

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 038**

51 Int. Cl.:

A61K 31/04 (2006.01)
A61K 31/275 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61K 31/353 (2006.01)
A61K 31/423 (2006.01)
A61K 31/603 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.10.2012 PCT/EP2012/070945**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.05.2013 WO13060668**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2012 E 12778323 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2770988**

54 Título: **Nuevo tratamiento para la amiloidosis asociada a transtirretina**

30 Prioridad:

24.10.2011 EP 11382326

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

05.12.2016

73 Titular/es:

**SOM INNOVATION BIOTECH S.L. (100.0%)
Baldiri Reixac, 4
08028 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**CENTELLAS CASADO, MARC;
INSA BORONAT, RAÚL;
REIG BOLAÑO, NURIA y
GAVALDÀ BATALLA, NÚRIA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 593 038 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

Nuevo tratamiento para la amiloidosis asociada a transtirretina

- 5 La presente invención está asociada con el campo de las enfermedades amiloideas y, particularmente, a nuevos compuestos para la prevención y/o el tratamiento de la amiloidosis asociada a transtirretina.

Antecedentes de la técnica

- 10 La amiloidosis se refiere a una diversidad de afecciones en las que las proteínas amiloides se depositan en órganos y tejidos de forma anómala. Estas proteínas amiloides a veces se encuentran en una forma fibrilar anómala, denominada fibrillas amiloides o depósitos amiloides, que se acumulan y progresivamente interfieren con la estructura y función de los órganos afectados de todo el cuerpo. Se han implicado diferentes proteínas en diferentes tipos de enfermedad amiloidea, y el tratamiento depende de la proteína amiloide particular.

- 15 La amiloidosis asociada a transtirretina es una denominación general para un grupo de enfermedades amiloideas que están asociadas específicamente con un plegamiento incorrecto anómalo de la transtirretina, agregación (formación de fibrillas) y posterior deposición. La proteína transtirretina (TTR) es un transportador de las hormonas tiroideas tiroxina y retinol en el líquido cefalorraquídeo y el suero. Las mutaciones en el gen TTR, que se encuentran en el cromosoma humano 18q12.1-11.2, dan a veces como resultado una desestabilización de la proteína TTR, que conduce a una agregación anómala y a la enfermedad amiloidea asociada a transtirretina. Se conocen más de 80 variantes de la TTR formadoras de amiloide, de las que la más frecuente se denomina TTR V30M.

- 20 La polineuropatía amiloidea familiar (PAF), también denominada amiloidosis asociada a transtirretina hereditaria, la amiloidosis por transtirretina o enfermedad de Corino de Andrade, se trata de una enfermedad neurodegenerativa dominante autosómica. Normalmente se manifiesta entre los 20 y 40 años de edad, se caracteriza por dolor, parestesia, debilidad muscular y disfunción autónoma. En su estado terminal, los riñones y el corazón se ven afectados. La PAF se caracteriza por el depósito sistémico de variantes amiloides de la proteína TTR, especialmente en el sistema nervioso periférico, ocasionando una polineuropatía sensorial y motora progresiva. Esta enfermedad es, con mucho, el tipo más frecuente de amiloidosis hereditaria en el mundo.

- 25 Otros tipos de amiloidosis asociada a transtirretina son la cardiomiopatía amiloide familiar y la amiloidosis sistémica senil, ocasionada por el depósito de TTR amiloide en el corazón, y la amiloidosis leptomeníngea, donde los depósitos amiloides de TTR se encuentran en las paredes de los vasos leptomeníngeos, en la pia aracnoides y también en depósitos en el espacio subpial. La última afección está asociada con una imagen clínica de una afectación del sistema nervioso central manifestada como demencia, ataxia y espasticidad.

- 30 Aunque por el momento no existe tratamiento alguno que bloquee el depósito de amiloide o acelere su eliminación, el tratamiento de las enfermedades amiloideas está destinado a respaldar la función de órganos que están fallando. Frecuentemente se ha utilizado el trasplante hepático como tratamiento para amiloidosis asociada a transtirretina, especialmente la PAF, ya que la proteína TTR se produce principalmente en el hígado. La sustitución del hígado que contiene un gen TTR mutante por un hígado que fabrica proteína transtirretina normal está destinada a prevenir la formación de más cantidad de amiloide y puede estabilizar la enfermedad. El trasplante hepático se ha realizado en pacientes de PAF con un importante éxito en muchos casos. Sin embargo, un trasplante hepático no siempre es una opción disponible y, además, a medida que aumenta la experiencia, es cada vez más evidente que el trasplante hepático en caso de PAF debe realizarse antes de que se haya producido mucho daño en los nervios o el corazón. Tristemente, esto último puede suceder sin ocasionar ningún síntoma.

- 35 Se han descrito muy pocos compuestos que ejerzan una actividad inhibidora contra la formación de fibrillas y posterior depósito de la TTR. Entre estos, se ha notificado que el yododiflunisal es un potente inhibidor de amiloide *in vitro* por Gales *et al* (Gales L, Macedo-Ribeiro S, Arsequell G, Valencia G, Saraiva MJ, Damas AM. "Human transthyretin in complex with iododiflunisal: structural features associated with a potent amyloid inhibitor". *Biochem J*, 2005, vol. 388, p. 615-621). Además, la solicitud de patente WO 2005/113523 divulga compuestos de benzoxazol para estabilizar la proteína TTR amiloide, evitando de esta manera la formación de fibrillas de TTR amiloides. Se reivindica que estos compuestos son útiles para el tratamiento de las enfermedades amiloideas asociadas a transtirretina.

- 40 En particular, se ha descrito que un derivado de benzoxazol denominado tafamidís (ácido 2-(3,5-diclorofenil)-1,3-benzoxazol-6-carboxílico) inhibe la agregación anómala de TTR y la formación de fibrillas, y se está sometiendo a estudios clínicos para el tratamiento de la PAF. A pesar de ser una perspectiva prometedora, tafamidís sigue estando en evaluación en los principales organismos oficiales de registro de medicamentos. Por tanto, debe aclararse aún la relevancia clínica del tafamidís.

- 45 A pesar del notable esfuerzo realizado en el campo, no existe hasta el momento ningún tratamiento farmacológico eficaz para el tratamiento de la PAF. Es por tanto deseable proporcionar compuestos alternativos para el tratamiento de la PAF y otras amiloidosis asociadas a transtirretina.

Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

- 5 Los inventores han descubierto sorprendentemente que los inhibidores de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) son útiles para la prevención y/o el tratamiento de la amiloidosis asociada con TTR.

10 Como se muestra en los siguientes ejemplos, el inhibidor de COMT tolcapona tiene una elevada actividad inhibidora contra la formación del amiloide TTR. La buena actividad inhibidora de tolcapona se revela por su bajo CI_{50} y un elevado porcentaje de valores de reducción en la amiloidosis (RA %).

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un inhibidor de COMT de fórmula (I) para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la amiloidosis asociada con TTR.

- 15 Es también parte de la divulgación un método para la prevención y/o el tratamiento de una amiloidosis asociada con TTR que comprende administrar un inhibidor de COMT de fórmula (I) a un sujeto que lo necesita. En una realización particular, el sujeto que necesita la prevención y/o tratamiento es un mamífero, incluyendo un ser humano. En una realización especialmente preferida, el mamífero es un ser humano.

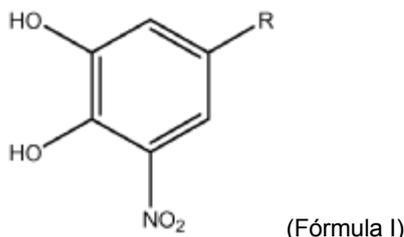
20 En comparación con tafamidís, que es hasta el momento el compuesto farmacológico más avanzado para el tratamiento de la PAF, tolcapona tiene un valor de CI_{50} cuatro veces inferior *in vitro*, lo que significa que la concentración de tolcapona necesaria para inhibir el 50 % de la formación de fibrillas de TTR es mucho más pequeña que la de tafamidís (véase los ejemplos posteriores). Los ejemplos posteriores muestran adicionalmente que la tolcapona se une a TTR y evita la citotoxicidad inducida por TTR en mayor medida que el tafamidís.

25 De acuerdo con estos resultados, tolcapona es más eficaz para reducir la formación de fibrillas de TTR que el compuesto de referencia tafamidís. Además de evitar la formación de fibrillas de TTR, los inventores han descubierto que la tolcapona muestra una importante actividad de alteración sobre las fibrillas de TTR existentes. Los resultados presentados a continuación demuestran que la actividad de alteración de las fibrillas de TTR de la tolcapona es mayor que la de tafamidís.

