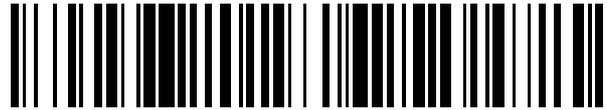


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 744**

51 Int. Cl.:

C07D 333/40 (2006.01)

A61K 31/381 (2006.01)

C07D 333/24 (2006.01)

C07D 333/28 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2009 E 09820849 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015 EP 2350042**

54 Título: **Nuevos compuestos de tiofeno para uso en terapia**

30 Prioridad:

17.10.2008 SE 0850043

23.10.2008 SE 0850050

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

23.11.2015

73 Titular/es:

**NEUROSCIOS GMBH (100.0%)
Willersdorferstrasse 6
8061 St. Radegund/Graz, AT**

72 Inventor/es:

**ÅSBERG, PETER;
JOHANSSON, LEIF;
HERLAND, ANNA;
ÅSLUND, ANDREAS y
KONRADSSON, PETER**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 551 744 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nuevos compuestos de tiofeno para uso en terapia

5 **Campo de la Invención**

La presente invención se refiere a nuevos derivados de tiofeno sustituidos útiles en terapia, especialmente terapia de un mamífero que padece una enfermedad que implica formas de proteínas plegadas defectuosamente o agregadas.

10 **Antecedentes de la Invención**

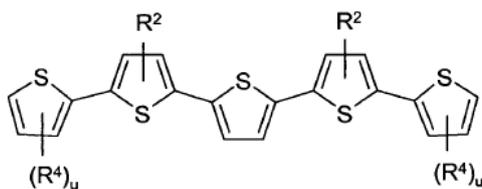
Los biopolímeros naturales, tales como las proteínas, tienen frecuentemente conformaciones ordenadas, tales como hélice alfa y hojas beta, que contribuyen a la estructura tridimensional ordenada y la función específica del biopolímero. La estructura de una proteína es esencial para la función de la proteína; ha sido demostrado por muchos científicos que una proteína no plegada puede no ser funcional. Y lo que es más importante, en los últimos años existe la consciencia creciente del peligro del plegado defectuoso de las proteínas y el ensamblaje defectuoso en por ejemplo formas amiloides y otras formas patológicas. El plegado defectuoso puede cambiar una proteína de algo que es útil a algo no funcional, peligroso o incluso tóxico. La salud humana está basada en proteínas plegadas correctamente, y la deposición *in vivo* de fibrillas amiloides está asociada con muchas enfermedades relacionadas con la conformación de las proteínas, que incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, las amiloidosis sistémicas, y las enfermedades priónicas. Las enfermedades priónicas, a saber, la encefalopatía espongiforme transmisible (TSE), en animales [v.g. la encefalopatía espongiforme bovina (BSE), el Scrapie y la caquexia crónica (CWD)] y en humanos [enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (CJD), enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), Kuru] están asociadas con la conversión conformacional de la proteína priónica celular normal (PrP^c), en una isoforma asociada a la enfermedad infecciosa patógena designada PrP^{sc}). Las proteínas alteran frecuentemente su conformación debido a diferentes estímulos externos y la importancia de los cambios de conformación de las proteínas que conducen a estados patógenos ha sido bien documentada. Especialmente en condiciones que desestabilizan el estado nativo, las proteínas pueden agregarse en ensamblajes fibrilares característicos, conocidos como fibrillas amiloides. Estos ensamblajes proteínicos ricos en hoja beta tienen conformaciones distintivamente diferentes comparadas con la del estado nativo. La proteína priónica plegada defectuosamente es incluso auto-propagante (infecciosa), una propiedad que está codificada totalmente dentro de la conformación plegada defectuosamente.

Las enfermedades humanas crónicas afectan gravemente al sistema de atención sanitaria. Está plenamente reconocido que son necesarias herramientas de diagnóstico rápidas y exactas para proporcionar intervención y terapia tempranas. Únicamente está disponible terapia sintomática, como por ejemplo en la enfermedad de Alzheimer, y estas tienen eficacia terapéutica limitada. En la actualidad no existe test de diagnóstico molecular alguno ante-mortem de la enfermedad de Alzheimer o las encefalopatías espongiformes transmisibles (TSEs), y los diagnósticos clínicos que se realizan requieren que la progresión de la enfermedad sea grave. Adicionalmente, no existe todavía tratamiento eficiente alguno disponible, y la inmunoterapia por ejemplo en la enfermedad de Alzheimer sigue siendo muy prometedora. La falta de métodos fiables para capturar proteínas plegadas defectuosamente, que monitoricen a la vez el tratamiento y la progresión de la enfermedad es sin embargo un inconveniente grave en el tratamiento de la mayoría de las enfermedades relacionadas con el plegado defectuoso de las proteínas.

La afinidad entre las proteínas plegadas defectuosamente en calvas amiloides, fibrillas amiloides y fibrillas de tipo amiloide, y moléculas conjugadas comprometidas de unidades repetitivas de tiofeno, etilenodioxitiofeno (EDOT), benzotiadiazol, fluoreno, y fenilo en homo y hetero-oligómeros y polímero con canales laterales iónicas o polares ha sido demostrada en varios estudios *in vitro*. La interacción entre fibrillas de tipo amiloide de insulina y poli- y oligo-tiofenos aniónicos, dipolares y catiónicos fue demostrada por [WO 2005/109005]. Se ha demostrado que varios de los oligómeros y polímeros mencionados se fijan a depósitos amiloide, A β y PrP en secciones histológicas [WO 2007/091973]. Un polímero aniónico, más específicamente un derivado de alcoxisulfonato de EDOT exhibía afinidad alta para fibrillas de tipo amiloide [Hanedi, M. et al.; Nano Lett.; (2008); 8, 1736-1740]. Además, se demostró que un polifluoreno sustituido y un polifluoreno alternante con un poli(óxido de etileno) están fuertemente asociados con fibrillas de tipo amiloide *in vitro* (Tanaka, H. et al.; Nano Lett.; (2008) 8, 2856-2861).

55 **Sumario de la Invención**

En un aspecto, la invención se refiere a un nuevo compuesto de fórmula (II)



(II)

en donde

cada u se selecciona independientemente de 0, y 1; y

- 5 cada R^2 y R^4 se selecciona independientemente de carboxi, carboxialquilo, alcóxicarbonilalquilo, aminoalquilo, (amino)(carboxi)alquilo, y (amino)(carboxi)alcoxi en donde cualquier resto alquilo es un alquilo C1-C6: y sus sales farmacéuticamente aceptables.

- 10 En otro aspecto, la invención se refiere a un compuesto conforme a la fórmula (II) para uso en terapia.

En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a compuestos conforme a la fórmula (II) para uso en métodos para terapia de enfermedades que implican formas de proteínas plegadas defectuosamente o agregadas.

- 15 Los compuestos conforme a la presente invención no deberían marcarse para uso en métodos de diagnóstico por imagen.

Breve descripción de los dibujos

- 20 **Figura 1.** Muestra de referencia incubada 20 h, ambas barras de escala representan 0,2 μm . Celdillas separadas en agregados de tipo hoja marcadas con flechas blancas.

Figura 2. Muestra de referencia incubada 20 h, las barras de escala representan 0,2 μm . Se observan fibrillas separadas en agregados en forma de hoja frente a las flechas blancas.

- 25 **Figura 3.** Muestra de referencia incubada 66 h, ambas barras de escala representan 0,2 μm . Las flechas blancas están dirigidas hacia celdillas visibles que están separadas de las hojas fibrilares.

- 30 **Figura 4.** Muestra incubada con 100 μM de compuesto inventivo F durante 66 h. La barra de escala representa 0,2 μm , ambas imágenes tienen el mismo aumento. Las flechas blancas apuntan hacia agregados densos en los que no puede verse fibrilla alguna.

- 35 **Figura 5.** Muestra superior incubada con 100 μM de compuesto inventivo G durante 20 h. La barra de escala representa 0,2 μm . La muestra inferior se incubó con 10 μM de compuesto inventivo G durante 20 h. La barra de escala representa 100 μm . Las fibrillas ramificadas cortas apuntan hacia la izquierda, mientras que las estructuras oligómeras apuntan hacia la derecha con flechas blancas.

- 40 **Figura 6.** Muestra incubada con 100 μM de compuesto inventivo G durante 66 h. La barra de escala representa 0,2 μm , y ambas imágenes tienen el mismo aumento. Se observan proto-fibrillas cortas a la izquierda mientras que se ven agregados muy densos con una morfología típica a la derecha, indicados por flechas blancas.

Figura 7. Compuestos inventivos (compuesto G a la izquierda y compuesto F a la derecha) unidos a depósitos A β en cerebro de ratón vivo una semana después de la inyección.

- 45 **Figura 8.**

- (A) Efectos de un tratamiento con p-FTAA en A β 38, A β 40 y A β 42 en CSF: los gráficos representan A β 38 humano (izquierda), A β 40 (centro), y A β 42 (derecha) en CSF de ratones Tg hAPP tratados con vehículo o p-FTAA en 3 dosis. Los datos se representan como un gráfico de puntos dispersos con valores individuales y valor medio del grupo con SD. Las diferencias de grupo importantes se indican con asteriscos: *indica $p < 0,05$, ** indica $p < 0,01$, *** indica $p < 0,001$.

- 55 (B) Efectos de un tratamiento con p-FTAA sobre A β 38, A β 40 y A β 42 en homogeneizados de cerebro: los gráficos representan A β 38 humano (izquierda), A β 40 (centro), y A β 42 (derecha) en cuatro fracciones diferentes de homogeneizado de cerebro de ratones Tg hAPP tratados con vehículo o p-FTAA en 3 dosis. Los datos se representan como gráfico de puntos dispersos con valores individuales y valor medio de grupo con SD. Las

diferencias importantes de los grupos se indican con asteriscos:*indica $p < 0,05$, ** indica $p < 0,01$, *** indica $p < 0,001$.

Figura 9. Efectos de un tratamiento con p-FTAA sobre el comportamiento en el MWM: el gráfico representa la velocidad de natación (arriba) y la longitud del recorrido de natación (abajo) para alcanzar la posición de la plataforma en el MWM los días 1-4 de ratones Tg que recibieron vehículo (\square), 10 mg/kg/día de p-FTAA (\diamond) y ratones nTg que recibieron vehículo (\circ). Los datos se presentan como valor medio del grupo +SEM de la totalidad de las tres pruebas por día. Las diferencias importantes de los grupos se indican con asteriscos:*indica $p < 0,05$, ** indica $p < 0,01$, *** indica $p < 0,001$ para control nTg frente a control Tg.

Figura 10. Efectos de un tratamiento con p-FTAA sobre el área de calva visualizado por tinción con tioflavina-S: los gráficos representan el área teñida con tioflavina-S en el córtex y el hipocampo de ratones Tg que recibieron vehículo (N = 6), 0,1 mg/kg/día de p-FTAA (N = 6), 1 mg/kg/día p-FTAA (N = 6), 10 mg/kg/día de p-FTAA (N = 6). Los datos se representan como valor medio + SEM. La barra dispersa indica una diferencia significativa en un test t de dos colas no apareado. 1 mg/kg así como 10 mg/kg de tratamiento con p-FTAA condujo a una carga de calva significativamente menor en el hipocampo, mientras que la carga de calva positiva a la tioflavina-S era comparable entre los grupos en el córtex.

Figura 11.

Tanto p-HTAA como POWT-13 dan como resultado mejor viabilidad comparados con 10 μ M de A β 1-42 solo. Se muestran las ratios estequiométricas de T.I. a 10 μ M al A β 1-42 debajo del gráfico.

Figura 12.

Tanto p-HTAA como POWT-13 dan como resultado mejor viabilidad comparados con 10 μ M de A β 1-42 solo. Se muestran las ratios estequiométricas de T.I. a 10 μ M de A β 1-42 debajo del gráfico.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Todos los términos y abreviaturas utilizados en la presente solicitud deben interpretarse conforme al significado dado usualmente a los mismos en la técnica relevante, a no ser que se indique otra cosa. Sin embargo, en aras de la claridad, algunos términos se definen específicamente a continuación.

El término resto alquilo o alquileno, como se utiliza en esta memoria, es un resto alquilo o alquileno C1-C6, v.g. un resto alquilo o alquileno C1-C4 y debe entenderse que abarca también la porción alquilo o alquileno de cualquier grupo funcional, v.g. un grupo alcoxi, alquilamino o carboxipolioxialquileno. Así, por ejemplo, cualquier alquilo en un grupo alcoxi o alquilamino conforme a la invención es un grupo alquilo C1-C6, v.g. un grupo alquilo C1-C4.

Asimismo, cualquier grupo alquilo o alquileno conforme a la invención puede ser ramificado o no ramificado.

El término "alquilo" incluye el monorradical derivado de un alcano C1-C6 o alcano C1-C4, ramificado o no ramificado. Ejemplos de un grupo alquilo son metilo (CH_3 -), etilo (CH_3CH_2 -), propilo ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ -) e isopropilo ($(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ -).

El término "alquileno" incluye el dirradical derivado de un alcano C1-C6, o alcano C1-C4 ramificado o no ramificado. Ejemplos de un grupo alquileno son metileno ($-\text{CH}_2$ -), etileno ($-\text{CH}_2\text{CH}_2$ -), propileno ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ -) e isopropileno ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$ -).

Los términos "tienileno", "fenileno", "fluorenileno", "benzotienileno", "etilenodioxitienileno", "benzotiadiazolileno", "vinileno" incluyen dirradicales derivados de tiofeno, benceno, fluoreno, 3,4-etilenodioxitiofeno, 2-benzotiofeno(o benzo [c]tiofeno), 2,1,3-benzotiadiazol, y etileno, respectivamente.

Los términos "hidroxialquilo", "hidroxialcoxi", "hidroxialcoxialquilo" e "hidroxipolioxialquileno", incluyen un radical alquilo, alcoxi, alcoxialquilo y polioxialquileno, respectivamente, que llevan una función hidroxil.

El término "alcoxi" incluye un grupo R-O-, en donde R es alquilo.

El término "alcoxialquilo" incluye un radical alquilo que lleva una función alcoxi.

El término "polioxialquileno" incluye un grupo de la fórmula general $\text{RO}-(\text{R}'\text{O})_n$ - en donde n es un número entero de 1 a 6, v.g. de 1 a 4, o 1 ó 2; R es un radical alquilo y cada R' es un radical alquileno seleccionado independientemente.

Los términos "carboxialquilo", "carboxialcoxi", "carboxialcoxialquilo", y "carboxipolioxialquileno", incluyen un radical alquilo, alcoxi, alcoxialquilo y polioxialquileno, respectivamente, que llevan una función carboxi.

El término "alcoxicarbonilo" incluye un radical -COOR, a saber un alquiléster de una función ácido carboxílico.

Los términos "alcoxicarbonilalquilo", "alcoxicarbonilalcoxi", "alcoxicarbonilalcoxialquilo", "alcoxicarbonilpolioxialquileno", incluyen un radical alquilo, alcoxi, alcoxialquilo y polioxialquileno, respectivamente, que llevan una función alcoxicarbonilo.

El término "alquilamino" incluye -NHR en donde R es alquilo.

El término "dialquilamino" incluye -NRR' en donde R y R' son grupos alquilo seleccionados independientemente.

Los términos "aminoalquilo", "alquilaminoalquilo", y "dialquilaminoalquilo", incluyen un radical alquilo que lleva una función amino, alquilamino o dialquilamino, respectivamente.

Los términos "aminoalcoxi", "alquilaminoalcoxi", y "dialquilaminoalcoxi", incluyen un radical alcoxi que lleva una función amino, alquilamino o dialquilamino, respectivamente.

Los términos "aminoalcoxialquilo", "alquilaminoalcoxialquilo", y "dialquilaminoalcoxialquilo", incluyen un radical alcoxialquilo que lleva una función amino, alquilamino o dialquilamino, respectivamente.

Los términos "aminopolioxialquileno", "alquilaminopolioxialquileno", y "dialquilaminopolioxialquileno", incluyen un radical polioxialquileno que lleva una función amino, alquilamino o dialquilamino, respectivamente.

El término "acilamino" incluye resto -NH-C(O)-alquilo.

Los términos "acilaminoalquilo", "acilaminoalcoxi", "acilaminoalcoxialquilo" y "acilaminopolioxialquileno", incluyen un radical alquilo, alcoxi, alcoxialquilo y polioxialquileno, respectivamente, que lleva una función acilamino.

El término "acilalquilamino" incluye un resto -NR-C(O)-alquilo en donde R es alquilo.

Los términos "acilalquilaminoalquilo", "acilalquilaminoalcoxi", "acilalquilaminoalcoxialquilo" y "acilalquilaminopolioxialquileno", incluyen un radical alquilo, alcoxi, alcoxialquilo y polioxialquileno, respectivamente, que lleva una función acilalquilamino.

El término "hidracinocarbonilo" incluye un resto -C(O)NH-NH₂.

Los términos "hidracinocarbonilalquilo", "hidracinocarbonilalcoxi", "hidracinocarbonilalcoxialquilo" e "hidracinocarbonilpolioxialquileno", incluyen un radical alquilo, alcoxi, alcoxialquilo y polioxialquileno, respectivamente, que lleva una función hidracinocarbonilo.

Los términos "(amino)(carboxi)alquilo", "(amino)(carboxi)alcoxi", "(amino)(carboxi)alcoxialquilo" y "(amino)(carboxi)polioxialquileno", incluyen un radical alquilo, alcoxi, alcoxialquilo y polioxialquileno, respectivamente, que lleva una función carboxi y una función amino, unidas preferiblemente al mismo átomo de carbono.

Los términos "(alquilamino)(carboxi)alquilo", "(alquilamino)(carboxi)alcoxi", "(alquilamino)(carboxi)alcoxialquilo" y "(alquilamino)(carboxi)polioxialquileno", incluyen un radical alquilo, alcoxi, alcoxialquilo y polioxialquileno, respectivamente, que lleva una función carboxi y una función alquilamino, unidas preferiblemente al mismo átomo de carbono.

