

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 453**

51 Int. Cl.:

C07D 231/06 (2006.01)
C07D 231/12 (2006.01)
C07D 233/22 (2006.01)
C07D 261/08 (2006.01)
C07D 271/06 (2006.01)
C07D 405/04 (2006.01)
C07D 207/333 (2006.01)
A61K 31/415 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2009 E 13176579 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 2684873**

54 Título: **Fármacos para inhibir la agregación de proteínas implicadas en enfermedades relacionadas con enfermedades neurodegenerativas y/o agregación de proteínas**

30 Prioridad:

09.06.2008 EP 08010458

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.05.2019

73 Titular/es:

LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN (50.0%)
Geschwister-Scholl-Platz 1
80539 München, DE y
MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. (50.0%)

72 Inventor/es:

GIESE, ARMIN;
BERTSCH, UWE;
KRETZSCHMAR, HANS;
HABECK, MATTHIAS;
HIRSCHBERGER, THOMAS;
TAVAN, PAUL;
GRIESINGER, CHRISTIAN;
LEONOV, ANDREI;
RYAZANOV, SERGEY;
FRICK, PETRA;
GEISSEN, MARKUS;
GROSCHUP, MARTIN, H. y
WAGNER, JENS

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o

ES 2 714 453 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).

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 453**

**Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 714 453 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

Fármacos para inhibir la agregación de proteínas implicadas en enfermedades relacionadas con enfermedades neurodegenerativas y/o agregación de proteínas

Compendio de la invención

5 La presente invención se refiere a un compuesto representado por la fórmula (E). La presente invención también se refiere a un compuesto representado por la fórmula (E) para ser usado en el tratamiento o la prevención de enfermedades relacionadas con la agregación de una proteína y/o enfermedades neurodegenerativas. Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas y diagnósticas que comprenden el compuesto de la invención, así como a un kit. Además, la presente invención se refiere a un método para tomar imágenes de los depósitos de la proteína agregada. También se describe un kit para preparar un compuesto marcado detectablemente de la presente invención.

A lo largo del texto de esta especificación se citan varios documentos. El contenido de la descripción de los documentos citados en la presente memoria (entre ellos cualquier especificación del fabricante, instrucciones, etc.) se incorpora en ella por referencia.

Antecedentes de la invención

En M. Ono et al. (*Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16 (2008) 6867-6872) se describen determinadas sondas de β -amiloides basadas en los 3,5-difenil-1,2,4-oxadiazoles.

En la patente de los EE. UU. 2007/0276034 se describen determinados compuestos de bis- y trisdihidroxiarilo y sus análogos de metilendioxi y ésteres farmacéuticamente aceptables, que presuntamente son idóneos para tratar sinucleinopatías.

En la solicitud de patente internacional WO 2008/131148 se describen derivados de difenilheteroarilo específicos y su uso para la fijación y la toma de imágenes de las placas amiloides.

Los compuestos heterocíclicos que son útiles como activadores de NURR-1 se describen en la solicitud de patente internacional WO 2004/072050.

25 El etilenglicol o el polietilenglicol radiomarcado se utiliza como un grupo de marcación en los compuestos que pueden ser útiles para tomar imágenes de tejidos en la solicitud de patente internacional WO 2007/002540.

En la solicitud de patente internacional WO 98/17652 se describen determinados derivados de oxadiazol que se afirma que son idóneos para tratar enfermedades neurodegenerativas y la isquemia cerebral.

30 Se conocen un gran número de enfermedades neurológicas y neurodegenerativas, muchas de las cuales no se pueden curar en la actualidad. Estas enfermedades incluyen afecciones médicas tales como enfermedad de Parkinson, corea de Huntington, enfermedad de Hallervorden-Spatz, enfermedad de Alzheimer, demencia senil, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, demencia arteriosclerótica, tromboangitis obliterante cerebral, demencia con cuerpos de Lewy (DCL), atrofia multisistémica (AMS) y muchas otras.

35 Las enfermedades causadas por los priones, que incluyen enfermedades tales como la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), la tembladera de las ovejas y la encefalopatía espongiiforme bovina (EEB), se caracterizan desde el punto de vista anatomopatológico por una degeneración espongiiforme del cerebro. Las enfermedades causadas por los priones están ocasionadas por un agente infeccioso no convencional que consiste principalmente en la isoforma de la glucoproteína membranaria PrP^C denominada PrP^{Sc}, que es rica en láminas β por estar mal plegada, y forma agregados.