30 Los inhibidores de COMT son bien conocidos en el estado de la técnica como compuestos que inhiben la acción de la catecol-O-metil transferasa, una enzima que está implicada en la degradación de neurotransmisores (Mannisto y Kaakkola, *Pharm. Rev.*, 1999, vol. 51, p. 593-628). La actividad del inhibidor de COMT se puede determinar por métodos conocidos en la materia, por ejemplo, el método divulgado en Zurcher *et al* (*Biomedical Chromatography*, 1996, vol. 10, p. 32-36). Los inhibidores de COMT son bien conocidos en la técnica de la farmacología para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson junto con agentes dopaminérgicos tales como L-DOPA.

35 Se han descrito varios inhibidores de COMT. Tolcapona, entacapona y nitecapona pertenecen a lo que se denominan "inhibidores de COMT de segunda generación", que han demostrado ser inhibidores de COMT potentes, muy selectivos y activos por vía oral. Nitrocatecol es la estructura clave de estas moléculas (*Pharm. Rev.*, 1999, vol. 51, p. 593-628, mencionado anteriormente). Por tanto, en una realización, el inhibidor de COMT para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la amiloidosis asociada con TTR es un compuesto de nitrocatecol que tiene la siguiente fórmula I

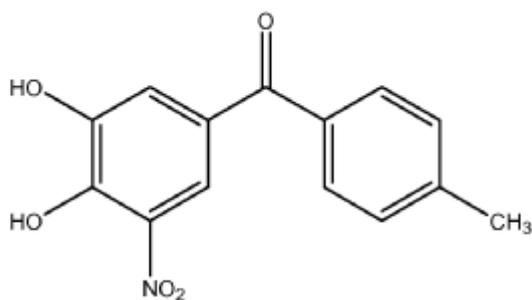
45



50 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que R= -C(O)-PhCH₃, -CH=C(CN)-C(O)-NEt₂ o -CH=C(C(O)(CH₃)₂).

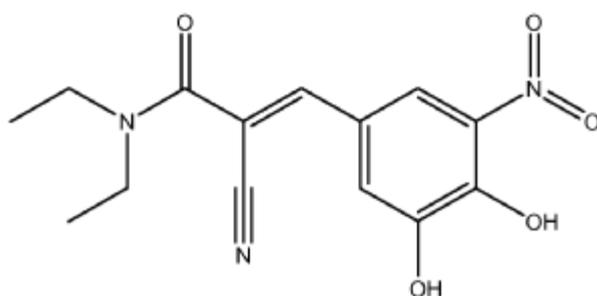
En otra realización del primer aspecto de la invención, el inhibidor de COMT es tolcapona, entacapona o nitecapona, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

55 En una realización particular, el inhibidor de COMT es tolcapona, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. Tolcapona (fórmula II) es un compuesto cristalino amarillo inodoro, no higroscópico que tiene una masa molecular relativa de 273,25. Su fórmula empírica es C₁₄H₁₁NO₅. El nombre químico de la tolcapona es 3,4-dihidroxi-4'-metil-5-nitrobenzofenona y su número de referencia CAS es 134308-13-7.



(Fórmula II)

En otra realización del primer aspecto de la invención, el inhibidor de COMT es entacapona, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. Entacapona (fórmula III) es un compuesto cristalino amarillo con una masa molecular de 305,29. Su fórmula empírica es $C_{14}H_{15}N_3O_5$. El nombre químico de la entacapona es (2E)-2-ciano-3-(3,4-dihidroxi-5-nitrofenil)-N,N-dietil-2-propenamida y su número de referencia CAS es 130929-57-6.

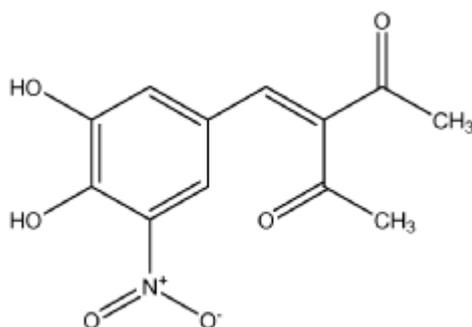


(Fórmula III)

10 Puesto que estos compuestos son fármacos que están autorizados para uso médico en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) desde 1998, la biodisponibilidad y el perfil de seguridad de la tolcapona y entacapona se han estudiado en varios ensayos clínicos. De este modo, estos compuestos tienen un perfil de seguridad aceptable para uso humano y buena biodisponibilidad. Su perfil de seguridad junto con su elevada actividad inhibidora contra la
15 formación de fibrillas de TTR convierten a los inhibidores de COMT en fármacos muy prometedores para la prevención y/o el tratamiento de la amiloidosis asociada con TTR.

Además, puesto que estos compuestos ya se han sometido a ensayos clínicos para el tratamiento de la enfermedad humana, la prueba conceptual clínica es menos arriesgada (y más rápida) de conseguir en comparación con el desarrollo clásico de nuevas entidades químicas. En este sentido, es importante destacar que se requiere realizar considerablemente menos experimentación en seres humanos y animales, implicando posteriormente menos costes de desarrollo y, de forma más importante, menos padecimientos a seres humanos y animales.

En otra realización del primer aspecto de la invención, el inhibidor de COMT es nitecapona, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. Nitecapona (fórmula IV) es un compuesto de masa molecular 265,21. Su fórmula empírica es $C_{12}H_{11}NO_6$, el nombre químico, 3-[(3,4-dihidroxi-5-nitrofenil)metileno]-2,4-pentandiona, y el número de referencia CAS, 116313-94-1.



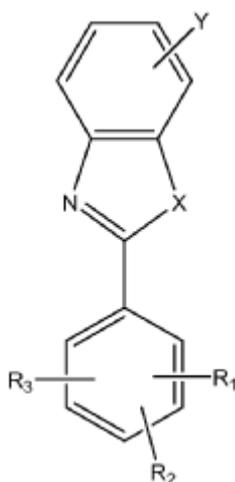
(Fórmula IV)

30 En una realización preferida de la invención, la amiloidosis asociada con TTR es PAF. En otra realización, la amiloidosis asociada con TTR es la amiloidosis sistémica senil. En otra realización, la amiloidosis asociada con TTR es la cardiomiopatía amiloide familiar. En otra realización adicional, la amiloidosis asociada con TTR es la amiloidosis leptomeníngea.

Los inhibidores de COMT anteriormente definidos se pueden utilizar tanto solos como combinados con otros agentes terapéuticos para la prevención y/o el tratamiento de las amiloidosis asociadas con TTR. Por tanto, en un segundo aspecto, la invención se refiere a una combinación de un inhibidor de COMT de fórmula (I) y un agente terapéutico adicional para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una amiloidosis asociada con TTR. Además, es también parte de la divulgación un método para la prevención y/o el tratamiento de la amiloidosis asociada con la transtirretina que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una combinación de un inhibidor de COMT de fórmula (I) y un agente terapéutico adicional. Son ejemplos de agentes terapéuticos adicionales para su uso en el segundo aspecto de la invención otro inhibidor de COMT, un derivado de benzoxazol de fórmula (V), yododiflunisal, diflunisal, resveratrol, ácido tauroursodesoxicólico, doxociclina y epigalocatequina-3-galato (EGCG). El inhibidor de COMT es un compuesto de nitrocatecol de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se ha definido para el primer aspecto de la invención. La persona experta comprenderá que las sales farmacéuticamente aceptables de los agentes terapéuticos adicionales anteriormente mencionados también se pueden utilizar en la combinación del segundo aspecto de la invención.

En una realización del segundo aspecto de la invención, se proporciona una combinación de un inhibidor de COMT de fórmula (I) y un agente terapéutico adicional seleccionado entre el grupo que consiste en otro inhibidor de COMT, un derivado de benzoxazol de fórmula (V) y yododiflunisal para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la amiloidosis asociada a transtirretina. El inhibidor de COMT es un compuesto de nitrocatecol de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se ha definido para el primer aspecto de la invención.

Los derivados de benzoxazol se divulgan en la solicitud de patente internacional WO 2005113523 como compuestos que estabilizan el estado natural de TTR, inhibiendo de esta forma el plegado incorrecto de la proteína. De acuerdo con el segundo aspecto de la invención, los derivados de benzoxazol son compuestos de la fórmula V:



(Fórmula V)

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que:

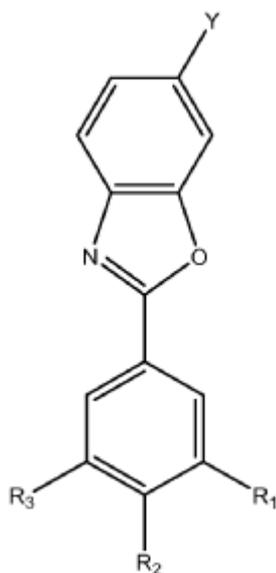
Y es COOR, tetrazolilo, CONHOR, B(OH)₂ u OR;

X es O; y

R¹, R² y R³ se seleccionan cada uno independientemente entre hidrógeno, halo, OR, B(OH)₂ o CF₃, y en la que R es hidrógeno, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₁-C₆, alquinilo C₁-C₆, cicloalquilo C₁-C₆, heterociclilo C₁-C₆, fenilo, xililo, naftilo, tienilo, indolilo o piridilo.

