

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 994**

51 Int. Cl.:

A61K 31/415 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

C07D 237/08 (2006.01)

C07D 231/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2013 PCT/US2013/076213**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14100227**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2013 E 13866060 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 2934514**

54 Título: **Estabilizadores de transtiretina y su uso para inhibir amiloidosis por transtiretina e interacciones proteína-proteína**

30 Prioridad:

21.12.2012 US 201261745089 P
14.03.2013 US 201313830731

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.10.2018

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (100.0%)
1705 El Camino Real
Palo Alto CA 94306-1106, US**

72 Inventor/es:

**GRAEF, ISABELLA, A. y
ALHAMADSHEH, MAMOUN, M.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 683 994 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

Estabilizadores de transtiretina y su uso para inhibir amiloidosis por transtiretina e interacciones proteína-proteína

5 REFERENCIA CRUZADA

INTRODUCCIÓN

La agregación proteica subyace a una gran cantidad de trastornos humanos, que incluyen algunas de las enfermedades más comunes observadas en la población que envejece, que incluyen amiloidosis sistémica y del SNC (Selkoe y col., *Nat Cell Biol* 6: 1054-1061 (2004); Falk et al., *N. Engl. J. Med.* 337: 898-909 (1997)). Recientemente, este proceso también ha sido implicado como un mecanismo importante en la senescencia celular (Haigis et al., *Mol Cell* 40: 333-344 (2010)). La agregación de péptidos o proteínas asociadas a la enfermedad puede ocurrir en diferentes compartimentos subcelulares y afectar tejidos específicos o diseminarse sistémicamente (Stefani et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1739: 5-25 (2004)). Los datos de los modelos biofísicos, celulares y animales indican que una serie de factores genéticos y ambientales contribuyen al plegamiento incorrecto, la agregación y la formación de fibrillas amiloides (amiloidogénesis) in vivo de proteínas. Se cree que el plegamiento incorrecto de proteínas y la formación de amiloide están íntimamente relacionados con los mecanismos patológicos de las enfermedades amiloides humanas basadas en la citotoxicidad demostrada de la proteína agregada in vitro. Una serie de observaciones en pacientes también indican que la formación de amiloide está íntimamente ligada a la patogénesis de la enfermedad. Dichas observaciones incluyen: niveles más bajos de amiloide observados en el SNC de controles emparejados por edad en relación con pacientes con enfermedad de Alzheimer y la correlación de mejoría de la salud con el aclaramiento de amiloide en pacientes con polineuropatía amiloide familiar (FAP), tras un trasplante hepático para reemplazar el TTR mutante por TTR salvaje. Por lo tanto, hay un gran interés en identificar formas de prevenir los cambios conformacionales que resultan en la formación de fibrillas de amiloide.

La transtiretina (TTR o prealbúmina) es una de más de 30 proteínas cuya agregación puede causar enfermedad (Selkoe et al., *Nature* 426: 900-904 (2003); Reixach y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 2817-2822 (2004)). TTR es una proteína de 127 aminoácidos, rica en láminas β , que forma un homotetrámero que se sintetiza principalmente en el hígado y se secreta en la sangre. Usando superficies de unión ortogonales, TTR se une tanto a la tiroxina (T_4) como a la proteína de unión a holo retinol (RBP). TTR es el principal transportador de RBP, pero debido a la presencia de otras dos proteínas de transporte T_4 , es solo un soporte de respaldo para T_4 en humanos (<1% de T_4 unido). Las dos bolsas de unión a T_4 , que permanecen en gran medida desocupadas en humanos, están formadas por la interfaz dímero-dímero más débil (Connelly et al., *Curr Opin Struct Biol* 20: 54-62 (2010)). Cada uno de los dos sitios de enlace T_4 creados por la interfaz dímero-dímero del homotetrámero TTR constan de un subsitio de unión externa, un subsitio de unión interna y una interfaz intermedia que se compone de pares de depresiones hidrofóbicas simétricas denominadas bolsillos de unión de halógeno (HBP), en los que residen los átomos de yodo de T_4 (Wojtczak y col., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 52 pp 758-765 (1996)). La disociación del tetrámero de TTR en la interfase de unión a T_4 , que genera dímeros que se disocian rápidamente en monómeros amiloidogénicos, es la etapa limitante de la velocidad durante el plegamiento incorrecto de TTR y la formación de amiloide.

Hay más de 100 mutaciones amiloidogénicas conocidas en TTR, que se segregan en grupos étnicos y geográficos (Saraiva et al., *Hum Mutat* 5: 191-196 (1995); Connors et al., *Amyloid* 10: 160-184 (2003)). Mutaciones puntuales en TTR promueve la amiloidogénesis de TTR disminuyendo la estabilidad termodinámica de TTR o disminuyendo la barrera cinética para la disociación de tetrámeros, o ambas (Connelly et al., *Curr Opin Struct Biol* 20: 54-62 (2010)). Estas mutaciones conducen a amiloidosis TTR hereditaria, como la polineuropatía amiloidea familiar (FAP) y la miocardiopatía amiloidea familiar (FAC), que son condiciones autosómicas dominantes con diferentes edades de aparición y penetrancia según el origen étnico. Una de las mutaciones de TTR causantes de FAP clínicamente más importantes es la desestabilización termodinámica de Val30Met TTR (V30M) (Coelho *Curr Opin Neurol* 9: 355-359 (1996)). Sin embargo, la lenta velocidad de disociación tetrámera (comparable a la de TTR de tipo salvaje) limita la concentración en estado estacionario del monómero amiloidogénico desestabilizado, lo que podría explicar la penetrancia incompleta de la mutación V30M en poblaciones no portuguesas. La variante de TTR más común con afectación cardíaca casi exclusiva es la mutación V122I cinéticamente desestabilizadora. Aunque el monómero V122I-TTR tiene una estabilidad similar al monómero de tipo silvestre (WT-TTR), el tetrámero se disocia 3 veces más rápido bajo condiciones fisiológicas y pueden explicar la mayor penetración de la mutación V121I (Jiang y col., *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 14943-14948 (2001)). Este alelo ocurre en 3-4% de los afroamericanos (~1,3 millones de personas) y se presume que contribuye a la mayor prevalencia de insuficiencia cardíaca entre los afroamericanos (Jacobson et al., *N Engl J Med* 336: 466-473 (1997); Connors y col., *Am Heart J* 158: 607-614 (2009); Buxbaum y col., *Am Heart J* 159: 864-870 (2010)). La agregación WT-TTR subyace al desarrollo de la amiloidosis sistémica senil (SSA), un estado que afecta hasta 10-20% de la población mayor de 65 años.

Las interacciones proteína-proteína (PPI) son un mecanismo regulador clave para una serie de procesos celulares fisiológicos y patológicos que los convierten en objetivos principales para la intervención terapéutica. Aunque los anticuerpos terapéuticos que bloquean los IBP son el segmento de mayor crecimiento del mercado de medicamentos recetados, no se han aprobado terapias de moléculas pequeñas para esta importante clase objetivo. La mayoría de los PPI involucran interfaces grandes, en muchos casos más grandes de 1.500 Å² (hasta 4.500 Å²) en

el que la afinidad se obtiene por una multitud de interacciones a menudo débiles. Como consecuencia estas interacciones ampliamente espaciadas son difíciles de imitar con moléculas pequeñas. La antagonización de los PPI con compuestos orgánicos pequeños es un desafío por varias razones: 1) una superficie grande, a menudo plana, está enterrada a cada lado de la interfaz, 2) la falta de cavidades profundas, 3) la naturaleza de bibliotecas de pequeñas moléculas. Por lo tanto, muchos PPI han llegado a ser considerados "no drogables". Muchos objetivos de PPI extracelulares han sido validados mediante el uso de anticuerpos u otros antagonistas de proteínas, algunos de los cuales se han convertido en fármacos de gran éxito. Los ejemplos son TNF α , IL2, IL4, IL13, VEGF, IFN α , SDF-1, CD4, MET, HER1 y 2.

El desarrollo de biosensores fluorescentes y/o luminiscentes se ha convertido en una poderosa herramienta para el monitoreo de biomoléculas in vitro e in vivo. La transferencia de energía de resonancia de Forster (FRET) es un método que mide la transferencia de energía dependiente de la distancia entre dos cromóforos, uno el donante y el otro el aceptor. El donante, después de la excitación por la luz, puede transmitir energía al aceptor a través de una interacción de dipolo inducida por dipolo inducido. La eficiencia de la transferencia de energía depende de la sexta potencia de la distancia entre los tintes. En general, el aceptor debe estar a una distancia de 10-80 Å del donante para una transferencia de energía eficiente. FRET es una técnica útil porque las mediciones pueden estar bajo condiciones fisiológicas y es uno de los mecanismos de detección más ampliamente utilizados para sondas fluorescentes ratiométricas. Permite la investigación de las interacciones proteína/proteína y ha demostrado ser un método robusto para la investigación de la dinámica de la composición del complejo proteico y estequiometría.

SUMARIO

En la presente memoria se describen compuestos y composiciones de los mismos, que encuentran uso para aumentar la estabilidad de proteínas, particularmente proteínas que pueden plegarse mal y formar agregados. También se proporcionan en la presente memoria métodos para usar estos compuestos y composiciones para aumentar la estabilidad de las proteínas y, por lo tanto, disminuir la formación de agregados por estas proteínas. También se describen en la presente memoria compuestos heterobifuncionales que incluyen un compuesto de unión a TTR conectado a un resto objetivo a través de un enlazador, para uso en la interrupción de los PPI de una proteína diana. También se describe en la presente memoria compuestos marcados que se unen a la bolsa T₄ de TTR, que se usan para determinar la concentración de TTR estabilizado y/o tetramérico, por cualquiera de las dos mediciones la etiqueta retenida y/o medición de la transferencia de energía dependiente de la distancia entre el compuesto etiquetado unido a la bolsa de unión de T₄ y un compuesto y/o péptido y/o proteína marcados unidos a una superficie de unión ortogonal en el tetramero de TTR.

En la presente memoria se proporcionan métodos para usar los compuestos descritos para aumentar la estabilidad de TTR y/o TTR tetramérico, evitando así que se plegue mal y forme fibrillas de amiloide TTR.

Los estabilizadores de TTR descritos en la presente memoria se pueden usar para disminuir la formación de amiloide de TTR y/o para disminuir la disfunción celular y/o muerte asociada con la formación de amiloide de TTR. Los estabilizadores de TTR se pueden usar para disminuir la formación de amiloide TTR in vitro en un sistema libre de células, in vitro, intra o extracelularmente en cultivo celular, e in vivo, como TTR encontrados en fluidos corporales que incluyen, pero no se limitan a, sangre, suero, líquido cefalorraquídeo, tejido y órganos incluidos, entre otros, el corazón, el riñón, nervios periféricos, meninges, el sistema nervioso central, el ojo (incluida la retina y el fluido vítreo) de un sujeto. Como tales, los métodos para usar los compuestos descritos incluyen administrar los compuestos descritos in vitro, ex vivo o a un sujeto in vivo para aumentar la estabilidad de TTR encontrada en fluidos corporales que incluyen, pero no se limitan a, sangre, suero, fluido cerebroespinal, tejidos y órganos incluyendo pero no restringido al corazón, el riñón, nervios periféricos, meninges, el sistema nervioso central, los ojos.

También se proporciona en la presente memoria un compuesto para usar en un método para el tratamiento, prevención, retraso o mejora de uno o más síntomas de amiloidosis de TTR así como el método que implica la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto proporcionado en la presente memoria. En una realización, el compuesto evita la disociación de un tetramero de transtiretinas mediante la estabilización cinética del tetramero de TTR. Las enfermedades de amiloide TTR incluyen, pero no están limitadas a polineuropatía amiloide familiar, miocardiopatía amiloide familiar, amiloide leptomeníngeo, amiloidosis oculoleptomeningial, amiloidosis sistémica senil, amiloidosis vítrea, amiloidosis del SNC, hipertiroxinemia eutiroides familiar. Otras enfermedades amiloides incluyen, pero no se limitan a, amiloidosis ocular, amiloidosis gastrointestinal, amiloidosis neuropática, amiloidosis no neuropática, nefropatía, amiloidosis no hereditaria, amiloidosis reactiva/secundaria, amiloidosis cerebral, enfermedad de Alzheimer, encefalopatía espongiiforme (es decir, enfermedad de Creutzfeldt Jakob, GSS, insomnio familiar fatal), demencia frontotemporal, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), síndrome de Down, esclerosis múltiple, polineuropatía, síndrome de Guillain-Barré, degeneración macular, opacidades vítreas, glaucoma, diabetes tipo II y carcinoma medular tiroideo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS.

La figura 1 ilustra la evaluación de la unión de ligandos (compuesto VIIc, compuesto A y tafamidis) a TTR en tampón mediante polarización de fluorescencia. La figura 1 representa ligandos TTR (10 mM) que desplazan

competitivamente la sonda FP 5 (0,2 mM) desde TTR (0,4 mM) a través de la unión a los sitios de unión a T₄ (cuanto menor es la unión de la sonda, mayor es la afinidad de unión del ligando de TTR).

La figura 2 representa la competencia de la sonda FP 5 a partir de TTR aumentando las concentraciones (0,003 a 100 mM) del compuesto VIIc ($K_{app} = 193$ nM, $R^2 = 0,994$) y tafamidis ($K_{app} = 247$ nM, $R^2 = 0,990$). Cada punto muestra la media +/- SD de tres réplicas

La figura 3 representa la evaluación de la afinidad de unión del compuesto VIIc, compuesto A y tafamidis a TTR mediante calorimetría de valoración isotérmica. (A) Titulación calorimétrica del compuesto VIIc contra TTR ($K_{d1} = 4,8$ nM y $K_{d2} = 314$ nM). (B) Titulación calorimétrica del compuesto A frente a TTR ($K_{d1} = 58$ nM y $K_{d2} = 500$ nM). (C) Titulación calorimétrica de tafamidis frente a TTR ($K_{d1} = 4,4$ nM y $K_{d2} = 280$ nM). Datos brutos (arriba) y calores integrados (abajo) de la titulación de TTR (2 mM) con compuestos de prueba (25 μ M).

La figura 4 representa el cambio de fluorescencia debido a la modificación de TTR en suero humano mediante la sonda covalente 6. (A) Monitorizada durante 6 h en presencia de sonda sola (círculos negros) o sonda y ligandos TTR (compuesto VIIc, compuesto A y tafamidis) (colores). (B) Porcentaje de sonda covalente 6 que se une a TTR en presencia de ligandos (compuesto VIIc, compuesto A y tafamidis) medido después de 6 horas de incubación, con respecto a la sonda sola (cuanto menor sea la unión de la sonda, mayor será la selectividad de unión del ligando a TTR). Cada barra muestra la media +/- SD de tres réplicas.

La figura 5 representa la estabilización de WT-TTR en suero frente a la desnaturalización mediada por ácido en (A) la presencia de 10 microM compuesto VIIc, compuesto A y tafamidis, (B) la presencia del intervalo de concentración (0,1 a 10 microM) de compuesto VIIc y tafamidis. Las muestras de suero se incubaron en tampón de acetato (pH 4,0), con DMSO o 10 μ M del compuesto de prueba, durante el período de tiempo deseado (0 y 72 horas) antes del entrecruzamiento, SDS-PAGE e inmunotransferencia. La densidad de todas las bandas TTR (tetrámero TTR, punta de flecha y TTR unido a RBP, flecha sólida) se cuantificó utilizando un sistema de imágenes infrarrojas Odyssey (LI-COR Bioscience, Lincoln, NE) y se informó como % tetrámero TTR = $100 \times [(\text{tetrámero} \& \text{ tetrámero} + \text{ densidad RBP, 72 h}) / (\text{tetrámero y tetrámero} + \text{ densidad RBP de DMSO, 0 h})]$. Cada barra muestra la media +/- SD de tres réplicas.

Las figuras 6A-6B ilustran la estabilización de V122I-TTR en suero de dos pacientes con FAC frente a la desnaturalización mediada por ácido en presencia de compuesto VIIc y tafamidis. Las muestras de suero se incubaron en tampón de acetato (pH 4,0), con DMSO o 10 μ M de tafamidis y compuesto VIIc, durante el período de tiempo deseado (0 y 72 horas) antes del entrecruzamiento, SDS-PAGE e inmunotransferencia. Cada barra muestra la media +/- SD de tres réplicas.

La figura 7 representa la evaluación de la citotoxicidad del compuesto VIIc, compuesto A y tafamidis en concentraciones de 1 a 100 μ M, en cuatro líneas celulares diferentes: Hep3B: línea celular de hepatoma humano; Jurkat: línea celular de linfocitos T; MCF7: línea celular de cáncer de mama HeLa: línea celular de cáncer de cuello uterino; La viabilidad celular se evaluó usando el ensayo de MTT después de 24 h. Los resultados de viabilidad celular se informan en relación con las células tratadas solo con vehículo (100% de viabilidad celular). Cada barra muestra la media +/- SD de tres réplicas.

La figura 8 muestra la afinidad de unión y la selectividad de los compuestos de prueba a TTR por su capacidad para competir por sonda 6 covalente que se une a TTR en suero humano.

DEFINICIONES

"En combinación con" como se usa en la presente memoria se refiere a usos en los que, por ejemplo, se administra el primer compuesto durante todo el curso de administración del segundo compuesto; donde el primer compuesto se administra durante un período de tiempo que se solapa con la administración del segundo compuesto, p. ej. donde la administración del primer compuesto comienza antes de la administración del segundo compuesto y la administración del primer compuesto finaliza antes de que termine la administración del segundo compuesto; donde la administración del segundo compuesto comienza antes de la administración del primer compuesto y la administración del segundo compuesto finaliza antes del final de la administración del primer compuesto; donde comienza la administración del primer compuesto antes de que comience la administración del segundo compuesto y la administración del segundo compuesto finaliza antes de que termine la administración del primer compuesto; donde comienza la administración del segundo compuesto antes de que comience la administración del primer compuesto y la administración del primer compuesto finaliza antes de que termine la administración del segundo compuesto. Como tal, "en combinación" también se puede referir a un régimen que implica la administración de dos o más compuestos. "En combinación con" como se usa en la presente memoria también se refiere a la administración de dos o más compuestos que pueden administrarse en la misma formulación o en diferentes formulaciones, por la misma de diferentes rutas, y en el mismo o diferente tipo de forma de dosificación.

