrayendo el compuesto activo del aceite hacia el medio acuoso circundante. Solo los compuestos activos que sean solubles en aceite y que tengan las características de extracción deseadas son adecuados. Los aceites que pueden utilizarse para la inyección intramuscular incluyen, pero no se limitan a, aceite de sésamo, de oliva, de arachis, de maíz, de almendra, de soja, de semilla de algodón y de ricino.

Una forma muy desarrollada de liberación de fármacos que imparte una liberación sostenida a lo largo de periodos de tiempo que varían de días a años es implantar un dispositivo polimérico que porta el fármaco subcutáneamente o en diversas cavidades corporales. El material polimérico utilizando en un implante, que debe ser biocompatible y no tóxico, incluye pero no se limita a, hidrogeles, siliconas, polietilenos, copolímeros de etileno-acetato de vinilo, o polímeros biodegradables.

#### Evaluación de la actividad de los compuestos

La actividad biológica de los compuestos divulgados en el presente documento como disruptores/inhibidores de las fibrillas de la proteína  $\beta$ -amiloides ( $A\beta$ ) de la enfermedad de Alzheimer y los agregados de  $\alpha$ -sinucleína de la enfermedad de Parkinson se evaluó determinando la eficacia de los compuestos para provocar un desensamblado/rotura de fibrillas de amiloides preformadas de la enfermedad de Alzheimer (es decir que consisten en fibrillas de  $A\beta$  1-42) y los agregados de  $\alpha$ -sinucleína de la enfermedad de Parkinson. En un estudio, se empleó una fluorometría de tioflavina T para determinar los efectos de los compuestos y de EDTA (como control negativo). En este ensayo la tioflavina T se une específicamente a amiloides fibrilares y esta unión produce una potenciación de la fluorescencia a 485 nm que es directamente proporcional a la cantidad de fibrillas presentes. Cuanto mayor sea la fluorescencia, mayor es la cantidad de fibrillas o agregados presentes (Naki *et al.*, Lab. Invest., 65:104-110, 1991; Levine III, Protein Sci. 2:404-410, 1993; Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest. 2:1-6, 1995).

En el ensayo de unión con rojo Congo se cuantificó la capacidad de un compuesto de ensayo concreto para alterar la unión de amiloides (fibrillas  $A\beta$  1-42 o agregados de  $\alpha$ -sinucleína) al rojo Congo. En este ensayo, las fibrillas  $A\beta$  1-42 o los agregados de  $\alpha$ -sinucleína, las fibrillas y los compuestos de ensayo se incubaron durante 3 días y después se filtraron al vacío a través de un filtro de 0,2  $\mu$ m. Después se cuantificó la cantidad de fibrillas  $A\beta$  1-42 o de agregados de  $\alpha$ -sinucleína retenidos en el filtro siguiendo la tinción del filtro con rojo Congo. Después de un lavado apropiado del filtro, cualquier disminución del color rojo Congo sobre el filtro en presencia del compuesto de ensayo (comparado con la tinción con rojo Congo de la proteína amiloide en ausencia del compuesto de ensayo) resultó indicativa de la capacidad del compuesto de ensayo para disminuir/alterar la cantidad de fibrillas agregadas y congófilica  $A\beta$  1-42, o agregados de  $\alpha$ -sinucleína.

#### Terapia de combinación

El 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol puede administrarse en combinación, o de forma secuencial, con otro agente terapéutico. Estos otros agentes terapéuticos incluyen los conocidos para el tratamiento, la prevención o la mejora de uno o más síntomas de las amiloidosis y las enfermedades de sinucleína. Tales agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, hidrocóloruro de donepezilo (Aracept), tartrato de rivastigmina (Exelon), hidrocóloruro de tacrina (Cognex) e hidrobromuro de galantamina (Reminyl).

#### Uso de los compuestos y las composiciones

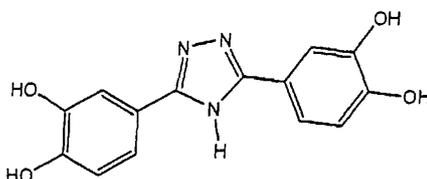
El 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol es útil en el tratamiento, prevención o mejora de uno o más síntomas de enfermedades  $\beta$ -amiloides o amiloidosis, incluyendo pero no limitadas a, enfermedades asociadas con la formación, el depósito, la acumulación o la persistencia de las fibrillas de  $\beta$ -amiloides. En determinadas realizaciones, el 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol se usa para el tratamiento, la prevención o la mejora de uno o más síntomas de enfermedades incluyendo, pero no limitadas a, la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down, la hemorragia

cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés y la angiopatía  $\beta$ -amiloide cerebral.

También se proporciona el uso de 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol para inhibir o evitar la formación de fibrillas de  $\alpha$ -sinucleína, para inhibir o evitar el crecimiento de fibrillas de  $\alpha$ -sinucleína y para provocar la desintegración, la rotura y/o la disgregación de agregados de  $\alpha$ -sinucleína preformados y de depósitos de proteínas asociadas a  $\alpha$ -sinucleína.

En ciertas realizaciones, las enfermedades de sinucleína o las sinucleinopatías tratadas, evitadas o cuyos síntomas se mejoran mediante el uso de 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol son pero no se limitan a enfermedades asociadas con la formación, el depósito, la acumulación o la persistencia de agregados de sinucleína, incluyendo fibrillas de  $\alpha$ -sinucleína. En determinadas realizaciones, dichas enfermedades de sinucleína incluyen enfermedad de Parkinson, enfermedad de Parkinson familiar, enfermedad de cuerpos de Lewy, la variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia de sistemas múltiples y el complejo Parkinsonismo-demencia de Guam.

En una realización se proporciona un compuesto que tiene la fórmula:



y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

En otra realización se proporciona una composición farmacéutica que comprende 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otra realización se proporciona 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol para su uso en la inhibición de la formación, el depósito, la acumulación o la persistencia de agregados de  $A\beta$ -amiloide o de  $\alpha$ -sinucleína.

En otra realización se proporciona 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol para su uso en el tratamiento de una enfermedad  $\beta$ -amiloide o una sinucleinopatía en un mamífero que la sufra.

En otra realización se proporciona 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol para su uso en la mejora del funcionamiento motor en un mamífero que sufra sinucleinopatía.

En otra realización se proporciona 3,5-bis(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-triazol para su uso en la detención de la progresión de déficits motores en un mamífero que sufra enfermedad de Parkinson.

Los siguientes ejemplos no limitantes se ofrecen solo como ilustración y no se consideran una limitación de la presente invención.

#### Ejemplos

##### Procedimientos experimentales generales

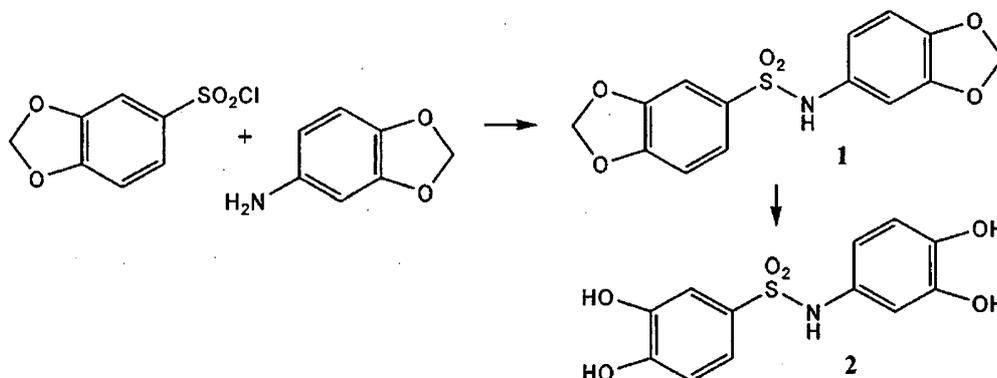
Todos los disolventes se destilaron antes del uso y se retiraron mediante evaporación rotatoria a unas temperaturas de hasta 35°C. Se empleó gel de sílice 60 de Merck, malla 200-400, 40-63  $\mu$ m, para la cromatografía ultrarrápida en gel de sílice. La TLC se realizó utilizando Merck DC-plastikfolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, se visualizó primero con una bombilla de UV y después sumergiendo en una disolución de vainillina (vainillina al 1%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1% en EtOH) y calentando. Los espectros de masas se registraron en un instrumento Kratos MS-80. Los espectros de RMN, a 25°C, se registraron a 500 o 300 MHz para <sup>1</sup>H y a 125 o 75 MHz para <sup>13</sup>C, en espectrómetros Varian INOVA-500 o VXR-300. Los desplazamientos químicos se indican en ppm sobre la escala  $\delta$  referenciada a los picos del disolvente: CHCl<sub>3</sub> a 7,25 y CDCl<sub>3</sub> a 77,0 ppm o (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO a 2,15 y (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO a 30,5 ppm o CH<sub>3</sub>OD a 3,30 y CD<sub>3</sub>OD a 39,0 ppm.

##### Condiciones de la HPLC

Las muestras se analizaron utilizando un instrumento Agilent HP1100 accionado con el software EzChrom Elite y provisto de una columna C-18 (Phenomenex Prodigy 5  $\mu$ m 100A, 250 x 4,6 mm) con una columna de guarda (Phenomenex ODS 4 x 3 mm, 5  $\mu$ m) ajustada a 30°C. Los picos se detectaron a 280 nm. La fase móvil era acetonitrilo en agua (con 0,1% de TFA): t<sub>0</sub>=11%, t<sub>20</sub>=11%, t<sub>30</sub>=100%, t<sub>31</sub>=11%, t<sub>40</sub>=11%. El caudal fue 1 ml/min y el volumen de inyección 5  $\mu$ l.

## Ejemplo comparativo 1: Síntesis de sulfonamida 2

3,4 dihidroxifenilsulfonamida de ácido 3,4-dihidroxi-bencenosulfónico (Compuesto 5)



5

La síntesis de la sulfonamida 2 se realizó mediante reacción de cloruro de 3,4-metilendioxi-bencenosulfonilo (preparado a partir de 1,2-metilendioxi-benceno (Tao, E.V.P.; Miller, W.D. patente de EE.UU. N.º: 5.387.681. 1995)) con 3,4-metilendioxi-anilina para dar la sulfonamida 1 con un buen rendimiento.. La desprotección con tribromuro de boro en condiciones convencionales dio la sulfonamida fenólica libre con un rendimiento razonable.

10

A una solución agitada de cloruro de 1,3-benzodioxol-5-sulfonilo (Tao, E.V.P.; Miller, W.D. patente de EE.UU. N.º: 5.387.681. 1995) (1 g) en diclorometano (DCM) (10 ml) se añadió una solución de 3,4-metilendioxi-anilina (0,62 g) en diclorometano (10 ml) seguida de piridina (1 ml). La mezcla se sometió a reflujo durante 2 horas, se enfrió, se diluyó con diclorometano (150 ml), se lavó con HCl acuoso (1M, 2 x 100 ml), se secó, después se evaporó al vacío para dar el producto en bruto como una goma marrón. La purificación mediante cromatografía en columna en gel de sílice eluyendo con 5 -10% de acetato de etilo en diclorometano dio la sulfonamida 1 pura como una goma marrón claro (1,34 g, 92%). La cristalización del 95% de etanol dio el producto como cristales de color marrón claro.

15

20 HPLC 29,6 minutos.

RMN de <sup>1</sup>H ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) 8,75 (1H, s), 7,39 (2H, dd, J 2, 9Hz), 7,24 (1H, d, J 2Hz), 7,02 (1H, d, J 9Hz), 6,86 (1H, d, J 2Hz), 6,81 (1H, d, J 9Hz), 6,72 (2H, dd, J 2, 9Hz), 6,23 (2H, s) y 6,06 (2H, s).

25 HREIMS Hallado, 344,0201; MNa<sup>+</sup>, C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>NNaO<sub>6</sub>S requiere 344,0199.

A una solución de la sulfonamida 1 (0,7 g) en DCM seco (50 ml) se añadió tribromuro de boro (0,5 ml) y la mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 3 horas. Se añadió metanol cuidadosamente (gota a gota después 5 ml) después la reacción se dejó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla se evaporó al vacío hasta 1 ml, después se añadió más metanol (20 ml), esto se repitió cuatro veces, después los disolventes se eliminaron mediante evaporación al vacío.

30

La purificación mediante cromatografía en columna en gel de sílice eluyendo con 0 - 20% metanol en cloroformo dio el producto como una goma de color marrón claro. La purificación adicional sobre sílice de fase inversa C-18 eluyendo con 0 - 50% de acetonitrilo en agua, seguida de liofilización, dio el producto puro 2 como un polvo marrón claro (295 mg, 45%).

35

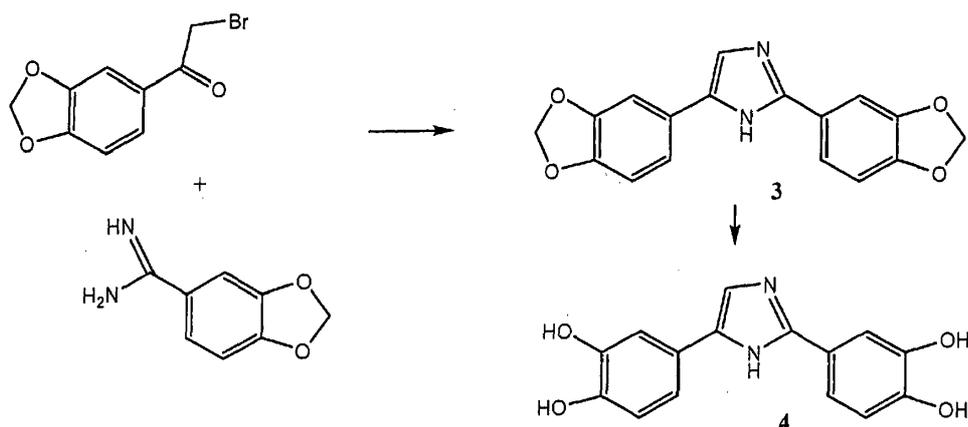
HPLC 12,9 minutos 95%

40 RMN de NMR (CD<sub>3</sub>OD) 7,05 (1H, d, J 2Hz), 7,03 (2H, dd, J 2, 9Hz), 6,76 (1H, d, J 9Hz), 6,57 (1H, d, J 2Hz), 6,56 (1H, d, J 9Hz) y 6,31 (2H, dd, J 2, 9Hz).

HREIMS Hallado, 296,0241; M<sup>+</sup>, C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>6</sub>S requiere, 296,0234.

45 Ejemplo comparativo 2: Síntesis de imidazol 4

2,4 bis (3,4 dihidroxifenil) imidazol (Compuesto 6)



El anillo imidazol se formó de acuerdo con el método descrito por Li *et al.* (Li *et al.* Organic Process Research and Development 2002, 6, 682-3) a partir del amidinobenceno, formado a partir de piperonilnitrilo (Thurkauf *et al.* J Med Chem. 1995, 38 (12), 2251-2255) y la bromocetona (Castedo *et al.* Tetrahedron 1982, 38 (11), 1569 - 70) formada a partir de 3,4-metilendioxiacetofenona de acuerdo con el método descrito por Lee *et al.* (Korean Chem Soc. 2003, 24 (4), 407 - 408). La desprotección con tribromuro de boro en condiciones convencionales dio el imidazol fenólico libre con un rendimiento bueno.

- 10 De acuerdo con el método descrito por Li, una mezcla de 3-amidinobenceno (Thurkauf *et al.* J Med Chem. 1995, 38 (12), 2251-2255) (0,5 g, 3 mmol) y bicarbonato potásico (1,20 g, 12 mmol) en tetrahidrofurano (THF) (16 ml) y agua (4 ml) se calentó enérgicamente a reflujo.. Se añadió bromocetona (Castedo *et al.* Tetrahedron 1982, 38 (11), 1569 - 70; y Lee *et al.* Korean Chem Soc. 2003, 24 (4), 407 408) (0,729 g, 3 mmol) en THF (4 ml) durante 20 minutos y se mantuvo el reflujo durante otras 2 horas. El THF se eliminó después mediante evaporación al vacío y el residuo se extrajo en acetato de etilo, se secó y se evaporó al vacío para dar el producto en bruto como un sólido marrón. La cristalización en 95% de etanol dio el imidazol puro 3 como un sólido cristalino amarillo claro (0,54 g, 58%).

HPLC 27,9 minutos. RMN ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) 7,45 7,70 (5H, m), 7,02 (1H, d, J 9Hz), 6,95 (1H, d, J 9Hz), 6,15 (2H, s) Y 6,09 (2H, s) HREIMS hallado, 309,0875; MH<sup>+</sup>, C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> requiere 309,0870.

- 20 A una solución del imidazol 3 (0,5 g) en DCM seco (50 ml) se añadió tribromuro de boro (1,0 ml) y la mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 3 horas. Cuidadosamente se añadió metanol (gota a gota después 5 ml) después la reacción se dejó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla se evaporó al vacío hasta 1 ml, después se añadió más metanol (30 ml), esto se repitió cuatro veces, después los disolventes se eliminaron mediante evaporación al vacío.

La purificación mediante cromatografía en columna en gel de sílice eluyendo con 0 - 20% metanol en cloroformo dio el producto 4 como un sólido marrón claro 4 (0,27 g, 58%).

- 30 HPLC 16,3 minutos 99%

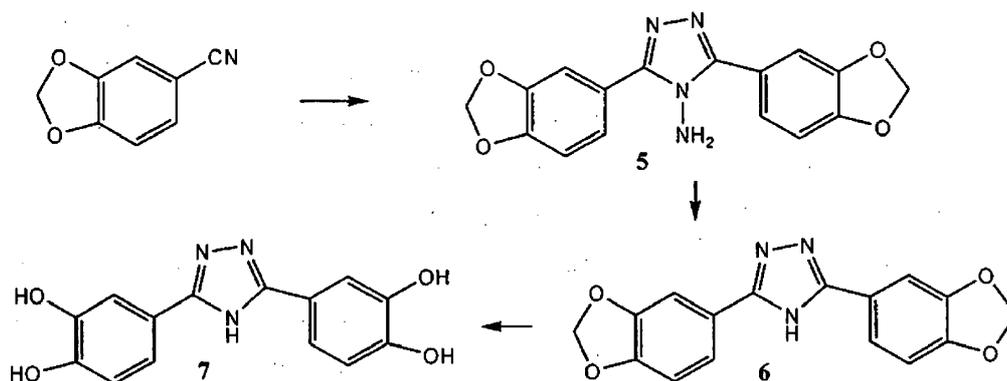
RMN de NMR (CD<sub>3</sub>OD) 7,59 (1H, s), 7,36 (1H, d, J 2Hz), 7,31 (2H, dd, J 2, 9Hz), 7,16 (1H, d, J 2Hz), 7,10 (2H, dd, J 2, 9Hz), 6,98 (1H, d, J 9Hz) y 6,88 (1H, d, J 9Hz).

- 35 HREIMS Hallado, 285,0873; MNa<sup>+</sup>, C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>NNaO<sub>6</sub>S requiere 285,0870.

Ejemplo 3: Síntesis de triazol 7

3,5 bis (3,4 dihidroxifenil)1,2,4-triazol (Compuesto 7)

- 40



El anillo 4-aminotriazol se formó mediante una reacción de dimerización de piperonilnitrilo de acuerdo con el método descrito por Bentiss (Bentiss et al. J Heterocyclic Chem. 1999, 36, 149-152) y después la desaminación se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito por Bentiss (Bentiss et al. J. Heterocyclic Chem. 2002, 39, 93 - 96) para dar el triazol 6 con un buen rendimiento. La desprotección con tribromuro de boro en condiciones convencionales dio el triazol fenólico 7 libre con un rendimiento bueno.

De acuerdo con el método descrito por Bentiss (Bentiss et al. J Heterocyclic Chem. 1999, 36, 149-152) una mezcla de nitrilo aromático (1 g), hidrato de hidracina (1 g) y clorhidrato de hidracina (0,5 g) en solución en etilenglicol (5 ml) se calentó hasta 130 °C durante 5 horas. La solución se enfrió después se diluyó con agua (7 ml), el producto sólido se filtró, se lavó con DCM después se secó para dar el producto en bruto. La recrystalización en metanol dio el 4-aminotriazol 5 puro, como un sólido amarillo claro (0,65 g, 66%).

HPLC 27,0 minutos.

RMN de  $^1\text{H}$  ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) 7,62 (2H, dd, J 2,9Hz), 7,42 (2H, d, J 2Hz), 6,94 (2H, d, J 9Hz), 6,15 (2H, s) y 5,93 (4H, s).

HREIMS Hallado, 325,0937;  $\text{MH}^+$ ,  $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_4$  requiere 325,0931.

De acuerdo con el método descrito por Bentiss (Bentiss et al. J. Heterocyclic Chem. 2002, 39, 93 - 96) a una solución agitada del aminotriazol 5 (0,5 g) en una solución acuosa de ácido hipofosforoso (50%, 5 ml) lentamente se añadió una solución de nitrito sódico (0,6 g) en agua (1,5 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una hora adicional después se recogió el precipitado naranja claro, se lavó con agua y se secó para dar el triazol 6 (0,38, 80%). HPLC 29,48 minutos.

RMN de  $^1\text{H}$  ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) 7,81 (2H, dd, J 2, 9Hz), 7,70 (2H, d, J 2Hz), 7,10 (2H, d, J 9Hz) y 6,20 (4H, s). HREIMS Hallado, 310,0818;  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4$  requiere 310,0822.

A una solución del triazol 6 (0,5 g) en DCM seco (50 ml) se añadió tribromuro de boro (1,0 ml) y la mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 3 horas. Cuidadosamente se añadió metanol (gota a gota, después 5 ml) después la reacción se dejó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla se evaporó al vacío hasta 1 ml, después se añadió más metanol (30 ml), lo que se repitió cuatro veces, después se eliminaron mediante evaporación al vacío.

La purificación mediante cromatografía en columna en gel de sílice eluyendo con 0 - 20% metanol en cloroformo dio el producto 7 como un sólido marrón claro 4 (0,24 g, 52%).

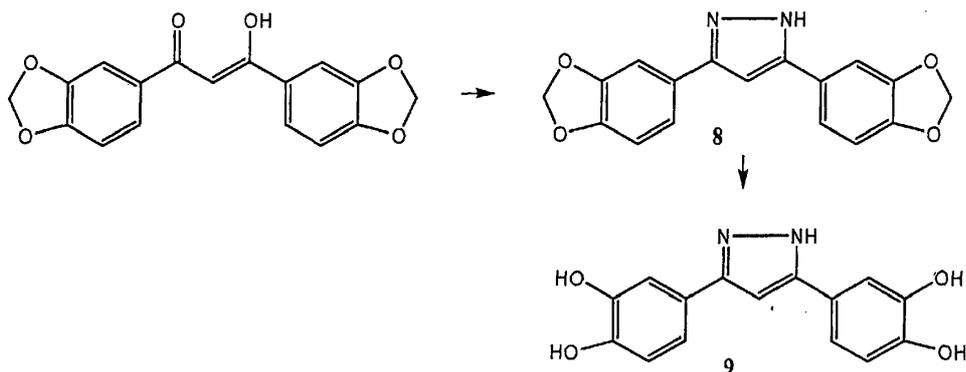
HPLC 16,1 minutos 97%

RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 7,46 (2H, d, J 2Hz), 7,41 (2H, dd, J 2, 9Hz), 7,15 (1H, s) y 6,96 (2H, d, J 9Hz).

HREIMS Hallado, 286,0815;  $\text{MH}^+$ ,  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4$  requiere 286,0822.

Ejemplo comparativo 4: Síntesis de pirazol 9

3,5 bis (3,4 dihidroxifenil) pirazol (Compuesto 8)



5 Reacción de la 1,3-dicetona (Lopez et al. *Planta Med.* 1998, 64 (1), 76 - 77) (preparada de acuerdo con el método descrito por Choshi et al. (*Chem. Pharm. Bull.* 1992, 40 (4), 1047 - 1049) con hidrato de hidrazina de acuerdo con el método descrito por Fink et al. (*Chemistry and Biology* 1999, 6, 205 - 219) dio el pirazol 8 con un buen rendimiento. La desprotección con tribromuro de boro en condiciones convencionales dio el pirazol fenólico 9 libre con un rendimiento bueno.

10 De acuerdo con el método descrito por Fink et al (*Chemistry and Biology* 1999, 6, 205 - 219) una suspensión de la dicetona (Choshi et al. *Chem. Pharm. Bull.* 1992, 40 (4), 1047 - 1049 y Lopez et al. *Planta Med.* 1998, 64 (1), 76 - 77) (1 g) e hidrazina HCl (1 g, 5 equiv.) en DMF/THF (3:1, 12 ml) se calentó a reflujo durante 24 horas. Se añadió agua y la mezcla se extrajo en diclorometano, se secó y se evaporó al vacío para dar el producto en bruto 8 como un sólido amarillo. La purificación mediante cromatografía en columna en gel de sílice eluyendo con 0 - 20% de acetato de etilo en diclorometano dio el pirazol 8 como un sólido amarillo (0,49 g, 50%).