De acuerdo con el segundo aspecto de la invención, el inhibidor de COMT es un compuesto de nitrocatecol de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se ha definido para el primer aspecto de la invención y el agente terapéutico adicional es un derivado de benzoxazol de fórmula V o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se ha definido anteriormente.

En otra realización del segundo aspecto de la invención, el derivado de benzoxazol es un compuesto de fórmula VI



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que:

- 5 Y es COOH, u OH; y
 R¹, R² y R³ se seleccionan cada uno independientemente entre hidrógeno, halo, OH, B(OH)₂ o CF₃.

10 En una realización particular, el inhibidor de COMT es un compuesto de nitrocatecol de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se ha definido para el primer aspecto de la invención y el agente terapéutico adicional es un derivado de benzoxazol de fórmula VI o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se ha definido anteriormente.

15 En otra realización, el derivado de benzoxazol es tafamidís. En una realización particular, el inhibidor de COMT es un compuesto de nitrocatecol de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se ha definido para el primer aspecto de la invención y el agente terapéutico adicional es tafamidís. En otra realización particular, el inhibidor de COMT es tolcapona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el agente terapéutico adicional es tafamidís.

20 En otra realización del segundo aspecto de la invención, el agente terapéutico adicional es yododiflunisal. En una realización particular, el inhibidor de COMT es un compuesto de nitrocatecol de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se ha definido para el primer aspecto de la invención y el agente terapéutico adicional es yododiflunisal. En otra realización particular, el inhibidor de COMT es tolcapona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el agente terapéutico adicional es yododiflunisal.

25 En otra realización particular, el inhibidor de COMT se combina con otro inhibidor de COMT. Los inhibidores de COMT son compuestos de nitrocatecol de fórmula I o sales farmacéuticamente aceptables del mismo tal como se ha definido para el primer aspecto de la invención. Por ejemplo, la invención proporciona una combinación de tolcapona y entacapona para la prevención y/o el tratamiento de amiloidosis asociadas con TTR.

30 En una realización adicional del segundo aspecto de la invención, se proporciona una combinación de un inhibidor de COMT de fórmula (I) y un agente terapéutico adicional seleccionado entre el grupo que consiste en diflunisal, resveratrol, ácido tauroursodesoxicólico, doxociclina y EGCG para su uso en la prevención y/o el tratamiento de amiloidosis asociada con TTR. EGCG es el polifenol principal y más significativo del té verde. En el sentido de la presente invención, EGCG se puede utilizar como un compuesto aislado o formando parte de un extracto vegetal, especialmente de un extracto de té. El inhibidor de COMT es un compuesto de nitrocatecol de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se ha definido para el primer aspecto de la invención. Más preferentemente, el inhibidor de COMT es tolcapona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Una realización particular proporciona una combinación de tolcapona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y EGCG para su uso en la prevención y/o el tratamiento de amiloidosis asociada con TTR.

40 Como será evidente para los expertos en la materia, la combinación de la presente invención es eficaz no solamente cuando los principios activos se utilizan en una composición individual, sino también cuando se utilizan en dos composiciones diferentes, administradas bien de forma simultánea, secuencial o independiente después de un determinado periodo de tiempo. Adicionalmente, los expertos en la materia entenderán que el inhibidor de COMT se puede describir para su uso con el resto de principios activos en una terapia de combinación para prevenir y/o tratar una amiloidosis asociada con transtirretina, y viceversa.

Por tanto, un tercer aspecto de la presente invención proporciona un inhibidor de COMT de fórmula (I) para su uso en la prevención y/o el tratamiento de amiloidosis asociadas con la transtirretina en una terapia de combinación con un agente terapéutico adicional.

- 5 Es también parte de la divulgación un método para la prevención y/o el tratamiento de una amiloidosis asociada con la transtirretina que comprende administrar a un sujeto que lo necesita un inhibidor de COMT de fórmula (I) en combinación con agente terapéutico adicional.

10 Los ejemplos de agentes terapéuticos adicionales para su uso en el tercer aspecto de la invención son otro inhibidor de COMT, un derivado de benzoxazol de fórmula (V), yododiflunisal, diflunisal, resveratrol, ácido tauroursodesoxicólico, doxiciclina y EGCG. El inhibidor de COMT es un compuesto de nitrocatecol de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se ha definido para el primer aspecto de la invención. La persona experta comprenderá que las sales farmacéuticamente aceptables de los agentes terapéuticos adicionales anteriormente mencionados también se pueden utilizar en la terapia de combinación del tercer aspecto de la invención.

15 En una realización del tercer aspecto de la invención, se proporciona un inhibidor de COMT de fórmula (I) para su uso en la prevención y/o el tratamiento de amiloidosis asociadas con la transtirretina en una terapia de combinación con un agente terapéutico adicional seleccionado entre el grupo que consiste en otro inhibidor de COMT, un derivado de benzoxazol de fórmula (V) y yododiflunisal. El inhibidor de COMT es un compuesto de nitrocatecol de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se ha definido para el primer aspecto de la invención.

20 En una realización particular del tercer aspecto de la invención, el agente terapéutico adicional es otro inhibidor de COMT. Preferentemente, los inhibidores de COMT son compuestos de nitrocatecol de fórmula I o sales farmacéuticamente aceptables del mismo tal como se ha definido para el primer aspecto de la invención. Por ejemplo, la invención proporciona tolcapona para la prevención y/o el tratamiento de una amiloidosis asociada con TTR junto con entacapona. En otra realización particular, el agente terapéutico adicional es un derivado de benzoxazol de fórmula (V).

25 Dicho derivado de benzoxazol es un compuesto de fórmula V o VI o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos tal como se ha definido para el segundo aspecto de la invención. Por ejemplo, la invención proporciona un inhibidor de COMT de fórmula (I) para la prevención y/o el tratamiento de una amiloidosis asociada con TTR junto con tafamidís. El inhibidor de COMT es un compuesto de nitrocatecol de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se ha definido para el primer aspecto de la invención. Más preferentemente, el inhibidor de COMT es tolcapona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. De esta forma, la invención proporciona tolcapona para la prevención y/o el tratamiento de una amiloidosis asociada con TTR en combinación con tafamidís. En otra realización adicional, el agente terapéutico adicional es yododiflunisal. En otra realización adicional, el agente terapéutico adicional es yododiflunisal y el inhibidor de COMT es un compuesto de nitrocatecol de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se ha definido para el primer aspecto de la invención. La invención proporciona de este modo tolcapona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la prevención y/o el tratamiento de una amiloidosis asociada con TTR junto con yododiflunisal.

30 En una realización adicional del tercer aspecto de la invención, se proporciona un inhibidor de COMT de fórmula (I) para su uso en la prevención y/o el tratamiento de amiloidosis asociada con la transtirretina en una terapia de combinación con un agente terapéutico adicional seleccionado entre el grupo que consiste en diflunisal, resveratrol, ácido tauroursodesoxicólico, doxiciclina y EGCG para su uso en la prevención y/o el tratamiento de amiloidosis asociada con TTR. El inhibidor de COMT es un compuesto de nitrocatecol de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se ha definido para el primer aspecto de la invención. Más preferentemente, el inhibidor de COMT es tolcapona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización particular, la invención proporciona tolcapona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la prevención y/o el tratamiento de amiloidosis asociada con transtirretina en una terapia de combinación con EGCG.

35 Un cuarto aspecto de la invención proporciona un agente terapéutico seleccionado entre el grupo que consiste en un derivado de benzoxazol de fórmula (V), yododiflunisal, diflunisal, resveratrol, ácido tauroursodesoxicólico, doxiciclina y EGCG, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de amiloidosis asociada con la transtirretina en una terapia de combinación con un inhibidor de COMT. El inhibidor de COMT es un compuesto de nitrocatecol de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se ha definido para el primer aspecto de la invención. La persona experta comprenderá que las sales farmacéuticamente aceptables de los agentes terapéuticos anteriormente mencionados también se pueden utilizar en una terapia de combinación del cuarto aspecto de la invención.

40 En una realización del cuarto aspecto de la invención, se proporciona un agente terapéutico seleccionado entre el grupo que consiste en un derivado de benzoxazol de fórmula (V) y yododiflunisal para su uso en la prevención y/o el tratamiento de amiloidosis asociada con la transtirretina en una terapia de combinación con un inhibidor de COMT. El inhibidor de COMT es un compuesto de nitrocatecol de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del

mismo tal como se ha definido para el primer aspecto de la invención.

En una realización particular del cuarto aspecto de la invención, el agente terapéutico es un derivado de benzoxazol de fórmula V o VI o sales farmacéuticas del mismo tal como se ha definido para el segundo aspecto de la invención.