El término "compuesto aislado" significa un compuesto que se ha separado significativamente de otros compuestos con los que se produce en la naturaleza o durante la síntesis química, o está enriquecido con respecto a ellos. Los compuestos aislados son usualmente al menos aproximadamente 80% puros, o al menos aproximadamente 90% puros, al menos aproximadamente 98% puros, o al menos aproximadamente 99% puros, en peso. La presente invención pretende abarcar diastereómeros así como sus formas racémicas y resueltas, enantioméricamente puras y sus sales farmacéuticamente aceptables.

"Tratar" o "tratamiento" de una afección o enfermedad incluye: (1) prevenir, mejorar o alterar al menos un síntoma de las afecciones de una manera beneficiosa, es decir, causar un síntoma clínico que no se desarrolle significativamente en un mamífero que pueda ser expuesto o predispuesto a la enfermedad, pero aún no experimenta o muestra síntomas de la enfermedad, (2) inhibir la enfermedad, es decir, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o sus síntomas, o (3) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o sus síntomas clínicos. Como se usa en la presente memoria, la mejora de los síntomas de un trastorno particular mediante la administración de un compuesto o composición farmacéutica particular se refiere a cualquier disminución, ya sea permanente o temporal, duradera o transitoria que puede atribuirse o asociarse con la administración de la composición.

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad eficaz" significa la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un mamífero u otro sujeto para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar dicho tratamiento para la enfermedad. La "cantidad terapéuticamente efectiva" variará dependiendo del compuesto, la enfermedad y su gravedad y la edad, peso, etc., del sujeto a tratar.

Los términos "sujeto" y "paciente" significan un mamífero que puede necesitar los métodos, las composiciones y los tratamientos farmacéuticos descritos en la presente memoria. Los sujetos y pacientes incluyen por lo tanto, sin limitación, primates (incluidos humanos), caninos, felinos, ungulados (por ejemplo, equino, bovino, porcino (por ejemplo, cerdo)) y otros sujetos. Los seres humanos y los animales no humanos que tienen importancia comercial (por ejemplo, ganado y animales domésticos) son de particular interés.

"Mamífero" significa un miembro o miembros de cualquier especie de mamífero, e incluye, a modo de ejemplo, caninos; felinos; equinos; bovinos; ovinos; roedores, etc. y primates, particularmente humanos. Modelos de animales no humanos, en particular mamíferos, p. ej. primates, murinos, lagomorfos, etc. pueden usarse para investigaciones experimentales.

El término "forma de dosificación unitaria", como se usa en la presente memoria, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuestos de la presente invención calculado en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente, vehículo o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las especificaciones para las nuevas formas de dosificación unitaria de la presente invención dependen del compuesto particular empleado y del efecto a lograr, y la farmacodinamia asociada con cada compuesto en el huésped.

El término "condiciones fisiológicas" pretende abarcar aquellas condiciones compatibles con células vivas, por ejemplo, condiciones predominantemente acuosas de una temperatura, pH, salinidad, etc. que son compatibles con las células vivas.

Un "excipiente farmacéuticamente aceptable", "diluyente farmacéuticamente aceptable", "vehículo farmacéuticamente aceptable" y "adyuvante farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente, diluyente, vehículo y adyuvante que son útiles para preparar una composición farmacéutica que generalmente son seguros, no tóxicos, ni biológicamente ni de otro modo indeseables, e incluyen un excipiente, diluyente, transportador y adyuvante que son aceptables para uso veterinario, así como uso farmacéutico humano. "Un excipiente, diluyente, vehículo y adyuvante farmacéuticamente aceptable" como se usa en la memoria descriptiva y reivindicaciones incluye tanto uno como más de uno de tales excipientes, diluyentes, vehículos y adyuvantes.

Como se usa en la presente memoria, una "composición farmacéutica" pretende abarcar una composición adecuada para la administración a un sujeto, tal como un mamífero, especialmente un ser humano. En general, una "composición farmacéutica" es preferiblemente estéril, y está libre de contaminantes que son capaces de provocar una respuesta indeseable dentro del sujeto (por ejemplo, el (los) compuesto (s) en la composición farmacéutica es de calidad farmacéutica). Las composiciones farmacéuticas se pueden diseñar para administración a sujetos o pacientes que lo necesiten a través de varias rutas de administración diferentes que incluyen oral, bucal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, intratraqueal y similares.

Como se usa en el presente documento, los "derivados farmacéuticamente aceptables" de un compuesto de la invención incluyen sales, ésteres, enol éteres, enolésteres, acetales, cetales, ortoésteres, hemiacetales, hemicetales, ácidos, bases, solvatos, hidratos o profármacos de los mismos. Dichos derivados se pueden preparar fácilmente por los expertos en esta técnica usando métodos conocidos para tal derivatización. Los compuestos producidos se pueden administrar a animales o humanos sin efectos tóxicos significativos y son farmacéuticamente activos o son profármacos.

Como se usa en la presente memoria, los derivados farmacéuticamente aceptables de un compuesto incluyen sales, ésteres, enol éteres, enol ésteres, acetales, cetales, ortoésteres, hemiacetales, hemicetales, solvatos, hidratos o profármacos de los mismos. Tales derivados se pueden ser preparar fácilmente por los expertos en esta técnica usando métodos conocidos para tal derivatización. Los compuestos producidos se pueden administrar a animales o humanos sin efectos tóxicos sustanciales y son farmacéuticamente activos o son profármacos.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" de un compuesto significa una sal que es farmacéuticamente aceptable y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto original. Dichas sales incluyen: (1) sales de adición de ácido, formada con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares; o formada con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, benzoico ácido, ácido 3- (4-hidroxibenzoil) benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etanodisulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 4-clorobenceno nesulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-tolueno sulfónico, ácido canforsulfónico, ácido glucoheptonico, ácido 4,4'-metilenolen- (3-hidroxi-2-eno-1-carboxílico), ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciario, ácido laurilsulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico y similares; o (2) sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto original o bien se reemplaza por un ion metálico, por ejemplo, un ion de metal alcalino, un ion alcalinotérreo o un ion de aluminio; o se coordina con una base orgánica como la etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina y similares.

Sales farmacéuticamente aceptables también pueden incluir, pero sin limitación, sales de amina, tales como, pero sin limitarse a ellas, N, N'-dibenciletildiamina, cloroprocaina, colina, amoníaco, dietanolamina y otras hidroxialquilaminas, etilendiamina, N-metilglucamina, procaína, N-bencilfenetilamina, 1-para-clorobencil-2-pirrolidin-1'-ilmetilo-bencimidazol, dietilamina y otras alquilaminas, piperazina y tris (hidroximetil) aminometano; sales de metales alcalinos, tales como, pero sin limitación, litio, potasio y sodio; sales de metales alcalinotérreos, tales como, pero sin limitación, bario, calcio y magnesio; sales de metales de transición, tales como, pero sin limitación, zinc; y otras sales metálicas, tales como, aunque sin limitación, hidrogenofosfato de sodio y fosfato de disodio; y también incluyendo, pero no limitado a, sales de minerales ácidos, tales como, pero sin limitación, hidroclouros y sulfatos; y sales de ácidos orgánicos, tales como, entre otros, acetatos, lactatos, malatos, tartratos, citratos, ascorbatos, succinatos, butiratos, valeratos y fumaratos. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales ácidas tales como acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, canforato, canforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etansulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidrocloruro, hidrobromuro, hidruroyoduro, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenil-propionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, sintalato y undecanoato; sales básicas que incluyen sales de amonio, sales de metales alcalinos, tales como sales de sodio y potasio, sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de calcio y magnesio, sales con bases orgánicas, tales como sales de dicitlohexilamina, N-metil-D-glucamina y sales con aminoácidos tales como arginina, lisina, etc. Además, grupos que contienen bases nitrogenadas se pueden cuaternizar con agentes tales como haluros de alquilo inferior, tales como cloruro, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; dialquil sulfatos, tales como dimetil, dietil, dibutil y diamil sulfatos, haluros de cadena larga tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo, haluros de aralquilo, tales como bromuros de bencilo y fenetilo y otros. De este modo se obtienen productos solubles o dispersables en agua o aceite.

Esteres farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no están limitados a, ésteres de alquilo, alquenilo, alquinilo y cicloalquilo de grupos ácidos, que incluyen, pero no se limitan a, ácidos carboxílicos, ácidos fosfóricos, ácidos fosfínicos, ácidos sulfónicos, ácidos sulfínicos y ácidos borónicos.

Enoléteres farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, derivados de fórmula $C=C(OR)$ donde R es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo o cicloalquilo. Los enolésteres farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, derivados de fórmula $C=C(OC(O)R)$ donde R es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo o cicloalquilo. Solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables son complejos de un compuesto con una o más moléculas de disolvente o agua, de 1 a aproximadamente 100, o de 1 a aproximadamente 10, o de 1 a aproximadamente 2, 3 o 4, moléculas de disolvente o agua.

Un "solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable" de un compuesto de la invención significa un complejo de solvato o hidrato que es farmacéuticamente aceptable y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto precursor, e incluye, pero no se limita a, complejos de un compuesto de la invención con una o más moléculas de disolvente o agua, o de 1 a aproximadamente 100, o de 1 a aproximadamente 10, o de 1 a aproximadamente 2, 3 o 4, moléculas de disolvente o agua.

El término "grupo orgánico" y "radical orgánico" como se usa en este documento significa cualquier grupo que contiene carbono, que incluye grupos hidrocarbonados que están clasificados como un grupo alifático, grupo cíclico, grupo aromático, derivados funcionalizados del mismo y/o varias combinaciones de los mismos. El término "grupo alifático" significa un grupo hidrocarburo lineal o ramificado saturado o insaturado y abarca grupos alquilo, alquenilo y alquinilo, por ejemplo. El término "grupo alquilo" significa un grupo o cadena de hidrato de carbono lineal o ramificado saturado, sustituido o no sustituido (por ejemplo, C1 a C8) que incluye, por ejemplo, metilo, etilo, isopropilo, terc-butilo, heptilo, isopropilo, n-octilo, dodecilo, octadecilo, amilo, 2-etilhexilo, y similares. Sustituyentes

adecuados incluyen carboxi, carboxi protegido, amino, amino protegido, halo, hidroxilo, hidroxilo protegido, nitro, ciano, amino monosustituido, amino monosustituido protegido, amino disustituido, alcoxi C₁ a C₇, acilo C₁ a C₇, aciloxi C₁ a C₇ y similares. El término "alquilo sustituido" significa el grupo alquilo definido anteriormente sustituido de una a tres veces por un hidroxilo, hidroxilo protegido, amino, amino protegido, ciano, halo, triflorometilo, amino monosustituido, amino di-sustituido, alcoxi inferior, alquiltio inferior, carboxi, carboxi protegido, o un carboxi, amino, y/o sal hidroxilo. Como se usa en conjunción con los sustituyentes para los anillos de heteroarilo, los términos "(cicloalquil) alquilo sustituido" y "cicloalquilo sustituido" son como se definen a continuación sustituidos con los mismos grupos que se enumeran para grupo "alquilo sustituido". El término "grupo alqueroarilo" significa un grupo hidrocarbonado insaturado, lineal o ramificado con uno o más dobles enlaces carbono-carbono, como un grupo vinilo. El término "grupo alquinilo" significa un grupo hidrocarbonado lineal o ramificado insaturado con uno o más triples enlaces carbono-carbono. El término "grupo cíclico" significa un grupo hidrocarbonado de anillo cerrado que se clasifica como un grupo alicíclico, grupo aromático o grupo heterocíclico. El término "grupo alicíclico" significa un grupo hidrocarbonado cíclico que tiene propiedades que se asemejan a las de los grupos alifáticos. El término "grupo aromático" o "grupo arilo" significa un grupo hidrocarbono aromático mono o policíclico, y puede incluir uno o más heteroátomos, y se definen con más detalle a continuación. El término "grupo heterocíclico" significa un hidrocarbono de anillo cerrado en el que uno o más de los átomos en el anillo son un elemento distinto de carbono (por ejemplo, nitrógeno, oxígeno, azufre, etc.), y se definen adicionalmente a continuación.

Los "grupos orgánicos" pueden ser funcionales o comprender funcionalidades adicionales asociadas con el grupo orgánico, tales como carboxilo, amino, hidroxilo y similares, que pueden estar protegidos o no protegidos. Por ejemplo, la frase "grupo alquilo" pretende incluir no solo sustituyentes alquilo de hidrocarburo saturados de cadena abierta puros, tales como metilo, etilo, propilo, t-butilo y similares, pero también sustituyentes alquilo que llevan sustituyentes adicionales conocidos en la técnica, tales como hidroxilo, alcoxi, alquilsulfonilo, átomos de halógeno, ciano, nitro, amino, carboxilo, etc. Por lo tanto, "grupo alquilo" incluye éteres, ésteres, haloalquilos, nitroalquilos, carboxialquilos, hidroxialquilos, sulfoalquilos, etc.

Los términos "halo" y "halógeno" se refieren a los grupos fluoro, cloro, bromo o yodo. Puede haber uno o más halógenos, que son iguales o diferentes. Los halógenos de particular interés incluyen grupos fluoro, cloro y bromo.

El término "haloalquilo" se refiere a un grupo alquilo como se definió anteriormente que está sustituido con uno o más átomos de halógeno. Los átomos de halógeno pueden ser iguales o diferentes. El término "dihaloalquilo" se refiere a un grupo alquilo como se describió anteriormente que está sustituido por dos grupos halo, que pueden ser iguales o diferentes. El término "trihaloalquilo" se refiere a un grupo alquilo como se describe arriba, que está sustituido por tres grupos halo, que pueden ser iguales o diferentes. El término "perhaloalquilo" se refiere a un grupo haloalquilo como se definió anteriormente en el que cada átomo de hidrógeno en el grupo alquilo se ha reemplazado por un átomo de halógeno. El término "perfluoroalquilo" se refiere a un grupo haloalquilo como se definió anteriormente en el que cada átomo de hidrógeno en el grupo alquilo se ha reemplazado por un grupo fluoro.

El término "cicloalquilo" significa un anillo saturado mono-, bi- o tricíclico que está completamente saturado o parcialmente insaturado. Los ejemplos de dicho grupo incluyen ciclodextrilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, adamantilo, ciclooctilo, cis o trans decalina, biciclo [2.2.1] hept-2-eno, ciclohex-1-enilo, ciclopent-1-enilo, 1,4-ciclooctadienilo, y similares.

El término "(cicloalquil) alquilo" significa el grupo alquilo definido anteriormente sustituido por uno de los anillos de cicloalquilo anteriores. Los ejemplos de dicho grupo incluyen (ciclohexil) metilo, 3-(ciclopropil)-n-propilo, 5-(ciclopentil) hexilo, 6-(adamantil) hexilo y similares.

El término "fenilo sustituido" especifica un grupo fenilo sustituido con uno o más restos, y en algunos casos uno, dos o tres restos, elegidos entre los grupos que consisten en halógeno, hidroxilo, hidroxilo protegido, ciano, nitro, trifluorometilo, C₁ a C₇ alquilo, C₁ a C₇ alcoxi, C₁ a C₇ acilo, C₁ a C₇ aciloxi, carboxi, oxicarboxi, carboxi protegido, carboximetilo, carboximetilo protegido, hidroximetilo, hidroximetilo protegido, amino, amino protegido, amino (monosustituido), amino protegido (monosustituido), amino (disustituido), carboxamida, carboxamida protegida, N-(alquilo C₁ a C₆) carboxamida, N-(alquilo C₁ a C₆) carboxamida protegida, N, N-di (alquilo C₁ a C₆) carboxamida, trifluorometilo, N - ((alquilo C₁ a C₆) sulfonilo) amino, N- (fenilsulfonil) amino o fenilo, sustituido o no sustituido, de manera que, por ejemplo, resulta un grupo bifenilo o naftilo.

Los ejemplos del término "fenilo sustituido" incluyen un grupo mono- o di (halo) fenilo tal como 2, 3 o 4-cloro-fenilo, 2,6-diclorofenilo, 2,5-diclorofenilo, 3,4-diclorofenilo, 2, 3 o 4-bromofenilo, 3,4-dibromofenilo, 3-cloro-4-fluorofenilo, 2, 3 o 4-fluorofenilo y similares; un grupo mono o di (hidroxilo) fenilo tal como 2, 3 o 4-hidroxifenilo, 2,4-dihidroxifenilo, los derivados hidroxilo protegidos de los mismos y similares; un grupo nitrofenilo tal como 2, 3 o 4- nitrofenilo; un grupo cianofenilo, por ejemplo, 2, 3 o 4-cianofenilo; un grupo mono- o di (alquil) fenilo tal como 2, 3 o 4-metilfenilo, 2,4-dimetilfenilo, 2, 3 o 4- (iso-propil) fenilo, 2, 3 o 4-etilfenilo, 2, 3 o 4-(n-propil) fenilo y similares; un grupo mono o di (alcoxi) fenilo, por ejemplo, 2,6-dimetoxifenilo, 2, 3 o 4- (isopropoxi) fenilo, 2, 3 o 4-(t-butoxi) fenilo, 3-etoxi-4-metoxifenilo y similares; 2, 3 o 4-trifluorometilfenilo; un grupo mono o dicarboxifenilo o (carboxi) fenilo protegido tal como 2, 3 o 4-carboxifenilo o 2,4-di (carboxi) fenilo protegido; un mono- o di (hidroximetil) fenilo o (hidroximetil

protegido) fenilo tal como 2, 3 o 4-(hidroximetil protegido) fenilo o 3,4- di (hidroximetil) fenilo; un mono- o di (aminometil) fenilo o (aminometil) fenilo protegido tal como 2, 3 o 4- (aminometil) fenilo o 2,4- (aminometil protegido) fenilo; o un mono- o di (N- (metilsulfonilamino)) fenilo tal como 2, 3 o 4- (N- (metilsulfonilamino)) fenilo. Además, el término "fenilo sustituido" representa grupos fenilo disustituídos en los que los sustituyentes son diferentes, por ejemplo, 3-metil-4-hidroxifenilo, 3-cloro-4-hidroxifenilo, 2-metoxi-4- bromofenilo, 4-etil-2 -hidroxifenilo, 3-hidroxi-4-nitrofenilo, 2-hidroxi-4-clorofenilo y similares.