15 HPLC 30,3 minutos.

RMN de  $^1\text{H}$  ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) 7,47 (2H, dd, J 2, 9Hz), 7,46 (2H, d, J 2Hz), 7,04 (1H, s), 7,02 (2H, d, J 9Hz) y 6,14 (4H, s).

20 HREIMS Hallado, 309,0859;  $\text{MH}^+$ ,  $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_4$  requiere 309,0870.

25 A una solución del pirazol 8 (0,46 g) en DCM seco (50 ml) se añadió tribromuro de boro (0,4 ml) y la mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 3 horas. Se añadió metanol cuidadosamente (gota a gota, después 5 ml) después la reacción se dejó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla se evaporó al vacío hasta 1 ml, después se añadió más metanol (30 ml), esto se repitió cuatro veces, después los disolventes se eliminaron mediante evaporación al vacío.

30 La purificación mediante cromatografía en columna en gel de sílice eluyendo con 0 - 20% metanol en cloroformo dio el pirazol 9 como un sólido amarillo claro. (0,285 g, 67%)

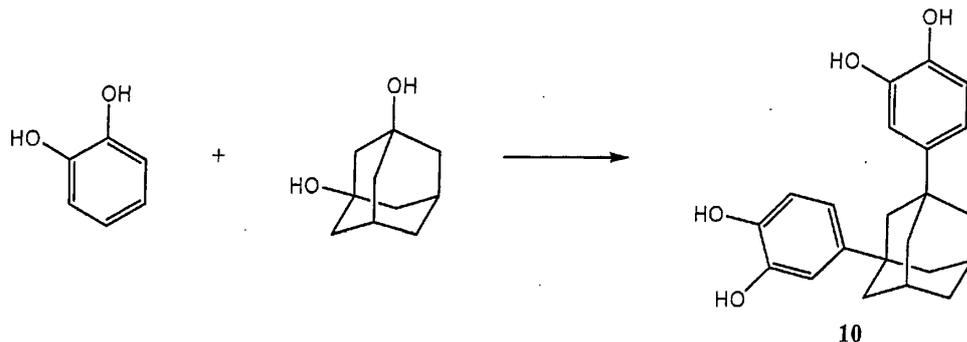
HPLC 25,9 minutos 98%

RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 7,26 (2H, d, J 2Hz), 7,22 (2H, dd, J 2, 9Hz), 7,15 (1H, s) y 6,93 (2H, d, J 9Hz).

35 HREIMS Hallado, 285,0879;  $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NNaO}_6\text{S}$  requiere 285,0870.

Ejemplo comparativo 5: Síntesis de adamantano 10

40 1,3 bis (3,4 dihidroxifenil) adamantano (Compuesto 9)



La reacción del catecol con 1,3-adamantano-diol de acuerdo con el método descrito por Lu *et al* (Lu et al. J Med Chem 2005, 48 (14), 4576 - 4585) dio el aducto 10 con un rendimiento razonable.

De acuerdo con el método descrito por Lu una solución de catecol (1,0 g) y adamantano-diol (0,5 g) en ácido metanosulfónico (2 ml) se calentó hasta 80°C durante 3 horas, después se dejó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió agua y la mezcla se extrajo en 10% de metanol en cloroformo que se secó y se evaporó al vacío para dar un sólido blanco. La purificación mediante cromatografía en columna en gel de sílice eluyendo con 0 - 20% metanol en cloroformo dio el producto como un sólido blanco. La cristalización en éter dietílico/40% de éter de petróleo dio después el producto puro 10 como un sólido cristalino blanco (210 mg, 20%).

HPLC 29,8 minutos 98%

RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 6,82 (2H, t, J 1,5Hz), 6,68 (4H, d, J 1,5Hz), 2,22 (2H, sa), 1,87 (8H, m) y 1,77 (2H, sa).

HREIMS Hallado, 387,1369;  $\text{MCl}^+$ ,  $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{ClO}_4$  requiere, 387,1369.

Ejemplo 6: compuestos 1-9 son potentes disruptores de las fibrillas o agregados de  $\text{A}\beta$  1-42 del Alzheimer

Los compuestos preparados en los ejemplos precedentes y los ejemplos comparativos eran potentes disruptores/inhibidores de las fibrillas o agregados de las proteínas  $\beta$ -amiloide de la enfermedad de Alzheimer. En un conjunto de estudios, se analizó la eficacia de los compuestos para producir desintegración/rotura de las fibrillas de amiloides preformadas de la enfermedad de Alzheimer (es decir, que consisten en fibrillas de  $\text{A}\beta$  1-42).

Parte A. Fluorometría con tioflavina T

En un estudio, se empleó una fluorometría de tioflavina T para determinar los efectos de los compuestos y de EDTA (como control negativo). En este ensayo la tioflavina T se une específicamente a amiloide fibrilar y esta unión produce una potenciación de la fluorescencia a 485 nm que es directamente proporcional a la cantidad de fibrillas de amiloide formadas. Cuanto mayor sea la fluorescencia, mayor es la cantidad de fibrillas de amiloide formadas (Naki *et al.*, Lab. Invest., 65:104-110, 1991; Levine III, Protein Sci. 2:404-410, 1993; Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest. 2:1-6, 1995).

En este estudio, 30  $\mu\text{l}$  de una solución 1 mg/ml (en agua destilada) de  $\text{A}\beta$ 1-42 (rPeptide) antes de que forme fibrillas se incubó a 37°C durante 3 días, solo o en presencia de uno de los compuestos o EDTA (a las proporciones en peso de  $\text{A}\beta$ :compuesto de ensayo de 1:1, 1:0,1, 1:0,01 o 1:0,001). Tras 3 días de coincubación, 50  $\mu\text{l}$  de cada mezcla de incubación se transfirieron a una placa de microtitulación de 96 pocillos que contenía 150  $\mu\text{l}$  de agua destilada y 50  $\mu\text{l}$  de una solución de tioflavina T (es decir, tioflavina T 500 mM en tampón fosfato 250 mM pH 6,8). La fluorescencia de emisión se leyó a 485 nm (longitud de onda de excitación 444 nm) usando un fluorómetro de placas de ELISA después de la sustracción con tampón solo o el compuesto solo, como blanco.

Los resultados de las incubaciones de 3 días se ilustran gráficamente en la figura 5. Por ejemplo, mientras que EDTA ('-C' en la figura 5) no produjo una inhibición significativa de fibrillas de  $\text{A}\beta$  1-42 a todas las concentraciones analizadas, los compuestos produjeron todos una rotura/desensamblado dependiente de la dosis de las fibrillas de  $\text{A}\beta$  1-42 preformadas. Todos los compuestos analizados fueron eficaces en la rotura de fibrillas de  $\text{A}\beta$  1-42 preformadas de forma similar a los resultados obtenidos de un compuesto control positivo ('+C' en la figura 5). Por ejemplo, todos los compuestos produjeron una inhibición de al menos un 96% cuando se usaron a una proporción en peso/peso del  $\text{A}\beta$ :compuesto de ensayo en comparación con el 99% para el control. A una proporción en peso/peso del  $\text{A}\beta$ :compuesto de ensayo de 1:0,1, los niveles de inhibición variaron del 86 al 95% en comparación con el 92% para el control. Este estudio indicó que los compuestos analizados son potentes disruptores/inhibidores de las fibrillas de  $\text{A}\beta$  de tipo enfermedad de Alzheimer y normalmente ejercen sus efectos de un modo dependiente de la dosis.

Parte B: Rojo Congo

En el ensayo de unión con rojo Congo se cuantificó la capacidad de un compuesto de ensayo para alterar la unión del  $\beta$ -amiloide al rojo Congo. En este ensayo, las fibrillas  $\text{A}\beta$  1-42 (como se preparan para el ensayo tio T) y los compuestos de ensayo se incubaron durante 3 días y después se filtraron al vacío a través de un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$ . La cantidad de  $\text{A}\beta$  1-42 retenido en el filtro se cuantificó después tras la tinción del filtro con rojo Congo. Después de un lavado apropiado del filtro, cualquier disminución del color rojo Congo sobre el filtro en presencia del compuesto de ensayo (comparado con la tinción con rojo Congo de la proteína amiloide en ausencia del compuesto de ensayo) fue indicativa de la capacidad del compuesto de ensayo para disminuir/alterar la cantidad de  $\text{A}\beta$  agregado y congófilico.

En un estudio, se determinó la capacidad de las fibrillas  $\text{A}\beta$  para unirse al rojo Congo en ausencia o presencia de cantidades crecientes de los compuestos o EDTA (a proporciones en peso de  $\text{A}\beta$ :compuesto de ensayo de 1:1, 1:0,1, 1:0,01 o 1:0,001). Los resultados de las incubaciones de 3 días se ilustran gráficamente en la figura 6. Mientras que EDTA ('-C' en la figura 6) no produjo una inhibición significativa de la unión de las fibrillas de  $\text{A}\beta$  1-42 al

rojo Congo a todas las concentraciones analizadas, los compuestos produjeron una inhibición dependiente de A $\beta$  al rojo Congo, algunas superando los efectos del compuesto control positivo ('+C' en la figura 6). Por ejemplo, el compuesto control positivo produjo una inhibición significativa del 73,5% ( $p < 0,01$ ) de la unión de rojo Congo a las fibrillas de A $\beta$  1-42 cuando se usó a una proporción en peso/peso de A $\beta$ :compuesto de ensayo de 1:1 y una inhibición significativa del 10,4% ( $p < 0,01$ ) de la unión del rojo Congo cuando se usó a una proporción en peso/peso de A $\beta$ :compuesto de ensayo de 1:0,1. Los compuestos 6, 8 y 9 superan los resultados del compuesto control positivo en ambas proporciones indicadas anteriormente. De forma similar a los resultados para el ensayo de Tio T, este estudio también indicó que los compuestos analizados son potentes inhibidores de la unión de las fibrillas A $\beta$  al rojo Congo y normalmente ejercen sus efectos de un modo dependiente de la dosis.

#### Parte D. Datos de espectroscopia de dicroísmo circular

La espectroscopia de dicroísmo circular (CD) es un método que se puede usar para determinar los efectos de los compuestos de ensayo sobre la rotura de la conformación de la estructura secundaria de las fibrillas de amiloides. En un estudio, como se describe en este ejemplo, la espectroscopia de dicroísmo circular se usó para determinar los efectos de diferentes compuestos de la invención en la conformación de lámina  $\beta$  de fibrillas de A $\beta$  1-42. Para este estudio, primero se liofilizó el A $\beta$ <sub>1-42</sub> (rPeptide Inc., Bogart, GA) en una solución de NaOH 50 mM, manteniéndose el pH por encima de 10 antes de congelar y liofilizar. El péptido se reconstituyó después en tampón acetato 20 mM, a pH 4, a una concentración de 1 mg/ml. La dilución y la adición de los compuestos de ensayo o vehículo se realizaron de un modo tal que la concentración final del péptido fue de 0,5 mg/ml y las proporciones de A $\beta$  1-42:compuesto de ensayo en peso/peso fueron 1:1 y 1:0,1. Cuando no se añadieron compuestos de ensayo, la cantidad de vehículo añadido a la mezcla de reacción fue igual a la cantidad usada para liberar los compuestos de ensayo. Tras 5 días de incubación a 37°C en presencia de compuestos o vehículo, los espectros CD se registraron en un espectropolarímetro Jasco 810 (Easton, MD). Todos los espectros CD se recolectaron en celdas de cuarzo de 0,05 o 0,1 cm. Las trazas de longitud de onda se escanearon de 190-270 nm en incrementos de 0,1 nm con un ancho de banda de 2 nm a una velocidad de escaneo de 50 nm por minuto, un tiempo de respuesta de 1 segundo y un paso de datos de 0,1 nm. Todo el sistema se equilibró y se lavó continuamente con nitrógeno a 10 l/min. Para el procesamiento de los datos, 10 espectros replicados de A $\beta$ <sub>1-42</sub> con vehículo añadido se adquirieron antes de la incubación, se promediaron y se restaron de 10 espectros promediados de "A $\beta$ <sub>1-42</sub> + el compuesto de ensayo" o vehículo después del periodo de incubación. Los espectros promedio se convirtieron a partir de la elipticidad en grados en elipticidad específica usando la fórmula  $[\theta] = (\theta^\circ/d) \times c$  en la que  $\theta^\circ$  es la elipticidad en grados,  $d$  es la longitud del recorrido en mm y  $c$  es la concentración en mg/ml. De este modo, se puede evaluar el cambio en la estructura del péptido que se produce entre lo hallado en el momento de la disolución inicial y lo hallado tras la incubación.

La figura 1A muestra algunos de los espectros CD generados en este estudio. A $\beta$ <sub>1-42</sub> solo (vehículo en la figura 1A) en tampón acetato 20mM tras la incubación normalmente demostró el espectro CD típico de una proteína amiloide con una estructura en lámina  $\beta$  significativa, como se demuestra por el mínimo observado a 218 nm. No obstante, en presencia de algunos de los compuestos, fue evidente una rotura marcada de la estructura de lámina  $\beta$  en fibrillas de A $\beta$ <sub>1-42</sub> (con un incremento significativo de la hélice aleatoria o  $\alpha$ -hélice) como muestra la reducción en la magnitud del mínimo observado a 218 nm (en comparación con A $\beta$ <sub>1-42</sub> solo).

La figura 1B muestra los efectos de los compuestos 1 y 2 sobre la inhibición de la estructura en lámina  $\beta$  de la formación de fibrillas A $\beta$ <sub>1-42</sub> cuando se comparó con un compuesto control positivo. Los estudios de CD demuestran que los compuestos analizados tienen la capacidad de romper/desintegrar la característica de estructura de lámina  $\beta$  de las fibrillas de A $\beta$  del Alzheimer. Los resultados de los estudios también confirman los ejemplos anteriores usando fluorometría con ensayos de unión a tioflavina T y Congo rojo.

Ejemplo 7: Los compuestos 1-9 son potentes disruptores de las fibrillas o agregados de la  $\alpha$ -sinucleína en la enfermedad de Parkinson

También se descubrió que los compuestos analizados eran potentes disruptores/inhibidores de las fibrillas o agregados de  $\alpha$ -sinucleína en la enfermedad de Parkinson. Se ha demostrado que la  $\alpha$ -sinucleína forma fibrillas o agregados cuando se incuba a 37°C durante varios días. Se ha postulado que la  $\alpha$ -sinucleína desempeña un importante papel en la patogenia de la enfermedad de Parkinson y otras sinucleinopatías. En este conjunto de estudios, se analizó la eficacia de los compuestos para producir un desensamblado/rotura de las fibrillas o agregados de  $\alpha$ -sinucleína preformados de la enfermedad de Parkinson.

#### Parte A. Fluorometría con tioflavina T

En un estudio, se empleó una fluorometría de tioflavina T para determinar los efectos de los compuestos y de EDTA (como control negativo (-C)). En este ensayo, la tioflavina T se une específicamente a fibrillas o agregados de  $\alpha$ -sinucleína y esta unión produce una potenciación de la fluorescencia a 485 nm que es directamente proporcional a la cantidad de fibrillas o agregados de  $\alpha$ -sinucleína presentes. Cuanto mayor sea la fluorescencia, mayor es la cantidad de fibrillas o agregados de  $\alpha$ -sinucleína (Naki *et al.*, Lab. Invest., 65:104-110, 1991; Levine III, Protein Sci. 2:404-410, 1993; Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest. 2:1-6, 1995).

En este estudio, 30  $\mu$ l de una solución 1 mg/ml de  $\alpha$ -sinucleína (rPéptido) se pre-fibrilizó a 37 °C con agitación a 1400 rpm durante 4 días y después se incubaron a 37 °C durante 3 días sola o en presencia de los compuestos o EDTA (a proporciones en peso de la  $\alpha$ -sinucleína:compuesto de 1:1, 1:0,1, 1:0,01 o 1:0,001). Tras 3 días de coincubación, 50  $\mu$ l de cada mezcla de incubación se transfirieron a una placa de microtitulación de 96 pocillos que contiene 150  $\mu$ l de agua destilada y 50  $\mu$ l de una solución de tioflavina T (es decir, tioflavina T 500 mM en tampón fosfato 250 mM pH 6,8). La fluorescencia de emisión se leyó a 485 nm (longitud de onda de excitación 444 nm) usando un fluorómetro de placas de ELISA después de la sustracción con tampón solo o el compuesto solo, como blanco.

Los resultados de las incubaciones de 3 días se ilustran gráficamente en la figura 7. Por ejemplo, mientras que la EDTA no produjo una inhibición significativa de las fibrillas o agregados de  $\alpha$ -sinucleína a todas las concentraciones analizadas, todos los compuestos produjeron un desensamblado/rotura dependiente de la dosis de las fibrillas o agregados de  $\alpha$ -sinucleína preformados en varias medidas. Por ejemplo, a una proporción de  $\alpha$ -sinucleína:compuesto de 1:0,01, el compuesto control positivo (+C en la figura 7) produjo una inhibición significativa del 77,4% ( $p < 0,01$ ), mientras que los otros compuestos analizados mostraron un intervalo de 45 a 83%. Los compuestos 1, 4, 5 y 6 mostraron resultados muy similares al compuesto control positivo. Este estudio indicó que los compuestos analizados son potentes disruptores/inhibidores de las fibrillas o agregados de  $\alpha$ -sinucleína de la enfermedad de Parkinson y normalmente ejercen sus efectos de un modo dependiente de la dosis.

#### 20 Parte B: Rojo Congo

En el ensayo de unión con rojo Congo, se cuantificó la capacidad de un compuesto de ensayo dado para alterar la unión de la  $\alpha$ -sinucleína al rojo Congo. En este ensayo, la  $\alpha$ -sinucleína (prefibrilada como se prepara para el ensayo tio T) y los compuestos de ensayo se incubaron durante 3 días y después se filtraron al vacío a través de un filtro de 0,2  $\mu$ m. Después la cantidad de  $\alpha$ -sinucleína retenida en el filtro se cuantificó siguiendo la tinción del filtro con rojo Congo. Después de un lavado apropiado del filtro, cualquier disminución del color rojo Congo sobre el filtro en presencia del compuesto de ensayo (comparado con la tinción con rojo Congo de la proteína amiloide en ausencia del compuesto de ensayo) resultó indicativa de la capacidad del compuesto de ensayo para disminuir/alterar la cantidad de  $\alpha$ -sinucleína agregada y congófilica.

En un estudio, se determinó la capacidad de las fibrillas o agregados de  $\alpha$ -sinucleína retenida para unirse al rojo Congo en ausencia o presencia de cantidades crecientes de los compuestos o EDTA (a proporciones en peso de  $\alpha$ -sinucleína:compuesto de ensayo de 1:1, 1:0,1, 1:0,01 o 1:0,001). Los resultados de incubaciones de 3 días se ilustran gráficamente en la figura 8. Mientras que EDTA (-C) no produjo inhibición significativa de la unión de las fibrillas de  $\alpha$ -sinucleína a rojo Congo a todas las concentraciones analizadas, los compuestos analizados produjeron una inhibición dependiente de la dosis de la unión de las fibrillas de  $\alpha$ -sinucleína a rojo Congo. Por ejemplo, el compuesto control positivo ((+C) produjo una inhibición significativa del 78,5% ( $p < 0,01$ ) unión de de rojo Congo a las fibrillas de  $\alpha$ -sinucleína o agregados de  $\alpha$ -sinucleína a una proporción en peso/peso de 1:1. El rango de inhibición a la misma proporción para todos los compuestos analizados era del 60 al 100%. Este estudio indicó que los compuestos analizados son potentes inhibidores de las fibrillas o agregados de la unión a rojo Congo de fibrillas de  $\alpha$ -sinucleína de la enfermedad de Parkinson y normalmente ejercen sus efectos de un modo dependiente de la dosis.

#### 45 Parte C Dicroísmo circular

La espectroscopia de dicroísmo circular (CD) es un método que se puede usar para determinar los efectos de los compuestos de ensayo sobre la conformación estructural secundaria de  $\alpha$ -sinucleína. Dado que la autoorganización de monómeros de  $\alpha$ -sinucleína en agregados o fibrillas no es posible sin la formación de una estructura secundaria, es decir lámina beta, se puede usar espectroscopia CD para medir la capacidad de los compuestos de ensayo para inhibir el proceso de fibrilización o agregación.

En un estudio, como se describe en este ejemplo, la espectroscopia de dicroísmo circular se usó para determinar los efectos de diferentes compuestos de la invención en la conformación de lámina  $\beta$  de  $\alpha$ -sinucleína. Para este estudio, la  $\alpha$ -sinucleína (rPeptide Inc., Bogart, GA) se disolvió en tampón fosfato (PBS) 9,5 mM a 1 mg/ml. La reserva resultante se diluyó en el mismo tampón y bien se añadieron compuestos de ensayo o bien se añadió vehículo de modo que la concentración final del péptido fue 0,25 mg/ml y las proporciones entre  $\alpha$ -sinucleína: compuesto fueron 1:1 y 1:0,1. Se registró un espectro CD de la muestra tratada con vehículo antes de la incubación de todas las muestras durante 4 días, tras lo que se adquirieron los espectros para todas las reacciones  $\alpha$ -sinucleína/compuesto o vehículo. Los espectros de CD se registraron en un espectropolarímetro Jasco 810 (Easton, MD). Todos los espectros de CD se adquirieron usando celdas de cuarzo de 0,10 cm. Las trazas de longitud de onda se escanearon de 190-270 nm en incrementos de 0,1 nm con un ancho de banda de 2 nm a una velocidad de escaneo de 50 nm por minuto, un tipo de respuesta de 32 segundos y un paso de datos de 0,5 nm. Todo el sistema se equilibró y se lavó continuamente con nitrógeno a 10 l/min. Para el procesamiento de los datos, 10 espectros replicados del tampón con vehículo añadido se adquirieron antes de la incubación, se promediaron y se restaron de 10 espectros promediados de " $\alpha$ -sinucleína + el compuesto de ensayo" o vehículo después del periodo de incubación. Los espectros promedio se convirtieron a partir de la elipticidad en grados en elipticidad específica usando la fórmula  $[\theta]$

=  $(\theta/d)xc$  en la que  $\theta^\circ$  es la elipticidad en grados,  $d$  es la longitud del recorrido en mm y  $c$  es la concentración en mg/ml. De este modo, se puede evaluar el cambio en la estructura del péptido que se produce entre lo hallado en el momento de la disolución inicial y lo hallado tras la incubación.

5 La figura 2 muestra los espectros de CD generados para la  $\alpha$ -sinucleína a tiempo cero y tras 4 días de incubación a 37°C. La  $\alpha$ -sinucleína sola en tampón PBS tratado con vehículo manifestó la firma de hélice aleatoria a tiempo cero y tras 4 días de incubación manifestó los espectros de CD típicos de una proteína con una estructura de lámina  $\beta$  significativa, como se demostró mediante el mínimo observado a 218 nm. No obstante, en presencia de algunos de los compuestos, una inhibición marcada de la formación de una estructura de lámina  $\beta$  mediante la  $\alpha$ -sinucleína fue  
10 evidente como se muestra mediante la reducción en la magnitud del mínimo observado a 218 nm (compárese con la  $\alpha$ -sinucleína sola).

La figura 3A muestra algunos de los espectros de CD generados en este estudio. La  $\alpha$ -sinucleína a tiempo cero produce los espectros indicativos de un péptido de hélice aleatoria y también proporciona datos de control de la inhibición del 100%. Tras la incubación, el espectro de la  $\alpha$ -sinucleína es lo que cabría esperar para una estructura de lámina  $\beta$ , lo que indica que se han formado agregados de mayor orden y se usa para proporcionar datos de control de la inhibición del 0%. Las muestras usadas para los controles están tratadas con vehículo para asegurar una relación cuantitativa entre estas muestras y las muestras tratadas con el compuesto de ensayo. Estos dos espectros permiten la cuantificación precisa del porcentaje de inhibición de la formación de fibrillas en las muestras tratadas con el compuesto de ensayo debido a su establecimiento de los controles positivos o negativos, que se supone que son un 100% y 0% de fibrillas respectivamente. A pesar de que estos porcentajes de control son solo estimaciones, existe una incertidumbre insuficiente como para sospechar, es decir el límite inferior puede ser una inhibición del 0-5% mientras que el límite superior puede ser una inhibición del 95-100%. Los controles se generan en cada ciclo de lote usando la misma solución madre de  $\alpha$ -sinucleína que se fracciona en alícuotas de volumen igual a los que se añaden del compuesto de ensayo individual o de vehículo y se realizan en paralelo para garantizar la precisión de la cuantificación. Los espectros mostrados en la figura 3A se adquirieron con una proporción en peso/peso de  $\alpha$ -sinucleína:compuesto de ensayo de 1:1. Estos espectros de CD demuestran que los compuestos de la presente invención tienen la capacidad para inhibir la formación de una estructura de lámina  $\beta$  característica de las fibrillas o agregados de  $\alpha$ -sinucleína de la enfermedad de Parkinson.  
15  
20  
25  
30

La figura 3B muestra los efectos de los compuestos sobre la inhibición de la estructura de lámina  $\beta$  de la  $\alpha$ -sinucleína cuando se compara con un compuesto control positivo (+C). El control positivo (+C) es, como se ha indicado, el espectro de las muestras tratadas con vehículo a tiempo cero, mientras que el control negativo (-C) es el espectro de las muestras tratadas con vehículo a los 4 días.  
35

La figura 4A muestra algunos de los espectros de CD que se adquirieron en este estudio. Estos espectros se adquirieron y procesaron del mismo modo que los presentados en la figura 3A. Estos espectros carecen de la firma de lámina  $\beta$  hallada en el espectro de la muestra tratada con vehículo.

