(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 546 063**

(51) Int. CI.:

C07C 255/43 (2006.01)
C07D 211/08 (2006.01)
C07D 265/30 (2006.01)
A61K 31/277 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2010 E 10836776 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2015 EP 2509940**

(54) Título: **Agentes de enlace a amiloides**

(30) Prioridad:

10.12.2009 US 285470 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.09.2015

(73) Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US

(72) Inventor/es:

YANG, JERRY y
THEODORAKIS, EMMANUEL A.

(74) Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

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

Agentes de enlace a amiloides.

ANTECEDENTES

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza por una pérdida progresiva de la función cognitiva y constituye el trastorno neurodegenerativo más común y fatal. Las pruebas genéticas y clínicas apoyan la hipótesis de que la acumulación de depósitos amiloides en el cerebro representa un papel importante en la patología de la enfermedad. Este suceso está asociado con perturbaciones de funciones biológicas en el tejido circundante que conducen a la muerte de células neuronales, contribuyendo así al proceso de la enfermedad. Los depósitos están compuestos principalmente por péptidos amiloides (Aβ), normalmente una secuencia de 39-43 aminoácidos que se autoagrega en un motivo de hoja plegada β fibrilar. Aunque no se conoce la estructura tridimensional exacta de los péptidos Aβ agregados, se ha propuesto una estructura modelo que apoya la propiedad de agregación. Esto crea oportunidades para la formación de imágenes *in vivo* de depósitos amiloides que no sólo puede ayudar a evaluar el curso y la evolución en el tiempo de la enfermedad, sino que también permite el control oportuno de tratamientos terapéuticos.

Históricamente, el indicador Rojo Congo (RC) y la Tioflavina T (Th T) han constituido el punto de partida para la visualización de placas amiloides y se siguen empleando comúnmente en análisis histológicos post-mórtem. Sin embargo, debido a su carga, estos compuestos se consideran inadecuados para uso *in vivo*. Por otro lado, se han descrito diversas moléculas para otras aplicaciones técnicas. Por ejemplo, se han descrito derivados de motores moleculares hidrófilos para uso en biofluidos para la determinación de viscosidades (Haidekker y col., Bioorg. Chem. 2004, 32, 274-289). Además existen informes sobre las propiedades fotorrefractivas de compuestos poliméricos basados en poli(N-vinilcarbazol) dopados con el sensibilizador C_{60}, el plastificante ftalato de butil-bencilo, y dos series de cromóforos (Díaz-García M. A. y col., Chem. Mater. 1999, 11, 1784-1791). También se ha descrito que determinados estirenos sustituidos tienen propiedades electroluminiscentes cuando se introducen en disposiciones correspondientes (véase la Patente US 5.874.180). Krell M. W. y Johnson F.E. (Patente US 2.798.090) han dado a conocer compuestos de ácido benzalanilina-3-sulfónico y procesos para su preparación. También se han propuesto compuestos de metina para utilizarlos en la técnica del tinte y la coloración (véase la Patente US 2.583.614). Además, la Patente US 4.258.182 describe colorantes de estirilo cuaternizado y aminosustituido. También se han dado a conocer ésteres de ácido α-cianoacrílico que contienen silicona sin referencia específica a una aplicación determinada (Senchenya y col., Russian Chemical Bulletin, 1993, 42, 909-911). El documento FR 1.321.641 se refiere a compuestos con resistencia aumentada a la radiación UV, en particular a ésteres acrílicos de 2-alcoxi-α-ciano-1-naftaleno. El documento WO 2005/073697 describe un método para detectar los valores de esfuerzo de cizallamiento local utilizando motores moleculares. Con el fin de proporcionar compuestos adecuados para aplicaciones *in vivo*, varios laboratorios han desarrollado compuestos con estructuras químicas no cargadas, lipófilas (logP= 0,1-3,5) y de bajo peso molecular (P.M. inferior a 650) que facilitan el paso a través de la barrera hematoencefálica. Una funcionalización adicional de estos compuestos con radionucleidos conduce a una nueva generación de reactivos de diagnóstico *in vivo* dirigidos a placas y estructuras relacionadas para formar imágenes por tomografía de emisión de positrones (PET) y tomografía computarizada de emisión por fotón único (SPECT), como es sabido en la técnica.

A pesar de estos avances, existe una necesidad urgente de diseñar y desarrollar nuevas moléculas dirigidas a amiloides con mejores características físicas, químicas y biológicas. Aquí se proporcionan métodos y compuestos que abordan estas y otras necesidades existentes en la técnica.

BREVE SUMARIO

Aquí se proporcionan, entre otras cosas, compuestos. También se proporcionan métodos (no reivindicados) para la detección de amiloides y el uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con amiloides, incluyendo la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas basadas en amiloides.

En un primer aspecto se proporcionan compuestos que se unen a péptidos amiloides (por ejemplo agregados de péptidos amiloides).

En otro aspecto se proporciona una composición farmacéutica. La composición farmacéutica incluye un compuesto aquí reivindicado y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto se proporciona el uso en un método para tratar una enfermedad caracterizada por una acumulación de amiloides (por ejemplo depósitos amiloides) en un sujeto. El uso en este método incluye la administración a un sujeto que requiera tratamiento de una cantidad eficaz de un compuesto o composición farmacéutica tal como se reivindica aquí.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Los compuestos no cubiertos por las reivindicaciones están marcados con un asterisco (*).

FIG. 1A-D: muestran espectros de excitación y emisión de fluorescencia de los **Compuestos 8d*** y **11** en solución acuosa de PBS (solución tampón fosfato) (líneas continuas) y la presencia de péptido Aβ (línea discontinua). FIG. 1A: espectro de excitación de fluorescencia del **Compuesto 8d***. FIG. 1B: espectro de emisión del **Compuesto 8d***. FIG. 1C: espectro de excitación de fluorescencia del **Compuesto 11**. FIG. 1D: espectro de emisión del **Compuesto 11**.

FIG. 2: rmuestra la constante de unión aparente (K_d) de los **Compuestos 8d*** y **11** a péptido Aβ preagregado. Leyenda: **Compuesto 8d*** (rombo); **Compuesto 11** (cuadrado).

FIG. 3: muestra la inhibición de interacciones fibrilares IgG-Aβ con el **Compuesto 8d*** (parte superior de la Fig. 3) y el **Compuesto 11** (parte inferior de la Fig. 3).

FIG. 4: muestra espectros de excitación (gráficos izquierdos) y de emisión (gráficos derechos) de fluorescencia de los **Compuestos 8a*, 8b*, 8c*, 14*** y **19*** con fibrillas de Aβ(1-42) agregadas, tal como se describen aquí.

FIG. 5: muestra espectros de emisión de fluorescencia de los **Compuestos 8a*, 8b*, 8c*, 8d*, 11, 14*** y **19*** con y sin monómero Aβ monomérico, tal como se describen aquí.

FIG. 6: gráfico doble recíproco de máximos de fluorescencia y concentración de los **Compuestos 8a*, 8b*, 8c*, 14*** y **19***, tal como se describen aquí. Leyenda: **Compuesto 8a*** (rombo); **Compuesto 8b*** (cuadrado); **Compuesto 8c*** (triángulo); **Compuesto 14*** (cruz); **Compuesto 19*** (cruz con barra).

FIG. 7A-D: muestran valores máximos de inhibición y valores IE_{50} de compuestos aquí descritos. FIG. 7A: **Compuesto 8a***; FIG. 7B: **Compuesto 8b***; FIG. 7C: **Compuesto 8c***; FIG. 7D: **Compuesto 14***.

FIG. 8: muestra los resultados de estudios de citotoxicidad tal como se describen aquí. Leyenda: para cada concentración del compuesto empleado en el ensayo de citotoxicidad, el % de supervivencia celular se representa en forma de histograma en el siguiente orden (de izquierda a derecha): **Compuesto 8a*, 8b*, 8c*, 8d*, 11** y **14***, respectivamente.

FIG. 9A-F: muestran espectros de excitación y emisión de fluorescencia de los **Compuestos 27*, 28-31** y **33***, respectivamente, en solución (líneas continuas) y en presencia de péptido Aβ (líneas discontinuas).

FIG. 10A-F: muestran la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de péptidos Ab agregados de los **Compuestos 27*, 28-31** y **33***, respectivamente.

FIG. 11A-F: muestran imágenes de placas teñidas con A), compuesto **27***, B) compuesto **28**, C) compuesto **29**, D) compuesto **30**, E) compuesto **31**, o F) compuesto **33***, tal como se describen aquí.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. Definiciones

Las abreviaturas aquí utilizadas tienen su significado convencional dentro de la técnica química y biológica. Las estructuras químicas y fórmulas aquí expuestas están construidas de acuerdo con las reglas estándar de valencia química conocidas en la técnica química.

Cuando se especifican grupos de sustituyentes mediante sus fórmulas químicas convencionales, escritas de izquierda a derecha, éstos también abarcan los sustituyentes químicamente idénticos resultantes de escribir la estructura de derecha a izquierda, por ejemplo, $-CH_2O-$ es equivalente a $-OCH_2-$.

El concepto "grupo donador de electrones (GDE)" se refiere a una fracción química que modifica las fuerzas electrostáticas que actúan sobre una fracción química cercana cediendo carga negativa a esta fracción química. En algunas realizaciones, el grupo donador de electrones cede carga negativa al elemento de conjugación π de los compuestos aquí reivindicados.

El concepto "elemento de conjugación π", "ECπ" o "elemento de conjugación pi" se refiere a una fracción química divalente que forma un sistema conjugado π que tiene enlaces simples y múltiples (por ejemplo enlaces dobles) alternantes, de modo que los electrones en los orbitales p de los átomos del sistema están deslocalizados. En algunas realizaciones, los enlaces simples y múltiples del elemento conjugado π pueden estar en una orientación planar o esencialmente planar.

El concepto "grupo soluble en agua" se refiere a una fracción química que aumenta la solubilidad en agua de los compuestos a los que está unida. El aumento de la solubilidad en agua se puede medir utilizando técnicas actualmente existentes, por ejemplo determinando la constante de partición de los compuestos con y sin un grupo soluble en agua unido. En algunas realizaciones, la constante de partición se puede medir mezclando un compuesto con agua y un disolvente orgánico, como octanol. Cuanto más hidrófobo es un compuesto, mayor es su constante de partición. Cuanto más hidrófilo es un compuesto, menor es su constante de partición. En algunas realizaciones, los grupos solubles en agua aquí descritos pueden mejorar la solubilidad en agua de moléculas precursoras disminuyendo su coeficiente de partición. En algunas realizaciones, los grupos solubles en agua pueden reducir la constante de partición de moléculas precursoras (que tienen una constante de partición más alta antes de la unión del grupo soluble en agua) al menos en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90%. En algunas realizaciones, los grupos solubles en agua aquí descritos pueden reducir la constante de partición de moléculas precursoras en un factor 1, un factor 2, un factor 3, un factor 4 o más.

El término "amiloide" se utiliza aquí de acuerdo con su significado habitual en la técnica. Los amiloides contienen múltiples péptidos amiloides asociados, por ejemplo agregados de péptidos amiloides. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los amiloides incluyen un péptido amiloide agregado con uno o más péptidos amiloides. En algunas realizaciones, los amiloides incluyen "placas amiloides", "depósitos amiloides", "agregados amiloides" o "agregados de péptidos amiloides". Los compuestos aquí reivindicados se pueden asociar (por ejemplo unir) a un péptido amiloide o a un amiloide. En algunas realizaciones, los compuestos aquí reivindicados se pueden asociar a un amiloide por interacciones hidrófobas.

El término "alquilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa, a no ser que se indique otra cosa, una cadena lineal (es decir, no ramificada) o ramificada, o una combinación de ambas, que puede estar completamente saturada, mono o poliinsaturada y que puede incluir radicales divalentes y multivalentes, que tienen el número de átomos de carbono designado (es decir, C_1-C_{10} significa uno a diez carbonos). Ejemplos de grupos hidrocarburo saturados incluyen, de forma no exclusiva, grupos como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, (ciclohexil)metilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo y similares. Un grupo alquilo insaturado es aquel que tiene uno o más enlaces dobles o triples. Ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen, de forma no exclusiva, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo, e isómeros y homólogos superiores. Un alcoxi es un alquilo unido al resto de la molécula mediante un enlazante oxígeno (-O-).

El término "alquileno", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa un radical divalente derivado de un alquilo, por ejemplo, de forma no exclusiva, $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, y además incluye los grupos descritos más abajo como "heteroalquileno". Normalmente, un grupo alquilo (o alquileno) tendrá de 1 a 24 átomos de carbono, siendo preferentes los grupos de 10 o menos átomos de carbono. Un "alquilo inferior" o "alquenilo inferior" es un grupo alquilo o alquileno de cadena más corta, que en general tiene ocho o menos átomos de carbono.

El término "heteroalquilo", por sí mismo o en combinación con otro término, significa, a no ser que se indique otra cosa, una cadena lineal o ramificada estable, o un radical hidrocarburo cíclico, o combinaciones de éstos, que consiste en al menos un átomo de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado entre el grupo consistente en O, N, P, Si y S. Los átomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. El o los heteroátomos O, N, P y S y Si pueden estar situados en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la que el grupo alquilo está unido al resto de la molécula. Ejemplos incluyen, de forma no exclusiva, $-CH_2-CH_2-O-CH_3$, $-CH_2-CH_2-NH-CH_3$, $-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3$, $-CH_2-S-CH_2-CH_3$, $-CH_2-CH_2$, $-S(O)-CH_3$, $-CH_2-CH_2-S(O)_2-CH_3$, $-CH=CH-O-CH_3$, $-Si(CH_3)_3$, $-CH_2-CH=N-OCH_3$, $-CH=CH-N(CH_3)-CH_3$, $O-CH_3$, $-O-CH_{-2}-CH_3$ y -CN. Hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos, por ejemplo $-CH_2-NH-OCH_3$. Del mismo modo, el término "heteroalquileno", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa un radical divalente derivado de heteroalquilo, por ejemplo, de forma no exclusiva, $-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-$ y $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$. En el caso de los grupos heteroalquileno, los heteroátomos también pueden ocupar cualquiera de los dos extremos de la cadena o pueden ocupar ambos extremos (por ejemplo, alquilenoxi, alquilenodioxi, alquilenoamino, alquilenodiamino y similares). Además, en el caso de los grupos de enlace alquileno o heteroalquileno, la dirección en la que está escrita la fórmula del grupo de enlace no implica ninguna orientación de éste. Por ejemplo, la fórmula $-C(O)_2R'-$ representa tanto $-C(O)_2R'-$ como $-R'C(O)_2-$. Tal como se ha descrito más arriba, los grupos heteroalquilo, tal como se utilizan aquí, incluyen grupos que están unidos al resto de la molécula por un heteroátomo, como -C(O)R', -C(O)NR', -NR'R", -OR', -SR', y/o $-SO_2R'$. Cuando se menciona "heteroalquilo" seguido de menciones de grupos heteroalquilo específicos, como -NR'R" o similares, se ha de entender que los términos heteroalquilo y -NR'R" no son redundantes ni mutuamente exclusivos. Más bien, los grupos heteroalquilo específicos se mencionan para añadir claridad. Por consiguiente, el término "heteroalquilo" no ha de ser interpretado aquí como excluyente de grupos heteroalquilo específicos, como -NR'R" o similares.

Los términos "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", por sí mismos o en combinación con otros términos, representan, a no ser que se indique otra cosa, versiones cíclicas de "alquilo" "heteroalquilo", respectivamente. Además, en el caso del heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la que el heterociclo está unido al resto de la molécula. Ejemplos de cicloalquilo incluyen, de forma no exclusiva, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo y similares. Ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, de forma no

exclusiva, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofuran-2-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, tetrahidrotien-2-ilo, tetrahidrotien-3-ilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo y similares. Un "cicloalquileno" y un "heterocicloalquileno", individualmente o como parte de otro sustituyente, significan un radical divalente derivado de un cicloalquilo y un heterocicloalquilo, respectivamente.

Los términos "halo" o "halógeno", por sí mismos o como parte de otro sustituyente, significan, a no ser que se indique otra cosa, un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo. Adicionalmente, los términos tales como "haloalquilo" incluyen monohaloalquilo y polihaloalquilo. Por ejemplo, el término "haloalquilo(C_1-C_4)" incluye, de forma no exclusiva, fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 4-clorobutilo, 3-bromopropilo y similares.

El término "acilo" significa -C(O)R, siendo R un alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido o heteroarilo sustituido o no sustituido.

El término "arilo" significa, a no ser que se indique otra cosa, un sustituyente hidrocarburo aromático poliinsaturado que puede consistir en un único anillo o en múltiples anillos (preferentemente de 1 a 3 anillos) que están fusionados entre sí (es decir un arilo de anillos fusionados) o enlazados de forma covalente. Un arilo de anillos fusionados se refiere a múltiples anillos fusionados entre sí, siendo al menos uno de los anillos fusionados un anillo arilo. El término "heteroarilo" se refiere a grupos (o anillos) arilo que contienen de uno a cuatro heteroátomos seleccionados entre N, O y S. Los átomos de nitrógeno y azufre están opcionalmente oxidados y el o los átomos de nitrógeno están opcionalmente cuaternizados. Por consiguiente, el término "heteroarilo" incluye grupos heteroarilo de anillos fusionados (es decir, múltiples anillos fusionados entre sí, siendo al menos uno de los anillos fusionados un anillo heteroaromático). Un heteroarileno de anillos fusionados 5,6 se refiere a dos anillos fusionados entre sí, en los que un anillo tiene 5 miembros y el otro anillo tiene 6 miembros, consistiendo al menos un anillo en un anillo heteroarilo. Del mismo modo, un heteroarileno de anillos fusionados 6,6 se refiere a dos anillos fusionados entre sí, en los que un anillo tiene 6 miembros y el otro anillo tiene 6 miembros, consistiendo al menos un anillo en un anillo heteroarilo. Y un heteroarileno de anillos fusionados 6,5 se refiere a dos anillos fusionados entre sí, en los que un anillo tiene 6 miembros y el otro anillo tiene 5 miembros, consistiendo al menos un anillo en un anillo heteroarilo. Un grupo heteroarilo puede estar unido al resto de la molécula a través de un carbono o de un heteroátomo. Ejemplos no limitativos de grupos arilo y heteroarilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenil-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-bencimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 3-quinolilo y 6-quinolilo. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillo de arilo y heteroarilo arriba indicados se seleccionan entre el grupo de sustituyentes aceptables descritos más abajo. Un "arileno" y un "heteroarileno", individualmente o como parte de otro sustituyente, significan un radical divalente derivado de un arilo y un heteroarilo, respectivamente.

Para una mayor brevedad, el término "arilo", cuando se utiliza en combinación con otros términos (por ejemplo ariloxi, ariltioxi, arilalquilo) incluye tanto anillos arilo como anillos heteroarilo tal como se definen más arriba. Por consiguiente, el término "arilalquilo" incluye aquellos grupos donde un grupo arilo está unido a un grupo alquilo (por ejemplo bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares), incluyendo los grupos alquilo en los que un átomo de carbono (por ejemplo un grupo metileno) está sustituido, por ejemplo, con un átomo de oxígeno (por ejemplo fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo y similares).

Tal como se utiliza aquí, el término "oxo" significa oxígeno que está unido a un átomo de carbono por un enlace doble.

Tal como se utiliza aquí, el término "alquilsulfonilo" significa una fracción de fórmula -S(O_2)-R', en la que R' es un grupo alquilo tal como se define más arriba. R' puede tener un número específico de carbonos (por ejemplo "alquilsulfonilo(C_1-C_4) ").

Cada uno de los términos arriba indicados (por ejemplo "alquilo", "heteroalquilo", "arilo" y "heteroarilo") incluyen tanto formas sustituidas como formas no sustituidas del grupo indicado. Más abajo se indican sustituyentes preferentes para cada tipo de grupo.

Los sustituyentes para los grupos alquilo y heteroalquilo (incluyendo los grupos frecuentemente designados como alquileno, alquenilo, heteroalquileno, heteroalquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquenilo y heterocicloalquenilo) pueden ser uno o más de una variedad de grupos seleccionados, de forma no limitativa, entre: -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -halógeno, -SiR'R"R"', -OC(O)R', -C(O)R', -CO_2R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', -NR'-C(O)NR"R"', -NR"C(O_2)R', -NR-C(NR'R"R"")=NR"", -NR-C(NR'R")=NR"', -S(O)R', -S(O_2)R', -S(O_2)NR'R", -NRSO_2R', -CN y -NO_2, en un número entre cero y (2m'+1), siendo m' el número total de átomos de carbono en dicho grupo. R', R", R"' y R"" se refieren en cada caso, independientemente entre sí, a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido (por ejemplo arilo sustituido con 1-3 halógenos), grupos alquilo, alcoxi o tioalcoxi sustituidos o no sustituidos, o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto aquí reivindicado incluye más de un

grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente, al igual que cada grupo R', R", R'" y R"" en caso de presencia de más de uno de estos grupos. Cuando R' y R" están unidos al mismo átomo de nitrógeno, se pueden combinar con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 4, 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo, -NR'R" incluye, de forma no exclusiva, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir de la anterior descripción de sustituyentes, los expertos en la técnica entenderán que el término "alquilo" comprende grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos diferentes a los grupos hidrógeno, como haloalquilo (por ejemplo $-CF_3$ y $-CH_2CF_3$) y acilo (por ejemplo, $-C(O)CH_3$, $-C(O)CF_3$, $-C(O)CH_2OCH_3$) y similares.

De modo similar a los sustituyentes descritos para alquilo, los sustituyentes para los grupos arilo y heteroalrilo son variados y se seleccionan, por ejemplo, entre: halógeno, -OR', -NR'R", -SR', -halógeno, -SiR'R"R'", -OC(O)R', -C(O)R', $-CO_2R'$, -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', -NR'-C(O)NR"R'", -NR"C(O)$_2$R', -NR-C(NR'R"R'")=NR"", -NR-C(NR'R")=NR'", -S(O)R', - S(O)$_2$R', -S(O)$_2$NR'R", $-NRSO_2R'$, -CN y $-NO_2$, -R', $-N_3$, $-CH(F)_2$, fluoroalcoxi(C_1-C_4), y fluoroalquilo(C_1-C_4), en un número entre cero y el número total de valencias abiertas en el sistema de anillo aromático; y seleccionándose R', R", R'" y R"" preferentemente de forma independiente entre hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido. cuando un grupo aquí reivindicado incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente, al igual que cada grupo R', R", R'" y R"" en caso de presencia de más de uno de estos grupos.

Dos de los sustituyentes de átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden formar opcionalmente un anillo de fórmula -T-C(O)-(CRR')$_q$-U-, en la que T y U son independientemente NR-, -O-, -CRR'- o un enlace simple, y q es un número entero de 0 a 3. Alternativamente, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo se pueden sustituir opcionalmente por un sustituyente de fórmula -A-(CH$_2$)$_r$-B-, en la que A y B son independientemente -CRR'-, -O-, -NR-, -S-, -S(O)-, -S(O)$_2$-, -S(O)$_2$NR'- o un enlace simple, y r es un número entero de 1 a 4. Uno de los enlaces simples del nuevo anillo así formado se puede sustituir opcionalmente por un enlace doble. Alternativamente, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo se pueden sustituir opcionalmente por un sustituyente de fórmula -(CRR')$_s$-X'-(C"R'")$_d$-, en la que s y d son independientemente números enteros de 0 a 3, y X' es -O-, -NR'-, -S-, -S(O)-, -S(O)$_2$-, o -S(O)$_2$NR'-. Los sustituyentes R, R', R" y R'" preferentemente se seleccionan de forma independiente entre hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, y heteroarilo sustituido o no sustituido.

Tal como se utiliza aquí, el concepto "heteroátomo" o "heteroátomo de anillo" incluye oxígeno (O), nitrógeno (N), azufre (S), fósforo (P), y silicio (Si).