El término "(fenil sustituido) alquilo" significa uno de los grupos fenilo sustituidos anteriores unidos a uno de los grupos alquilo descritos anteriormente. Los ejemplos incluyen grupos tales como 2-fenil-1-cloroetilo, 2- (4'-metoxifenil) etilo, 4- (2', 6'-dihidroxifenil) n-hexilo, 2- (5'-ciano-3'-metoxifenil) n-pentilo, 3- (2', 6'-dimetilfenil) n-propilo, 4- cloro-3- aminobencilo, 6- (4'-metoxifenil) -3-carboxi (n-hexil), 5- (4'-aminometilfenil) -3- (aminometil) n-pentilo, 5-fenil-3-oxo- n-pent-1-il, (4-hidroxinaph-2-il) metilo y similares.

Como se indicó anteriormente, el término "aromático" o "arilo" se refiere a anillos carbocíclicos de seis miembros. También como se indicó anteriormente, el término "heteroarilo" denota anillos de cinco miembros o seis miembros opcionalmente sustituidos que tienen de 1 a 4 heteroátomos, tales como átomos de oxígeno, azufre y/o nitrógeno, en particular nitrógeno, ya sea solo o junto con átomos de anillo de azufre u oxígeno.

Además, los anillos de cinco miembros o seis miembros opcionalmente sustituidos pueden fusionarse opcionalmente a un sistema de anillo aromático de 5 miembros o 6 miembros. Por ejemplo, los anillos se pueden fusionar opcionalmente a un sistema de anillo aromático de 5 miembros o 6 miembros, tal como un sistema de piridina o triazol, y preferiblemente a un anillo de benceno.

Los siguientes sistemas de anillo son ejemplos de los radicales heterocíclicos (ya sean sustituidos o no sustituidos) indicados por el término "heteroarilo": tienilo, furilo, pirrolilo, pirrolidinilo, imidazolilo, isoxazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tetrazolilo, tiazolilo, oxatriazolilo, piridilo, pirimidilo, pirazinilo, piridazinilo, oxazinilo, triazinilo, tiadiazinil tetrazol, 1,5- [b] piridazinilo y purinilo, así como derivados benzocondensados, por ejemplo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, bencimidazolilo e indolilo.

Los sustituyentes para los anillos heteroarilo opcionalmente sustituidos anteriores son de uno a tres halo, trihalometilo, amino, amino protegido, sales amino, amino mono-sustituido, amino di-sustituido, carboxi, carboxi protegido, sales de carboxilato, hidroxilo, hidroxilo protegido, sales de un grupo hidroxilo, alcoxi inferior, alquiltio inferior, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, (cicloalquil) alquilo, sustituido (cicloalquil) alquilo, fenilo, fenilo sustituido, fenilalquilo, y (fenil sustituido) alquilo. Los sustituyentes para el grupo heteroarilo son como se han definido anteriormente, o en el caso de trihalometilo, pueden ser trifluorometilo, triclorometilo, tribromometilo o triyodométilo. Como se usa junto con el anteriores sustituyentes para anillos heteroarilo, "alcoxi inferior" significa un grupo alcoxi C₁ a C₄, de manera similar, "alquiltio inferior" significa un grupo alquiltio C₁ a C₄.

El término "amino (monosustituido)" se refiere a un grupo amino con un sustituyente elegido del grupo que consiste en fenilo, fenilo sustituido, alquilo, alquilo sustituido, acilo C₁ a C₄, alquenilo C₂ a C₇, alquenilo sustituido C₂ a C₇, alquinilo C₂ a C₇, alquilarilo C₇ a C₁₆, alquilarilo sustituido C₇ a C₁₆ y grupo heteroarilo. El amino (monosustituido) puede tener adicionalmente un grupo protector de amino tal como se engloba en el término "amino protegido (monosustituido)". El término "amino (disustituido)" se refiere a grupos amino con dos sustituyentes elegidos del grupo que consiste en fenilo, fenilo sustituido, alquilo, alquilo sustituido, acilo C₁ a C₇, alquenilo C₂ a C₇, alquinilo C₂ a C₇, alquilarilo C₇ a C₁₆, alquilarilo sustituido C₇ a C₁₆ y heteroarilo. Los dos sustituyentes pueden ser iguales o diferentes.

El término "heteroarilo (alquilo)" denota un grupo alquilo como se definió anteriormente, sustituido en cualquier posición por un grupo heteroarilo, como se definió anteriormente.

"Opcional" u "opcionalmente" significa que el evento, circunstancia, característica o elemento posteriormente descrito puede, pero no es necesario que suceda, y que la descripción incluye instancias donde ocurre el evento o circunstancia y casos en los que no ocurre. Por ejemplo, "grupo heterociclo opcionalmente mono o disustituido con un grupo alquilo" significa que el alquilo puede estar presente, aunque no es necesario, y la descripción incluye situaciones en las que el grupo heterociclo está mono- o disustituido con un grupo alquilo y situaciones donde el grupo heterociclo no está sustituido con el grupo alquilo.

Compuestos que tienen la misma fórmula molecular pero difieren en la naturaleza o secuencia de unión de sus átomos o la disposición de sus átomos en el espacio se denominan "isómeros". Los isómeros que difieren en la disposición de sus átomos en el espacio se denominan "estereoisómeros". Los estereoisómeros que no son imágenes especulares entre sí se denominan "diastereómeros" y los que son imágenes especulares no superponibles entre sí se denominan "enantiómeros". Cuando un compuesto tiene un centro asimétrico, por ejemplo, está unido a cuatro grupos diferentes, es posible un par de enantiómeros. Un enantiómero puede caracterizarse por la configuración absoluta de su centro asimétrico y se describe mediante las reglas de secuencia R y S de Cahn y Prelog, o por la forma en que la molécula gira el plano de la luz polarizada y se designa como dextrógira o levógira

(es decir, como isómeros (+) o (-) -, respectivamente). Un compuesto quiral puede existir como enantiómero individual o como una mezcla de los mismos. Una mezcla que contiene proporciones iguales de los enantiómeros se denomina "mezcla racémica".

5 Los compuestos de esta invención pueden poseer uno o más centros asimétricos; tales compuestos pueden, por lo tanto, producirse como estereoisómeros individuales (R) - o (S) - o como mezclas de los mismos. A menos que se indique lo contrario, la descripción o la denominación de un compuesto particular en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones pretende incluir tanto enantiómeros individuales como mezclas racémicas o de otro tipo, de los mismos. Los métodos para la determinación de la estereoquímica y la separación de estereoisómeros son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la discusión en el capítulo 4 de "Advanced Organic Chemistry", 4ª edición J. March, John Wiley and Sons, Nueva York, 1992).

10 Salvo que se indique lo contrario, los métodos y técnicas de las presentes realizaciones generalmente se realizan según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Loudon, Organic Chemistry, Forth Edition, Nueva York: Oxford University Press, 2002, pp. 360-361, 1084-1085; Smith y March, Advanced Organic Chemistry, March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, Fifth Edition, Wiley-Interscience, 2001.

15 Muchas referencias generales que proporcionan esquemas y condiciones sintéticos químicos comúnmente conocidos útiles para la síntesis de los compuestos descritos está disponible (ver, por ejemplo, Smith and March, Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, Fifth Edition, Wiley-Interscience, 2001, o Vogel, A Textbook of Organic Organic Chemistry, including Qualitative Organic Analysis, Forth Edition, Nueva York: Longman, 1978).

20 Los compuestos como se describen en la presente memoria se pueden purificar por cualquiera de los medios conocidos en la técnica, incluyendo medios cromatográficos, tales como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía en capa fina preparativa, cromatografía de columna instantánea y cromatografía de intercambio iónico. Se puede usar cualquier fase estacionaria adecuada, incluidas las fases normales e inversas, así como las resinas iónicas. Véase, por ejemplo, Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2nd Edition, ed. L.R. Snyder y J. J. Kirkland, John Wiley and Sons, 1979; y Thin Layer Chromatography, ed. E. Stahl, Springer-Verlag, Nueva York, 1969.

25 Durante cualquiera de los procesos para la preparación de los compuestos de la presente divulgación, puede ser necesario y/o deseable proteger grupos sensibles o reactivos en cualquiera de las moléculas en cuestión. Esto se puede lograr por medio de grupos protectores convencionales como se describe en las obras estándar, tales como TW Greene y PGM Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", Forth Edition, Wiley, Nueva York, 2006. Los grupos protectores se pueden eliminar en una etapa posterior conveniente usando métodos conocidos de la técnica.

35 Los compuestos descritos en este documento pueden contener uno o más centros quirales y/o enlaces dobles y, por lo tanto, pueden existir como estereoisómeros, tales como isómeros de doble enlace (es decir, isómeros geométricos), enantiómeros o diastereómeros. Por consiguiente, todos los posibles enantiómeros y estereoisómeros de los compuestos que incluyen la forma estereoisoméricamente pura (por ejemplo, geométricamente pura, enantioméricamente pura o diastereoméricamente pura) y las mezclas enantioméricas y estereoisoméricas se incluyen en la descripción de los compuestos de la presente invención. Las mezclas enantioméricas y estereoisoméricas se pueden resolver en sus componentes enantiómeros o estereoisómeros usando técnicas de separación o técnicas de síntesis quiral bien conocidas por los expertos en la técnica. Los compuestos también pueden existir en varias formas tautoméricas que incluyen la forma enólica, la forma ceto y mezclas de las mismas. Por consiguiente, las estructuras químicas representadas en este documento abarcan todas las posibles formas tautoméricas de los compuestos ilustrados. Los compuestos descritos también incluyen compuestos marcados isotópicamente en los que uno o más átomos tienen una masa atómica diferente de la masa atómica convencionalmente encontrada en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en los compuestos descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , etc. Los compuestos pueden existir en formas no solvatadas así como en formas solvatadas, incluyendo formas hidratadas. En general, los compuestos pueden hidratarse o solvotarse. Ciertos compuestos pueden existir en múltiples formas cristalinas o amorfas. En general, todas las formas físicas son equivalentes para los usos contemplados en la presente memoria y están destinadas a estar dentro del alcance de la presente descripción.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

60 Antes de que la presente invención se describa adicionalmente, debe entenderse que esta invención no está limitada a las realizaciones particulares descritas, como tales pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente memoria tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende ser limitativa, ya que el alcance de la presente invención estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas.

65

5 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta el décimo de la unidad del límite inferior a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo indicado, está abarcado dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños, y también están abarcados dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o ambos de los límites incluidos también se incluyen en la invención.

10 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria también se puede usar en la práctica o prueba de la presente invención, los métodos y materiales preferidos se describen a continuación. Todas las publicaciones mencionadas en este documento se incorporan aquí como referencia para divulgar y describir los métodos y/o materiales en relación con los cuales se citan las publicaciones.

15 Debe señalarse que, y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un método" incluye una pluralidad de dichos métodos y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente. Se observa además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración tiene la intención de servir como base previa para el uso de terminología exclusiva como "únicamente", "solo" y similares en relación con la recitación de elementos reivindicados, o uso de una limitación "negativa".

20 Se aprecia que ciertas características de la invención, que, por claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también se pueden proporcionar en combinación en una única realización. A la inversa, varias características de la invención, que, por brevedad, se describen en el contexto de una única realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada. Todas las combinaciones de las realizaciones pertenecientes a los grupos químicos representados por las variables (por ejemplo, -J, =W-, -X=, =Y-, -Z=, -Q, -R^{V1}, -R^{V2}, -R^{V3}, -R^{V4}, -R^T, -R^{TT}, -Q^{CA}, -Q^{HA}, -R^{PP}, -R^R, -R^{RA}, -L^R, -M^R, -R^K, -R^{RR}, -R^J, -M^J, -R^N, -R^{J1}, -R^{J2}, -R^{J3}, -R^{J4}, -R^{J5}, -R^{J6}, -L^J, -R^{J2X}, -R^{J2XX}, -R^{JJ}, -R^{JJJ}, -L^{JJJ}, -R^{P2}, -R^{P3}, -R^{P4}, -R^{P5}, -R^{P6}, -R^{P2R}, -R^{P2RA}, -R^{P3R}, -R^{P3RA}, -R^{P4R}, -R^{P4RA}, -R^{P5R}, -R^{P5RA}, -R^{P6R}, -R^{P6RA}, -R^{AK}, etc.) están específicamente abarcados por la presente invención y se describen en este documento como si todos y cada uno de la combinación se describe individual y explícitamente, en la medida en que tales combinaciones abarcan compuestos que son compuestos estables (es decir, compuestos que se pueden aislar, caracterizar y ensayar para la actividad biológica). Además, todas las subcombinaciones de los grupos químicos enumerados en las realizaciones que describen tales variables también están específicamente abarcadas por la presente invención y se describen en la presente memoria como si todas y cada una de tales subcombinaciones de grupos químicos se divulgaran individual y explícitamente.

40 Las publicaciones discutidas en la presente memoria se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en la presente memoria se debe interpretar como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder a dicha publicación en virtud de la invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicaciones reales que pueden necesitar confirmación independiente.

45 GENERAL

La presente descripción se basa en la identificación de compuestos que se unen a un tetrámero de TTR en presencia de un ligando de TTR que se sabe que se une y estabiliza el tetrámero de TTR. Estos compuestos estabilizan los tetrámeros de TTR y de ese modo reducen la formación de fibrillas de amiloide TTR. Estos compuestos también encuentran uso para determinar el nivel de TTR estabilizado y/o tetramérico. Además, estos compuestos encuentran uso en la preparación de compuestos heterobifuncionales que reclutan TTR para su uso en la disrupción de PPI.

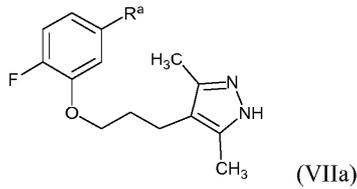
COMPOSICIONES

55 Se proporcionan en la presente memoria compuestos que se pueden usar para estabilizar los tetrámeros de TTR reduciendo la formación de fibrillas de amiloide TTR. Estos compuestos se pueden incorporar en una variedad de formulaciones para administración terapéutica por una variedad de rutas, que incluyen pero no se limitan a administración oral, parenteral, transdérmica, intratecal, oftálmica, tópica, pulmonar, nasal, rectal o de depósito.

60 Más particularmente, los compuestos descritos en la presente memoria se pueden formular en composiciones farmacéuticas por combinación con vehículos, diluyentes, excipientes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables apropiados.

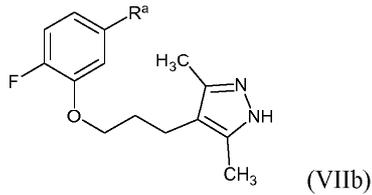
Compuestos

Un compuesto de la invención es de la estructura del compuesto VIIa:



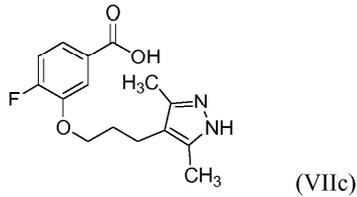
5 donde R^a es OH, CHO, COOH, CONH₂, CONH(OH), COOR⁶, CONHR⁶; y R⁶ es alquilo lineal o ramificado de 1-3 átomos de carbono; o una sal, éster, enol-éter, enol-éster, amida, acetal, cetal, ortoéster, hemiacetal, hemicetal farmacéuticamente aceptables, hidrato o solvato de los mismos.

En algunas realizaciones, un compuesto de la invención es de la estructura del compuesto VIIb:



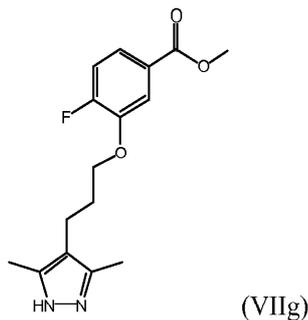
10 donde R^a es COOH, CONH₂, CONH(OH), COOR⁶, CONHR⁶; y R⁶ es alquilo lineal o ramificado de 1-3 átomos de carbono; o una sal, éster, enol-éter, enol-éster, amida, acetal, cetal, ortoéster, hemiacetal, hemicetal farmacéuticamente aceptables, hidrato o solvato de los mismos.

15 En algunas realizaciones, un compuesto de la invención es de la estructura del compuesto VIIc:



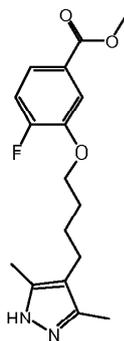
20 o una sal, éster, enol éter, enol éster, amida, acetal, cetal, ortoéster, hemiacetal, hemicetal farmacéuticamente aceptables, hidrato o solvato de los mismos.

En algunas realizaciones, un compuesto de la invención es de la estructura del compuesto VIIg:



25 o una sal, éster, enol éter, enol éster, amida, acetal, cetal, ortoéster, hemiacetal, hemicetal farmacéuticamente aceptables, hidrato o solvato de los mismos.

30 En algunas realizaciones, un compuesto de la invención es de la estructura del compuesto VIIIi:

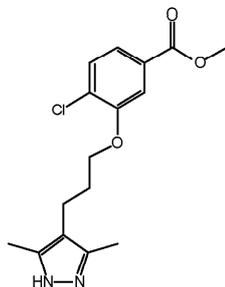


(VIIi)

o una sal, éster, enol éter, enol éster, amida, acetal, cetal, ortoéster, hemiacetal, hemicetal farmacéuticamente aceptables, hidrato o solvato de los mismos.