40 La figura 4B muestra los efectos de los compuestos sobre la inhibición de la estructura de lámina  $\beta$  de la  $\alpha$ -sinucleína cuando se compara con un compuesto control positivo (+C). El control positivo (+C) es, como se ha indicado, el espectro de las muestras tratadas con vehículo a tiempo cero mientras que el control negativo (-C) es el espectro de las muestras tratadas con vehículo a los 4 días.

45 Los resultados de los estudios también confirman los ejemplos anteriores que usan los ensayos de tipo de unión a rojo Congo y de fluorometría de tioflavina T, de que los compuestos analizados son potentes agentes de anti-fibrilización de  $\alpha$ -sinucleína.

50 Ejemplo 8: compuestos 1-9 son potentes disruptores/inhibidores de las fibrillas o agregados de la  $\alpha$ -sinucleína en la enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por la acumulación de agregados intraneuronales insolubles denominados cuerpos de Lewy, un componente principal del cual es la  $\alpha$ -sinucleína (revisado en Dauer et al., Neuron, 39:889-909, 2003). Dado que las mutaciones dominantes autonómicas en la  $\alpha$ -sinucleína producen un subconjunto de casos de enfermedad de Parkinson familiar y dado que estas mutaciones aumentan la probabilidad de la  $\alpha$ -sinucleína para agregar y formar cuerpos de Lewy, se ha propuesto que la  $\alpha$ -sinucleína agregada está directamente implicada en la etiología y progresión de la enfermedad (Polymeropoulos et al., Science 276:1197-1199, 1997; Papadimitriou et al., Neurology 52:651-654, 1999). Los estudios estructurales han revelado que los cuerpos de Lewy intracelulares contienen una gran proporción de proteínas mal plegadas con un elevado grado de estructura secundaria en lámina  $\beta$  plegada. Estos estudios se realizaron para determinar la eficacia de los compuestos de ensayo en la inhibición/rotura de los agregados de  $\alpha$ -sinucleína asociados con la enfermedad de Parkinson.  
55  
60

Por tanto, para analizar el potencial terapéutico de los compuestos se usaron dos ensayos basados en células. En ambos ensayos, se usa rotenona para inducir estrés oxidativo mitocondrial y agregación de  $\alpha$ -sinucleína. El primer ensayo usa la unión del pigmento fluorescente tioflavina S a estructuras con un contenido elevado de lámina  $\beta$  que  
65

- incluye fibrillas y agregados de  $\alpha$ -sinucleína. Por tanto, la evaluación cuantitativa de la extensión de la tinción positiva a tioflavina S de las células fijadas se usa para analizar la capacidad de los compuestos para disminuir la cantidad de agregados de  $\alpha$ -sinucleína. En el segundo ensayo se evalúa la viabilidad celular usando el ensayo de citotoxicidad XTT que depende de las mitocondrias funcionales, intactas en células vivas. Por tanto, el ensayo de citotoxicidad XTT se usa para analizar la capacidad de los compuestos para mejorar la toxicidad mitocondrial y la pérdida resultante de viabilidad asociada con la acumulación de agregados de  $\alpha$ -sinucleína. Dicho de otro modo, el ensayo de citotoxicidad XTT se usa para calibrar la eficacia neuroprotectora de los compuestos. Estos estudios se presentan en los ejemplos siguientes.
- Para llevar a cabo estos estudios se usó un modelo de cultivo celular en el que se induce experimentalmente la agregación de  $\alpha$ -sinucleína humana. Se obtuvieron células de neuroblastoma humano BE-M17 transfectadas de forma estable con  $\alpha$ -sinucleína humana mutante A53T. Los reactivos de cultivos celulares se obtuvieron de Gibco/Invitrogen y las células se cultivaron en medio OPTIMEM suplementado con 10% de FBS, Penicilina (100 unidades/ml), estreptomycin (100  $\mu$ g/ml) y 500  $\mu$ g/ml de G418 como se ha descrito anteriormente (Ostrerova-Golts et al., J. Neurosci., 20:6048-6054, 2000)
- La tioflavina S se usa habitualmente para detectar estructuras que contienen amiloide in situ, incluyendo en tejido cerebral (Vallet et al., Acta Neuropathol., 83:170-178, 1992) y células cultivadas (Ostrerova-Golts et al., J. Neurosci., 20:6048-6054, 2000), mientras que la tioflavina T a menudo se usa como reactivo *in vitro* para analizar la agregación de proteínas amiloides solubles en fibrillas enriquecidas en estructuras plegadas en lámina  $\beta$  (LeVine III, Prot. Sci., 2:404-410, 1993). Por tanto, se usó histoquímica de tioflavina S en las células cultivadas para detectar agregados que contienen un grado elevado de estructuras plegadas en  $\beta$  formadas en respuesta a agentes inductores de estrés oxidativo (en este caso rotenona), como se ha descrito previamente, con modificaciones pequeñas (Ostrerova-Golts et al., J. Neurosci., 20:6048-6054, 2000). En resumen, para estos estudios se cultivaron las células en cámaras de portaobjetos recubiertas con poli-D-lisina a aproximadamente  $3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Tras 24 horas, las células se trataron con rotenona 500 nM, 1  $\mu$ M o 5  $\mu$ M (Sigma) o vehículo (0,05% de DMSO) como se ha indicado. Inmediatamente después de la adición de rotenona (o vehículo), los compuestos se añadieron a la concentración indicada o se añadieron solo medios de cultivo celular (sin compuesto) en presencia de rotenona. Tratamientos idénticos se repitieron tras 48 horas. Tras 48 horas adicionales, las células se fijaron durante 25 minutos en paraformaldehído al 3%. Tras un lavado con PBS, las células se incubaron con 0,015% de tioflavina S en 50% de etanol durante 25 minutos, se lavaron dos veces durante cuatro minutos en 50% de etanol y dos veces durante cinco minutos en agua desionizada y después se montaron usando un montante de base acuosa diseñado para la protección contra el fotoblanqueo. Los agregados que se unen a tioflavina S se detectaron con un microscopio de fluorescencia usando un conjunto de filtros High Q FITC (480 a 535 nm de ancho de banda) y una lente de objetivo 20X a menos que se indique lo contrario. Se seleccionaron entre 8 y 16 imágenes representativas por afección, se realizaron imágenes y se procesaron por un experimentador enmascarado con respecto a las condiciones de tratamiento. Para evaluar la cantidad de agregados positivos a tioflavina S, se determinó el área total por campo cubierto por inclusiones positivas a tioflavina S. Para este fin, la fluorescencia de fondo que no superó el tamaño prefijado o el umbral de intensidad del píxel se eliminó usando el software Q-capture. La fluorescencia falsa no asociada con células se eliminó manualmente. A menos que se indique lo contrario, los datos representan la media  $\pm$  EEM de los grupos. Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism (GraphPad Inc). Las diferencias entre las medias (dos muestras) se evaluaron mediante la prueba t de Student. Las diferencias entre múltiples medias se evaluaron mediante ANOVA de un factor, seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey.
- Para validar la capacidad del ensayo para detectar cuantitativamente los agregados que se unen a la tioflavina S, se llevó a cabo la tinción de las células BE-M17 que sobreexpresan la  $\alpha$ -sinucleína de A53T y los resultados revelaron un incremento dependiente de la dosis de rotenona en agregados positivos a tioflavina S respecto a las células control tratadas con vehículo (figura 9-AD). Las imágenes de mayor aumento obtenidas con un objetivo 40X indicaron que los agregados positivos a tioflavina S eran intracelulares y citoplasmáticos (figura 9D), de forma análoga a la acumulación de cuerpos de Lewy intracitoplásmicos que son características patológicas asociadas con la enfermedad de Parkinson. La cuantificación del área cubierta por los agregados positivos a tioflavina S estableció que 5  $\mu$ M de rotenona eran suficientes para inducir una agregación fuerte (figura 9E) y por tanto es una dosis eficaz para analizar la capacidad de los compuestos para atenuar la formación de estos agregados.
- Usando el protocolo descrito anteriormente se analizaron varios compuestos para determinar su capacidad para reducir, evitar o eliminar los agregados positivos a tioflavina S en células BE-M17 tratadas con rotenona que sobreexpresan  $\alpha$ -sinucleína A53T. Ejemplos de resultados obtenidos de los experimentos usando estos compuestos se describen más adelante.
- En las células tratadas con rotenona 1  $\mu$ M únicamente había una fuerte presencia de agregados positivos a tioflavina S (figura 10A). La adición de 500 ng/ml (figura 10B) o 1  $\mu$ g/ml (figura 10C) del compuesto control positivo redujo marcadamente la abundancia de estos agregados inducidos por rotenona en un 87% y un 91% respectivamente (como se muestra en la figura 10D) respecto a las células tratadas únicamente con rotenona. Por tanto, el compuesto control positivo es muy eficaz en la reducción, prevención y/o eliminación de agregados positivos a tioflavina-S en las células que expresan  $\alpha$ -sinucleína A53T humana.

La adición de 500 ng/ml hasta 2 µg/ml (figuras 11B-D) del compuesto 1 no redujo la abundancia de agregados inducidos por rotenona respecto a las células tratadas únicamente con rotenona (figuras 11D y E).

5 Como se muestra en la figura 12, en las células tratadas con rotenona 1 µM, la adición de 500 ng/ml y 2 µg/ml del compuesto 2 redujo la abundancia de agregados inducidos por rotenona en un 39-44% y en las células tratadas con rotenona 5 µM, la adición de 1 µg/ml del compuesto 2 redujo marcadamente la abundancia de agregados inducidos por rotenona en un 67% (figura 12E).

10 Las figuras 13 A-E muestran los efectos del compuesto 3. En las células tratadas con rotenona 1 µM, la adición de 500 ng/ml hasta 2 µg/ml del compuesto 3 redujo la abundancia de agregados inducidos por rotenona en un 41 al 63% respecto a las células tratadas solo con rotenona.

15 La adición de 500 ng/ml hasta 2 µg/ml del compuesto 4 no redujo la abundancia de agregados inducidos por rotenona respecto a las células tratadas únicamente con rotenona (figuras 14A-E).

Las figuras 15 A-E muestran los efectos del compuesto 5. En las células tratadas con rotenona 1 µM la adición de 1 - 2 µg/ml del compuesto 3 redujo la abundancia de agregados inducidos por rotenona en un 25 a 49% respecto a las células tratadas solo con rotenona.

20 La adición del compuesto 6 no tuvo efectos significativos sobre la abundancia de agregados inducidos por rotenona respecto a las células tratadas solo con rotenona (figuras 16A-E).

25 La adición de 500 ng/ml y 2 µg/ml del compuesto 7 redujo marcadamente la abundancia de agregados inducidos por rotenona en un 60 y 74% (respectivamente) respecto a las células tratadas solo con rotenona 1 µM. En las células tratadas con rotenona 5 µM la adición de 500 ng/ml y 2 µg/ml del compuesto 7 redujo la abundancia de agregados inducidos por rotenona en un 31 y 67% (respectivamente) (figuras 17A-E).

30 Las figuras 18 A-E muestran los efectos del compuesto 8. En las células tratadas con rotenona 1 µM la adición de 1 - 2 µg/ml del compuesto 8 redujo la abundancia de agregados inducidos por rotenona en un 56% respecto a las células tratadas solo con rotenona. En las células tratadas con rotenona 5 µM, la adición de 1 o 2 µg/ml del compuesto 8 redujo la abundancia de agregados inducidos por rotenona en un 48 y 38% (respectivamente).

35 La adición de 500 ng/ml hasta 2 µg/ml del compuesto 9 redujo marcadamente la abundancia de agregados inducidos por rotenona en un 19 a 60% respecto a las células tratadas solo con rotenona tratadas con rotenona 1 µM (figuras 19A-E). La adición del compuesto 9 no redujo la abundancia de agregados inducidos por rotenona en las células tratadas con rotenona 5 µM aunque la tinción basal fue inferior a la prevista a esta dosis de rotenona.

40 En conclusión, muchos de los compuestos analizados, especialmente los compuestos 2, 3, 5, 7, 8 y 9 redujeron con eficacia y potencia, evitaron, inhibieron y/o eliminaron la formación, el depósito y/o la acumulación de agregados de α-sinucleína en las células BE-M17 que expresan α-sinucleína A53T.

Ejemplo 9: Los compuestos 1-9 protegen contra la citotoxicidad inducida por rotenona

45 El ensayo de citotoxicidad XTT (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) se usó anteriormente para demostrar que la α-sinucleína A53T potencia la muerte celular en células BE-M17 a través de un mecanismo dependiente del estrés oxidativo (Ostrerova-Golts et al., J. Neurosci., 20:6048-6054, 2000). La investigación ha demostrado que la acumulación de agregados de α-sinucleína en los cuerpos de Lewy contribuye desde el punto de vista mecánico a la degradación de neuronas en la enfermedad de Parkinson y trastornos relacionados (Polymeropoulos et al., Science 276:2045-2047, 1997; Kruger et al., Nature Genet. 18:106-108, 1998). Aquí, el ensayo de citotoxicidad XTT (en lo sucesivo denominado ensayo XTT) se usó para medir la capacidad de los compuestos de ensayo para proteger frente a la citotoxicidad inducida por rotenona (capacidad neuroprotectora). El ensayo se basa en el principio de que la conversión de la sal de tetrazolio amarilla XTT para formar un pigmento de formazán naranja (que absorbe la luz alrededor de 490 nm) solo se produce en las células viables, metabólicamente activas. Por tanto, la absorbancia de la luz a 490 nm es proporcional a la viabilidad celular. Para este ensayo, las células se sembraron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos a 10<sup>4</sup> células por pocillo. Tras 24 horas, se trató a las células con rotenona 500 nM o 2 µM, o vehículo (0,05% de DMSO) como se ha indicado. Inmediatamente después de la adición de rotenona, los compuestos se añadieron a la concentración indicada. Como un control, se añadieron compuestos sin rotenona (solo vehículo, 0,05% de DMSO) y dieron como resultado ausencia de toxicidad a las dosis analizadas. Las células sin tratar recibieron solo medio de cultivo celular (sin compuesto, con o sin rotenona). Tras 40-44 horas de tratamiento se eliminó el medio acondicionado y se sustituyó con 100 µl de medio fresco y 50 µl DE la mezcla de marcaje de XTT de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. De cinco a seis horas después, la absorbancia a 490 nm se midió y se corrigió la absorbancia a la longitud de onda de referencia de 700 nm. El tratamiento con rotenona 500 nM y 2 µM normalmente disminuyó la viabilidad en 35-45% respecto a las células no tratadas sin rotenona (figura 20). La inhibición del porcentaje de la muerte celular se calculó como la proporción de la disminución de la absorbancia inducida por rotenona (viabilidad) que se eliminó mediante el tratamiento con el compuesto de ensayo.

El tratamiento con el compuesto control positivo a 10-25 µg/ml inhibió la pérdida de viabilidad inducida por rotenona en un 25-33% a ambas dosis de rotenona (figura 21).

5 El experimento se realizó con cada compuesto y los resultados se muestran en las figuras 22-30. Las figuras 22-30, panel A ilustran gráficamente la toxicidad del compuesto mientras que las figuras 22-30, panel B, muestran la inhibición por el compuesto de la pérdida de viabilidad inducida por rotenona medida a ambas dosis de rotenona.

10 El tratamiento con 10 µg/ml del compuesto 1 indica que este compuesto es no tóxico, mientras que dosis más altas mostraron alguna toxicidad (figura 22A). El tratamiento con 10 µg/ml del compuesto 1 inhibió la pérdida de viabilidad inducida por rotenona en aproximadamente un 18 al 27 % a ambas dosis de rotenona (figura 22B).

15 El tratamiento con 10-25 µg/ml del compuesto 2 indica que este compuesto es no tóxico, mientras que una dosis de más50 µg/ml mostró alguna toxicidad (figura 23A). El tratamiento con 25 µg/ml del compuesto 2 inhibió la pérdida de viabilidad inducida por rotenona en aproximadamente un 20 al 28 % a ambas dosis de rotenona (figura 23B).

20 El tratamiento con de 10 a 50 µg/ml del compuesto 3 indica que este compuesto es relativamente no tóxico a todas las dosis analizadas (figura 24A). El tratamiento con de 10 a 50 µg/ml del compuesto 3 inhibió la pérdida de viabilidad inducida por rotenona en aproximadamente un 17 al 28 % a ambas dosis de rotenona (figura 24B).

25 El tratamiento con 10 y 25 µg/ml del compuesto 4 indica que este compuesto es no tóxico, mientras que una dosis de más50 µg/ml mostró una toxicidad mínima (figura 25A). El tratamiento con 25 µg/ml del compuesto 4 fue particularmente eficaz e inhibió la pérdida de viabilidad inducida por rotenona en aproximadamente un 50% a la dosis de 500nM de rotenona, mientras que a 2 µM la inhibición observada fue de aproximadamente un 26% (figura 25B).

30 El tratamiento con 10 o 25 µg/ml del compuesto 5 indica que este compuesto es no tóxico, mientras que una dosis de más50 µg/ml mostró una toxicidad mínima (figura 26A). El tratamiento con el compuesto 5 no produjo inhibición alguna de la pérdida de viabilidad inducida por rotenona a ninguna de las dosis de rotenona (figura 26B).

35 El tratamiento con de 10 a 50 µg/ml del compuesto 6 indica que este compuesto es no tóxico a todas las dosis analizadas (figura 27A). El tratamiento con de 50 µg/ml del compuesto 6 a la dosis de 500nM rotenona inhibió la pérdida de viabilidad inducida por rotenona en aproximadamente un 10%, mientras que a rotenona 2 µM, la inhibición observada fue de aproximadamente 12-16% para todas las dosis del compuesto analizado (figura 27B).

40 El tratamiento con de 1 a 50 µg/ml del compuesto 7 indica que este compuesto es no tóxico, y dosis incluso mayores (100-150 µg/ml) mostraron solo una toxicidad muy mínima (figura 28A). El tratamiento con 50 µg/ml del compuesto 7 mostró la inhibición más alta de la pérdida de viabilidad inducida por rotenona en aproximadamente un 25% de la dosis de 500nM de rotenona (figura 28B).

45 El tratamiento con de 10 a 25 µg/ml del compuesto 8 indica que este compuesto es relativamente no tóxico (figura 29A). A pesar de alguna actividad minoritaria a 50 µg/ml, el compuesto proporciona aparentemente alguna protección contra la toxicidad fuerte de la rotenona. Esta conclusión está avalada por el análisis morfológico (no mostrado). El tratamiento con 50 µg/ml de compuesto 1 a rotenona 2 µM mostró inhibición de la pérdida de viabilidad inducida por rotenona en aproximadamente un 18% (figura 29B).

50 El tratamiento con de 10 a 25 µg/ml del compuesto 9 indica que este compuesto es relativamente no tóxico, mientras que la dosis más alta mostró alguna toxicidad (figura 30A). El tratamiento con el compuesto 9 no produjo inhibición apreciable de la pérdida de viabilidad inducida por rotenona a ninguna de las dosis de rotenona (figura 30B).

55 En conclusión, muchos de los compuestos analizados fueron eficaces en la inhibición de la citotoxicidad inducida por rotenona, lo que demuestra actividad neuroprotectora contra la toxicidad por α-sinucleína.

Ejemplo 10. Mejor funcionamiento motor de ratones transgénicos con α-sinucleína tratados con los compuestos 2 y 7

60 Para evaluar la potencial eficacia de los compuestos en un modelo de ratón relevante para la enfermedad de Parkinson, se usaron ratones transgénicos que sobreexpresan α-sinucleína humana silvestre sometida al control del promotor Thy-1 de ratón (Rockenstein E, et al., 2002. J Neurosci Res 68:568-578). Se ha demostrado que los ratones transgénicos que sobreexpresan α-sinucleína humana son modelos útiles para la enfermedad de Parkinson y por tanto un sistema adecuado para analizar los posibles agentes terapéuticos por una serie de razones, incluyendo las siguientes: (1) La presencia de agregados de α-sinucleína que son detectables mediante métodos tanto inmunohistoquímicos (tinción) como bioquímicos (transferencia de tipo Western). Estos agregados son similares a los cuerpos de Lewy (Inclusiones intracelulares compuestas principalmente por α-sinucleína) que son la característica patológica de la enfermedad de Parkinson (Rockenstein E, et al., 2002. J. Neurosci. Res. 68:568-578 y Hashimoto M, et al., 2003 Ann N Y Acad Sci 991:171-188). (2) Los ratones experimentan un déficit dopaminérgico en la vía nigroestriatal, como se indica por la pérdida de proyecciones neuronales inmunorreactivas a la tirosina

hidroxilasa en el núcleo estriado (Hashimoto M, et al., 2003 Ann N Y Acad Sci 991:171-188). Este déficit también se ve en pacientes humanos con EP. (3) Los ratones muestran déficit, incluyendo ralentización del movimiento, pérdida del equilibrio y de la coordinación y debilidad muscular en una prueba conductual dependiente de la función motora, tal como la prueba de la barra transversal (Fleming SM, et al., 2004 J Neurosci 24:9434-9440 y Fleming SM, et al., 2006 Neuroscience 142:1245-1253).

En pacientes humanos de EP se ve una disfunción motora similar. Para evaluar la potencial eficacia de los compuestos para mejorar la función motora o minimizar los déficits, se realizó la prueba de exposición a barra transversal con los ratones tratados con el compuesto o tratados con vehículo evaluados antes del tratamiento a 0 meses y de nuevo a los 3 y 6 meses de tratamiento. Si los compuestos eran eficaces, cabría esperar que los ratones administrados estos compuestos funcionarían mejor que los ratones tratados con vehículo a la misma edad y/o que el tratamiento con el compuesto de ensayo podría mejorar la disminución dependiente de la edad del funcionamiento en un grupo dado. Por ejemplo, si los compuestos de ensayo eran eficaces, podría esperarse que los ratones tratados con compuesto cruzaran la barra con más rapidez que los ratones tratados con vehículo. O cabría esperar la disminución de los deterioros dependientes de la edad en un grupo (por ejemplo el funcionamiento después del tratamiento podría ser similar al funcionamiento antes del tratamiento o incluso mejor, mientras que los ratones tratados con vehículo funcionarían progresivamente peor durante el mismo periodo de tiempo).

#### Prueba de la barra transversal

En la prueba de barra transversal, que es una medida del funcionamiento motor, se entrena a los ratones durante dos días, con cinco ensayos al día, a cruzar una barra de anchura decreciente (separada en cuatro segmentos) con salientes de apoyo unidos a lo largo de cada lado y que conducen a la jaula del animal. El tercer día, la prueba se hace más exigente al colocar una rejilla de malla sobre la superficie de la barra y dejar un espacio pequeño de aproximadamente 1 cm entre la rejilla y la superficie de la barra. A continuación, se graba a los animales en un periodo de cinco ensayos y un investigador enmascarado con respecto al tratamiento con fármacos registra el tiempo que requieren para cruzar, el número de pasos que dan y el número de resbalones (Fleming SM, et al., 2006. Neuroscience 142:1245-1253).

Los ratones transgénicos a los que se administra el compuesto 2 durante tres meses mostraron una marcada mejora del 49% (tiempo necesario para cruzar la barra) respecto a los ratones control tratados con vehículo y de edad equivalente (15 meses de edad) (figura 31). No obstante, tras seis meses de tratamiento, el funcionamiento fue similar al de los ratones tratados con vehículo a esta edad (figura 31). Tomados en conjunto, estos datos muestran que el compuesto 2 retrasa el inicio de los déficits de comportamiento en la prueba de barra transversal.

Los ratones transgénicos a los que se administra el compuesto 7 durante seis meses mostraron una marcada mejora del 35% (tiempo necesario para cruzar la barra) respecto a los ratones control tratados con vehículo y de edad equivalente (15 meses de edad) (figura 31). Además, tras únicamente tres meses de tratamiento con el compuesto 7, el funcionamiento mejoró un 39% respecto a los controles tratados con vehículo (figura 31). Tomados en conjunto, estos datos muestran que el tratamiento con el compuesto 7 previene la progresión dependiente de la edad de los déficits de comportamiento en la prueba de barra transversal.