Los términos "(dialquilamino)(carboxi)alquilo", "(dialquilamino)(carboxi)alcoxi", "(dialquilamino)(carboxi)alcoxialquilo" y "(dialquilamino)(carboxi)polioxialquileno", incluyen un radical alquilo, alcoxi, alcoxialquilo y polioxialquileno, respectivamente, que llevan una función carboxi y una función dialquilamino, unidas preferiblemente al mismo átomo de carbono.

Los términos "(alcoxicarbonil)(amino)alquilo", "(alcoxicarbonil)(amino)alcoxi", "(alcoxicarbonil)(amino)alcoxialquilo" y "(alcoxicarbonil)(amino)polioxialquileno", incluyen un radical alquilo, alcoxi, alcoxialquilo y polioxialquileno, respectivamente, que lleva una función alcoxicarbonilo y una función amino, unidas preferiblemente al mismo átomo de carbono.

Los términos "(alcoxicarbonil)(alquilamino)alquilo", "(alcoxicarbonil)(alquilamino)alcoxi", "(alcoxicarbonil)(alquilamino)alcoxialquilo" y "(alcoxicarbonil)(alquilamino)polioxialquileno", incluyen un radical alquilo, alcoxi, alcoxialquilo y polioxialquileno, respectivamente, que lleva una función alcoxicarbonilo y una función alquilamino, unidas preferiblemente al mismo átomo de carbono.

5 Los términos "(alcoxycarbonil)(dialquilamino)alquilo", "(alcoxycarbonil)(dialquilamino)alcoxi", "(alcoxycarbonil)-(dialquilamino)alcoxialquilo" y "(alcoxycarbonil)(dialquilamino)polioxialquilenno", incluyen un radical alquilo, alcoxi, alcoxialquilo y polioxialquilenno, respectivamente, que lleva una función alcoxycarbonilo y una función dialquilamino, unidas preferiblemente al mismo átomo de carbono.

Los términos "nitroalquilo", "nitroalcoxi", "nitroalcoxialquilo" y "nitropolioxialquilenno", incluyen un radical alquilo, alcoxi, alcoxialquilo y polioxialquilenno, respectivamente, que lleva una función nitro.

10 Los términos "cianoalquilo", "cianoalcoxi", "cianoalcoxialquilo", "cianopolioxialquilenno", incluyen un radical alquilo, alcoxi, alcoxialquilo y polioxialquilenno, respectivamente, que lleva una función ciano.

Los términos "sulfoalquilo", "sulfoalcoxi", "sulfoalcoxialquilo", "sulfopolioxialquilenno", incluyen un radical alquilo, alcoxi, alcoxialquilo y polioxialquilenno, respectivamente, que lleva una función sulfo.

15 El término "monodisperso" como se utiliza en esta memoria debería interpretarse, como es conocido comúnmente para una persona experta en la técnica, como distribución de tamaños muy estrecha, es decir, el índice de polidispersidad (PDI) debería estar próximo a 1.

20 Debería indicarse que la invención incluye los compuestos descritos en esta memoria en todas las formas posibles geométricas o estereoméricas. Dentro del alcance de la invención, se encuentran isómeros cis y trans, enantiómeros R y S, diastereoisómeros, y mezclas racémicas de los compuestos mencionados.

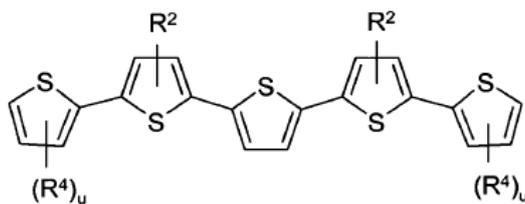
NUEVO USO MÉDICO

25 Como se ha mencionado anteriormente en esta memoria, en un primer aspecto la invención se refiere a un compuesto de fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para el tratamiento de un mamífero, especialmente un mamífero tal como un humano que padece una enfermedad que implica formas de proteínas plegadas defectuosamente o agregadas.

30 Los compuestos de la invención pueden considerarse como oligómeros o polímeros de monómeros. Se ha sugerido en la técnica anterior la producción de oligómeros o polímeros de algunos de los monómeros que constituyen la base de los compuestos conforme a la presente invención. Sin embargo, los polímeros son en la mayoría de los casos polidispersos debido a la facilidad y el bajo coste de fabricación de los polímeros polidispersos en comparación con los compuestos monodispersos. Los compuestos conforme a la presente invención encuentran su uso primario como productos farmacéuticos y por tanto necesitan estar bien definidos. Los compuestos de la invención son por tanto monodispersos.

COMPUESTOS NUEVOS

40 En un aspecto, la invención se refiere a un compuesto nuevo de fórmula (II)



(II)

45 en donde
 cada u se selecciona independientemente de 0 y 1;
 cada R^2 , y R^4 se selecciona independientemente de carboxi, carboxialquilo, alcoxycarbonilalquilo, aminoalquilo, (amino)(carboxi)alquilo y (amino)(carboxi)alcoxi; en donde cualquier resto alquilo es un alquilo C1-C6.

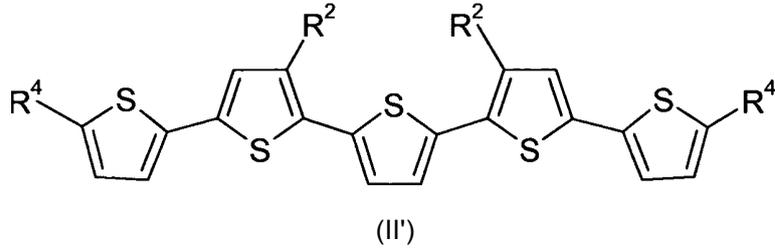
50 En algunas realizaciones, cada R^2 se selecciona independientemente de carboxi, carboxialquilo, alcoxycarbonilalquilo, y aminoalquilo.

55 En algunas realizaciones, cada R^4 se selecciona independientemente de carboxi, carboxialquilo, alcoxycarbonilalquilo, aminoalquilo, (amino)(carboxi)alquilo y (amino)(carboxi)alcoxi.

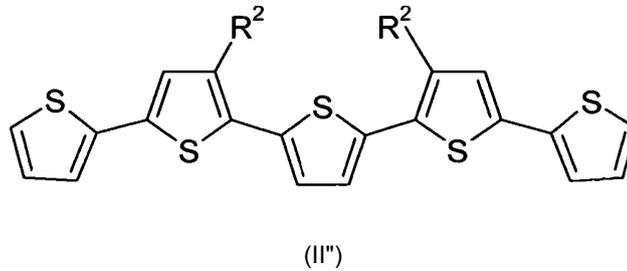
Por ejemplo, cada R^2 y R^4 pueden seleccionarse independientemente de $-\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{C}_2\text{H}_4\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{COOCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{C}_2\text{H}_4\text{NH}_2$, $-\text{OCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)(\text{COOH})$, y $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)(\text{COOH})$.

En algunas realizaciones, todos los grupos R^2 son iguales. En otras realizaciones, todos los grupos R^4 son iguales. En todavía otras realizaciones, todos los grupos R^2 y R^4 son iguales.

En algunas realizaciones, el compuesto puede representarse por la fórmula (II')

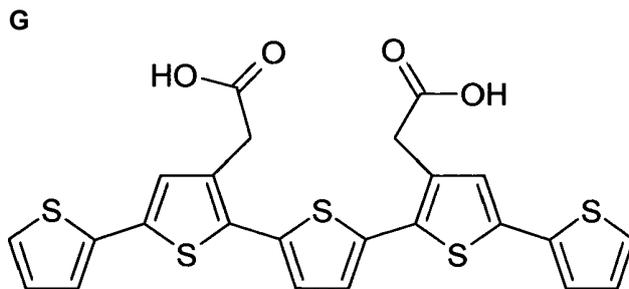
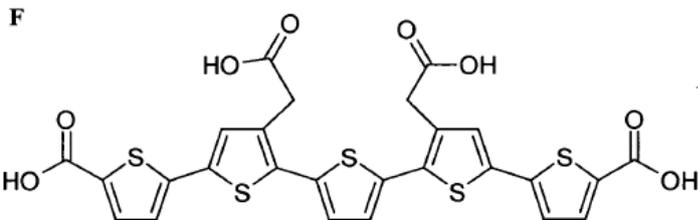


en donde R^2 y R^4 son como se define anteriormente en esta memoria; o por la fórmula (II'')



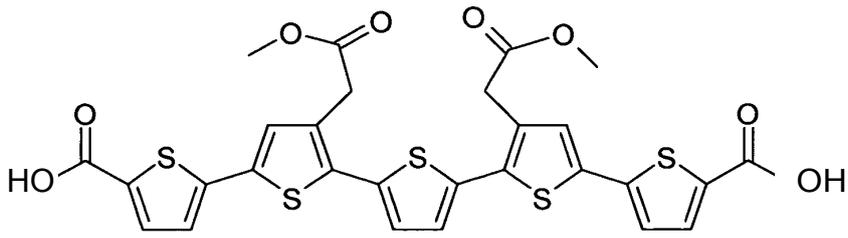
en donde R^2 es como se define anteriormente en esta memoria.

Algunos ejemplos de compuestos conforme a la presente invención son los siguientes:



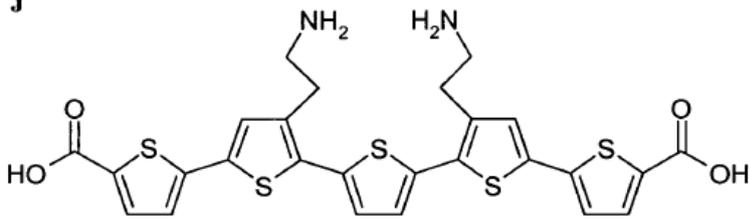
35

H

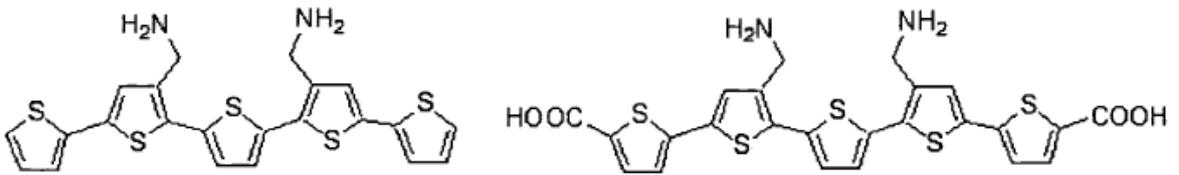


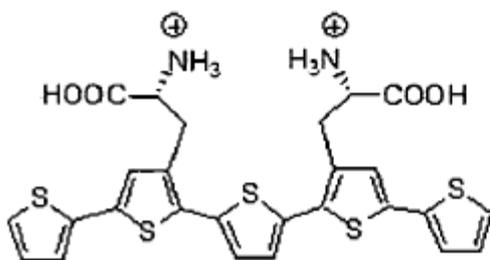
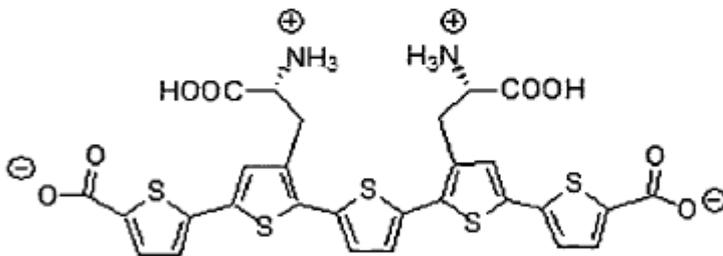
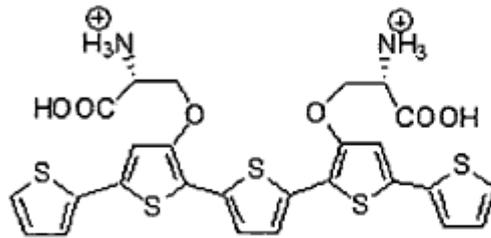
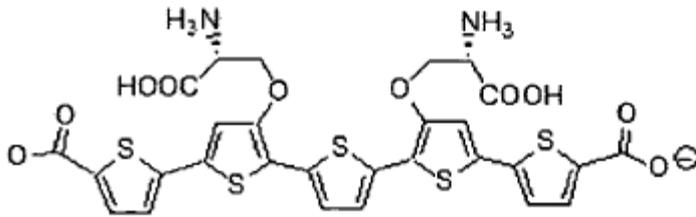
5 y

J



10 Otros ejemplos de compuestos conforme a la invención son los siguientes:



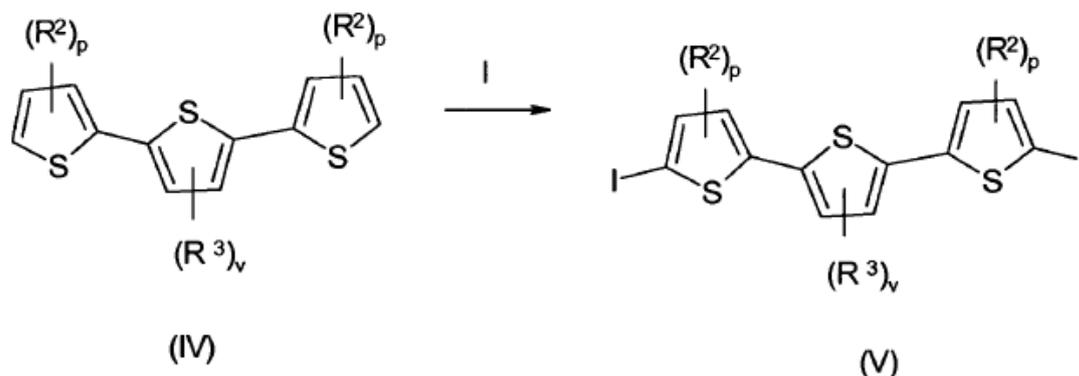


MÉTODOS DE PREPARACIÓN

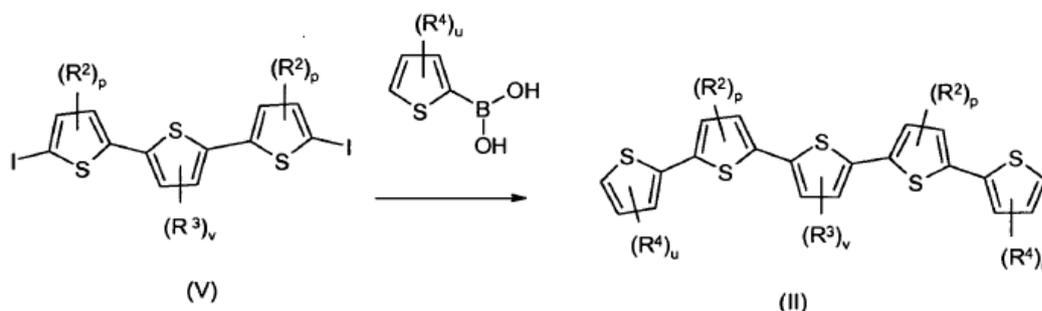
5 Los compuestos de la presente invención pueden ser preparados por una persona con experiencia ordinaria en la técnica, a la luz de la descripción general de esta memoria y los ejemplos ilustrativos específicos.

Un ejemplo de un método de preparación de un compuesto conforme a la presente invención, es como sigue:

10 En un primer paso, un compuesto conforme a la fórmula (IV) (disponible comercialmente o sintetizado, v.g., utilizando el acoplamiento de Suzuki), en donde A, R² y p son como se define anteriormente en esta memoria, se somete a yodación, para dar un compuesto de fórmula (V):



El compuesto de fórmula (V) se hace reaccionar luego con ácido 2-tiéfeno-borónico en condiciones de acoplamiento de Suzuki, para dar el compuesto (II):



5

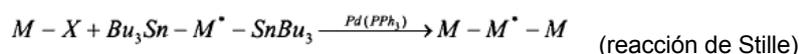
Los compuestos inventivos se pueden preparar también siguiendo generalmente la secuencia de reacción descrita para el compuesto J en el Ejemplo 4.

10 Generalmente, las estructuras cíclicas, es decir, tiofeno, benceno, fluoreno, benzotiofeno, etilenodioxitiofeno, benzotiazol; y vinilo, sirven como unidades monómeras básicas en el compuesto inventivo. Pueden obtenerse sustituciones de las estructuras cíclicas mencionadas por química convencional, bien conocida por un experto en la técnica de síntesis orgánica y descrita en libros de texto de síntesis orgánica, e ilustrada en los ejemplos de síntesis que siguen.

15 Para la preparación de homo- y copolímeros polidispersos descritos en los compuestos inventivos puede realizarse una polimerización oxidante aleatoria de las estructuras cíclicas mencionadas utilizando por ejemplo cloruro de hierro (III). Tales polímeros pueden separarse por tamaños por métodos de separación bien conocidos que incluyen, pero sin carácter limitante, diálisis y cromatografía de exclusión por tamaños.

20 Para generar estructuras dímeras, trímeras, tetrámeras, pentámeras, etc de las estructuras cíclicas mencionadas, son conocidos varios métodos por los expertos en la técnica, mencionándose en esta memoria los ejemplos no limitantes del acoplamiento de Suzuki y de Stille. Otro método bien conocido para generación de polímeros y oligómeros de sistemas conjugados y algunos de los compuestos inventivos descritos en esta memoria es la denominada reacción de Metátesis de Grignard, bien descrita por McCullough. [Loewe, R. S.; Khersonsky, S. M.; McCullough, R. D. Adv. Mater. 1999,11, 250-253.]

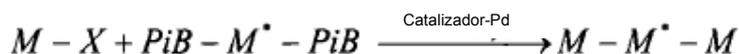
25 El acoplamiento de Stille utiliza el acoplamiento de un compuesto orgánico de estaño con un haluro orgánico que posee hibridación sp^2 catalizado por paladio, ilustrado por la reacción esquemática de tres unidades cíclicas para dar un bloque trímero:



35 donde Bu_3Sn es tributilestannilo, M y M^* simbolizan una estructura cíclica arbitraria.

El acoplamiento de Suzuki utiliza una reacción entre un ácido aril- o vinil-borónico o éster borato con un haluro de vinilo o arilo catalizada por un complejo de paladio, ilustrada por la reacción esquemática:

40



(reacción de Suzuki)

en donde PiB es un éster borato.