5

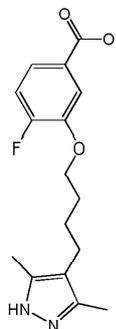
En algunas realizaciones, un compuesto de la invención es de la estructura del compuesto VIIk:



(VIIk)

10 o una sal, éster, enol éter, enol éster, amida, acetal, cetal, ortoéster, hemiacetal, hemicetal farmacéuticamente aceptables, hidrato o solvato de los mismos.

En algunas realizaciones, un compuesto de la invención es de la estructura del compuesto VIIm:

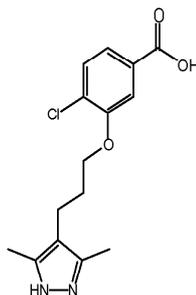


(VIIm)

15

o una sal, éster, enol-éter, enol-éster, amida, acetal, cetal, ortoéster, hemiacetal, hemicetal farmacéuticamente aceptables, hidrato o solvato de los mismos.

20 En algunas realizaciones, un compuesto de la invención es de la estructura del Compuesto VIIo:



(VIIo)

o una sal, éster, enol-éter, enol-éster, amida, acetal, cetel, ortoéster, hemiacetal, hemicetal farmacéuticamente aceptables, hidrato o solvato de los mismos.

Formulación de composiciones farmacéuticas

5 Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento contienen cantidades terapéuticamente eficaces de uno o más de los compuestos proporcionados en este documento que son útiles en la prevención, tratamiento o mejora de uno o más de los síntomas de enfermedades o trastornos asociados con el plegamiento erróneo de transtiretina (TTR), o en cuyo despliegue incorrecto de TTR está implícito, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las enfermedades o trastornos asociados con el mal plegamiento de TTR incluyen, 10 entre otros, polineuropatía amiloide familiar, miocardiopatía amiloide familiar, amiloidosis sistémica senil, enfermedad de Alzheimer, encefalopatía esponjiforme (es decir, enfermedad de Creutzfeldt Jakob GSS, insomnio familiar fatal), demencia frontotemporal, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), síndrome de Down, esclerosis múltiple, polineuropatía, síndrome de Guillain-Barré, degeneración macular, opacidades vítreas, glaucoma, diabetes tipo II o carcinoma medular de la tiroides. Los vehículos farmacéuticos adecuados para la administración de los compuestos proporcionados en la presente memoria incluyen cualquiera de dichos vehículos conocidos por los expertos en la técnica que sean adecuados para el modo de administración particular.

Además, los compuestos se pueden formular como el único ingrediente farmacéuticamente activo en la composición o se pueden combinar con otros ingredientes activos.

20 Las composiciones contienen uno o más compuestos proporcionados en este documento. Los compuestos son, en una realización, formulados en preparaciones farmacéuticas adecuadas tales como disoluciones, suspensiones, tabletas, tabletas dispersables, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida o elixires, para administración oral o en disoluciones o suspensiones estériles para administración parenteral, así como preparación de parche transdérmico e inhaladores de polvo seco. En una realización, los compuestos descritos anteriormente se formulan en composiciones farmacéuticas usando técnicas y procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Fourth Edition 1985, 126). En ciertas realizaciones preferibles, los compuestos se formulan en preparaciones farmacéuticas adecuadas para administración oral a un sujeto.

30 En las composiciones, las concentraciones efectivas de uno o más compuestos o sus derivados farmacéuticamente aceptables se mezclan con un vehículo farmacéutico adecuado. Los compuestos se pueden derivatizar como los correspondientes sales, ésteres, enoléteres o ésteres enol, acetales, cetales, ortoésteres, hemiacetales, hemicetales, ácidos, bases, solvatos, hidratos o profármacos antes de la formulación, como se describió anteriormente. Las concentraciones de los compuestos en las composiciones son eficaces para el suministro de una cantidad, tras la administración, que trata, previene o mejora uno o más de los síntomas de enfermedades o trastornos asociados con el mal plegamiento de TTR o en los que está implicado el plegamiento incorrecto de TTR.

40 En ciertas realizaciones, las composiciones se formulan para administración de dosis única. Para formular una composición, la fracción en peso del compuesto se disuelve, suspende, dispersa o mezcla de otro modo en un vehículo seleccionado a una concentración eficaz tal que la condición tratada se alivia, previene, o uno o más síntomas mejoran.

45 El compuesto activo se incluye en el vehículo farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil en ausencia de efectos secundarios indeseables en el paciente tratado. La concentración terapéuticamente eficaz se puede determinar empíricamente probando los compuestos en sistemas in vitro e in vivo descritos y luego extrapolarlo para dosificaciones para humanos.

50 La concentración del compuesto activo en la composición farmacéutica dependerá de las velocidades de absorción, inactivación y excreción del compuesto activo, las características fisicoquímicas del compuesto, el programa de dosificación y la cantidad administrada, así como otros factores conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la cantidad que se entrega es suficiente para mejorar uno o más de los síntomas de enfermedades o trastornos asociados con el mal plegamiento de TTR o en el que está implicado el plegamiento incorrecto de TTR, como se describe en la presente memoria.

55 En una realización, una dosificación terapéuticamente eficaz debería producir una concentración sérica de ingrediente activo de aproximadamente 0,1 ng/ml a aproximadamente 50-100 µg/ml. Las composiciones farmacéuticas, en otra realización, deberían proporcionar una dosificación de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 2.000 mg de compuesto por kilogramo de peso corporal por día. Las formas de dosificación farmacéutica se preparan para proporcionar desde aproximadamente 0,01 mg, 0,1 mg o 1 mg hasta 60 aproximadamente 500 mg, 1.000 mg o 2.000 mg, y en una realización de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo o una combinación de ingredientes esenciales por forma de unidad de dosificación.

El ingrediente activo se puede administrar de una vez, o se puede dividir en varias dosis más pequeñas para administrar a intervalos de tiempo. Se entiende que la dosificación precisa y la duración del tratamiento es una función de la enfermedad que se está tratando y se puede determinar empíricamente usando protocolos de prueba conocidos o mediante extrapolación de datos de pruebas in vivo o in vitro. Debe observarse que las concentraciones y los valores de dosificación también pueden variar con la gravedad de la afección que se va a aliviar. Debe entenderse además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos se deben ajustar a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de concentración establecidos aquí son a modo de ejemplo solamente y no están destinados a limitar el alcance o la práctica de las composiciones reivindicadas.

En casos en los que los compuestos exhiben una solubilidad insuficiente, se pueden usar métodos para solubilizar compuestos. Dichos métodos son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, el uso de tensioactivos, tales como TWEEN™, o la disolución en bicarbonato de sodio acuoso. Los derivados de los compuestos, tales como los profármacos de los compuestos, también se pueden usar para formular composiciones farmacéuticas eficaces.

Al mezclar o agregar el (los) compuesto (s), la mezcla resultante puede ser una disolución, suspensión, emulsión o similares. La forma de la mezcla resultante depende de una serie de factores, que incluyen el modo de administración previsto y la solubilidad del compuesto en el vehículo o transporte seleccionado. La concentración eficaz es suficiente para mejorar los síntomas de la enfermedad, trastorno o condición tratada y puede determinarse empíricamente.

Las composiciones farmacéuticas se proporcionan para la administración a humanos y animales en formas de dosificación unitarias, tales como tabletas, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, disoluciones o suspensiones parenterales estériles, y disoluciones orales o suspensiones, y emulsiones de aceite y agua que contienen cantidades adecuadas de los compuestos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los compuestos farmacéuticamente activos terapéuticamente y sus derivados son, en una realización, formulados y administrados en formas de dosificación unitaria o formas de dosificación múltiple. Las formas de dosis unitarias como se usan en la presente memoria se refieren a unidades físicamente discretas adecuadas para sujetos humanos y animales y empaquetadas individualmente como se conoce en la técnica. Cada dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada del compuesto terapéuticamente activo suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el transporte, diluyente o vehículo farmacéutico requerido. Los ejemplos de formas de dosis unitarias incluyen ampollas y jeringas y tabletas o cápsulas individualmente envasadas. Las formas de dosis unitaria pueden administrarse en fracciones o múltiplos de las mismas. Una forma de dosis múltiple es una pluralidad de formas de dosificación unitaria idénticas empaquetadas en un único recipiente para administrarse en forma de dosis unitaria segregada. Ejemplos de formas de dosis múltiples incluyen viales, botellas de tabletas o cápsulas o botellas de pintas o galones. Por lo tanto, la forma de dosis múltiple es un múltiplo de dosis unitarias que no están segregados en el envasado.

Las composiciones líquidas administrables farmacéuticamente pueden, por ejemplo, prepararse disolviendo, dispersando o mezclando de otro modo un compuesto activo como se definió anteriormente y adyuvantes farmacéuticos opcionales en un vehículo, tal como, por ejemplo, agua, disolución salina, dextrosa acuosa, glicerol, glicoles, etanol, y similares, para formar de ese modo una disolución o suspensión. Si se desea, la composición farmacéutica a administrar también puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes, emulsionantes, solubilizantes, tamponantes del pH y similares, por ejemplo, acetato, citrato de sodio, derivados de ciclodextrina, monolaurato de sorbitán, acetato de trietanolamina sódica, oleato de trietanolamina y otros agentes similares.

Se pueden preparar formas de dosificación o composiciones que contienen ingrediente activo en el intervalo de 0,005% a 100% con el resto constituido por un vehículo no tóxico. Los métodos para la preparación de estas composiciones son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las composiciones objeto pueden contener 0,001% -100% de ingrediente activo, en una realización 0,1-95%, en otra realización 75-85%.

Composiciones para administración oral

Las formas de dosificación farmacéutica oral pueden ser sólidas, en gel o líquidas. En ciertas realizaciones, las formas de dosificación sólidas son tabletas, cápsulas, gránulos y polvos a granel. Los tipos de tabletas orales incluyen comprimidos, pastillas masticables y tabletas que pueden ser entéricas, recubiertas de azúcar o recubiertas con película. Las cápsulas pueden ser cápsulas de gelatina dura o blanda, los gránulos y polvos se pueden proporcionar en forma no efervescente o efervescente con la combinación de otros ingredientes conocidos por los expertos en la técnica.

Composiciones sólidas para administración oral

En ciertas realizaciones, las formulaciones son formas de dosificación sólidas, en una realización, cápsulas o tabletas. Las tabletas, píldoras, cápsulas, troscos y similares pueden contener uno o más de los siguientes

ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante; un lubricante; un diluyente; un deslizador un agente disgregante; un agente colorante; un agente edulcorante; un agente aromatizante; un agente humectante; un recubrimiento emético; y un recubrimiento de película. Los ejemplos de aglutinantes incluyen celulosa microcristalina, goma tragacanto, disolución de glucosa, mucílago de acacia, disolución de gelatina, melaza, polinilpirrolidona, povidona, crospovidonas, sacarosa y pasta de almidón. Los lubricantes incluyen talco, almidón, estearato de magnesio o calcio, lycopodium y ácido esteárico. Los diluyentes incluyen, por ejemplo, lactosa, sacarosa, almidón, caolín, sal, manitol y fosfato dicálcico. Los deslizantes incluyen, pero no se limitan a, dióxido de silicio coloidal. Los agentes desintegrantes incluyen croscarmelosa sódica, almidón glicolato sódico, ácido alginico, almidón de maíz, almidón de patata, bentonita, metilcelulosa, agar y carboximetilcelulosa. Los agentes colorantes incluyen, por ejemplo, cualquiera de los colorantes FD y C solubles en agua certificados aprobados, mezclas en esto; y colorantes FD y C insolubles en agua suspendidos sobre hidrato de alúmina. Los agentes edulcorantes incluyen sacarosa, lactosa, manitol y agentes edulcorantes artificiales tales como sacarina, y cualquier cantidad de sabores secados por pulverización. Los agentes aromatizantes incluyen aromatizantes naturales extraídos de plantas tales como frutas y mezclas sintéticas de compuestos que producen una sensación agradable, tales como, entre otros, menta y salicilato de metilo. Los agentes humectantes incluyen monoestearato de propilenglicol, monooleato de sorbitán, monolaurato de dietilenglicol y éter laural de polioxietileno. Los recubrimientos eméticos incluyen ácidos grasos, grasas, ceras, shellac, shellac amoniacal y ftalatos de acetato de celulosa. Los recubrimientos de película incluyen hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, polietilenglicol 4000 y acetato ftalato de celulosa.

El compuesto, o derivado farmacéuticamente aceptable del mismo, podría proporcionarse en una composición que lo proteja del entorno ácido del estómago. Por ejemplo, la composición puede formularse en un recubrimiento entérico que mantenga su integridad en el estómago y libere el compuesto activo en el intestino. La composición también se puede formular en combinación con un antiácido u otro ingrediente similar.

Cuando la forma de la unidad de dosificación es una cápsula, puede contener, además del material del tipo anterior, un vehículo líquido tal como un aceite graso. Además, las formas de unidades de dosificación pueden contener otros diversos materiales que modifican la forma física de la unidad de dosificación, por ejemplo, recubrimientos de azúcar y otros agentes entéricos. Los compuestos también pueden administrarse como un componente de un elixir, suspensión, jarabe, oblea, espolvoreo, goma de mascar o similares. Un jarabe puede contener, además de los compuestos activos, sacarosa como agente edulcorante y ciertos conservantes, tintes y colorantes y sabores. Los materiales activos también se pueden mezclar con otros materiales activos que no perjudiquen la acción deseada, o con materiales que complementen la acción deseada, como antiácidos, bloqueadores H₂ y diuréticos. El ingrediente activo es un compuesto o derivado farmacéuticamente aceptable del mismo como se describe en este documento. Se pueden incluir concentraciones más altas, hasta aproximadamente 98% en peso del ingrediente activo.

En todas las realizaciones, las formulaciones de comprimidos y cápsulas pueden recubrirse como conocen los expertos en la técnica con el fin de modificar o sostener la disolución del ingrediente activo. Por lo tanto, por ejemplo, pueden recubrirse con un revestimiento convencional digerible entéricamente, tal como fenilalilato, ceras y ftalato de acetato de celulosa.

Composiciones líquidas para administración oral

Las formas líquidas de dosificación oral incluyen disoluciones acuosas, emulsiones, suspensiones, disoluciones y/o suspensiones reconstituidas a partir de gránulos no efervescentes y preparaciones efervescentes reconstituidas a partir de gránulos efervescentes. Las disoluciones acuosas incluyen, por ejemplo, elixires y jarabes. Las emulsiones son aceite en agua o agua en aceite.

Los elixires son preparaciones hidroalcohólicas claras y endulzadas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables usados en elixires incluyen disolventes. Los jarabes son disoluciones acuosas concentradas de un azúcar, por ejemplo, sacarosa, y pueden contener un conservante. Una emulsión es un sistema de dos fases en el que un líquido se dispersa en forma de pequeños glóbulos a través de otro líquido. Los vehículos farmacéuticamente aceptables utilizados en emulsiones son líquidos no acuosos, agentes emulsionantes y conservantes. Las suspensiones usan agentes de suspensión y conservantes farmacéuticamente aceptables. Las sustancias farmacéuticamente aceptables usadas en gránulos no efervescentes, para ser reconstituidas en una forma de dosificación oral líquida, incluyen diluyentes, edulcorantes y agentes humectantes. Las sustancias farmacéuticamente aceptables usadas en gránulos efervescentes, para ser reconstituidas en una forma de dosificación oral líquida, incluyen ácidos orgánicos y una fuente de dióxido de carbono. Los agentes colorantes y saborizantes se usan en todas las formas de dosificación anteriores.

Los disolventes incluyen glicerina, sorbitol, alcohol etílico y jarabe. Los ejemplos de conservantes incluyen glicerina, metil y propilparabeno, ácido benzoico, benzoato de sodio y alcohol. Los ejemplos de líquidos no acuosos utilizados en emulsiones incluyen aceite mineral y aceite de semilla de algodón. Los ejemplos de agentes emulsionantes incluyen gelatina, goma arábiga, tragacanto, bentonita y tensioactivos tales como monooleato de polioxietilensorbitán. Los agentes de suspensión incluyen carboximetilcelulosa sódica, pectina, tragacanto, Veegum y acacia. Los agentes edulcorantes incluyen sacarosa, jarabes, glicerina y agentes edulcorantes artificiales tales

como sacarina. Los agentes humectantes incluyen monoestearato de propilenglicol, monooleato de sorbitán, monolaurato de dietilenglicol y lauril éter de polioxietileno. Los ácidos orgánicos incluyen ácido cítrico y tartárico. Las fuentes de dióxido de carbono incluyen bicarbonato de sodio y carbonato de sodio. Los agentes colorantes incluyen cualquiera de los tintes FD y C solubles en agua aprobados y certificados y mezclas de los mismos. Los agentes aromatizantes incluyen sabores naturales extraídos de plantas tales como frutas, y mezclas sintéticas de compuestos que producen una agradable sensación de sabor.

Para una forma de dosificación sólida, la disolución o suspensión, en, por ejemplo, carbonato de propileno, aceites vegetales o triglicéridos, se encapsula en una realización en una cápsula de gelatina. Dichas disoluciones, y la preparación y encapsulación de las mismas, se describen en las patentes de EEUU nº 4.328.245; 4.409.239; y 4.410.545. Para una forma de dosificación líquida, la disolución, por ejemplo, en un polietilenglicol, se puede diluir con una cantidad suficiente de un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, agua, para medir fácilmente la administración.