#### Ejemplo 11: funcionamiento motor mejorado de ratones transgénicos con $\alpha$ -sinucleína tratados con el compuesto 7

Para evaluar la eficacia potencial de los compuestos en la prueba del poste se realizó la evaluación de los ratones tratados con compuesto y tratados con vehículo antes del tratamiento (a 0 meses) y de nuevo a los 3 y 6 meses de tratamiento. Los ratones transgénicos fueron los descritos en el Ejemplo 10 anterior y recibieron inyecciones i.p. diarias a 50 mg/kg/día. Para evaluar la potencial eficacia en la prueba de la barra, los ratones tratados con compuesto y tratados con vehículo se evaluaron a las 5-6 semanas de tratamiento. Si los compuestos eran eficaces, cabría esperar que los ratones a los que se ha administrado el compuesto de ensayo funcionarían mejor que los ratones tratados con vehículo a la misma edad y/o que el tratamiento con el compuesto de ensayo podría mejorar los déficits (mejorar el funcionamiento) en el tiempo dentro de un grupo dado. Por ejemplo, si los compuestos de ensayo eran eficaces, podría esperarse que los ratones tratados con compuesto cruzaran la barra con más rapidez que los ratones tratados con vehículo. O cabría esperar una mejora de los deterioros en un grupo dado en el tiempo (por ejemplo, el funcionamiento después del tratamiento con el compuesto podría ser mejor que antes del tratamiento con el compuesto, mientras que los ratones tratados con vehículo funcionaban de un modo similar, o progresivamente peor, durante el mismo periodo de tiempo).

#### A) Prueba del poste

En la prueba del poste, que es una medida del funcionamiento motor, se entrena a los ratones el día uno (en 2 ensayos) a descender un poste de madera después de colocarlos con la cabeza arriba en la parte superior del poste. El día dos, se probó a los ratones en cinco ensayos y un investigador enmascarado con respecto al tratamiento farmacológico registró la latencia para volverse mirando hacia abajo (tiempo de giro), el tiempo necesario para descender (tiempo del viaje) y el tiempo total en el poste.

Los ratones transgénicos a los que se administró el compuesto 7 durante 3 meses (n=11) (15 meses de edad) mostraron una tendencia hacia una mejora en el funcionamiento de la prueba del poste (menor tiempo de giro) respecto a su funcionamiento antes del tratamiento. Tras 6 meses de tratamiento (n= 11) con el compuesto 7, los ratones (18 meses de edad) mostraron una mejora significativa del 41% en la prueba del poste respecto a su funcionamiento antes del tratamiento y su funcionamiento fue similar al de ratones no transgénicos de 16 meses de edad (figura 32). Por el contrario, el funcionamiento de los ratones tratados con vehículo a los 3 y 6 meses de tratamiento fue similar a su funcionamiento antes del tratamiento. Estos resultados muestran que el compuesto 7 mejora el funcionamiento en la prueba del poste.

#### 10 B) Prueba de la barra transversal en ratones transgénicos más jóvenes

Para medir el funcionamiento motor en ratones transgénicos con  $\alpha$ -sinucleína más jóvenes (a los 3 meses de edad) tratados durante 6 semanas con el compuesto 7 (o con el vehículo control) (n= 8 por grupo) se usó una prueba de la barra transversal ligeramente modificada (experimento de 2 días en lugar de 3 días). Se entrena a los ratones el día uno, en seis ensayos, a cruzar una barra con estrechamiento creciente (separada en cuatro segmentos) con salientes de apoyo fijados a lo largo de cada lado y que conduce a la jaula del animal. El segundo día, la prueba se hace más exigente al colocar una rejilla de malla sobre la superficie de la barra y dejar un espacio pequeño de aproximadamente 1 cm entre la rejilla y la superficie de la barra. A continuación se graba a los ratones en un periodo de cinco ensayos y un investigador enmascarado con respecto al tratamiento con el fármaco registra el tiempo que requieren para cruzar, el número de pasos que dan y el número de resbalones (Fleming SM, et al., 2006. Neuroscience 142:1245-1253).

Los ratones transgénicos a los que se administra el compuesto 7 durante seis semanas mostraron una mejora significativa del 36% (tiempo necesario para cruzar la barra) respecto a los ratones control tratados con vehículo y de edad equivalente (4 – 5 meses de edad (figura 33). No se produjo ningún efecto significativo sobre el número de pasos dados o sobre los resbalones por paso (tasa de error), Tomados en conjunto, estos resultados indican que el compuesto 7 mejora el funcionamiento en la prueba de barra transversal.

#### 30 Ejemplo 12. Reducción de la inmunotinción intraneuronal positiva a $\alpha$ -sinucleína en cerebros de ratones transgénicos con $\alpha$ -sinucleína

Se realizó inmunotinción de la  $\alpha$ -sinucleína y el análisis de imagen para determinar si el tratamiento con el compuesto 7 reduce los niveles de  $\alpha$ -sinucleína en ratones transgénicos con  $\alpha$ -sinucleína envejecidos (descrito anteriormente). Tras el bloqueo de la unión inespecífica de los anticuerpos, secciones de cerebro de ratón se incubaron durante la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal de conejo producido contra la  $\alpha$ -sinucleína humana (Chemicon AB5038P; dilución a 1:500). El día 2, después de lavar abundantemente con solución salina tamponada con fosfato (PBS), las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado (anti-conejo de cabra, VectorLabs) a una dilución de 1:200 durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar abundantemente con PBS, las secciones se incubaron con el complejo avidina-biotina (ABC) de Vector labs durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron después en PBS tres veces y se hicieron reaccionar durante 4 minutos en Vector DAB (de acuerdo con las recomendaciones del fabricante). La reacción DAB se inactivó mediante dos lavados con tampón Tris. Las secciones se montaron sobre portaobjetos cargados y se secaron durante la noche. Los portaobjetos se cubrieron con cubreobjetos y se obtuvieron imágenes.

45 Para el análisis y cuantificación de las imágenes se digitalizaron tres imágenes de la corteza equilibradas anatómicamente entre ratones (aumento del 100) con una cámara digital Q-Image y el software Q-Capture. Cada imagen se procesó usando el software Image-Pro. A cada imagen se aplicó un umbral predeterminado para la segmentación del color en los píxeles y el área de objeto mínima. Los artefactos de imagen se eliminaron y los datos se exportaron y procesaron para la determinación del porcentaje (%) de área ocupado por objetos inmunomarcados positivos para  $\alpha$ -sinucleína.

Se trató a los ratones durante 6 meses con inyecciones i.p. diarias de 50 mg/kg/día desde los 12 meses de edad a los 18 meses de edad. La figura 34 muestra que los ratones tratados con el compuesto 7 (paneles C-D) exhiben significativamente menos  $\alpha$ -sinucleína humana intraneuronal en la corteza frontal en comparación con los ratones tratados con vehículo (paneles A-B). Los cerebros de ratones salvajes no transgénicos están desprovistos de tinción de la  $\alpha$ -sinucleína humana y se muestran como control de la especificidad del anticuerpo para la  $\alpha$ -sinucleína humana derivada de transgén (E y F). El análisis y la cuantificación de imágenes revelan que el tratamiento con el compuesto 7 produce una reducción significativa del 81% de objetos positivos para  $\alpha$ -sinucleína.

60 El tratamiento con el compuesto 7 durante 6 meses reduce espectacularmente los niveles de  $\alpha$ -sinucleína en la corteza frontal de los ratones transgénicos con  $\alpha$ -sinucleína humana respecto a los controles tratados con vehículo. Estos datos se correlacionan bien con los datos de los autores que muestran un funcionamiento motor mejor en ratones transgénicos tratados durante 6 meses con el compuesto de la presente invención.

#### 65 Ejemplo 13. Reducción de los niveles de $\alpha$ -sinucleína en cerebro de ratón transgénico con $\alpha$ -sinucleína

Se usó electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE) y transferencia de tipo Western para analizar la concentración de  $\alpha$ -sinucleína en fracciones tanto particuladas (de membrana) como citosólicas de regiones cerebrales anteriores de ratones transgénicos de 18 meses y de 4-5 meses (descritos anteriormente) y no transgénicos. Ambas fracciones contienen reservorios potencialmente patogénicos de agregados de  $\alpha$ -sinucleína que en su mayoría se reducen a monómeros en condiciones reductoras de SDS-PAGE.

Tras el sacrificio de ratones transgénicos con  $\alpha$ -sinucleína tras 6 meses de tratamiento con el compuesto (cuando los animales tenían 18 meses de edad) o 6 semanas de tratamiento con el compuesto (cuando los animales tenían 4-5 meses de edad), se extrajeron los cerebros y se biseccionaron a lo largo de la línea media (régimen de tratamiento como se ha descrito anteriormente). Los controles tratados con vehículo a ambas edades se procesaron de un modo idéntico. El hemisferio cerebral derecho se biseccionó coronalmente para dar una porción anterior y posterior. Los hemisferios cerebrales diseccionados se ultracongelaron en baño de hielo seco/etanol y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Los cerebros se sometieron a fraccionamiento bioquímico para separar la fracción citosólica soluble de la particulada insoluble (membrana). Brevemente, los cerebros se homogeneizaron en 9 volúmenes de tampón HEPES (sin detergente) suplementados con inhibidores de la proteasa o la fosfatasa (Calbiochem). La homogeneización suave se facilitó con una mano de mortero de teflón en un homogeneizador de vidrio (Kontes #19) para minimizar la rotura de las interacciones membrana/ $\alpha$ -sinucleína durante la lisis. Todo el lisado celular se centrifugó después a velocidad baja hasta sedimentar las células sin romper (P1) y los orgánulos (tales como los núcleos). Después el sobrenadante (S1) se centrifugó a  $225.000 \times g$  durante 1 hora a  $4^{\circ}\text{C}$  con el fin de sedimentar las membranas (P2) (esta fracción puede incluir orgánulos tales como las mitocondrias). El sobrenadante (S2) fue la fracción "citosólica". El sedimento (P2) se resuspendió pipeteando en 2,5 volúmenes de tampón de homogeneización, por sonicación en hielo durante  $5 \times 1$  segundo y se denomina la fracción "particulada" o "de membrana". La concentración total de las proteínas se determinó mediante el ensayo MicroBCA (Pierce). Cantidades iguales de proteína por carril ( $25 \mu\text{g}$ ) se pasaron por SDS-PAGE (Bio-Rad Criterion geles de 4-12% Bis-Tris, 26 pocillos por gel) y se transfirieron a nitrocelulosa (BioRad). La eficiencia de transferencia consistente a través de la transferencia se confirmó mediante tinción reversible con el pigmento Ponceau S y se obtuvo la imagen en un escáner de lecho plano. Las transferencias desteñidas se bloquearon y se sondaron con anticuerpos policlonales de conejo purificados AB5038P (Chemicon), seguidos de anticuerpos secundarios IgG/HRP anti-conejo (Abcam) y el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce) para detectar  $\alpha$ -sinucleína. La especificidad del anticuerpo AB5038P por  $\alpha$ -sinucleína en transferencias de tipo western se confirmó mediante preabsorción del anticuerpo con un exceso 50X molar de  $\alpha$ -sinucleína humana purificada, que anuló todas las señales a excepción de una banda que migraba a 25 kDa (en el presente documento indicaba la banda inespecífica de 25 kDa).

Se trató a los animales durante 6 meses con los compuestos con inyecciones i.p. diarias de 50 mg/kg/día desde los 12 meses de edad a los 18 meses de edad. El compuesto 7 redujo significativamente los niveles de  $\alpha$ -sinucleína en un 69% en la fracción particulada (figura 35) y redujo significativamente los niveles de  $\alpha$ -sinucleína en un 73% en la fracción citosólica (figura 36) respecto a los ratones tratados con vehículo. Dado que estas cohortes son de sexo mixto (normalmente hay 2 machos por grupo) y dado que en ocasiones se ve variabilidad relacionada con el sexo en los niveles de  $\alpha$ -sinucleína, los autores analizaron las hembras por separado. Es importante el hecho de que el compuesto redujo significativamente los niveles de  $\alpha$ -sinucleína en un 58% en la fracción particulada (figura 35) y un 48% en la fracción citosólica (figura 36) cuando solo se analizaron las hembras.

Para analizar si los compuestos darían como resultado una reducción similar de la  $\alpha$ -sinucleína en animales más jóvenes, tratados durante menos tiempo, se administraron los compuestos (o el vehículo) durante 6 semanas de inyecciones i.p. al día, solo en ratones hembra, a 50 mg/kg/día de aproximadamente 3 meses de edad a aproximadamente 4-5 meses de edad. Los tratamientos con el compuesto 7 redujeron significativamente los niveles de  $\alpha$ -sinucleína en un 45% en la fracción particulada (figura 37) y redujeron significativamente los niveles de  $\alpha$ -sinucleína en un 71% en la fracción citosólica (figura 38) respecto a los ratones tratados con vehículo. Se observaron reducciones similares en los niveles de  $\alpha$ -sinucleína con el tratamiento con el compuesto 7 (respecto a los controles tratados con vehículo) cuando se analizó la porción posterior del cerebro (menos el cerebelo) (datos no mostrados).

Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que rompiendo o reduciendo la agregación de  $\alpha$ -sinucleína el tratamiento con el compuesto puede producir formas más solubles de  $\alpha$ -sinucleína (incluyendo monómeros) que son mejores sustratos para depuración.

Ejemplo 14. Composiciones del compuesto de la presente invención

El compuesto de la presente invención, como se ha mencionado anteriormente, se administra deseablemente en forma de composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas adecuadas y el método de prepararlas se conocen bien por los expertos en la técnica y se describen en tratados tales como Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, ed., 20<sup>a</sup> edición, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

Composiciones representativas son las siguientes:

Formulación en comprimido oral

Una formulación en comprimido oral de un compuesto de la presente invención se prepara como sigue:

	% peso/peso
Compuesto de esta invención	10,0
Estearato de magnesio	0,5
Almidón	2,0
Hidroxipropilmetilcelulosa	1,0
Celulosa microcristalina	86,5

- 5 Los ingredientes se mezclan hasta homogeneidad, después se granulan con la ayuda de agua y los granulados se secan. El granulado desecado se comprime en comprimidos de tamaño tal que proporcionan una dosis adecuada del compuesto. El comprimido se recubre opcionalmente aplicando una suspensión de un agente formador de película (por ejemplo hidroxipropilmetilcelulosa), un pigmento (por ejemplo dióxido de titanio) y un plastificante (por ejemplo ftalato de dietilo) y secando la película mediante evaporación del disolvente. El recubrimiento de película puede comprender, por ejemplo, del 2-6% del peso del comprimido.

Formulación en cápsula oral

- 15 El granulado de la sección anterior de este ejemplo se introduce en cápsulas de gelatina dura con un tamaño adecuado para la dosis prevista. La cápsula tiene bandas para el sellado, si se desea.

Formulación en gel blando

- 20 Se prepara una formulación en gel blando como sigue:

	% peso/peso
Compuesto de esta invención	20,0
Polietilenglicol 400	80,0

- 25 El compuesto se disuelve o se dispersa en el polietilenglicol y se añade un agente espesante si se requiere. Entonces una cantidad de la formulación suficiente para proporcionar la dosis deseada del compuesto se introduce en geles blandos.

Formulación parenteral

- 30 Se prepara una formulación parenteral como sigue:

	% peso/peso
Compuesto de esta invención	1,0
Solución salina normal	99,0

El compuesto se disuelve en la solución salina y la solución resultante se esteriliza y se carga en viales, ampollas y jeringuillas precargadas, según sea adecuado.

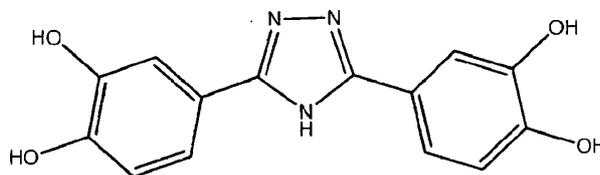
35 Formulación oral de liberación controlada

Puede prepararse una formulación de liberación sostenida mediante el método de la patente de EEUU N.º: 4.710.383, como sigue:

- 40 Se recubre 1 kg de un compuesto de esta invención en un recubridor de polvos Uni-Glatt modificado con etilcelulosa Dow de tipo 10. La solución de pulverización es una solución al 8% de la etilcelulosa en acetona al 90% a etanol al 10%. Se añade aceite de ricino como plastificante en una cantidad igual al 20% de la etilcelulosa presente. Las condiciones de pulverización son las siguientes: 1) velocidad, 1 litro/hora; 2) aleta, 10-15%; 3) temperatura de entrada, 50°C; 4) temperatura de salida, 30°C; 5) porcentaje de recubrimiento, 17%. El compuesto recubierto se
- 45 tamiza hasta unos tamaños de partícula de entre 74 y 210 micrometros. Se tiene cuidado para asegurar un buen mezclado de partículas de diferentes tamaños dentro de este intervalo. Se mezclan 400 mg de las partículas recubiertas con 100 mg de almidón y la mezcla se comprime en una prensa manual hasta 1,5 toneladas para producir un comprimido de liberación controlada de 500 mg.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula



5

y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

2. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la reivindicación 1 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10

3. El compuesto de la reivindicación 1 para su uso en la inhibición de la formación, el depósito, la acumulación o la persistencia de agregados de A $\beta$ -amiloide o de  $\alpha$ -sinucleína.

15

4. El compuesto de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad  $\beta$ -amiloide o una sinucleinopatía en un mamífero que la sufre.

5. El compuesto para uso de la reivindicación 4 en el que la enfermedad de  $\beta$ -amiloide se selecciona del grupo de enfermedades que consisten en enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis del tipo holandés y angiopatía  $\beta$ -amiloide cerebral.

20

6. El compuesto para uso de la reivindicación 4 en el que la enfermedad  $\beta$ -amiloide es enfermedad de Alzheimer.

7. El compuesto para uso de la reivindicación 4 en el que la sinucleinopatía se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad de Parkinson familiar, enfermedad de cuerpos de Lewy, la variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia de sistemas múltiples y el complejo Parkinsonismo-demencia de Guam.

25

8. El compuesto para uso de la reivindicación 4 en el que la sinucleinopatía es enfermedad de Parkinson.

30

9. El compuesto de la reivindicación 1 para su uso en la mejora del funcionamiento motor en un mamífero que sufre de una sinucleinopatía.

10. El compuesto de la reivindicación 1 para su uso en la detención de la progresión de déficits motores en un mamífero que sufre de enfermedad de Parkinson.

35

11. Uso del compuesto de la reivindicación 1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad  $\beta$ -amiloide o una sinucleinopatía en un mamífero que sufre de la misma.

12. El uso de la reivindicación 11 en el que la enfermedad  $\beta$ -amiloide se selecciona del grupo de enfermedades que consisten en enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis del tipo holandés y angiopatía  $\beta$ -amiloide cerebral.

40

13. El uso de la reivindicación 11 en el que la enfermedad  $\beta$ -amiloide es enfermedad de Alzheimer.

45

14. El uso de la reivindicación 11 en el que la sinucleinopatía se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad de Parkinson familiar, enfermedad de cuerpos de Lewy, la variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia de sistemas múltiples y el complejo Parkinsonismo-demencia de Guam.

50

15. El uso de la reivindicación 11, en el que la sinucleinopatía es enfermedad de Parkinson.

16. El uso del compuesto de la reivindicación 1 en la fabricación de un medicamento para su uso en la mejora del funcionamiento motor en un mamífero que sufre de una sinucleinopatía.

55

17. Uso compuesto de la reivindicación 1 en la fabricación de un medicamento para uso en la detención de la progresión de déficits motores en un mamífero que sufre de enfermedad de Parkinson.