Tal como se utiliza aquí, un "grupo sustituido" significa un grupo seleccionado de entre las siguientes fracciones:

(A) -OH, $-NH_2$, -SH, -CN, $-CF_3$, $-NO_2$, oxo, halógeno, alquilo no sustituido, heteroalquilo no sustituido, cicloalquilo no sustituido, heterocicloalquilo no sustituido, arilo no sustituido, heteroarilo no sustituido, y

(B) alquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, y heteroarilo, sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado entre:

(i) oxo, -OH, $-NH_2$, -SH, -CN, $-CF_3$, $-NO_2$, halógeno, alquilo no sustituido, heteroalquilo no sustituido, cicloalquilo no sustituido, heterocicloalquilo no sustituido, arilo no sustituido, heteroarilo no sustituido, y

(ii) alquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, y heteroarilo, sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado entre:

(a) oxo, -OH, $-NH_2$, -SH, -CN, $-CF_3$, $-NO_2$, halógeno, alquilo no sustituido, heteroalquilo no sustituido, cicloalquilo no sustituido, heterocicloalquilo no sustituido, arilo no sustituido, heteroarilo no sustituido, y

(b) alquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo, sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado entre oxo, -OH, $-NH_2$, -SH, -CN, $-CF_3$, $-NO_2$, halógeno, alquilo no sustituido, heteroalquilo no sustituido, cicloalquilo no sustituido, heterocicloalquilo no sustituido, arilo no sustituido y heteroarilo no sustituido.

Tal como se utiliza aquí, un "sustituyente de tamaño limitado" o "grupo sustituyente de tamaño limitado" significa un grupo seleccionado entre todos los sustituyentes arriba descritos en relación con un "grupo sustituyente", en el que cada alquilo sustituido o no sustituido es un alquilo(C_1-C_{20}) sustituido o no sustituido, cada heteroalquilo sustituido o no sustituido es un heteroalquilo de 2 a 20 miembros sustituido o no sustituido, cada cicloalquilo sustituido o no sustituido es un cicloalquilo(C_4-C_8) sustituido o no sustituido, y cada heterocicloalquilo sustituido o no sustituido es un heterocicloalquilo de 4 a 8 miembros sustituido o no sustituido.

Tal como se utiliza aquí, un "sustituyente inferior" o "grupo sustituyente inferior" significa un grupo seleccionado entre todos los sustituyentes arriba descritos en relación con un "grupo sustituyente", en el que cada alquilo sustituido o no sustituido es un alquilo(C_1-C_8) sustituido o no sustituido, cada heteroalquilo sustituido o no sustituido es un heteroalquilo de 2 a 8 miembros sustituido o no sustituido, cada cicloalquilo sustituido o no sustituido es un cicloalquilo(C_5-C_7) sustituido o no sustituido, y cada heterocicloalquilo sustituido o no sustituido es un heterocicloalquilo de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido.

El concepto "sales farmacéuticamente aceptables" incluye sales de los compuestos activos que se preparan con ácidos o bases relativamente no tóxicas, dependiendo de los sustituyentes particulares que se encuentran en los compuestos aquí reivindicados. Cuando los compuestos aquí reivindicados contienen funcionalidades relativamente ácidas, se pueden obtener sales de adición de base poniendo en contacto la forma neutra de dichos compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, bien pura, bien en un disolvente inerte adecuado. Ejemplos de sales de adición de base farmacéuticamente aceptables incluyen sal de sodio, potasio, calcio, amonio, amina orgánica o magnesio, o una sal similar. Cuando los compuestos aquí reivindicados contienen funcionalidades relativamente básicas, se pueden obtener sales de adición de ácido poniendo en contacto la forma neutra de dichos compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, bien puro, bien en un disolvente inerte adecuado. Ejemplos de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen las sales derivadas de ácidos inorgánicos, como los ácidos clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, yodhídrico o fosforoso, y similares, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos, como los ácidos acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, oxálico, metanosulfónico y similares. También están incluidas sales de aminoácidos tales como arginato y similares, y sales de ácidos orgánicos tales como los ácidos glucorónico o galacturónico y similares (véase, por ejemplo, Berge y col., "Farmaceutical Salts", Journal of Farmaceutical Science, 1977, 66, 1-19). Determinados compuestos específicos aquí reivindicados contienen tanto funcionalidades básicas como funcionalidades ácidas que permiten convertir los cuerpos en sales de adición de base o sales de adición de ácido.

Por consiguiente, los compuestos aquí reivindicados pueden existir en forma de sales, por ejemplo con ácidos farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de tales sales incluyen clorhidratos, bromhidratos, sulfatos, metanosulfonatos, nitratos, maleatos, acetatos, citratos, fumaratos, tartratos (por ejemplo (+)-tartratos, (-)-tartratos o mezclas de los mismos, incluyendo mezclas racémicas), succinatos, benzoatos y sales con aminoácidos tales como ácido glutámico. Estas sales se pueden preparar mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Las formas neutras de los compuestos preferentemente se regeneran poniendo en contacto la sal con una base o ácido y aislando el compuesto parental de modo convencional. La forma parental del compuesto se diferencia de las diversas formas salinas en determinadas propiedades físicas, como la solubilidad en disolventes polares.

Determinados compuestos aquí reivindicados se pueden presentar tanto en formas no solvatadas como en formas solvatadas, incluyendo formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a las formas no solvatadas y están incluidas dentro del alcance aquí reivindicado. Determinados compuestos aquí reivindicados se pueden presentar en múltiples formas cristalinas o amorfas. En general, todas las formas físicas son equivalentes para los usos considerados dados a conocer aquí.

Determinados compuestos aquí reivindicados poseen átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o enlaces dobles; racematos, diastereoisómeros, tautómeros, isómeros geométricos e isómeros individuales. Los compuestos aquí reivindicados no incluyen aquellos que son conocidos en la técnica por ser demasiado inestables para la síntesis y/o aislamiento.

Cuando un sustituyente de un compuesto aquí proporcionado está "sustituido con R" (por ejemplo, sustituido con R^1), ello significa que el sustituyente está sustituido con uno o más de los grupos R mencionados (por ejemplo R^1) del modo apropiado. En algunas realizaciones, el sustituyente está sustituido únicamente con uno de los grupos R mencionados.

Los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren a cualquier indicio de éxito en el tratamiento o la mejoría de una lesión, patología o enfermedad, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo como moderación; remisión; disminución de síntomas o hacer la lesión, patología o enfermedad más tolerable para el paciente; ralentización de la velocidad de degeneración o deterioro; hacer el punto final de la degeneración menos debilitante; mejorar el bienestar físico o mental de un paciente. El tratamiento o la mejoría de síntomas se pueden basar en parámetros objetivos o subjetivos, incluyendo los resultados de un examen físico, exámenes neuropsiquiátricos y/o evaluación psiquiátrica. Por ejemplo, los métodos determinados aquí presentados tratan con éxito el cáncer disminuyendo la incidencia de éste, inhibiendo su desarrollo y/o provocando la remisión del cáncer.

Una "cantidad eficaz" es una cantidad de un compuesto aquí reivindicado suficiente para contribuir al tratamiento, la prevención o la reducción de uno o más síntomas de una enfermedad, o para inhibir el efecto de un amiloide en relación con la ausencia del compuesto. Cuando se menciona en referencia al tratamiento de una enfermedad, una "cantidad eficaz" también se puede designar como una "cantidad terapéuticamente eficaz". Una "reducción" de uno o

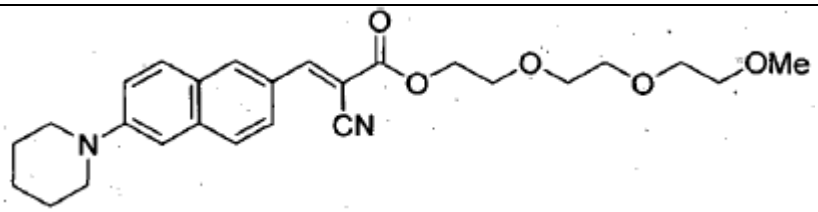
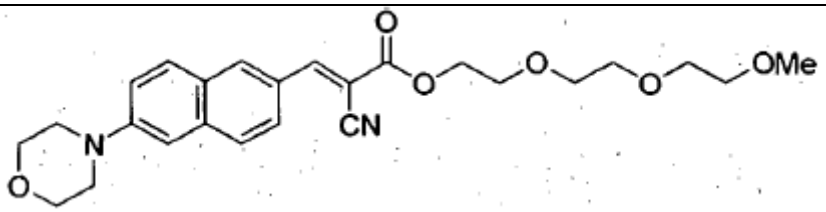
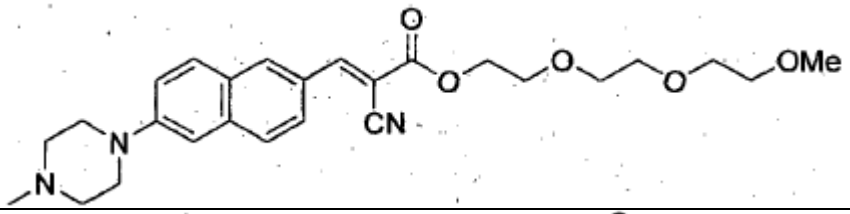
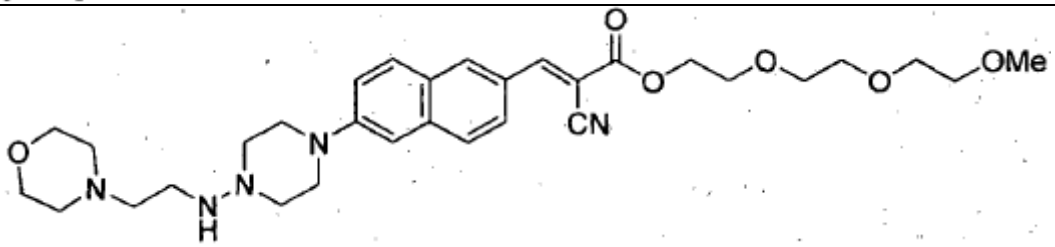
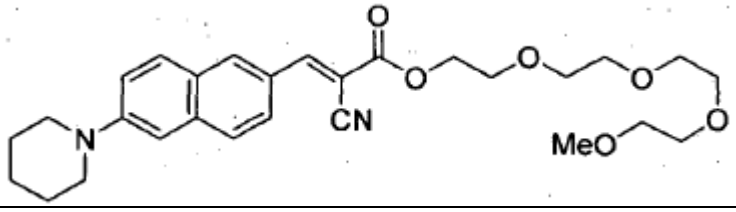
más síntomas (y equivalentes gramaticales de esta frase) significa la disminución de la gravedad o frecuencia del síntoma o los síntomas, o la eliminación del síntoma o los síntomas. Una "cantidad profilácticamente eficaz" de un fármaco es una cantidad de un fármaco que al ser administrada a un sujeto tendrá el efecto profiláctico previsto, por ejemplo prevenir o retrasar la aparición (o reaparición) de una enfermedad, o reducir las probabilidades de aparición (o reaparación) de una enfermedad o sus síntomas. El efecto profiláctico completo no se produce necesariamente mediante la administración de una dosis y puede que sólo tenga lugar después de la administración de una serie de dosis. Por consiguiente, una cantidad profilácticamente eficaz se puede administrar en una o más administraciones. Tal como se utiliza aquí, una "actividad reductora de la actividad" se refiere a la cantidad de un antagonista requerida para reducir la actividad de una enzima en relación con la ausencia del antagonista. Tal como se utiliza aquí, una "actividad alteradora de la función" se refiere a la cantidad de un antagonista requerida para alterar la función de un osteoclasto o leucocito en relación con la ausencia del antagonista.

II. Compuestos de unión a amiloides

En un aspecto se proporcionan compuestos que se asocian a un amiloide (o amiloides) y/o a un péptido de amiloide (o péptidos amiloides).

Los compuestos de las fórmulas aquí proporcionadas son uno o más de los compuestos mostrados en la siguiente Tabla 1:

Tabla 1. Compuestos

Comp.	Estructura
11	
29	
28	
30	
31	

III. Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, las composiciones farmacéuticas aquí reivindicadas (es decir, formulaciones) pueden incluir un compuesto aquí reivindicado en combinación con un excipiente (es decir, vehículo) farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas incluyen isómeros ópticos, diastereoisómeos, o sales farmacéuticamente aceptables de los inhibidores que aquí se dan a conocer. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas incluyen un compuesto aquí reivindicado y citrato como sal farmacéuticamente aceptable. El compuesto incluido en la composición farmacéutica puede estar unido de forma covalente a una fracción vehículo, tal como se describe más arriba. Alternativamente, el compuesto incluido en la composición farmacéutica no está unido de forma covalente a una fracción vehículo.

Tal como se utiliza aquí, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a excipientes farmacéuticos, por ejemplo sustancias vehículo orgánicas e inorgánicas farmacéutica y fisiológicamente aceptables adecuadas para la administración enteral o parenteral que no reaccionen de forma perjudicial con el principio activo. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen agua, soluciones salinas (como solución de Ringer), alcoholes, aceites, gelatinas y carbohidratos, como lactosa, amilosa o almidón, ésteres de ácidos grasos, hideroximetilcelulosa y polivinilpirrolidona. Estas preparaciones se pueden esterilizar y, si así se desea, mezclar con adyuvantes tales como lubricantes, conservantes, estabilizadores, humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, sustancias colorantes y/o aromáticas y similares que no reaccionen de forma perjudicial con los compuestos que aquí se dan a conocer.

Los compuestos aquí reivindicados se pueden administrar solos o se pueden coadministrar al sujeto. La coadministración significa que incluye una administración simultánea o secuencial de los compuestos individualmente o en combinación (más de un compuesto). Las preparaciones también se pueden combinar, si así se desea, con otras sustancias activas (por ejemplo para reducir la degradación metabólica).

A. Formulaciones

Los compuestos se pueden preparar y administrar en una gran variedad de formas de administración oral, parenteral y tópica. Por consiguiente, los compuestos aquí reivindicados se pueden administrar por inyección (por ejemplo intravenosa, intramuscular, intracutánea, subcutánea, intraduodenal o intraperitoneal). Además, los compuestos aquí reivindicados se pueden administrar por inhalación, por ejemplo vía intranasal. Adicionalmente, los compuestos aquí reivindicados se pueden administrar vía transdérmica. También está prevista la utilización de múltiples vías de administración (por ejemplo intramuscular, oral, transdérmica) para administrar los compuestos aquí reivindicados. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas pueden incluir un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable y uno o más compuestos aquí reivindicados.

Para la preparación de composiciones farmacéuticas a partir de los compuestos aquí reivindicados, los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser sólidos o líquidos. Las preparaciones en forma sólida incluyen polvos, tabletas, píldoras, cápsulas, sellos, supositorios y gránulos dispersables. Un vehículo sólido puede consistir en una o más sustancias que también pueden actuar como diluyentes, aromatizantes, aglutinantes, conservantes, agentes disgregantes de tabletas, o un material de encapsulación.

En los polvos, el vehículo consiste en un sólido finamente dividido en una mezcla con el componente activo finamente dividido. En las tabletas, el componente activo se mezcla con el vehículo que tiene las propiedades aglutinantes necesarias en proporciones adecuadas y se compacta con la forma y el tamaño deseados.

Los polvos y tabletas contienen preferentemente entre un 5% y un 70% del compuesto activo. Vehículos adecuados son carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, una cera de bajo punto de fusión, manteca de cacao y similares. El término "preparación" ha de incluir aquí la formulación del compuesto activo con un material de encapsulación como vehículo que proporciona una cápsula en la que el componente activo, con o sin otros vehículos, está rodeado por un vehículo, que está así asociado con el mismo. Del mismo modo, también están incluidos los sellos y pastillas. Las tabletas, los polvos, las cápsulas, las píldoras, los sellos y las pastillas pueden ser utilizados como formas de dosificación sólidas adecuadas para la administración oral.

La preparar supositorios, primero se funde una cera de bajo punto de fusión, como una mezcla de glicéridos de ácido graso o manteca de cacao, y el componente activo se dispersa homogéneamente dentro de la misma. La mezcla homogénea fundida se vierte en moldes de tamaño conveniente y se dejan enfriar, solidificándose.

Las preparaciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones, por ejemplo agua o soluciones de agua/propilenglicol. Para la inyección parenteral se pueden formular preparaciones líquidas en solución en una solución acuosa de polietilenglicol.

Cuando se requiere o se desea una administración parenteral, mezclas particularmente adecuadas de los compuestos aquí reivindicados son inyectables, con soluciones estériles inyectables, preferentemente soluciones

oleaginosas o acuosas, así como suspensiones, emulsiones o implantes, incluyendo supositorios. En particular, los vehículos para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de dextrosa, solución salina, agua pura, etanol, glicerol, propilenglicol, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, polímeros de bloques de polioxietileno y similares. Las ampollas son dosis unitarias convenientes. Los compuestos aquí reivindicados también se pueden incorporar en liposomas o se pueden administrar a través de parches o bombas transdérmicas. Las mezclas farmacéuticas adecuadas para ser utilizadas aquí incluyen las descritas, por ejemplo, en Pharmaceutical Sciences (Edición 17, Mack Pub. Co., Easton, PA) y el documento WO 96/05309, estando incorporadas aquí por referencia las enseñanzas de ambos documentos.

Las soluciones acuosas adecuadas para uso oral se pueden preparar disolviendo el componente activo en agua y añadiendo agentes colorantes, aromatizantes, estabilizadores y espesantes adecuados como se desee. Las suspensiones acuosas adecuadas para uso oral se pueden preparar dispersando el componente activo finamente dividido en agua con un material viscoso, como gomas naturales o sintéticas, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y otros agentes de suspensión conocidos.

También están incluidas preparaciones en forma sólida previstas para ser convertidas, poco antes de su uso, en preparaciones en forma líquida para la administración oral. Estas formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones. Estas preparaciones pueden contener, además del componente activo, agentes colorantes, aromatizantes, estabilizadores, tampones, edulcorantes artificiales y naturales, dispersantes, espesantes, solubilizadores y similares.

Preferentemente, la preparación farmacéutica está en forma de dosis unitarias. En esta forma, la preparación está dividida en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma en dosis unitarias puede consistir en una preparación envasada, conteniendo el envase cantidades discretas de la preparación, por ejemplo tabletas o cápsulas envasadas y polvos en viales o ampollas. Además, la forma en dosis unitaria puede consistir en la propia cápsula, tableta, sello o pastilla, o puede haber una cantidad apropiada de éstos en forma envasada.

La cantidad de componente activo en una preparación en dosis unitarias se puede variar o ajustar entre 0,1 y 10.000 mg, más típicamente entre 1,0 mg y 1.000 mg, de forma totalmente típica entre 10 mg y 500 mg, de acuerdo con la aplicación particular y la potencia del componente activo. Si así se desea, la composición también puede contener otros agentes terapéuticos compatibles.

Algunos compuestos pueden tener una solubilidad limitada en agua y, en consecuencia, pueden requerir un agente tensioactivo u otro codisolvente apropiado en la composición. Estos codisolventes incluyen: Polisorbato 20, 60 y 80; Pluronic F-68, F-84 y P-103; ciclodextrina; y aceite de ricino polioxil 35. Estos codisolventes se emplean normalmente en una cantidad entre aproximadamente el 0,01% y aproximadamente el 2% en peso.

Puede ser deseable una viscosidad mayor que la de simples soluciones acuosas para reducir la variabilidad en la dispensación de las formulaciones, para reducir la separación física de componentes de una suspensión o emulsión de la formulación y/o para mejorar de otro modo la formulación. Los agentes aumentadores de la viscosidad incluyen, por ejemplo, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, sulfato de condroitina y sus sales, ácido hialurónico y sus sales, y combinaciones de los mismos. Estos agentes se emplean típicamente en una cantidad entre aproximadamente el 0,01% y aproximadamente el 2% en peso.

Las composiciones aquí reivindicadas pueden incluir adicionalmente componentes que proporcionen una liberación continua y/o comodidad. Estos componentes incluyen polímeros mucomiméticos aniónicos de alto peso molecular, polisacáridos gelificantes y sustratos soporte de fármaco finamente divididos. Estos componentes se describen con mayor detalle en las Patentes US nº 4.911.920, 5.403.841, 5.212.162 y 4.861.760. El contenido íntegro de estas patentes se incorpora aquí por referencia para todos los fines.

B. Dosis eficaces

Las composiciones farmacéuticas aquí proporcionadas incluyen composiciones que contienen el ingrediente activo en una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, en una cantidad eficaz para lograr su objetivo previsto. La cantidad eficaz real para una aplicación en particular dependerá, entre otras cosas, de la enfermedad a tratar. Por ejemplo, si se administran en métodos para tratar el cáncer, estas composiciones contendrán una cantidad de ingrediente activo eficaz para obtener el resultado deseado (por ejemplo, reducir la cantidad de células cancerosas en un sujeto).

La dosis y la frecuencia (dosis simples o múltiples) del compuesto administrado pueden variar dependiendo de diversos factores, incluyendo la vía de administración; el tamaño, la edad, la salud, el peso corporal, el índice de masa corporal y la dieta del receptor; la naturaleza y la magnitud de los síntomas de la enfermedad tratada; la presencia de otras enfermedades o problemas relacionados con la salud; el tipo de tratamiento concurrente; y

complicaciones de cualquier enfermedad o régimen de tratamiento. Junto con los métodos y compuestos aquí descritos se pueden utilizar otros regímenes o agentes terapéuticos.

La cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los compuestos aquí reivindicados se puede determinar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular conocidos en la técnica.

Las cantidades terapéuticamente eficaces a utilizar en humanos se pueden determinar a partir de modelos animales. Por ejemplo, se puede formular una dosis para humanos para alcanzar una concentración que se ha comprobado eficaz en animales.

Las dosis pueden variar dependiendo de los requisitos del paciente y del compuesto empleado. La dosis administrada a un paciente debería ser suficiente para provocar una respuesta terapéutica beneficiosa en el paciente con el paso del tiempo. La magnitud de la dosis también se determinará por la existencia, la naturaleza y la magnitud de los eventuales efectos secundarios adversos. Por regla general, el tratamiento se inicia con dosis más pequeñas, que son inferiores a la dosis óptima del compuesto. Después, la dosis se aumenta en pequeños incrementos hasta alcanzar el efecto óptimo bajo determinadas circunstancias. En una realización, el intervalo de dosis es del 0,001% al 10% p/v. En otra realización, el intervalo de dosis es del 0,1% al 5% p/v.

Las cantidades y los intervalos de las dosis se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles del compuesto administrado eficaces para la indicación clínica particular tratada. Esto proporcionará un régimen terapéutico acorde con la gravedad del estado de enfermedad del individuo.

Utilizando las enseñanzas que aquí se proporcionan se puede plantear un régimen de tratamiento profiláctico o terapéutico que no provoque una toxicidad esencial y siga siendo totalmente eficaz para tratar los síntomas clínicos presentados por el paciente en particular. Esta planificación debería implicar la elección cuidadosa del compuesto activo teniendo en cuenta factores tales como la potencia del compuesto, la biodisponibilidad relativa, el peso corporal del paciente, la presencia y gravedad de efectos secundarios adversos, el modo de administración preferente y el perfil de toxicidad del agente seleccionado.

C. Toxicidad

La relación entre la toxicidad y el efecto terapéutico de un compuesto particular es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación entre LD_{50} (la cantidad de compuesto letal en un 50% de la población) y ED_{50} (la cantidad de compuesto eficaz en un 50% de la población). Son preferentes los compuestos que presentan altos índices terapéuticos. Los datos de índice terapéutico obtenidos de ensayos de cultivo celular y/o estudios en animales pueden ser utilizados para formular un rango de dosis a utilizar en humanos. Las dosis de estos compuestos están incluidas preferentemente en un intervalo de concentración plasmática que incluye la ED_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Véase, por ejemplo, Fingl y col., en: THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, Cap. 1, p. 1, 1975. La formulación exacta, la vía de administración y la dosis pueden ser elegidas por el médico particular en vista del estado del paciente y el método particular en el que se utiliza el compuesto.