40 Las enfermedades causadas por los priones han provocado una preocupación importante con respecto a la salud pública debido a la aparición de la EEB. Las pruebas científicas sugieren que la EEB se ha transmitido a los humanos y ha ocasionado una nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ) (Will et al., 1996, Bruce et al., 1997). Se desconoce cuántas personas están en la actualidad incubando la enfermedad o se verán afectadas por la vECJ en el futuro. Las pruebas disponibles no descartan una epidemia inminente que afecte a un gran número de pacientes (Andrews et al. 2000). Esto eleva la necesidad de desarrollar un tratamiento eficaz además de aplicar medidas que impidan una posterior diseminación de la enfermedad. Además, las pruebas recientes sugieren que se puede producir la transmisión secundaria por transfusión de sangre (Llewelyn et al., 2004).

50 El acontecimiento central en la patogenia de las enfermedades causadas por los priones es la conversión de la proteína priónica celular PrP^C en la isoforma patológica PrP^{Sc}, que se agrega en grandes agregados proteicos. Esta formación de agregados de PrP^{Sc} es un distintivo de la patogenia de las enfermedades causadas por los priones. Las pruebas disponibles sugieren que la PrP^{Sc} actúa de plantilla para esta conversión y también como un agente neurotóxico que provoca disfunción neuronal y muerte celular (Prusiner 1998, Giese y Kretzschmar, 2001). Por lo tanto, el método terapéutico más prometedor contra las enfermedades causadas por los priones pasa por interferir en la amplificación de la PrP^{Sc}. Las pruebas procedentes del cultivo celular y de los estudios *in vivo* sugiere que una vez que se inhibe la

formación de la PrP^{Sc}, puede tener lugar la eliminación de la PrP^{Sc} (Mallucci, 2003). Así pues, esta estrategia terapéutica también podría ser eficaz más tarde en el periodo de incubación, e incluso después de la manifestación de los signos clínicos de la enfermedad, lo que es esencial para encontrarle uso en el tratamiento de la enfermedad causada por los priones en los humanos.

5 Hay una serie de compuestos que se ha demostrado que son eficaces a la hora de interferir con la amplificación de la PrP^{Sc} *in vitro*, tales como los derivados de la acridina, rojo Congo, porfirinas/ftalocianinas, Cp-60, péptidos disruptores de láminas β y variantes de PrP (Caughey et al., 1998, Chabry et al., 1998, Demaimay et al., 2000, Horiuchi et al., 2000, Perrier et al. 2000, Rudyk et al. 2000, Soto et al., 2000). Sin embargo, ninguno de estos compuestos se han utilizado hasta la fecha con éxito para el tratamiento de las enfermedades o como compuestos de partida para desarrollar
10 compuestos con un incremento de su potencial terapéutico y de sus propiedades farmacológicas.

Las sustancias identificadas hasta la fecha con potencial terapéutico se han descubierto en su mayoría por casualidad. Hasta ahora se han consolidado pocos ensayos *in vitro* idóneos para el cribado masivo de grandes colecciones de compuestos en busca de fármacos con potencial antipriónico. Se han propuesto dos estrategias diferentes para el cribado sistemático en los estudios publicados recientemente: uno que se basa en la levadura (Bach et al., 2003) y otro que utiliza cultivos de células ScN2a infectadas (Kocisko et al., 2004, Kocisko et al., 2003). Sin embargo, estas estrategias permitían el cribado de colecciones limitadas a 2500 y 2000 compuestos, respectivamente, y además necesitaban mucho tiempo.
15

Además de las sustancias de masa molecular baja, en la actualidad se han analizado tres métodos posibles más. Primero, se están utilizando anticuerpos contra PrP para suprimir la formación de PrP^{Sc}. Este método se ha utilizado con éxito en cultivos celulares, así como con ratones por inyección intraperitoneal (Enari et al., 2001; White et al., 2003). Otra estrategia es la aplicación de oligonucleótidos con CpG, que se halló que incrementaban el periodo de incubación en los ratones infectados con el prion de la tembladera de las ovejas (Sethi et al., 2002). Sin embargo, el mecanismo de acción de este método no se ha elucidado hasta ahora. Finalmente, se está debatiendo sobre los siRNA que suprimen la expresión de PrP^C en las neuronas de los animales o humanos infectados. Se ha demostrado que este método inhibe la formación de PrP^{Sc} en los cultivos de células (Daude et al., 2003). Los tres métodos se enfrentan al mismo problema, a saber, que las moléculas atraviesen la barrera hematoencefálica. Debido a este inconveniente, estas estrategias son solo idóneas para la profilaxis en los órganos periféricos después de la exposición, pero no para el tratamiento de la enfermedad en el sistema nervioso central.
20