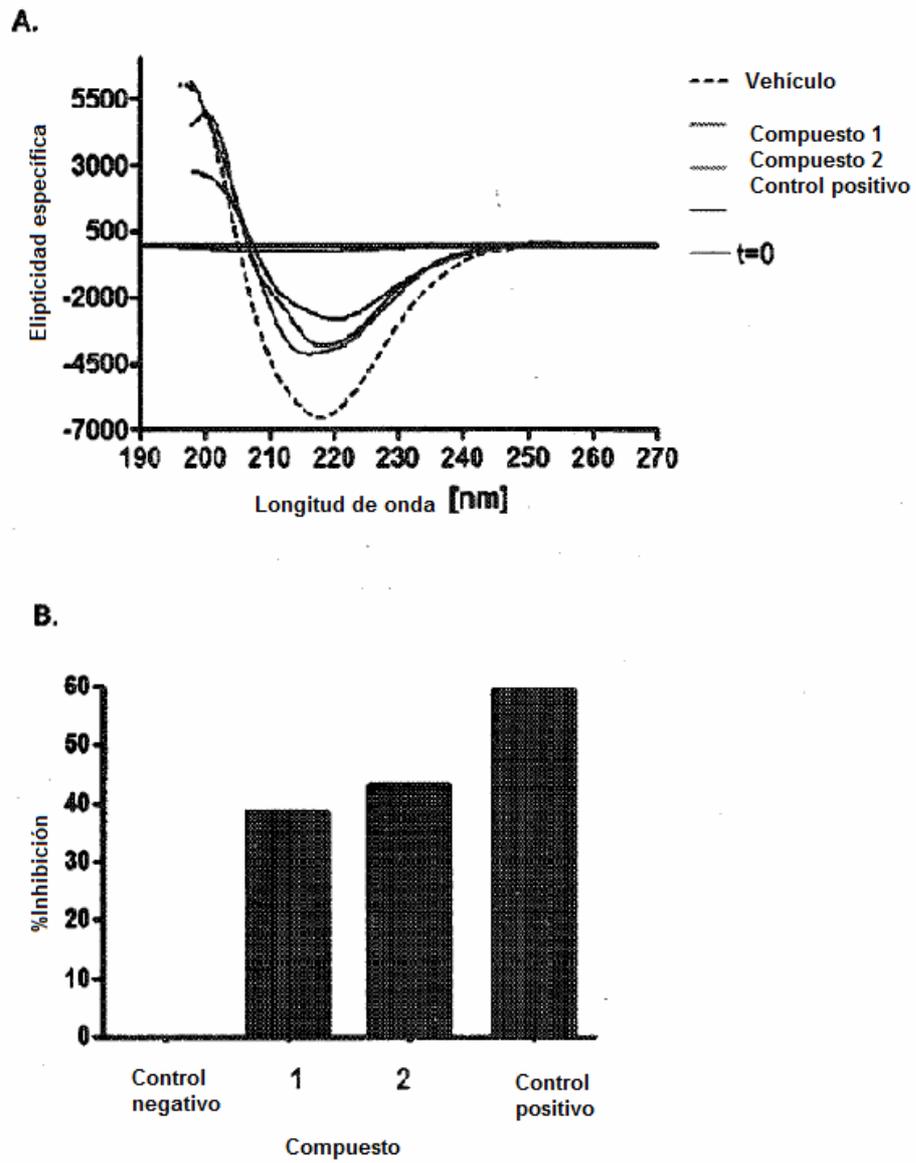


Figura 1

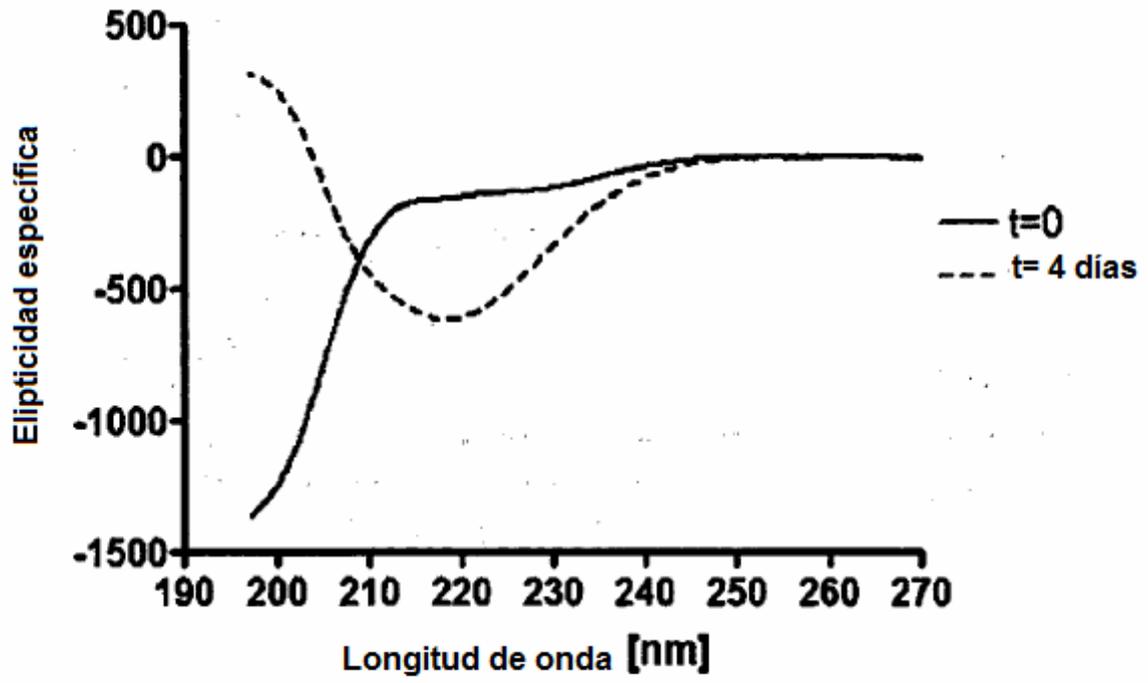


Figura 2

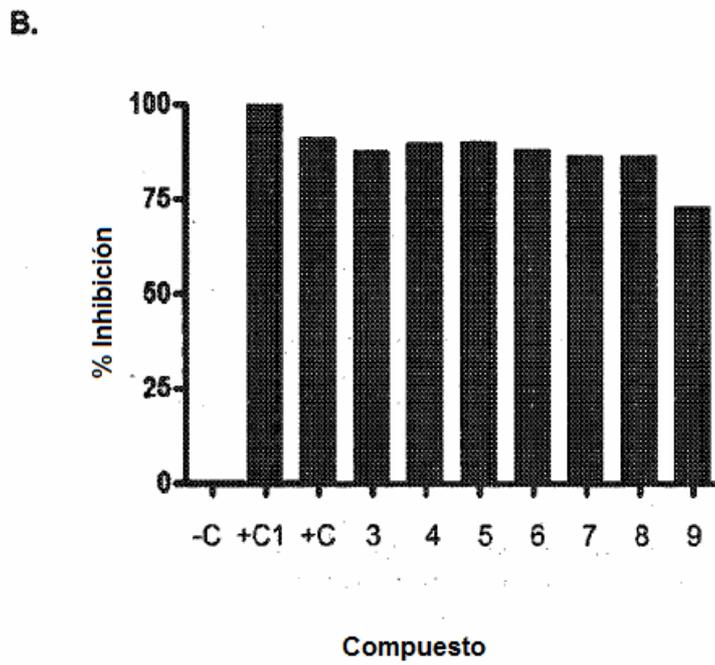
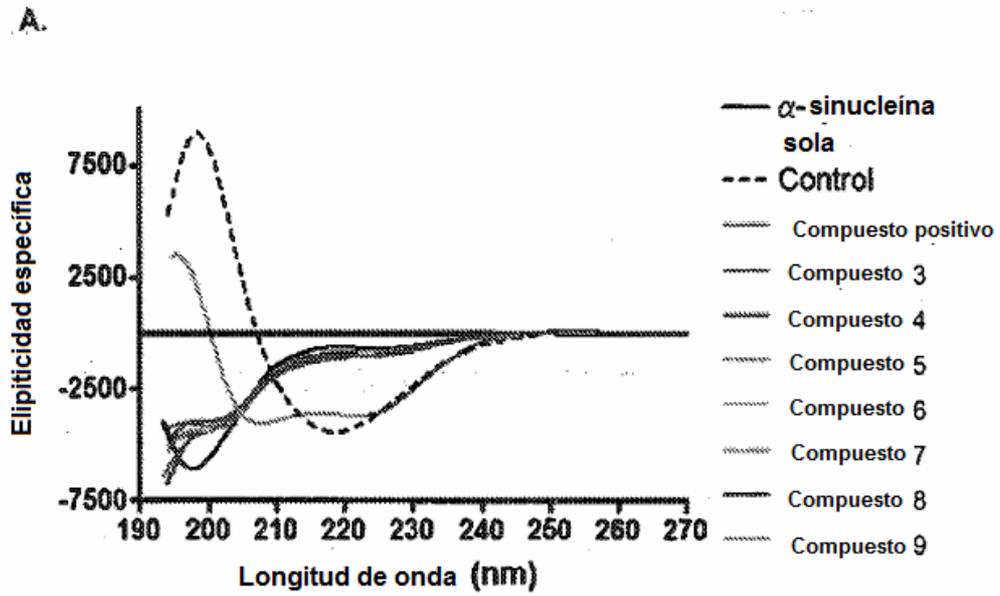
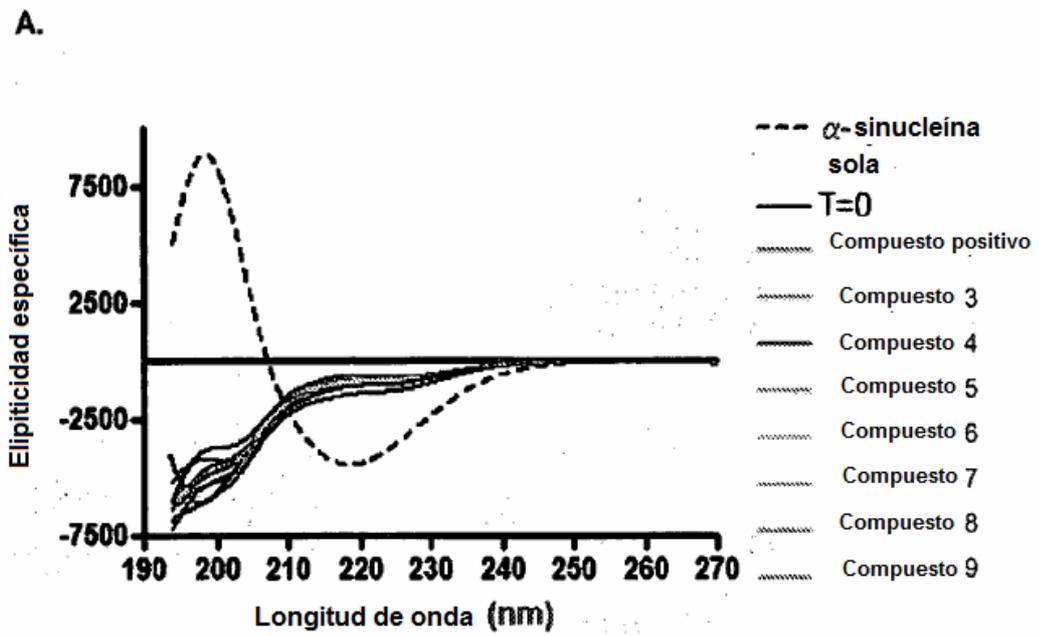


Figura 3



**B.**

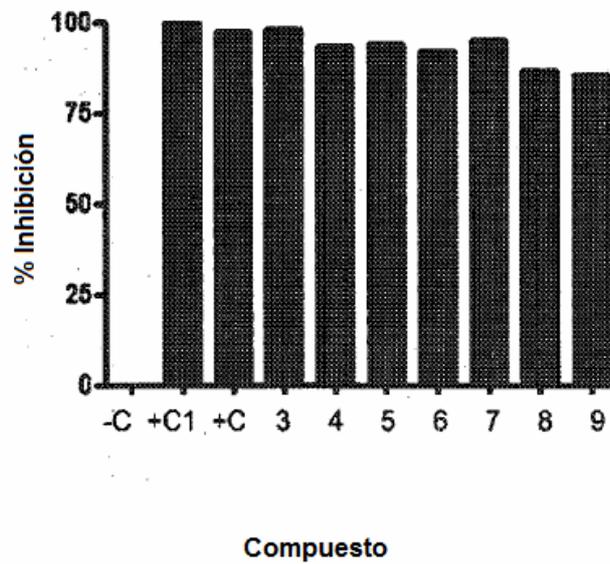


Figura 4

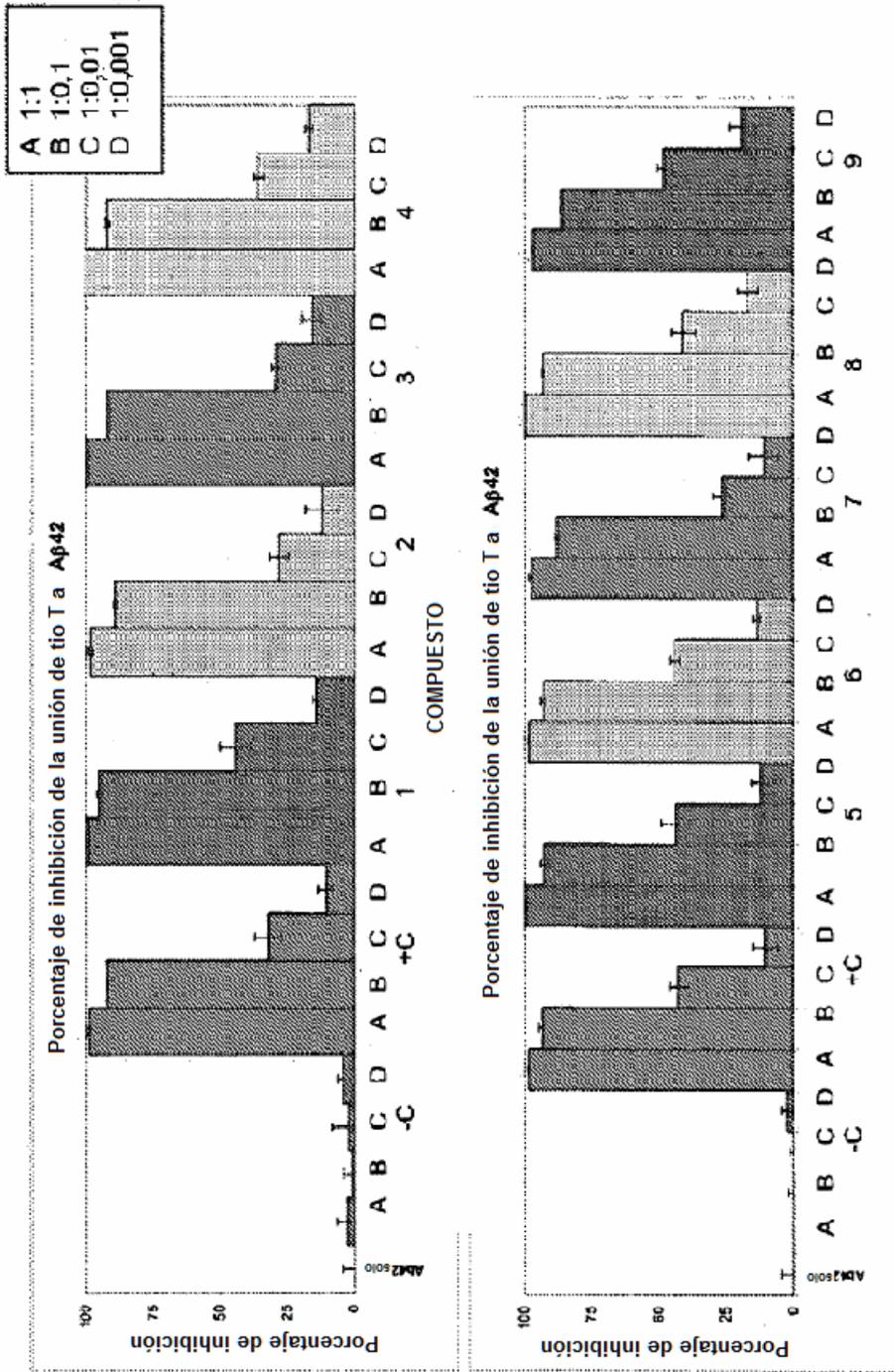


Figura 5

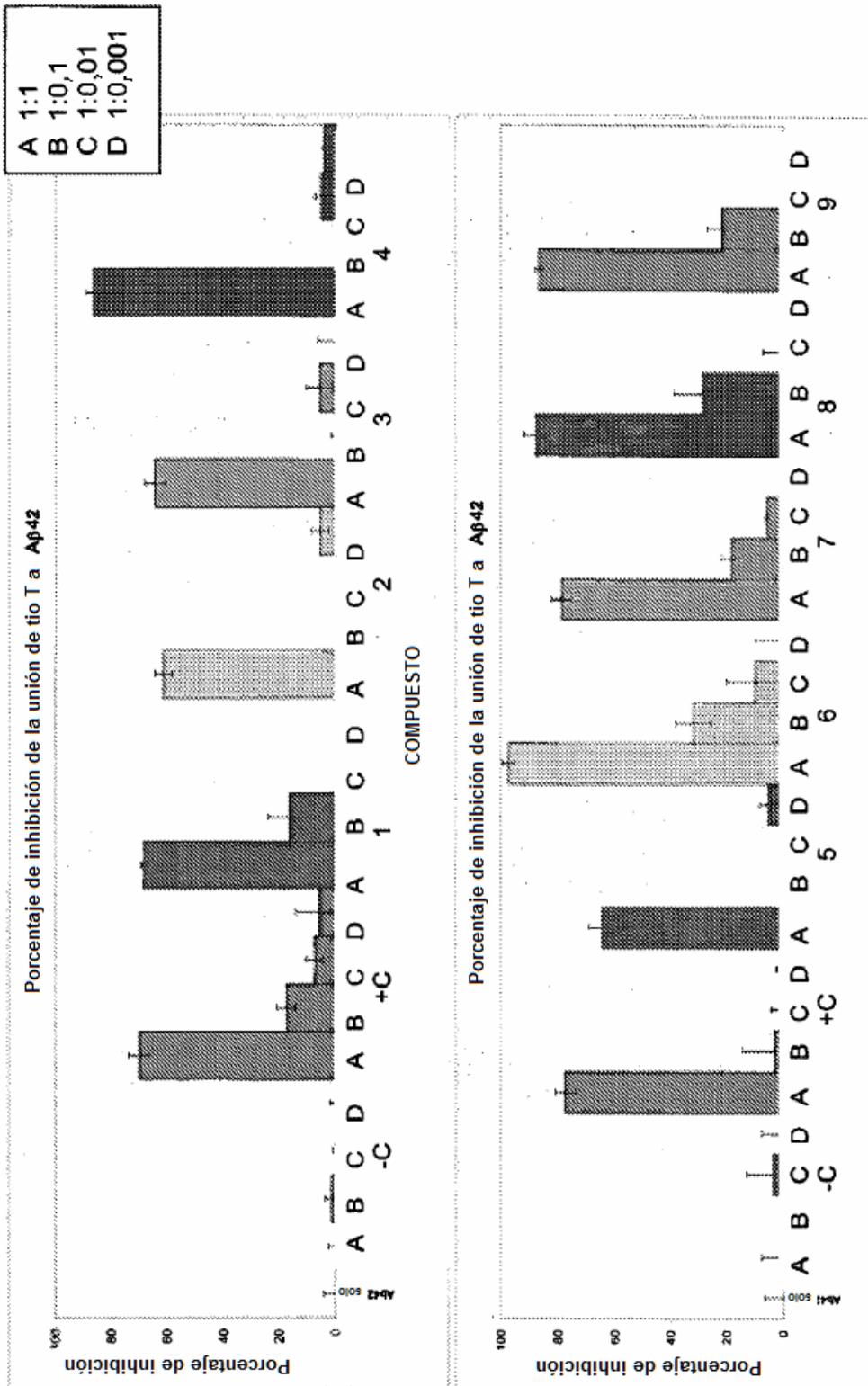


Figura 6



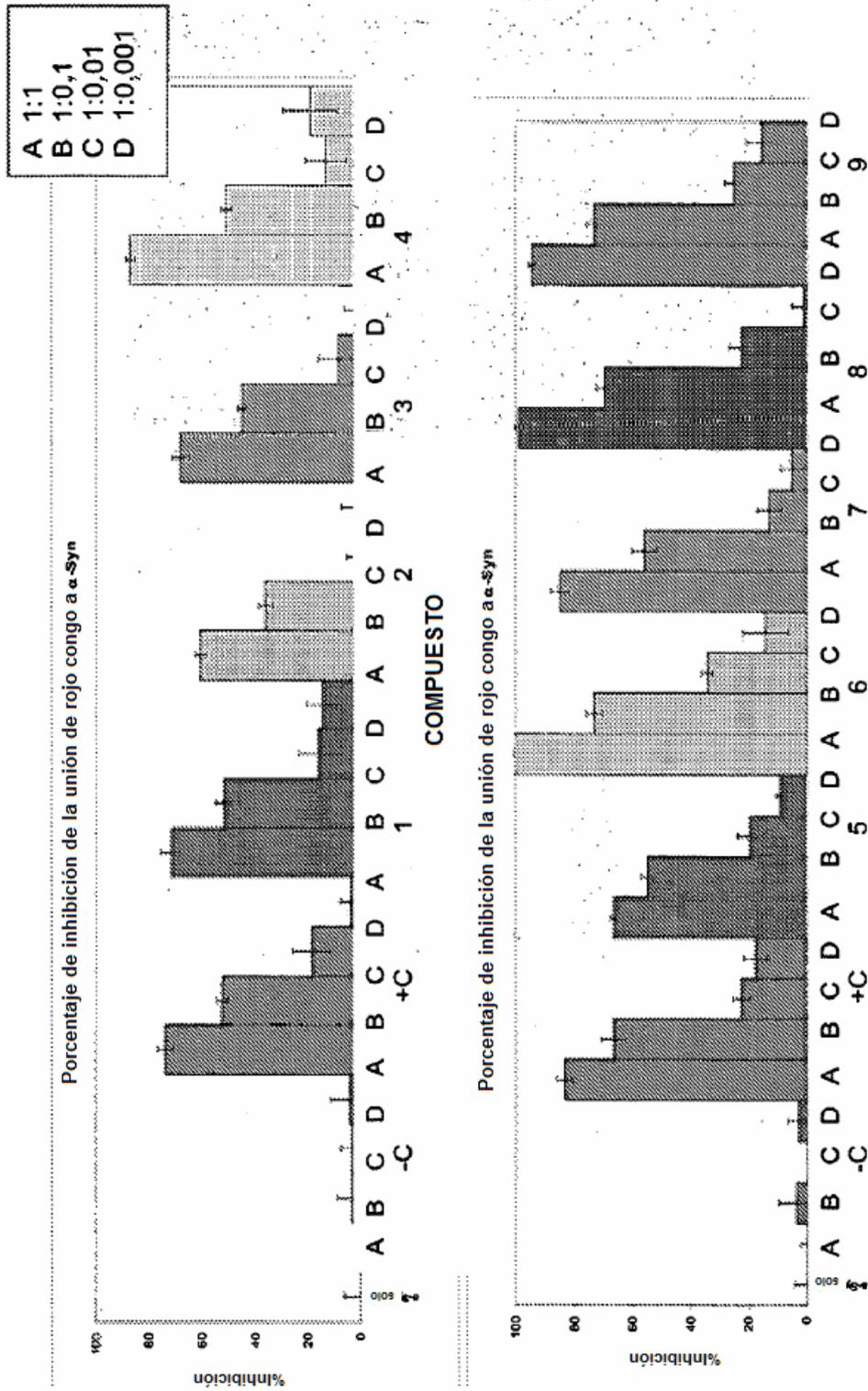


Figura 8

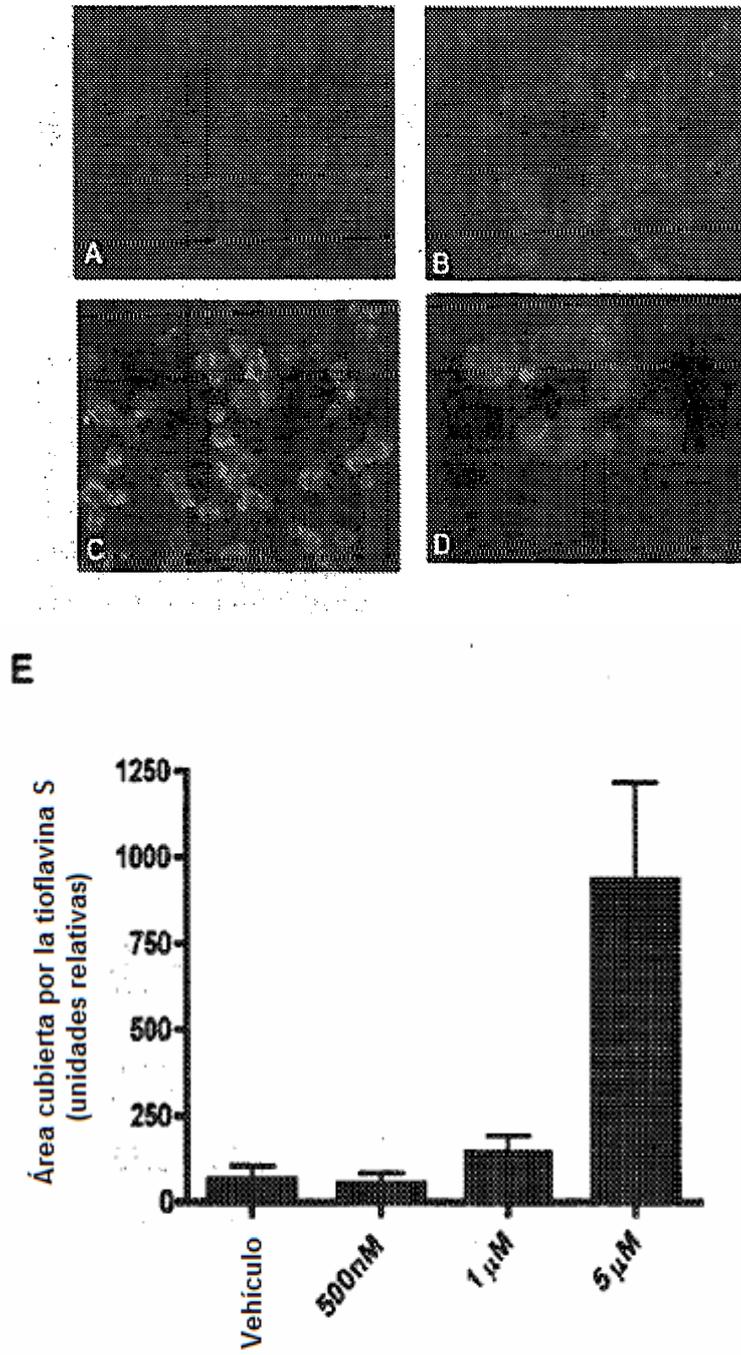


Figura 9

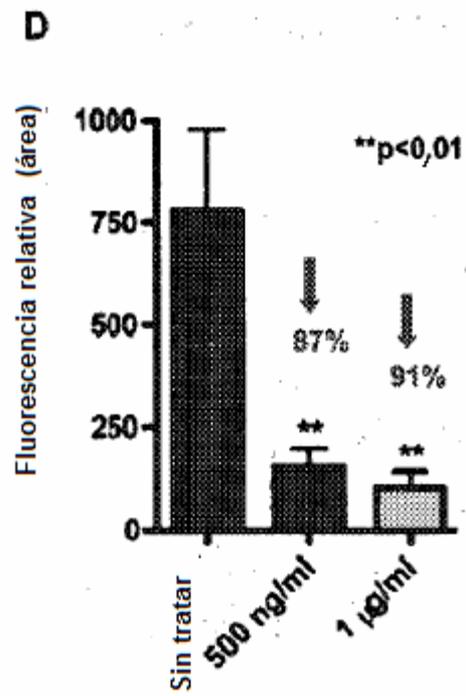
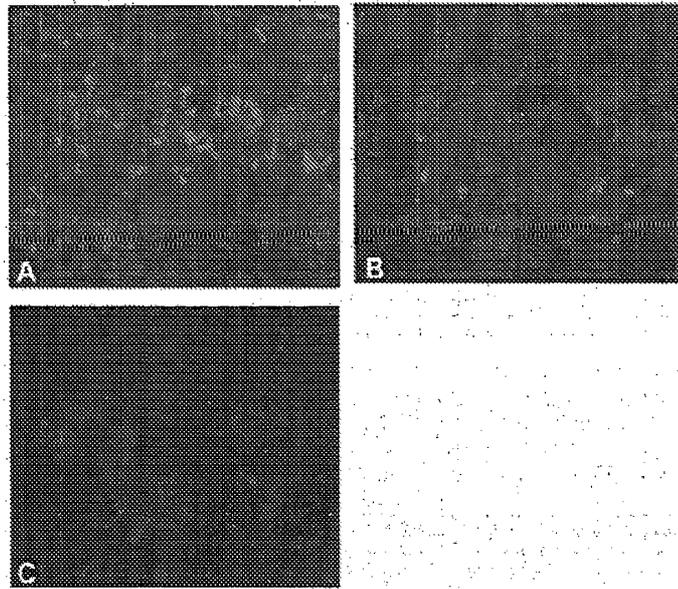