IV. Métodos de uso

Un "complejo amiloide" se designa aquí como un complejo de un compuesto aquí reivindicado y al menos un péptido amiloide (por ejemplo, un agregado de péptidos amiloides). Los compuestos aquí reivindicados pueden formar un complejo con un amiloide mediante diversas interacciones, como interacciones no covalentes (por ejemplo interacciones hidrófobas o enlaces de hidrógeno).

Los amiloides aquí descritos pueden estar compuestos por al menos una molécula de péptido amiloide. Un péptido amiloide se designa aquí como un péptido o proteína que puede formar parte o que puede formar un amiloide en asociación con otros péptidos o proteínas. Los amiloides aquí descritos pueden estar compuestos por cualquier péptido o proteína amiloide conocidos por formar amiloides. En algunas realizaciones, los amiloides incluyen múltiples péptidos amiloide y/o moléculas de péptido amiloide. En algunas realizaciones, un amiloide incluye una molécula de péptido amiloide agregada con una o más moléculas de péptido amiloide.

En algunas realizaciones, los péptidos amiloide pueden incluir péptido Aβ, proteína priónica, α-sinucleína o superóxido dismutasa. En algunas realizaciones, los péptidos amiloide pueden incluir una parte de péptido Aβ, proteína priónica, α-sinucleína o superóxido dismutasa o un fragmento funcional de éstos. En algunas realizaciones, un péptido amiloide y/o amiloide se puede solvatar en solución y unir a uno o más de los compuestos aquí reivindicados. En algunas realizaciones, los amiloides incluyen péptidos amiloide que están dispuestos en lámina β, de modo que posibilitan la unión de los compuestos aquí reivindicados. En algunas realizaciones, los compuestos aquí reivindicados presentan una fluorescencia incrementada (en comparación con la solución libre) cuando están unidos con amiloides e interactúan con éstos a través de interacciones hidrófobas.

En otro aspecto no reivindicado, los métodos dados a conocer incluyen métodos de ensayo de estos compuestos para detectar la unión de los mismos con amiloides y/o péptidos amiloides. Utilizando técnicas conocidas en la actualidad y la guía aquí proporcionada, los compuestos candidatos se pueden ensayar fácilmente para comprobar su capacidad para unirse a amiloides. Por ejemplo, algunos agentes de unión de amiloides que tienen la estructura de las fórmulas aquí proporcionadas o de realizaciones de las mismas se pueden ensayar utilizando ensayos *in vitro*. En algunas realizaciones, los ensayos *in vitro* pueden incluir la medida de la fluorescencia de estos compuestos cuando se unen a amiloides en comparación con la solución libre no unida a amiloides. En regla, un aumento de la fluorescencia indica unión a un amiloide. Las constantes de unión de estos compuestos también se pueden determinar utilizando técnicas conocidas en la actualidad. Por ejemplo se pueden utilizar estudios de unión competitiva para determinar la eficacia de los compuestos aquí reivindicados para inhibir, por ejemplo, interacciones de IgG-péptido Aβ. También se pueden emplear ensayos celulares para evaluar las propiedades de unión de agentes de unión de amiloides candidatos que tienen la estructura de las fórmulas aquí proporcionadas o de realizaciones de las mismas. Los ensayos celulares incluyen células de cualquier fuente apropiada, incluyendo células vegetales y animales (como células de mamífero). Los ensayos celulares también se pueden llevar a cabo en células humanas. La selección de métodos de ensayo apropiados está dentro del conocimiento del experto medio en la materia.

Una vez identificados compuestos capaces de unirse a amiloides *in vitro* y/o en una célula, los compuestos se pueden analizar adicionalmente en cuanto a su capacidad para unirse selectivamente a amiloides (por ejemplo en placas de amiloides) en modelos animales (por ejemplo animales completos, órganos de animales o tejidos de animales). Por consiguiente, los compuestos aquí reivindicados se pueden analizar adicionalmente en modelos celulares o modelos animales en cuanto a su capacidad para provocar cambios detectables en el fenotipo en relación con un péptido amiloide y/o un amiloide particular. Además de los cultivos celulares, también se pueden utilizar modelos animales para analizar los compuestos aquí reivindicados en cuanto a su capacidad para tratar, por ejemplo, enfermedades asociadas a amiloides en un modelo animal. En algunas realizaciones, los compuestos aquí reivindicados pueden ser utilizados para visualizar amiloides en tejido animal. En algunas realizaciones, el tejido animal es tejido humano.

En otro aspecto se proporciona el uso en un método para tratar una enfermedad asociada con péptidos amiloide y/o amiloides en un sujeto que requiera dicho tratamiento. En algunas realizaciones, la enfermedad puede estar caracterizada por una acumulación de amiloides (por ejemplo placas de amiloides) en un sujeto. El uso en estos métodos puede incluir la administración al sujeto de una cantidad eficaz (por ejemplo una cantidad terapéuticamente eficaz) de un compuesto que tiene la estructura de las fórmulas aquí proporcionadas (o de una realización correspondiente tal como se describe más arriba).

Tal como se utiliza aquí, el término "sujeto" se refiere a un mamífero al que se administra una composición o formulación farmacéutica. Ejemplos de sujetos incluyen humanos y también animales de veterinaria y laboratorio, como caballos, cerdos, ganado bovino, perros, gatos, conejos, ratas, ratones y mamíferos acuáticos. En algunas realizaciones, el sujeto es un humano.

En algunas realizaciones, la enfermedad puede incluir la enfermedad de Alzheimer, encefalopatía espongiforme bovina (EEB), la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, síndrome de Down, demencia con cuerpos de Lewi o esclerosis lateral amiotrófica (ELA). En algunas realizaciones, el péptido amiloide es péptido Aβ y la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer. En algunas realizaciones, el uso en métodos de tratamiento aquí descrito incluye el uso en un método para tratar la enfermedad de Alzheimer. En algunas realizaciones, el uso en métodos de tratamiento aquí descrito incluye el uso en un método para tratar la enfermedad de Parkinson.

V. Ejemplos

Ejemplo 1

Procedimiento general para la preparación de compuestos aquí descritos y en los Ejemplos 1a-1m. En un matraz de fondo redondo que contenía una solución de aldehído (5,0 mmol) y 2-cianoacetato de 2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etilo (5,5 mmol) en 20 ml de THF se añadieron 0,50 mmol de piperidina y la mezcla ser calentó a 50ºC. La reacción se controló mediante CCF y se completó en un plazo de 21 horas. La mezcla bruta se concentró bajo presión reducida y el producto se purificó mediante cromatografía flash (10-30% de acetato de etilo en hexano).

Notas generales: Todos los reactivos se obtuvieron (Aldrich, Acros) con la máxima calidad comercial y se utilizaron sin ninguna purificación adicional, excepto en los casos indicados. Los líquidos y soluciones sensibles al aire y la humedad se transfirieron mediante una jeringuilla o una cánula de acero inoxidable. Las soluciones orgánicas se concentraron mediante evaporación por rotación por debajo de 45ºC a aproximadamente 20 mmHg. Todas las reacciones no acuosas se llevaron a cabo bajo condiciones anhidras. Los rendimientos se refieren a materiales cromatográfica y espectroscópicamente (^{1}H RMN, ^{13}C RMN) homogéneos, a no ser que se indique otra cosa. Las reacciones se controlaron mediante cromatografía de capa fina (CCF) en placas de gel de sílice E. Merck de 0,25 mm (60F-254) y se visualizaron bajo luz UV y/o desarrollaron mediante inmersión en soluciones de ácido fosfomolíbdico (AFM) etanólico al 10% o p-anisaldehído y aplicando calor. Para la cromatografía flash se utilizó gel

de sílice E. Merk (60, tamaño de partícula 0,040-0,063 mm). Las separaciones por cromatografía de capa fina preparativa se llevaron a cabo sobre placas de gel de sílice E. Merck de 0,25 o 0,50 mm (60F-254). Los espectros de RMN se registraron en instrumentos Varian Mercury 300 o 400 MHz y se calibraron utilizando el disolvente no deuterado residual como referencia interna. Las siguientes abreviaturas se utilizaron para explicar las multiplicidades: s = singlete, d = doblete, t = triplete, q = cuarteto, m = multiplete, b = ancha. Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se registraron en un espectrómetro de masas VG 7070 HS bajo condiciones de ionización por electrospray (IES) o impacto electrónico (IE). Los datos de espectroscopia de fluorescencia se registraron en un MD-5020 Photon Technology International Spectrophotometer a 25ºC.

Para la síntesis de compuestos aquí descritos era importante una condensación de Knoevenagel de 1 equivalente del aldehído apropiado, ejemplo 6, con 1,1 equivalentes del derivado de ácido malónico apropiado, ejemplo 7. Véase el Esquema 1. Esta reacción se catalizó mediante piperidina (10%) y se completó en un plazo de 21 horas en THF bajo reflujo. Véase X. H. Chen, Z. J. Zhao, Y. Liu, P. Lu, Y. G. Wang, Chemistry Letters 2008, 37:570-571; M. A. Haidekker, T. P. Brady, D. Lichlyter, E. A. Theodorakis, Journal of the American Chemical Society 2006, 128:398-399. Después de una purificación cromatográfica estándar sobre gel de sílice se aisló el producto deseado **8** con excelentes rendimientos (Tabla 2). Reactivos y condiciones para el Esquema 1: (a) 1,0 equivalentes 6, 1,1 equivalentes 7, 0,1 equivalentes piperidina, THF, 50 °C, 21 h.

Esquema 1

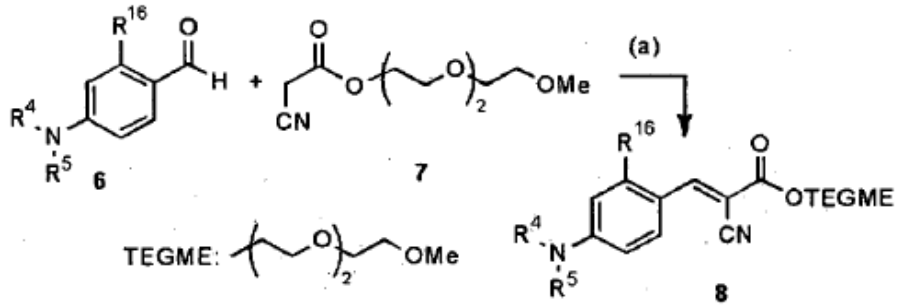
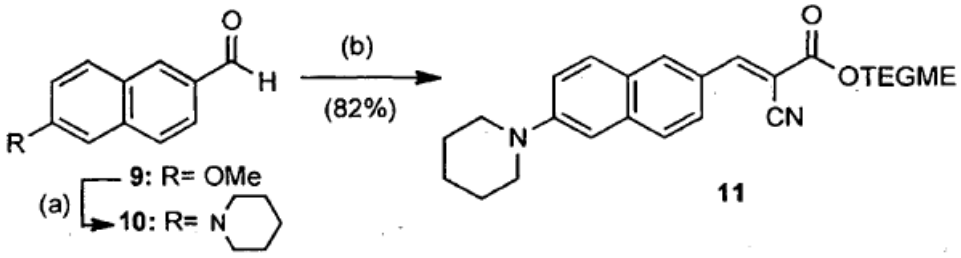


Tabla 2. Estructuras y rendimientos de los Compuestos 8a-8d (no reivindicados)

Compuesto nº	R^4	R^5	Rendimiento (%)
8a	Me	H	98
8b	Me	OMe	98
8c	Et	H	90
8d	*n*Bu	H	78

El **Compuesto 11** basado en naftaleno se sintetizó mediante tratamiento de un metoxinaftaldehído **9** comercial con ocho equivalentes de piperidina litiada y condensación de Knoevenagel del aldehído resultante **10** con ciano éster **7** (Esquema 2, 29% rendimiento *combinado*). Véase H. M. Guo, F. Tanaka, J. Org. Chem. 2009, 74:2417-2424. Reactivos y condiciones para el Esquema 2: (a) 8,0 equivalentes de piperidina en benceno/HMPA: 1/1, 0ºC, 8,0 equivalentes de nBuLi, 0ºC, 15 minutos, después 1,0 equivalentes **9**, 25ºC, 12 h, 35%; (b) 1,0 equivalentes **10**, 1,1 equivalentes 7, 0,1 equivalentes de piperidina, THF, 50ºC, 21 h, 82%. En algunas realizaciones R^4, R^5 y R^{16} pueden corresponder a R^4, R^5 y R^{16} arriba descritos.

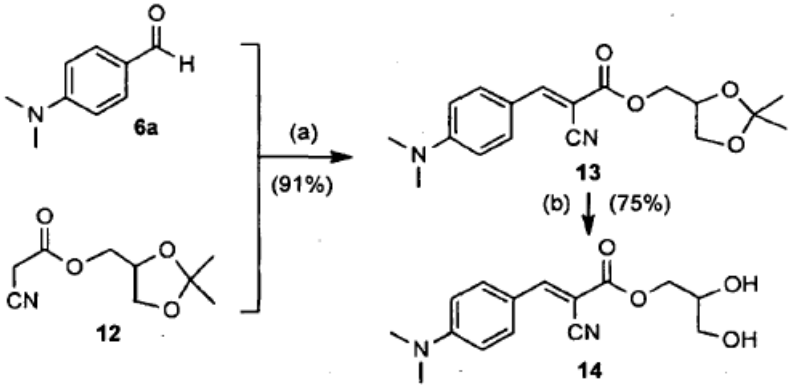
Esquema 2



El **compuesto 14** (no reivindicado) se preparó mediante condensación del aldehído **6a** con el α-ciano éster 12, seguido de una desprotección catalizada por ácido de la unidad acetónido (Esquema 3, 68% rendimiento combinado). Véase M. A. Haidekker, T. P. Brady, S. H. Chalian, W. Akers, D. Lichlyter, E. A. Theodorakis, Bioorg. Chem. 2004, 32:274-289. Reactivos y condiciones para el Esquema 3: (a) 1,0 equivalentes **6a**, 1,1 equivalentes 12,

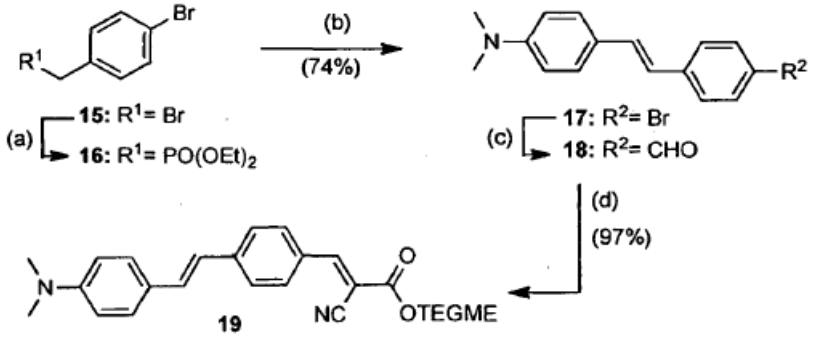
0,1 equivalentes de piperidina, THF, 50ºC, 21 h, 91%; (b) 1,5 mmol **13**, 0,10 g DOWEX- H+,1:1 THF/MeOH, 25ºC, 20 h, 75%.

Esquema 3



El **Compuesto 19** basado en estilbeno (no reivindicado) se sintetizó en cuatro pasos que incluían; (a) conversión de bromuro de bencilo **15** en fosfonato **16**; (b) olefinación de Horner-Emmons de **16** con el aldehído **6a** para formar **17**; (c) litiación de bromuro **17** y formulación para producir el aldehído **18**; y (d) condensación de Knoevenagel del aldehído resultante **18** con el ciano éster 7 (Esquema 4, 42% rendimiento combinado). Véase H. Meier, E. Karpuk, H. C. Holst, Eur. J. Org. Chem. 2006, 2609-2617; L. Viau, O. Maury, H. Le Bozec, Tetrahedron Lett. 2004, 45:125-128. Reactivos y condiciones para el Esquema 4: (a) 1,0 equivalentes **15**, 15 equivalentes de trietil-fosfito, 90ºC, 19 h, 98%; (b) 1,0 equivalentes **16**, 1,0 equivalentes de NaOMe, 1,0 equivalentes **6a**, DMF en exceso, 25ºC, 24 h, 74%; (c) 1,0 equivalentes **17**, 1,0 equivalentes de n-BuLi, 1,33 equivalentes de DMF, THF, -78ºC, 60%; (d) 1,0 equivalentes **18**, 1,1 equivalentes 7, 0,1 equivalentes de piperidina, THF, 50ºC, 21 h, 97%. R^1 y R^2 en el Esquema 4 son específicos para el Esquema 4 y no están concebidos para que correspondan a R^1 y R^2 arriba descritos.

Esquema 4



Ejemplo 1a. 2-ciano-3-(4-(dimetilamino)fenil)acrilato de (E)-2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etilo (8a) (no reivindicado). 98%; sólido amarillo; ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,07 (s, 1H), 7,93 (d, 2H, *J* = 9,0 Hz), 6,69 (d, 2H, *J* = 9,1 Hz), 4,41 (m, 2H), 3,81-3,79 (m, 2H), 3,73-3,65 (m, 6H), 3,56-3,54 (m, 2H), 3,37 (s, 3H), 3,10 (s, 6H); ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 164,2, 154,7, 153,6, 134,1, 119,3, 117,4, 111,4, 93,6, 71,9, 70,8, 70,6, 70,5, 68,9, 65,0, 59,0, 40,0; HRMS calculado para $C_{19}H_{26}N_2O_5$ $(M)^+$ 362,1836, hallado 362,1841.

Ejemplo 1b. 2-ciano-3-(4-(dimetilamino)-2-metoxifenil)acrilato de (E)-2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etilo (8b) (no reivindicado). Rendimiento 98%; sólido amarillo; ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,64 (s,1H), 8,39 (d, 1H, *J* = 9,2 Hz), 6,63 (dd, 1H, *J* = 2,3 Hz, *J* = 9,2 Hz), 6,01 (s, 1H), 4,40 (m, 2H), 3,87 (s, 3H), 3,81-3,78 (m, 2H), 3,73- 3,65 (m, 6H), 3,56-3,53 (m, 2H), 3,36 (s, 3H), 3,10 (s, 6H); ^{13}C RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 165,0, 162,2, 155,9, 148,5, 131,3, 118,4, 109,7, 105,4, 93,0, 92,0, 72,2, 71,1, 70,9, 70,8, 69,2, 65,1, 59,3, 55,6, 40,4; HRMS calculado para $C_{20}H_{28}N_2O_6$ $(M+Na)^+$ 415,1840, hallado 415,1836.

Ejemplo 1c. 2-ciano-3-(4-(dietilamino)fenil)acrilato de (Z)-2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etilo (8c) (no reivindicado). Rendimiento 90%; líquido naranja; ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,05 (s, 1H), 7,92 (d, 2H, *J* = 9,1 Hz), 6,67 (d, 2H, *J* = 9,2 Hz), 4,42 (m, 2H), 3,82-3,79 (m, 2H), 3,73-3,72 (m, 2H), 3,69-3,65 (m, 4H), 3,57-3,54 (m, 2H), 3,45 (q, 4H, *J* = 7,1 Hz), 3,37 (s, 3H), 1,23 (t, 6H, *J* = 7,1 Hz); ^{13}CRMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 164,7, 154,8, 151,9, 134,8, 119,0, 117,8, 111,4, 93,0, 72,2, 71,1, 70,9, 70,8, 69,2, 65,2, 59,3, 45,0, 12,8; HRMS calculado para $C_{21}H_{30}N_2O_5$ $(M+Na)^+$ 413,2047, hallado 413,2053.

Ejemplo 1d. 2-ciano-3-(4-(dibutilamino)fenil)acrilato de (Z)-2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etilo (8d) (no reivindicado). Rendimiento 78%; líquido amarillo; ^{1}HRMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,00 (s, 1H), 7,87 (d, 2H, *J* = 9,0 Hz), 6,60 (d, 2H, *J* = 9,2 Hz), 4,38 (m, 2H), 3,78-3,76 (m, 2H), 3,71-3,69 (m, 2H), 3,66-3,62 (m, 4H), 3,53-3,51 (m, 2H), 3,34-3,30 (m, 7H), 1,57 (m, 4H), 1,34 (m, 4H), 0,94 (t, 6H, *J* = 7,3 Hz); ^{13}CRMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 164,7, 154,7, 152,2, 134,6, 118,9, 117,9, 111,5, 92,8, 72,1, 71,0, 70,8, 69,1, 65,2, 59,2, 51,1, 29,5, 20,4, 14,1; HRMS calculado para $C_{25}H_{38}N_2O_5$ $(M+Na)^+$ 469,2673, hallado 469,2677.

Ejemplo 1e. 6-(piperidin-1-il)-2-naftaldehído (10) (no reivindicado). En un matraz de fondo redondo de 50 ml que contenía benceno (3 ml), HMPA (3 ml) y piperidina (1,65 ml, 16,7 mmol) se añadió n-BuLi (1,6 M en hexano, 10,4 ml, 16,7 mmol) por medio de una jeringuilla, a 0ºC. Después de agitar durante 15 minutos, la mezcla de reacción se trató con una solución de 6-metoxi-2-naftaldehído (390 mg, 2,09 mmol) en benceno: HMPA 1:1 (2 ml). La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente, se agitó durante 12 horas y después se vertió en NaCl acuoso al 5% frío (30 ml). La mezcla se extrajo con dietil éter (3 x 20 ml), se secó sobre $MgSO_4$ y se concentró. El producto se purificó mediante cromatografía flash (20% EtOAc en hexanos) para obtener el compuesto 9. 9: rendimiento 35%, sólido amarillo; ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 10,02 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 7,88-7,73 (m, 2H), 7,67 (d, 1H, *J* = 8,6 Hz), 7,32 (dd, 1H, *J* = 2,5 Hz, *J* = 9,1 Hz), 7,08 (d, 1H, *J* = 2,4 Hz), 3,42-3,32 (m, 4H), 1,85-1,57 (m, 6H); ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 192,2, 152,2, 138,8, 134,7, 131,6, 130,7, 127,5, 126,5, 123,6, 119,7, 109,0, 49,8, 25,8, 24,6; HRMS calculado para $C_{16}H_{17}NO(M+H)^+$ 240,1383, hallado 240,1387.

Ejemplo 1f. 2-ciano-3-(6-(piperidin-1-il)naftalen-2-il)acrilato de (E)-2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etilo (11). Rendimiento 82%; líquido rojo; ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,30 (s, 1H), 8,22 (d, 1H, *J* = 1,2 Hz), 8,10 (dd, 1H, *J* = 1,8 Hz, *J* = 8,8 Hz), 7,76 (d, 1H, *J* = 9,2 Hz), 7,65 (d, 1H, *J* = 8,8 Hz), 7,29 (dd, 1H, *J* = 2,4 Hz, *J* = 9,2 Hz), 7,05 (d, 1H, *J* = 2,2 Hz), 4,47 (m, 2H), 3,85-3,82 (m, 2H), 3,74-3,66 (m, 6H), 3,57-3,54 (m, 2H), 3,42-3,38 (m, 4H), 3,37 (s, 3H), 1,74-1,67 (m, 6H); ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_{13}$) δ 163,4, 155,5, 151,9, 137,8, 134:7, 130,6, 127,3, 126,4, 126,0, 125,7, 119,3, 116,4, 108,4, 98,7, 71,9, 70,8, 70,6, 70,5, 68,8, 65,4, 59,0, 49,4, 25,5, 24,3; HRMS calculado para $C_{26}H_{32}N_2O_5$ $(M+H)^+$ 453,2384, hallado 453,2390.

Ejemplo 1g. 2-cianoacetato de (2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metilo (12) (no reivindicado). A una solución de ácido 2-cianoacético (1,02 g, 12 mmol) se añadió gota a gota a 0ºC el acetal (2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metanol (1,32 g, 10 mmol) en 5 ml de DCM y DMAP (61 mg, 0,50 mmol). Finalmente se añadió EDC 1,86 g (12 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 0ºC durante 6 horas. La reacción se diluyó con 15 ml de DCM y el DCU formado se filtró. El filtrado se secó con $MgSO_4$ anhidro y los disolventes se retiraron bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía flash (Hex: EtOAc; 10:1) para obtener el compuesto 12. 12: rendimiento 71%; líquido incoloro; ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4,34-4,32 (m, 1H), 4,28-4,17 (m, 2H), 4,07 (dd, 1H, *J* = 6,5 Hz, *J* = 8,5 Hz), 3,75 (dd, 1H, *J* = 5,8 Hz, *J* = 8,5 Hz), 3,51 (s, 2H), 1,41 (s, 3H), 1,34 (s, 3H); HRMS calculado para $C_9H_{13}NO_4(M+H)^+$ 200,0923, hallado 200,0931.