Otra clase de enfermedades neurodegenerativas, las denominadas sinucleinopatías, se caracterizan por la acumulación intracelular de agregados, oligómeros, protofibrillas y fibrillas de proteína, que contienen principalmente α -sinucleína. En los casos de las sinucleinopatías, se cree que los efectos patológicos sobre las células nerviosas están inducidos por la formación de agregados oligoméricos de α -sinucleína y la posterior formación de poros en la membrana. Los ejemplos de sinucleinopatías son la enfermedad de Parkinson (EP), la demencia con cuerpos de Lewy (DCL) y la atrofia multisistémica (AMS). Hasta la fecha, no hay disponible ninguna estrategia terapéutica para la inhibición de la agregación de la α -sinucleína.
25

Por lo tanto, existe la necesidad de identificar nuevos compuestos idóneos para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con la agregación de una proteína, tales como las enfermedades causadas por los priones y las sinucleinopatías.
30

Así pues, el problema técnico que subyace en la presente invención es la provisión de compuestos para el tratamiento de las enfermedades causadas por los priones, las sinucleinopatías y otras enfermedades caracterizadas por la agregación de una proteína, en particular la enfermedad de Parkinson. Además, existe la necesidad de dar a conocer compuestos que son sondas idóneas para tomar imágenes de los depósitos de proteínas agregadas en los trastornos mencionados más arriba.
35

Descripción de las figuras

45 Figura 1: Mapa de REA generado para DIVERSet 1 y 2, cribado mediante SIFT bidimensional y en cultivo celular. El mapa muestra aglomeraciones de compuestos similares desde el punto de vista estructural (representados por estrellas o cajas) construidas a partir de 837 compuestos positivos del cribado del cultivo celular primario de DIVERSet 1 y 2. A su vez, las aglomeraciones están distribuidas de tal manera que las aglomeraciones parecidas están cercanas unas de otras. Los símbolos que representan las aglomeraciones están con la escala, con la forma y con el color que se corresponden con su tamaño y las proporciones de los activos por SIFT y los activos por cultivo celular, respectivamente, tal y como se explica en la leyenda. Así pues, las aglomeraciones más grandes, que contienen grandes proporciones de activos por SIFT y por cultivo celular, están representados por estrellas rojas grandes. Se seleccionaron cinco aglomeraciones, denominadas de DPP_1 a DPP_5 y se muestran los compuestos prototípicos que representan a estas aglomeraciones.
50

55 Figura 2: Todos los compuestos clasificados en las aglomeraciones identificadas (figura 1) se muestran en la figura 2 de A a F, junto con su actividad en los diferentes ensayos. Todos ellos pertenecen a la clase de compuestos químicos que se obtienen por modificación del 3,5-difenilpirazol (DPP) (compárese con el motivo DPP mostrado en la figura 1). En la figura 2F, se muestra otra aglomeración, DPP_6, que no está contenida en el mapa de REA de la figura 1 y que

contiene un único compuesto activo, según el cultivo celular, con un átomo de N unido al anillo de pirazol. En la figura 2F, se muestran adicionalmente 4 de los 33 compuestos de DPP de DIVERSet 1 y 2, que se halló que eran inactivos en el cultivo celular y a los que el programa DM juzgó que eran diferentes a las seis clases de DPP. Hemos identificado estos compuestos mediante una búsqueda del motivo de DPP en la colección.

5 Figura 3: Lista de compuestos que se sintetizaron de acuerdo con los métodos descritos en el ejemplo 2 basándose en los resultados del cribado inicial y en las consideraciones químicas medicinales. Estos compuestos se analizaron con el uso de diferentes ensayos de comprobación (a saber, SIFT, ensayos con cultivos celulares de modelos de las enfermedades causadas por los priones, pruebas *in vivo* con animales o ensayos bioquímicos de agregación de la α -sinucleína).

10 Figura 4: Efectos del tratamiento sobre el tiempo de supervivencia de los ratones después de la infección intracerebral con la cepa RML de la tembladera de las ovejas. Los compuestos se administraron diariamente durante 14 días a partir del día 80 tras la infección (50 μ l del compuesto a 10 mM). (A) El tratamiento con el compuesto 10353_F11 prolonga la supervivencia de los ratones infectados por vía intracerebral ($p < 0,05$). En (B) se muestra la media de los tiempos de supervivencia después del tratamiento con los diferentes compuestos. Una inyección intraperitoneal al día con los compuestos anle138b y sery149 prolonga significativamente el tiempo de supervivencia después de la provocación con la cepa RML de la tembladera de las ovejas (anle138b: $p < 0,01$; sery149: $p < 0,05$). La media de los tiempos de supervivencia se expresa en días \pm desviación estándar.