5 La reacción puede llevarse a cabo también con pseudo-haluros tales como triflatos.

Los ejemplos arriba mencionados describen la preparación de compuestos simétricos. Para preparar compuestos asimétricos, puede utilizarse v.g. un enfoque estequiométrico, donde la cantidad de reactivo añadida es equimolar al compuesto a derivatizar, si este compuesto tiene varios sitios de reacción. Como es bien sabido por las personas expertas, a partir de cualquier mezcla de compuestos simétricos y/o asimétricos, los compuestos individuales pueden separarse por métodos de separación química. Ejemplos no limitantes de separación incluyen cromatografía en columna flash y destilación.

15 En ciertos aspectos, los compuestos inventivos pueden utilizarse en forma de "sales farmacéuticamente aceptables", haciendo referencia a derivados de los compuestos descritos, donde los compuestos descritos se modifican por producción de sales ácidas y básicas de los mismos. Ejemplos no limitantes de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales minerales u orgánicas de derivados básicos de los grupos R mencionados tales como aminas y sales orgánicas o inorgánicas, v.g. sales alcalinas de derivados ácidos de los grupos R mencionados tales como ácidos carboxílicos. Sales convencionales no tóxicas y sales de amonio cuaternario se incluyen en las sales farmacéuticamente aceptables.

Las sales farmacéuticamente aceptables descritas en la presente invención se pueden preparar a partir de los compuestos inventivos descritos en esta memoria que contienen una identidad básica o ácida por métodos químicos convencionales.

25 ENFERMEDADES

Las enfermedades a tratar por utilización de los compuestos conforme a la presente invención son enfermedades relacionadas con proteínas plegadas defectuosamente y agregadas. Tales enfermedades han sido denominadas también proteopatías, (Walker y Levine, Curr Opin Investig Drugs. 2002, mayo; 3(5):782-7). Las enfermedades que caracterizan proteínas amiloides son ejemplos relevantes para la descripción de enfermedades relacionadas con proteínas plegadas defectuosamente y agregadas, donde las amiloidosis se conocen como una enfermedad y pueden ser hereditarias o adquiridas. Obsérvese que la amiloidosis se refiere usualmente por defecto a amiloidosis AA, pero cualquier enfermedad relacionada con proteínas amiloides, que presente deposición de amiloide, es una amiloidosis. Por ejemplo, CJD, vCJD, Enfermedad de Alzheimer y diabetes no se consideran casi nunca como amiloidosis.

En este párrafo se citan algunos ejemplos de amiloidosis con relevancia para la presente invención. La amiloidosis primaria incluye mutaciones en lisozima, transtiretina, apolipoproteína B, fibrinógeno y amiloidosis AL (cadenas ligeras de inmunoglobulina, como se ven en el mieloma múltiple). La amiloidosis secundaria incluye amiloidosis AA (proteína amiloide A del suero, una proteína de fase aguda debida a inflamación crónica) y amiloidosis por gelsolina (fragmentos de gelsolina en plasma). Las amiloidosis familiares o hereditarias están causadas en la mayoría de los casos por mutaciones en la proteína transtiretina, pero en casos raros pueden estar causadas también por teina A1, gelsolina, fibrinógeno, y mutaciones de lisozima, causadas fundamentalmente por genética, que se cree son autosómicas dominantes, con alta probabilidad de paso a la descendencia, amiloidosis de tipo Apalache y fiebre de Shar Pei para la amiloidosis en Shar Peis. Ejemplos de amiloidosis organoespecíficas son diabetes mellitus tipo 2 (amilina, conocida también como IAPP), enfermedad de Alzheimer (Aβ39-42), enfermedad de Parkinson (α-sinucleína), enfermedad de Huntington (huntingtina), encefalopatías espongiiformes transmisibles (proteína priónica, PrP), algunos ejemplos de la cual son la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (PrP en cerebro), Kuru (depósitos difusos de PrP en el cerebro), Insomnio Familiar Fatal (PrP en el tálamo), miositis por cuerpos de inclusión y encefalopatía espongiiforme bovina (PrP en el cerebro de las vacas), angiopatía Congólica (Amiloide beta). La amiloidosis cardiaca incluye insuficiencia cardiaca congestiva; algunos casos (PrP o transtiretina en el corazón). Otro ejemplo importante son las condiciones iatrogénicas como la amiloidosis por insulina, que se cree está causada por insulina administrada mediante inyección.

Algunos amiloides que no provocan enfermedad son amiloides nativos en organismos, Proteína Curli de E. coli (curlina), Priones de Levadura [Sup35], Prión de Podospora Anserina Het-s, la Proteína de cubierta de la malaria, la seda de araña, los melanosomas de mamífero (pMel), el activador del plasminógeno de tipo tisular (tPA) (un factor hemodinámico), Calcitonina y proteínas y péptidos modificados por ingeniería para producir amiloide.

Las enfermedades priónicas [v.g. encefalopatía espongiiforme bovina (BSE), y la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (CJD)], están asociadas con la conversión de conformación de la proteína priónica celular normal, (PrP^C), en una isoforma asociada a enfermedad infecciosa designada PrP^{Sc}. La forma infecciosa defectuosamente pegada de la proteína PrP^{Sc} es la causa de un grupo de enfermedades fatales raras del cerebro, denominadas enfermedades priónicas que afectan a humanos y mamíferos. Las enfermedades priónicas se conocen también como

encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE), e incluyen encefalopatía espongiforme bovina (BSE, o mal de las "vacas locas") en el ganado bovino; el Scrapie en las ovejas; la caquexia crónica en ciervos y alces; y en humanos [enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (CJD); enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), Kuru].

- 5 Los compuestos de la presente invención tienen por objeto ser utilizados para métodos de terapia de las enfermedades arriba indicadas.

USO DE LOS COMPUESTOS EN TERAPIA

- 10 La presente invención se refiere también al uso de derivados de tiofeno como agentes terapéuticos nuevos. Los derivados de tiofeno alteran la patología del amiloide después de administración a un organismo, es decir actúan como agentes terapéuticos. Las afecciones y enfermedades a tratar con los compuestos conforme a la invención son afecciones y enfermedades relacionadas con la agregación de proteínas plegadas defectuosamente como se ha expuesto con anterioridad por administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos conforme a la invención a un individuo que lo necesita.

15 Los derivados de tiofeno de la presente invención pueden diseñarse para atravesar la barrera hematoencefálica y tienen por tanto efectos o enfermedades que afectan al cerebro, lo cual incluye, pero sin carácter limitante, patología del amiloide A β en organismos vivos, es decir influyen en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer por actuar como agentes terapéuticos.

20 Los derivados de tiofeno pueden incluirse en preparaciones farmacéuticas adaptadas para inyección en el torrente sanguíneo, para ser administrados por vía oral, por inhalación, por absorción a través de la piel o las mucosas, y para distribución en otros fluidos corporales, tales como el fluido cerebroespinal (CSF) o la linfa.

25 Los productos inventivos pueden administrarse por cualquier medio conocido por una persona con experiencia ordinaria en la técnica. La presente invención incluye composiciones "farmacéuticamente aceptables" basadas en una cantidad del compuesto inventivo necesaria para el tratamiento eficaz de un paciente junto con uno o más portadores farmacéuticos, tales como aditivos y/o diluyentes. Los compuestos inventivos pueden formularse y administrarse con otros agentes terapéuticos. La formulación de los compuestos inventivos puede determinarse por los medios de administración. La formulación para administración de los compuestos inventivos puede ser sólida, líquida o en forma de aerosol. La administración de los compuestos inventivos a un animal o humano puede ser local o sistémica y realizarse por vías parenteral, oral, por inhalación, por vías rectal, nasal, bucal, vaginal o por un depósito implantado. El término "parenteral" se refiere a la administración fuera del tracto alimentario que incluye administración subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intraespinal, intracraneal, subdérmica, intradérmica por inyección o infusión.

30 Pueden añadirse agentes portadores a las composiciones de derivados farmacéuticos de tiofeno a fin de conseguir la distribución y aceptación deseadas en el organismo vivo. Tales agentes incluyen, pero sin carácter limitante, lípidos, fosfolípidos, membranas de celulosa, recubrimientos de azúcar, ácido hialurónico, detergentes, péptidos, proteínas, iones, sales, formadores de quelatos y disolventes.

35 La dosis administrada de los compuestos debería ser una dosis eficaz para tratamiento del paciente específico. El nivel específico de dosis de los compuestos inventivos dependerá de varios factores, que incluyen la actividad y la posible toxicidad de los compuestos específicos utilizados; el estado general de salud, la edad, el sexo, el peso corporal y la dieta del individuo o paciente, la combinación de fármacos, el tiempo y la forma de administración así como la tasa de excreción. La dosis administrada puede estar comprendida típicamente entre 0,001 mg/kg/día y 50 mg/kg/día, preferiblemente entre 0,005 mg/kg/día y 10 mg/kg/día.

50 EJEMPLOS

Efectos terapéuticos de los compuestos inventivos

55 La presente invención demuestra nuevos tratamientos modificadores anti-enfermedades amiloides basados en los compuestos inventivos descritos en esta memoria. Los tratamientos sintomáticos actuales representan los extremos opuestos del continuo de resultados terapéuticos posibles en la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades relacionadas con proteínas agregadas. Los compuestos inventivos pueden utilizarse como agentes modificadores anti-enfermedades amiloides y, si bien no se pretende quedar ligados por la teoría, se supone que éstos interrumpen eventos patológicos tempranos por disminución de la producción de proteínas agregadas o A β ; por fijación a proteínas agregadas existentes o A β ; por inhibición de la formación de proteína nueva agregada o A β , o por aclaramiento creciente de las proteínas amiloides agregadas o A β , previniendo con ello todos los procesos patológicos aguas abajo. Un mecanismo plausible, relacionado con enfermedades neurológicas, consiste en utilizar los compuestos inventivos para rescatar neuronas viables a fin de conseguir cierto grado de alivio de los síntomas o una inversión total de la enfermedad. Otros tratamientos pueden bloquear eventos que ocurren aguas abajo de la producción de proteínas agregadas o A β que afectan a ciertos aspectos de la enfermedad.

Los ejemplos mencionados en esta memoria describen los primeros pasos para mostrar los efectos terapéuticos sobre las enfermedades de plegado defectuoso tales como el Alzheimer de los compuestos inventivos (Esquema 2). Ejemplos tanto *in vitro* como *in vivo* verificarán adicionalmente estos efectos.

Ejemplos de inhibición de la fibrilación in vitro

Una fibrilación *in vitro* de péptidos y proteínas asociados a enfermedades, siendo un ejemplo no limitante los péptidos A β , puede realizarse en presencia de los compuestos inventivos, y el efecto de la distribución de pesos moleculares de las especies agregadas puede evaluarse para demostrar los efectos individuales. El peso molecular de las especies agregadas puede determinarse por electroforesis en gel, cromatografía de exclusión de tamaños y otros métodos bien conocidos en la técnica.

Ejemplos in vivo de ensayos de células A β

La serie de compuestos de la presente invención puede ser, pero no tiene necesariamente que ser permeable a las células. Como modelo para la enfermedad de Alzheimer es especialmente adecuado exponer células neurales a especies agregadas de péptidos A β , donde después de las respuestas celulares se estudia la supervivencia celular. Los efectos terapéuticos del compuesto inventivo pueden estudiarse en este sistema por exposición de las células neurales a especies agregadas de péptidos A β y adición de los compuestos inventivos simultáneamente, antes o después, tras de lo cual se evalúan los efectos protectores de los compuestos. Puede demostrarse que una función, pero no la única, de los compuestos inventivos es proteger las neuronas contra la toxicidad intracelular de AbO por reducción del nivel de oligómeros Ab (AbO) intraneuronales o simplemente por disminución de su toxicidad.

Los AbO pueden inducir toxicidad cuando se aplican desde fuera de las células. Un modo de toxicidad es por la vía de la fijación fuerte de AbO a las sinapsis, dando como resultado deterioro sináptico grave. Tal actividad de fijación puede visualizarse también utilizando AbO marcados o una variante de los compuestos inventivos. Los compuestos inventivos se añadirán antes o después de la aplicación de AbO a cultivos neuronales, u otros cultivos de células, a fin de demostrar su actividad. Los compuestos inventivos se añadirán también al mismo tiempo, junto con la aplicación de AbO a los cultivos celulares para demostrar ulteriormente su actividad.

Ejemplo de ensayo de priones in vivo

Ejemplos *in vivo* que son especialmente adecuados para demostrar los efectos terapéuticos son cultivos de células o modelos en portaobjetos de cultivos organotípicos de enfermedades de plegado defectuoso. En el caso de las enfermedades priónicas, el ensayo de las células del Scrapie (SCA) se conoce desde hace al menos 5 años como sistema modelo, en el cual las infecciones priónicas pueden estudiarse por la supervivencia celular y cuantificación de la proteína priónica. Los efectos terapéuticos de los compuestos inventivos pueden demostrarse por adición constante de éstos en el medio de cultivo o, alternativamente, por una exposición corta en un medio adecuado, después de lo cual se medirían la supervivencia celular y los niveles de proteína priónica. Otro sistema modelo de tipo *in vivo* más es el ensayo de cultivo de cortes priónicos organotípicos (POSCA) descrito recientemente por Aguzzi (Falsig y Aguzzi, Nat. Prot., 2008, 3 (4), 555-562). Se cultivan cortes de cultivos de cerebro hasta 8 semanas y puede monitorizarse la progresión de las infecciones priónicas. De manera similar, como en el caso del SCA, los cortes de cultivo pueden exponerse constantemente a los compuestos inventivos o exponerse en dosis más cortas, después de lo cual se estudiará la progresión de la infección priónica.

Demostración de eficacia in vivo

Los autores de la presente invención han demostrado que una inyección intravenosa de los compuestos inventivos atravesaba rápidamente la barrera hematoencefálica y permeaba el cerebro produciendo calvas de amiloide resaltadas fluorescentemente en un ratón AD. Existen varios modelos animales de la enfermedad de plegado defectuoso, para evaluación de los efectos terapéuticos de los compuestos inventivos, siendo especialmente adecuados los modelos de ratón transgénico. Ejemplos no limitantes de modelos de ratón son los modelos PS-APP y 5xFAD.

La presente invención ha demostrado que los compuestos de la invención reconocen una conformación amiloide en AbO y en fibrillas amiloides en ratones transgénicos. Esta fijación puede demostrarse adicionalmente en ratones humanizados y en humanos. Al ser compatibles con el organismo humano, dichos compuestos pueden utilizarse como agentes terapéuticos para el hombre. Los estudios iniciales pueden incluir, pero sin carácter limitante, un curso de 2 semanas de inyección intraperitoneal diaria de los compuestos inventivos en ratones modelo con patología AD, ratones humanizados y posteriormente en humanos, a fin de demostrar la reducción significativa de la cantidad de lesiones amiloides en el cerebro o en otras partes del cuerpo. No debería observarse toxicidad aparente alguna. La reducción de los niveles cerebrales de proteína o agregados Ab por los compuestos inventivos podría confirmarse también, pero no necesariamente, por transferencia Western. Adicionalmente, se estudiarán cambios de comportamiento, v.g., mejoras cognitivas, como respuesta de la exposición a los compuestos inventivos. El uso

terapéutico de ligandos de amiloides conocidos, tales como PIP y otros derivados de Rojo Congo y tioflavinas está, con arreglo al saber de los autores de la presente invención, restringido por la capacidad limitada de sus modificaciones sintéticas. La ventaja singular de los compuestos inventivos es que los mismos son el primer ejemplo de ligandos amiloides derivados de una biblioteca de tienilo y que dichos ligandos pueden oligomerizarse y polimerizarse para alcanzar distintas propiedades adicionales. Una estructura oligómera o polímera puede ser de gran ventaja cuando se aplican modificaciones adicionales en la estructura química esencial. Las series de compuestos inventivos contienen una estructura esencial con tres más dos tienilo, u otros grupos como se describe en la presente invención. Estas son unidades químicas perfectamente adecuadas para generación de nuevas bibliotecas y para conseguir el efecto terapéutico relacionado con las enfermedades causadas por proteínas agregadas.