Ejemplo 1h. 2-ciano-3-(4-(dimetilamino)fenil)acrilato de (E)-(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metilo (13) (no reivindicado). En un matraz de fondo redondo que contenía una solución de aldehído 6a (0,75 g, 5,0 mmol) y el compuesto 12 (1,2 g, 5,5 mmol) en 20 ml de THF se añadieron 0,50 mmol de piperidina y la mezcla se calentó a 50ºC. La mezcla bruta se concentró bajo presión reducida y el producto se purificó mediante cromatografía flash (10-30% acetato de etilo en hexano) para obtener el compuesto 13. 13: rendimiento 91%; sólido amarillo; ^{1}HRMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,08 (s, 1H), 7,94 (d, 2H, *J* = 9,0 Hz), 6,69 (d, 2H, *J* = 9,2 Hz), 4,42-4,29 (m, 3H), 4,13 (dd, 1H, *J* = 6,2 Hz, *J* = 8,6 Hz), 3,89 (dd, 1H, *J* = 5,9 Hz, *J* = 8,5 Hz), 3,11 (s, 6H), 1,46 (s, 3H), 1,38 (s, 3H); ^{13}CRMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 164,3, 155,3, 153,9, 134,5, 119,5, 117,5, 111,7, 110,1, 93,3, 73,7, 66,7, 65,6, 40,3, 26,9, 25,7; HRMS calculado para $C_{18}H_{22}N_2O_4(M+H)^+$ 331,1658, hallado 331,1691.

Ejemplo 1i. 2-ciano-3-(4-(dimetilamino)fenil)acrilato de (E)-2,3-dihidroxipropilo (14) (no reivindicado). El compuesto 13 (0,5 g, 1,5 mmol) se disolvió en una mezcla de THF/MeOH (1:1) y se le añadió resina DOWEX-H^+ (0,10 g), y la mezcla heterogénea se agitó durante 20 horas. La resina DOWEX-H^+ se retiró por filtración y se añadió trietilamina (50 mg, 0,5 mmol), y el disolvente se retiró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía flash (100% éter) para obtener el compuesto 14. 14: rendimiento 75%; sólido amarillo intenso; ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,08 (s, 1H), 7,94 (d, 2H, *J* = 9,1 Hz), 6,69 (d, 2H, *J* = 9,2 Hz), 4,42-4,32 (m, 2H), 4,05 (m, 1H), 3,80-3,70 (m, 2H), 3,12 (s, 6H); ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 199,0, 164,8, 155,5, 154,0, 134,6, 119,4, 117,9, 111,8, 111,7, 92,8, 70,3, 70,2, 66,9, 66,8, 63,6, 63,5, 40,3, 40,2; HRMS calculado para $C_{15}H_{18}N_2O_4$ $(M+H)^+$ 291,1345, hallado 291,1361.

Ejemplo 1j. 4-bromobencilfosfonato de dietilo (16) (no reivindicado). En un matraz de fondo redondo se mezclaron 1-bromo-4-(bromometil)benceno (5,0 g, 20 mmol) y trietil-fosfito (51 ml, 300 mmol) y se sometieron a reflujo a 90ºC durante 19 horas. El trietil-fosfito se retiró bajo presión reducida y el producto se purificó mediante cromatografía flash (1:1 hexano/EtOAc) para obtener el compuesto **16**. **16:** rendimiento 98%; líquido incoloro; ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,30 (d, 2H, *J* = 7,5 Hz), 7,05 (d, 2H, *J* = 7,6 Hz), 3,99- 3,88 (m, 4H), 2,99 (s, 1H), 2,94 (s, 1H), 1,12 (t, 6H, *J* = 6,9 Hz); ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 131,7, 131,6, 131,5, 121,0, 62,3, 34,0, 32,0, 16,5; HRMS calculado para $C_{11}H_{16}BrO_3P$ $(M+H)^+$ 307,0097, hallado 307,0093.

Ejemplo 1k. (E)-4-(4-bromoestiril)-N,N-dimetilanilina (17) (no reivindicado). En primer lugar se añadió DMF (anhidro) (10,5 ml) a metóxido de sodio (176 mg, 3,26 mmol) y el color cambió a rosa. A la solución arriba indicada se añadió gota a gota a lo largo de 2 minutos 4-bromobencilfosfonato de dietilo (1,0 g, 3,26 mmol) en DMF (6,5 ml), seguido de 4 (dimetilamino)benzaldehído (486 mg, 3,26 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Después se añadió agua desionizada (17 ml). El producto se filtró por filtración en vacío y se recristalizó con DCM/hexano para obtener el compuesto 17. 17: rendimiento 74%; sólido de color canela; ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,47-7,32 (m, 6H), 7,04 (d, 1H, *J* = 12,5 Hz), 6,83 (d, 1H, *J* = 16,3 Hz), 6,71 (d, 2H, *J* = 8,9 Hz), 2,99 (s, 6H); ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 150,5, 137,4, 136,1, 132,1, 131,8, 129,7, 128,3, 128,2, 127,9, 127,7, 125,5, 123,2, 120,3, 112,6, 40,7; HRMS calculado para $C_{16}H_{16}BrN$ 302,0541, hallado 302,0539.

Ejemplo 1l. 4-(4-(dimetilamino)estiril)benzaldehído (18) (no reivindicado). El compuesto 17 (300 mg, 1 mmol) se transfirió a un matraz de fondo redondo, seguido de THF (5 ml). La solución heterogénea se enfrió a -78ºC y luego se añadió gota a gota a lo largo de 5 minutos n-BuLi (1,6 M en hexano, 1 mmol), seguido por DMF (1,5 ml). La mezcla de reacción se agitó a -78ºC durante 3 horas y después se extinguió con agua (1 ml), y la mezcla se extrajo con éter (2 x 25 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron con $MgSO_4$ y se concentraron bajo presión reducida para obtener el compuesto **18**. **18:** rendimiento 60%; polvo amarillo; ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9,96 (s, 1H), 7,83 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz), 7,60 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz), 7,44 (d, 2H, *J* = 8,8 Hz), 7,22 (d, 1H, *J* = 16,2 Hz), 6,94 (d, 1H, *J* = 16,2 Hz), 6,72 (d, 2H, *J* = 8,8 Hz), 3,01 (s, 6H); ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 191,8, 150,8, 144,7, 134,7, 134,6, 132,7, 130,4, 128,4, 126,4, 124,9, 122,8, 112,4, 40,5; HRMS calculado para $C_{17}H_{17}NO$ 252,1384, hallado 252,1383.

Ejemplo 1m. Ciano-3-(4-(4(dimetilamino)estiril)fenil)acrilato de (E)-2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etilo (19) (no reivindicado). Rendimiento 97%; sólido rojo; ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,20 (s, 1H), 7,98 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz), 7,57 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz), 7,45 (d, 2 H, *J* = 8,7 Hz), 7,20 (d, 1H, *J* = 16,2 Hz), 6,92 (d, 1H, *J* =16,2 Hz), 6,72 (d, 2H, *J* = 8,7 Hz), 4,47 (m, 2H), 3,84- 3,82 (m, 2H), 3,74-3,72 (m, 2H), 3,70-3,66 (m, 4H), 3,57-3,55 (m, 2H), 3,37 (s, 3H), 3,02 (s, 6H); ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 154,9, 133,0, 132,2, 128,6, 128,5, 126,7, 122,7, 112,4, 72,2, 71,1, 70,8, 69,0, 65,8, 59,3, 40,6, 40,5, 29,9, 28,2; HRMS calculado para $C_{27}H_{32}N_2O_5$ $(M+Na)^+$ 487,2203, hallado 487,2201.

Ejemplo 2. Síntesis de los Compuestos 27 (no reivindicado), 28-31, 32 (no reivindicado) y 33 (no reivindicado). Los resultados de los análisis de compuestos aquí descritos se proporcionan en los siguientes Ejemplos 2a-2o.

Notas generales: Todos los reactivos se adquirieron con la máxima calidad comercial y se utilizaron sin ninguna purificación adicional, excepto en los casos indicados. Los líquidos y soluciones sensibles al aire y la humedad se transfirieron mediante una jeringuilla o una cánula de acero inoxidable. Las soluciones orgánicas se concentraron mediante evaporación por rotación por debajo de 45ºC a aproximadamente 20 mmHg. Todas las reacciones no acuosas se llevaron a cabo bajo condiciones anhidras. Los rendimientos se refieren a materiales cromatográfica y espectroscópicamente (^{1}H RMN, ^{13}C RMN) homogéneos, a no ser que se indique otra cosa. Las reacciones se controlaron mediante cromatografía de capa fina (CCF) realizada en placas de gel de sílice Dynamic Adsorbents, Inc. de 0,25 mm (60F-254) y se visualizaron bajo luz UV y/o desarrollaron mediante inmersión en soluciones de ácido fosfomolíbdico (AFM) etanólico al 10%. Para la cromatografía flash se utilizó gel de sílice Dynamic Adsorbents, Inc. (60, tamaño de partícula 0,040-0,063 mm). Los espectros de RMN se registraron en los instrumentos Varian Mercury 400, 300 y/o Unity 500 MHz y se calibraron utilizando el disolvente no deuterado residual como referencia interna. Las siguientes abreviaturas se utilizaron para explicar las multiplicidades: s = singlete, d = doblete, t = triplete, q = cuarteto, m = multiplete, b = ancha. Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se registraron en un espectrómetro de masas VG 7070 HS bajo condiciones de ionización por electrospray (IES) o impacto electrónico (IE).

En el esquema 5 srepresentada una estrategia general para la síntesis de compuestos aquí descritos, incluyendo los compuestos 27-33. Un 6-bromo naftaleno-2-carboxilato de metilo (20) comercial se convirtió en el naftaldehído correspondiente 21 en dos pasos: a) reducción del éster en el alcohol primario utilizando DIBALH y b) oxidación del alcohol en el aldehído después de un tratamiento con PCC. Granzhan, A.; Teulade-Fichou, M.-P., Tetrahedron 2009, 65, (7), 1349-1360. La transformación del bromuro en la amina apropiada requirió el uso de una química nueva para mejorar el rendimiento y aplicar el método a mayor escala. El tratamiento de bromuro 21 en presencia de paladio utilizando condiciones de Buchwald y Hartwig condujo a los aldehídos 22-25 con un rendimiento excelente en la mayoría de los casos. Guram, A. S.; Rennels, R. A.; Buchwald, S. L., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1995, 34, (12), 1348-1350; Wolfe, J. P.; Buchwald, S. L., J. Org. Chem. 2000, 65, (4), 1144-1157; Hartwig, J. F., Accounts Chem. Res. 2008,41, (11), 1534-1544. Una condensación de Knövenagel de los aldehídos **22-25** y el cianoéster apropiado **26** concluyó la síntesis de las sondas finales **27-32**. Sutharsan, J.; Lichlyter, D.; Wright, N. E.; Dakanali, M.; Haidekker, M. A.; Theodorakis, E. A., Tetrahedron 2010, 66, (14), 2582-2588. La desprotección del acetal en la sonda **32** utilizando resina ácida produjo el tinte final **33**. La tabla 3 resume las combinaciones R, X de los productos finales y los rendimientos de condensación.

Esquema 5. Estrategia general para la síntesis de las sondas **27-33**

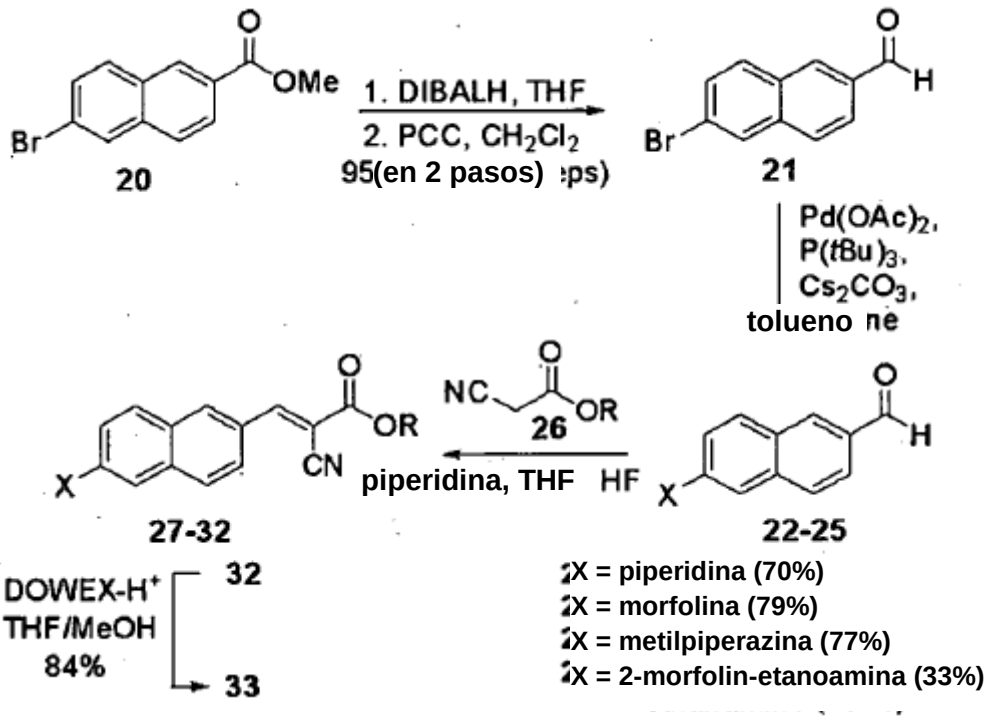
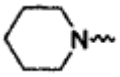
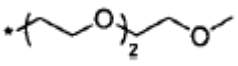
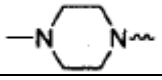
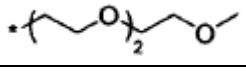
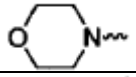
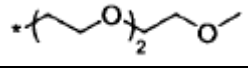
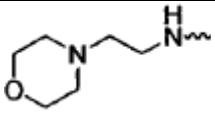
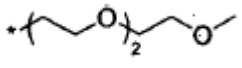
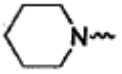
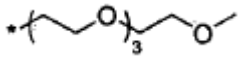
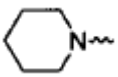
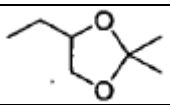
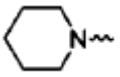
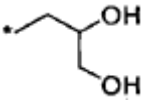


Tabla 3. Estructuras y rendimientos de las sondas de unión Aβ

Compuesto	X	R	Rendimiento
27 (no reivindicado)			90%
28			85%
29			83%
30			87%
31			89%
32 (no reivindicado)			83%
33 (no reivindicado)			84%

Ejemplo 2a. 6-bromo-2-naftaldehído (21) (no reivindicado). A una solución de DIBAL-H (1,0 M en heptano, 34 ml, 34 mmol) a 0ºC se añadió bajo argón gota a gota una solución de **20** (3,0 g, 11 mmol) en THF anhidro. Después se dejó que la mezcla de reacción se calentara a temperatura ambiente y se agitó durante una noche. Una vez completada la agitación se añadió MeOH, seguido por una solución saturada de tartrato de sodio-potasio y acetato de etilo. Después se separaron las dos fases, la fase orgánica se lavó con una disolución saturada de cloruro de amonio y salmuera, se secó con $MgSO_4$ y se concentró bajo presión reducida para obtener 6-bromo-2-(hidroximetil)naftaleno. ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,99 (bs, 1H), 7,77 (bs, 1H), 7,74 (d, 1H, *J* = 8,5 Hz), 7,69 (d, 1H, *J* = 8,7 Hz), 7,55 (dd, 1H, *J* = 1,7 Hz, *J* = 8,7 Hz), 7,49 (dd, 1H, *J* = 1,7 Hz, *J* = 8,5 Hz), 4,84 (bs, 2H); ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 138,8, 133,9, 131,7, 129,7, 129,5, 129,5, 127,4, 126,1, 125,2, 119,8, 65,2.

A una suspensión de clorocromato de piridinio (2,4 g, 11 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (60 ml) se añadió una solución del alcohol arriba indicado en CH_2Cl_2 anhidro y la reacción se calentó bajo reflujo durante 5 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se enfrió a temperatura ambiente y se vertió en dietil éter. Después, la solución se filtró a través de un tampón de sílice y se concentró bajo presión reducida para obtener **21** (2,4 g, 95%). 20: sólido blanco; ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10,15 (s, 1H), 8,31 (bs, 1H), 8,08 (bs, 1H), 7,98 (dd, 1H, *J* = 1,5 Hz, *J* = 8,5 Hz), 7,86 (m, 2H), 7,67 (dd, 1H, *J* = 1,5 Hz, *J* = 8,5 Hz); ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 191,8, 137,3, 134,3, 134,1, 131,0, 131,0, 130,6, 130,2, 128,2, 124,0, 123.

Procedimiento general para la síntesis de naftaldehídos 6-amino-sustituidos (Compuestos 22-25) (no reivindicados). A tolueno seco y desgasificado (0,8 ml) se añadieron $Pd(OAc)_2$ (0,022 mmol) y $P(tBu)_3$ (0,078 mmol). Después de 20 minutos de agitación se añadieron 8 (0,207 mmol), la amina apropiada (0,249 mmol) y Cs_2CO_3 (0,280 mmol) y la reacción se agitó durante tres días bajo reflujo. Tres días después, la reacción se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con CH_2Cl_2, se filtró, se concentró bajo presión reducida y se purificó mediante cromatografía flash en gel de sílice (hexanos/EtOAc 0-10%).

Ejemplo 2b. 6-(piperidin-1-il)naftaleno-2-carbaldehído (22) (no reivindicado). Rendimiento 70%, sólido amarillo; ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10,03 (s, 1H), 8,15 (s, 1H), 7,83 (m, 2H), 7,68 (d, 1H, *J* = 8,6 Hz) 7,32 (dd, 1H, *J* = 2,4 Hz, *J* = 9,1 Hz), 7,08 (d, 1H, *J* = 2,4 Hz), 3,38 (m, 4H), 1,78-1,63 (m, 6H); ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 191,9, 151,9, 138,5, 134,4, 131,3, 130,4, 127,2, 126,3, 123,4, 119,5, 108,8, 49,6, 25,5, 24,3; HRMS calculado para $C_{16}H_{18}NO$ $(M+H)^+$ 240,1383 hallado 240,1381.

Ejemplo 2c. 6-morfolinonaftaleno-2-carbaldehído (23) (no reivindicado). Rendimiento 79%, sólido amarillo; ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10,06 (s, 1H), 8,20 (s, 1H), 7,88 (m, 2H), 7,73 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz), 7,32 (m, 1H), 7,11 (d, 1H, *J* = 1,2 Hz), 3,92 (m, 4H), 3,36 (m, 4H); ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 191,9, 151,3, 138,1, 134,2, 131,8, 130,6, 127,5, 127,0, 123,6, 118,7, 109,0, 66,7,48,5; HRMS calculado para $C_{15}H_{15}NO_2Na$ $(M+Na)^+$ 264,0995, hallado 264,0996.

Ejemplo 2d. 6-(4-metilpiperazin-1-il)naftaleno-2-carbaldehído (24) (no reivindicado). Rendimiento 77%, sólido amarillo; ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 10,00 (s, 1H), 8,13 (s, 1H), 7,80 (m, 2H), 7,66 (d, 1H, J = 8,6 Hz), 7,28 (dd, 1H, J = 2,1 Hz, J = 9,2 Hz), 7,06 (d, 1H, J = 2,1 Hz), 3,36 (m, 4H), 2,57 (m, 4H), 2,33 (s, 3H); ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 191,5, 151,0, 138,0, 134,0, 131,3, 130,2, 127,1, 126,4, 123,1, 118,7, 108,7, 54,5, 47,8, 45,7; HRMS calculado para $C_{16}H_{19}N_2O$ $(M+H)^+$ 255,1492, hallado 255,1491.

Ejemplo 2e. 6-(2-morfolinoetilamino)naftaleno-2-carbaldehído (25) (no reivindicado). Rendimiento 33%, amarillo sólido; ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10,01 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 7,83 (dd, 1H, J = 1,6 Hz, J = 8,6 Hz), 7,76 (d, 1H, J = 8,9 Hz), 7,64 (d, 1H, J = 8,6 Hz), 6,98 (dd, 1H, J = 2,3 Hz, J = 8,9 Hz), 6,79 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 4,88 (bs, 1H), 3,75 (m, 4H), 3,31 (dd, 2H, J = 5,1 Hz, J = 11,1 Hz), 2,72 (m, 2H), 2,51 (bs, 4H); ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 191,9, 148,8, 139,1, 134,6, 130,8, 130,7, 126,6, 126,0, 123,8, 118,7, 103,8, 66,9, 56,7, 53,3, 39,3; HRMS calculado para $C_{17}H_{21}N_2O_2$ $(M+H)^+$ 285,1598, hallado 285,1600.

Procedimiento general para la síntesis de 2-cianoacetatos (26) (no reivindicado). A una solución de ácido 2-cianoacético (2,72 mmol) se añadió gota a gota a 0ºC el alcohol apropiado (2,27 mmol) en CH_2Cl_2 (2,5 ml) y DMAP (0,013 mmol). Finalmente se añadió DCC (2,72 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 0ºC durante 6 horas. La reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y el DCU formado se filtró. El filtrado se secó con $MgSO_4$ y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía flash para obtener el 2-cianoacetato 7.

Ejemplo 2f. 2-cianoacetato de 2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etilo (26a) (no reivindicado). Rendimiento 86%; líquido incoloro; ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4,29 (m, 2H), 3,67, (m, 2H), 3,59 (m, 6H), 3,50 (m, 2H), 3,49 (s, 2H), 3,32 (s, 3H); ^{13}C RMN (100MHz, $CDCl_3$) δ 163,0, 113,0, 71,7, 70,4, 70,3, 68,3, 65,5, 58,8, 24,5; HRMS: calculado para $C_{10}H_{17}NO_5$: $(M+H^+)$ 232,1185, hallado 232,1199.

Ejemplo 2g. 2-cianoacetato de 2-(2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etoxi)etilo (26b) (no reivindicado). Rendimiento 68%; líquido incoloro; ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4,21 (bs, 2H), 3,61 (bs, 2H), 3,51 (m, 12H), 3,43 (m, 2H), 3,24 (bs, 3H) ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 163,0, 113,0, 71,4, 70,2, 70,1, 70,1, 70,0, 68,1, 65,3, 58,5, 24,2.

Ejemplo 2h. 2-cianoacetato de (2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil (26c) (no reivindicado). Rendimiento 71%; líquido incoloro; ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4,35 (m, 1H), 4,29-4,19 (m, 2H), 4,09 (m, 1H), 3,76 (dd, 1H, J = 5,8 Hz, J = 8,6 Hz), 3,52 (s, 2H), 1,43 (s, 3H), 1,36 (s, 3H); ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 162,8, 112,7, 110,1, 73,0, 66,8, 65,9, 26,6, 25,2, 24,6; HRMS calculado para $C_9H_{13}NO_4$ $(M+H)^+$ 200,0923, hallado 200,0931.

Procedimiento general para la síntesis de las sondas fluorescentes 27 (no reivindicada), 28-31, 32 (no reivindicada) y 33 (no reivindicada). En un matraz de fondo redondo que contenía una solución de aldehído (0,21 mmol) y el 2-cianoacetato apropiado (0,23 mmol) en THF (0,8 ml), se añadió piperidina (0,02 mmol) y la mezcla se agitó a 50ºC. La reacción se controló mediante CCF y se completó en 21 horas. La mezcla bruta se concentró bajo presión reducida y el producto se purificó mediante cromatografía en columna flash (10-30% EtOAc en hexanos).