15 Figura 5: Influencia del tratamiento sobre la cantidad de PrP^{Sc} en el bazo de los ratones infectados por vía intraperitoneal con la cepa RML de la tembladera de las ovejas. (A) Después de la inoculación con priones de la tembladera de las ovejas, los ratones se trataron una vez al día con el compuesto (25 μ l del compuesto a 100 mM para la administración intraperitoneal y 50 mg/kg para la administración oral). (B) Análisis densitométrico de la cantidad de PrP^{Sc} esplénicos en una inmunotransferencia por puntos. El tratamiento con anle138b indujo una fuerte reducción de la cantidad de PrP^{Sc} en comparación con el control ($p = 0,001$). (C) Análisis inmunohistológico del bazo de los ratones infectados con el prion de la tembladera de las ovejas. Después del tratamiento con anle138b, se incrementa el porcentaje de bazos con poco depósito de PrP^{Sc} (grado +), y desaparecen los depósitos intensos de PrP^{Sc} (grado +++). En (D) se muestran dos ejemplos de depósitos de PrP^{Sc} teñidos (flechas) en el bazo. La imagen de la izquierda muestra una tinción intensa de PrP^{Sc} (grado +++), mientras que la de la derecha muestra poca tinción de PrP^{Sc} (grado +). Las barras indican la cantidad media de PrP^{Sc} \pm error estándar.

20 Figura 6: Inmunotransferencia y análisis histológico del cerebro de los ratones. (A) El tratamiento de los ratones después de la inoculación intracerebral de ratones con la cepa RML de la tembladera de las ovejas comenzó 80 días después de la infección. Se administraron los compuestos en los momentos indicados (25 μ l del compuesto a 100 mM para la aplicación i.p. y 50 mg/kg para la administración oral). (B) Cuantificación de la cantidad de PrP^{Sc} en los homogeneizados de cerebro de los ratones inoculados con priones en los diferentes momentos. El tratamiento con anle138b bloquea completamente la acumulación de PrP^{Sc} en el cerebro. La cantidad de PrP^{Sc} el día 106 está todavía en los valores del día 80. El tratamiento con anle186b conduce a una reducción de la acumulación de PrP^{Sc} en el cerebro de los ratones. (C) Cambio de la cantidad relativa de PrP^{Sc} después del tratamiento con los compuestos en comparación con el control sin tratar el día 80. (D) Evaluación histológica de células apoptóticas (flecha en (E)) en cortes de cerebro teñidos con hematoxilina y eosina (HE) en los momentos indicados. El gráfico de líneas muestra el número medio de células apoptóticas \pm error estándar. En (E) se muestra un corte teñido con HE con una célula apoptótica (flecha).

25 Figura 7: Prolongación del tiempo de supervivencia mediante la administración diaria de los compuestos de la invención. Los ratones, que se han infectado por vía intracerebral con la cepa RML de la tembladera de las ovejas, muestra una prolongación del tiempo de supervivencia hasta alcanzar la etapa terminal de la infección de la tembladera de las ovejas.

30 Figura 8: Supresión de la agregación de la α -sinucleína por los compuestos de la invención. (A) El compuesto de DPP 351F11 es capaz de inhibir la formación de complejos multiméricos de α -sinucleína de un modo dependiente de la dosis. (B) (C) Detección del efecto inhibitor dependiente de la dosis sobre la agregación de la α -sinucleína que presentan otros compuestos relacionados con el DPP.

35 Figura 9: Cultivos celulares infectados con priones y tratados con los compuestos relacionados con DPP de la invención. Los compuestos relacionados con DPP mostraban una fuerte reducción de PrP^{Sc} en el cultivo celular a unas concentraciones micromolares bajas e incluso submicromolares.

40 Figura 10: Influencia del tratamiento diario con anle138b sobre la acumulación de PrP^{Sc} y la enfermedad causada por los priones en los ratones infectados con la cepa RML de la tembladera de las ovejas. (A) Los cortes de cerebro teñidos para la PrP^{Sc} (fila superior: corteza e hipocampo, fila inferior: cerebelo) muestran que el tratamiento con anle138b reduce la acumulación de PrP^{Sc} en comparación con los animales tratados con DMSO. (B) La cuantificación de la cantidad de PrP^{Sc} en los homogeneizados de cerebro de los ratones inoculados con priones en los momentos indicados demuestra que se reduce mucho la acumulación de PrP^{Sc} en los ratones tratados con anle138b, incluso después del comienzo del tratamiento en una etapa tardía de la enfermedad (120 dpi). (C) La cuantificación histológica de las células apoptóticas en el cerebelo en los cortes de cerebro teñidos con HE demuestra que la inhibición de la

acumulación de PrP^{Sc} da lugar a la inhibición de la muerte celular de las neuronas. (D) Los ratones de control tratados con DMSO más mantequilla de cacahuete sin el compuesto muestran un adelgazamiento progresivo. El tratamiento con anle138b desde los 80 dpi en adelante impide el adelgazamiento durante aproximadamente 100 días. El tratamiento desde los 120 dpi inhibe el adelgazamiento durante aproximadamente 70 días. Las barras de error en B y C indican el error estándar ($n = 4$ ratones). La leyenda que se muestra en la figura B también se aplica a las figuras C y D.