5 Por ejemplo, la invención proporciona tafamidís para la prevención y/o el tratamiento de amiloidosis asociada con TTR junto con un inhibidor de COMT. El inhibidor de COMT es un compuesto de nitrocatecol de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se ha definido para el primer aspecto de la invención. Más preferentemente, el inhibidor de COMT es tolcapona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. De esta forma, la invención proporciona tafamidís para la prevención y/o el tratamiento de una amiloidosis asociada con TTR
10 junto con tolcapona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otra realización adicional, el agente terapéutico es yododiflunisal. En otra realización adicional, el agente terapéutico adicional es yododiflunisal y el inhibidor de COMT es un compuesto de nitrocatecol de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se ha definido para el primer aspecto de la invención. La invención proporciona yododiflunisal para la prevención y/o el tratamiento de una amiloidosis asociada con TTR junto con tolcapona o una sal farmacéuticamente
15 aceptable del mismo.

En una realización adicional del cuarto aspecto de la invención, se proporciona un agente terapéutico seleccionado entre el grupo que consiste en diflunisal, resveratrol, ácido tauroursodesoxicólico, doxociclina y EGCG para su uso en la prevención y/o el tratamiento de amiloidosis asociada con la transtirretina en una terapia de combinación con un inhibidor de COMT. El inhibidor de COMT es un compuesto de nitrocatecol de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se ha definido para el primer aspecto de la invención. Más preferentemente, el inhibidor de COMT es tolcapona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Una realización particular proporciona EGCG para su uso en la prevención y/o el tratamiento de amiloidosis asociadas con TTR en una terapia de combinación con tolcapona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
20

Además, el inhibidor de COMT se puede usar como tratamiento auxiliar antes y/o después del trasplante hepático en un paciente con una amiloidosis asociada con TTR. Dicho inhibidor de COMT es un compuesto de nitrocatecol de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se ha definido para el primer aspecto de la invención.
25

La invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de COMT de fórmula (I) junto con excipientes y/o portadores farmacéuticamente aceptables para la prevención y/o el tratamiento de una amiloidosis asociada con TTR. Dicho inhibidor de COMT es un compuesto de nitrocatecol de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se ha definido para el primer aspecto de la invención.
30

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", también denominada "dosis", se refiere a la cantidad de un compuesto que, cuando se administra, es suficiente para evitar el desarrollo de, o para aliviar en cierta medida, uno o más de los síntomas de la enfermedad a la que se dirige. La dosis particular del compuesto administrado de acuerdo con la presente invención se determinará por las circunstancias concretas que rodean el caso, incluyendo el compuesto administrado, la vía de administración, la afección particular para tratar, y consideraciones similares.
35

La expresión "excipientes y/o portadores farmacéuticamente aceptables" se refiere a materiales, composiciones o vehículos farmacéuticamente aceptables. Cada componente debe ser farmacéuticamente aceptable en el sentido de ser compatible con el resto de ingredientes de la composición farmacéutica. También debe ser adecuado para su uso en contacto con el tejido u órgano de los seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad u otros problemas o complicaciones en concordancia con una relación beneficio/riesgo razonable.
40

Se puede usar cualquier sal farmacéuticamente aceptable del inhibidor de COMT para los fines de la invención. La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales preparadas a partir de bases no tóxicas farmacéuticamente aceptables. Preferentemente, la sal es una sal de metal alcalino o alcalinotérreo.
45

En una realización de la invención, el inhibidor de COMT se administra a un paciente en una forma farmacéutica unitaria oral. Las formas farmacéuticas incluyen formas farmacéuticas sólidas tales como comprimidos, polvos, cápsulas, sobrecillos, así como jarabes líquidos, suspensiones y elixires. Los inhibidores de COMT y los excipientes se pueden formular en composiciones y formas farmacéuticas de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica. En una realización particular, el inhibidor de COMT se administra en forma de un comprimido, píldora o cápsula. Sin embargo, los inhibidores de COMT también se pueden administrar a un paciente como un ingrediente en formas farmacéuticas inyectables. Las formas farmacéuticas inyectables pueden incluir líquidos para inyección intradérmica, intravenosa, intramuscular o subcutánea, soluciones para perfusión, polvo para reconstitución de inyecciones líquidas y jeringas precargadas. En el sentido de la presente invención, puede ser también adecuado formular el inhibidor de COMT para administración intranasal o inhalada, o para su administración tópica en la forma de, por ejemplo, una crema, un gel, una pomada o un parche dérmico. Los métodos para la preparación de estas formulaciones son conocidos en la técnica. Además, el inhibidor de COMT se puede formular como una forma farmacéutica de liberación controlada. Las formas farmacéuticas de liberación controlada son conocidas en la
50
55
60
65

técnica y son especialmente deseables para el tratamiento de enfermedades crónicas o para la administración de principios activos que pueden ser tóxicos a dosis elevadas o que presentan un patrón de semivida corta cuando se administran a un paciente. Preferentemente, el inhibidor de COMT es un compuesto de nitrocatecol de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se ha definido para el primer aspecto de la invención.

5 Tal como se ha mencionado anteriormente, una cantidad terapéuticamente eficaz (o dosis) del inhibidor de COMT en el sentido de la presente invención es la cantidad de dicho compuesto que es suficiente para prevenir o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas de una amiloidosis asociada con TTR. Por ejemplo, una dosis diaria eficaz de tolcapona para uso humano podría estar comprendida entre 20 y 600 mg y una dosis diaria eficaz de entacapona para uso humano podría estar comprendida entre 1600 y 2000 mg.

15 Por tanto, la dosis de inhibidor de COMT para administrar puede estar comprendida entre 0,1 y 16000 mg/día, o entre 0,1 y 12000 mg/día, o entre 0,1 y 10000 mg/día, o entre 0,1 y 5000 mg/día, o entre 0,1 y 3000 mg/día. En una realización particular, la dosis de inhibidor de COMT para administrar está comprendida entre 1 y 3000 mg/día. En otra realización, la dosis está comprendida entre 1 y 2000 mg/día. Preferentemente, el inhibidor de COMT es un compuesto de nitrocatecol de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se ha definido para el primer aspecto de la invención.

20 En la totalidad de la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la palabra "comprende" y variaciones de la palabra, no están previstas para excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Los objetos, ventajas y características adicionales de la invención serán evidentes para los expertos en la materia después de examinar la memoria descriptiva o se pueden aprender con la práctica de la invención. Se proporcionan los siguientes ejemplos a modo de ilustración.

25 Breve descripción de las figuras

Figura 1. Ensayo de competición con T4 para la unión a TTR natural (WT) mediante filtración en gel: Curvas de desplazamiento de T4 por TTR WT mediante diferentes compuestos. Eje Y: Cantidad de T4 unido a TTR/ T4 total; Eje X: log 10 de la concentración de compuesto (unidades molares). Los valores corresponden a un experimento representativo realizado por duplicado, representado como promedio +/- desviación típica. Compuestos de ensayo: Tiroxina (T4), Tolcapona (SOM), Tafamidís (TAF), y (-)-epigalocatequina-3-galato (EGCG).

35 Figura 2. Estabilidad tetramérica de TTR en presencia de diferentes compuestos según IEF: El plasma de individuos de control (C) y de pacientes de polineuropatía amiloide familiar que tienen la mutación V30M (V30M) se trató con los compuestos de ensayo Tafamidís (T); tolcapona (S); epigalocatequina-3-galato (EGCG) o se dejó sin tratamiento (nt); y se sometió a IEF en condiciones de semidesnaturalización como se describe en el texto. La relación de TTR tetramérica a TTR total para cada condición se calculó y se representó gráficamente como promedio +/- etm (error típico de la media).

40 Figura 3: Activación de la caspasa-3. Células de schwannoma de rata (línea celular RN22) se incubaron durante 24 h en ausencia o presencia de oligómeros Y78F de TTR obtenidos en ausencia o presencia de los compuestos sometidos a ensayo (a 20 μ M). La activación de la Caspasa-3 se midió en lisados celulares, y se expresó como fluorescencia / contenido en proteínas. Muestras: células de control (C1); Células tratadas con EGCG (C2); Células con tafamidís (C3); células tratadas con tolcapona (C4); células de control tratadas con el oligómero obtenido en ausencia de los compuestos (O1); células tratadas con el oligómero obtenido en presencia de EGCG (O2); células tratadas con el oligómero obtenido en presencia de tafamidís (O3); células tratadas con el oligómero obtenido en presencia de tolcapona (O4). Los resultados representan el promedio de 4 repeticiones y la desviación típica. Las diferencias significativas con respecto al control O1 se calcularon con la prueba de la T de Student: * P<0,05; ****: P<0,005.

50 Figura 4: Análisis mediante el microscopio electrónico de transmisión de fibrillas de TTR preformadas después de 4 días de incubación con diferentes compuestos a 36 μ M. Desde arriba a la izquierda, en sentido horario: control, tafamidís, EGCG, Tolcapona.

55 Ejemplos

Ejemplo 1: Ensayo de turbidez cinética.