Ejemplo 2i. 2-ciano-3-(2-(piperidin-1-il)naftalen-6-il)acrilato de (E)-2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etilo (27) (no reivindicado). Rendimiento 90%; líquido rojo; ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,31 (s, 1H), 8,22 (bs, 1H), 8,10 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 7,76 (d, 1H, J = 9,2 Hz), 7,65 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 7,30 (dd, 1H, J = 2,1 Hz, J = 9,2 Hz), 7,05 (d, 1H, J = 2,1 Hz), 4,47 (m, 2H), 3,83 (m, 2H), 3,74-3,66 (m, 6H), 3,56 (m, 2H), 3,42-3,38 (m, 4H), 3,37 (s, 3H), 1,74 (m, 6H); ^{13}C RMN (100, MHz, $CDCl_3$) δ 163,3, 155,4, 151,9, 137,7, 134,7, 130,6, 127,2, 126,4, 125,9, 125,6, 119,2, 116,4, 108,3, 71,8, 70,7, 70,5, 70,5, 68,7, 65,3, 58,9, 49,3, 25,4, 24,3; HRMS calculado para $C_{26}H_{32}N_2O_5Na$ $(M+Na)^+$ 475,2203, hallado 475,2197.

Ejemplo 2j. 2-ciano-3-(2-(4-metilpiperazin-1-il)naftalen-6-il)acrilato de (E)-2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etilo (28). Rendimiento 85%; líquido rojo; ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,31 (s, 1H), 8,23 (s, 1H), 8,10 (d, 1H, *J* = 8,6 Hz), 7,78 (d, 1H, *J* = 9,1 Hz), 7,67 (d, 1H, *J* = 8,6 Hz), 7,29 (d, 1H, *J* = 9,1 Hz), 7,06 (s, 1H), 4,46 (m, 2H), 3,83 (m, 2H), 3,73 (m, 2H), 3,67 (m, 4H), 3,55 (m, 2H) 3,42 (bs, 4H), 3,36 (s, 3H), 2,61 (bs, 4H), 2,37 (s, 3H); ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 163,2, 155,4, 151,4, 137,5, 134,5, 130,6, 127,4, 126,9, 126,1, 126,1, 119,0, 116,2, 108,7, 99,3, 71,9, 70,8, 70,6, 70,5, 68,8, 65,4, 59,0, 54,8, 48,0, 46,1; HRMS calculado para $C_{26}H_{34}N_3O_5$ $(M+H)^+$ 468,2493, hallado 468,2494.

Ejemplo 2k. 2-ciano-3-(2-morfolinonaftalen-6-il)acrilato de (E)-2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etilo (29). Rendimiento 83%; líquido rojo; ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8,31 (s, 1H), 8,24 (s, 1H), 8,11 (dd, 1H, J = 1,9 Hz, J = 8,8 Hz), 7,80 (d, 1H, J = 9,1 Hz), 7,69 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 7,28 (m, 1H), 7,06 (d, 1H, J = 1,9 Hz), 4,47 (m, 2H), 3,90 (m, 4H), 3,83 (m, 2H), 3,70 (m, 6H), 3,55 (m, 2H), 3,35 (m, 7H); ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 163,0, 155,2, 151,3, 137,2, 134,4, 130,6, 127,4, 127,0, 126,1, 126,0, 118,5, 116,1, 108,5, 99,4, 71,8, 70,7, 70,5, 70,4, 68,6, 66,5, 65,3, 58,9, 48,2; HRMS calculado para $C_{25}H_{30}N_2O_6Na$ $(M+Na)^+$ 477,1996, hallado 477,1995.

Ejemplo 2l. 3-(2-(2-morfolinoetilamino)naftalen-6-il)-2-cianoacrilato de (E)-2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etilo (30). Rendimiento 87%; líquido rojo; ^{1}H RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8,28 (s, 1H), 8,19 (d, 1H, *J* = 1,6 Hz), 8,08 (dd, 1H, *J* = 1,9 Hz, *J* = 8,8 Hz), 7,69 (d, 1H, *J* = 8,9 Hz), 7,60 (d, 1H, *J* = 8,8 Hz), 6,95 (dd, 1H, *J* = 2,3 Hz, *J* = 8,8 Hz), 6,74 (d, 1H, *J* = 2,2 Hz), 4,96 (bs, 1H), 4,46 (m, 2H), 3,83 (m, 2H), 3,76-3,72 (m, 6H), 3,69-3,65 (m, 4H), 3,57-3,54 (m, 2H), 3,36 (s, 3H), 3,31 (s, 2H), 2,70 (m, 2H), 2,51 (s, 4H); ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 163,4, 155,5, 149,0, 138,3, 135,0, 130,9, 126,6, 126,3, 126,2, 124,9, 118,9, 116,5, 103,6, 98,2, 71,9, 70,8, 70,6, 70,5, 68,8, 66,9, 65,3, 59,0, 56,6, 53,2, 39,2; HRMS calculado para $C_{27}H_{36}N_3O_6$ $(M+H)^+$ 498,2599, hallado 498,2596.

Ejemplo 2m. 2-ciano-3-(2-(piperidin-1-il)naftalen-6-il)acrilato de (E)-2-(2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etoxi)etilo (31). Rendimiento 89%; líquido rojo; ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,20 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 8,01 (d, 1H, *J* = 8,5 Hz), 7,66 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz), 7,55 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz), 7,20 (d, 1H, *J* = 8,5 Hz), 6,95 (s, 1H), 4,39 (bs, 2H), 3,75 (bs, 2H), 3,65-3,54 (m, 10H), 3,45 (m, 2H), 3,31 (bs, 4H), 3,28 (s, 3H), 1,65-1,54 (m, 6H); ^{13}C NNM (100 MHz, $CDCl_3$) δ 163,2, 155,3, 151,8, 137,6, 134,6, 130,5, 127,1, 126,3, 125,8, 125,5, 119,1, 116,3, 108,2, 98,4, 71,7, 70,6, 70,4, 70,3, 68,6, 65,3, 58,8, 49,2, 25,3, 24,2; HRMS calculado para $C_{28}H_{36}N_2O_6Na$ $(M+Na)^+$ 519,2466, hallado 519,2468.

Ejemplo 2n. 2-ciano-3-(2-(piperidin-1-il)naftalen-6-il)acrilato de (E)-(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metilo (32) (no reivindicado). Rendimiento 83%; líquido rojo; ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,29 (s, 1H), 8,19 (s, 1H), 8,09 (dd, 1H, *J* = 1,9 Hz, *J* = 8,8 Hz), 7,74 (d, 1H, *J* = 9,3 Hz), 7,63 (d, 1H, *J* = 8,8 Hz), 7,28 (dd, 1H, *J* = 2,8 Hz, *J* = 9,3 Hz), 7,03 (d, 1H, *J* = 1,9 Hz), 4,43 (m, 1H), 4,36 (m, 2H), 4,14 (dd, 1H, *J* = 6,0 Hz, *J* = 8,5 Hz), 3,90 (dd, 1H, *J* = 6,0 Hz, *J* = 8,5 Hz), 3,40 (m, 4H), 1,73-1,66 (m, 6H), 1,48 (s, 3H), 1,39 (s, 3H); ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 162,9, 155,4, 151,5, 137,6, 134,6, 130,5, 127,0, 126,2, 125,6, 125,3, 119,0, 116,1, 109,6, 108,2, 98,0, 73,1, 65,9, 65,6, 57,1, 49,1, 45,5, 29,4, 26,4, 25,2, 24,0; MS $(M+H)^+$ 421,24.

Ejemplo 2o. 2-ciano-3-(2-(piperidin-1-il)naftalen-6-il)acrilato de (E)-2,3-dihidroxipropilo (33) (no reivindicado). El compuesto **31** (50 mg, 0,12 mmol) se disolvió en una mezcla de THF/MeOH (1:1) y se añadió resina DOWEX-H^+ (15 mg) y la mezcla heterogénea se agitó durante 20 horas. La resina se retiró por filtración y se añadió trietilamina y el disolvente se retiró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía flash para obtener el compuesto **32**. **32**: 38 mg, rendimiento 84%; líquido rojo; ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,30 (s, 1H), 8,19 (s, 1H), 8,08 (d, 1H, *J* = 8,8 Hz), 7,74 (d, 1H, *J* = 9,1 Hz), 7,63 (d, 1H, *J* = 9,1 Hz), 7,29 (m, 1H), 7,03 (s, 1H), 4,46-4,36 (m, 2H), 4,09 (m, 1H), 3,81 (dd, 1H, *J* = 5,5 Hz, *J* = 11,3 MHz), 3,73 (dd, 1H, *J* = 5,5 Hz, *J* = 11,3 Hz), 3,41 (m, 4H), 1,74-1,67 (m, 6H); ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 163,6, 156,0, 152,0, 137,9, 135,0, 130,7, 127,3, 126,3, 125,9, 125,5, 119,2, 116,6, 108,3, 97,8, 69,9, 67,0, 63,2, 49,3, 25,5, 24,3; HRMS calculado para $C_{22}H_{25}N_2O_4$ $(M+H)^+$ 381,1809, hallado 381,1802.

Ejemplo 3. Detección y estudios de unión.

Estudios correspondientes a los Compuestos 8a-8d (no reivindicados), 11, 14 (no reivindicado) y 18 (no reivindicado). Un estudio inicial para determinar si un compuesto se puede asociar con Aβ consiste en comparar sus espectros de fluorescencia antes y después de mezclarlo con los agregados Aβ. Véase E. E. Nesterov, J. Skoch, B. T. Hyman, W. E. Klunk, B. J. Bacskai, T. M. Swager, Angew. Chem. Int. Edit. 2005, 44:5452-5456; Z. P. Zhuang, M. P. Kung, H. F. Kung, J. Med. Chem. 2006, 49:2841-2844; Q. A. Li, J. S. Lee, C. Ha, C. B. Park, G. Yang, W. B. Gan, Y. T. Chang, Angew. Chem. Int. Edit. 2004, 43:6331-6335; H. F. Kung, C. W. Lee, Z. P. Zhuang, M. P. Kung, C. Hou, K. Plossl, J. Am. Chem. Soc. 2001, 123:12740-12741. Típicamente, los agentes de unión de

amiloides presentan un aumento significativo de la intensidad de la fluorescencia después de unirse a agregados de Aβ en comparación con su fluorescencia nativa en solución. Véase H. LeVine III, Protein Sci. 1993, 2:404-410. En esa línea medimos las propiedades de fluorescencia de cada compuesto en una concentración 4 μM antes y después de mezclarlo con péptidos Aβ(1-42) preagregados (5 μM, agregados en tampón PBS durante 3 días a 25ºC).

En todos los casos se observó un aumento de la intensidad de fluorescencia en un factor 1,3-9,4 en presencia de Aβ agregado, lo que indica que estos compuestos se unen al péptido (Tabla 2). En la mayoría de los casos se observó un ligero desplazamiento al azul (6-20 nm) con la unión. Únicamente en el caso del **Compuesto 11** basado en naftaleno se observó un desplazamiento significativo al rojo de 76 nm con la unión con Aβ preagregado (Figuras 1c, 1d). De forma interesante, esta unión iba acompañada de un aumento de la intensidad en un factor 9,3. Un aumento similar de la intensidad se ha observado con FDDNP y se puede explicar por la capacidad del motivo de naftaleno para crear excímeros cuando se une con su objetivo. Véase E. D. Agdeppa, V. Kepe, J. Liu, S. Flores-Torres, N. Satyamurthy, A. Petric, G. M. Cole, G. W. Small, S. C. Huang, J. R. Barrio, J. Neurosci. 2001, 21:1-5; S. Abad, I. Vaya, M. C. Jimenez, U. Pischel, M. A. Miranda, ChemPhysChem 2006, 7:2175-2183; C. Spies, R. Gehrke J. Phys. Chem. A 2002, 106:5348-5352.

Los compuestos **8a** y **8b** mostraron características de fluorescencia similares, lo que sugiere que la adición de un grupo metoxi sobre el grupo fenilo no altera las propiedades del compuesto como sonda. Por otro lado se ha de señalar que el aumento del tamaño de los grupos alquilo del nitrógeno conduce a un aumento significativo de la intensidad de fluorescencia después de la unión (Tabla 4, **8a, 8c, 8d**). Probablemente, esto es el resultado de la disminución de la libertad de rotación de las moléculas cuando se unen a las formas agregadas de péptido Aβ. Véase W. Schuddeboom, S. A. Jonker, J. M. Warman, U. Leinhos, W. Kuehnle, K. A. Zachariasse, J. Phys. Chem. 1992, 96 :10809-10819; Y. V. Il'chev, W. Kuehnle, K. A. Zachariasse, J. Phys. Chem. 1998, 102 :5670-5680. De forma interesante, no se observó ningún aumento de la intensidad de fluorescencia después de mezclar estos compuestos con péptido Aβ monomérico. Esto respalda la idea de que estos compuestos se unen selectivamente a formas agregadas de Aβ. La Figura 1A y la Figura 1B muestran el perfil de fluorescencia de 8d (excitación y emisión).

Tabla 4. Perfil de fluorescencia, Kd, IC_{50} y valores relacionados correspondientes a la interacción de los compuestos sintetizados con péptidos Aβ(1-42) agregados

Comp. Nº	Excitación máx. antes de la unión (nm)	Excitación máx. después de la unión (nm)	Emisión máx. antes de la unión (nm)	Emisión máx. después de la unión (nm)	Factor de aumento	K_d (μM)	R^2	% inhibición máxima (EILISA)	Ic_{50} (μM) (ELISA)	LogP
8a	439	435	476	470	1,8	2,6	0,93	81	129,0	1,74
8b	442	444	478	469	1,3	5,3	0,99	92	1,2	1,54
8c	445	442	478	470	4,2	4,8	0,96	98	11,4	2,49
8d	432	440	466	468	9,4	4,4	0,95	91	90,6	62
11	445	440	462	538	9,3	2,5	0,98	58	74,3	3,81
14	437	434	476	467	2,2	3,3	0,99	79	82,1	1,07
19	312	319	658	638	2,3	1,4	0,98	40	33,6	4,30

ES 2 546 063 T3

El péptido Aβ agregado se preparó disolviendo Aβ(1-42) en PBS pH 7,4 hasta una concentración final de 100 μM. Esta solución se agitó magnéticamente a 1.200 rpm durante 3 días a temperatura ambiente. La solución madre 100 μM Aβ(1-42) en PBS se dividió en partes alícuotas y se congeló a -80ºC durante 4 semanas sin ningún cambio perceptible en sus propiedades. A 2,85 ml del compuesto se le añadieron 150 μl de Aβ(1-42) preagregado hasta alcanzar una concentración final de 5 μM de Aβ(1-42) y 4 μM de compuesto. La solución se transfirió a una cubeta de 3 ml y se midió la fluorescencia a 25ºC. Como muestra la Figura 4, la asociación de compuestos aquí descritos con Aβ agregado produce cambios tanto en los espectros de excitación como en los de emisión. Los espectros de excitación de fluorescencia de los **Compuestos 8a, 8b, 8c, 14** y **19** están representados en la Figura 4, respectivamente.

También medimos las constantes de unión aparente (Kd) de los compuestos (en concentraciones de 10, 5, 2,5 y 1,25 μM) con péptido Aβ(1-42) preagregado 5,0 μM. Las Kd se pueden medir a partir del doble recíproco del valor máximo de fluorescencia y la concentración del compuesto. Véase H. LeVine III, Protein Sci. 1993, 2:404-410. Todos los valores Kd se midieron entre 1,4 y 5,3 μM (Tabla 4). Se ha de señalar que, a pesar de las diferencias estructurales, estos compuestos presentan valores Kd similares, lo que sugiere que se unen de forma similar a Aβ agregado. Además, estos valores son similares a los valores Kd de informes existentes para ThT (2 μM).[22,] Véase LeVine, Id.; Lockhart, L. Ye, D. B. Judd, A. T. Merritt, P. N. Lowe, J. L. Morgenstern, G. Z. Hong, A. D. Gee, J. Brown, J. Biol. Chem. 2005, 280:7677-7684; M. Biancalana, K. Makabe, A. Koide, S. Koide, J. Mol. Biol. 2008, 383:205-213; M. Biancalana, K. Makabe, A. Koide, S. Koide, J. Mol. Biol. 2009, 385:1452-1063. La Figura 2 muestra la gráfica de la doble recíproca de la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de los **Compuestos 8d** y **11**. La Kd corresponde a -1/(interceptación-x) de la regresión lineal.

La asociación de los compuestos sintetizados con péptidos Aβ agregados se analizó utilizando un ensayo basado en ELISA semicuantitativo desarrollado por Yang y col.. Véase P. Inbar, J. Yang, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2006, 16:1076-1079; P. Inbar, C. Q. Li, S. A. Takayama, M. R. Bautista, J. Yang, ChemBioChem 2006, 7:1563-1566; P. Inbar, M. R. Bautista, S. A. Takayama, J. Yang, Anal. Chem. 2008, 80:3502-3506. El ensayo se basa en la selección de moléculas que inhiben la interacción del péptido Aβ agregado con una IgG anti-Aβ monoclonal cultivada contra residuos 1-17 de Aβ. La Tabla 4 muestra las concentraciones de los compuestos correspondientes a una inhibición del 50% (IC_{50}) de las interacciones IgG-Aβ y el porcentaje máximo de las IgG inhibidas en cuanto a la unión con las fibrillas. Todos los compuestos mostraron valores IC_{50} en niveles de μM, habiéndose medido el valor más bajo en el compuesto 8b (IC50 = 1,17 μM). La inhibición máxima determinada, una medida de la magnitud de recubrimiento superficial del péptido agregado por los compuestos, oscilaba entre el 40 y el 98% (Tabla 4). Véase P. Inbar, J. Yang, Bioorg. Med Chem. Lett. 2006, 16:1076-1079; P. Inbar, C. Q. Li, S. A. Takayama, M. R. Bautista, J. Yang, ChemBioChem 2006, 7:1563-1566; P. Inbar, M. R. Bautista, S. A. Takayama, J. Yang, Anal. Chem. 2008, 80:3502-3506. La comparación de estos datos indica que el recubrimiento superficial aumenta cuando se disminuye el tamaño del compuesto o la magnitud del sistema π. Específicamente, mientras que la inhibición máxima en el caso de los compuestos de fenilo oscila entre el 81 y el 98%, en el caso del compuesto de naftaleno 11 más largo disminuye al 58% y en el caso del estilbeno 19 más conjugado disminuye al 40%. La Figura 3 muestra gráficos representativos correspondientes a los **Compuestos 8d** y **11**. Las Figuras A-D muestran gráficos representativos correspondientes a los **Compuestos 8a, 8b, 8c** y **14**, respectivamente.

Los valores logP calculados de todos los compuestos oscilaron entre 1,07 y 4,62 (Tabla 2), lo que indica que la mayoría de estos compuestos satisfacen los criterios de solubilidad y deberían poder atravesar la barrera hematoencefálica. Véase P. Inbar, J. Yang, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2006, 16:1076-1079; P. Inbar, C. Q. Li, S. A. Takayama, M. R. Bautista, J. Yang, ChemBioChem 2006, 7:1563-1566; P. Inbar, M. R. Bautista, S. A. Takayama, J. Yang, Anal. Chem. 2008, 80:3502-3506; C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, Adv. Drug Deliver. Rev. 1997, 23:3-25. Los valores LogP se calcularon utilizando el *software* Molinspiration Chem- informatics.

Estudios correspondientes a los compuestos 27 (no reivindicado), 28-31 y 33 (no reivindicado). El péptido Aβ agregado se preparó disolviendo Aβ(1-42) en PBS pH 7,4 hasta una concentración final 100 μM. Esta solución se agitó magnéticamente a 1.200 rpm durante 3 días a temperatura ambiente. La solución madre de Aβ(1-42) 100 μM en PBS se dividió en parte alícuotas y se congeló a -10ºC durante 4 semanas sin ningún cambio perceptible en sus propiedades. A 285 μl de la sonda (5% DMSO en agua nanopura) se le añadieron 15 μl del Aβ(1-42) preagregado para alcanzar una concentración final 5 μM de Aβ(1-42) y 4 μM de la sonda. La solución se transfirió a una cubeta de 300 ml y se midió la fluorescencia Las Figuras 9A-F muestran los espectros de excitación de fluorescencia de los Compuestos 27-31 y 33, respectivamente.

Tabla 5. Perfil de fluorescencia, Kd y valores logP de las sondas sintetizadas con péptidos Aβ(1-42) agregados

Comp. nº	Exc. máx. (nm)		Em. máx. (nm)		Factor de aumento	K_d	SD	R^2	logP
	antes	después	antes	después					
27	415	410	590	545	7,7	1,4	0,2	0,99	3,81
28	400	385	580	530	4,9	4,6	1,3	0,98	2,79
29	400	380	530	525	5,1	13,8	2,9	0,99	2,74
30	430	430	570	540	2,9	6,7	2,1	0,98	2,53
31	420	410	590	546	8,3	1,6	0,3	0,93	3,60
33	410	410	540	535	7,2	1,6	0,9	0,93	3,14

En principio, una sonda de unión de amiloide muestra un aumento significativo de la emisión fluorescente cuando se une con los agregados en comparación con la sonda en solución. LeVine III, H., Protein Sci. 1993, 2, (3), 404-410. En esta línea, comparamos las propiedades de fluorescencia de **27-31** o **33** en solución acuosa con o sin la presencia de péptidos Aβ42 agregados. Específicamente medimos las propiedades de fluorescencia de cada colorante en una concentración 4 μM en agua nanopura, antes y después de mezclarlo con péptido Aβ42 agregado (concentración final de péptido = 5 μM). Como muestra la Tabla 5, en todos los casos observamos un aumento significativo (en un factor de 3 a 9) en la intensidad de los espectros de emisión de las sondas después de la asociación con los péptidos amiloides agregados. Este aumento de la intensidad también fue acompañado por un desplazamiento al azul en los espectros de emisión de aproximadamente 5-50 nm. Después de la unión, todos los compuestos presentaban valores máximos de excitación entre 380 y 430 nm y sus valores máximos de emisión oscilaban entre 525 y 545 nm, lo que sugiere que los pequeños cambios en la parte donadora o aceptadora de la molécula no alteran de forma significativa sus valores máximos de fluorescencia. Sin embargo, los compuestos **27, 31** y **33**, que tienen piperidina como donador de electrones, presentaron un mayor aumento en la intensidad de la fluorescencia después de la unión (en un factor 7,7, 8,3 y 7,2, respectivamente) en comparación con sondas que contenían piperazina, morfolina o morfolino-etanoamina como donadores de electrones. La Figura 9C proporciona un ejemplo representativo de las propiedades de fluorescencia del compuesto **29**. La figura muestra la emisión de fluorescencia del compuesto **29** antes (línea continua) y después (línea discontinua) de mezclarlo con agregados de Aβ.

También medimos las constantes de unión aparente (K_d) de las sondas con péptidos Aβ42 agregados. La intensidad de fluorescencia de cada sonda se midió en concentraciones de 1,25, 2,5, 5,0 y 10 μM en agua nanopura, mezclada con 5 μM de los péptidos Aβ42 preagregados. Zhao, X.; Yang, J., ACS Chem. Neurosc. 1, (10), 655-660. En todos los casos, los valores K_d estaban en el nivel de μM, presentando los compuestos **27, 31** y **33** la mayor afinidad por los péptidos Aβ agregados. Los datos de estos estudios de unión sugieren que las pequeñas modificaciones químicas dentro de la región de solubilización en agua del motivo ANCA no influyen de forma significativa en la unión de las sondas con agregados Aβ (compuestos **27, 31** y **33**). Por otro lado se observó una disminución significativa del valor K_d al alterar químicamente el donador de electrones de la estructura ANCA. Como muestra la Tabla 5, se ha comprobado que los compuestos que tienen piperidina como donador de electrones tienen valores K_d más bajos (1,4-1,6 μM) en comparación con los compuestos que contienen piperazina, morfolina o morfolino-etanoamina como donadores de electrones (compuestos **28, 29** y **30**, respectivamente). Las Figuras 10A-F muestran gráficos de la intensidad de fluorescencia (a λ = 525 nm) de los compuestos **27-31** y **32**, respectivamente, en función de la concentración en presencia de péptidos Aβ42 agregados (5 μM) en solución. A modo de ejemplo, la correspondencia de estos datos con el compuesto **29** reveló un K_d de 13,8 μM para la asociación del compuesto **29** con péptidos Aβ42 agregados.