Figura 11: Comparación de diferentes protocolos de tratamiento. El tratamiento con anle138b en diferentes momentos y con diferentes pautas, tal y como se indica en la figura, prolongaron significativamente los tiempos de supervivencia después de la provocación con la cepa RML de la tembladera de las ovejas ($p < 0,01$). La media de los tiempos de supervivencia se expresan en días \pm desviación estándar.

Figura 12: Efecto dependiente de la dosis que presenta la administración de anle138b sobre la cantidad de PrP^{Sc} en el cerebro. Los ratones C57BL/6 se inocularon por vía intracerebral (i.c.) con 30 μ l del homogeneizado de cerebro al 1% (cepa RML de la tembladera de las ovejas). El tratamiento comenzó 80 días después de la infección con la aplicación de diferentes cantidades de anle138b (tal y como se muestra en la figura) por vía oral mezclado con DMSO y mantequilla de cacahuete. A los 120 días de la infección, se sacrificaron los animales y se cuantificó la cantidad de PrP^{Sc} en el cerebro en comparación con los animales sacrificados 80 días después de la infección. Las barras de error indican el error estándar ($n = 4$ ratones).

Figura 13: Cuantificación de PrP^{Sc} por inmunotransferencia del tejido cerebral de los ratones sin infectar tratados con 1 mg al día de anle138b mezclado con DMSO y mantequilla de cacahuete durante 1 semana. Cada barra representa cuatro ratones en cada grupo.

Figura 14: Análisis farmacocinético de anle138b. A los ratones C57BL/6 sin infectar se les aplicó una dosis única de anle138b tal y como está indicado. En diferentes momentos después de la aplicación, se midió por LC-MS la cantidad del compuesto en el cerebro y en el suero para 2 animales por momento y el grupo experimental.

Figura 15: Inhibición de la formación de agregados de α -sinucleína debida a diferentes compuestos. Se muestra la estructura de los compuestos ensayados en la tabla 2.

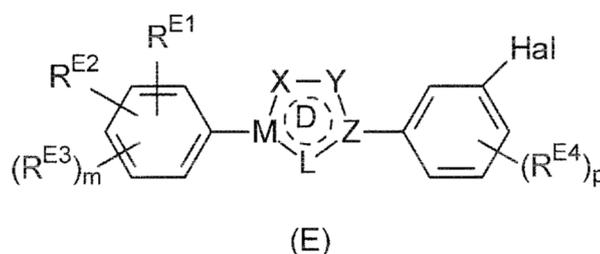
Figura 16: Cuantificación de la pérdida de neuronas en los ratones tratados con MPTP en comparación con los ratones sin tratar con MPTP, según se evaluó mediante la determinación de las células de la sustancia negra compacta (SNc) que dan positivo para la tirosina hidroxilasa (TH) en cortes de 50 μ m inmunoteñidos con un anticuerpo anti-TH. Se analizó un corte de cada dos a lo largo de la SNc con el programa informático Stereo Investigator (MicroBrightfield, Colchester, VT, EE. UU.). Las células inmunoteñidas se contaron mediante el método del fraccionador óptico con un objetivo de 20 \times . Los recuentos estereológicos los realizaron con anonimato dos investigadores independientes.

Figura 17: Efecto de anle138c en la agregación de A β . La agregación de A β se analizó mediante dispersión óptica dinámica. A β 40 monomérica y oligomérica en ausencia (panel superior) y presencia (panel central) de anle138. El panel inferior muestra la distribución por tamaños del estado fibrilar amiloide de A β 40, medido después de centrifugar la muestra.

Descripción detallada de la invención

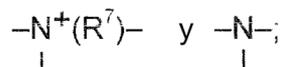
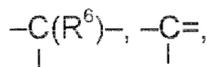
La invención se resume mediante las realizaciones recogidas en las reivindicaciones. Se debe saber que las combinaciones de todas las realizaciones preferidas recogidas de aquí en adelante y en las reivindicaciones se considera que están dentro del alcance de la presente descripción.

La presente descripción se refiere a un compuesto representado por la fórmula general (E)



En el anillo, D, se seleccionan X, Y y L de manera independiente y no direccional de -C(R¹)(R²)-, -C(R³)=, -N(R⁴)-, -N=, -N⁺(R⁵)=, -O- y -S-;

M y Z se seleccionan de manera independiente y no direccional de



--- representa un doble enlace optativo.

Es evidente por sí mismo que X, Y, Z, L y M se seleccionarán según lo permitan la valencia y la estabilidad.