Materiales

60 La proteína Y78F de TTR recombinante, que es una variación Tyr78Phe fuertemente amiloidogénica de la TTR humana, se produjo como se indica en Dolado *et al* (Dolado I, Nieto J, Saraiva MJ, Arsequell G, Valencia G, Planas A. "Kinetic Assay for High-Throughput Screening of *In vitro* Transthyretin Amyloid Fibrillogenesis Inhibitors". *J. Comb. Chem.*, 2005, vol. 7, p. 246-252).

65 La tolcapona se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology, Inc. El yododiflunisal se preparó a partir de diflunisal (Sigma)

por reacción con tetrafluoroborato de bis(piridina)yodonio (IPy₂BF) como se describe en Barluenga *et al* (Barluenga J, Gonzalez JM, Garcia-Martin MA, Campos PJ, Asensio G. "An expeditious and general aromatic iodination procedure. *J Chem Soc Chem Commun*, 1992, vol. 14, p. 1016-1017). El tafamidís se puede preparar según los métodos divulgados en la solicitud de patente internacional WO2005113523. Disoluciones madre de los compuestos sometidos a ensayo como inhibidores se disolvieron en DMSO (calidad espectrofotométrica, de Sigma) a una concentración de 1,5 mM. Se prepararon las soluciones de trabajo por dilución de la disolución madre 1:4 en H₂O/DMSO (2:1). En todos los casos, la concentración de DMSO se ajustó al 5 % (v/v) en la mezcla final del ensayo de reacción.

10 Métodos

El ensayo se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito en Dolado *et al.* (mencionado anteriormente). El ensayo comprende dos etapas, una etapa en la que la proteína Y78F se incubó junto con el inhibidor durante 30 minutos, y una segunda etapa en la que se induce la formación de fibrillas mediante un cambio en el pH, y se mide la absorbancia durante 1,5 h. En resumen, el ensayo se realizó de la siguiente forma:

En primer lugar, se prepararon las siguientes soluciones: Solución madre de proteína Y78F: 4 mg/ml en fosfato 20 mM, KCl 100 mM, pH 7,6. Tampón de incubación: fosfato 10 mM, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,6. Tampón de dilución: acetato de sodio 400 mM, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 4,2.

Para cada inhibidor, se siguió el siguiente protocolo: La concentración exacta de proteína de la solución madre se determinó por Abs₂₈₀ y, de acuerdo con este valor, se calculó el volumen de disolución madre de Y78F para añadir para tener una concentración final de proteína en el pocillo de 0,4 mg/ml, y se dosificó en 6 pocillos de una microplaca de 96 pocillos. Se añadieron diferentes volúmenes de la solución de inhibidor de trabajo para conseguir concentraciones finales comprendidas entre 0 y 40 μM, y el contenido final en DMSO de cada pocillo se ajustó al 5 % por adición del correspondiente volumen de una solución de H₂O/DMSO (1:1). A continuación, se añadió tampón de incubación hasta un volumen de 100 μl. La placa se incubó a 37 °C en un lector de placas termostaticado con agitación planetaria cada 15 s por minuto durante 30 min. Una porción de 100 μl de tampón de dilución se dosificó a cada pocillo, y la mezcla se incubó a 37 °C con agitación (15 s cada minuto) en el lector de microplacas. La absorbancia a 340 nm se controló durante 1,5 h en intervalos de 1 min. Se recogieron los datos y se analizaron con el programa informático Microsoft Excel. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Análisis de los resultados

Tras seguir el procedimiento general indicado anteriormente, se obtuvieron curvas de cursos temporales, a partir de las que se calcularon las velocidades iniciales de formación de fibrillas (V_0) como las pendientes del aumento lineal de la absorbancia. Al representar gráficamente las velocidades iniciales frente a la concentración de inhibición, se obtuvo una disminución exponencial para todos los inhibidores analizados. Los datos se ajustaron a la ecuación (1):

$$V_0 = A + B \cdot e^{-C[I]} \quad (1),$$

donde V_0 es la velocidad inicial de formación de fibrillas (en unidades de absorbancia por hora, Abs⁺ h⁻¹), e $[I]$ es la concentración del inhibidor (μM). Los parámetros ajustables son A (Abs⁺ h⁻¹), tasa de agregación residual a concentración elevada del inhibidor; B (Abs⁺ h⁻¹), amplitud o disminución máxima de la velocidad inicial de formación de fibrillas; y C (μM⁻¹), la constante exponencial. A + B es igual a la velocidad inicial de formación de fibrillas en las condiciones de ensayo en ausencia de inhibidor.

Los siguientes parámetros se estimaron para evaluar la potencia de un compuesto como inhibidor de la formación de fibrillas: CI₅₀: concentración de inhibidor a la que la velocidad inicial de formación de fibrillas es la mitad de la que se obtiene sin inhibidor. RA(%) = 100 B/(A + B): porcentaje de reducción en la tasa de formación de fibrillas a una concentración de inhibidor elevada con respecto a la velocidad para $[I] = 0$. Los resultados de la evaluación de las propiedades de inhibición de los compuestos sometidos a ensayo se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. CI₅₀ y porcentaje de valores de reducción de amiloidosis (RA) para los inhibidores de la formación de fibrillas de TTR

Compuesto	CI ₅₀ (μM)	RA (%)
Tolcapona	4,8	85,8
Yododiflunisal	3,9	99,8
Tafamidís	16,9	99

En los resultados anteriores se puede observar que tolcapona es un inhibidor eficaz de la formación de fibrillas de TTR, como se muestra para un valor bajo de la CI₅₀ y un RA elevado. De acuerdo con sus valores de CI₅₀, tolcapona tiene una capacidad de inhibición similar en comparación con yododiflunisal, que se ha notificado como uno de los inhibidores de formación de fibrillas de TTR más potentes *in vitro*. Además, de acuerdo con el valor de CI₅₀, tolcapona es más eficaz que tafamidís, ya que muestra un valor de CI₅₀ que es cuatro veces inferior a tafamidís.

Estos resultados demuestran que tolcapona es un fármaco prometedor para las amiloidosis relacionadas con TTR, tales como PAF, cardiomiopatía amiloide familiar, amiloidosis sistémica senil y amiloidosis leptomenígea.

Ejemplo 2: Ensayo de turbidez de criterio de valoración con una variante mutante de la TTR para la cardiopatía amiloide familiar

Materiales

La proteína V122I de TTR recombinante, que es una variante amiloidogénica de la TTR humana asociada con la cardiopatía amiloide familiar (CAF), se produjo según el mismo procedimiento descrito para la variante Y78F utilizada en el Ejemplo 1. Se preparó un ADN plásmido que expresaba el mutante V122I mediante mutagénesis dirigida al sitio como se notificó para Y78F por Dolado *et al* (mencionado anteriormente), pero usando los siguientes cebadores: 5'- GGATTGGTGTATGACAGCCGT-3' y 5'-ACGGCTGTCAATCACCAATCC-3'. Tolcapona y yododiflunisal se obtuvieron como se describe en el Ejemplo 1.

Métodos

Este ensayo se utiliza para variantes de TTR con amilogenicidad inferior a la de la variante Y78F cuando el ensayo de turbidez cinética no es lo suficientemente sensible para realizar medidas precisas. El procedimiento seguido para analizar los inhibidores mediante este ensayo de criterio de valoración a las 72 h se recoge en Dolado *et al*, (mencionado anteriormente). TTR de V122I se incubó junto con el inhibidor en las mismas condiciones descritas anteriormente para el ensayo de turbidez cinética (Ejemplo 1), usando la proteína V122I a una concentración de 0,4 mg/ml y tres concentraciones diferentes del inhibidor: 3,6, 7,2 y 21,8 microM, correspondiente a 0,5x[proteína], 1x[proteína] y 3x[proteína]. Tras la inducción de ácido (adición de tampón de dilución), las muestras se incubaron sin agitación durante 72 h a 37 °C y a continuación se homogeneizaron por mezclado para resuspender las posibles fibrillas presentes. La turbidez se midió a 340 nm y se normalizó a la amiloidogénesis en ausencia de inhibidor.

Resultado

La potencia inhibidora de los compuestos sometidos a ensayo se evaluó como el porcentaje de reducción de absorbancia de las muestras que contenían inhibidor en comparación con la muestra de control exenta de inhibidor.

Tabla 2. Valores % de reducción de fibrillas para los inhibidores de la formación de fibrillas de TTR V122I

Concentración de inhibidor:	0,5x[proteína]	1x[proteína]	3x[proteína]
Tolcapona	79,3 %	84,3 %	100,0 %
Yododiflunisal	83,2 %	85,0 %	88,2 %

% de reducción de fibrillas=100 x (1-turbidez de la muestra/turbidez del blanco), donde la turbidez de la muestra es la turbidez medida en presencia del inhibidor, y la turbidez del blanco es aquella en ausencia de inhibidor.