Alternativamente, se pueden preparar formulaciones orales líquidas o semisólidas disolviendo o dispersando el compuesto activo o la sal en aceites vegetales, glicoles, triglicéridos, ésteres de propilenglicol (por ejemplo, carbonato de propileno) y otros vehículos similares, y encapsulando estas disoluciones o suspensiones en conchas de gelatina dura o blanda. Otras formulaciones útiles incluyen las expuestas en la patente de EEUU nº RE28.819 y 4.358.603. Brevemente, tales formulaciones incluyen, pero no se limitan a, aquellas que contienen un compuesto proporcionado en la presente memoria, un mono- o polialquilenglicol dialquilado, que incluye, pero no limitado a, 1,2-dimetoximetano, diglima, triglima, tetraglima, polietilenglicol-350-dimetiléter, polietilenglicol-550-dimetiléter, polietilenglicol-750-dimetiléter, en donde 350, 550 y 750 se refieren a el peso molecular medio aproximado del polietilenglicol y uno o más antioxidantes, tales como hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA), galato de propilo, vitamina E, hidroquinona, hidroxicumarinas, etanolamina, lecitina, cefalina, ácido ascórbico, ácido málico, sorbitol, ácido fosfórico, ácido tiodipropiónico y sus ésteres, y ditiocarbamatos.

Otras formulaciones incluyen, pero no se limitan a, disoluciones alcohólicas acuosas que incluyen un acetal farmacéuticamente aceptable. Los alcoholes usados en estas formulaciones son cualquier solvente miscible en agua farmacéuticamente aceptable que tenga uno o más grupos hidroxilo, que incluyen, pero no se limitan a, propilenglicol y etanol. Los acetales incluyen, pero no se limitan a, di (alquilo inferior) acetales de aldehídos de alquilo inferiores tales como acetaldehído dietil acetal.

Inyectables, disoluciones y emulsiones

En la presente memoria también se contempla la administración parenteral, en una realización caracterizada por inyección, ya sea por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa. Los inyectables se pueden preparar en formas convencionales, ya sea como disoluciones líquidas o suspensiones, formas sólidas adecuadas para disolución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Los inyectables, disoluciones y emulsiones también contienen uno o más excipientes. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, disolución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas a administrar también pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH, estabilizantes, potenciadores de la solubilidad y otros agentes similares, tales como por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitán, trietanolamina oleato y ciclodextrinas.

La implantación de un sistema de liberación lenta o de liberación sostenida, de manera que se mantenga un nivel constante de dosificación también se contempla en la presente memoria. Brevemente, un compuesto proporcionado en la presente memoria se dispersa en una matriz interna sólida, por ejemplo, polimetilmetacrilato, polibutilmetacrilato, plastificado o no plastificado con poli (cloruro de vinilo), nylon plastificado, polietilentereftalato plastificado, caucho natural, poliisopreno, poliisobutileno, polibutadieno, polietileno, copolímeros de etileno-acetato de vinilo, cauchos de silicona, polidimetilsiloxanos, copolímeros de carbonato de silicona, polímeros hidrófilos tales como hidrogeles de ésteres de ácido acrílico y metacrílico, colágeno, poli (alcohol vinílico) reticulado y acetato de polivinilo parcialmente hidrolizado reticulado, que está rodeado por una membrana exterior polimérica, por ejemplo, polietileno, polipropileno, copolímeros de etileno/propileno, copolímeros de etileno/acrilato de etilo, copolímeros de etileno/acetato de vinilo, cauchos de silicona, polidimetil siloxanos, caucho de neopreno, polietileno clorado, policloruro de vinilo, copolímeros de cloruro de vinilo con acetato de vinilo, cloruro de vinilideno, etileno y propileno, tereftalato de polietileno ionómero, cauchos de epíclorhidrina de caucho butílico, copolímero de etileno/alcohol vinílico, terpolímero de etileno/acetato de vinilo/alcohol vinílico y etileno/copolímero de viniloxietanol, que es insoluble en fluidos corporales. El compuesto se difunde a través de la membrana externa polimérica en una etapa de liberación de velocidad controlada. El porcentaje de compuesto activo contenido en tales composiciones parenterales depende en gran medida de la naturaleza específica de las mismas, así como de la actividad del compuesto y las necesidades del sujeto.

La administración parenteral de las composiciones incluye administraciones intravenosa, subcutánea e intramuscular. Las preparaciones para administración parenteral incluyen disoluciones estériles listas para inyección, productos estériles solubles en seco, tales como polvos liofilizados, listos para combinarse con un solvente justo antes de su uso, incluyendo tabletas hipodérmicas, suspensiones estériles listas para inyección, productos

insolubles secos estériles listos para combinarse con un vehículo justo antes del uso y emulsiones estériles. Las disoluciones pueden ser acuosas o no acuosas.

5 Si se administran por vía intravenosa, los vehículos adecuados incluyen disolución salina fisiológica o disolución salina tamponada con fosfato (PBS), y disoluciones que contienen agentes espesantes y solubilizantes, tales como glucosa, polietilenglicol y polipropilenglicol y mezclas de los mismos.

10 Vehículos farmacéuticamente aceptables usados en preparaciones parenterales incluyen vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, tampones, antioxidantes, anestésicos locales, agentes de suspensión y dispersión, agentes emulsionantes, agentes secuestrantes o quelantes y otras sustancias farmacéuticamente aceptables.

15 Ejemplos de vehículos acuosos incluyen inyección de cloruro de sodio, inyección de ringer, inyección de dextrosa isotónica, inyección de agua estéril, dextrosa e inyección de ringer lactato. Los vehículos parenterales no acuosos incluyen aceites fijos de origen vegetal, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo y aceite de maní. Los agentes antimicrobianos en concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas se deben agregar a las preparaciones parenterales envasadas en envases de dosis múltiples que incluyen fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol bencílico, clorobutanol, ésteres de ácido metil y propil p-hidroxibenzoico, timerosal, cloruro de benzalconio y cloruro de benconio. Los agentes isotónicos incluyen cloruro de sodio y dextrosa. Los tampones incluyen fosfato y citrato. Los antioxidantes incluyen bisulfato de sodio. Los anestésicos locales incluyen hidrocloreto de procaína. Los agentes de suspensión y dispersantes incluyen carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropil metilcelulosa y polivinilpirrolidona. Los agentes emulsionantes incluyen polisorbato 80 (TWEENa 80). Un agente secuestrante o quelante de iones metálicos incluye EDTA. Los vehículos farmacéuticos también incluyen alcohol etílico, polietilenglicol y propilenglicol para vehículos miscibles en agua; e hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para el ajuste del pH.

20 La concentración del compuesto farmacéuticamente activo se ajusta de modo que una inyección proporciona una cantidad eficaz para producir el efecto farmacológico deseado. La dosis exacta depende de la edad, el peso y la condición del paciente o animal como se conoce en la técnica.

30 Las preparaciones parenterales a dosis unitarias se envasan en una ampolla, un vial o una jeringa con una aguja. Todas las preparaciones para administración parenteral deben ser estériles, como se conoce y practica en la técnica.

35 De manera ilustrativa, infusión intravenosa o intraarterial de una disolución acuosa estéril que contiene un compuesto activo es un modo eficaz de administración. Otra realización es una disolución o suspensión acuosa u oleosa estéril que contiene un material activo inyectado según sea necesario para producir el efecto farmacológico deseado.

40 Los inyectables están diseñados para administración local y sistémica. En una realización, se formula una dosificación terapéuticamente eficaz para que contenga una concentración de al menos aproximadamente 0,1% p/p hasta aproximadamente 90% p/p o más, en ciertas realizaciones más de 1% p/p del compuesto activo del tejido(s) tratado(s).

45 El compuesto se puede suspender en forma micronizada u otra forma adecuada o se puede derivatizar para producir un producto activo más soluble o para producir un profármaco. La forma de la mezcla resultante depende de una serie de factores, que incluyen el modo de administración previsto y la solubilidad del compuesto en el vehículo o transporte seleccionado. La concentración eficaz es suficiente para mejorar los síntomas de la afección y puede determinarse empíricamente.

50 *Polvos liofilizados*

En la presente memoria también son de interés polvos liofilizados, que pueden reconstituirse para administración en forma de disoluciones, emulsiones y otras mezclas. También se pueden reconstituir y formular como sólidos o geles.

55 El polvo estéril liofilizado se prepara disolviendo un compuesto proporcionado en la presente memoria, o un derivado farmacéuticamente aceptable, en un disolvente adecuado. El disolvente puede contener un excipiente que mejora la estabilidad u otro componente farmacológico del polvo o disolución reconstituida, preparada a partir del polvo. Los excipientes que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, dextrosa, sorbital, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerol, glucosa, sacarosa u otro agente adecuado. El disolvente también puede contener un tampón, tal como citrato, fosfato de sodio o potasio u otro tampón conocido por los expertos en la técnica en, en una realización, aproximadamente a pH neutro. Filtración estéril posterior de la disolución seguida de liofilización en condiciones estándar conocidas por los expertos en la técnica proporciona la formulación deseada. En una realización, la disolución resultante se distribuirá en viales para la liofilización. Cada vial contendrá una dosis única o dosis múltiples del compuesto. El polvo liofilizado puede almacenarse en condiciones apropiadas, tal como de aproximadamente 4°C a temperatura ambiente.

La reconstitución de este polvo liofilizado con agua para inyección proporciona una formulación para uso en administración parenteral. Para la reconstitución, el polvo liofilizado se agrega a agua estéril u otro vehículo adecuado. La cantidad precisa depende del compuesto seleccionado. Tal cantidad se puede ser determinar empíricamente.

Administración tópica.

Las mezclas tópicas se preparan como se describe para la administración local y sistémica. La mezcla resultante puede ser una disolución, suspensión, emulsiones o similares y se formulan como cremas, geles, ungüentos, emulsiones, disoluciones, elixires, lociones, suspensiones, tinturas, pastas, espumas, aerosoles, irrigaciones, aerosoles, supositorios, vendajes, parches dérmicos o cualquier otra formulación adecuada para administración tópica.

Los compuestos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos se pueden formular como aerosoles para aplicación tópica, tal como por inhalación. Estas formulaciones para administración al tracto respiratorio pueden estar en forma de un aerosol o disolución para un nebulizador, o como un polvo microfino para insuflación, solo o en combinación con un vehículo inerte tal como lactosa. Donde las composiciones se formulan como aerosoles para inhalar o administrar en el tracto respiratorio, las partículas de la formulación pueden tener diámetros de 50 micrómetros o menos, tales como 40 micrómetros o menos, tal como 30 micrómetros o menos, tal como 25 micrómetros o menos, tal como 15 micrómetros o menos, tal como 10 micrómetros o menos, como 5 micrómetros o menos y que incluye tener diámetros de 1 micrómetro o menos.

Los compuestos pueden formularse para aplicación local o tópica, tal como para aplicación tópica en la piel y las membranas mucosas, como en el ojo, en forma de geles, cremas y lociones y para su aplicación en el ojo o para aplicación intracisternal o intraespinal. Se contempla la administración tópica para el suministro transdérmico y también para la administración a los ojos o a la mucosa, o para terapias de inhalación. También se pueden administrar disoluciones nasales del compuesto activo solo o en combinación con otros excipientes farmacéuticamente aceptables.

Estas disoluciones, tales como, por ejemplo, para uso oftálmico, se pueden formular como disoluciones isotónicas al 0,01%-10%, pH de aproximadamente 5-7, con sales apropiadas.

Composiciones para otras rutas de administración

También se contemplan en la presente memoria otras vías de administración, tales como parches transdérmicos, que incluyen dispositivos iontoforéticos y electroforéticos, y administración bucal y rectal.

Los parches transdérmicos, que incluyen dispositivos ioforéticos y electroforéticos de interés, pueden incluir, entre otros, los descritos en las patentes de EEUU n°. 6.267.983, 6.261.595, 6.256.533, 6.167.301, 6.024.975, 6.010.715, 5.985.317, 5.983.134, 5.948.433 y 5.860.957.

Por ejemplo, las formas de dosificación farmacéutica para administración rectal son supositorios rectales, cápsulas y tabletas para efecto sistémico. Los supositorios rectales se usan en la presente memoria como cuerpos sólidos para la inserción en el recto que se funden o reblandecen a temperatura corporal liberando uno o más ingredientes farmacológicamente o terapéuticamente activos. Las sustancias farmacéuticamente aceptables utilizadas en supositorios rectales son bases o vehículos y agentes para aumentar el punto de fusión. Los ejemplos de bases incluyen manteca de cacao (aceite de teobroma), glicerina-gelatina, carbowax (polioxietilenglicol) y mezclas apropiadas de mono-, di- y triglicéridos de ácidos grasos. Se pueden usar combinaciones de las diversas bases. Los agentes para elevar el punto de fusión de los supositorios incluyen espermaceti y cera. Los supositorios rectales se pueden preparar ya sea por el método comprimido o por moldeado. El peso de un supositorio rectal, en una realización, es de aproximadamente 2 a 3 g.

Los comprimidos y las cápsulas para administración rectal se fabrican usando la misma sustancia farmacéuticamente aceptable y por los mismos métodos que para las formulaciones para administración oral.

Formulaciones dirigidas

Los compuestos proporcionados en la presente memoria, o los derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos, también se pueden formular para dirigirse a un tejido, receptor u otra área particular del cuerpo del sujeto a tratar. Muchos de tales métodos de direccionamiento son bien conocidos por los expertos en la materia. Todos estos métodos de direccionamiento se contemplan aquí para su uso en las presentes composiciones. Ejemplos de métodos de interés de focalización pueden incluir, entre otros, los descritos en las patentes de EEUU n°. 6.316.652, 6.274.552, 6.271.359, 6.253.872, 6.139.865, 6.131.570, 6.120.751, 6.071.495, 6.060.082, 6.048.736, 6.039.975, 6.004.534, 5.985.307, 5.972.366, 5.900.252, 5.840.674, 5.759.542 y 5.709.874. En una realización, las suspensiones liposomales, que incluyen liposomas dirigidos a tejidos, tales como liposomas dirigidos a tumores, también pueden ser adecuados como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse según los métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las formulaciones de liposomas se pueden preparar

como se describe en la patente de EEUU nº 4.522.811. Brevemente, liposomas tales como vesículas multilaminares (MLVs) se pueden formar secando fosfatidil colina de huevo y fosfatidil serina de cerebro (relación molar 7:3) en el interior de un matraz. Se agrega una disolución de un compuesto proporcionado en la presente memoria en disolución salina tamponada con fosfato que carece de cationes divalentes (PBS) y se agita el matraz hasta que la película lipídica se dispersa. Las vesículas resultantes se lavan para eliminar el compuesto no encapsulado, se sedimentan por centrifugación y luego se resuspenden en PBS.

Dosis de los compuestos de la presente descripción

Dependiendo del sujeto y la afección a tratar y de la vía de administración, los compuestos en cuestión se pueden administrar en dosis de, por ejemplo, 0,1 µg a 10 mg/kg de peso corporal por día. El intervalo es amplio, ya que en general, la eficacia de un efecto terapéutico para diferentes mamíferos varía ampliamente con dosis que son típicamente 20, 30 o incluso 40 veces más pequeñas (por unidad de peso corporal) en el hombre que en la rata. Del mismo modo, el modo de administración puede tener un gran efecto sobre la dosificación. Por lo tanto, por ejemplo, las dosificaciones orales pueden ser aproximadamente diez veces la dosis de inyección. Se pueden usar dosis más altas para rutas de administración localizadas.

Una dosificación típica puede ser una disolución adecuada para administración intravenosa; una tableta tomada de una a seis veces diariamente, o una cápsula o tableta de liberación prolongada tomada una vez al día y que contiene un contenido proporcionalmente más elevado de ingrediente activo, etc. El efecto de liberación en el tiempo se puede obtener mediante materiales de cápsula que se disuelven a diferentes valores de pH, mediante cápsulas que se liberan lentamente por presión osmótica, o por cualquier otro medio conocido de liberación controlada.

Los expertos en la materia apreciarán fácilmente que los niveles de dosis pueden variar en función del compuesto específico, la gravedad de los síntomas y la susceptibilidad del sujeto a los efectos secundarios. Dosis preferidas para un compuesto dado se determinan fácilmente por los expertos en la técnica por una variedad de medios.

Aunque la dosificación usada variará dependiendo de los objetivos clínicos a alcanzar, un intervalo de dosificación adecuado es uno que proporciona hasta aproximadamente 1 µg a aproximadamente 1.000 µg o aproximadamente 10.000 µg de la composición sujeto para reducir un síntoma en un sujeto animal.

Se pueden proporcionar formas de dosificación unitaria para administración oral o rectal, como jarabes, elixires y suspensiones en el que cada unidad de dosificación, por ejemplo, cucharadita, cucharada, tableta o supositorio, contiene una cantidad predeterminada de la composición que contiene uno o más compuestos de la invención. De forma similar, las formas de dosificación unitarias para inyección o administración intravenosa pueden comprender el (los) compuesto (s) en una composición como una disolución en agua estéril, disolución salina normal u otro vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como se analiza a continuación, la presente descripción incluye compuestos y composiciones farmacéuticas para estabilizar transtiretina y evitar la disociación del tetrámero de transtiretina mediante la estabilización cinética del estado nativo del tetrámero de transtiretina de la TTR, como los que se encuentran en la sangre, el suero, el líquido cefalorraquídeo, los fluidos del sistema nervioso central (SNC), la retina y los ojos. Como tales, los compuestos y composiciones farmacéuticas de interés incluyen aquellos que son compatibles con los fluidos biológicos de sangre, suero, fluido cerebroespinal, fluidos del sistema nervioso central, retina y los ojos.

Terapia de combinación

Para su uso en los métodos objeto, los compuestos en cuestión se pueden formular con, o administrarse de otro modo, en combinación con otros agentes farmacéuticamente activos, incluidos otros agentes, que pueden modular homeostasis de proteínas intra o extracelularmente y/o estabilidad de proteínas y/o agregación de proteínas y/o plegamiento de proteínas, tales como resveratrol, proteínas de choque térmico, chaperonas proteínicas y sus miméticos.