5 $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4, \text{R}^5, \text{R}^6$ y R^7 se seleccionan independientemente de hidrógeno; alquilo(C_{1-4}); alquileno(C_{1-4})-halógeno; -alquileno(C_{1-4})-OH; -alquileno(C_{1-4})-alcoxi(C_{1-4}); -C(O)-alquilo(C_{1-4}); y arilo(C_{6-10}), en donde el anillo de arilo puede estar sustituido optativamente por alquilo(C_{1-4}) o halógeno. El grupo arilo(C_{6-10}) no está particularmente limitado y se puede, p. ej., seleccionar de fenilo y naftilo. El átomo de halógeno puede ser F, Cl, Br o I y es típicamente F o Cl.

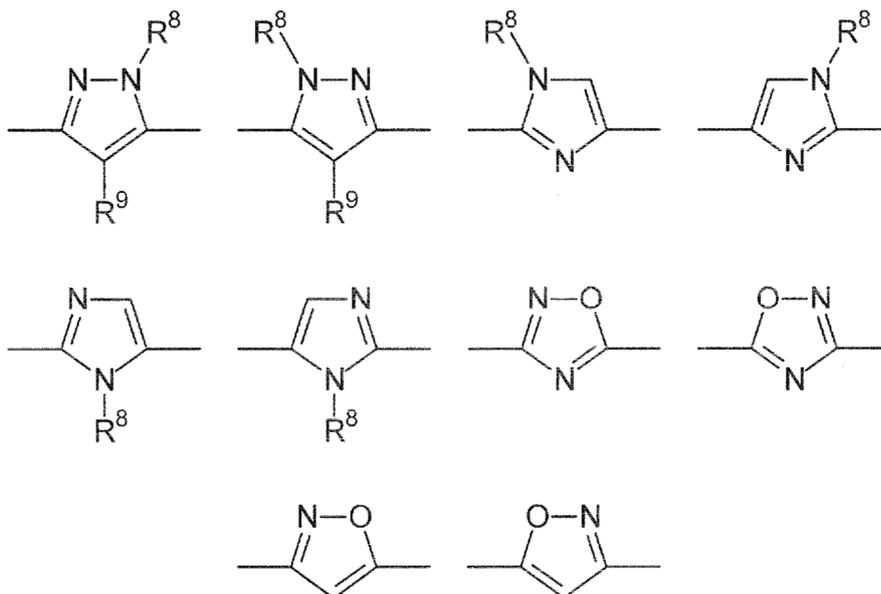
10 Preferiblemente, $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4, \text{R}^5, \text{R}^6$ y R^7 se seleccionan independientemente de hidrógeno; alquilo(C_{1-4}); -alquileno(C_{1-4})-halógeno; -alquileno(C_{1-4})-OH; -alquileno(C_{1-4})-alcoxi(C_{1-4}); y -C(O)-alquilo(C_{1-4}). Más preferiblemente, $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4, \text{R}^5, \text{R}^6$ y R^7 se seleccionan de hidrógeno; alquilo(C_{1-4}); y -alquileno(C_{1-4})-halógeno.

15 La elección del sustituyente puede depender del uso que se pretenda dar a los compuestos de la fórmula (E). En una realización preferida, al menos uno de $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4, \text{R}^5, \text{R}^6$ y R^7 (más preferiblemente al menos uno de R^4, R^5 y R^7) es -alquileno(C_{1-4})-halógeno. Esto es particularmente útil si los compuestos se han de emplear como una sonda para tomar imágenes de los depósitos de las proteínas agregadas, porque entonces es posible marcarlos con rapidez y eficacia con un marcador detectable, tal como un isótopo de halógeno detectable. Los ejemplos de isótopos de halógeno detectables incluyen ^{18}F , ^{125}I , ^{123}I , ^{131}I , ^{77}Br y ^{76}Br , en concreto ^{18}F . Por supuesto, es posible utilizar un isótopo de halógeno detectable como cualquiera de los otros átomos de halógeno presentes en los compuestos de la fórmula (E), tales como los átomos de halógeno unidos al anillo de fenilo.

20 Como alternativa, se puede utilizar ^{11}C para marcar detectablemente los compuestos de la fórmula (E). El ^{11}C puede estar presente en al menos uno de $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4, \text{R}^5, \text{R}^6$ y R^7 (más preferiblemente, al menos uno de R^4, R^5 y R^7) o en cualquier otra parte del compuesto de la fórmula (E).