Los resultados anteriores muestran que tolcapona inhibe eficazmente la formación de fibrillas del mutante de ATTR V122I, incluso a una relación molar de inhibidor:proteína de 1:2 (0,5x[proteína]). De acuerdo con estos valores, tolcapona tiene una capacidad de inhibición similar en comparación con yododiflunisal. Estos resultados demuestran que tolcapona es un fármaco prometedor para las amiloidosis relacionadas con TTR, incluyendo la cardiopatía amiloide familiar, que está causada principalmente por la mutación V122I.

Ejemplos 3-6

Materiales para los ejemplos 3-6

Tolcapona y tafamidís se obtuvieron como se describe en el Ejemplo 1. Epigallocatequina-3-galato (EGCG, n.º CAS 989-51-5) se adquirió de Cayman Chemicals (n.º 70935). Se produjeron variantes recombinantes naturales TTR (TTR WT), TTR Y78F y TTR L55P en un sistema de expresión bacteriano usando *Escherichia coli* BL21. Los TTR recombinantes se aislaron y se purificaron tal como se ha descrito anteriormente (Ferreira *et al*, 2009, *FEBS Lett*, vol. 583, p. 3569-76). Se obtuvo sangre completa de portadores heterocigóticos de V30M de TTR y de individuos de control procedentes de una colección de muestras disponible en el Molecular Neurobiology Group, IBMC (Universidad de Oporto). Se recogieron muestras de sangre en presencia de EDTA y se centrifugaron para separar el plasma. Los plasmas se mantuvieron congelados a -20 °C.

Ejemplo 3: Ensayo de competición con tiroxina (T4) para la unión a TTR natural (WT) mediante filtración en gel

La unión de ligandos de molécula pequeña a los sitios de unión de T4 en TTR podría estabilizar el tetrámero de TTR y ralentizar la disociación del tetrámero y la amiloidogénesis *in vitro*. Para evaluar la unión, la competición de los compuestos de ensayo con T4 (Sigma-Aldrich) para su unión a TTR WT se estudió cuantitativamente mediante un procedimiento de filtración en gel, usando una cantidad constante de TTR (100 µl de una solución 60 nM) incubada con una cantidad traza de [125I]T4 radiomarcado (que correspondía a 50,000 cpm; actividad específica de 125I-T4 1250 pCi/g de Perkin-Elmer, MA, EE.UU.) y con 100 µl de una solución bien de compuestos de ensayo o de T4

(control positivo) a diferentes concentraciones, concretamente 0, 20, 60, 200, 600, 2000, 6000 y 20000 nM (concentración final 0-10 μ M) (Ferreira *et al*, 2011, *FEBS Lett.*, vol. 585, p. 2424-30). El control negativo se preparó con la proteína, más T4 marcada más 100 μ l de TNE (ausencia de competidor). Todas las soluciones se prepararon en tampón TNE (Tris 0,1 M, NaCl 0,1 M, EDTA 1 mM). Todas las muestras se prepararon por duplicado. Se midió la radiactividad de cada muestra en un contador de centelleo gamma Wizard 14701, Wallac. A continuación, las muestras se incubaron durante una noche a 4 °C. Tras la incubación, la T4 unida a TTR se separó de la T4 no unida mediante filtración a través de una columna de filtración en gel P6DG (1 ml, BioRad). Se midió la radiactividad en las muestras eluidas. Los resultados se expresaron como cantidad de T4 unida a TTR / T4 total frente al Log concentración total de los compuestos de ensayo (competidores). Los datos se ajustaron a una curva de regresión no lineal para un único sitio de unión con competición con el programa informático GraphPad Prism usando la siguiente ecuación: $Y = \text{Inferior} + (\text{Superior} - \text{inferior}) / (1 + 10^{(X - \text{LogCE}_{50})})$

La Figura 1 muestra los resultados de la competición con T4 para la unión a TTR natural de los competidores: Tiroxina (T4), Tolcapona (SOM), Tafamidís (TAF) y (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG). Los resultados se muestran en forma de curvas de desplazamiento de T4 por TTR WT mediante los diferentes compuestos. A partir de cada curva de dosis-respuesta, se determinó el valor de la CE_{50} (concentración de inhibidor a la que se desplaza la mitad de la T4 unida) para cada compuesto. Además, también se calculó la potencia relativa de la inhibición de la unión de T4, definida como el cociente de CE_{50} (T4)/ CE_{50} (compuesto sometido a ensayo), y se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3: CE_{50} y potencia relativa de la inhibición de la unión de T4 por el fármaco

	CE_{50} nM	Potencia relativa de la inhibición de la unión de T4 por el fármaco
Tiroxina (T4)	50,11 nM	1
Tolcapona	41,85 nM	1,19
Tafamidís	214,4 nM	0,23
EGCG	-	Sin afinidad

Estos resultados demuestran que tolcapona y tafamidís presentan una afinidad de unión similar para TTR, mientras que EGCG no compite con T4 por la unión a TTR. La CE_{50} de tolcapona fue 4 veces inferior a la de tafamidís, lo que demuestra que tolcapona es más eficaz en su unión al tetrámero de TTR, lo que sugiere un mayor potencial antiamiloidogénico.

Ejemplo 4: Evaluación de la estabilidad tetramérica de TTR mediante centrado isoelectrónico (IEF)

Para evaluar el efecto de los compuestos sometidos a ensayo sobre la resistencia del tetrámero de TTR a la disociación, la estabilidad de TTR se evaluó mediante IEF en condiciones de semidesnaturalización tal como se ha descrito anteriormente (Ferreira *et al*, 2009, *FEBS Lett*, vol. 583, p. 3569-76). Las muestras se prepararon de la siguiente forma: 30 μ l de plasma humano procedente de controles y portadores de V30M de TTR se incubaron con 5 μ l de una solución 10 mM de compuestos de ensayo y compuestos de control (EGCG) durante una noche a 4 °C seguido de incubación durante 1 h a TA. Las preparaciones se sometieron a PAGE natural (acrilamida al 5 %) y la banda de gel que contenía el TTR se recortó y se aplicó a un gel IEF (acrilamida al 5 %). La IEF se llevó a cabo en condiciones de semidesnaturalización (urea 4 M), que contenía un 5 % (v/v) de anfolitos pH 4-6,5 (GE Healthcare), a 1200 V durante 6 horas. Las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie, se realizó un barrido de los geles y se sometieron a densitometría usando el programa ImageQuant (HP Scanjet 4470c, Hewlett Packard). En ausencia de cualquier compuesto, el TTR plasmático presentó un patrón de bandas característico, compuesto por un monómero, un monómero oxidado y varias bandas con un punto isoelectrónico (pI) inferior correspondiente a las diferentes formas de tetrámeros. Se analizaron un total de 12 muestras de plasma (5 controles y 7 portadores de V30M de TTR) en 3 geles de IEF. Para cada condición de tratamiento, se procesaron un mínimo de cuatro muestras de donantes diferentes. La relación de tetrámero de TTR frente al TTR total (tetrámero TTR + monómero) se calculó para cada muestra de plasma y se representó en la Figura 2. Esta relación suele ser más elevada para el plasma de individuos normales que para el plasma de portadores heterocigóticos de V30M de TTR, tal como se observa en la Figura 2. El tratamiento con tolcapona aumenta la cantidad de tetrámero de TTR respecto de las formas monoméricas en comparación con los plasmas de control sin tratar de TTR tanto normal como mutante; y en mayor grado que tafamidís.

El aumento de la relación de TTR tetramérica/total inducido por el tratamiento con los compuestos de ensayo se combinó para todas las muestras y se representó en la Tabla 4 como % de estabilización. Estos valores se calcularon después de normalizar la relación de TTR tetramérica/total obtenida para cada muestra, donde la relación obtenida para el plasma no tratado del correspondiente individuo donante se describe a continuación:

% estabilización = $100 \times (\text{relación muestra} - \text{relación nt}) / \text{relación nt}$. Donde "relación de la muestra" es la relación de TTR tetramérica/total en presencia de compuesto; y "relación nt" es la relación de TTR tetramérica/total de plasma no tratado del mismo donante.

Tabla 4. Estabilidad del tetrámero de TTR en presencia de compuestos

	% estabilización (promedio +/- etm)
Tolcapona	29,9 +/- 7,64
Tafamidís	16,4 +/- 5,49
EGCG	51,26 +/- 14,21

5 El tratamiento con un estabilizador de TTR tal como tafamidís o tolcapona aumenta la relación del tetrámero respecto de las formas monoméricas. Los resultados mostrados anteriormente demuestran claramente que tolcapona presenta un mejor efecto de estabilización sobre los tetrámeros de TTR que tafamidís.