Los compuestos descritos anteriormente también pueden administrarse en combinación con otras terapias para enfermedades causadas por fibrillas de amiloide TTR. Las terapias para las enfermedades causadas por las fibrillas de amiloide TTR incluyen el trasplante de corazón para la miocardiopatía TTR, el trasplante de hígado, otros estabilizadores cinéticos de TTR, el knock-down de ARN y/o métodos de interferencia de ARN y similares. El compuesto descrito anteriormente se puede administrar antes, después o durante otra terapia para enfermedades causadas por fibrillas de amiloide TTR.

Los compuestos descritos en la presente memoria para uso en terapia de combinación con los compuestos de la presente invención se pueden administrar por la misma vía de administración (por ejemplo, intrapulmonar, oral, enteral, etc.) que los compuestos que se administran. En la alternativa, los compuestos para uso en terapia de combinación con los compuestos de la presente invención se pueden administrar mediante una ruta de administración diferente que los compuestos que se administran.

Los compuestos y composiciones proporcionados en la presente memoria se pueden administrar como el único agente terapéutico o en combinación con otros ingredientes activos. Por ejemplo, los compuestos y composiciones se pueden administrar en combinación con otros compuestos para tratar amiloidosis y trastornos amiloides, que incluyen pero no se limitan a compuestos que se unen y estabilizan TTR y/o compuestos que se dirigen al ARN de TTR y/o compuestos que modulan la expresión de la proteína TTR y/o compuestos que modulan la transcripción del gen y/o compuestos de TTR, que pueden modular la homeostasis de proteínas intra y extracelulares y/o la estabilidad de proteínas y/o la agregación de proteínas y/o el plegamiento de proteínas.

Otros ingredientes activos para terapia de combinación incluyen, pero no se limitan a, compuestos para la modificación de la enfermedad o el tratamiento sintomático de amiloidosis, que incluyen, entre otros, polineuropatía amiloide familiar, miocardiopatía amiloide familiar, amiloidosis cerebral, amiloidosis leptomeníngea, amiloidosis oculoleptomeningial, amiloidosis sistémica senil, amiloidosis vítrea, amiloidosis ocular, hipertiroidismo eutiroideo familiar, amiloidosis gastrointestinal, amiloidosis neuropática, amiloidosis no neuropática, nefropatía, amiloidosis no hereditaria, amiloidosis reactiva/secundaria, enfermedad de Alzheimer, encefalopatía espongiiforme (es decir, enfermedad de Creutzfeldt Jakob, GSS, insomnio familiar fatal), síndrome de Guillain-Barre, demencia frontotemporal, esclerosis múltiple, polineuropatía, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), síndrome de Down, degeneración macular, opacidades vítreas, glaucoma, diabetes tipo II y carcinoma medular tiroideo.

KITS

Se proporcionan kits con dosis unitarias de los compuestos sujeto, generalmente en dosis orales o inyectables. En dichos kits, además de los envases que contienen las dosis unitarias, habrá un prospecto informativo que describirá el uso y los beneficios concomitantes de los medicamentos en el tratamiento de la afección patológica de interés. Los compuestos preferidos y las dosis unitarias son los descritos anteriormente en la presente memoria.

Artículos de fabricación

Los compuestos o derivados farmacéuticamente aceptables se pueden envasar como artículos de fabricación que contienen material de envasado, un compuesto o derivado farmacéuticamente aceptable del mismo proporcionado en la presente memoria, que es eficaz para modular el plegamiento de TTR, o para el tratamiento, prevención o mejora de uno o más síntomas de enfermedades o trastornos mediados por TTR, o enfermedades o trastornos en los que el plegamiento incorrecto de TTR está implicado, dentro del material de envasado, y una etiqueta que indica que el compuesto o composición, o derivado farmacéuticamente aceptable del mismo, se usa para modular el plegamiento de TTR, o para el tratamiento, prevención o mejora de uno o más síntomas de trastornos, o enfermedades mediados por TTR, o enfermedades o trastornos en los que está implicado el plegamiento incorrecto de TTR.

Los artículos de fabricación proporcionados en este documento contienen materiales de envasado. Ejemplos de materiales de envasado farmacéuticos incluyen, pero no se limitan a, blísters, botellas, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, viales, envases, jeringas, botellas y cualquier material de envasado adecuado para una formulación seleccionada y el modo de administración previsto y tratamiento. Una amplia gama de formulaciones de los compuestos y composiciones proporcionados en la presente memoria se contemplan como son una variedad de tratamientos para cualquier enfermedad o trastorno en el que el mal plegamiento de TTR esté implicado como mediador o contribuyente a los síntomas o causa.

MÉTODOS

Hay una serie de ensayos in vitro publicados y bien establecidos que se usan para evaluar la capacidad de los compuestos de ensayo para estabilizar los tetrámeros de TTR o prevenir la formación de fibrillas TTR. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, ensayo de polarización de fluorescencia, ensayo de unión de sonda fluorada, ensayo de calorimetría de titulación isotérmica, ensayo de formación de fibrillas, determinación de la estructura tridimensional del ligando unido a TTR usando cristalografía de rayos X, FRET, cinética de transtiretina disociación tetrámera o formaciones de fibrillas, inmunoblots para evaluar el efecto estabilizador y selectividad de la unión del compuesto a TTR en el suero.

En la presente memoria se proporcionan métodos para usar los compuestos descritos para aumentar la estabilidad de TTR, evitando así que se doblen mal y formen fibrillas de amiloide TTR.

Los estabilizadores de TTR descritos en la presente memoria se pueden usar para disminuir la formación de amiloide de TTR y/o para disminuir la disfunción celular y/o la muerte asociada con la formación de amiloide de TTR. Los estabilizadores TTR se pueden usar para disminuir la formación de amiloide TTR in vitro en un sistema libre de células, in vitro - intra o extracelularmente en cultivo celular, e in vivo, como TTR encontrado en fluidos corporales que incluyen, pero no se limitan a, sangre, suero, líquido cefalorraquídeo, tejido y órganos incluyendo pero no restringido al corazón, el riñón, los nervios periféricos, las meninges, el sistema nervioso central, el ojo (incluida la retina y el fluido vítreo) de un sujeto. Como tales, los métodos para usar los compuestos descritos incluyen administrar los compuestos descritos in vitro, ex vivo o a un sujeto in vivo para aumentar la estabilidad de TTR encontrada en fluidos corporales que incluyen, pero no restringido a sangre, suero, líquido cefalorraquídeo, tejidos y

órganos, incluidos, entre otros, el corazón, el riñón, los nervios periféricos, las meninges, el sistema nervioso central, los ojos...

5 La formación de fibrillas amiloides se puede determinar usando un ensayo de turbidez in vitro en un sistema libre de células. El ensayo de turbidez puede usar un TTR de tipo salvaje o un TTR mutante con una tendencia incrementada a formar fibrillas amiloides. Cuando se usa un TTR de tipo salvaje, la amiloidogénesis TTR se puede iniciar por acidificación de TTR o la adición de urea. Cuando se usa un mutante de TTR con una tendencia incrementada a formar fibrillas amiloides, también se puede usar acidificación de TTR o adición de urea.

10 Los estabilizadores de TTR descritos en la presente memoria se pueden usar para disminuir la formación de amiloide TTR en una célula, tales como las células encontradas en fluidos corporales que incluyen, pero no se limitan a, sangre, suero, fluido cerebroespinal, tejido y órganos incluyendo, pero no restringidos al corazón, riñón, nervios periféricos, meninges, el sistema nervioso central, el ojo (incluida la retina y el fluido vítreo) de un sujeto.

15 También se proporcionan métodos para la estabilización de transtiretina en un tejido o en un fluido biológico, y de ese modo inhiben la disociación y/o el mal plegamiento. Generalmente, el método comprende administrar al tejido o fluido biológico una composición que comprende una cantidad estabilizante de un compuesto descrito en la presente memoria que se une a transtiretina y evita la disociación del tetrámero de transtiretina por estabilización cinética del estado nativo del tetrámero de transtiretina. Como tal, métodos para usar los compuestos descritos incluyen
20 administrar al tejido o fluido biológico una composición que comprende una cantidad estabilizante de un compuesto descrito en la presente memoria que se une a transtiretina y previene la disociación del tetrámero de transtiretina mediante la estabilización cinética del estado nativo del tetrámero de transtiretina de TTR encontrado en la sangre, suero, líquido cefalorraquídeo, fluidos del sistema nervioso central, retina y los ojos. En general, el método implica la
25 administración al tejido o al fluido biológico una cantidad estabilizante de un compuesto proporcionado en la presente memoria que se une a TTR y evita la disociación del tetrámero de TTR mediante la estabilización cinética del estado nativo del tetrámero de TTR.

Por lo tanto, los métodos que estabilizan la TTR en un tejido enfermo mejoran el mal plegamiento y disminuyen los síntomas de una enfermedad asociada y, dependiendo de la enfermedad, pueden contribuir a la cura de la
30 enfermedad. También se contempla en la presente memoria la inhibición del plegamiento erróneo de TTR en un tejido y/o dentro de una célula. El grado de mal plegamiento y, por lo tanto, el grado de inhibición logrado mediante los presentes métodos, puede evaluarse mediante una variedad de métodos, tales como los que se describen en los ejemplos y en la publicación de solicitud de patente internacional n°. WO 2004/056315. La descripción de la solicitud mencionada anteriormente se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad.

35 Por lo tanto, los métodos que estabilizan la transtiretina en un tejido enfermo mejoran el mal plegamiento y disminuyen los síntomas de una enfermedad asociada y, dependiendo de la enfermedad, pueden contribuir a la cura de la enfermedad. La enfermedad objetivo de los métodos de la presente descripción puede variar y puede incluir aquellas enfermedades que resultan del mal plegamiento de proteínas (por ejemplo, plegamiento de TTR) o
40 enfermedades asociadas con una tendencia incrementada a formar fibrillas amiloides del tetrámero de TTR encontrado en los fluidos corporales tales como sangre, suero, líquido cefalorraquídeo, fluidos del sistema nervioso central y ojos. La invención contempla la inhibición del plegamiento incorrecto de TTR en un tejido y/o dentro de una célula. El grado de plegamiento incorrecto, y por lo tanto el grado de inhibición logrado por los métodos presentes, se puede evaluar mediante una variedad de métodos, tales como los que se describen en los ejemplos.

45 Por consiguiente, en otro aspecto, la invención incluye un compuesto para uso en un método para tratar una enfermedad amiloide TTR, comprendiendo el método administrar a un sujeto diagnosticado con una enfermedad amiloide TTR una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto que estabiliza el estado nativo del tetrámero TTR.

50 En una realización, la invención presenta un compuesto para uso en un método para tratar una enfermedad de amiloide TTR, el método comprende administrar a un sujeto diagnosticado con una enfermedad de amiloide TTR una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto descrito anteriormente que estabiliza el tetrámero de TTR.

55 La enfermedad amiloide TTR puede ser, por ejemplo, polineuropatía amiloide familiar, cardiomiopatía amiloide familiar, amiloidosis sistémica senil, amiloidosis central o amiloidosis ocular.

60 El sujeto tratado con compuestos para su uso en los presentes métodos puede ser un sujeto humano, aunque se debe entender que los principios de la invención indican que la invención es eficaz con respecto a todos los mamíferos.

Evaluación de la actividad de los compuestos

65 Se pueden usar varias pruebas in vitro para evaluar los compuestos por su capacidad de estabilizar tetrámeros TTR o prevenir la formación de fibrillas. Las pruebas pueden incluir un ensayo de formación de fibrillas, un ensayo de selectividad de plasma, determinación de la estructura tridimensional de un complejo de TTR: complejo compuesto

3-(3-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il) propoxi)-4-fluorobenzoato de metilo (compuesto 4); una disolución de 2 (780 mg, 2,69 mmol, 1 equiv) en benceno (3 ml) se añadió gota a gota a una disolución de acetil acetona (0,552 ml, 5,38 mmol, 2 equiv) y DBU (0,804 ml, 5,38 mmol, 2 equiv) en benceno (7 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice, 1-10% EtOAc/hexanos) para proporcionar el compuesto 3 que se usó en la siguiente etapa directamente. Se añadió hidrato de hidrazina (0,36 ml, 6,73 mmol, 2,5 equiv) a una disolución 3 en etanol (5 ml) y la reacción se calentó a reflujo durante 4 horas. La reacción se concentró y purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice, 1-20% MeOH/CH₂Cl₂) para proporcionar el compuesto 4 (288 mg, 35% de rendimiento) en dos etapas; ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ 7,64-7,58 (m, 2H), 7,20-7,15 (m, 1H), 4,01 (t, 2H, J = 6,0 Hz), 3,86 (s, 3H), 2,58 (t, 2H, J = 7,2 Hz), 2,12 (s, 6H), 1,97-1,92 (m, 2H); HRMS (DART) m/z: calculado para C₁₆H₁₉FN₂O + H⁺ 307,1458; encontrado 307,1452 (M + H⁺).

Ácido 3-(3-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il) propoxi)-4-fluorobenzoico (compuesto VIIIc); a una suspensión de 4 (100 mg, 0,33 mmol, 1 equiv) en una mezcla de THF (3 ml) y agua (3 ml) se añadió LiOH·H₂O (27,5 mg, 0,66 mmol, 2 equiv). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 14 horas, después de lo cual se enfrió a 0°C y se acidificó cuidadosamente a pH 2-3 con HCl acuoso 1N. La mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 30 ml) y los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron al vacío. El producto crudo se sometió a cromatografía de columna instantánea (gel de sílice, 10-50% MeOH/CH₂Cl₂) para dar el compuesto VIIIc (68 mg, 71% de rendimiento) como un sólido blanco (> 98% de pureza por HPLC); ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ 7,65-7,58 (m, 2H), 7,20-7,14 (m, 1H), 4,00 (t, 2H, J = 6,0 Hz), 2,58 (t, 2H, J = 5,8 Hz), 2,12 (s, 6H), 1,97-1,92 (m, 2H); HRMS (DART) m/z: calculado para C₁₅H₁₇FN₂O₃ + H⁺ 293,1301; encontrado 293,1293 (M + H⁺).

3-(3-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il) propoxi)-4-fluorobenzamida. A una suspensión de 4 (100 mg, 0,33 mmol, 1 equiv) en una mezcla de THF (3 ml) y agua (3 ml) se añade (23,1 mg, 0,66 mmol, 2 equiv) de NH₄OH. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 14 horas, después de lo cual se enfría a 0°C y se ajusta cuidadosamente a pH 7 con HCl acuoso 1N. La mezcla se extrae con EtOAc (3 x 30 ml) y los extractos orgánicos combinados se secan sobre sulfato de sodio anhidro y se concentran al vacío. El producto bruto se somete a cromatografía de columna instantánea (gel de sílice, 10-50% MeOH/CH₂Cl₂) para dar 3-(3-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il) propoxi)-4-fluorobenzamida.

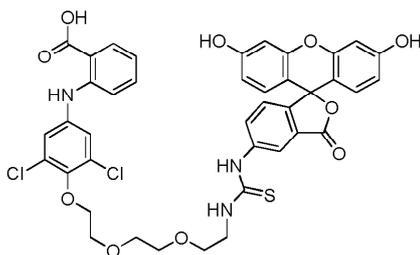
N-etil 3-(3-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il) propoxi)-4-fluorobenzamida. A una suspensión de 4 (100 mg, 0,33 mmol, 1 equiv) en una mezcla de THF (3 ml) y agua (3 ml) se agrega (27,1 mg, 0,66 mmol, 2 equiv) de C₂H₅NH₂. La mezcla de reacción se ajusta a pH 9,0 con NaOH 5N, luego se agita a temperatura ambiente durante 14 horas, después de lo cual se enfría a 0°C y se ajusta cuidadosamente a pH 7 con HCl acuoso 1N. La mezcla se extrae con EtOAc (3 x 30 ml) y los extractos orgánicos combinados se secan sobre sulfato de sodio anhidro y se concentran al vacío. El producto bruto se somete a cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice, 10-50% MeOH/CH₂Cl₂) para dar N-etil 3-(3-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il) propoxi)-4-fluorobenzamida.

Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

Las valoraciones calorimétricas se llevaron a cabo en un calorímetro VP-ITC (MicroCal, Northhampton, MA). Se preparó una disolución del compuesto de prueba (compuesto VIIIc, compuesto A y tafamidis) (25 μM en PBS pH 7,4, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, DMSO al 8%) y se tituló en una célula ITC que contenía 2 μM de TTR en un tampón idéntico. Antes de cada titulación, todas las muestras se desgasificaron durante 10 minutos. Se inyectaron 37 inyecciones de compuestos de prueba (8,0 μl cada una) en la celda de ITC (a 25°C) hasta el punto de que TTR estaba completamente saturado con ligando. La integración del termograma después de la resta de espacios en blanco produjo una isoterma de unión que se ajusta mejor a un modelo de dos sitios interactivos que muestran una cooperatividad negativa. Los datos fueron ajustados por un enfoque de mínimos cuadrados no lineales con cuatro parámetros ajustables: K_{d1}, ΔH1, K_{d2} y ΔH2 utilizando el módulo de análisis de datos de ITC en el software MicroCal ORIGIN 5.0.

Ensayos de enlace de polarización de fluorescencia

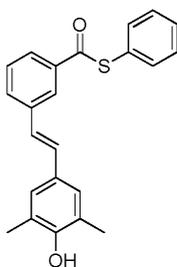
Determinación del desplazamiento de la sonda FP por ligandos TTR. La afinidad de los compuestos de prueba por TTR se determinó por su capacidad para desplazar la sonda FP de TTR usando nuestro ensayo desarrollado recientemente (Alhamadsheh y col., Science Translational Medicine (2011)). En placas negras de 384 pocillos (E & K Scientific, nº EK-31076), sonda FP 5 (200 nM) se incubó con TTR (400 nM) en tampón de ensayo (PBS pH 7,4, 0,01% Triton-X100, 1% DMSO en volúmenes finales de 25 μl) a temperatura ambiente. El compuesto VIIIc, el compuesto A y tafamidis se añadieron después a los pocillos con una concentración única de 10 μM. Las muestras se dejaron equilibrar por agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente y se tomaron medidas de polarización de fluorescencia (excitación λ 485 nm, emisión λ 525 nm, corte λ 515 nm) usando SpectraMax M5 Microplate Reader (Molecular Devices). Los datos se ajustaron a la siguiente ecuación $[y = (A-D) / (1 + (x / C)^B) + D]$ donde A = señal FP máxima, B = pendiente, C = constante de unión aparente (K_{app}), y D = señal FP mínima. La constante de unión aparente se informó como la media para los experimentos por triplicado y el mejor ajuste de datos se determinó por el valor de R².