Ejemplo 1: Compuesto G (p-HTAA)

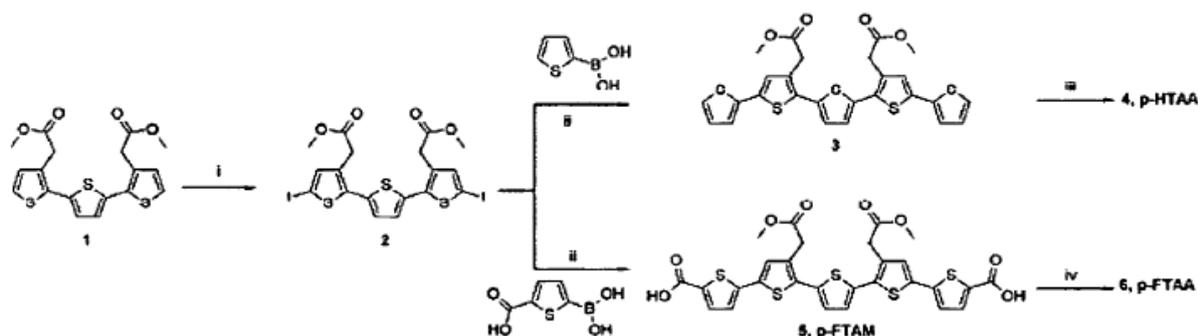
El bloque de construcción trímero (**1** en el Esquema 1), sintetizado con un protocolo previamente comunicado [Aslund A et al, Bioconjugate Chem., 2007, 18 (6), 1860-1868], se sometió a yodación antes de acoplarlo con ácido 2-tiofeno-borónico en condiciones semejantes al acoplamiento de Suzuki para dar p-HTAA (**3** en el Esquema 1). Se añadió adicionalmente **3** (0,200 g, 0,359 milimoles) a una solución de dioxano/NaOH (1 M, aq.) (1:1, 2 mililitros). Después de una 1 hora, la solución se neutralizó con HCl (1 M, aq.) y el precipitado se recogió por centrifugación. El precipitado se lavó con agua para dar la forma no salificada de p-HTAA con rendimiento cuantitativo (190 mg), que se convirtió en su sal de sodio correspondiente por disolución de la misma en H₂O (3 mL) y NaOH (29 mg, 0,725 milimol) y se liofilizó para proporcionar el producto p-HTAA (**4**, 0,205 g).
 HRMS calculado para C₂₄H₁₆O₄S₅: [M+H]⁺: 528,9725; encontrado 528,9723
 13C NMR (DMSO-D₆) δ: 34,6, 124,5, 126,0, 127,2, 128,0, 128,5, 130,1, 132,7, 134,6, 134,7, 135,6, 171,5
 1H-NMR (DMSO-D₆) δ: 3,76 (s, 4H), 7,12 (dd, 2H, J = 3,57, 5,22 Hz), 7,28 (s, 2H), 7,30 (s, 2H), 7,35 (dd, 2H, J = 1,10, 3,57 Hz), 7,51 (dd, 2H, J = 1,10, 5,22 Hz)

Ejemplo 2: Compuesto H (p-FTAM)

El bloque de construcción trímero (**1** en el Esquema 1, sintetizado con un protocolo previamente comunicado (Aslund A et al, Bioconjugate Chem., 2007, 18 (6), 1860-1868 (2007)), se sometió a yodación (**2** en el Esquema 1). El yoduro (**2**, 0,068 gramos, 0,106 milimoles), ácido 5-(hidroxiboril)-2-tiofenocarboxílico (0,072 g, 0,419 milimoles) y K₂CO₃ (0,090 g, 0,651 milimoles) se disolvieron en tolueno/metanol (1:1, 5 ml) y se borboteó argón durante 10 minutos. Después de adición de PEPPSI^(TM)-IPr ([1,3-bis(2,6-diisopropilfenil)imidazol-2-ilideno](3-cloropiridil)paladio(II) dicloruro) (0,003 g, 0,004 milimoles) la vasija de reacción se sometió a condiciones de microondas (10 min, 80°C). La mixtura se diluyó con HCl (1 M, aq.) y el precipitado rojo se recogió y se disolvió en dioxano a ebullición, se filtró sobre Celita y se precipitó por adición de H₂O para dar p-FTAM (**5**) como un polvo rojo con rendimiento de 85% (0,090 g).
 HRMS calculado para C₂₈H₁₉O₈S₅: [M-H]⁻: 642,9684; encontrado 642,9645
 13C NMR (DMSO-D₆) δ: 34,1, 52,1, 125,1, 127,8, 129,7, 132,2, 132,3, 133,2, 133,7, 134,3, 134,5, 141,7, 162,5, 170,4

Ejemplo 3: Compuesto F (p-FTAA)

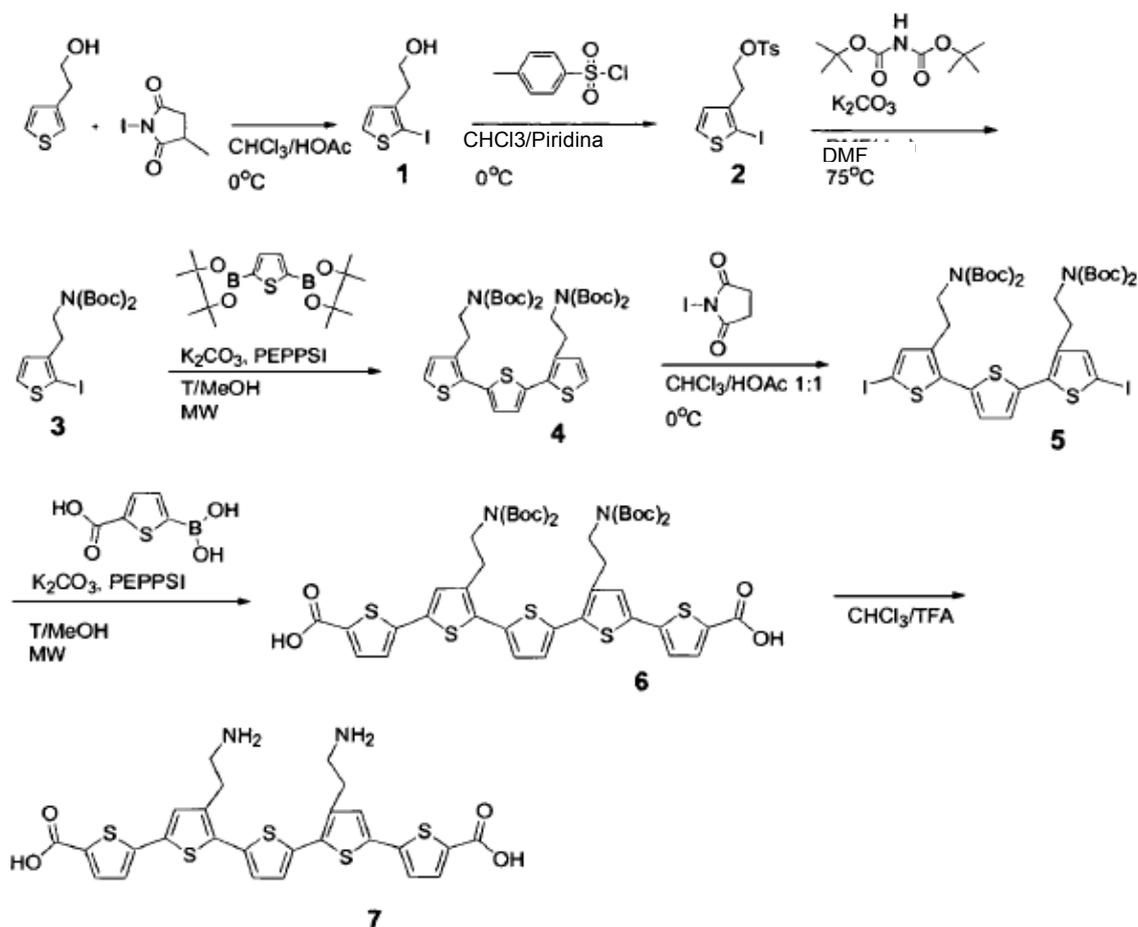
El compuesto H (p-FTAM, 0,200 g, 0,310 milimoles, **5** en el Esquema 1) se añadió a una solución de dioxano/NaOH (1 M, aq.) (1:1, 2 mililitros). Después de 1 hora, la solución se neutralizó con HCl (1 M, aq.) y el precipitado se recogió por centrifugación. El precipitado se lavó con H₂O para dar la forma no salificada de p-FTAA con rendimiento cuantitativo (191 mg) que se convirtió en su sal de sodio correspondiente por disolución de la misma en H₂O (3 ml) y NaOH (29 mg, 0,720 milimoles) y liofilización para proporcionar el producto p-FTAA (**6**, 0,207 g). HRMS calculado para C₂₆H₁₅O₈S₅: [M-H]⁻: 614,9371; encontrado 614,9422
 13C NMR (D₂O, 45 °C) δ: 38,4, 124,4, 126,6, 129,1, 131,9, 132,0, 134,4, 134,7, 135,5, 139,6, 140,9, 169,9, 179,4
 1H-NMR (DMSO-D₆) δ: 3,76 (s, 4H), 7,32 (s, 2H), 7,38 (d, 2H, J = 4,10 Hz), 7,45 (s, 2H), 7,66 (d, 2H, J = 4,10 Hz)



Esquema 1

5 Ejemplo 4: Compuesto J (p-PAMT)

Se disolvió 3-tiéfeno-etanol y se agitó en $\text{CHCl}_3/\text{HOAc}$ (1:1) a 0°C y se añadió poco a poco *N*-yodo-succinimida durante 20 minutos. La reacción se extinguió con 20 ml de agua después de 19 horas y la capa orgánica se lavó con 2×50 ml de solución saturada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 2×50 ml de agua, se secó, se filtró, se concentró, y se purificó por cromatografía en columna flash (tolueno/ EtOAc 18:1) para dar **1** (Esquema 2). Se disolvió **1** en $\text{CHCl}_3/\text{piridina}$ (7:1) a 0°C y se añadió cloruro de *p*-toluenosulfonilo durante 5 minutos. Después de 19 horas, la reacción se extinguió con 15 ml de agua y se diluyó con 40 ml de dietiléter. La capa orgánica se lavó con 2×40 ml de HCl 2 M, 2×50 ml de solución saturada de NaHCO_3 , 2×50 ml de agua, se secó, se filtró, se concentró y se purificó por cromatografía en columna flash (tolueno) para dar **2**. Se disolvieron **2**, di-*tert*-iminodicarboxilato, y K_2CO_3 en DMF (seca) y se calentaron en un baño de aceite a 75°C . Después de 4 horas, se añadieron EtOAc (50 ml) y agua (30 ml). La capa orgánica se lavó con 2×20 ml de HCl 2 M, 2×15 ml de agua, 2×15 ml salmuera, se secó, se filtró, se concentró, y se purificó por cromatografía en columna flash (tolueno) para dar **3**. Se disolvieron **3**, éster tío-feno-diborónico y K_2CO_3 en una solución desgasificada de tolueno/ MeOH (1:1) a la temperatura ambiente y se trataron bajo argón. Después de 10 minutos, se añadió PEPPSITM-IPr y la reacción se ejecutó en un horno microondas a 80°C durante 10 minutos. La solución se diluyó con tolueno (20 ml), se lavó con HCl 2 M (10 ml), agua (15 ml), se secó, se filtró, se concentró y se purificó por cromatografía en columna flash (tolueno/ EtOAc 18:1) para dar **4**. Se disolvió **4** en CHCl_3 (15 ml) a 0°C y se añadieron primeramente HOAc (15 ml) y finalmente *N*-yodosuccinimida. Después de 17 horas, la reacción se extinguió con agua (10 ml) y la capa orgánica se lavó con 2×50 ml de solución saturada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 2×50 ml de agua, se secó, se filtró se concentró y se purificó por cromatografía en columna flash (tolueno/ EtOAc 18:1) para dar **5**. Se disolvieron **5**, ácido 2-carboxitío-feno-5-borónico, y K_2CO_3 en una solución desgasificada de T/MeOH (1:1) a la temperatura ambiente y se trataron bajo argón. Después de 10 minutos, se añadió PEPPSI y la reacción se ejecutó en un horno microondas a 80°C durante 10 minutos. La solución se trató con HCl 1 M (10 ml) y se obtuvo un precipitado rojo. Los copos rojos, es decir el producto bruto, se recogieron y purificaron por cromatografía en columna flash (EtOAc/MeOH 10:1 >> EtOAc/MeOH 10:1 + 1% HOAc) para dar **6**. Se disolvió **6** en CHCl_3 a la temperatura ambiente y se añadió luego TFA. La solución se agitó a la temperatura ambiente durante 3 horas. Después de 3 horas, la reacción se extinguió con MeOH y se evaporó para dar el producto final como copos rojos (**7** en el Esquema 2). MALDI-TOF MS calculado: 586,65. Encontrado: 586,79.



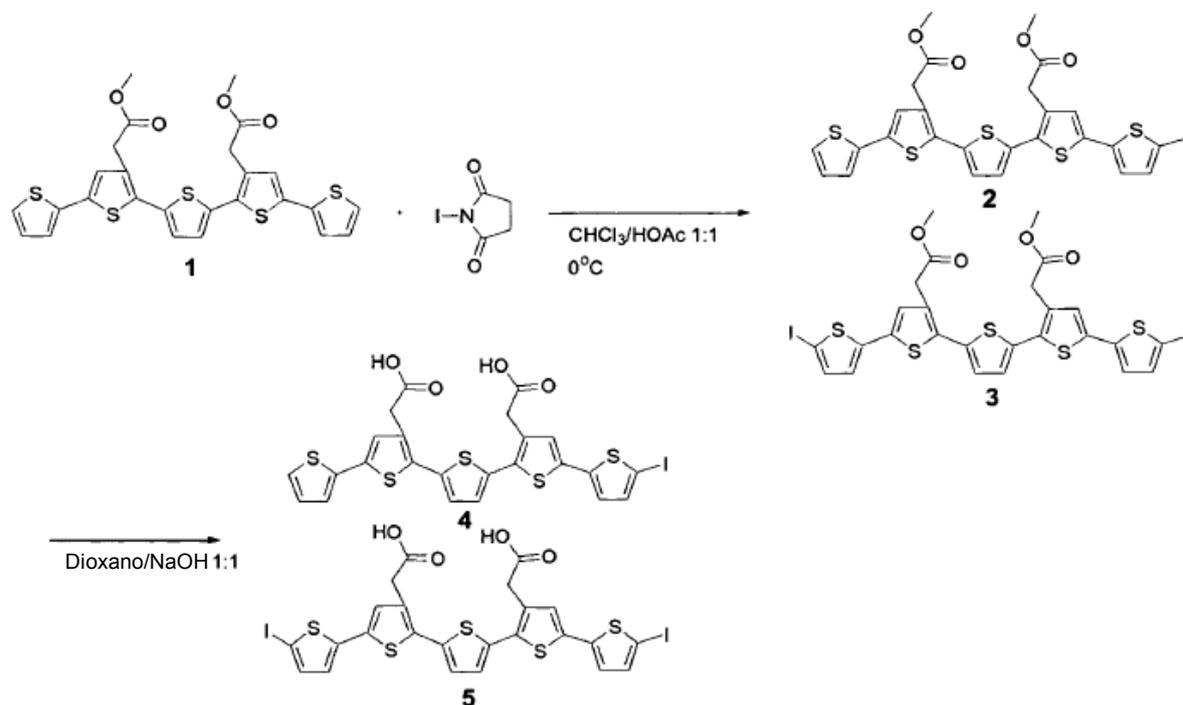
Esquema 2

5 Ejemplo 5: Compuestos Ia y Ib (no son parte de la invención)

Se disolvió 1 (Esquema 3) en CHCl_3 a la temperatura ambiente. Se añadió HOAc en una ratio 1:1 y la mezcla se enfrió a 0°C , después de lo cual se añadió N-yodo-succinimida. La reacción se extinguió con 3 ml de agua después de 19 horas en la oscuridad, y la fase orgánica se lavó con 2×30 ml de solución saturada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 2×30 ml de agua, se secó, se filtró, se concentró y se purificó por cromatografía en columna flash (tolueno/ EtOAc 18:1) para dar una mezcla de 2 y 3 (Esquema 5). La mezcla de 2 y 3 se disolvió en dioxano a la temperatura ambiente, se añadió NaOH 1 M y, después de 7 horas, la reacción se neutralizó con HCl 1 M. El compuesto producto Ia y Ib (4 y 5) se recogió como precipitado por centrifugación.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , 300MHz): δ 3,49 (s, 4H), 7,0 (s, 2H), 7,35 (d, 2H $J=4,8$ Hz), 7,45 (d, 2H, $J=3,6$ Hz), 7,67 (d, 1H, $J=5,1$ Hz), 7,75 (s, 2H),
 MALDI-TOF MS calculado para 5 $[\text{M-H}]^+$ calculado: 655,60, encontrado: 656,00, $[\text{M+K}]^+$ calculado: 693,60, encontrado: 692,90, MALDI-TOF MS calculado para 6 $[\text{M+K}]^+$ calculado: 819,50, encontrado: 819,79.

La separación entre 4 y 5 puede obtenerse por cromatografía en columna flash adicional sobre la mezcla de 2 y 3 seguida por el mismo procedimiento de desprotección arriba mencionado.



Esquema 3

5 Ejemplo 6: Efectos in vivo a largo plazo de los compuestos inventivos F y G en ratones transgénicos con depósitos $\text{A}\beta$

Los compuestos G ((p-HTAA) y F (p-FTAA) se evaluaron respecto a efectos *in vivo* a largo plazo sobre placas de amiloide utilizando ratones transgénicos con patología de tipo AD. Los ratones se prepararon con ventanas craneales para permitir la monitorización directa de la superficie del cerebro con espectroscopia multifotónica. Los compuestos G y F se disolvieron en solución acuosa de PBS a razón de 5 mg/ml. Ambos compuestos se inyectaron en la vena de la cola de los ratones con la dosis de 10 mg/kg. Como se ha mencionado arriba, los compuestos atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica y se fijan a los depósitos $\text{A}\beta$. Una semana después de la inyección, podía observarse todavía la fijación de los compuestos inventivos a los depósitos $\text{A}\beta$ (Figura 7). Esta fijación de larga duración a las calvas es ventajosa para un efecto terapéutico a largo plazo de los compuestos inventivos.

20 Ejemplo 7. Ejemplo de los efectos principales sobre la agregación/fibrilación de β -amiloide por los compuestos inventivos F y G

Este ejemplo describe los efectos terapéuticos del direccionamiento de los compuestos inventivos F y G a las enfermedades que implican proteínas con plegado defectuoso.

El péptido $\text{A}\beta$ 1-42 se disolvió en hexafluoroisopropanol a una concentración de 1 mg/ml y se diluyó ulteriormente a $20\ \mu\text{M}$ en Tris-HCl 5 mM, NaCl 75 mM. Los compuestos inventivos F y G se añadieron en concentraciones de 10 a $100\ \mu\text{M}$ y las muestras, con inclusión de referencias sin los compuestos inventivos, se incubaron a 37°C para iniciar la fibrilación. Después de 0 h, 20 h y 66 h, se tomaron partes alícuotas, se depositaron sobre rejillas TEM recubiertas con formvar-carbono y se tiñeron negativamente utilizando acetato de uranilo. Se utilizó un equipo CM 200 Phillips que operaba a 200 kV para estudiar el progreso de la fibrilación en las diferentes muestras.

Las muestras de referencia y las muestras que contenían los compuestos inventivos no exhibían fibrillas o especies agregadas antes de incubación a 37°C (a la hora 0). Después de 20 h de incubación, la muestra de referencia exhibía un alto contenido de fibrillas, ensambladas en hojas en las que podían visualizarse fibrillas separadas (véanse las Figuras 1 y 2). Estos agregados recubrían la mayor parte de la rejilla TEM y no podían verse fibrillas más pequeñas o estructuras de tipo oligómero. Después de 66 horas de incubación, no podía verse cambio importante alguno en morfología comparada con las muestras de 20 horas, y se encontraron hojas con fibrillas separadas visibles con alta densidad en la rejilla, de una morfología típica ilustrada en la Figura 3.