Finalmente se calculó el carácter lipófilo (log*P*) de las sondas sintetizadas. Se comprobó que todos los compuestos tenían valores log*P* entre 2,53 y 3,81, lo que sugiere que la mayoría de ellos satisface los criterios de solubilidad y es potencialmente capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., Adv. Drug Delivery Rev. 1997, 23, (1-3), 3-25.

Ejemplo 6. Determinación de las constantes de unión de compuestos aquí descritos. Un Aβ(1-42) preagregado (concentración final 5 μM) se mezcló con diversas concentraciones de compuestos aquí descritos (10, 5, 2,5, 1,25 μM) en tampón PBS (pH 7,4) y se midió su fluorescencia. La inversa negativa de la interceptación-x de la regresión lineal, que se trazó entre la doble recíproca del valor máximo de la intensidad de fluorescencia y la concentración del compuesto, representa la constante de unión del compuesto (K_d) con Aβ(1-42).

Ejemplo 7. De terminación de la K_d del método de fluorescencia. Para cuantificar las constantes de disociación (K_d) para la unión de compuestos fluorescentes con péptidos de β-amiloide agregados utilizamos el método descrito por LeVine (véase H. LeVine III, Protein Sci. 1993, 2, 404-410). Este método es similar al método descrito por Benesi-Hildebran (véase C. Yang, L. Liu, T. W. Mu, Q. X. Guo, Anal. Sci. 2000, 16, 537-539). Aquí se midió la fluorescencia del compuesto con y sin la adición de los péptidos agregados en solución. El aumento de la fluorescencia relativa del compuesto al unirse a péptidos de β-amiloide agregados se determinó tomando la diferencia entre *F* (fluorescencia después de la adición de péptidos agregados) y F_o (fluorescencia antes de la adición de péptidos agregados).

Para estimar la constante de unión (K_d) de los complejos del compuesto Aβ a partir de los estudios de fluorescencia se hacen las siguientes suposiciones:

1. Todos los compuestos están completamente en solución y libres de todo proceso de unión competitivo significativo, tal como autoagregación.

2. La concentración de compuestos no unidos se puede aproximar hasta la concentración total de los compuestos.

3. Los sitios de unión en los péptidos Aβ agregados no están completamente ocupados en la concentración de compuestos de unión de Aβ utilizados para los estudios de fluorescencia (es decir, los experimentos se llevan a cabo bajo condiciones de unión no saturada).

De acuerdo con la ley de Beer-Lambert (véase J. W. Robinson, "Atomic spectroscopy", 1996) se pueden obtener dos expresiones que relacionan la concentración de compuesto unido ([*HG*]), compuesto libre ([*G*]) y péptidos de amiloide libres ([*H*]) con 1) la fluorescencia medida del compuesto en solución antes de la adición de los péptidos agregados (F_o), o 2) la fluorescencia medida del compuesto en presencia de los péptidos de amiloide (*F*):

$$F_O = \varepsilon_G l[G_O] \qquad (1)$$

$$F = \varepsilon_{HG} l[HG] + \varepsilon_H l[H] + \varepsilon_G l[G] \qquad (2)$$

donde
$[G_o]$ = concentración total del compuesto ε_G = coeficiente de absorción de *G*.
[*G*] = concentración de compuesto no unido ε_{HG} = coeficiente de absorción de *HG*.
[*HG*] = concentración del complejo compuesto-Aβ ε_H = coeficiente de absorción de *H*.
$[H_O]$ = concentración total de péptido agregado *l* = longitud de recorrido.
[*H*] = concentración de péptido agregado no unido.

Mediante la sustitución $[G_o]$ = [*G*] + [*HG*] en la ecuación 1 y la realización de la aproximación $\varepsilon_{HG}[HG] + \varepsilon_G/[G] >> \varepsilon_H/[H]$ se puede llegar a una expresión simplificada para la fluorescencia relativa del compuesto unido (Δ*F*):

$$\Delta F = F - F_O = \varepsilon_{HG} l[HG] + \varepsilon_G l[G] - \varepsilon_G l[G] - \varepsilon_G l[HG] \qquad (3)$$

$$\text{o} \quad \text{or } \Delta F = \Delta\varepsilon l[HG] \qquad (4)$$

donde $\Delta\varepsilon = \varepsilon_{HG} - \varepsilon_G$.

Para obtener una relación entre el cambio en la fluorescencia medida del compuesto (Δ*F*) y la constante de unión del compuesto con péptidos de β-amiloide agregados (K_d), se ha utilizado la ecuación estándar para una isoterma de unión con el fin de obtener una relación entre [*HG*] y K_d:

$$[HG] = \frac{[H_O][G]}{K_d + [G]} \qquad (5)$$

Combinando las ecuaciones 4 y 5 se obtiene una relación entre Δ*F* y K_d:

$$\Delta F = \frac{[H_O][G]}{K_d + [G]} \Delta\varepsilon l \qquad (6)$$

Con el fin de estimar la K_d del compuesto unido a péptidos Aβ agregados a partir del cambio de fluorescencia medido, se toma la recíproca de la ecuación 6 para obtener:

$$\frac{1}{\Delta F} = \frac{K_d}{\Delta\varepsilon l\,[H_O]} \frac{1}{[G]} + \frac{1}{\Delta\varepsilon l[H_O]} \qquad (7)$$

La ecuación 7 sugiere que un gráfico doble recíproco de ΔF y [*G*] debería producir una línea recta con interceptación-x igual a $-1/K_d$. La Figura 2 y la Figura 6 muestran gráficos dobles recíprocos de la fluorescencia

medida en función de la concentración total del compuesto [G_o]. Suponiendo que [G] se puede aproximar hasta [G_o] (suposición 2), se pueden obtener valores estimados para las K_d de los complejos de compuesto-Aβ a partir de la interceptación-x de los ajustes lineales de los datos para cada compuesto. La Tabla 3 muestra las K_d estimadas de algunos compuestos aquí descritos.

Ejemplo 8. Ensayo ELISA: A partir de péptidos Aβ(1-42) sintéticos se generaron péptidos Aβ agregados disolviendo 30 µg de péptido en 90 µl de agua nanopura (pH 5-6) e incubando la solución a 37ºC durante ≥ 72 h sin agitación. Cada pocillo de una placa de 96 pocillos (volumen de pocillo 0,4 ml; polipropileno transparente de fondo plano) se recubrió durante 3 horas a 25ºC con 50 µl de solución 1,3 µM de péptidos Aβ en solución salina tamponada con fosfato (PBS, 10 mM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4, 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4). Después de retirar el exceso de muestra, 50 µl de soluciones de compuestos en tampón PBS (se obtuvieron diversas concentraciones diluyendo una solución madre con tampón PBS) se incubaron en los pocillos durante 12 horas. Los compuestos que no se disolvían en tampón PBS se disolvieron en DMSO y se diluyeron en tampón PBS para obtener una solución final de DMSO al 5% en tampón PBS. Después se retiraron las soluciones en exceso y todos los pocillos se bloquearon durante 30 minutos añadiendo 300 µl de una solución al 1% (p/v) de seroalbúmina bovina en tampón PBS (BSA/PBS). En algunos casos se llevó a cabo un paso de bloqueo adicional antes de la incubación con soluciones de moléculas pequeñas. La solución de bloqueo se desechó y los pocillos se lavaron una vez con 300 µl de tampón PBS. Los pocillos se incubaron durante 1 hora con 50 µl de una solución 1,1 nM (en 1% BSA/PBS, dilución 1:6000) de IgG anti-Aβ (clon 6E10, monoclonal, ratón), y a continuación se retiró la solución. Los pocillos se lavaron dos veces con 300 µl de tampón PBS y se incubaron durante 60 minutos con 50 µl de la IgG secundaria (IgG antirratón H+L, policlonal, conejo) conjugada con fosfatasa alcalina (6,8 nM en 1% BSA/PBS, dilución 1:1000). La solución se desechó y los pocillos se lavaron dos veces con 300 µl de tampón PBS. Las IgG secundarias unidas se detectaron mediante la adición de 50 µl de una solución de fosfato de *p*-nitrofenilo (2,7 mM, en dietanol amina 100 mM/cloruro de magnesio 0,5 mM, pH 9,8). Las intensidades de absorbancia se determinaron a 405 nm utilizando un lector de placas espectroscópico UV-vis (Sprectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Cada proceso se llevó a cabo cinco veces y se calculó el promedio. Las barras de error representas desviaciones estándar. Se trazaron gráficos y se ajustaron con el ajuste de curvas sigmoideas.

Ejemplo 9. Estudios de fluorescencia con Aβ monomérico. Un Aβ (Biopeptide, Inc.) se solubilizó inicialmente en hexafluoroisopropanol en una concentración 1 mM, se agitó con vórtice, se sometió a ultrasonido y se agitó con vórtice. El vial se tapó con una lámina y se incubó durante 21 horas a 25ºC sobre un agitador, con 3 agitaciones con vórtice a lo largo del período de incubación. La solución se sometió a ultrasonido y se agitó de nuevo con vórtice. Después se diluyó con agua nanopura fría (2:1 H_2O:HFIP), se fraccionó en las cantidades deseadas en pequeños viales de vidrio y se congelaron inmediatamente en un baño de CO_2/acetona. Cada fracción se cubrió con parafilm, que se perforó para permitir el escape de vapores de disolvente. Las fracciones se liofilizaron durante 2 días para obtener Aβ monomérico (91% monómero mediante análisis en gel PAGE Tris-bis 12%). 1,8 µl (8,42 µM) de este Aβ(1-42) monomérico se añadieron a 3 µl de una concentración 4 µM de pequeñas moléculas que se preparó mediante disolución en tampón PBS pH 7,4 para obtener una concentración final de 0,5 µM de Aβ(1-42) y 4 µM del compuesto. La solución se transfirió a cubetas de 3 ml y se midió la fluorescencia a 25ºC.

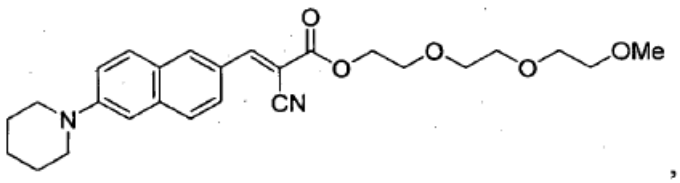
Ejemplo 10. Evaluación de motores rígidos para la actividad citotóxica contra células de neuroblastoma humanas (ensayo MTT). En ATCC (Manassas, VA) se compraron células de neuroblastoma humanas SHSY-5Y, un kit de proliferación celular MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), Medio Mínimo Esencial de Eagle (EMEM), mezcla nutriente Ham's F12, y Suero Bovino Fetal (SBF). En pocas palabras, las células SH-SY5Y (en EMEM:Ham's F-12 1:1 con 10% SBF) se sembraron en placas de 96 pocillos en una densidad de $5x10^4$ células/pocillo. Las placas se incubaron durante una noche (en una atmósfera humidificada de un 95% de aire y un 5% de CO_2, a 37ºC) para promover la unión de células a los pocillos. Después, las células se trataron con diversas concentraciones del compuesto **8a (no reivindicado), 8b (no reivindicado), 8c (no reivindicado), 8d (no reivindicado), 11,** o **14 (no reivindicado)** y se incubaron durante 24 horas (atmósfera humidificada de un 95% de aire y un 5% de CO_2, a 37 °C). Luego se añadió reactivo MTT (20 µl) al medio y éste se incubó durante otras 4 horas. Después de la incubación se añadieron 100 µl de reactivo detergente y las placas se cubrieron con lámina de aluminio y se dejaron a temperatura ambiente a lo largo de la noche. La cantidad de MTT formazán solubilizado se midió mediante absorbancia espectrofotométrica a 570 nm (Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). El ensayo MTT no se llevó a cabo en el compuesto 19 debido a su mala solubilidad en medios acuosos. Todos los datos se muestran como media ± desviación estándar, N = 3 para cada concentración. Para todos los análisis se empleó la prueba *t*. Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo en comparación con las células de control. Como muestra la Figura 8, todos los compuestos presentaban muy poca o ninguna citotoxicidad contra células de neuroblastoma humanas en concentraciones hasta 100 µM. Estas propiedades representan ventajas significativas para una evaluación adicional *in vivo*.

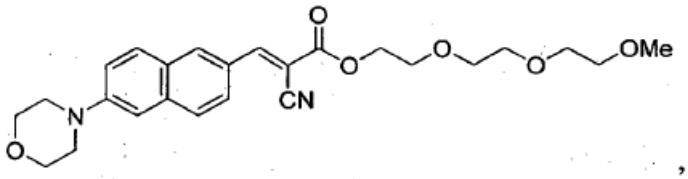
Ejemplo 11. Formación de imágenes de tejido humano con compuestos de unión a amiloides. Las Figuras 11A-F muestran imágenes de fluorescencia de placas amiloides en tejido humano de casos de EA. Después, el tejido congelado se seccionó y se dispuso en un portaobjetos de vidrio, y se expuso a una solución que contenía una sonda fluorescente durante 30 minutos. La muestra se lavó con agua para eliminar la tinción no específica del tejido y se realizaron imágenes utilizando un microscopio epifluorescente invertido. Las imágenes revelan la localización

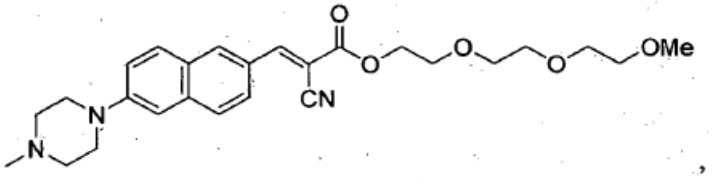
de placas teñidas con A) compuesto **27 (no reivindicado)**, B) compuesto **28**, C) compuesto **29**, D) compuesto **30**, E) compuesto **31**, o F) compuesto **33 (no reivindicado)**.

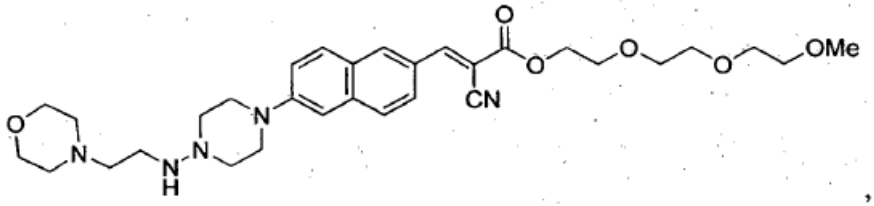
REIVINDICACIONES

1. Compuesto seleccionado de entre el grupo consistente en

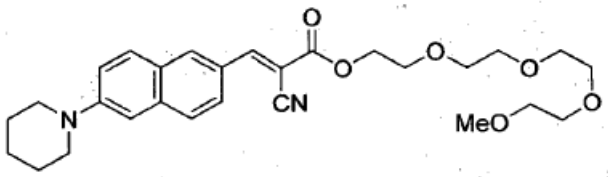






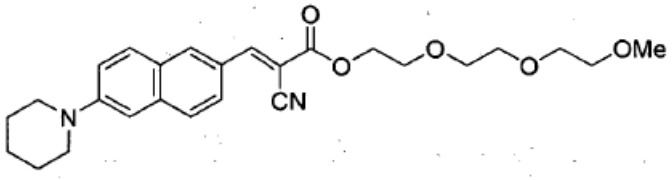


o



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

2. Compuesto según la reivindicación 1, caracterizado porque es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Compuesto según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la sal farmacéuticamente aceptable se selecciona de entre el grupo consistente en clorhidratos, bromhidratos, sulfatos, metanosulfonatos, nitratos, maleatos, acetatos, citratos, fumaratos, tartratos, succinatos, benzoatos y sales con aminoácidos.

4. Compuesto según la reivindicación 3, caracterizado porque la sal farmacéuticamente aceptable es un clorhidrato.

5. Composición farmacéutica que incluye un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

6. Composición farmacéutica según la reivindicación 5, caracterizada porque la composición incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable.

7. Composición farmacéutica según la reivindicación 5 o 6, caracterizada porque el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo están unidos de forma covalente con el soporte farmacéuticamente aceptable.

8. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, caracterizado porque el vehículo farmacéuticamente aceptable se selecciona de entre el grupo consistente en agua, soluciones salinas, alcoholes, aceites, gelatinas, carbohidratos, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidona.

9. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, caracterizado porque la composición comprende un adyuvante seleccionado de entre el grupo consistente en lubricantes, conservantes, estabilizadores, humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, sustancias colorantes y/o aromáticas.

10. Compuesto o composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en un método para tratar una enfermedad caracterizada por una acumulación de amiloides en un sujeto, que consiste en administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto o composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

11. Compuesto o composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso según la reivindicación 10, caracterizado porque la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer, encefalopatía espongiforme bovina (EEB), enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, síndrome de Down, demencia con cuerpos de Lewi o esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

Fig. 1.

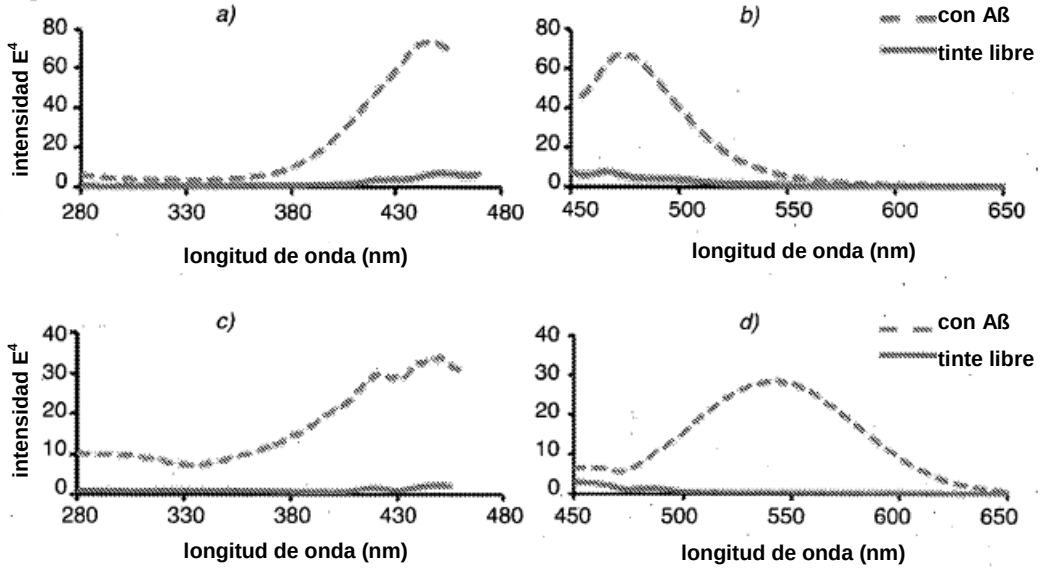

a)
b)
c)
d)
intensidad E4
longitud de onda (nm)
con Aß
tinte libre

Fig. 2.

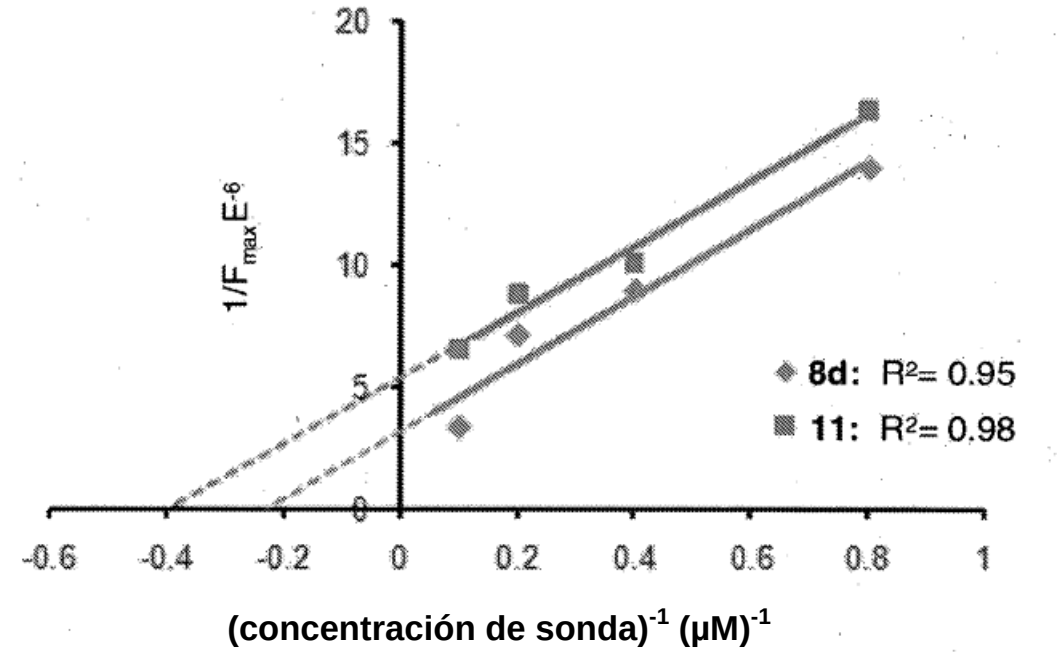
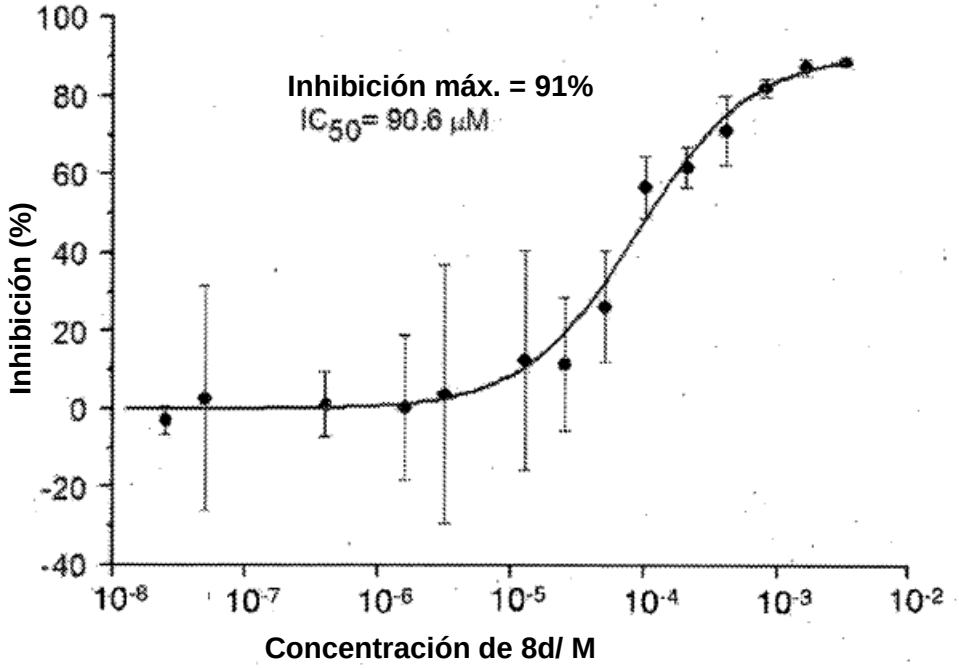

1/Fmax E-6
8d: R2= 0.95
11: R2= 0.98
(concentración de sonda)-1 (µM)-1

Fig. 3.