Sonda FP 5

5 Ensayo de selectividad TTR en suero.

La afinidad de unión y selectividad de los compuestos de prueba por TTR se determinó por su capacidad de competir por la sonda covalente 6 (mostrada a continuación) que se une a TTR en suero humano como se informó previamente (Choi et al., *Bioorg Med. Chem* (2011)). Se mezclaron 98 μ l de suero humano (Sigma-Aldrich) con 1 μ l de compuestos de prueba (disolución patrón 1,0 mM en DMSO, concentración final: 10 μ M) y 1 ml de sonda covalente 6 (disolución patrón 0,36 mM en DMSO: concentración final: 3,6 μ M). Los cambios de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 328$ nm y $\lambda_{\text{em}} = 384$ nm) se controlaron cada 10 min usando un lector de espectrofotómetro de microplacas (Molecular Devices SpectraMax M5) durante 6 h a 25°C.



Sonda covalente 6

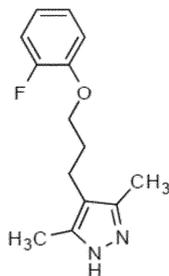
Medición de la estabilidad del tetrámero W-TTR sérico frente a la desnaturalización ácida. Todos los compuestos fueron 10 mM de disoluciones patrón en DMSO y se diluyeron en consecuencia con DMSO para diferentes ensayos. Se añadieron 0,5 μ l de cada compuesto a 24,5 μ l de suero humano (de plasma AB humano masculino, Sigma) para obtener la concentración final de 10 μ M. Las muestras se incubaron a 37°C durante 2 h, y luego 10 μ l de las muestras se diluyeron 1:10 con tampón de acidificación (pH 4,0, acetato de sodio 100 mM, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM). Las muestras para 0 horas se entrecruzaron directamente con glutaraldehído (concentración final de 2,5%) durante 5 minutos, y luego se inactivó con 10 μ l de disolución de borohidruro sódico al 7% en NaOH 0,1 M; mientras que las muestras en tampón de acidificación se incubaron a temperatura ambiente durante 72 h y luego se reticularon y se inactivaron con el mismo protocolo. Todas las muestras se desnaturalizaron con la adición de 100 μ l de tampón de carga de gel SDS y se hirvieron durante 5 minutos. Se separaron 12,5 μ l de cada muestra en geles de SDS-PAGE al 12% y se analizaron por inmunotransferencia usando antisuero anti-TTR (DAKO A0002). La normalización se hizo dividiendo cada valor de la intensidad de la banda del tetrámero TTR por el promedio de todos los valores en el tiempo 0.

Medición de la estabilidad del tetrámero V122I-TTR en suero frente a la desnaturalización ácida. Sujetos: se obtuvieron muestras de dos pacientes con la mutación V122I TTR (mutación confirmada por secuenciación/prueba: "titulación de ADN de amiloidosis"); el análisis de transferencia Western se realizó como se describió anteriormente para TTR de tipo salvaje. Todo el valor de la intensidad de la banda del tetrámero TTR se normalizó mediante la muestra tratada con DMSO en el tiempo 0 que se estableció en 1.

Ensayo de citotoxicidad. Se sembraron 5×10^3 células en 80 μ l de medio de crecimiento (excepto $2,5 \times 10^4$ células Jurkat) en cada pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron O/N a 37°C. Se añadieron 20 μ l de medio de crecimiento fresco que contenía cada compuesto a cada pocillo para hacer que la concentración final oscilase entre 1-100 μ M. DMSO fue utilizado para la normalización. Se ensayó la titulación celular cada 24 horas usando el kit de ensayo de proliferación celular no radiactiva CellTiter 96 (Promega, Madison, WI) a 560 nm de absorbancia.

45

DISEÑO Y SÍNTESIS DEL COMPUESTO VIIC



Compuesto A

5
10
15
20
25

Anteriormente se informó la primera pantalla de alto rendimiento (HTS) para ligandos TTR, que nos permitió identificar una variedad de estabilizadores cinéticos de TTR potentes y estructuralmente diversos tales como el compuesto A (Alhamadsheh y col., Science Translational Medicine, 2011). El anillo de 2-fluorofenilo del compuesto A ocupaba la cavidad de unión externa, colocando una porción del anillo de arilo en el bolsillo de unión a halógeno (HBP) 1 o 1'. Con esta observación y datos de SAR adicionales obtenidos de otros ligandos, se predijo que la introducción de un ácido carboxílico en el anillo de 2-fluorofenilo del compuesto A permitiría a la molécula realizar interacciones electrostáticas adicionales con K15 y 15' en la periferia del bolsillo. Nuestra hipótesis es que la formación de enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas con TTR dentro del sitio de unión T₄ daría como resultado una mayor afinidad de unión y una mejor estabilización de TTR. Se sintetizaron una serie de análogos del compuesto A, incluido el compuesto VIIC, que sondearon la posición óptima del resto de ácido carboxílico en el anillo 2-fluorofenilo. En comparación con el candidato clínico tafamidis, encontramos que el compuesto VIIC es un estabilizador altamente eficaz y selectivo de TTR tanto de WT como de V122I. El compuesto VIIC también evita la disociación de V122I-TTR en suero obtenido de pacientes con FAC de manera muy eficaz. El compuesto VIIC no era tóxico en varias líneas celulares, en comparación con el compuesto A, que mostraba toxicidad para ciertas líneas celulares a una concentración más alta (>25 µM). Por lo tanto, incorporando el grupo de ácido carboxílico, desarrollamos el compuesto VIIC, que es más potente y menos tóxico que el HTS, compuesto A. El compuesto VIIC tiene propiedades sorprendentes en comparación con el compuesto A. Los ensayos bioquímicos y biofísicos revelaron importantes conocimientos sobre el mecanismo de cómo el compuesto VIIC puede unir V122I-TTR con alta selectividad y estabilizar el tetrámero TTR.

CARACTERIZACIÓN DE ENERGÍAS DE UNIÓN DE COMPUESTOS VIIC A TTR

30
35
40
45
50

La afinidad de unión del compuesto VIIC a TTR a pH fisiológico se determinó utilizando nuestro ensayo establecido de polarización fluorescente (FP) (figuras 1 y 2). Para comparar, también probamos cuatro potentes estabilizadores de TTR conocidos (tafamidis y diflunisal están en ensayos clínicos para la amiloidosis TTR, T4 es un ligando natural para TTR y resveratrol, un producto natural que se ha demostrado que previene la agregación de TTR in vitro y citotoxicidad de TTR-inducida en cultivo de tejidos) (figura 1). El ensayo de FP es un ensayo competitivo que permite la medición de ligandos que se unen a TTR basándose en su capacidad para desplazar una sonda fluorescente de los sitios de unión de TTR T₄ (sonda FP 5, anterior). Todos los compuestos de prueba fueron capaces de unirse a TTR (purificado a partir de plasma humano) a 10 µM (figura 4). Los dos compuestos superiores, el compuesto VIIC y las tafamidis, se analizaron a continuación en un ensayo FP de dosis-respuesta multipunto (intervalo de concentración entre 0,003 y 100 µM). La constante de unión aparente del compuesto VIIC ($K_{app} = 193$ nM, $R^2 = 0,994$) fue similar a la de tafamidis ($K_{app} = 247$ nM, $R^2 = 0,990$) (figura 2). Muchos ligandos, incluyendo tafamidis ($K_{d1} = 4,4$ nM y $K_{d2} = 280$ nM) (figura 3C), unen TTR con cooperatividad negativa. Utilizamos la calorimetría de titulación isotérmica (ITC) para determinar las constantes de unión del compuesto VIIC a TTR y también para evaluar la cooperatividad entre los dos sitios TTR T₄. Las mediciones ITC mostraron que el K_{d1} del compuesto VIIC ($K_{d1} = 4,8$ nM) era un orden de magnitud menor que el K_{d1} del compuesto A ($K_{d1} = 58$ nM), lo que indica una mayor afinidad del compuesto VIIC por TTR. El análisis de las energías libres asociadas con el compuesto VIIC que se une a TTR muestra una afinidad de unión alta y las constantes de disociación indican que el compuesto VIIC se une a TTR con co-reactividad negativa ($K_{d1} = 4,8$ nM y $K_{d2} = 314$ nM) (figura 3A). A pesar de las afinidades de unión similares del compuesto VIIC y tafamidis (es decir valores de ΔG similares; $\Delta G_1 \sim -11,4$ y $\Delta G_2 \sim -8,8$), la naturaleza de unión de ambos compuestos a TTR es muy diferente. Mientras que la unión del compuesto VIIC es conducida casi en su totalidad entálpicamente ($\Delta H1 = -13,6$ kcal/mol y $\Delta H2 = -7,5$ kcal/mol), la unión a tafamidis es aproximadamente 50% de entropía y 50% de entalpía ($\Delta H1 = -5,0$ kcal/mol y $\Delta H2 = -3,9$ kcal/mol).

COMPUESTO VIIC SE UNE CON ALTA SELECTIVIDAD A WT-TTR EN SUERO HUMANO

55

Para estabilizar el tetrámero de TTR y así prevenir la formación de fibrillas amiloides y el desarrollo de infiltrados cardíacos en pacientes con FAC y SSA, las moléculas pequeñas deben ser capaces de unirse selectivamente a TTR en presencia de más de 4.000 otras proteínas séricas humanas. Examinamos la selectividad de unión del compuesto VIIC a TTR en suero humano mediante un ensayo de competencia conjugado fluorescente usando una sonda covalente 6. La sonda covalente 6 se une selectivamente a TTR en suero y modifica covalentemente K15,

creando un conjugado fluorescente. Los ligandos que se unen con alta selectividad a TTR en suero disminuyen la unión de la sonda covalente 6 a TTR y, por lo tanto, disminuyen la fluorescencia. Todos los compuestos de ensayo (10 μM) se incubaron con suero humano (concentración de WT-TTR $\sim 5 \mu\text{M}$) en presencia de la sonda covalente 6 (3,6 μM) (figura 4). Curiosamente, el compuesto VIIc, que se une con alta afinidad a TTR en tampón, en comparación con tafamidis y compuesto A (70,5 \pm 1,4% y 59,3 \pm 8,7% de unión a sonda, respectivamente), fue el ligando de TTR más selectivo en suero (3,1 \pm 2,9 % de unión de sonda) (figura 4B).

Nuestros experimentos muestran que tanto la selectividad como la eficacia de los estabilizadores cinéticos de TTR se pueden aumentar enormemente cuando se optimiza la orientación del ligando dentro del bolsillo T_4 . Esto se evidencia por el compuesto VIIc que supera al compuesto A y tafamidis en la estabilización de TTR en concentraciones estequiométricas en suero humano. Curiosamente, a pesar las afinidades de unión similares del compuesto VIIc y tafamidis a TTR en tampón, su selectividad por TTR en suero es diferente. La unión a las proteínas séricas es un factor importante para determinar la selectividad global, la toxicidad y la farmacocinética de un fármaco. En comparación con tafamidis y el compuesto A, el compuesto VIIc exhibió una notable selectividad para unirse a TTR en suero humano en presencia de más de 4.000 proteínas séricas humanas tales como albúmina (figuras 4-6). La selectividad de unión excepcional del compuesto VIIc a TTR sérica supera la del ligando natural de TTR, T_4 , así como la de tafamidis y compuesto A.

EL COMPUESTO VIIC AUMENTA LA ESTABILIDAD DE WT-TTR Y V122I-TTR EN SUERO HUMANO FRENTE A LA DISOCIACIÓN Y AMILOIDOGÉNESIS MEDIADAS POR ÁCIDO

Los compuestos se ensayaron en cuanto a su capacidad para estabilizar WT-TTR en suero humano (figura 5). La disociación del tetrámero de TTR a monómeros y la agregación posterior se produce de forma muy ineficiente a pH neutro. Para medir el efecto estabilizante del compuesto VIIc, compuesto A y tafamidis hacia TTR, usamos un ensayo de disociación de tetrámero mediado por ácido. Los compuestos de prueba (10 μM) se preincubaron con suero humano (TTR $\sim 5 \mu\text{M}$) y el pH se redujo a pH 4,0 para inducir la agregación. Se trataron alícuotas, tomadas a las 0 y 72 horas, con glutaraldehído para reticular tetrámeros de TTR que permanecieron intactos en la muestra de suero. Se usó SDS-PAGE seguido de análisis de inmunotransferencia para medir la cantidad de tetrámero de TTR intacto después de 72 horas de tratamiento con ácido en presencia y ausencia de compuestos de prueba. En ensayos clínicos de tafamidis la concentración máxima media ($C_{\text{máx}}$) de tafamidis en el suero de sujetos humanos, después de una dosis diaria de 20 mg, se estimó en alrededor de 7,4 μM (informe de evaluación de Tafamidis Meglumine (Vyndaqel), European Medicines Agency (EMA) (2011) N° de procedimiento: EMEA/H/C/002294). A 10 μM , tafamidis estabilizó aproximadamente el 58% \pm 3% del tetrámero de TTR en suero. El compuesto A proporcionó un efecto estabilizante similar al de tafamidis (61,7% \pm 2,1% de estabilización de tetrámero de TTR a 10 μM). Por el contrario, a 10 μM , el compuesto VIIc fue muy eficaz y estabilizó la mayoría (108 \pm 6%) de suero WT-TTR. El efecto estabilizante drásticamente incrementado del compuesto VIIc en comparación con el compuesto A y tafamidis fue imprevisto y sorprendente. A 10 μM , el compuesto VIIc también fue muy eficaz para estabilizar casi todos el V122I-TTR mutante en muestras de suero de pacientes con FAC ($\sim 100\%$) (figura 6). Debido a su capacidad para estabilizar WT- y V122I-TTR, anticipamos que el compuesto VIIc será eficaz tanto contra SSA como contra FAC.

EL COMPUESTO VIIC NO MUESTRA CITOTOXICIDAD IN VITRO

Los ensayos de citotoxicidad in vitro mostraron que no tiene citotoxicidad in vitro frente a un panel de líneas celulares (figura 7).

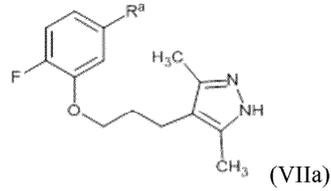
El efecto del compuesto VIIc y tafamidis sobre la viabilidad y proliferación de cuatro líneas celulares se estudió mediante el ensayo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT) (figura 7). Los compuestos se añadieron al medio de cultivo a diferentes concentraciones (intervalo de concentración de 1 a 100 μM) y las células se incubaron durante 24 horas adicionales a 37°C. El compuesto VIIc no mostró efectos citotóxicos hacia ninguna de las líneas celulares que se probaron, mientras el compuesto A muestra citotoxicidad a altas concentraciones ($> 25 \mu\text{M}$) hacia células Hep3B y Hela (figura 7). Estos datos indican que el compuesto VIIc tiene menos citotoxicidad que el compuesto A y sugieren un mejor perfil de seguridad del compuesto VIIc. Los resultados de citotoxicidad de tafamidis fueron similares al compuesto VIIc, excepto hacia las células MCF7, donde los efectos citotóxicos se observaron a concentraciones más altas ($> 50 \mu\text{M}$).

ENSAYO DE SELECTIVIDAD DE TTR EN SUERO

La afinidad de unión y la selectividad de los compuestos de prueba para TTR se determinaron por su capacidad para competir por la unión covalente de sonda 6 a TTR en suero humano como se informó anteriormente (Choi et al., (2011) Bioorg Med Chem. 19: 1505-1514). Se mezcló una alícuota de 98 μl de suero humano (Sigma-Aldrich) con 1 μl de compuestos de prueba (solución patrón 1,0 mM en DMSO, concentración final: 10 μM) y 1 μl de sonda 6 (solución patrón 0,36 mM en DMSO: final concentración: 3,6 μM). Los cambios de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 328 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 384 \text{ nm}$) se controlaron cada 10 min usando un lector de espectrofotómetro de microplacas (Molecular Devices SpectraMax M5) durante 6 h a 25°C. Los resultados de ensayo se muestran en la figura 8.

REIVINDICACIONES

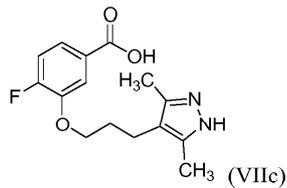
- 5 1. Un compuesto (VIIa):



10 donde R^a es OH, CHO, COOH, CONH₂, CONH(OH), COOR⁶, CONHR⁶; y R⁶ es alquilo lineal o ramificado de 1-3 átomos de carbono; o una sal, éster, enol éter, enol éster, acetal, amida, cetal, ortoéster, hemiacetal, hemicetal, farmacéuticamente aceptables, hidrato o solvato de los mismos.

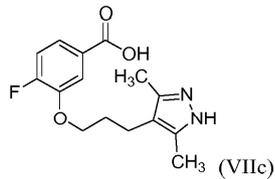
- 15 2. Un compuesto de la reivindicación 1, en donde R^a es COOH, CONH₂, CONH(OH), COOR⁶, CONHR⁶.