Las muestras incubadas con 100 μM de compuesto inventivo F exhibían un proceso de fibrilación claramente diferente. Después de 20 h, no se encontraba en la muestra agregado denso alguno que se asemejara a los de la muestra de referencia (Figuras 1 y 2). Después de 66 h, no pudo encontrarse fibrilla separada alguna en la muestra como podría encontrarse en la muestra de referencia (Figura 3). Sin embargo, estaban presentes agregados muy densos, sin fibrilla distinguible alguna, cuya morfología típica se ilustra en la Figura 4. Esta falta de fibrillas en la muestra después de tiempos de incubación más largos constituye significativamente un punto importante del compuesto F sobre la fibrilación del péptido A β 1-42.

Las muestras incubadas con compuesto inventivo G 100 μM y 10 μM exhibían un proceso de fibrilación claramente diferente. Después de 20 h, no se encontraba agregado denso alguno que se asemejara a los apreciados en la muestra de referencia (Figuras 1 y 2), en las muestras con compuesto G inventivo 100 μM y 10 μM . Estaba presente una baja densidad de fibrillas cortas ramificadas con un contraste muy bajo en la muestra con G 100 μM , ilustrada en la Figura 5. En la muestra con compuesto inventivo G 10 μM , se encontró una baja densidad de estructuras de tipo oligómero, ilustradas en la Figura 5. Después de 66 h, podían encontrarse muy pocas protofibrillas cortas separadas en la muestra que contenía G 100 μM , ilustrada en la Figura 6. Más frecuentemente, estaban presentes agregados muy densos con una morfología típica ilustrada en la Figura 6. Esta falta de agregados de fibrillas densas en la muestra después de ambos tiempos de incubación de 20 y 66 h, es significativa de un efecto importante del compuesto G sobre la fibrilación del péptido A β 1-42.

Ejemplo 8

8.1 Efectos del compuesto p-FTAA, 14 días de tratamiento, en ratones transgénicos hAPPSL hembra de 4 meses: Observaciones Generales, y Tolerancia al Compuesto (Toxicidad)

Vehículo: Solución salina tamponada con fosfato (PBS; PO₄ 6,7 mM, NaCl 155 mM, pH=7,3-7,5) (BioWhittaker PBS de Lonza).

T.I.: p-FTAA, Mw = 617 g/mol, diluido en vehículo procedente de la solución stock en agua desionizada (10 mg/ml).

Tg hAPPSL: Ratones transgénicos hAPPSL que sobreexpresan hAPP (751) bajo el control del promotor murino Thy-1 con un fondo genético de C57BL/6xDBA.

Comenzando a los 4 meses de edad, se trataron ratones hembra hAPPSL con vehículo únicamente o pFTAA en 3 dosis durante 14 días. 40 ratones hAPP Tg más 4 reservas asignados a 4 grupos de tratamiento diferentes, se trataron con vehículo sólo (control) o con p-FTAA en dosis de 0,1 mg/kg/día, 1 mg/kg/día, o 10 mg/kg/día. El vehículo y los T.I.s se administraron 2 veces al día por vía intraperitoneal (i.p.) durante 14 días.

En total, 44 animales asignados a 4 grupos de tratamiento se incluyeron en el estudio. 4 animales murieron prematuramente debido a una razón desconocida: un animal de cada uno de los grupos 1 mg/kg y 10 mg/kg T.I. y 2 animales del grupo de control. La muerte de los animales no puede atribuirse a p-FTAA, dado que la mayor parte de las muertes se encontraron en el grupo de vehículo.

8.2 Efectos del compuesto p-FTAA, 14 días de tratamiento, en ratones transgénicos hembra hAPPSL de 4 meses de edad: Biodistribución

Vehículo: Solución salina tamponada con fosfato (PBS; PO₄ 6,7 mM, NaCl 155 mM, pH=7,3-7,5) (BioWhittaker PBS de Lonza).

T.I.: p-FTAA, Mw = 617 g/mol, diluido en vehículo a partir de solución stock en agua desionizada (10 mg/ml).

Tg hAPPSL: Ratones transgénicos hAPPSL que sobreexpresaban hAPP (751) bajo el control del promotor murino Thy-1 con un fondo genético de C57BL/6xDBA.

Comenzando a los 4 meses de edad, ratones hembra hAPPSL se trataron sólo con vehículo o con pFTAA en 3 dosis durante 14 días. 40 ratones hAPP Tg más 4 reservas se asignaron a 4 grupos de tratamiento diferentes con vehículo sólo (control) o con p-FTAA en dosis de 0,1 mg/kg/día, 1 mg/kg/día, o 10 mg/kg/día. El vehículo y los T.I.s se administraron 2 veces al día por vía intraperitoneal (i.p.) durante 14 días.

La biodistribución de p-FTAA en los ratones se evaluó por determinación del compuesto parental en el hemisferio derecho del cerebro (sin cerebelo), hígado, riñón, y plasma de los animales tratados. Se determinó p-FTAA en todas las matrices por métodos bioanalíticos diferentes que implicaban HPLC-MS/MS. Cada uno de los métodos se caracterizó en términos de especificidad, linealidad, exactitud y permisión a fin de proporcionar resultados fiables.

Toma de muestras de tejidos: Después del último tratamiento, se sacrificaron los animales. Cada grupo de tratamiento se dividió en 3 puntos de muestreo dando como resultado 3-4 animales por punto de muestreo y por grupo (los tiempos puntuales indicados más adelante se refieren al momento de la toma de muestras de CSF):

- 5 1) Inmediatamente antes de la última dosis el día 14 (predosis)
- 2) 0,5 horas después de la última dosis el día 14
- 3) 3 horas después de la última dosis el día 14

10 Se recogieron de cada animal CSF, sangre, cerebro, hígado, y riñón. Para ello, los ratones se sedaron por anestesia estándar mediante inhalación (isoflurano, Baxter).

15 Los resultados demostraron que los animales estaban expuestos sistémicamente a p-FTAA a todos los niveles de dosis. Los niveles cerebrales de p-FTAA demostraron que p-FTAA atravesaba la barrera hematoencefálica después de administración i.p. Se observó también una exposición importante a p-FTAA en el hígado y el riñón, cuantificándose los niveles máximos en el último órgano. La presencia del fármaco en el riñón y en el hígado sugería que ambos procesos oxidantes hepáticos y el aclaramiento renal estaban implicados en el aclaramiento sistémico del fármaco. La alta concentración del fármaco en el riñón sugería también que la excreción urinaria es la ruta principal de eliminación de p-FTAA sistémico. Los niveles de p-FTAA eran mayores en el riñón comparado con el hígado, lo que sugería que el aclaramiento renal es una ruta de eliminación principal para el fármaco. La presencia del fármaco en el hígado sugiere que también los procesos metabólicos hepáticos (Fase I y II) contribuían significativamente al aclaramiento sistémico total del compuesto.

25 **8.3 Efectos del compuesto p-FTAA, 30 días de tratamiento, en ratones transgénicos hembra hAPPSL de 8 meses: Resultados de las determinaciones de Aβ humano en muestras de cerebro**

Vehículo: Solución salina tamponada con fosfato (PBS; PO₄ 6,7 mM, NaCl 155 mM, pH=7,3-7,5) (BioWhittaker PBS de Lonza).

30 T.I.: p-FTAA, Mw = 617 g/mol, diluido en vehículo a partir de solución stock en agua desionizada (10 mg/ml).

Tg hAPPSL: Ratones transgénicos hAPPSL que sobreexpresan hAPP (751) bajo el control del promotor Thy-1 murino con un fondo de C57BL/6xDBA.

35 Comenzando a los 8 meses de edad, se trataron ratones hembra hAPPSL con vehículo sólo o con pFTAA en 3 dosis durante 30 días. El ítem de test (T.I.) p-FTAA se administró en 3 dosis en vehículo. 48 ratones hAPPTg más 4 reservas asignados a 4 grupos de tratamiento diferentes se trataron con vehículo sólo (control) o con p-FTAA en dosis de 0,1 mg/kg/día, 1 mg/kg/día, o 10 mg/kg/día. Como control adicional, 12 hermanos de camada nTg de los ratones hAPPSL (más 1 reserva) se trataron con vehículo sólo. El vehículo y los T.I. se administraron 2 veces al día por vía intraperitoneal (i.p.) durante 30 días.

40 Se determinaron Aβ38, Aβ40 y Aβ42 humanas en homogeneizados de los hemisferios cerebrales izquierdos y en muestras de CSF de todos los animales Tg por un ensayo de inmunosorbente de Mesoscare Discovery.

45 El tratamiento con p-FTAA en la dosis máxima (10 mg/kg/día) condujo a niveles significativamente reducidos de Aβ38, Aβ40 y Aβ42 en el CSF así como en la fracción de homogeneizado de cerebro SDS.

Tratamiento

50 48 ratones hAPPTg más 4 reservas asignados a 4 grupos de tratamiento diferentes se trataron con vehículo sólo (control) o p-FTAA. Como control adicional, se trataron 12 hermanos de camada nTg de los ratones hAPPSL (más 1 reserva) con vehículo sólo. El compuesto y el vehículo se administraron dos veces al día por vía i.p. durante 30 días como se muestra en la tabla siguiente. Los ratones Tg hAPPSL con un fondo genético C57BL/6xDBA y hermanos de camada nTg correspondientes de una edad de 8 meses (± 2 semanas) se asignaron aleatoriamente a los grupos de tratamiento.

Grupo	Número de animales	Tipo de animales		Sexo	Edad al comienzo	Tratamiento			Tejidos muestreados
						Sustancia	Dosis	Administración	
A	12	Tg	Ratones hAPPSL	f	8 meses ± 2 semanas	Vehículo	-	i.p. dos veces al día durante 30 días	plasma, CSF, cerebro
B	12	Tg	Ratones hAPPSL	f	8 meses ± 2 semanas	p-FTAA	0,1 mg/kg/día	i.p. dos veces al día durante 30 días	plasma, CSF, cerebro
C	12	Tg	Ratones hAPPSL	f	8 meses ± 2 semanas	p-FTAA	1 mg/kg/día	i.p. dos veces al día durante 30 días	plasma, CSF, cerebro
D	12	Tg	Ratones hAPPSL	f	8 meses ± 2 semanas	p-FTAA	10 mg/kg/día	i.p. dos veces al día durante 30 días	plasma, CSF, cerebro
E	12	nTg	Ratones hAPPSL	f	8 meses ± 2 semanas	Vehículo	-	i.p. dos veces al día durante 30 días	plasma, CSF, cerebro

55

Extracción de proteínas del cerebro

Muestras del hemi-cerebro izquierdo (sin cerebelo) de los animales Tg se homogeneizaron y se separaron. Se preparó una fracción de SDS, después de descongelación, se homogeneizaron los hemisferios con el Homogeneizador "Ultra Turrax T8" a la velocidad máxima en TBS (Tris 20 mM, NaCl 137 mM, pH = 7,6; que contenía cóctel inhibidor de proteasas; 100 mg de peso húmedo de cerebro por ml de TBS). Una parte alícuota (1 ml) se centrifugó (74.200 x g durante 1 h a 4°C). Los sedimentos se suspendieron en 1 ml de SDS (2% SDS en agua bidestilada), se centrifugaron como anteriormente y los sobrenadantes se mantuvieron a -20°C (fracción de SDS).

10 Determinación de especies de A β

En la fracción SDS de homogeneizado de cerebro y en CSF de cada ratón Tg, se midieron los niveles de A β 38, A β 40 y A β 42 humano con un kit de A β de Mesoscale Discovery. Los niveles de A β se evaluaron en comparación con un estándar peptídico como pg/mg de cerebro (peso húmedo) o pg/ml de CSF.

15 Estadísticas para parámetros bioquímicos

Se realizó un análisis estadístico descriptivo de todos los parámetros evaluados. Los datos se representaron como valor medio \pm desviación estándar (SD). Se utilizó el test de Grubbs para detectar los valores aberrantes. La distribución y normalidad de los valores se testó con el test de distribución de normalidad de Kolmogorov Smirnov. Las diferencias de grupos entre todos los grupos Tg se calcularon por un ANOVA paramétrico seguido por un test posterior de Bonferroni.

25 Niveles de A β en muestras de CSF

Se midieron los niveles de A β 38, A β 40 y A β 42 humanas en muestras de CSF de cada ratón Tg con un ensayo de inmunosorbente. En los ratones hAPPSL, los niveles de CSF de A β 40 excedían típicamente de los de A β 42 y A β 38. Los tres analitos se veían afectados por un tratamiento con p-FTAA. Los niveles medios de A β 38, A β 40 y A β 42 eran máximos en el grupo tratado con vehículo y mínimos en los animales tratados con 10 mg/kg/día. Comparado con el grupo de vehículo, el efecto de disminución de A β en CSF de un tratamiento de 10 mg/kg/día de p-FTAA era muy importante en un ANOVA de una sola vía ($p < 0,001$ para A β 38 y $p < 0,01$ para A β 40 y A β 42). Los animales tratados con 0,1 mg/kg/día exhibían también niveles medios de A β más bajos, pero se observó significación estadística para A β 38 solamente. El grupo que recibió 1 mg/kg/día de p-FTAA no difería significativamente del control de vehículo. (Figura 8 (A)).

35 Niveles de A β en muestras de cerebro

Se extrajo secuencialmente A β del cerebro con disolventes de potencia creciente: SDS. Los niveles de A β 38, A β 40 y A β 42 humanos se midieron en la fracción SDS de cada ratón Tg con un suero inmunosorbente. (Figura 8 (B)). Para los niveles de A β en las fracciones de SDS se observaron diferencias de grupo significativas: los niveles medios de A β eran máximos en el grupo tratado con vehículo y mínimos para los animales tratados con 10 mg/kg/día. La diferencia de los niveles medios de A β 38, A β 40 y A β 42 entre el grupo de control de vehículo y el grupo de 10 mg/kg/día era altamente significativa ($p < 0,001$). Además de los valores medios más bajos, la variabilidad intragrupo para el grupo de 10 mg/kg/día era muy baja, lo que puede interpretarse como otro signo de efectividad del T.I.

El tratamiento con las dosis máximas (10 mg/kg/día) de p-FTAA reducía significativamente los niveles de A β 38, A β 40 y A β 42 en el CSF y en la fracción de homogeneizado de cerebro SDS.

Se observó también, datos no presentados, que el tratamiento de p-FTAA durante 14 días, en ratones hembra transgénicos hAPPSL de 4 meses, conducía a una disminución de los niveles de A β 38, A β 40 o A β 42 en la extracción de amiloide β [soluble] con DEA a partir de homogeneizados de cerebro. El efecto alcanzaba su intensidad máxima para el grupo de 10 mg/kg/día.

55 **8.4 Efectos del compuesto p-FTAA, 30 días de tratamiento, en ratones transgénicos hembra hAPPSL de 8 meses: Test del laberinto de agua de Morris (MWM)**

Vehículo: Solución salina tamponada con fosfato (PBS; PO₄ 6,7 mM, NaCl 155 mM, pH=7,3-7,5) (BioWhittaker PBS de Lonza).

60 T.I.: p-FTAA, Mw = 617 g/mol, diluido en vehículo a partir de solución stock en agua desionizada (10 mg/ml).

Tg hAPPSL: Ratones transgénicos hAPPSL que sobreexpresan hAPP (751) bajo el control del promotor Thy-1 murino con un fondo genético C57BL/6xDBA.

Comenzando a los 8 meses de edad, se trataron ratones hembra hAPPSL con vehículo sólo o pFTAA en 3 dosis durante 30 días. Se administró el ítem de Test (T.I.) p-FTAA en 3 dosis en vehículo. 48 ratones Tg hAPP más 4 reservas asignados a 4 grupos de tratamiento diferentes se trataron con vehículo sólo (control) o con p-FTAA en dosis de 0,1 mg/kg/día, 1 mg/kg/día, o 10 mg/kg/día. Como control adicional, se trataron 12 hermanos de camada nTg de los ratones hAPPSL (más 1 reserva) con vehículo sólo. El vehículo y los T.I. se administraron 2 veces al día por vía intraperitoneal (i.p.) durante 30 días.

Se realizó el MWM durante 4 días al final del periodo de tratamiento (días de tratamiento 24 a 27). Una piscina circular (de 100 cm de diámetro) llena con agua del grifo con una temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$ se dividió virtualmente en 4 cuadrantes. Se puso una plataforma transparente (de 8 cm de diámetro) aproximadamente 0,5 cm por debajo de la superficie del agua. Durante la sesión completa del test, excepto en la prueba de sonda, la plataforma estaba localizada en el cuadrante suroeste de la piscina.

Cada ratón tenía que realizar 3 pruebas de natación en cada uno de 4 días consecutivos. Una sola prueba tenía una duración máxima de 1 minuto. Durante este tiempo, el ratón tenía la probabilidad de encontrar la diana diáfana oculta. Si el animal no encontraba el "camino" fuera del agua, el investigador guiaba a o ponía el ratón sobre la plataforma. Después de cada prueba, el ratón se dejaba descansar en la plataforma durante 10-15 segundos para orientarse en el entorno. En las paredes que rodeaban la piscina, estaban fijados símbolos geométricos en negrita (v.g. un círculo y un cuadrado) que podrían utilizar los ratones como referencia para orientación espacial.

La latencia de escape (el tiempo necesario para encontrar la plataforma oculta y para escapar por tanto del agua). Se evaluaron el camino de natación (la distancia hasta alcanzar el objetivo), la velocidad de natación y los cruzamientos en la prueba de sonda sobre la primera posición de la plataforma y la permanencia en el cuadrante diana. Un sistema de seguimiento computerizado con una cámara situada por encima del centro de la piscina se utilizó para las medidas.

Los animales con una velocidad de natación inferior a 0,08 m/s en una de las pruebas se identificaron como flotadores, excluyéndose del análisis estadístico entre todas las pruebas, y no se presentaron en los gráficos.