Figura 10

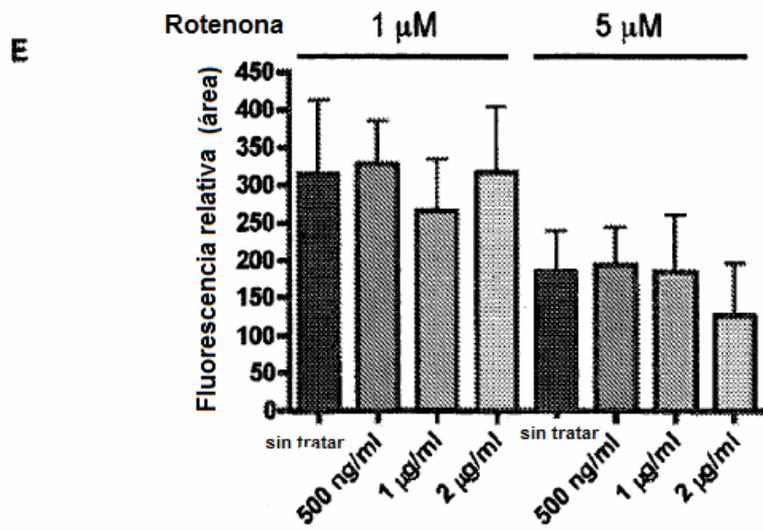
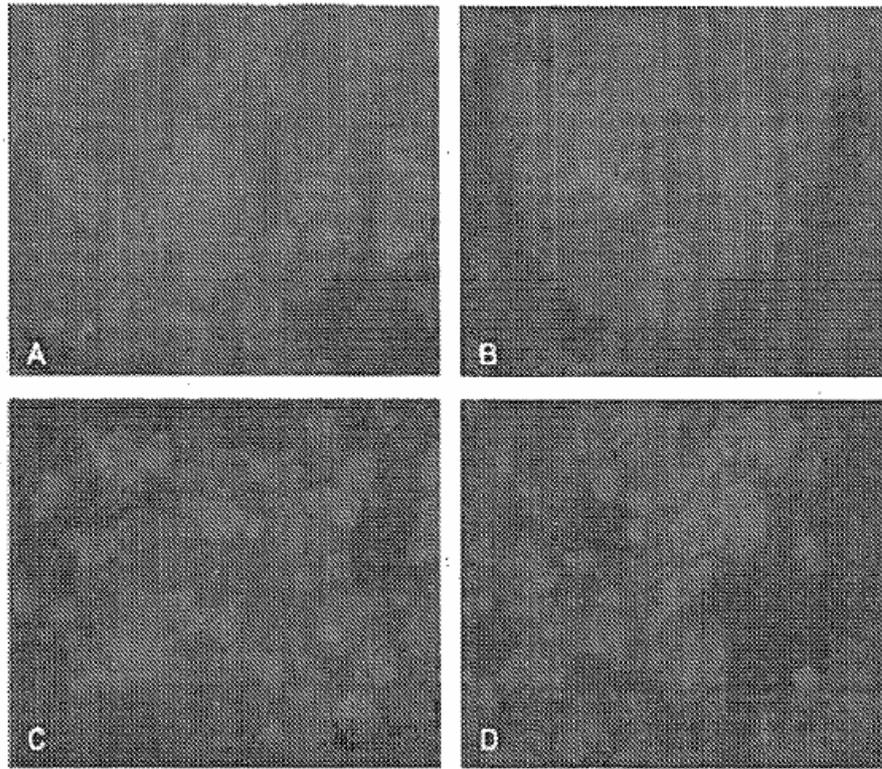
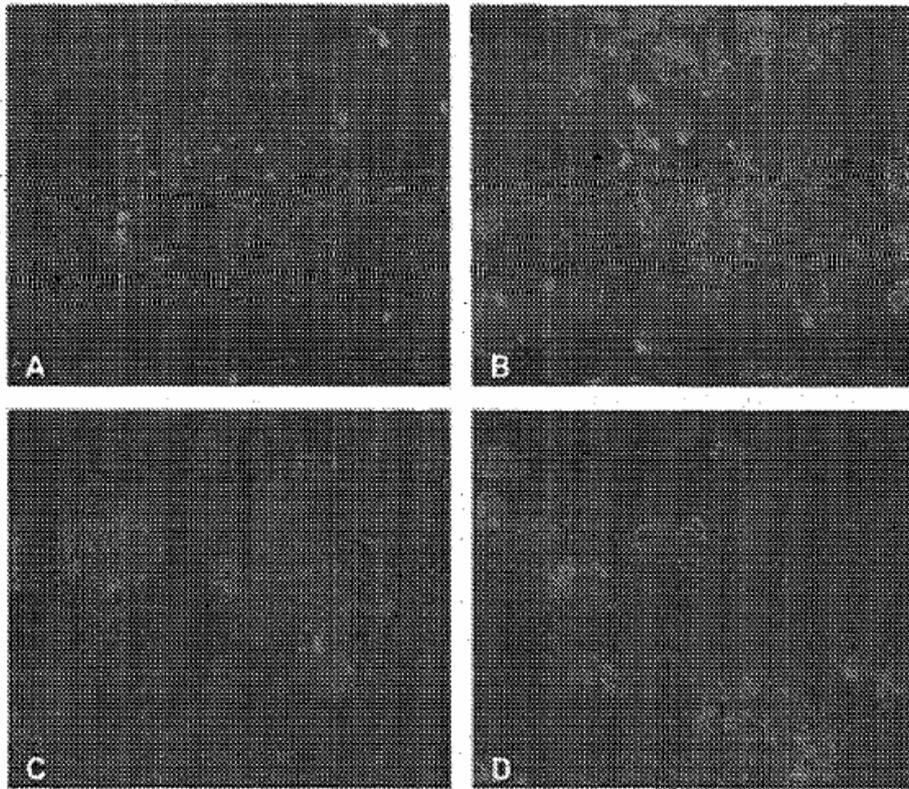


Figura 11



E

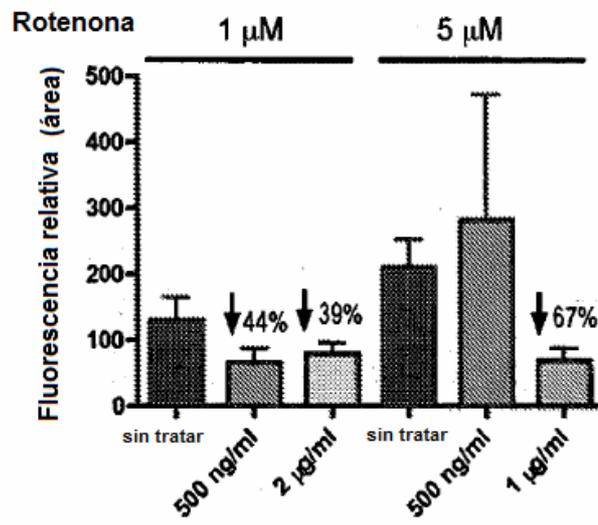


Figura 12

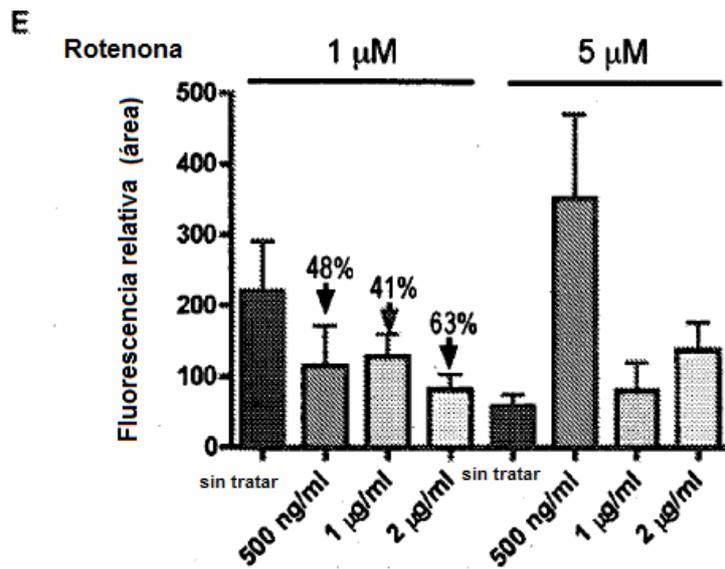
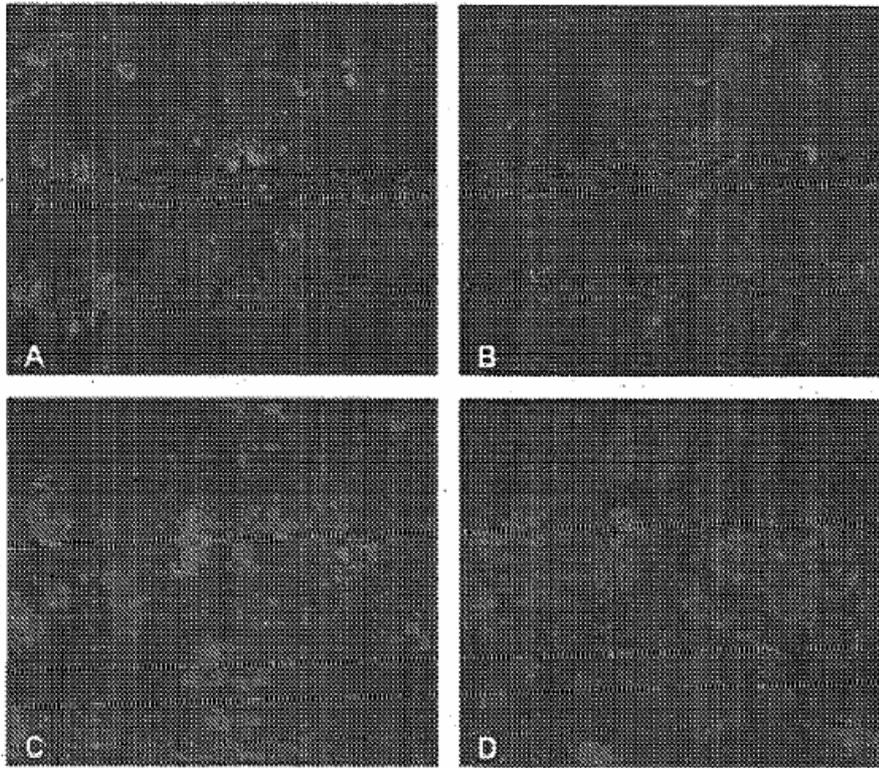


Figura 13

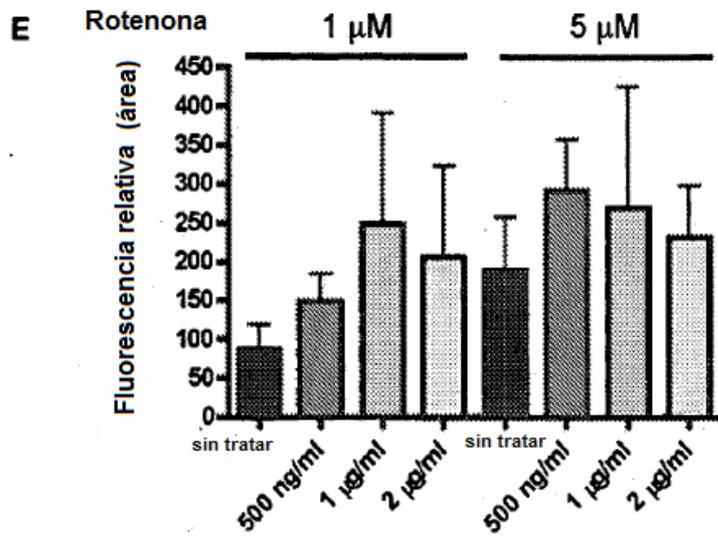
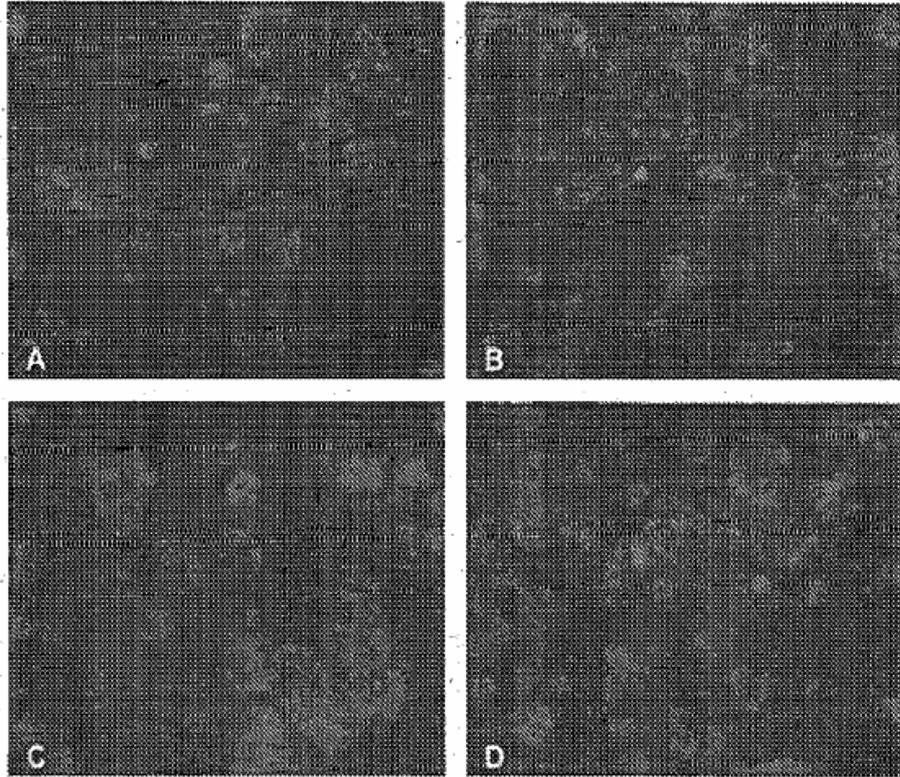


Figura 14

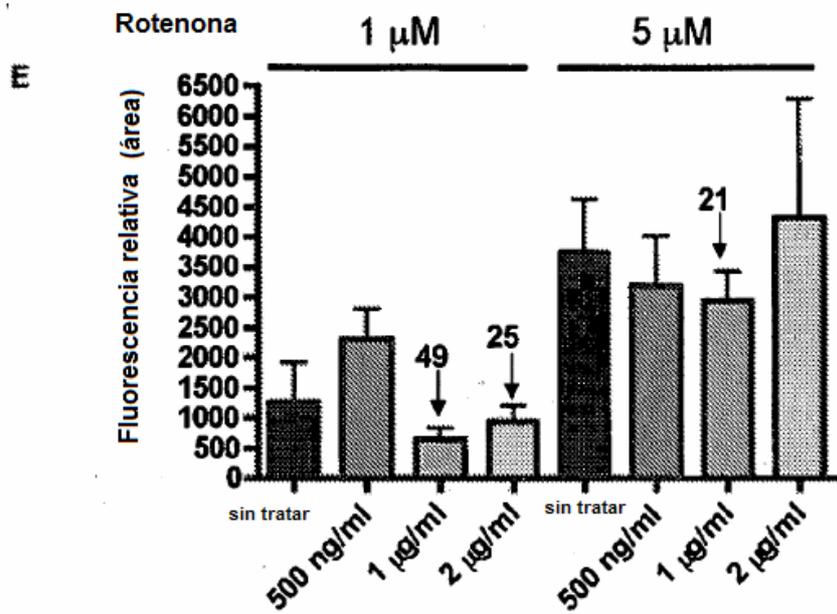
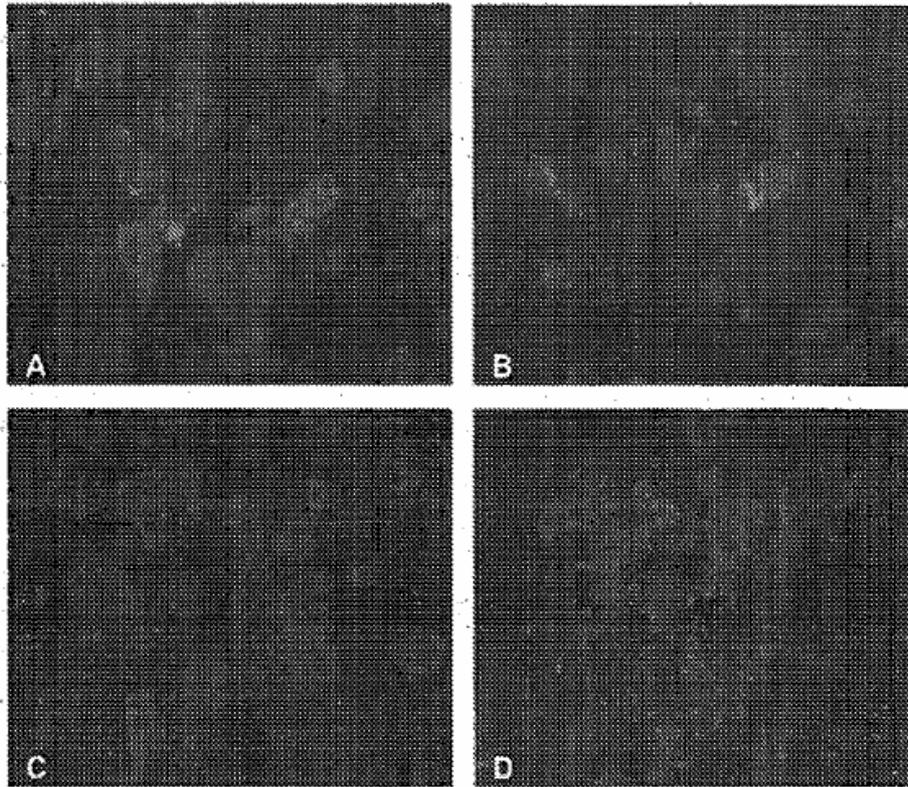


Figure 15

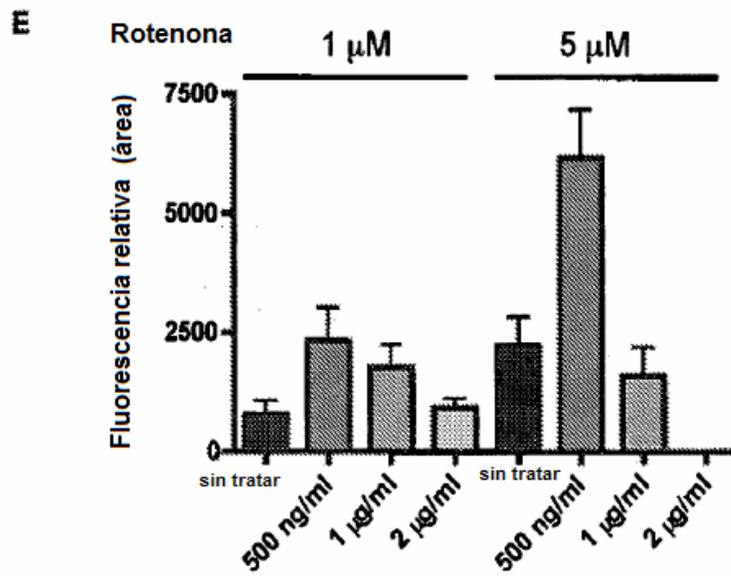
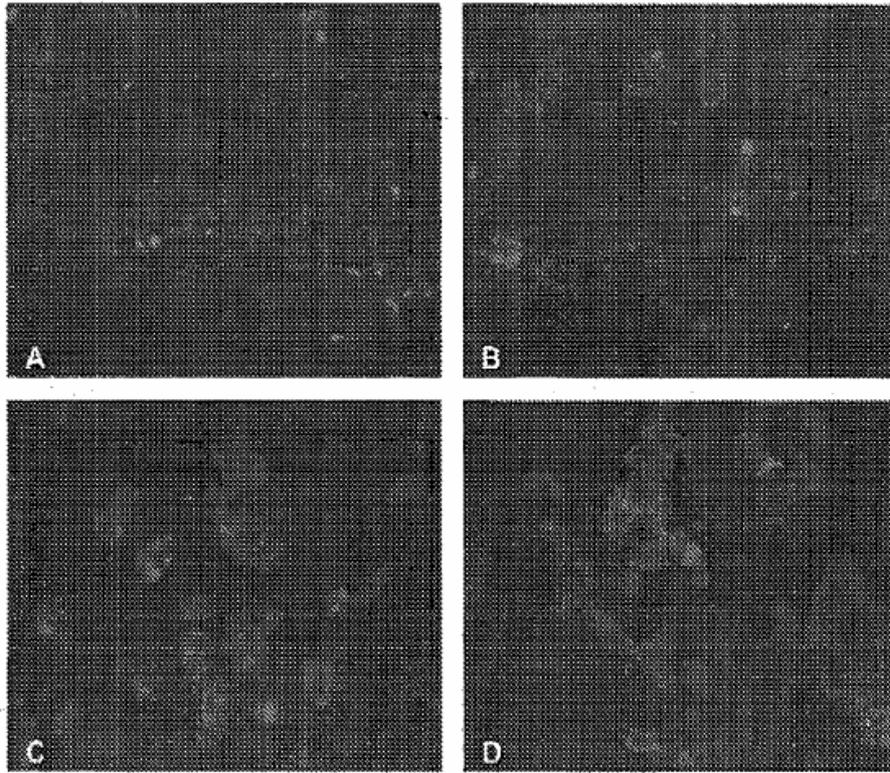


Figure 16

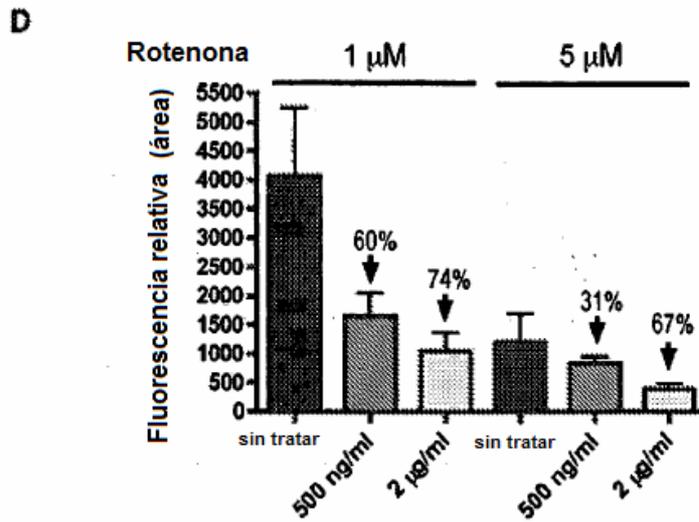
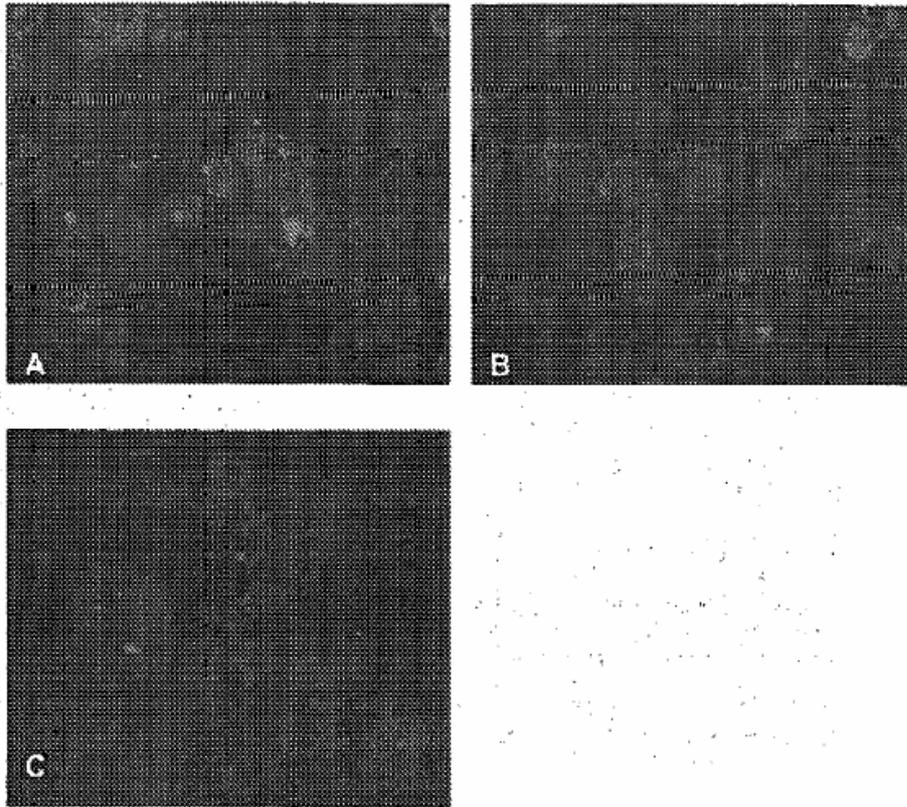