Ejemplo 5: Ensayos de toxicidad celular

10 Para evaluar la toxicidad inducida por TTR y el efecto preventivo de los compuestos sometidos a ensayos, Células de schwannoma de rata (RN22, obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo ATCC), células confluentes al 80 % en medio esencial mínimo de Dulbecco con suero bovino fetal al 10 %, se expusieron durante 24 horas a 2 μ M de oligómeros Y78F de TTR. Estos oligómeros se obtuvieron por incubación de Y78F de TTR soluble tanto en ausencia como en presencia de un exceso 10x molar (concentración final 20 μ M) de compuestos de ensayo o control (EGCG) a 37 °C durante 6 días. A continuación, las células se tripsinizaron y los lisados celulares se utilizaron para la determinación de la activación de la caspasa-3 mediante el sistema de ensayo fluorométrico CaspACE en placas de 96 pocillos (Sigma). La concentración de proteína en los lisados se determinó con el kit de ensayo de proteínas Bio-Rad.

20 Los resultados obtenidos para la actividad de la caspasa 3 y la cuantificación de proteínas en cada pocillo de cultivo celular se representan en la figura 3. La adición extracelular de oligómeros de Y78F de TTR sin tratar (control, O1) aumentó los niveles intracelulares de la caspasa-3, y por tanto la muerte celular. Los oligómeros de Y78F de TTR obtenidos en la presencia de compuestos que inhiben la formación de especies oligoméricas tóxicas (O2-O4) produjeron niveles bajos de activación de caspasa 3 en las células RN22. La reducción en la toxicidad celular en presencia de los compuestos (expresada como 100- % relativo al control O1) se muestra en la tabla 5. Se puede observar que tolcapona mostró una mayor reducción de la citotoxicidad celular (29 %) en comparación con tafamidís (12 %).

Tabla 5. Reducción de la toxicidad celular en presencia de los compuestos

Tolcapona	29 %
Tafamidís	12 %
EGCG	50 %

Ejemplo 6: Alteración de fibrillas

35 Para estudiar el efecto de los compuestos de ensayo sobre la alteración de fibrillas de TTR, los inventores utilizaron fibrillas de TTR preformadas preparadas mediante incubación de una solución filtrada (filtros de 0,2 μ m) de L55P de TTR (2 mg/ml en PBS ~ 3,6 μ M) durante 15 días a 37 °C. Posteriormente, las muestras se incubaron bien en ausencia (control) o en presencia de un exceso molar 10x (36 μ M) (concentración final) de los compuestos de ensayo durante 4 días a 37 °C. El efecto de alteración se evaluó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y dispersión de luz dinámica (DLS) tal como se ha descrito anteriormente (Ferreira *et al*, 2009, *FEBS Lett*, vol. 583, p. 3569-76).

40 Se observó que la muestra de control de las fibrillas de TTR preformadas (control) está principalmente compuesta por grandes agregados y fibrillas (partículas con un diámetro superior a 1000 nm) y solo una pequeña cantidad de la proteína está en forma soluble (partículas de 10 nm de diámetro). A medida que las fibrillas se alteran mediante los compuestos de ensayo, la cantidad relativa de agregados grandes disminuye, y los agregados pequeños y las proteínas solubles aumentan (véase la figura 4).

La actividad de alteración de las fibrillas de cuantificó a partir de análisis por DLS como intensidad relativa (%) de los agregados y partículas solubles después de 4 días de tratamiento con 36 μ M de compuestos (tabla 6).

Tabla 6. Análisis por DLS de las fibrillas de TTR

	intensidad relativa (%)		
	Partículas solubles (~10 nm)	Agregados (~10-100 nm)	Agregados (~1000 nm)
Control	28,2	-	71,8
tolcapona	56,1	5,9	38
Tafamidís	35,2	6,7	58,1
EGCG	49,1	26,3	24,6

Se puede observar que las muestras tratadas con tolcapona dan como resultado una mayor cantidad de pequeños

agregados y proteínas solubles, mostrando de esta forma una importante actividad de alteración. Los resultados también muestran que tolcapona tiene una mayor actividad de alteración de las fibrillas que tafamidís.

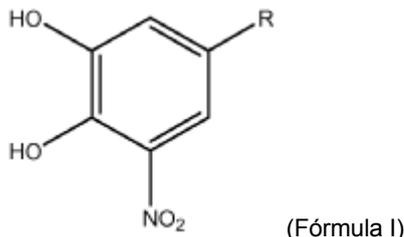
5 Los resultados obtenidos en los experimentos 1-6 demuestran claramente que tolcapona tiene una elevada actividad inhibidora de la formación de fibrillas amiloides de TTR y que dicha actividad inhibidora es mayor que la de tafamidís, que se ha descrito para el tratamiento de la PAF. Además, tolcapona puede alterar las fibrillas amiloides de TTR preformadas de una forma más eficaz que el tafamidís. En su conjunto, los resultados indican que tolcapona se puede utilizar eficazmente como un medicamento para el tratamiento de todos los tipos de amiloidosis asociadas con TTR.

10

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

5



en la que R se selecciona del grupo que consiste en $-C(O)-PhCH_3$, $-CH=C(CN)-C(O)-NEt_2$ y $-CH=C(C(O)(CH_3)_2)$, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la amiloidosis asociada a transtirretina.

10

2. El inhibidor de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el inhibidor de COMT es tolcapona o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

15

3. El inhibidor de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la amiloidosis asociada a transtirretina es la polineuropatía amiloide familiar.

4. El inhibidor de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la amiloidosis asociada con transtirretina es la amiloidosis sistémica senil.

20

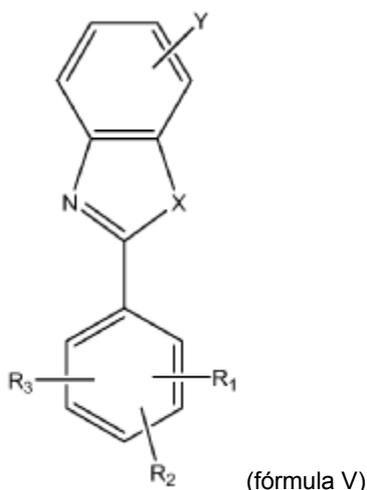
5. El inhibidor de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la amiloidosis asociada con transtirretina es la amiloidosis leptomeníngea.

25

6. El inhibidor de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la amiloidosis asociada a transtirretina es la cardiomiopatía amiloide familiar.

30

7. Un inhibidor de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) tal como se ha definido en la reivindicación 1 para su uso en la prevención y/o el tratamiento de amiloidosis asociada con la transtirretina en una terapia de combinación con un agente terapéutico adicional seleccionado entre el grupo que consiste en otro inhibidor de COMT tal como se ha definido en la reivindicación 1, un derivado de benzoxazol, yododiflunisal, diflunisal, resveratrol, ácido tauroursodesoxicólico, doxociclina y epigalocatequina-3-galato, en el que el derivado de benzoxazol es un compuesto de fórmula V



35

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que:

Y se selecciona entre el grupo que consiste en COOR, tetrazolilo, CONHOR, $B(OH)_2$ y OR;

X es O; y

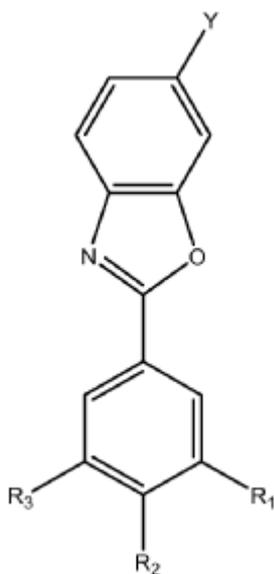
R^1 , R^2 y R^3 se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, halo, OR, $B(OH)_2$ y CF_3 , y en la que

40

R se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_6 , alqueniilo C_1-C_6 , alquiniilo C_1-C_6 , cicloalquilo $-C_1-C_6$, heterociclilo C_1-C_6 , fenilo, xililo, naftilo, tienilo, indolilo y piridilo.