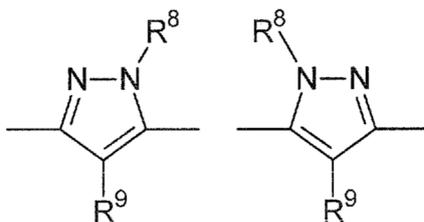
En una realización preferida alternativa, $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4, \text{R}^5, \text{R}^6$ y R^7 se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo(C_{1-4}), preferiblemente hidrógeno.

El anillo D no está particularmente limitado. Ejemplos típicos del mismo incluyen



25

Ejemplos particularmente preferidos de anillo D son



En las fórmulas de más arriba, R⁸ se selecciona de hidrógeno; -alquilo(C₁₋₄); -alquileno(C₁₋₄)-halógeno; -alquileno(C-1-4)-OH; -alquileno(C₁₋₄)-alcoxi(C₁₋₄); -C(O)-alquilo(C₁₋₄); y arilo(C₆₋₁₀), en donde el anillo de arilo puede estar optativamente sustituido por alquilo(C₁₋₄) o halógeno. Preferiblemente R⁸ se selecciona de hidrógeno; -alquilo(C₁₋₄); -alquileno(C₁₋₄)-halógeno; -alquileno(C₁₋₄)-OH; -alquileno(C₁₋₄)-alcoxi(C₁₋₄); y -C(O)-alquilo(C₁₋₄). Más preferiblemente, R⁸ se selecciona de hidrógeno; -alquilo(C₁₋₄); -alquileno(C₁₋₄)-halógeno. En una realización, R⁸ se selecciona de hidrógeno; y alquilo(C₁₋₄), más preferiblemente hidrógeno. En una realización alternativa, R⁸ es -alquileno(C₁₋₄)-halógeno. Tal y como se explicó más arriba, R⁸ se puede marcar de manera detectable, si se desea.

En las fórmulas de más arriba, R⁹ se selecciona de hidrógeno; -alquilo(C₁₋₄); -alquileno(C₁₋₄)-halógeno; -alquileno(C₁₋₄)-OH; -alquileno(C₁₋₄)-alcoxi(C₁₋₄); -C(O)-alquilo(C₁₋₄); y arilo(C₆₋₁₀), en donde el anillo de arilo puede estar optativamente sustituido por alquilo(C₁₋₄) o halógeno. Preferiblemente R⁹ se selecciona de hidrógeno; -alquilo(C₁₋₄); -alquileno(C₁₋₄)-halógeno; -alquileno(C₁₋₄)-OH; -alquileno(C₁₋₄)-alcoxi(C₁₋₄); y -C(O)-alquilo(C₁₋₄). Más preferiblemente, R⁹ se selecciona de hidrógeno; -alquilo(C₁₋₄); -alquileno(C₁₋₄)-halógeno. En una realización, R⁹ se selecciona de hidrógeno; y alquilo(C₁₋₄), más preferiblemente hidrógeno. En una realización alternativa, R⁹ es -alquileno(C₁₋₄)-halógeno. Tal y como se explicó más arriba, R⁹ se puede marcar de manera detectable, si se desea.

En una realización más, R⁸ y R⁹ son hidrógeno. Aún en otra realización, R⁸ es -alquileno(C₁₋₄)-halógeno y R⁹ es hidrógeno.

Hal se selecciona de F, Cl, Br e I, y es preferiblemente F, Cl o Br, más preferiblemente Cl o Br, lo más preferiblemente Br.

R^{E1} se selecciona de hidroxilo, alcoxi(C₁₋₆) y -NR^{E5}R^{E6}.

R^{E2} se selecciona de hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alcoxi(C₁₋₆) y -NR^{E5}R^{E6}, preferiblemente R^{E2} se selecciona de hidrógeno, hidroxilo, alcoxi(C₁₋₆) y -NR^{E5}R^{E6}.

En una realización alternativa, R^{E1} y R^{E2} juntos pueden formar no direccionalmente una estructura -T-(CR^{E7}R^{E8})_n-V-, así como las correspondientes estructuras en las que está presente un doble enlace, si están unidos a átomos de carbono adyacentes. En esta estructura, T se selecciona de CR^{E9}R^{E10}, NH y O, y V se selecciona de CR^{E9}R^{E10}, NH y O. Preferiblemente, al menos uno de T y V es NH u O. Ejemplos de tales estructuras incluyen -O-(CH₂)_n-O-, -O-(CF₂)_n-O-, -O-(CH₂)_n-CH₂-, -NH-(CH₂)_n-NH-, -NH-(CF₂)_n-NH-, -NH-(CH₂)_n-CH₂- o una estructura correspondiente en la que está presente un doble enlace. Por ejemplo, si n = 1, entonces -N=CH-NH- es una estructura en la que está presente un doble enlace y que corresponde a -NH-CH₂-NH-. Preferiblemente, R^{E1} y R^{E2} juntos forman una estructura -O-(CH₂)_n-O-. Se supone que este grupo también podría hidrolizarse *in vivo* a los correspondientes grupos hidroxilo.

n es de 1 a 3; preferiblemente n es 1 o 2, más preferiblemente n es 1.