Estadísticas para los parámetros MWM

El análisis estadístico descriptivo se realizó sobre todos los parámetros evaluados. Los datos se representaron como valor medio \pm error estándar del valor medio (SEM). Se utilizó el test de Grubbs para detectar los valores aberrantes. La distribución de normalidad de los valores se testó con el test de distribución de la normalidad de Kolmogorov Smirnov. Las diferencias de grupo se calcularon por un ANOVA paramétrico seguido por un post-test de Bonferroni o por un ANOVA no paramétrico de Kruskal Wallis seguido por un post-test de Dunn si la distribución Gaussiana era incorrecta. Las curvas de aprendizaje se evaluaron por un ANOVA de dos vías seguido por un post-test de Bonferroni. Como grupo de control se utilizaron animales Tg tratados con vehículo (Grupo A).

Los ratones tratados con 10 mg/kg pFTAA exhibían un comportamiento mejor que cualquier otro grupo Tg en términos del camino de natación (Figura 9).

8.5 Efectos del compuesto p-FTAA, 30 días de tratamiento, ratones transgénicos hembra hAPPSL de 8 meses: Carga de calva

Vehículo: Solución salina tamponada con fosfato (PBS; PO_4 6,7 mM, NaCl 155 mM, $\text{pH}=7,3-7,5$) (BioWhittaker PBS de Lonza).

T.I.: p-FTAA, Mw = 617 g/mol, diluido en vehículo a partir de solución stock en agua desionizada (10 mg/ml).

Tg hAPPSL: Ratones transgénicos hAPPSL que sobreexpresan hAPP (751) bajo el control del promotor Thy-1 murino con un fondo genético C57BL/6xDBA.

Comenzando a los 8 meses de edad, se trataron ratones hembra hAPPSL con vehículo sólo o pFTAA en 3 dosis durante 30 días. El ítem de Test (T.I.) p-FTAA se administró en 3 dosis en vehículo. 48 ratones Tg hAPP más 4 reservas asignados a 4 grupos de tratamiento diferentes se trataron con vehículo sólo (control) o con p-FTAA en dosis de 0,1 mg/kg/día, 1 mg/kg/día, o 10 mg/kg/día. Como control adicional, 12 hermanos de camada nTg de los ratones hAPPSL (más 1 reserva) se trataron con vehículo sólo. El vehículo y los T.I. se administraron 2 veces al día por vía intraperitoneal (i.p.) durante 30 días.

Después de la toma de muestra de sangre, los ratones se sometieron a perfusión transcárdial con solución salina fisiológica (0,9%). Se extrajeron los cerebros del cráneo y se separó el cerebelo, se congeló inmediatamente en hielo seco y se guardó a -80°C . El cerebro restante se dividió en hemisecciones y se pesó el hemisferio izquierdo, se congeló inmediatamente en hielo seco y se guardó a -80°C hasta el análisis de A β . El hemisferio derecho se fijó con paraformaldehído como se describe en la sección 4.3.1.

Los hemisferios derechos de todos los ratones Tg se fijaron por inmersión en 4% paraformaldehído/PBS preparado recientemente (pH 7,4) durante 1 hora a la temperatura ambiente. Después de ello se transfirieron los cerebros a una solución de sacarosa al 15% en PBS durante 24 horas para asegurar la crioprotección. Al día siguiente, los cerebros se congelaron en isopentano y se guardaron a -80°C hasta su utilización para análisis histológico.

A partir de 6 animales por grupo Tg, se cortaron sagitalmente 15 criosecciones por capa (en total 5 capas), cada una de 10 µm de grosor (Leica CM 3050S). Los niveles del cerebro se seleccionaron conforme al atlas de morfología "The Mouse Brain" de Paxinos y Franklin (2ª edición). El corte de los 5 niveles comenzó con un corte aleatorio correspondiente a la Figura 105 (aspecto total de la fascia dentata), y la toma de muestras se continuó luego uniforme y sistemáticamente, reteniendo siempre 15 cortes por nivel en serie y desechando 10 µm entre los niveles.

La carga de calva se cuantificó por tinción con 6E10 IHC dirigida contra AA1-17 del péptido amiloide humano y tinción con tioflavina S contra las estructuras de hoja beta en una incubación doble. Los tejidos de todos los animales investigados se manipularon uniformemente.

Estadística para Parámetros Histológicos

El análisis estadístico descriptivo se realizó sobre todos los parámetros evaluados. Los datos se representaron como valor medio ± error estándar del valor medio (SEM). Los valores aberrantes se detectaron por test de Grubbs y se excluyeron de los análisis estadísticos.

Los valores de las 5 medidas individuales (una de cada nivel de corte) por animal se integraron en un solo valor por animal (media individual). Las medias de grupo se calcularon con estos valores integrados. Después de los tests de distribución de la normalidad de Kolmogorov Smirnov, se calcularon las diferencias por un ANOVA paramétrico seguido por un test post-hoc de comparación múltiple de Newman Keuls o por un ANOVA no paramétrico de Kruskal Wallis seguido por un test de comparación múltiple de Dunn, si faltaba la distribución Gaussiana.

La Figura 10 indica el efecto principal del tratamiento con p-FTAA en el hipocampo sin cambios significativos en el córtex. En lo que respecta al desarrollo de carga de calva diferente en el córtex y el hipocampo de este modelo de ratón, ello se ajusta perfectamente al concepto de un compuesto inhibidor de la agregación. El porcentaje de área de calva en el hipocampo de los ratones tratados con p-FTAA es reducido comparado con el control de vehículo (Figura 10). La significación estadística para este efecto debida a una disminución del tamaño medio de calva se demostró para los ratones tratados con 1 mg/kg y 10 mg/kg de p-FTAA por un test t. Aunque el periodo de tratamiento fue sólo 30 días, se consiguió una disminución de 40% en el área de calva para los animales tratados con 1 mg/kg.

Conforme a los niveles reducidos de Aβ en la fracción de homogeneizado de cerebro SDS, el tratamiento con p-FTAA condujo a una reducción de la carga de calva. Esto era visible principalmente en el hipocampo, donde las calvas son menos maduras que en el córtex. El efecto se observó con 6E10 IHC contra amiloide humano así como por tinción con tioflavina S de núcleos de hoja beta localizados en el centro de las calvas. La reducción de 6E10 IR más difuso alrededor de los núcleos de calva era máxima para el tratamiento con 10 mg/kg de p-FTAA, mientras que el efecto más fuerte sobre los núcleos de hoja beta se observaba para el tratamiento con 1 mg/kg de p-FTAA.

8.6 Efecto de dos sustancias sobre las lesiones inducidas por Aβ1-42 en neuronas primarias de pollo: Neuroprotectividad

T.I. 1: p-HTAA, Mw = 529 g/mol, diluido en vehículo a partir de solución stock en PBS + 1,33% DMSO (10 mg/ml).

T.I. 2: POWT-13, Mw = 2782 g/mol, diluido en vehículo a partir de solución stock en agua desionizada (40 mg/ml).

Fuente de células: Neuronas del telencéfalo de embriones de pollo de 8 días (híbrido de Lohman Brown).

Medio de nutrición: DMEM con 4,5 g glucosa/l, 5% Nu Serum, 0,01% gentamicina, y L-glutamina 2 mM

Tamaño de grupo: n = 6 para cada concentración de T.I. y R.I. por experimento

Lesión: Aβ1-42 10 µM (preagregado durante 48 horas) a DIV8 durante 48 horas

Evaluación de los efectos: MTT sobre DIV10

Duración de un solo experimento: 9 días

Número de experimentos independientes por ensayo: n = 2.

Preparación de neuronas del telencéfalo de pollo

5 Se guardarán huevos fertilizados de 1 día en condiciones apropiadas hasta comienzo de la cría. El día 0 de los embriones, los huevos se transferirán a la incubadora de cría y se mantendrán dándoles vueltas a 37,8°C y 55% de humedad hasta el día 8 de los embriones. Todos los experimentos de cultivo de células se llevarán a cabo en condiciones estériles lo que significa que todos los procedimientos se realizarán en una unidad de cultivo de células con equipo especial de cultivo de células. Los ítems necesarios, tales como material de vidrio, fórceps o tijeras se esterilizarán antes del experimento. Las soluciones stock se adquirirán ya estériles y las suspensiones finales tales como el medio de cultivo se prepararán recientemente en la cabina de flujo de aire laminar. La preparación de las neuronas se hará en breve. Los embriones se transferirán a una navecilla de plástico, y se decapitarán. Se separarán ambos hemisferios, se recogerán y se limpiarán de cualquier tejido suelto. Los hemisferios se disociarán mecánicamente y se extenderán en placas 4,8 x 10⁴ células en cada pocillo en un volumen de 160 µl. El medio de cultivo de células para las neuronas del telencéfalo de pollo está constituido por DMEM con 4,5 g glucosa/l, 5% Nu Serum, 0,01% de gentamicina y L-glutamina 2 mM. Los cultivos se mantendrán a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO₂.

Agregación de Aβ1-42

20 Los péptidos Aβ 1-42 se disolverán en amoníaco al 0,25% a una concentración final de 1 mM. Los péptidos Aβ1-42 disueltos se diluirán luego con PBS a una concentración final de 255 µM y se incubarán durante 48 horas a 37°C. Después de 48 horas de agregación, los péptidos Aβ1-42 se tratarán por ultrasonidos durante 1 minuto en un baño de agua ultrasónico (en ambos casos, cuando los péptidos Aβ 1-42 están agregados juntos o por separado de los ítems de test).

25 Ensayo de Viabilidad MTT

30 La viabilidad de los cultivos se determinará por el ensayo MTT utilizando un lector de placas (570 nm) como se describe v.g. en SOP MET004. El ensayo MTT está basado en la reducción del amarillo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio), a cristales azul oscuro de formazano por las deshidrogenasas mitocondriales (succinato-deshidrogenasas). Dado que dicha reacción está catalizada en las células vivas, este ensayo puede utilizarse únicamente para la cuantificación de la viabilidad celular. Para determinación de la viabilidad celular, se añade solución de MTT a cada pocillo en una concentración final de 0,5 mg/ml. Después de 2 horas, se aspira el medio que contiene MTT. Las células se lisan con SDS al 3% y los cristales de formazano se disuelven en isopropanol/HCl. Para estimar la densidad óptica, se utiliza un lector de placas (Anthos HT II o µquant) a una longitud de onda de 570 nm. La viabilidad celular se expresa en densidad óptica (OD).

Aplicación de los ítems de test y referencia en lesiones de Aβ 1-42

40 A DIV8, se aplicará Aβ 1-42 pre-agregado a una concentración final de 10 µM durante 48 horas. T.I. se aplicará:

1) directamente a Aβ 1-42 al comienzo de la agregación en PBS (DIV6); después de 48 horas de agregación en DIV8, Aβ 1-42 pre-agregado en presencia del ítem de test se aplicará a las células durante 48 horas o

45 2) con Aβ 1-42 pre-agregado en neuronas de pollo (DIV8) durante 48 horas. El ítem de referencia se aplicará únicamente a cultivos junto con Aβ 1-42 pre-agregado (punto 2) pero no se añadirá directamente a Aβ 1-42 al comienzo de la agregación (punto 1).

50 Después de 48 horas de incubación de T.I. y Aβ 1-42 en células (DIV10), se analizará la viabilidad de las neuronas por el ensayo MTT.

Controles

Se utilizaron los controles siguientes:

55 1) Control de vehículo (para cada ítem de test e ítem de referencia)

2) Aβ 1-42 sin ítem de test e ítem de referencia

60 3) T.I. 10 µM solo (no representado).

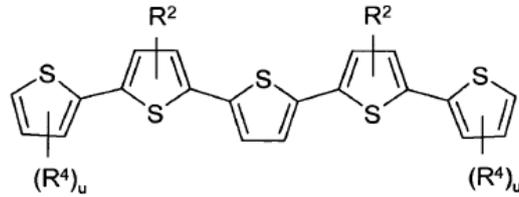
Resultados

Los ítems de test (T.I.s) y A β 1-42 ya pre-agregado aplicados sobre neuronas simultáneamente dan los resultados que se muestran en la Figura 11. Ambos compuestos dan como resultado mejor viabilidad comparados con A β 1-42 10 μ M solo. Las ratios estequiométricas de T.I. a A β 1-42 10 μ M se muestran bajo el gráfico.

- 5 Los ítems de test (T.I.s) añadidos a A β 1-42 durante la agregación dan los resultados que se muestran en la Figura 12. Ambos compuestos dan como resultado mejor viabilidad comparados con A β 1-42 10 μ M solo. Las ratios estequiométricas de T.I. a A β 1-42 10 μ M se muestran bajo el gráfico.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (II)



(II)

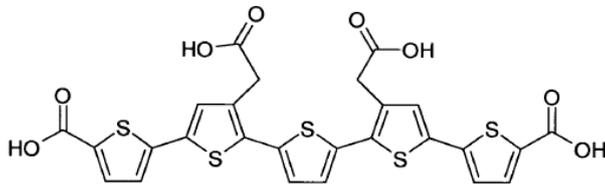
5 en donde
 cada u se selecciona independientemente de 0, y 1; y
 cada R^2 y R^4 se selecciona independientemente de carboxi, carboxialquilo, alcocarbonilalquilo, aminoalquilo,
 (amino)(carboxi)alquilo, y (amino)(carboxi)alcoxi; en donde cada resto alquilo es un alquilo C1-C6:
 10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Un compuesto conforme a la reivindicación 1, en donde
 cada R^2 se selecciona independientemente de carboxialquilo, alcocarbonilalquilo, aminoalquilo,
 (amino)(carboxi)alquilo, y (amino)(carboxi)alcoxi.

3. Un compuesto conforme a la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el cual cada R^4 es carboxi.

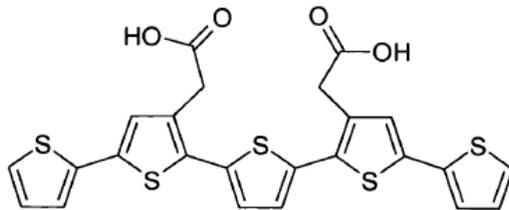
4. Un compuesto conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el cual u es 1.

5. Un compuesto conforme a la reivindicación 1, que es



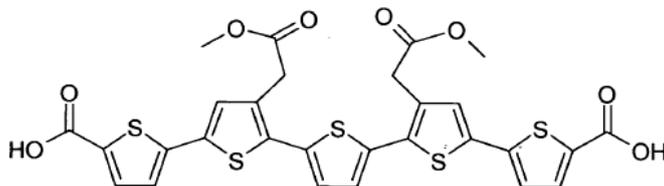
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. Un compuesto conforme a la reivindicación 1, que es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

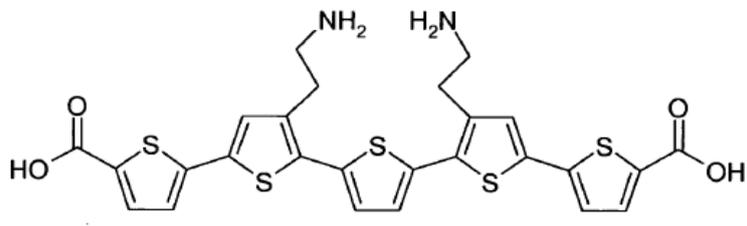
7. Un compuesto conforme a la reivindicación 1, que es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5

8. Un compuesto conforme a la reivindicación 1, que es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10

9. Un compuesto conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento terapéutico de un individuo humano o animal.

15

10. Un compuesto conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de un mamífero que padece una enfermedad que implica formas plegadas defectuosamente o agregadas de proteínas en dicho mamífero.

20

11. Un compuesto para uso conforme a la reivindicación 10, en el cual dicha enfermedad es una amiloidosis o una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en amiloidosis primaria, amiloidosis secundaria, amiloidosis organoespecífica y amiloidosis iatrogénica de insulina.

25

12. Un compuesto para uso conforme a la reivindicación 11, en el cual dicha amiloidosis organoespecífica se selecciona de amiloidosis específicas del cerebro.

30

13. Un compuesto para uso conforme a la reivindicación 10, en el cual dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en amiloidosis primaria, amiloidosis secundaria, amiloidosis familiar o hereditaria, diabetes mellitus tipo 2, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, encefalopatías espongiformes transmisibles, amiloidosis cardíaca y una afección iatrogénica.

35

14. Un compuesto para uso conforme a la reivindicación 13, en el cual dichas encefalopatías espongiformes transmisibles se seleccionan de enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, Kuru, Insomnio Familiar Fatal, miositis por cuerpos de inclusión, encefalopatía espongiforme bovina y angiopatía Congofílica.

15. Un compuesto para uso conforme a la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en el cual dicha afección iatrogénica es amiloidosis de insulina.