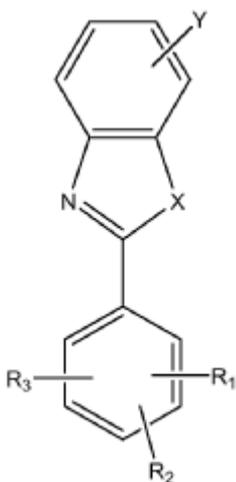
8. El inhibidor de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el

derivado de benzoxazol es un compuesto de fórmula VI



Fórmula VI

- 5 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que:
 Y se selecciona entre el grupo que consiste en COOH y OH; y
 R¹, R² y R³ se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, halo, OH, B(OH)₂ y CF₃.
- 10 9. El inhibidor de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en el que el derivado de benzoxazol es tafamidís.
10. El inhibidor de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el inhibidor de COMT se administra como una forma farmacéutica inyectable, como una forma farmacéutica oral o como forma farmacéutica de liberación controlada.
- 15
11. Una combinación de un inhibidor de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) como se ha definido en la reivindicación 1, y un agente terapéutico adicional seleccionado entre el grupo que consiste en otro inhibidor de COMT como se ha definido en la reivindicación 1, un derivado de benzoxazol, yododiflunisal, diflunisal, resveratrol, ácido tauroursodesoxicólico, doxociclina y epigalocatequina-3-galato, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la amiloidosis asociada a transtirretina, en el que el derivado de benzoxazol es un compuesto de fórmula V
- 20

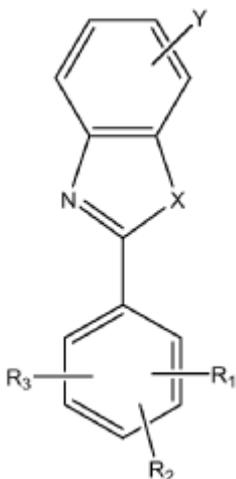


(fórmula V)

- 25 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que:
 Y se selecciona entre el grupo que consiste en COOR, tetrazolilo, CONHOR, B(OH)₂ y OR;
 X es O; y
 R¹, R² y R³ se seleccionan cada uno independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, halo, OR, B(OH)₂ y CF₃, y en el que

R se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₆, alqueno C₁-C₆, alquino C₁-C₆, cicloalquilo C₁-C₆, heterociclilo C₁-C₆, fenilo, xililo, naftilo, tienilo, indolilo y piridilo.

- 5 12. Un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un derivado de benzoxazol, yododiflunisal, diflunisal, resveratrol, ácido tauroursodesoxicólico, doxociclina y epigalocatequina-3-galato, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de amiloidosis asociada con la transtirretina en una terapia de combinación con un inhibidor de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) como se ha definido en la reivindicación 1, en el que el derivado de benzoxazol es un compuesto de fórmula V



10

(fórmula V)

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que:

Y se selecciona entre el grupo que consiste en COOR, tetrazolilo, CONHOR, B(OH)₂ y OR;

X es O; y

- 15 R¹, R² y R³ se seleccionan cada uno independientemente entre hidrógeno, halo, OR, B(OH)₂ y CF₃, y en el que R se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₆, alqueno C₁-C₆, alquino C₁-C₆, cicloalquilo C₁-C₆, heterociclilo C₁-C₆, fenilo, xililo, naftilo, tienilo, indolilo y piridilo.

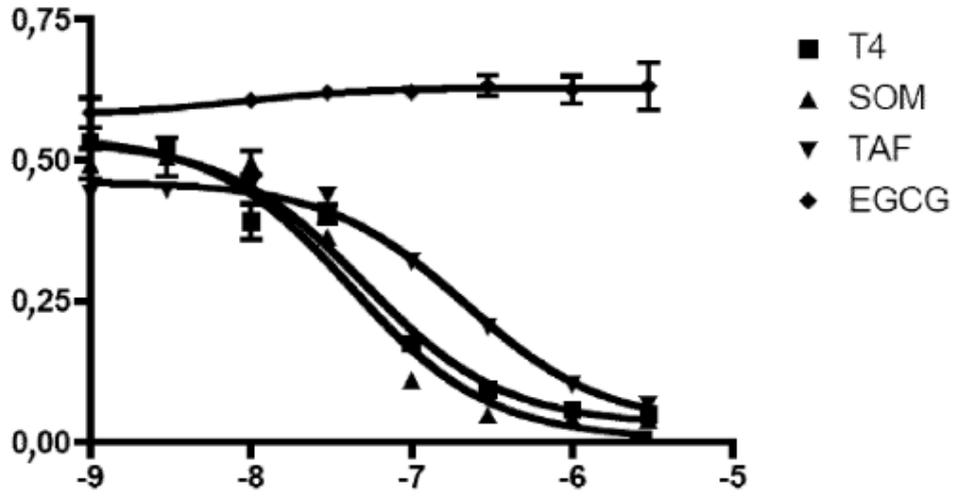


Figura 1

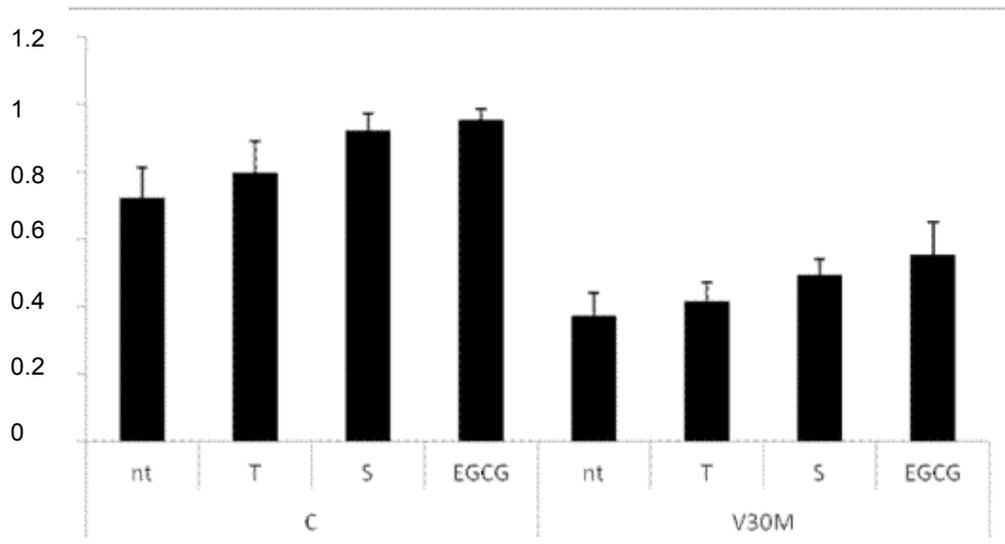


Figura 2

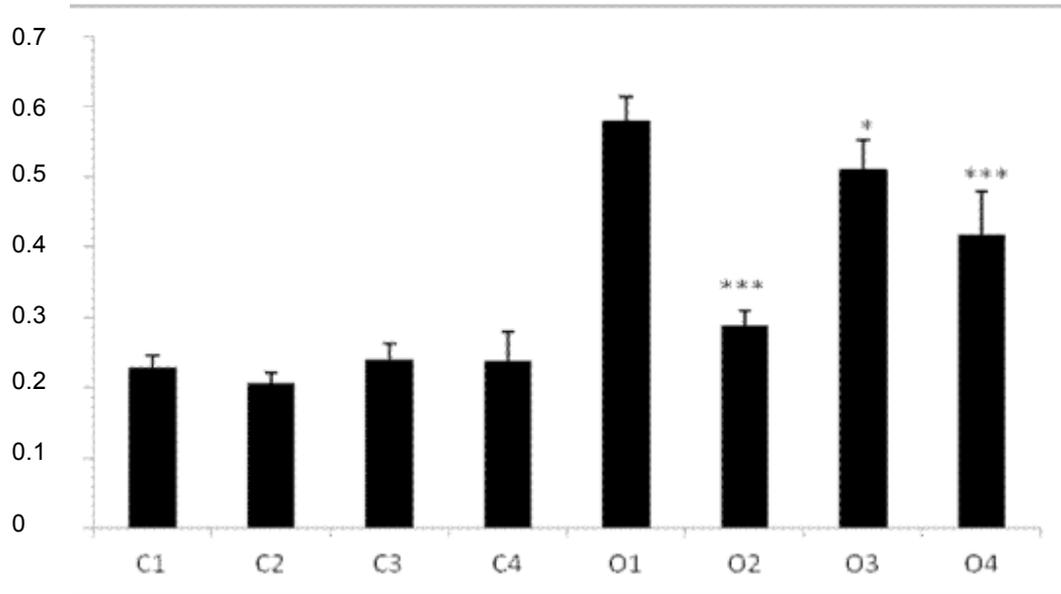


Figura 3

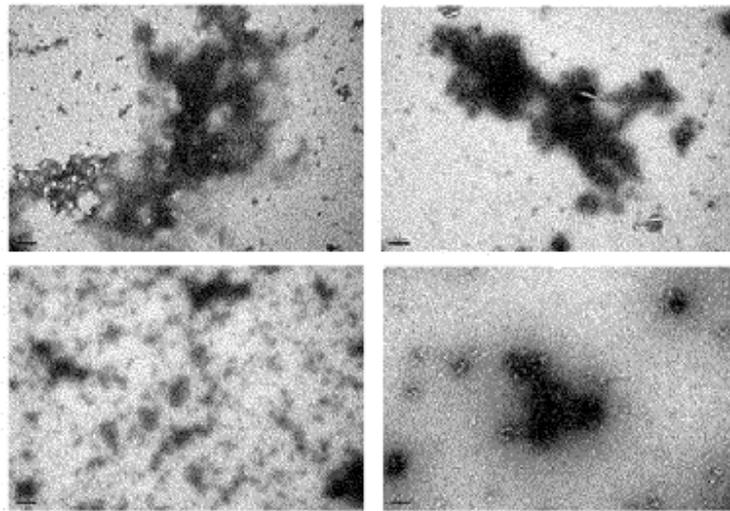


Figura 4