Figura 17

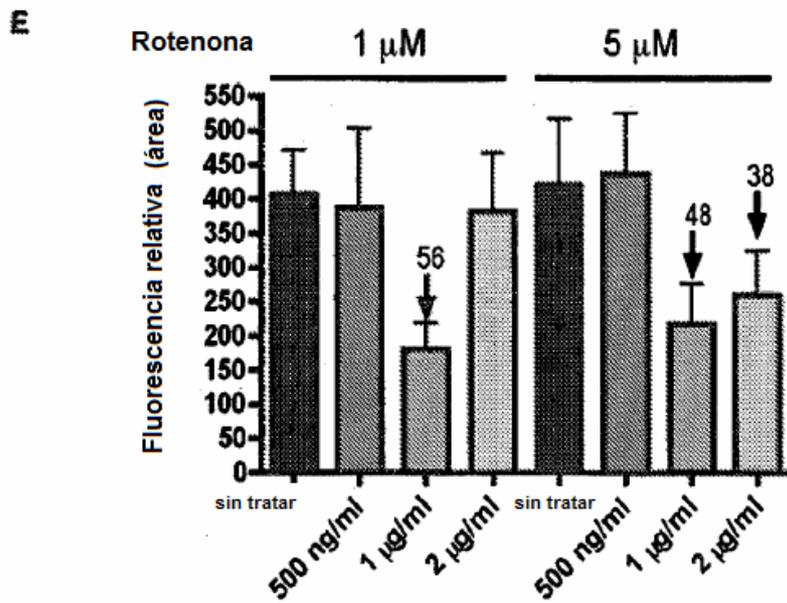
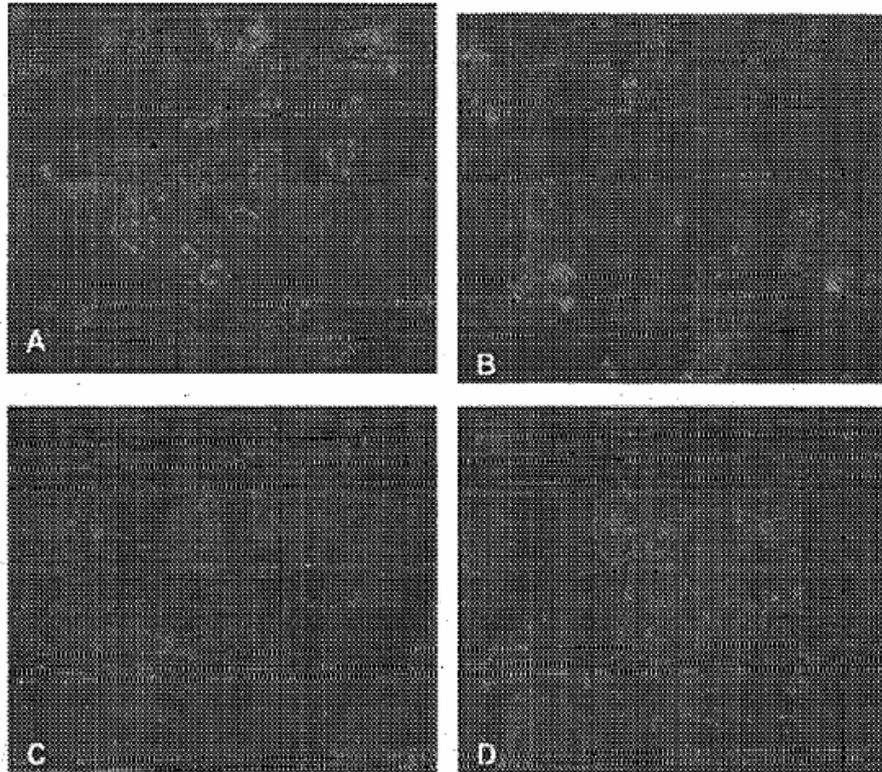


Figura 18

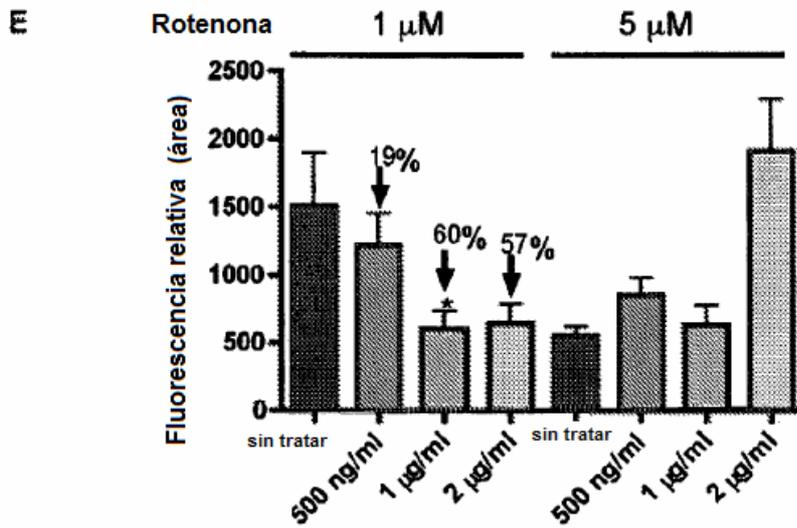
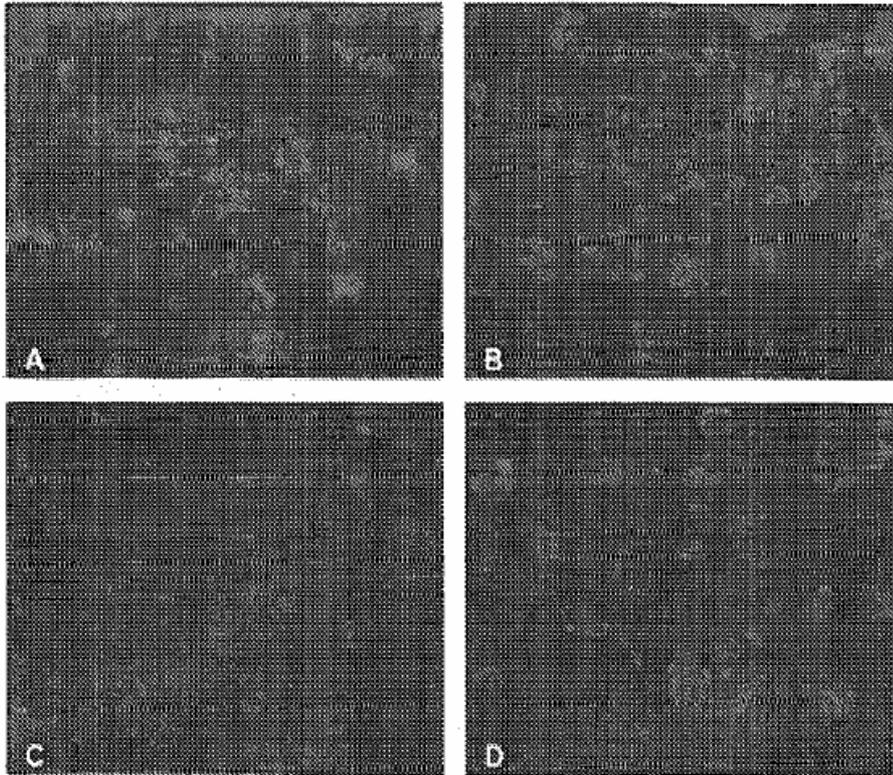


Figura 19

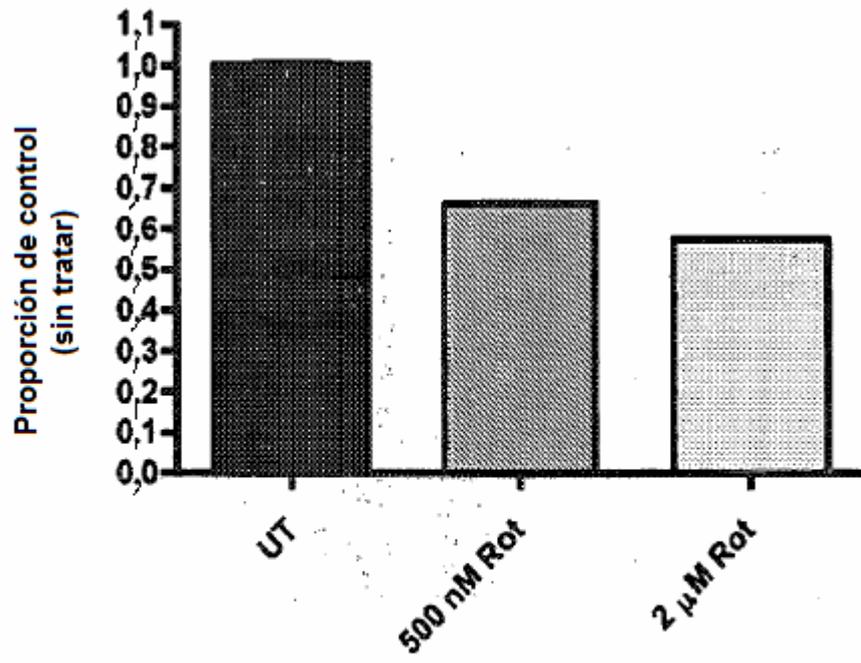


Figura 20

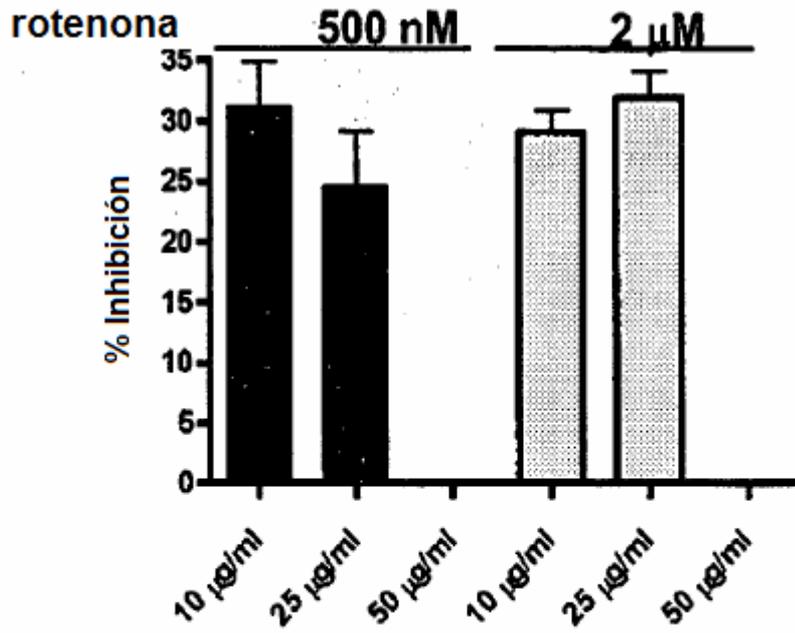


Figura 21

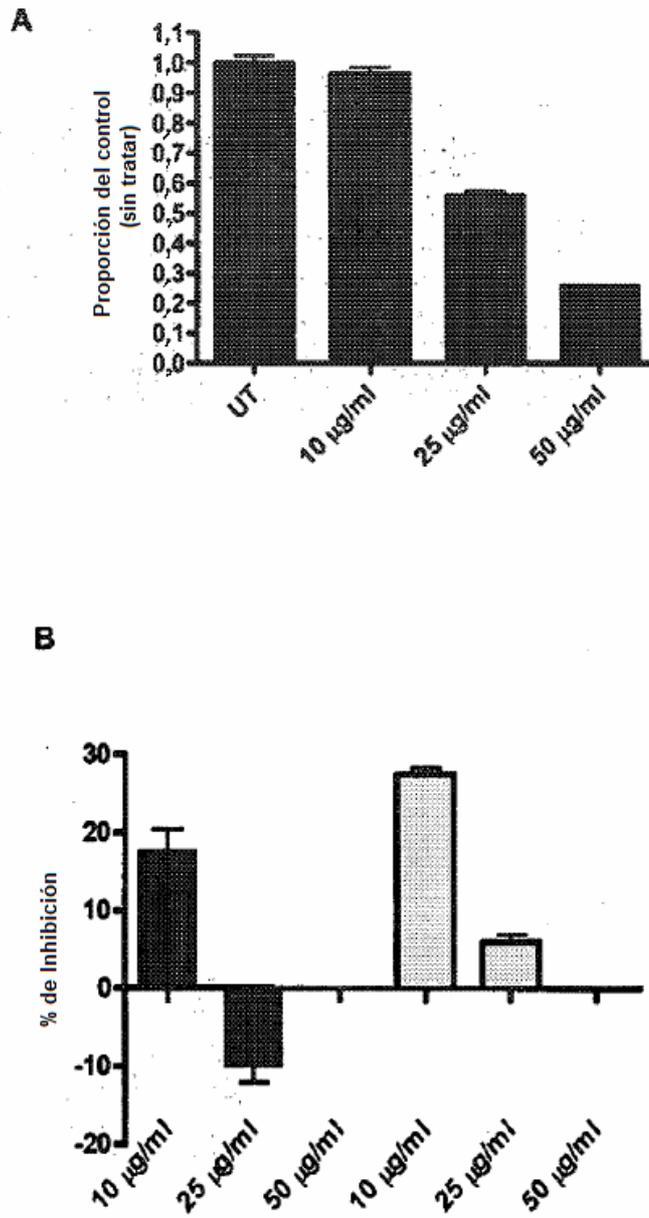


Figura 22

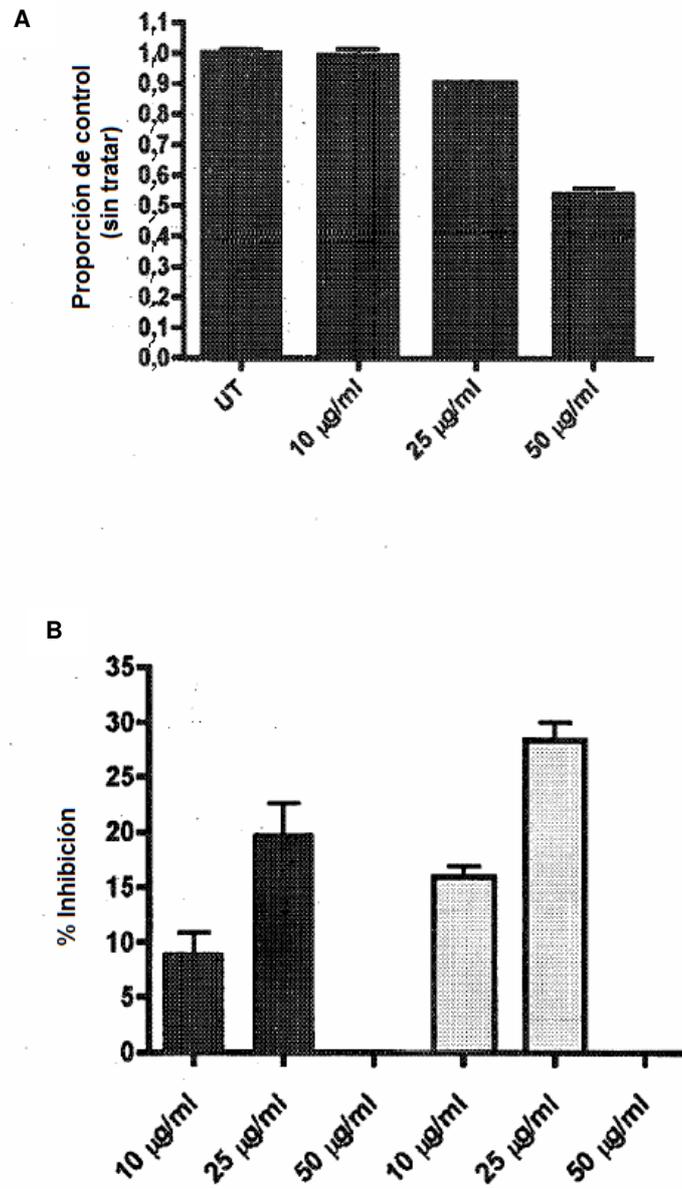


Figura 23

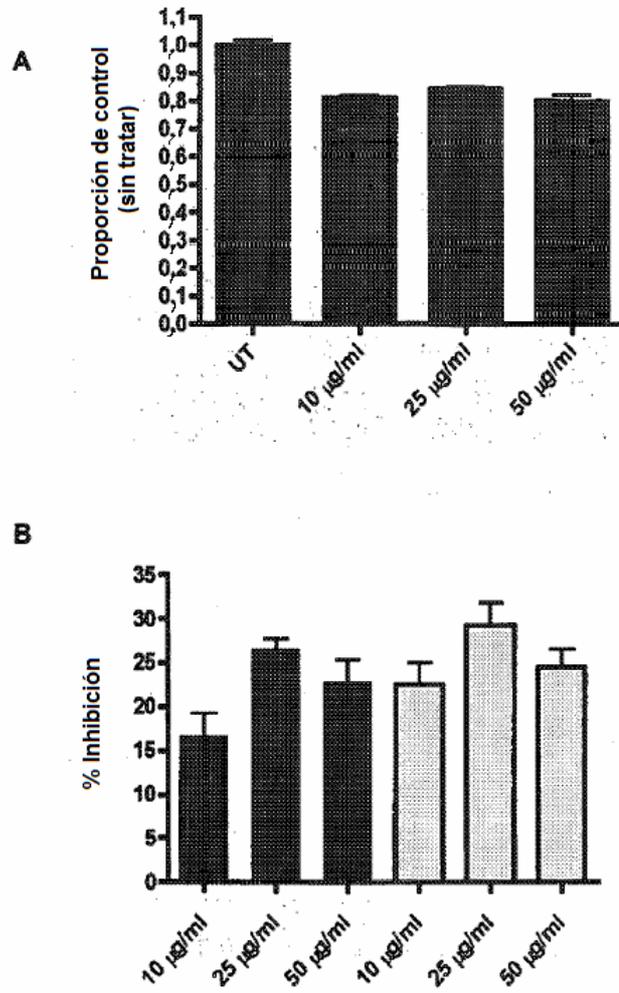


Figura 24

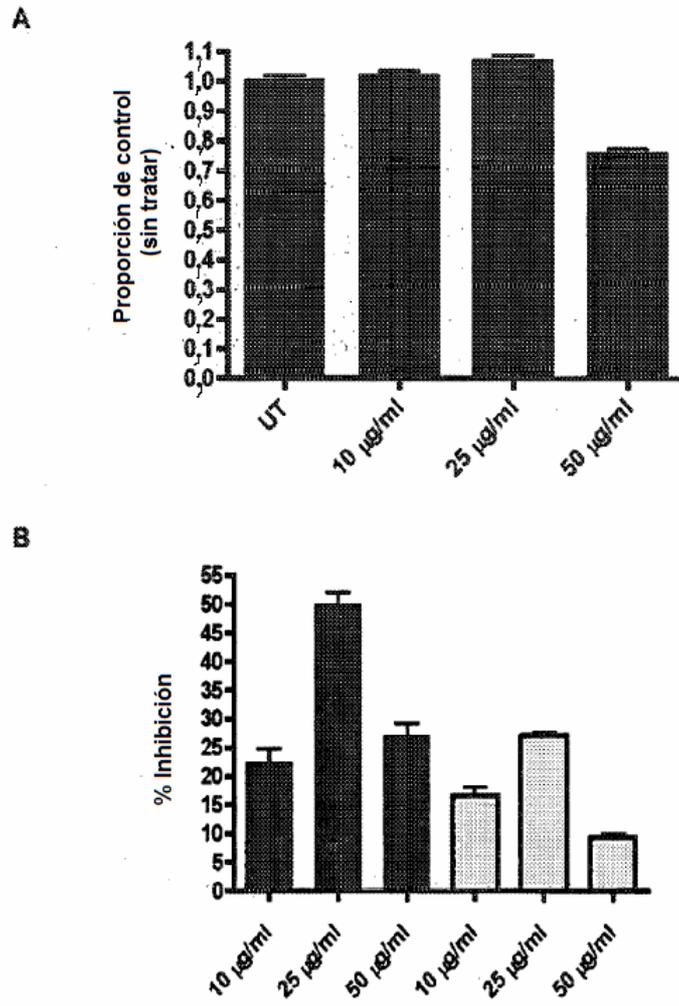
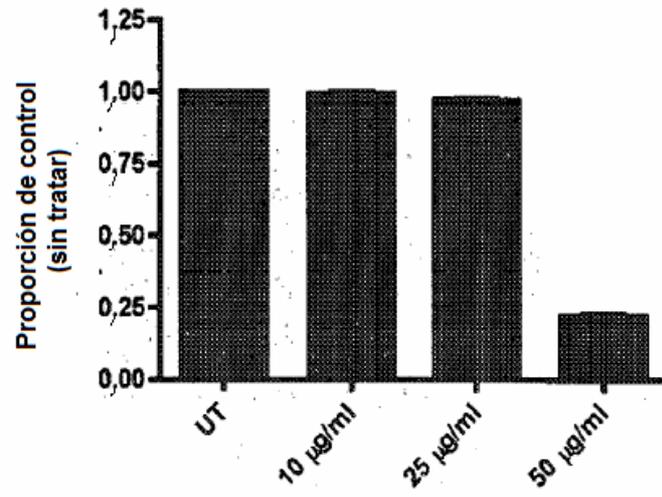