Inhibición máx. = 91%
IC50= 90.6 µM
Inhibición (%)
100
80
60
40
20
0
-20
-40
10-8
10-7
10-6
10-5
10-4
10-3
10-2
Concentración de 8d/ M

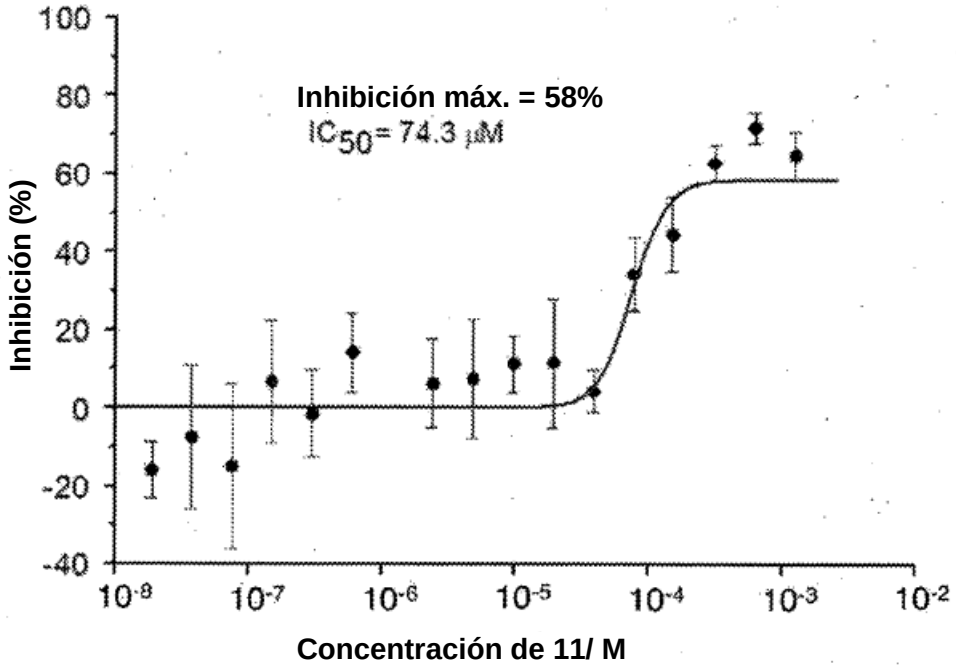

Inhibición máx. = 58%
IC50= 74.3 µM
Inhibición (%)
100
80
60
40
20
0
-20
-40
10-8
10-7
10-6
10-5
10-4
10-3
10-2
Concentración de 11/ M

Fig. 4.

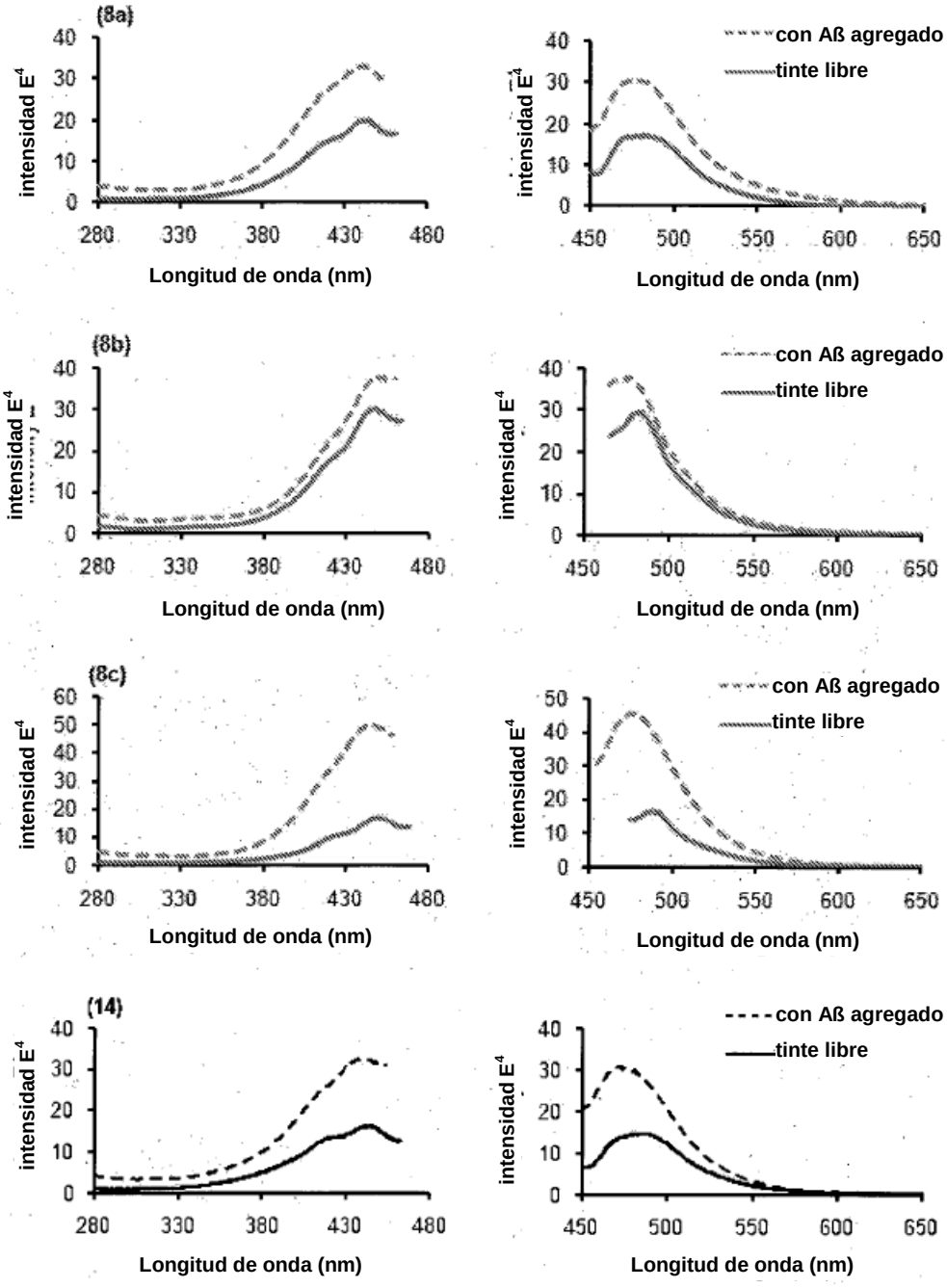

(8a)
intensidad E4
Longitud de onda (nm)
con Aß agregado
tinte libre
(8b)
(8c)
(14)

Fig. 4 continuación

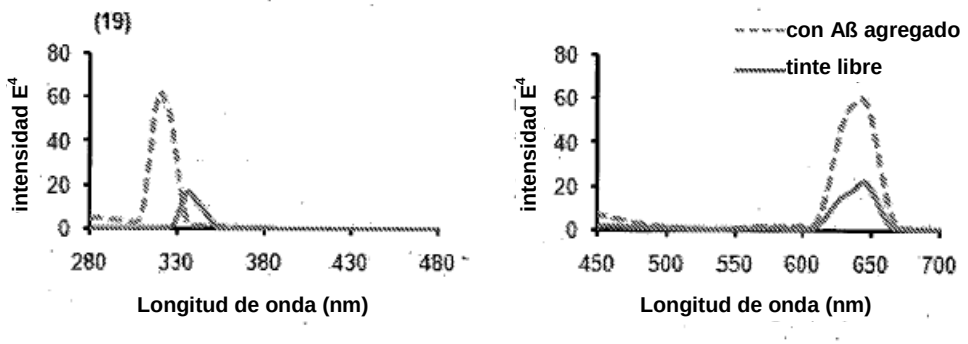


Fig. 5.

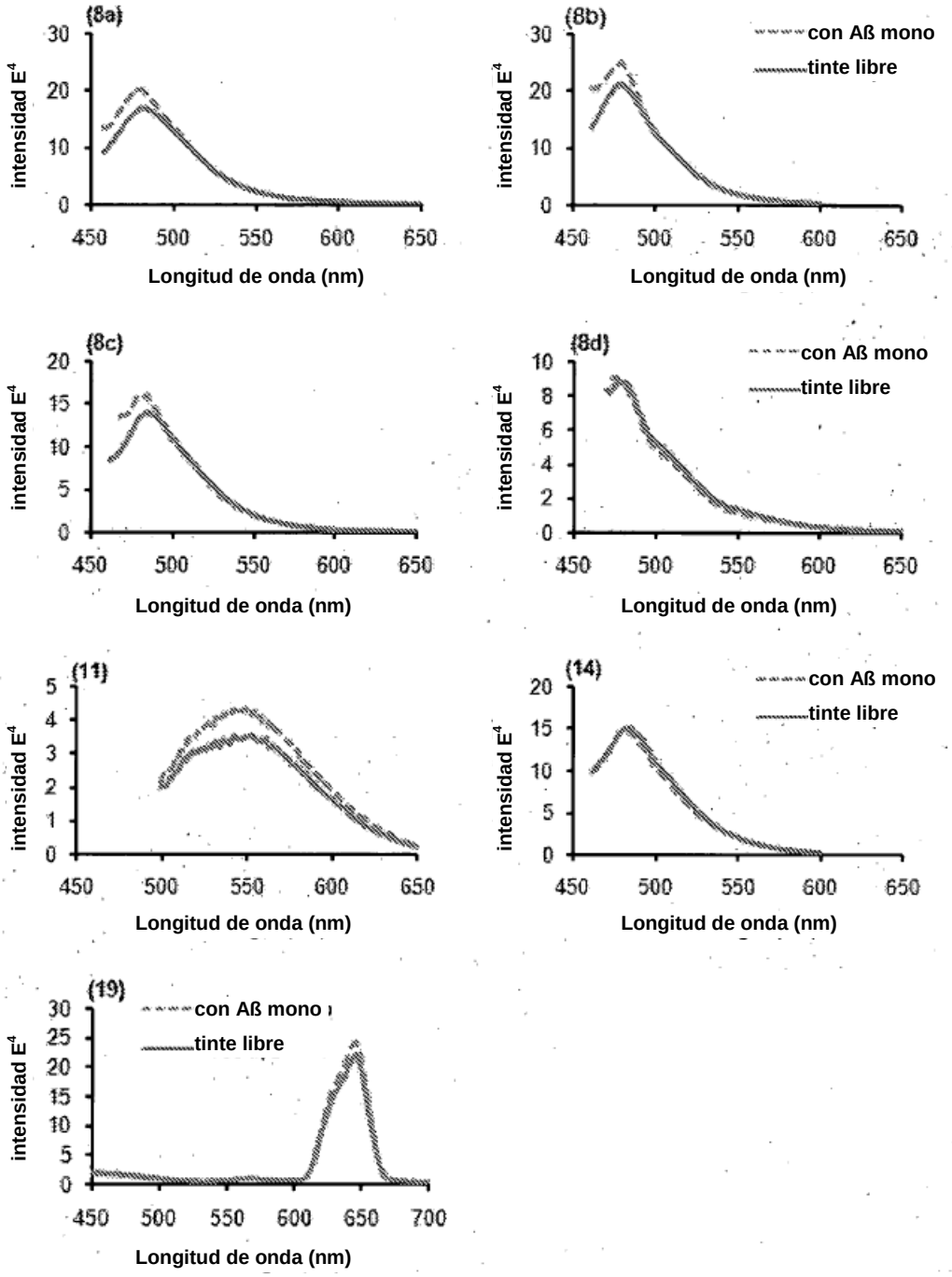

(8a)
(8b)
(8c)
(8d)
(11)
(14)
(19)
con Aß mono
tinte libre
intensidad E4
Longitud de onda (nm)

Fig. 6.

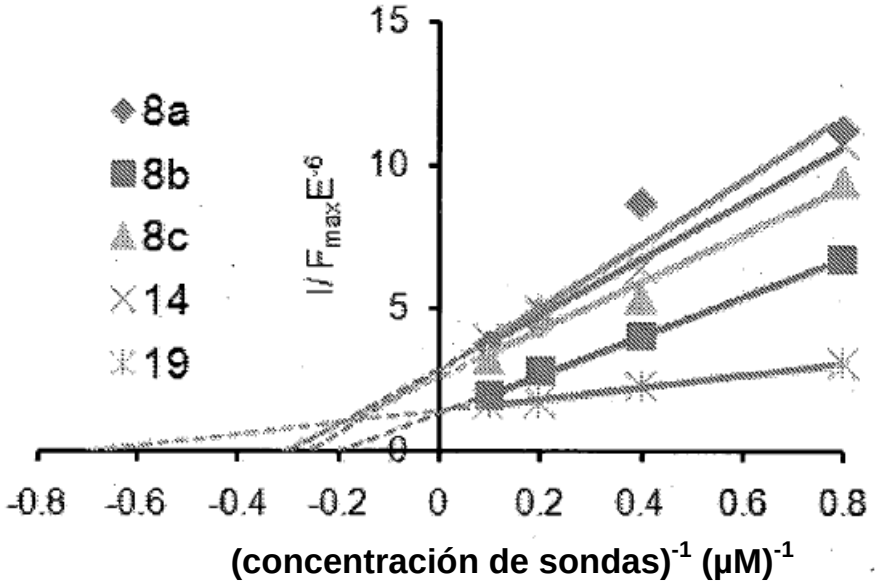

15
10
5
0
8a
8b
8c
14
19
$1/F_{max}E^{-6}$
-0.8
-0.6
-0.4
-0.2
0
0.2
0.4
0.6
0.8
(concentración de sondas)$^{-1}$ (μM)$^{-1}$

Fig. 7A.

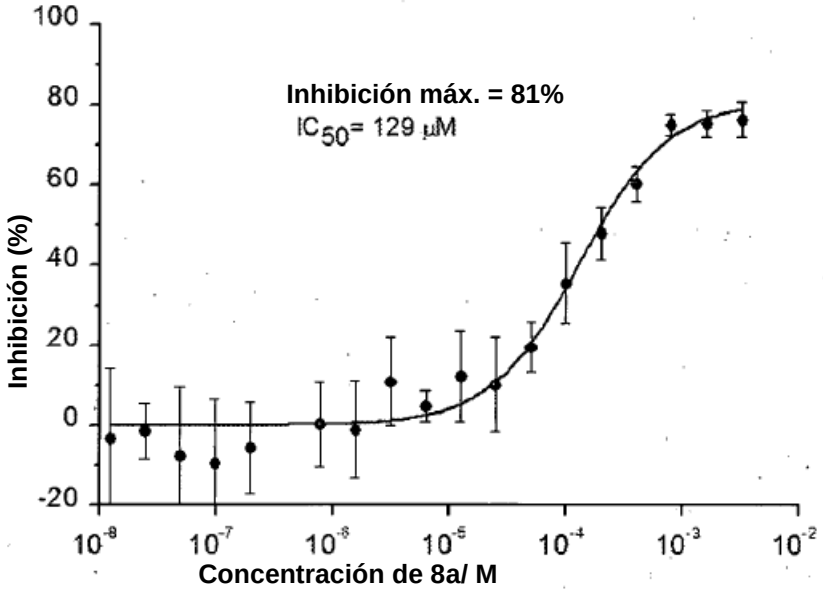

Inhibición máx. = 81%
IC50= 129 µM
Inhibición (%)
100
80
60
40
20
0
-20
10-8
10-7
10-6
10-5
10-4
10-3
10-2
Concentración de 8a/ M

Fig. 7B.

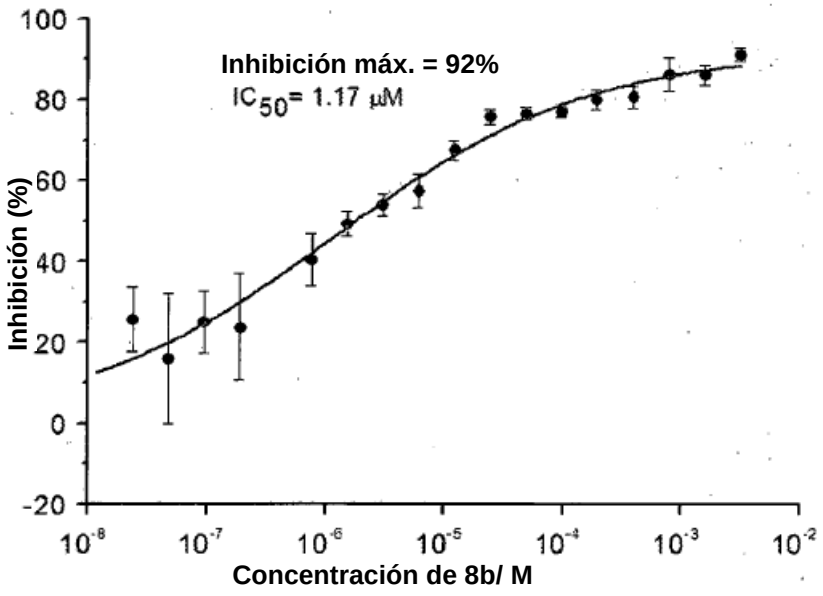

Inhibición máx. = 92%
IC50= 1.17 µM
Inhibición (%)
100
80
60
40
20
0
-20
10-8
10-7
10-6
10-5
10-4
10-3
10-2
Concentración de 8b/ M

Fig. 7C.

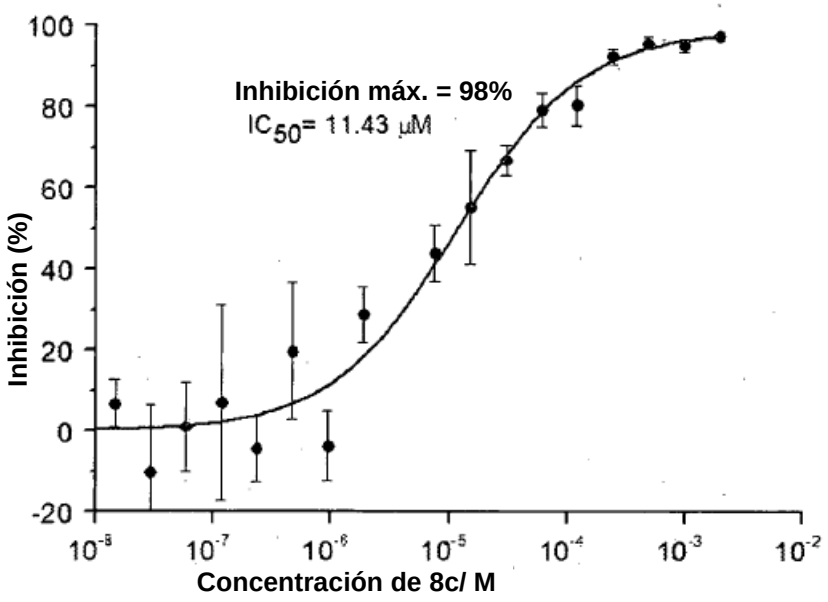

Inhibición máx. = 98%
IC50= 11.43 µM
Inhibición (%)
100
80
60
40
20
0
-20
10-8
10-7
10-6
10-5
10-4
10-3
10-2
Concentración de 8c/ M

Fig. 7D.

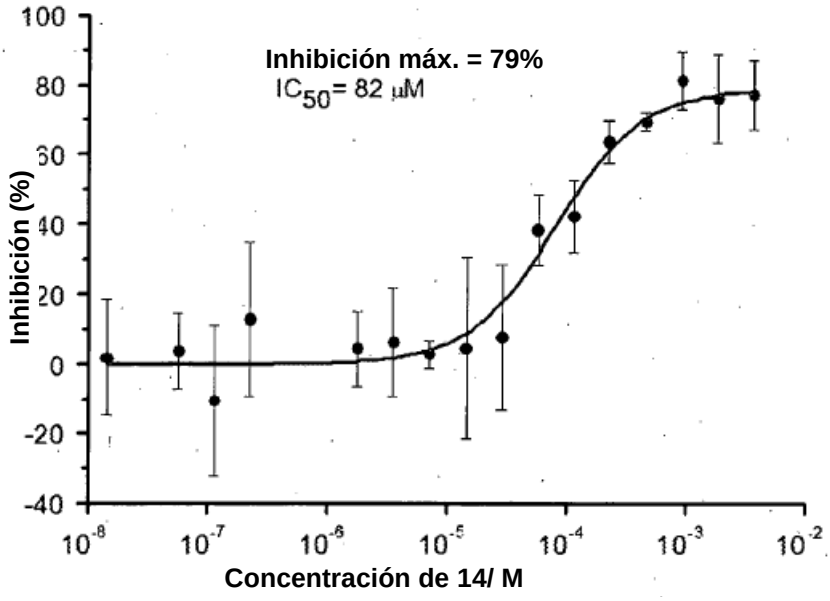

Inhibición máx. = 79%
IC50= 82 µM
Inhibición (%)
100
80
60
40
20
0
-20
-40
10-8
10-7
10-6
10-5
10-4
10-3
10-2
Concentración de 14/ M

Fig. 8.