Figura 1

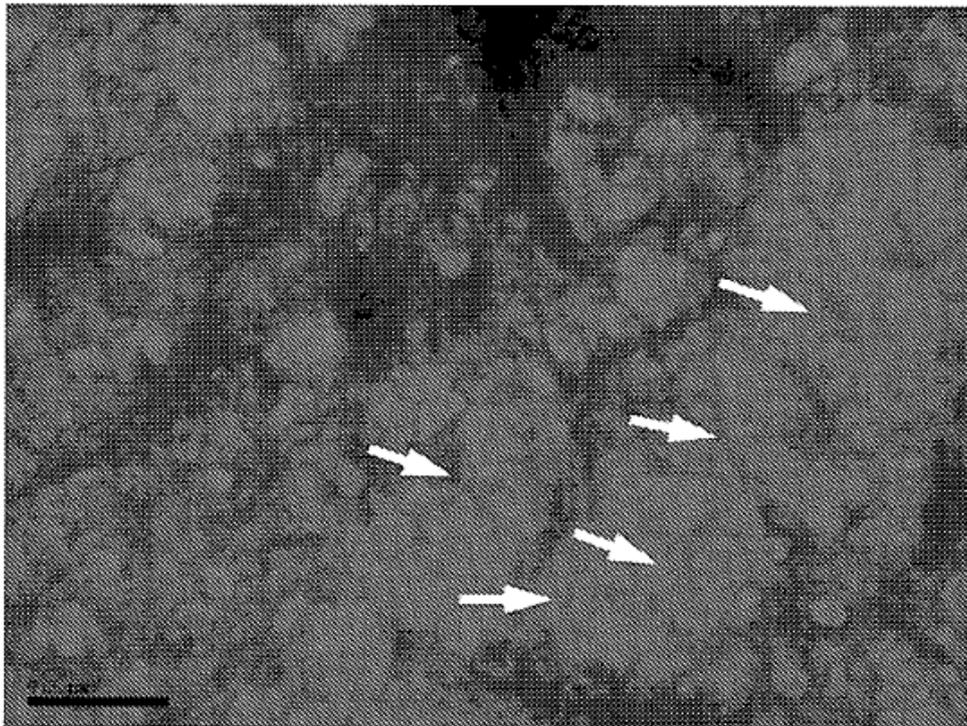
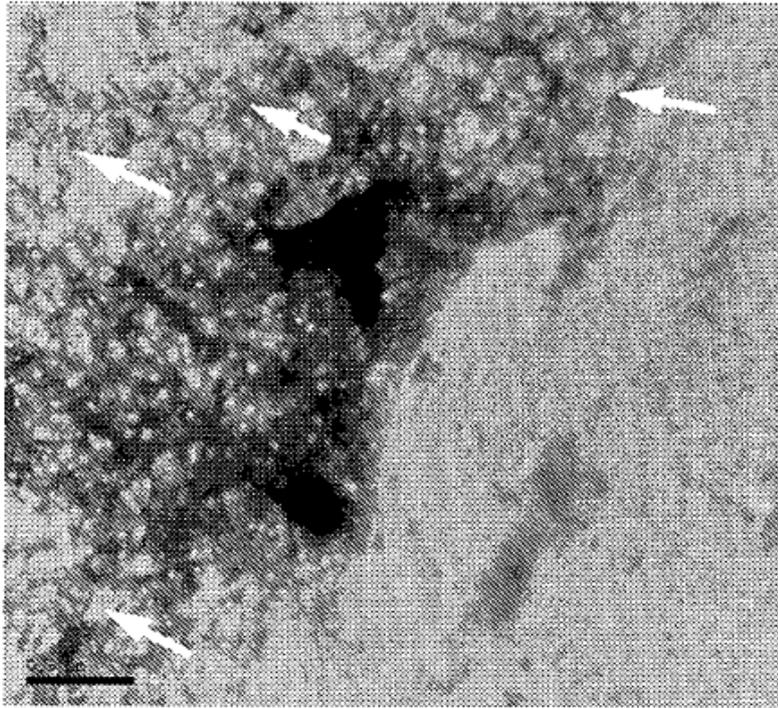


Figura 2

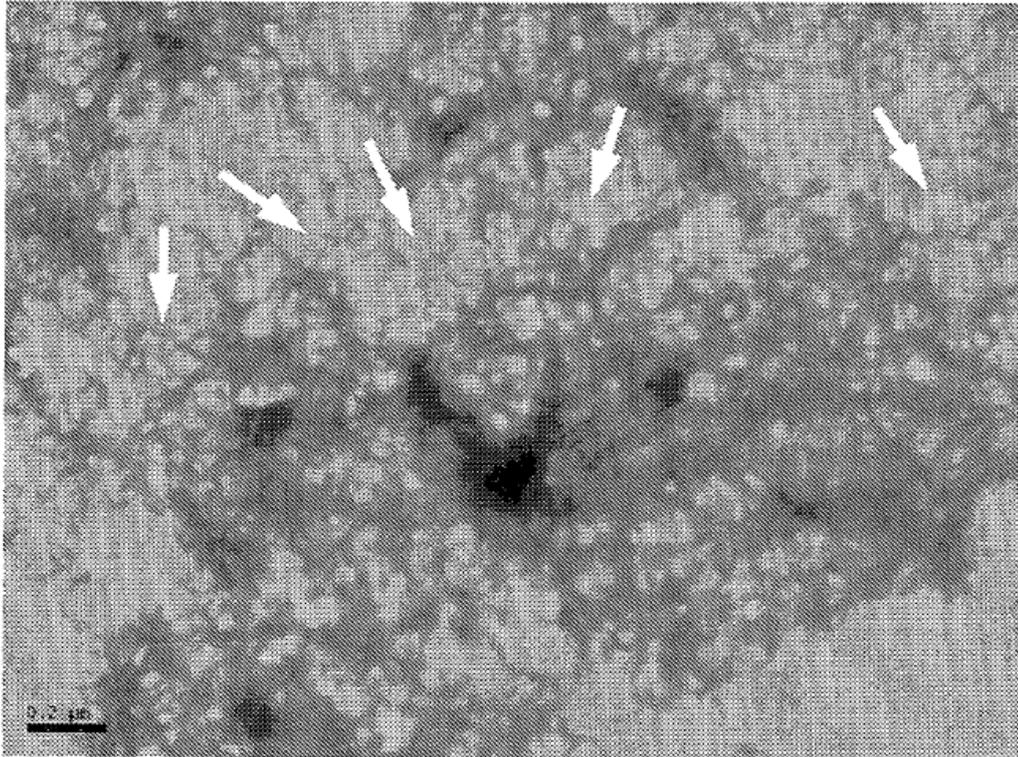


Figura 3

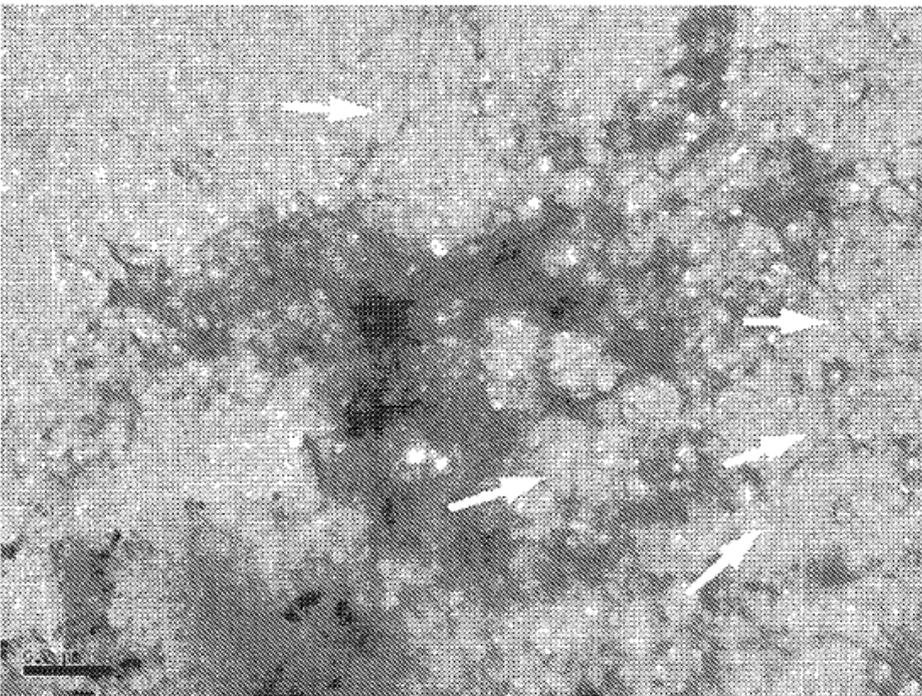
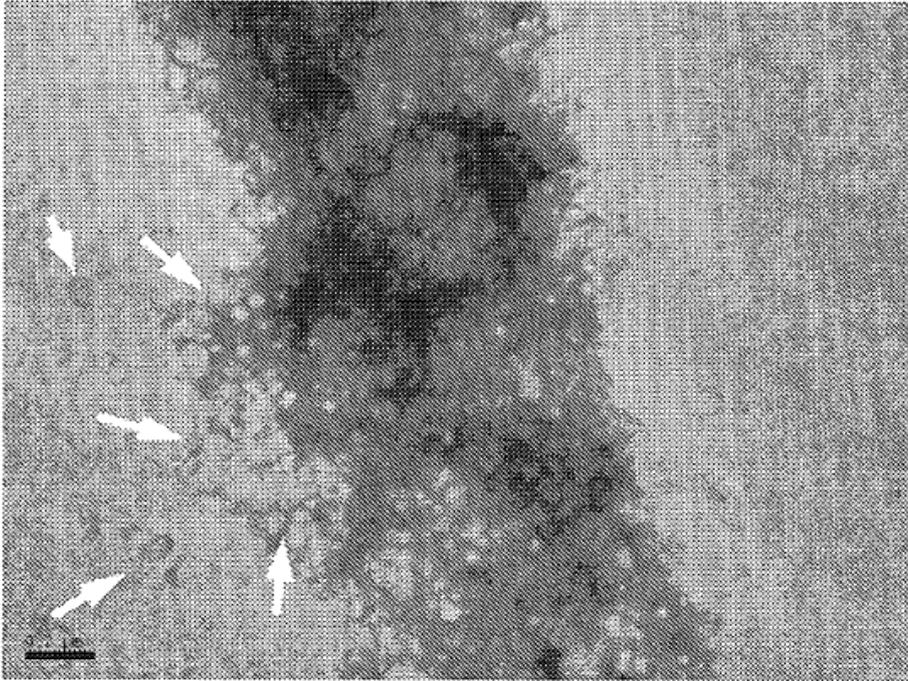


Figura 4

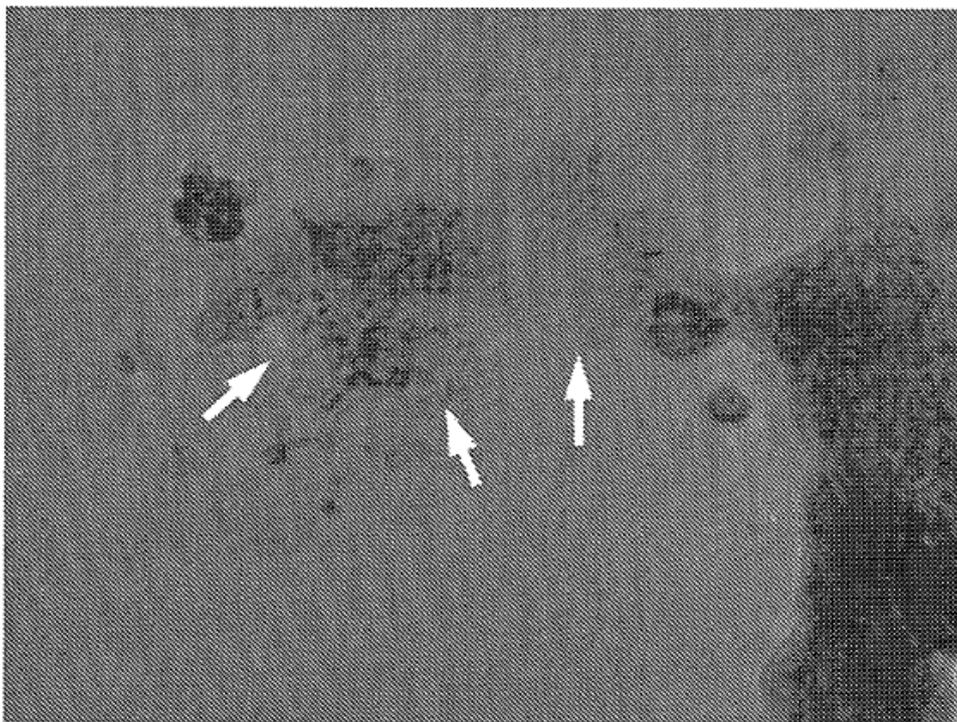
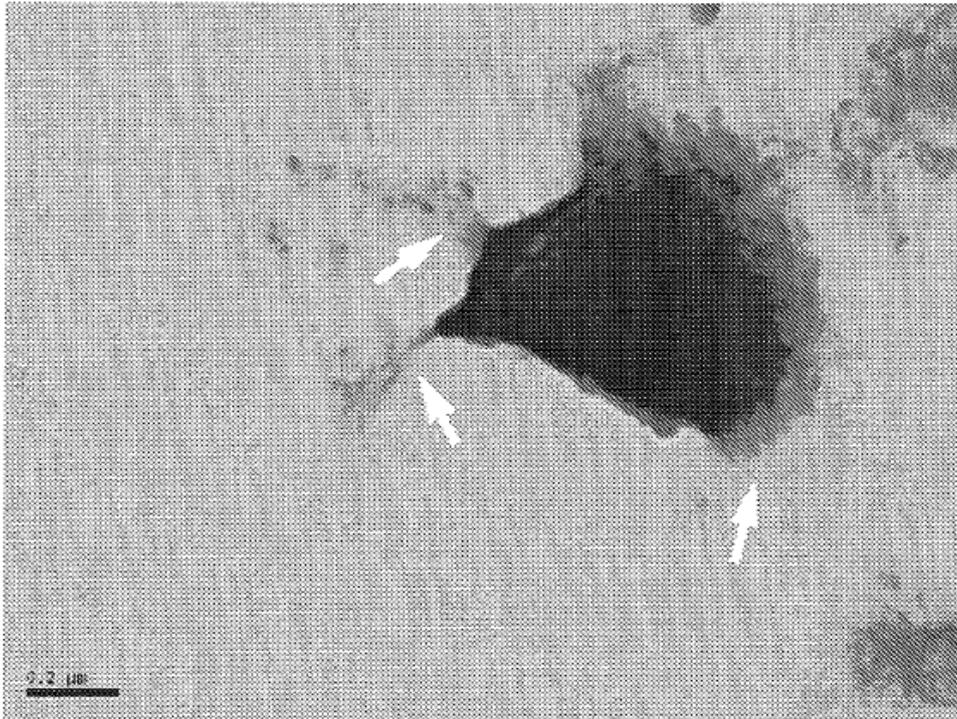


Figura 5

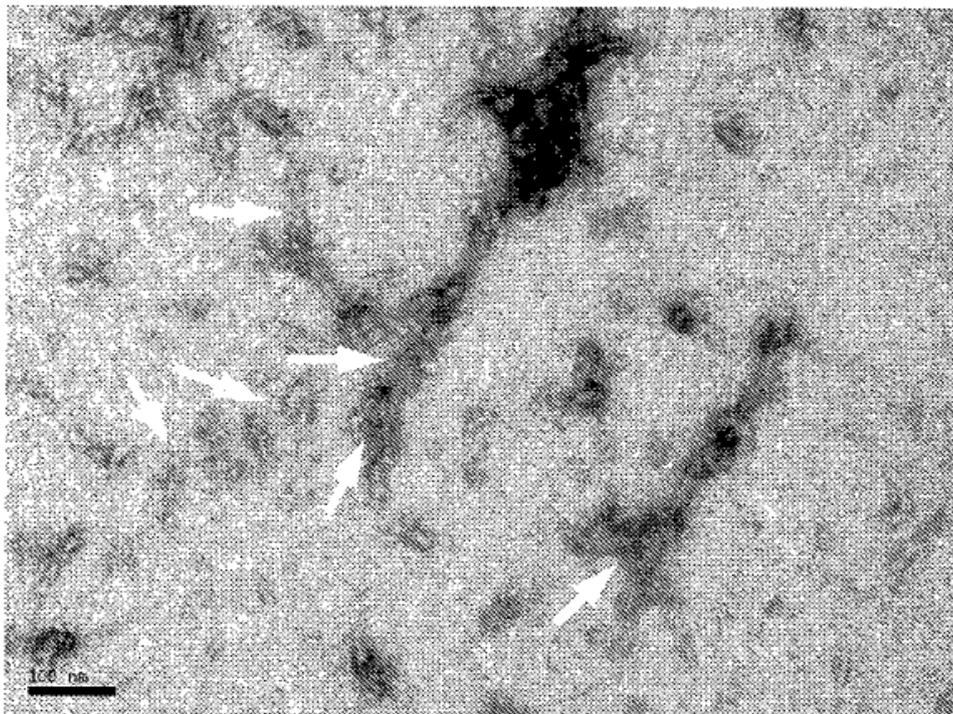
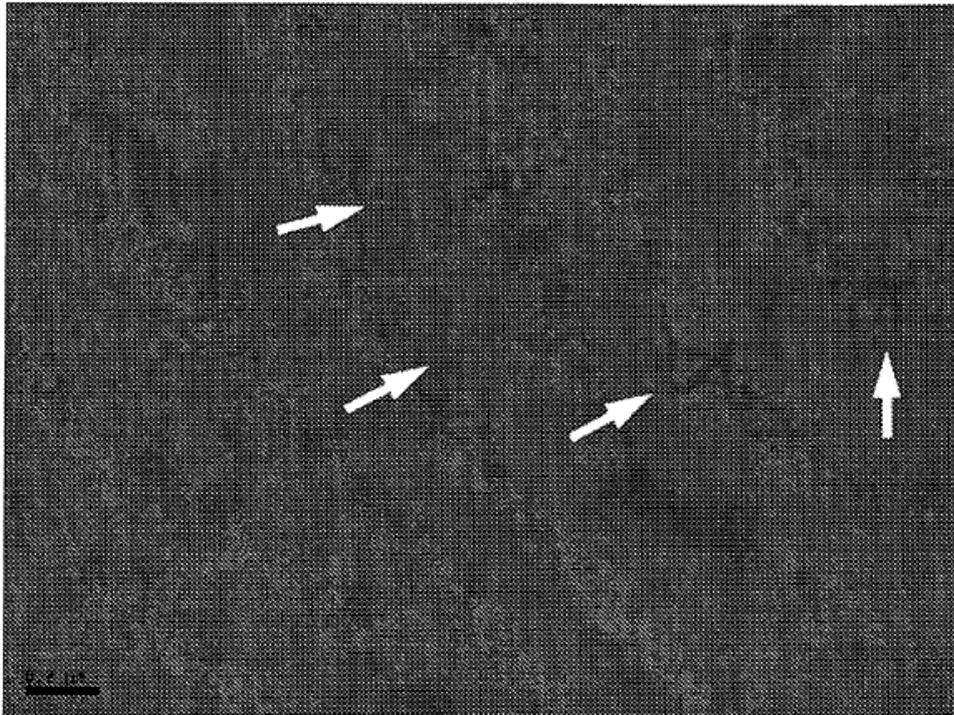