Figura 25

A



B

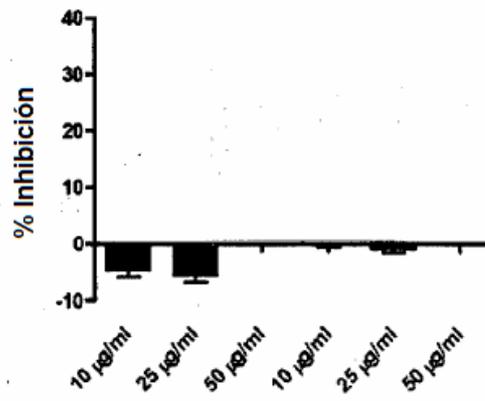


Figura 26

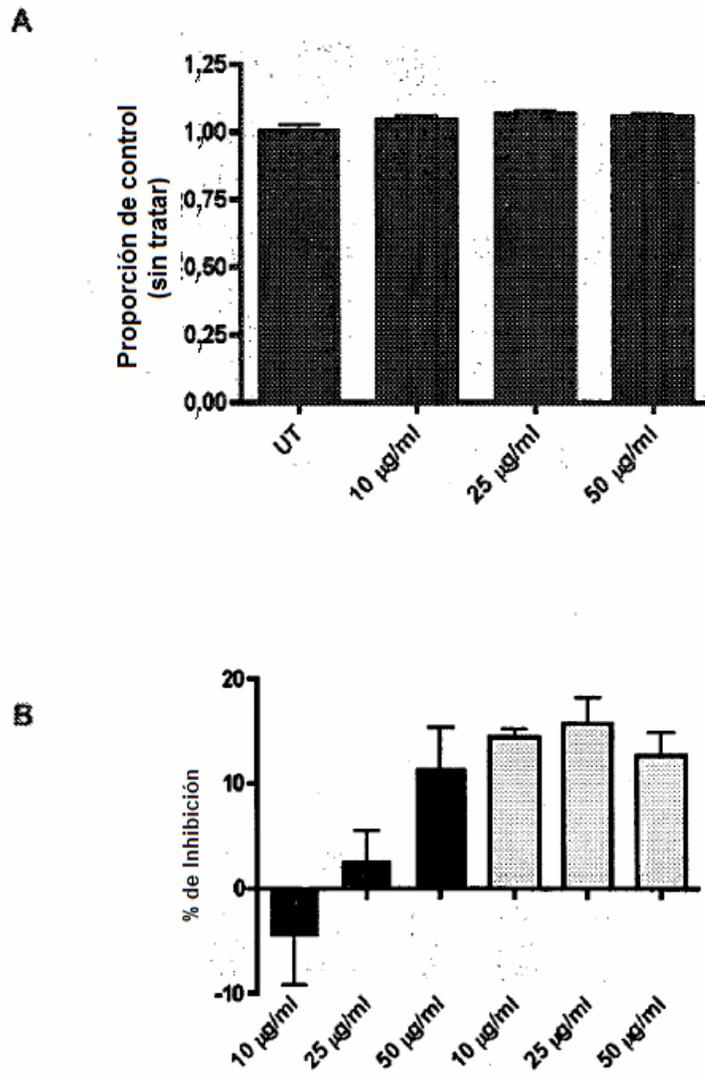


Figura 27

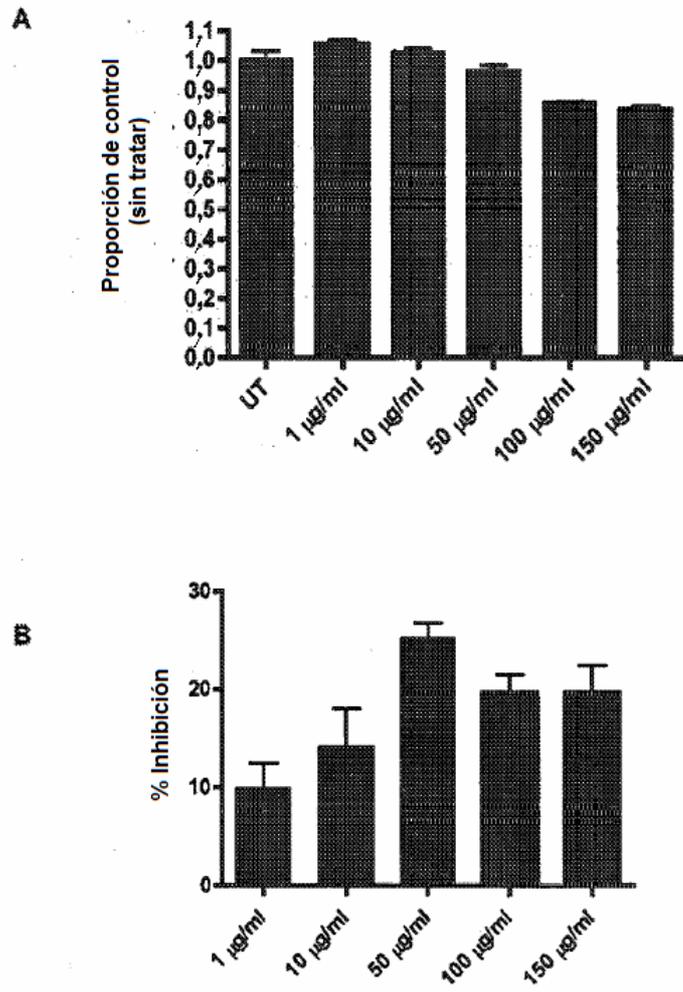


Figura 28

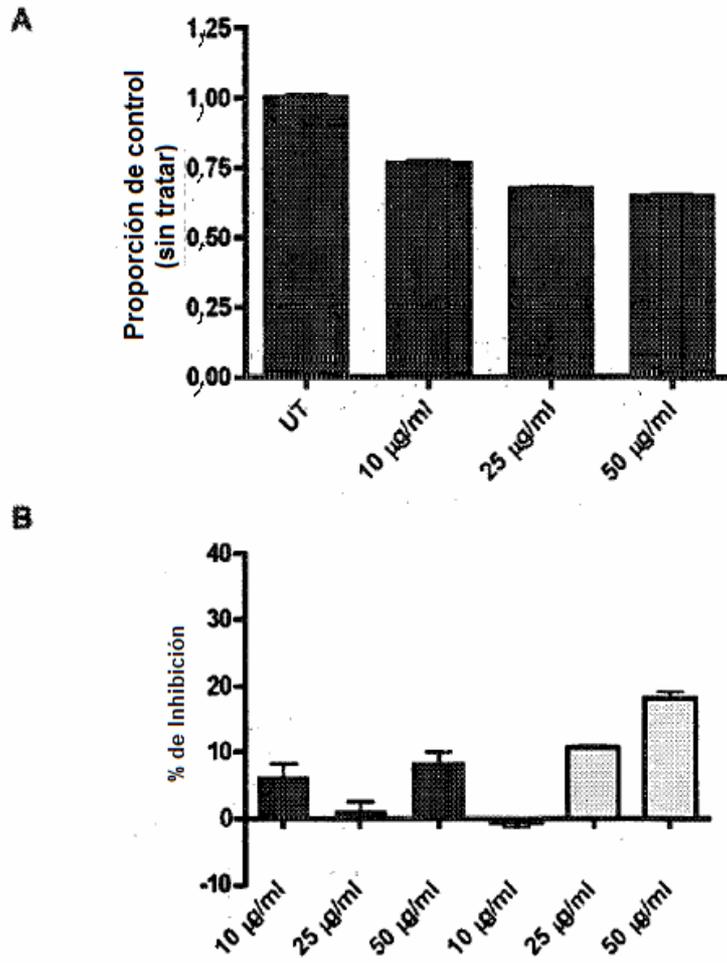


Figura 29

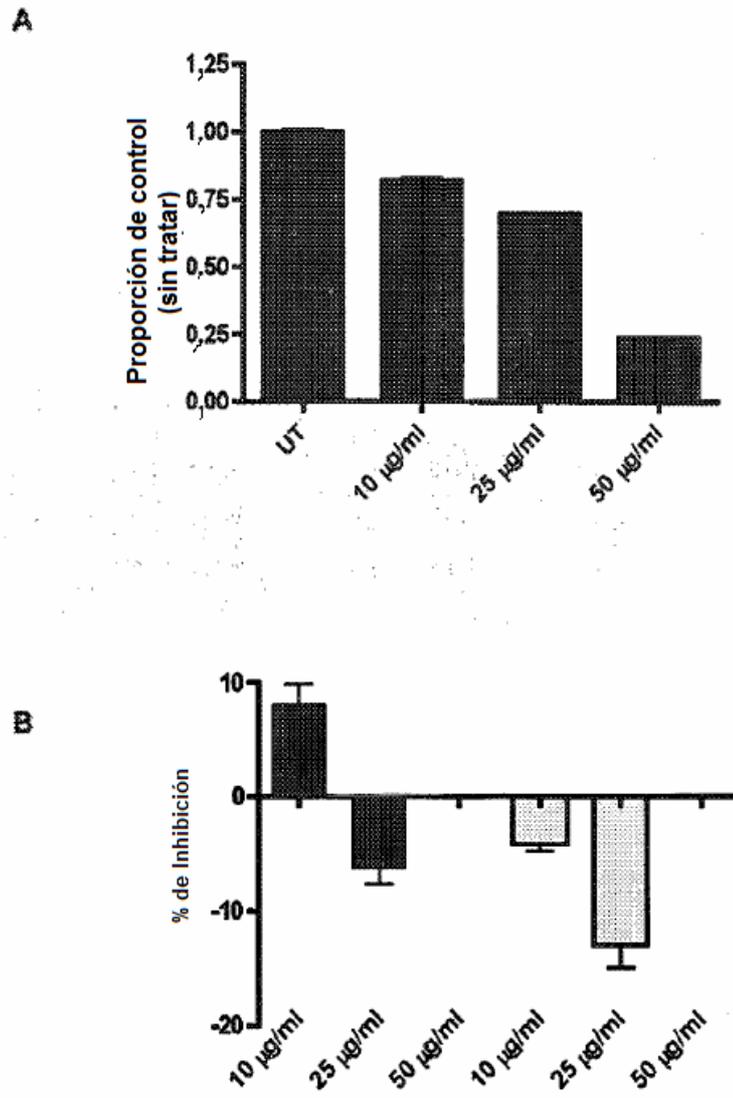


Figura 30

Figura 31

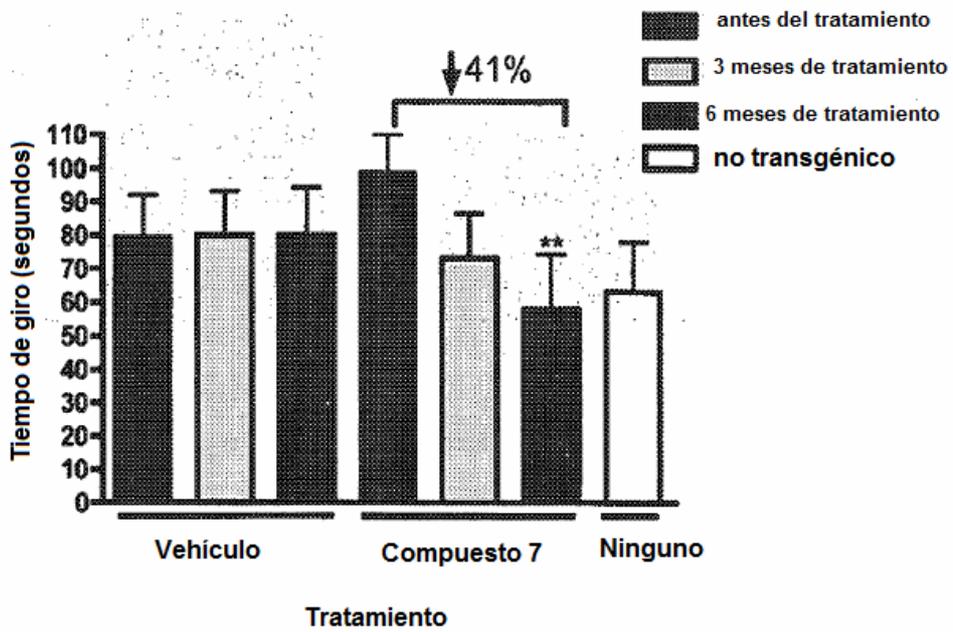
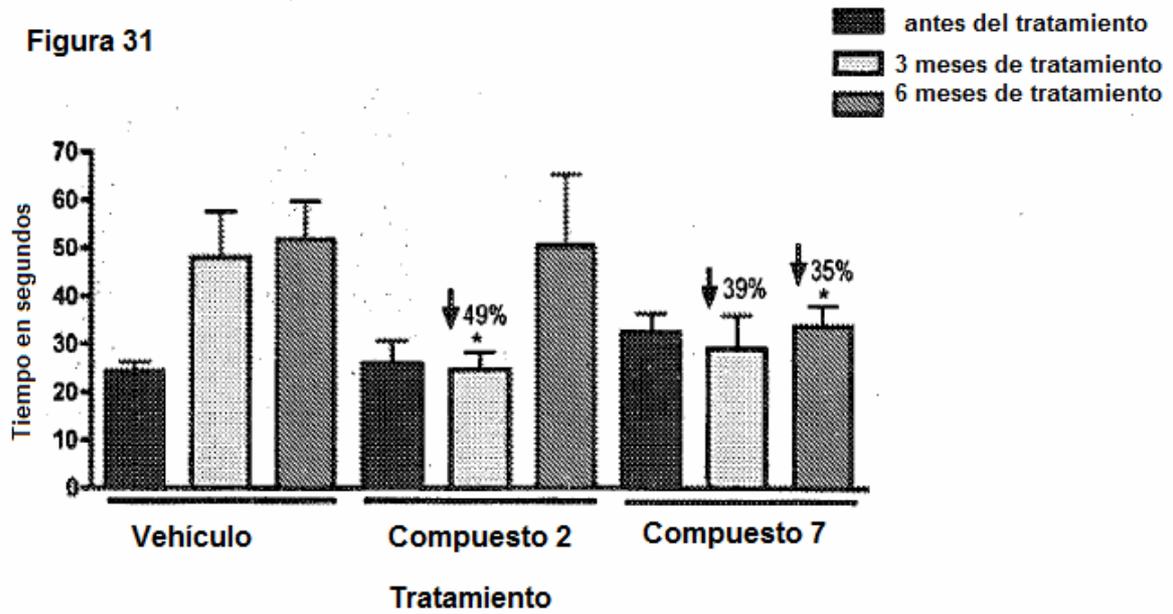


Figura 32

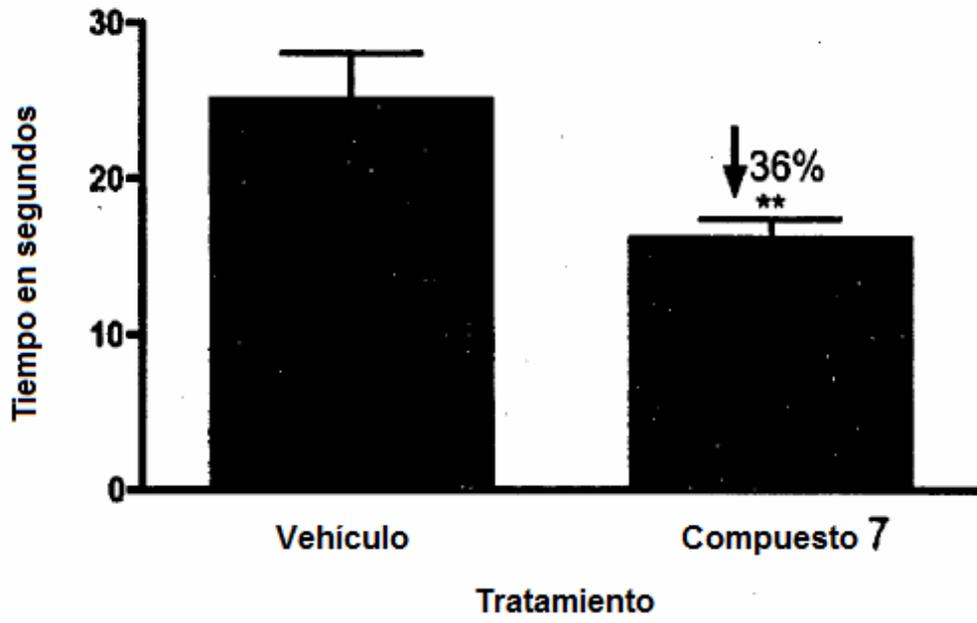


Figura 33

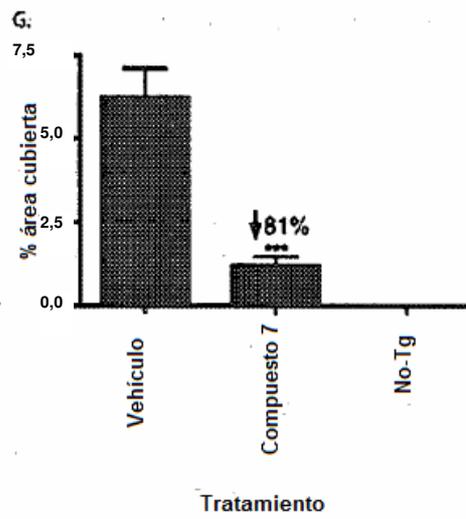
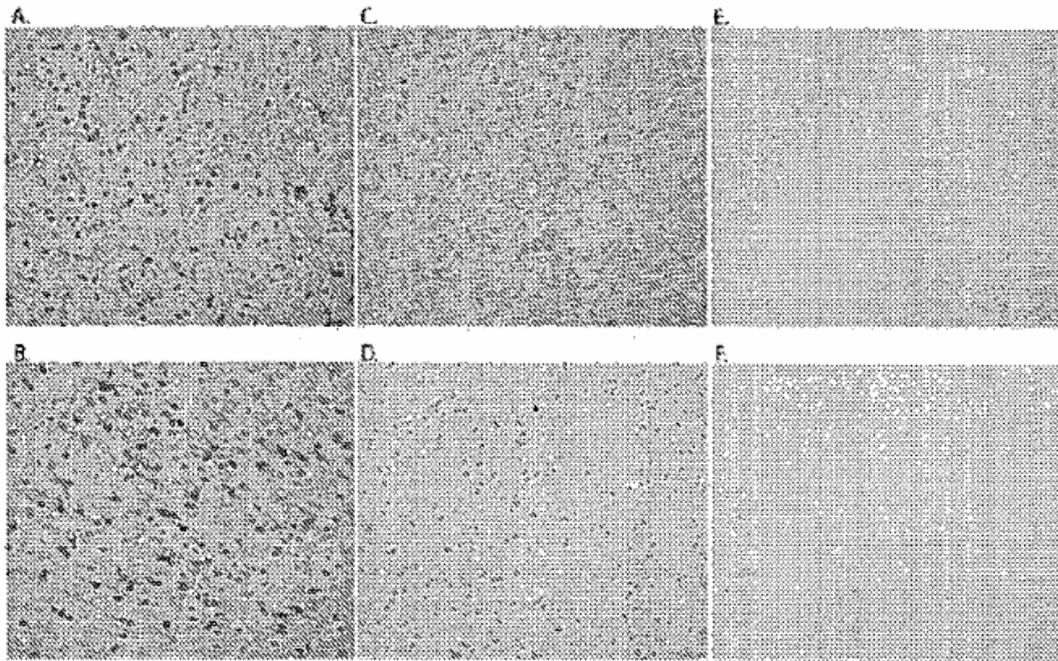


Figura 34

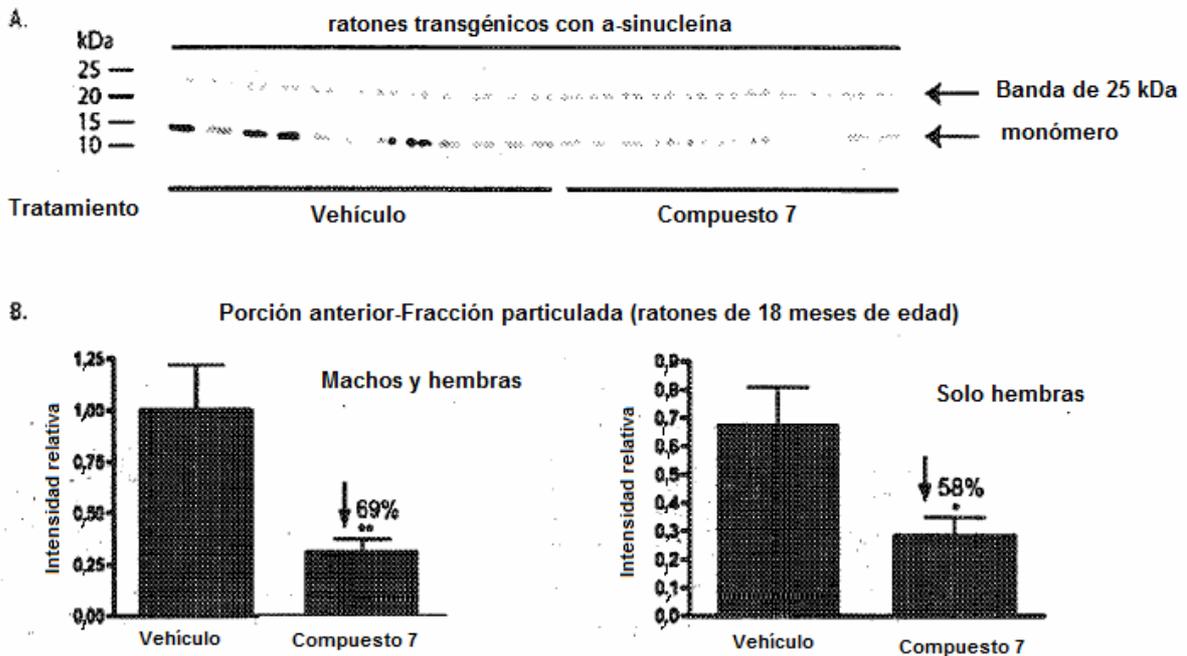


Figura 35

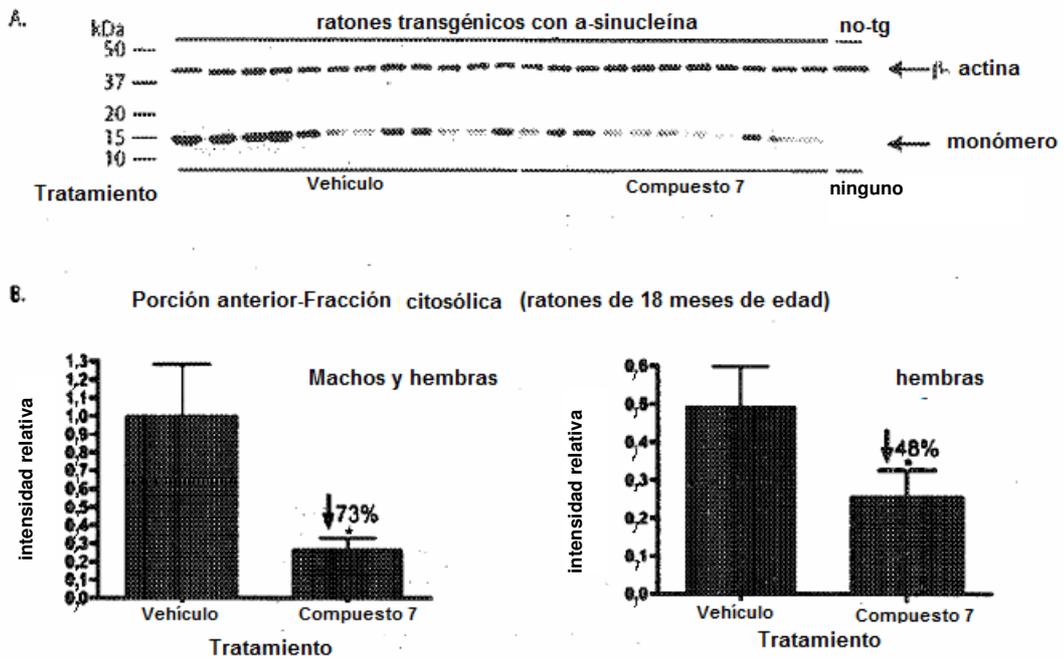
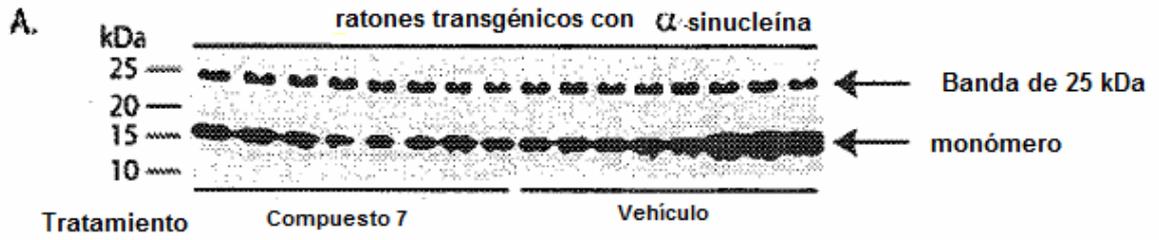
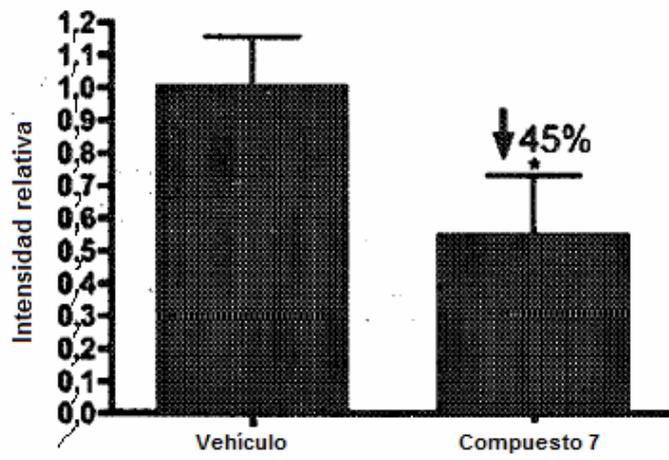


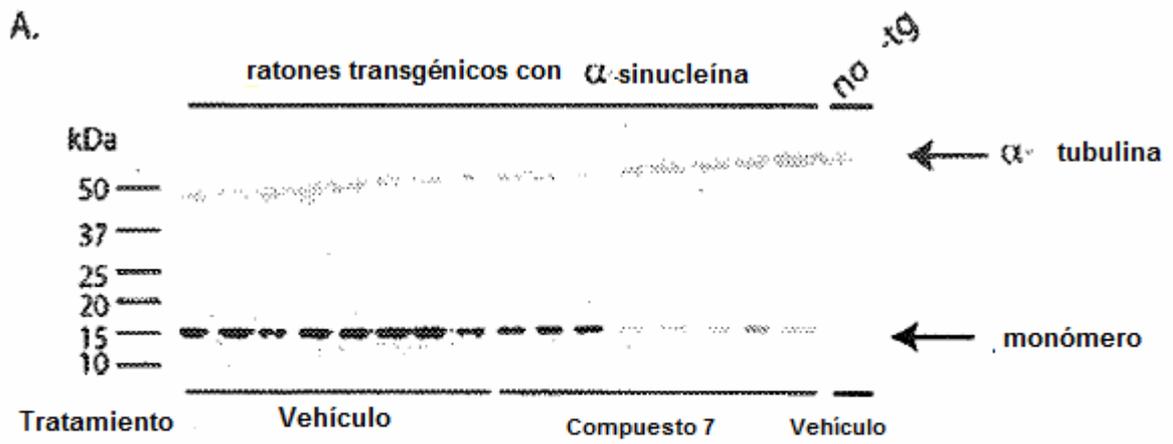
Figura 36



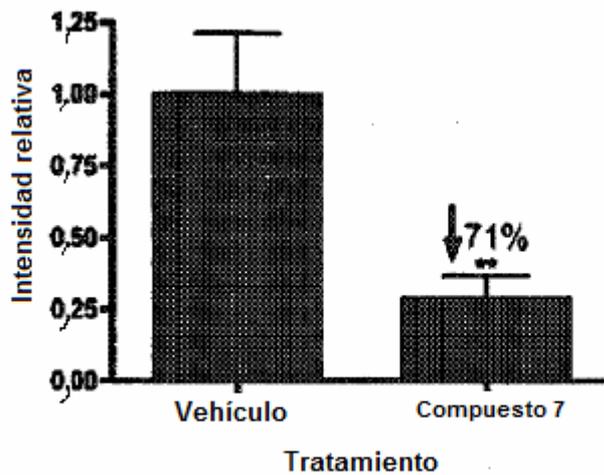
B. A Porción anterior: Fracción particulada



Tratamiento  
Figura 37



**B. Porción anterior-Fracción citosólica**



**Figura 38**