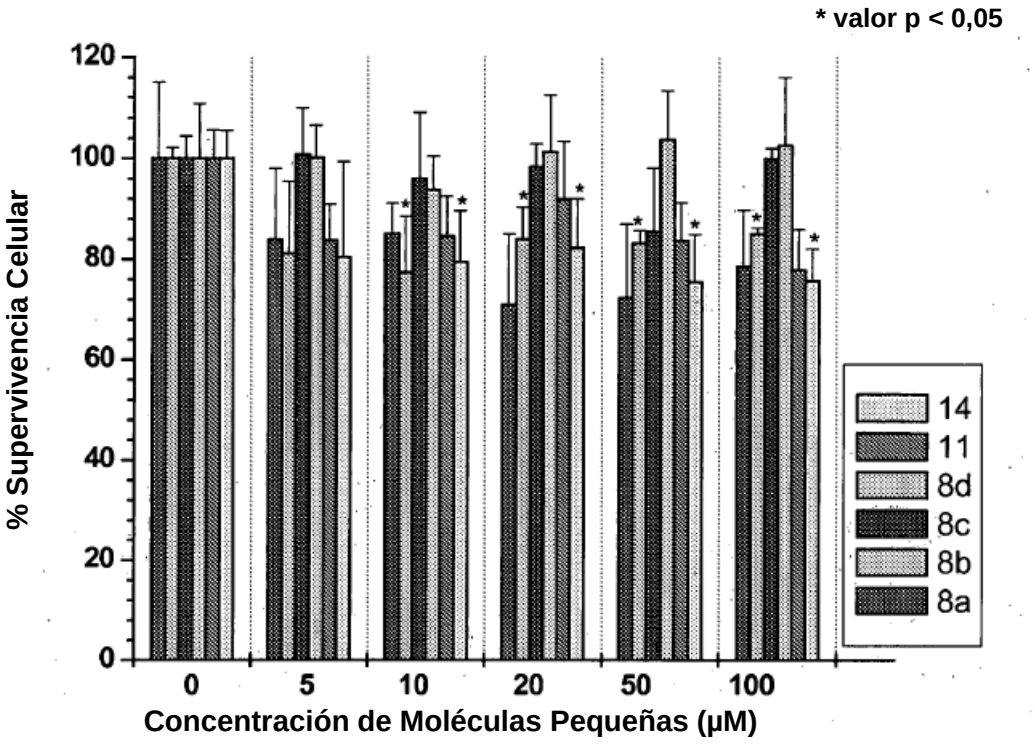

* valor p < 0,05
% Supervivencia Celular
120
100
80
60
40
20
0
0
5
10
20
50
100
Concentración de Moléculas Pequeñas (μM)
14
11
8d
8c
8b
8a

Fig. 9A

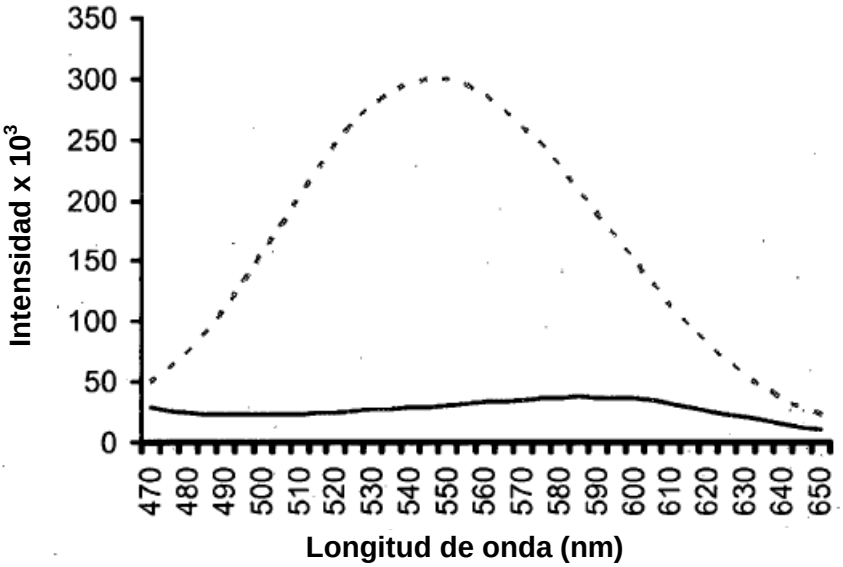

Intensidad x 10³
350
300
250
200
150
100
50
0
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
Longitud de onda (nm)

Fig. 9B

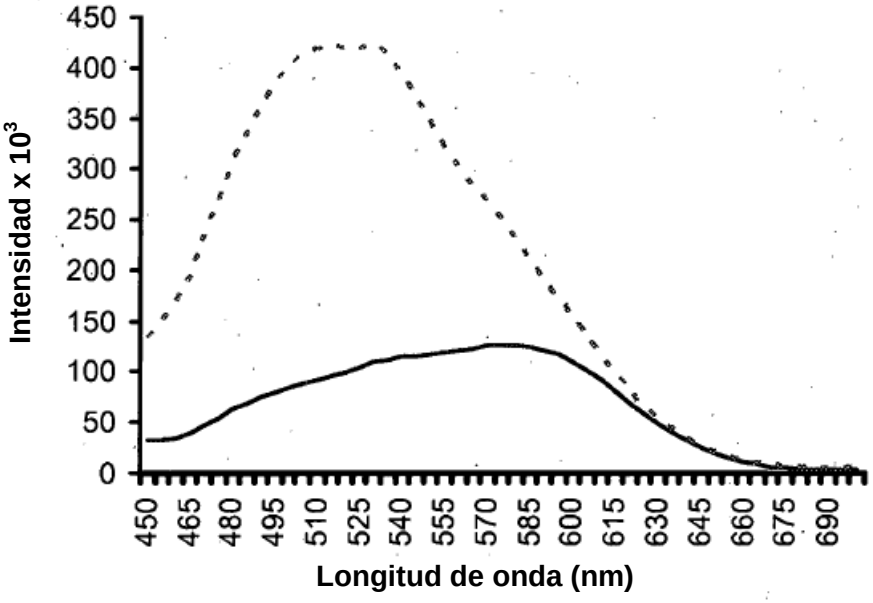

Intensidad x 10³
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
450
465
480
495
510
525
540
555
570
585
600
615
630
645
660
675
690
Longitud de onda (nm)

Fig. 9C

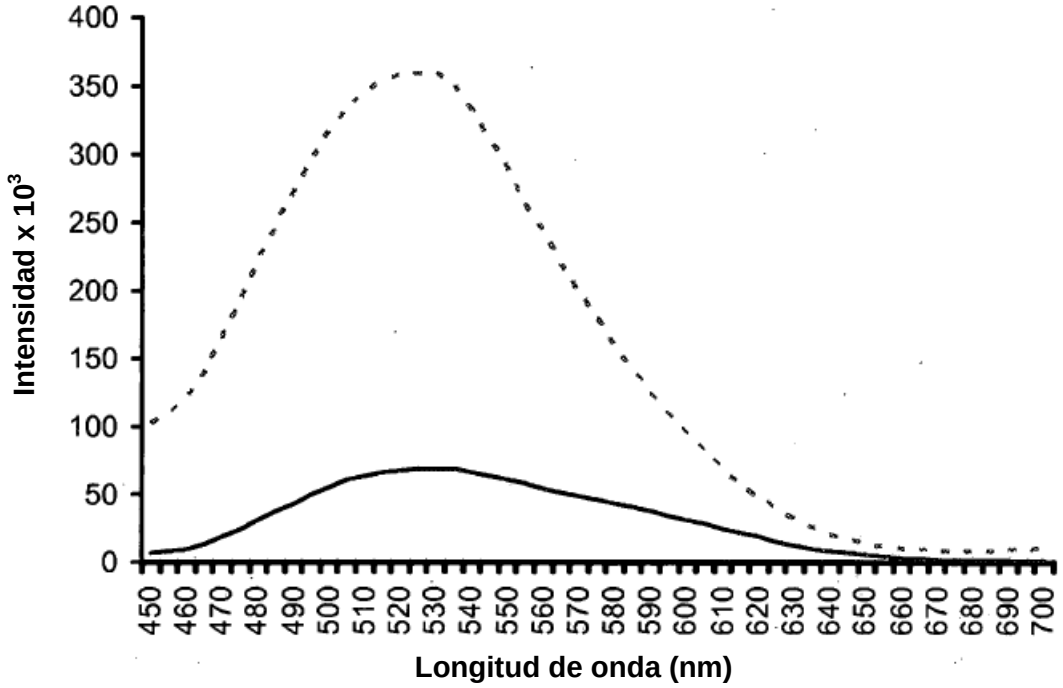

Intensidad x 10³
400
350
300
250
200
150
100
50
0
450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
Longitud de onda (nm)

Fig. 9D

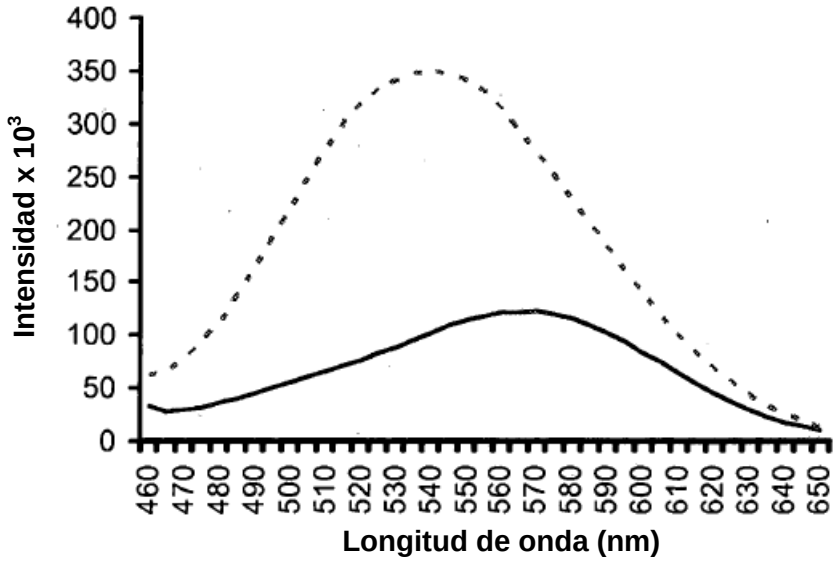

Intensidad x 10³
400
350
300
250
200
150
100
50
0
460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650
Longitud de onda (nm)

Fig. 9E

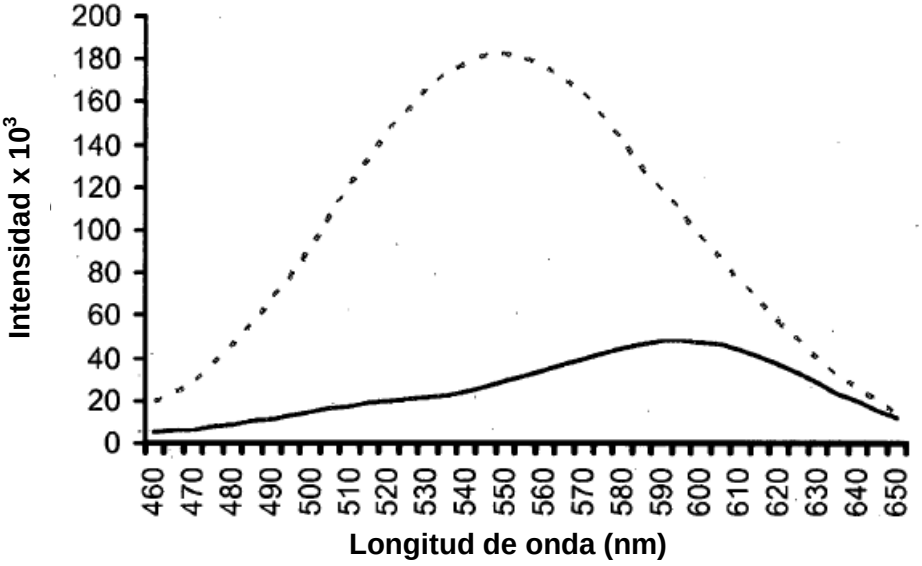

Intensidad x 10³
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650
Longitud de onda (nm)

Fig. 9F

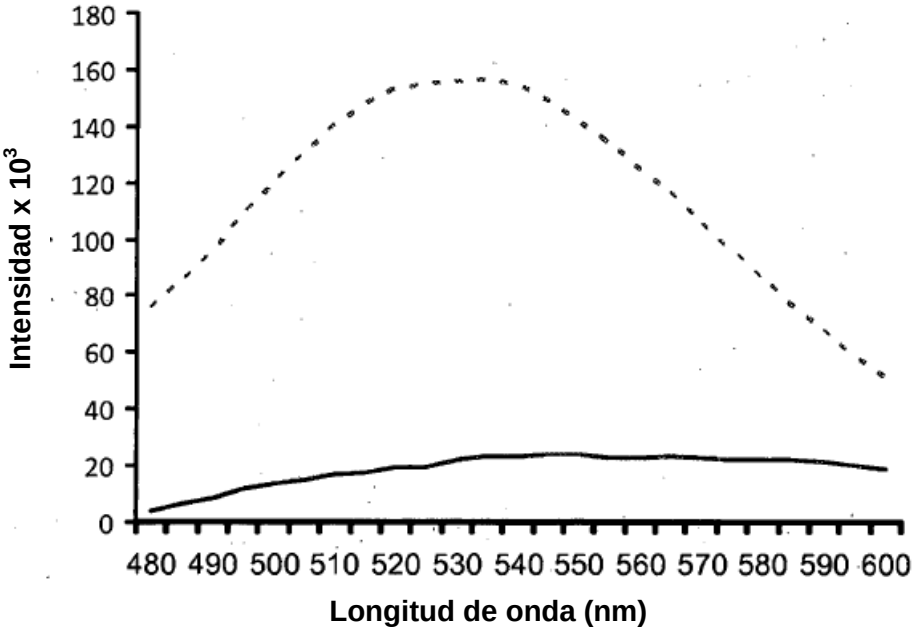

Intensidad x 10³
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
Longitud de onda (nm)

Fig. 10A

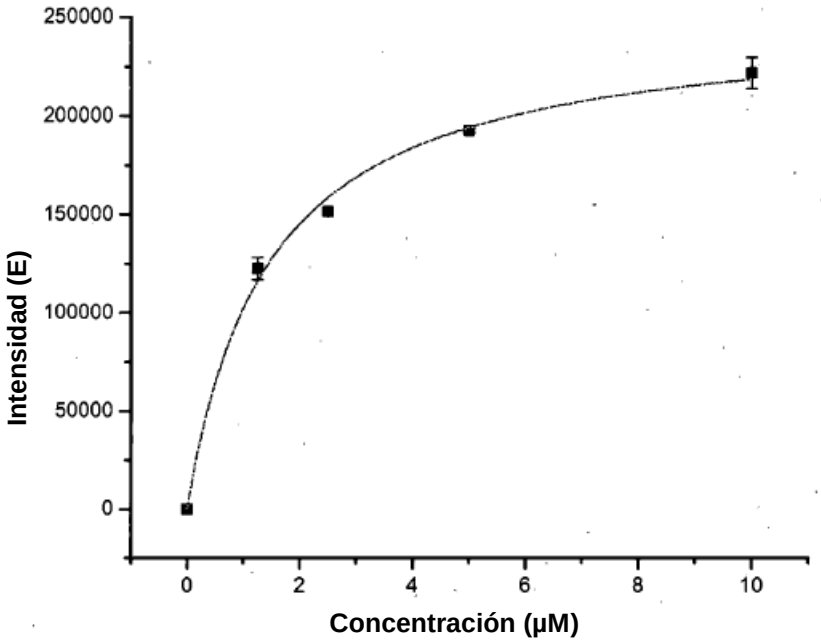


Fig. 10B

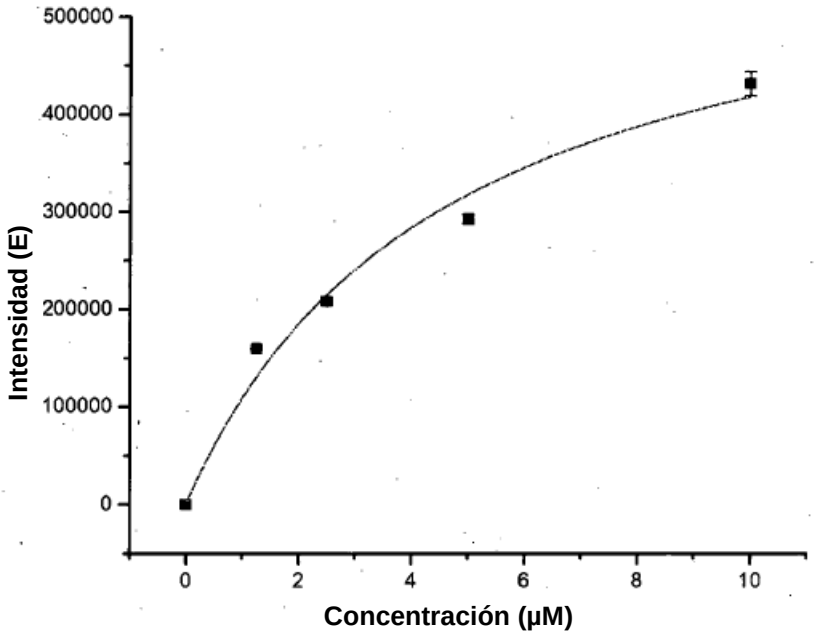


Fig. 10C

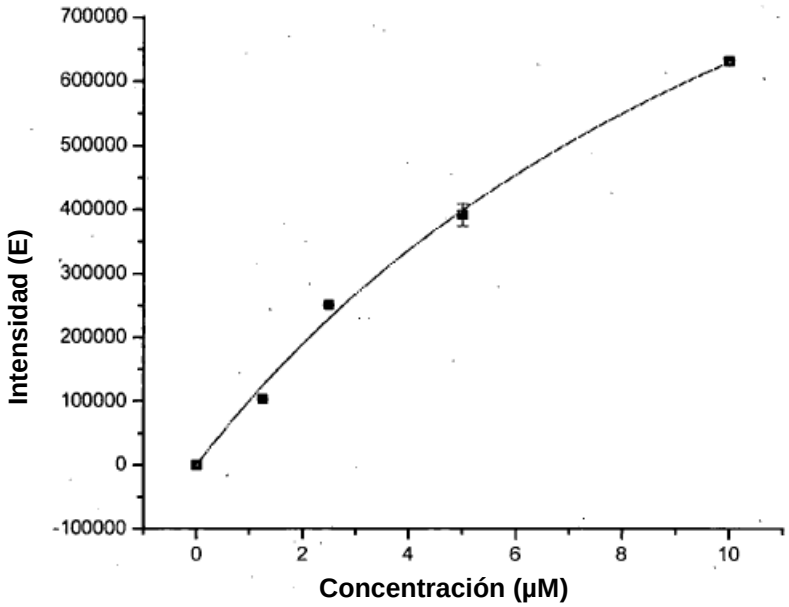


Fig. 10D

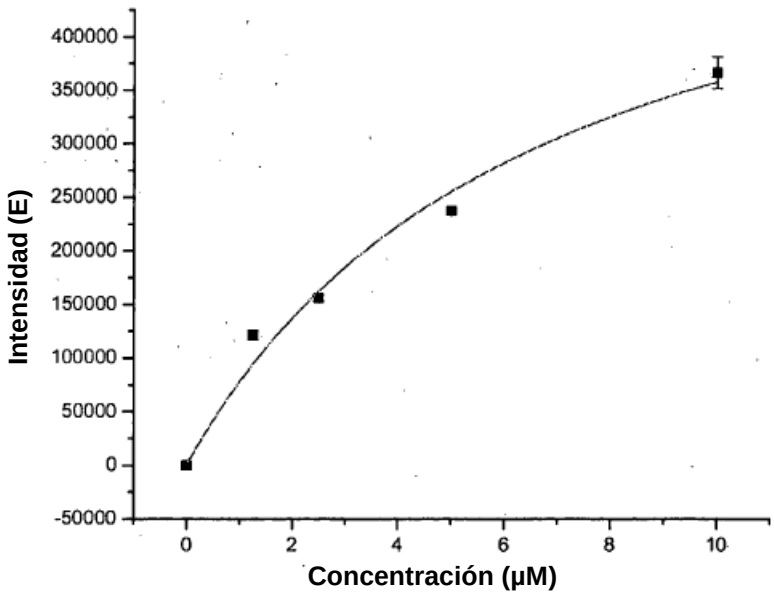


Fig. 10E

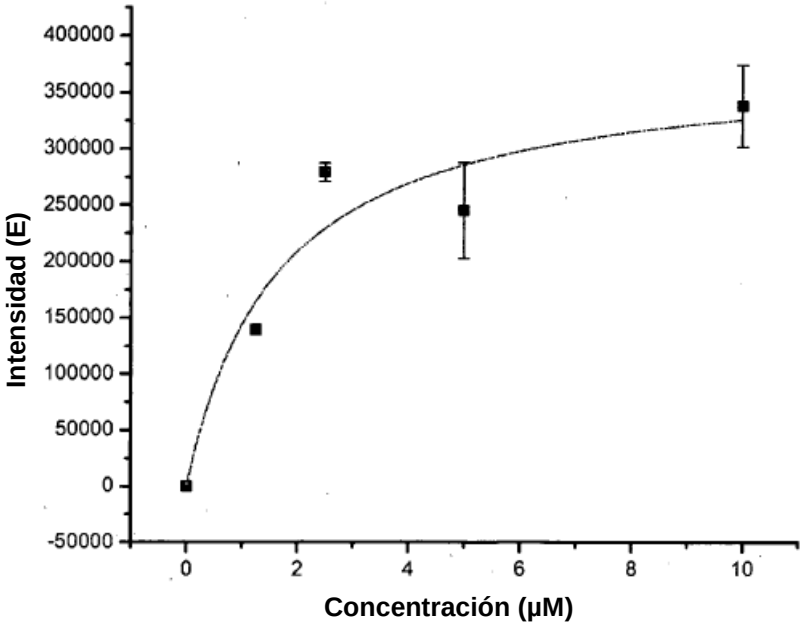


Fig. 10F

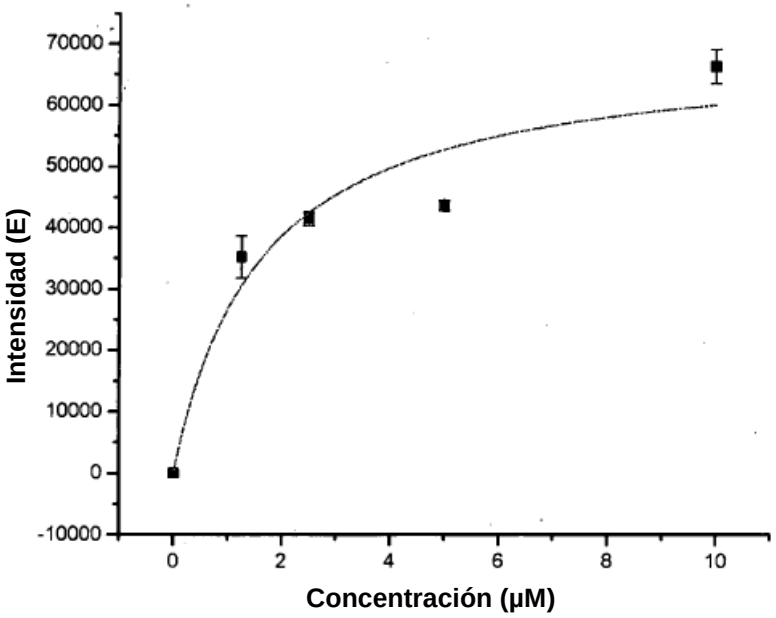
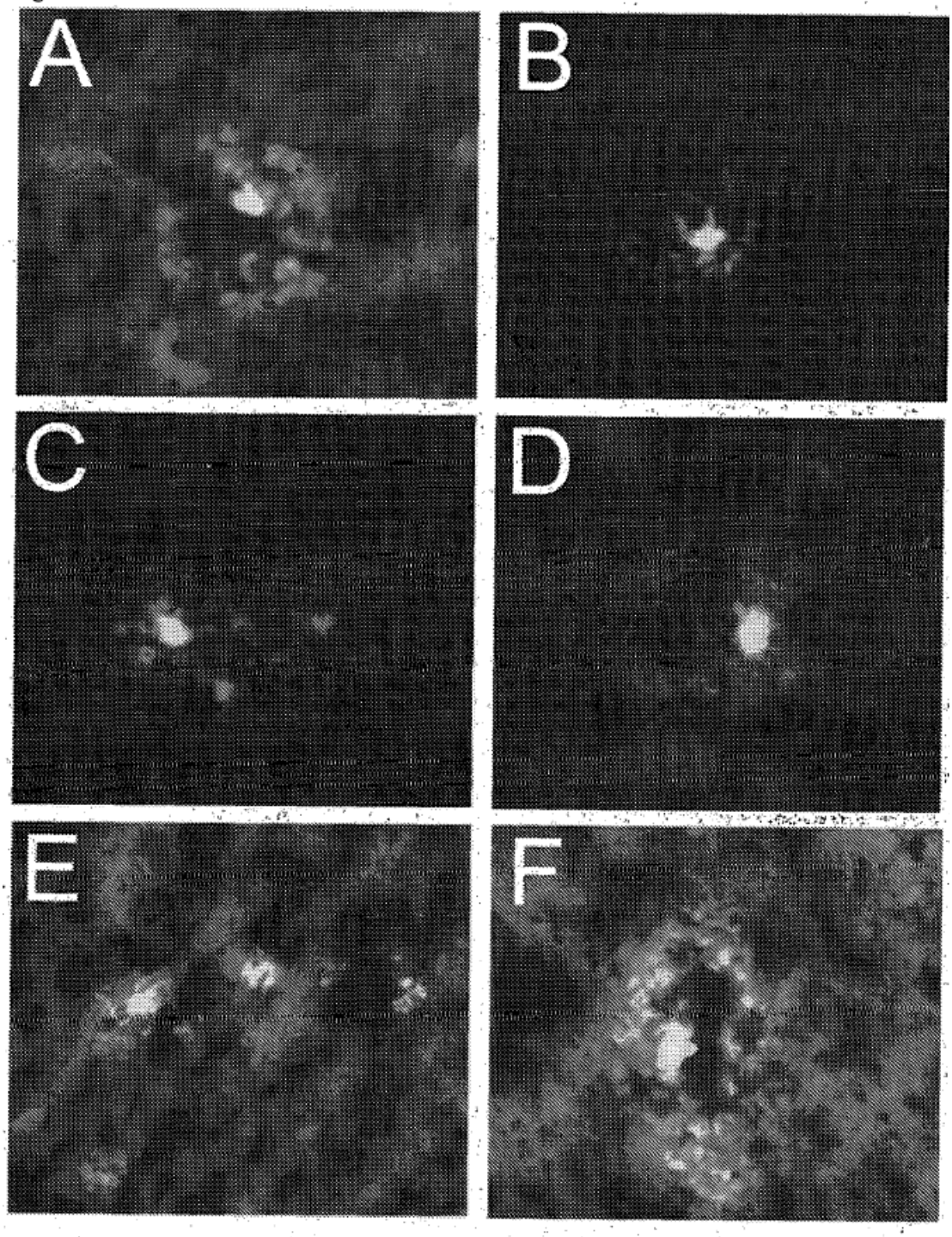



Fig. 11