Figura 6

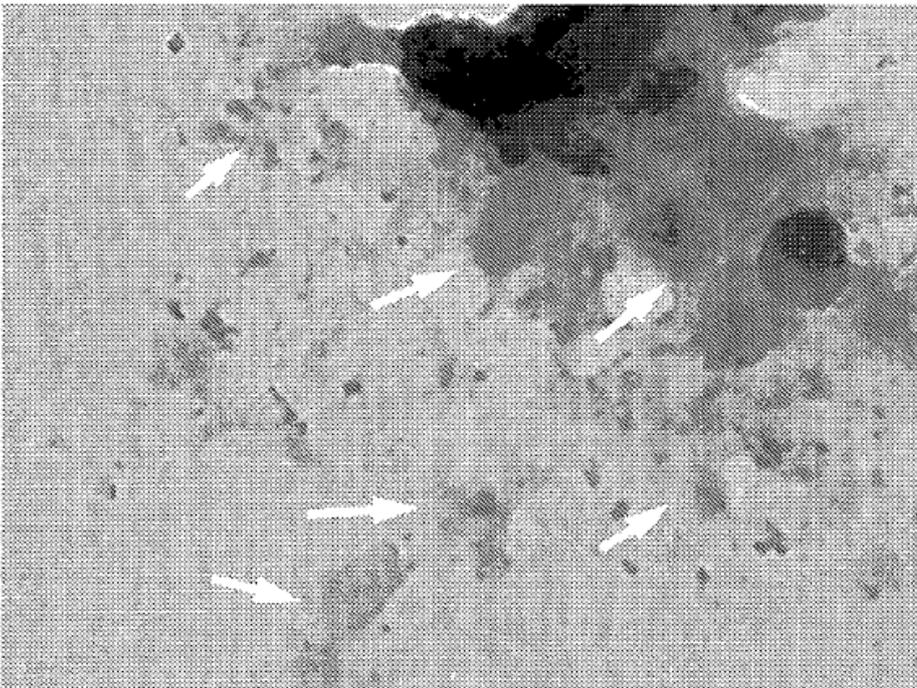
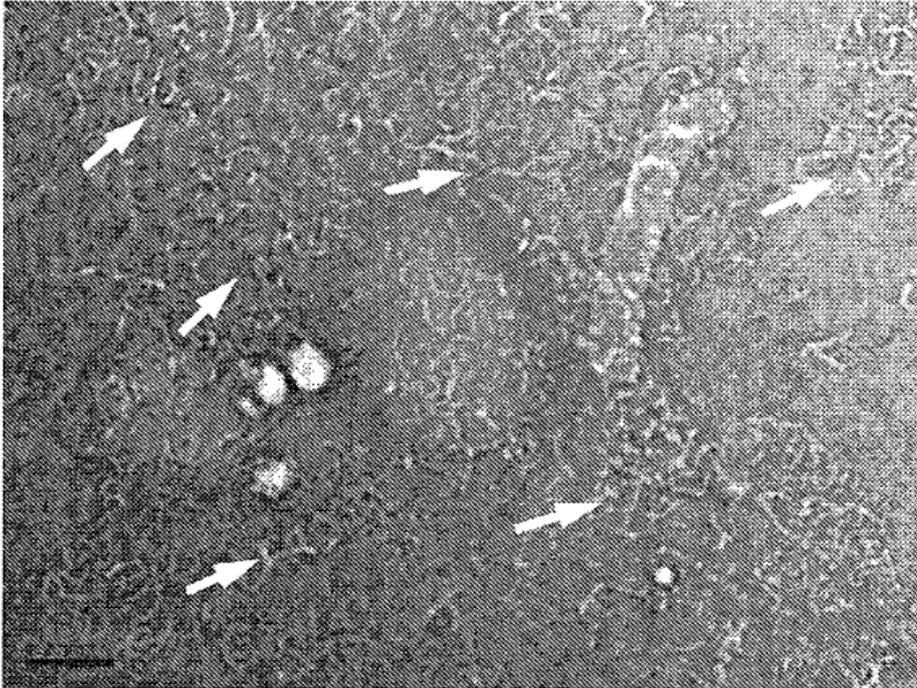


Figura 7

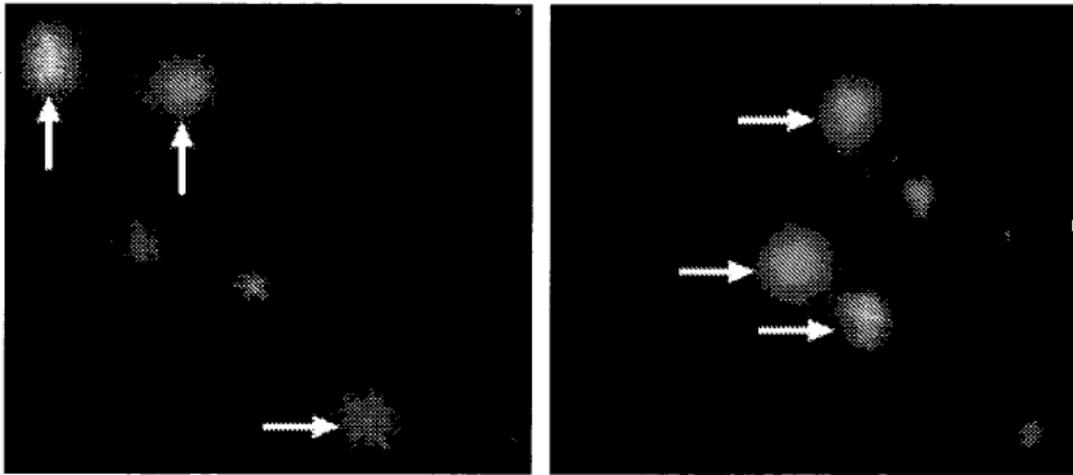


Figura 8

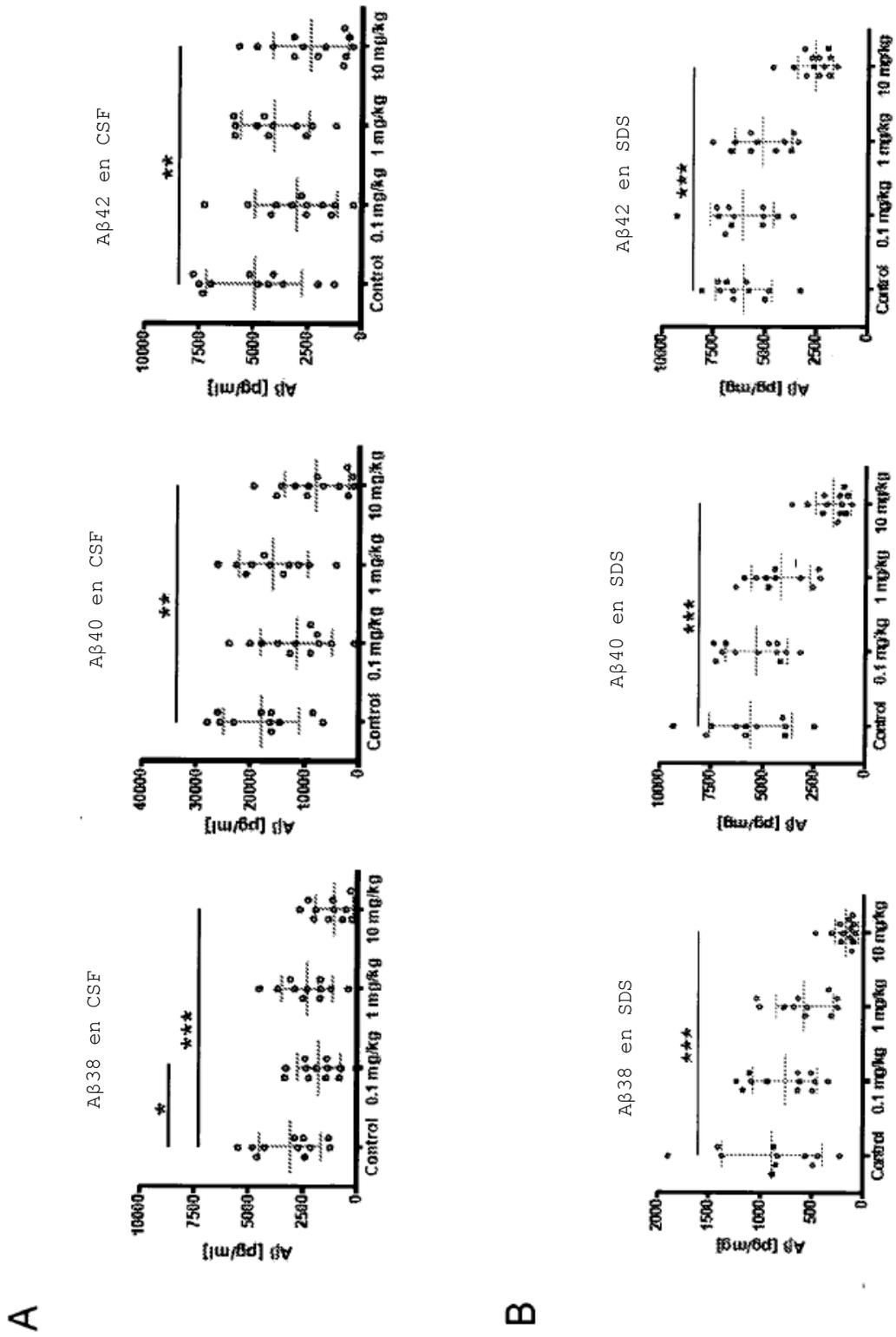


Figura 9

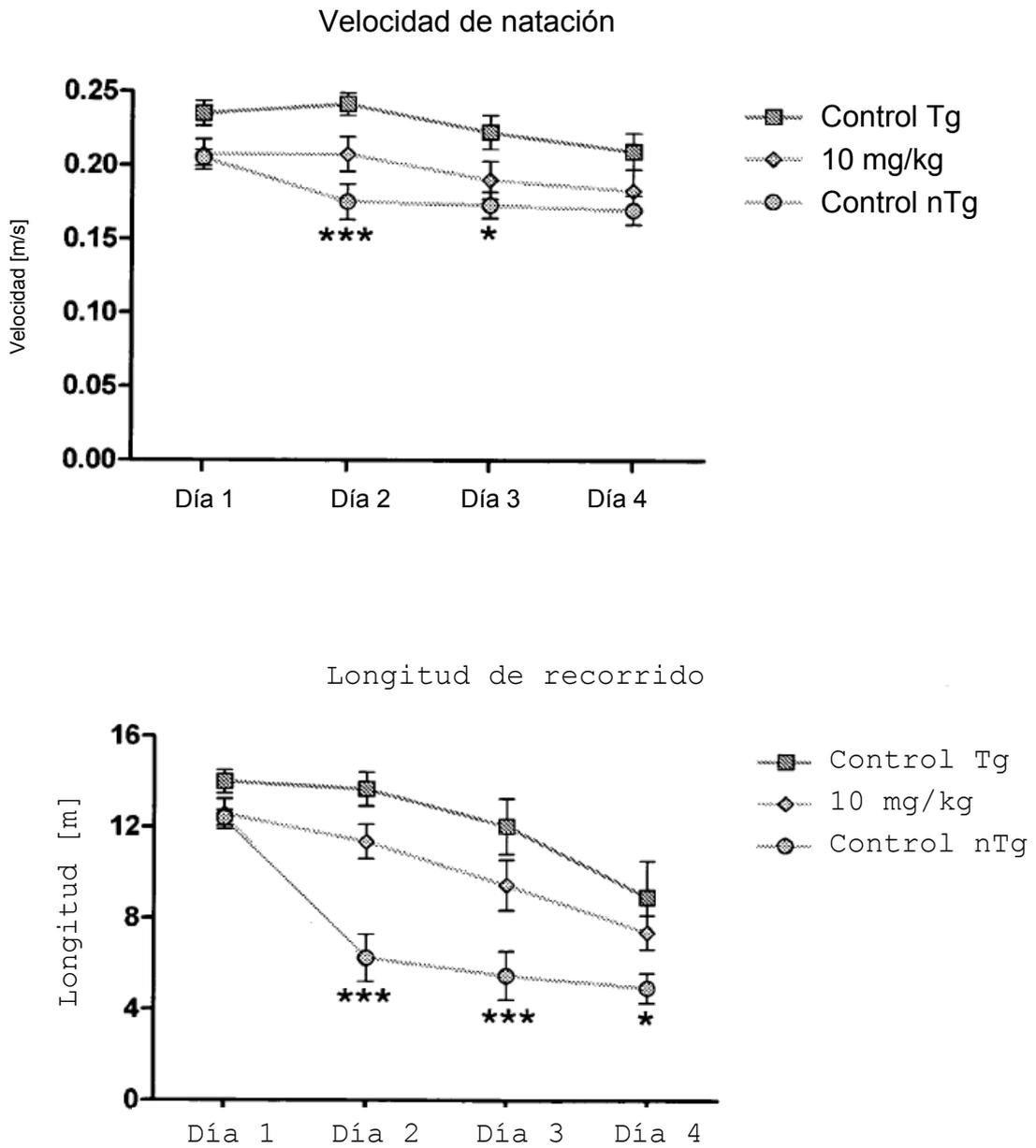


Figura 10

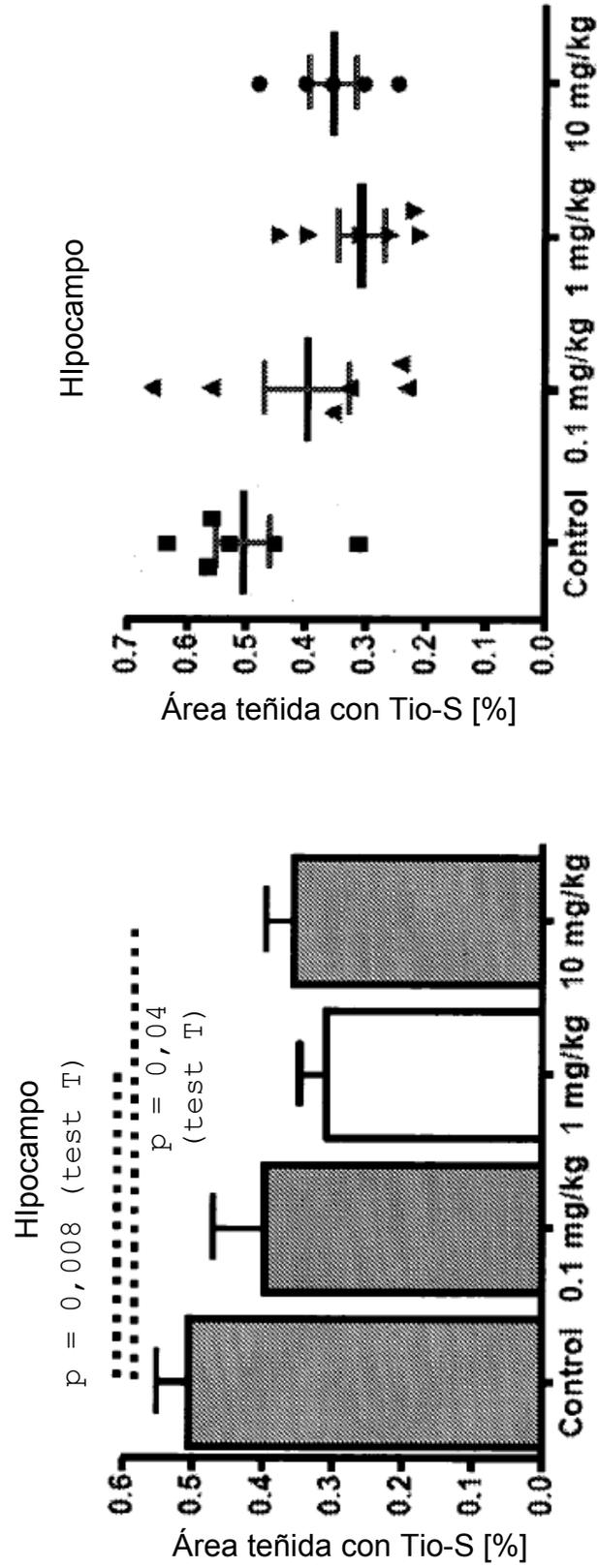


Figura 11

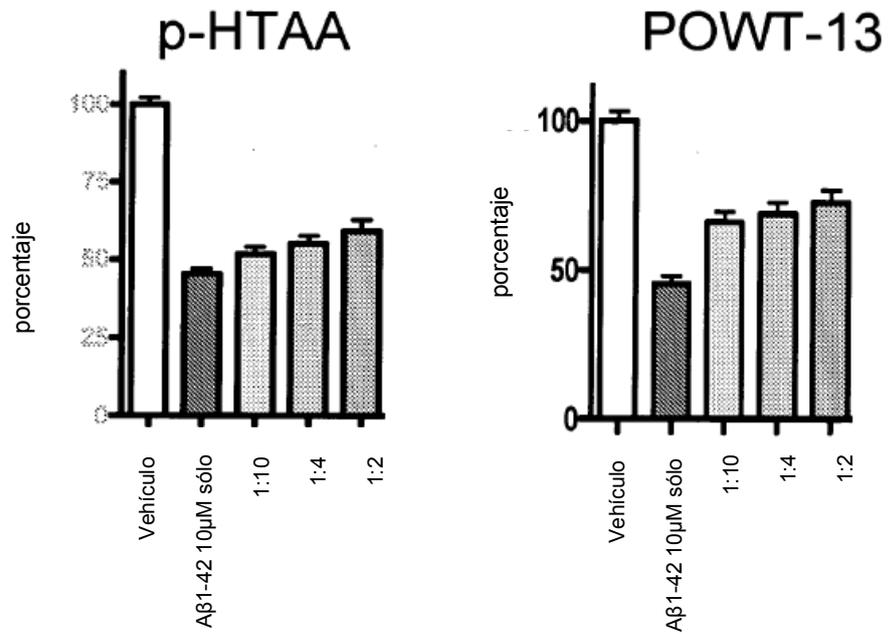


Figura 12