3. El compuesto de las reivindicaciones 1 o 2, representado por la estructura del compuesto (VIIc):



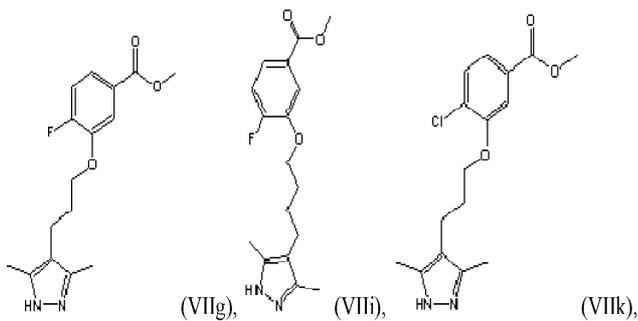
20 o una sal, éster, enol-éter, enol-éster, acetal, amida, cetal, ortoéster, hemiacetal, hemicetal, farmacéuticamente aceptables, hidrato o solvato de los mismos.

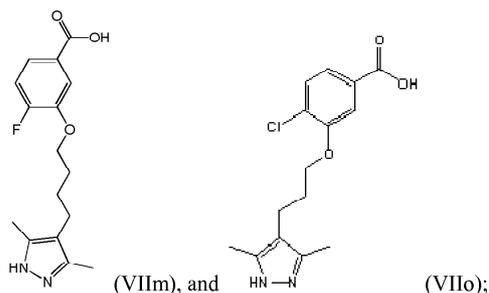
4. El compuesto de la reivindicación 3, representado por la estructura del compuesto (VIIc):



25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 30 5. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:





y una sal, éster, enol-éter, enol-éster, acetal, amida, cetal, ortoéster, hemiacetal, hemicetal, farmacéuticamente aceptables, hidrato o solvato de los mismos.

- 5
6. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10
7. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 ó una composición según la reivindicación 6 para usar en el tratamiento de polineuropatía amiloide familiar, miocardiopatía amiloide familiar, amiloidosis sistémica senil, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Creutzfeldt Jakob GSS, insomnio familiar fatal, demencia frontotemporal, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), síndrome de Down, esclerosis múltiple, polineuropatía, síndrome de Guillain-Barré, degeneración macular, opacidades vítreas, glaucoma, diabetes tipo II o carcinoma medular de la tiroides.
- 15
8. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 ó una composición según la reivindicación 6 para uso en el tratamiento de polineuropatía amiloidea familiar, miocardiopatía amiloide familiar, amiloidosis leptomeníngea, amiloidosis sistémica senil, amiloidosis amiloide ocular central, amiloidosis vítrea o amiloidosis del SNC.
- 20
9. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 ó una composición según la reivindicación 6 para uso en el tratamiento de la polineuropatía amiloide familiar.
- 25
10. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 ó una composición según la reivindicación 6 para usar en el tratamiento de la miocardiopatía amiloide familiar.
- 30
11. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 ó una composición según la reivindicación 6 para uso en el tratamiento de amiloidosis sistémica senil.
- 35
12. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 ó una composición según la reivindicación 6 para uso en el tratamiento de la amiloidosis ocular.
13. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 ó una composición según la reivindicación 6 para uso en el tratamiento de la amiloidosis leptomeníngea.

Figura 1

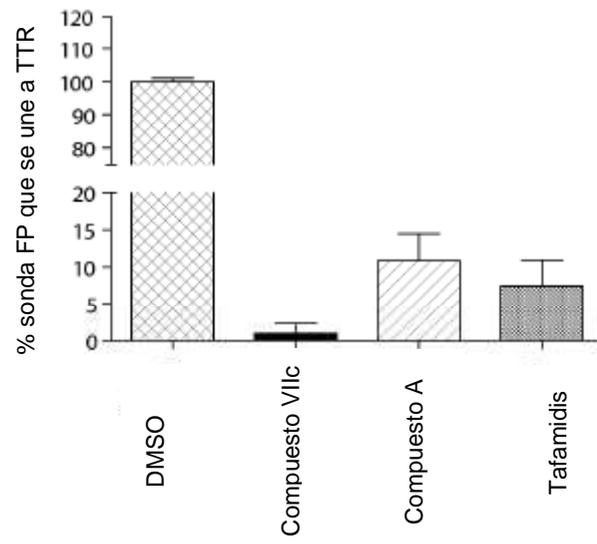


Figura 2

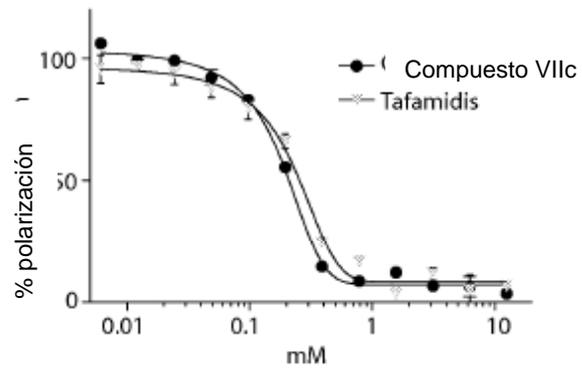


Figura 3

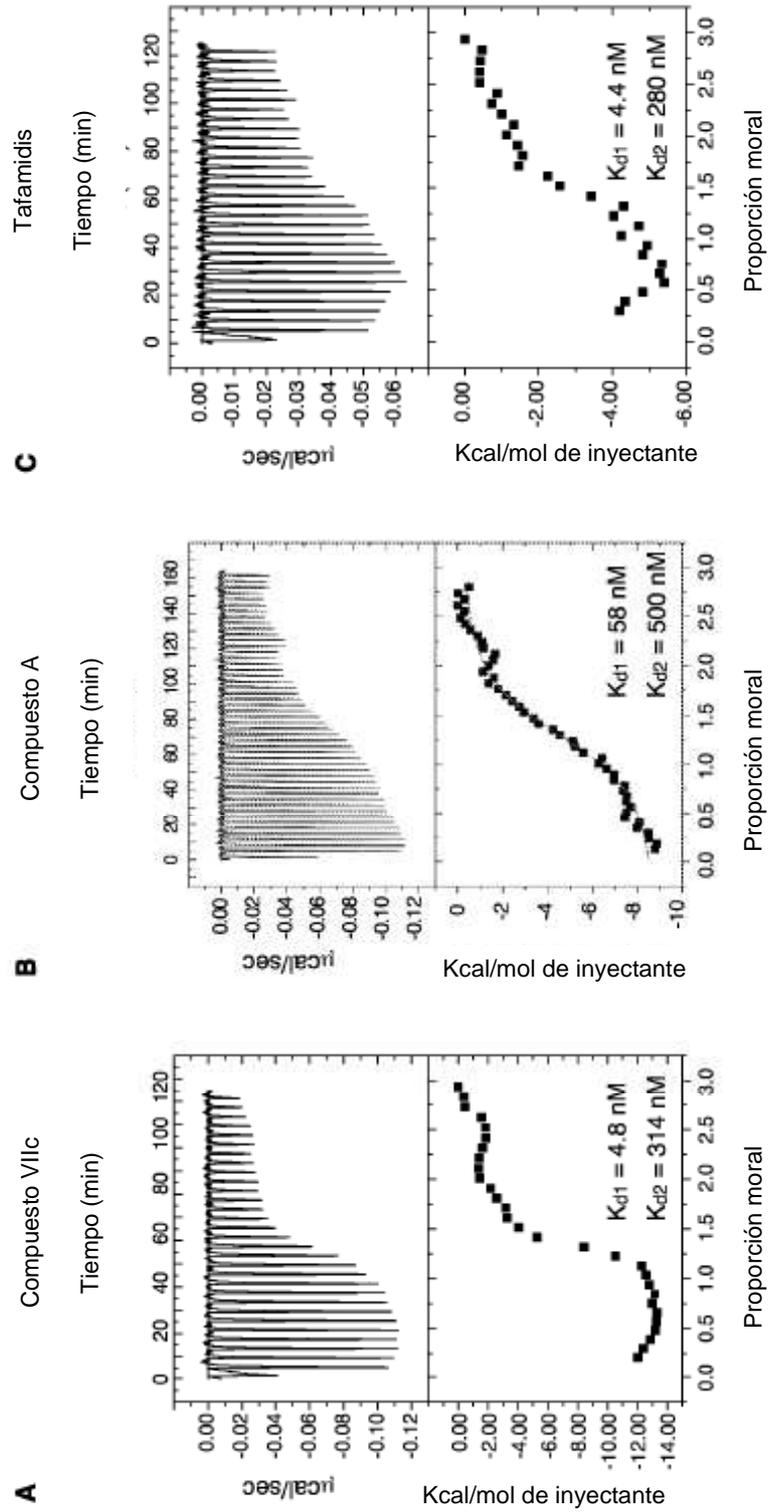


Figura 4

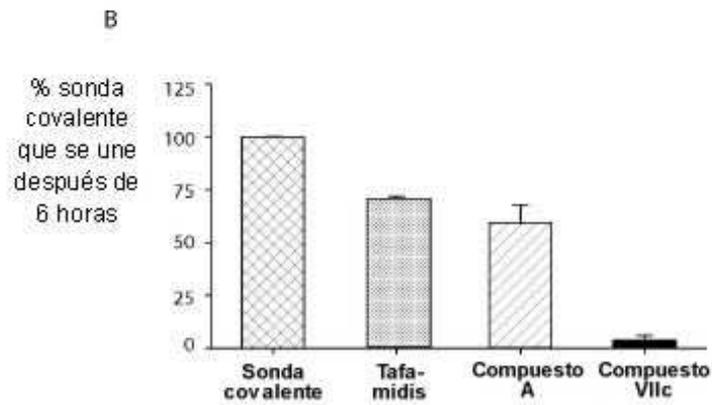
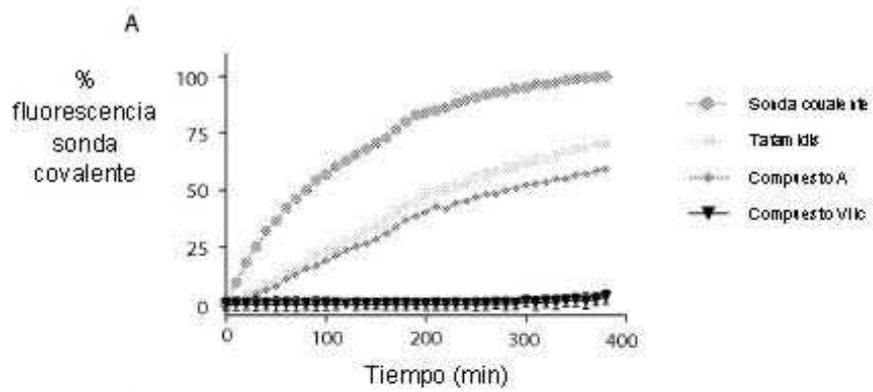


Figura 5

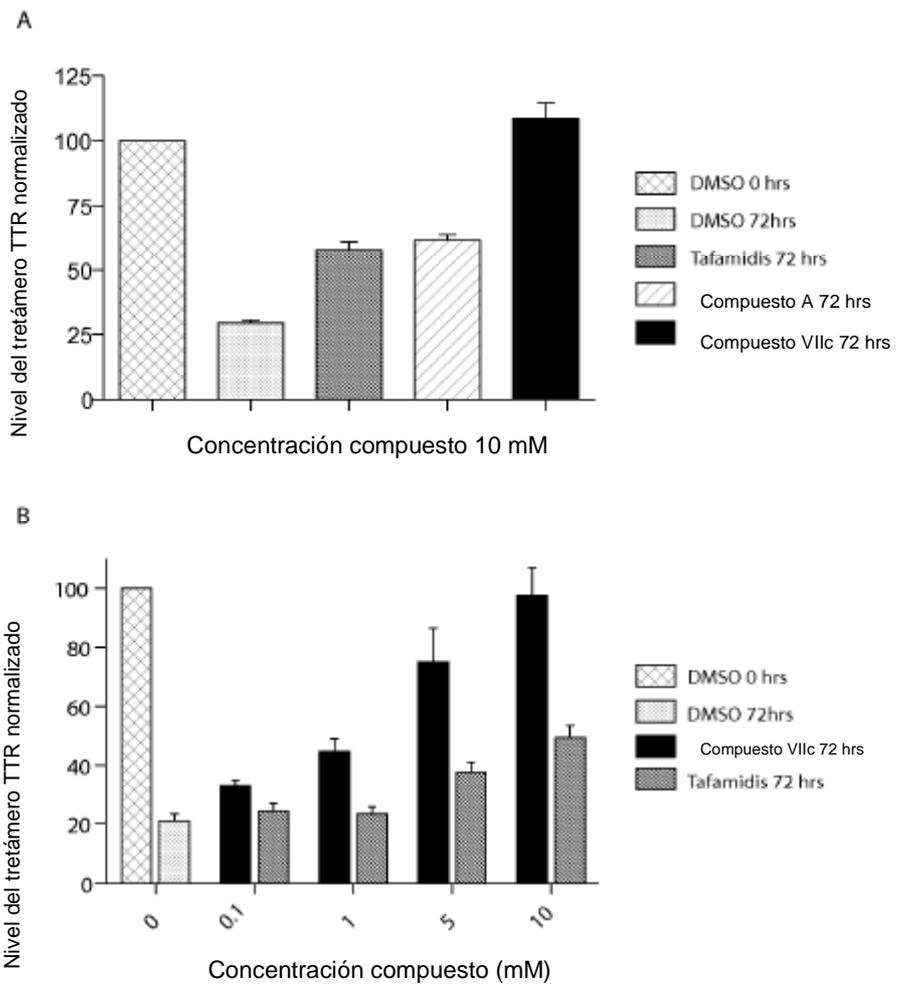
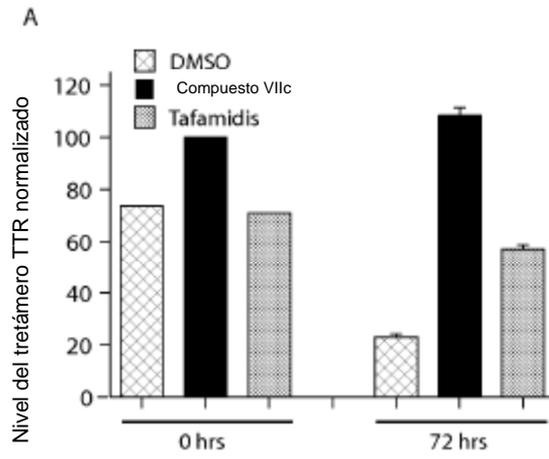
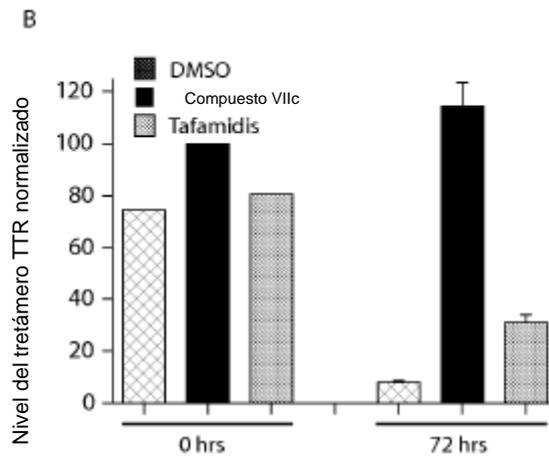


Figura 6



Paciente heterocigótico V122I



Paciente homocigótico V122I

Figura 7

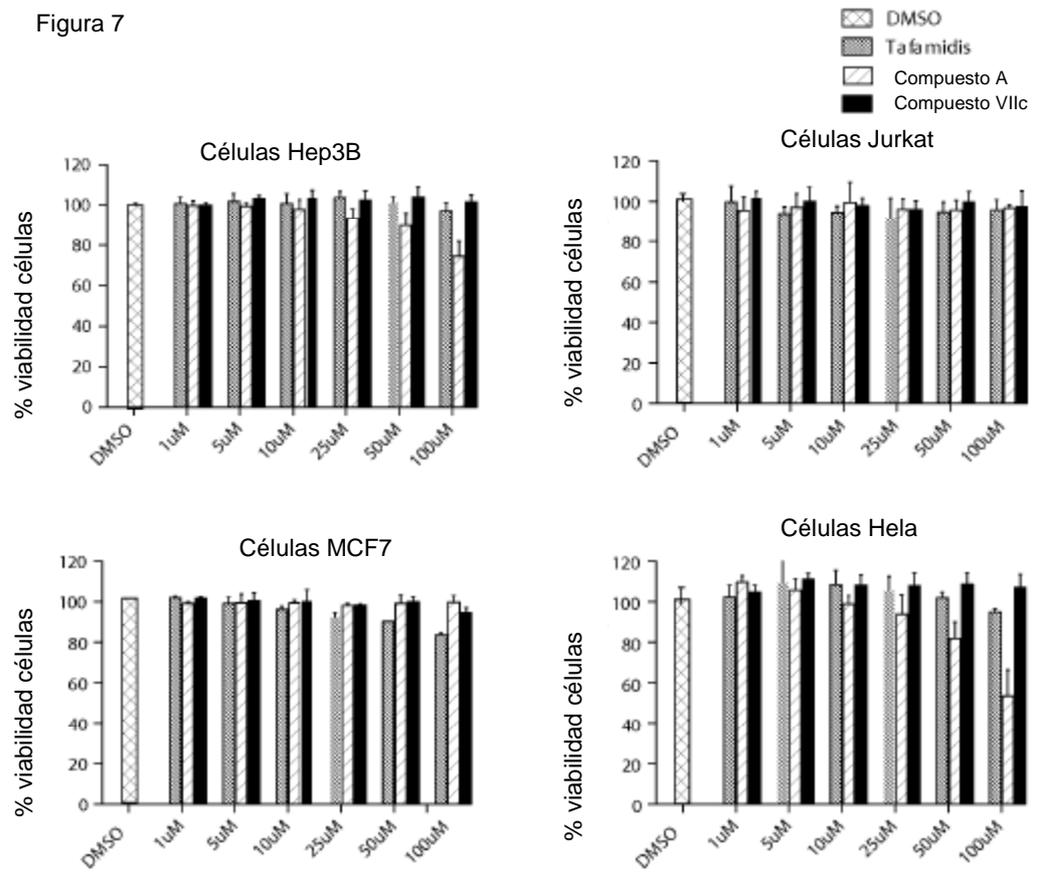


Figura 8