R^{E5} y R^{E6} se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo(C₁₋₆); preferiblemente R^{E5} y R^{E6} se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo(C₁₋₄).

R^{E7} y R^{E8} son independientemente H o F y son preferiblemente H.

R^{E9} y R^{E10} son independientemente H o F y son preferiblemente H.

Puede variar la posición en la que R^{E1} y R^{E2} están unidos al anillo fenilo.

En una realización, R^{E1} y R^{E2} son independientemente hidroxilo o alcoxi, están unidos en *meta* y *para* por comparación con el átomo de carbono que une el anillo fenilo al anillo D.

En una segunda realización, R^{E1} y R^{E2} son una estructura -T-(CR^{E7}R^{E8})_n-V- o una estructura correspondiente en la que está presente un doble enlace y están unidos en *meta* y *para* por comparación con el átomo de carbono que une el anillo fenilo al anillo D. Las definiciones preferidas de más arriba para la estructura -T-(CR^{E7}R^{E8})_n-V- se aplican de manera análoga a esta realización.

En una tercera realización, R^{E1} es -NR^{E5}R^{E6} y está unido en posición *para* por comparación con el átomo de carbono que une el anillo fenilo al anillo D.

Otros sustituyentes R^{E3} pueden estar optativamente presentes en el anillo fenilo además de R^{E1} y R^{E2} . R^{E3} puede ser un grupo alquilo(C_{1-6}) o un grupo arilo(C_{5-10}) (tal como un grupo fenilo o naftilo), preferiblemente un grupo alquilo(C_{1-6}), más preferiblemente un grupo alquilo(C_{1-4}). El número de sustituyentes, m , no está particularmente limitado y está típicamente en el margen de 0 a 2, preferiblemente de 0 o 1, típicamente 0.

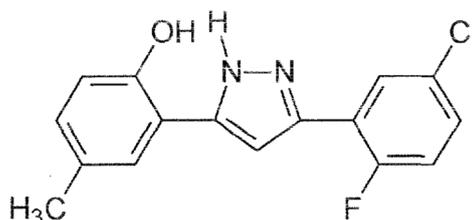
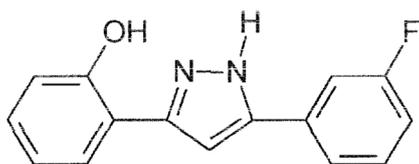
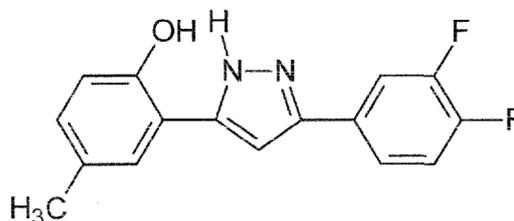
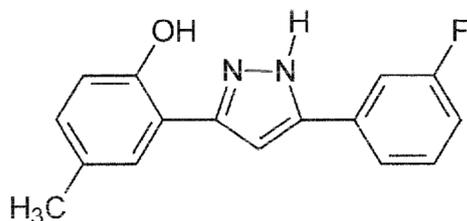
5 También pueden estar presentes otros sustituyentes R^{E4} . Son típicamente un átomo de halógeno, un grupo alquilo(C_{1-6}) o un grupo arilo(C_{5-10}) (tal como un grupo fenilo o naftilo), preferiblemente un átomo de halógeno o un grupo alquilo(C_{1-6}), más preferiblemente un grupo alquilo(C_{1-6}), lo más preferiblemente un grupo alquilo(C_{1-4}). El número de sustituyentes, p , no está particularmente limitado y está típicamente en el margen de 0 a 2, preferiblemente 0 o 1, típicamente 0.

10 En algunas realizaciones, los siguientes compuestos queda excluidos:

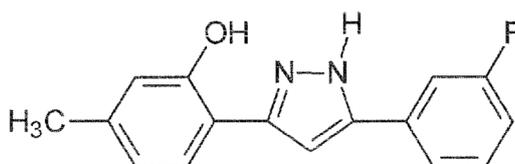
3(5)-(2-hidroxi-5-metilfenil)-5(3)-(4-clorofenil)-pirazol (DE 41 26 543: compuesto 26 en la tabla 1);

orto-hidroxifenil-5-dicloro-3'-4'-fenil-3-metil-2-pirazol (FR 2.104.932: ejemplo IV);

orto-hidroxifenil-5-dicloro-3'-4'-fenil-3-fenil-2-pirazol (FR 2.104.932: ejemplo IV);



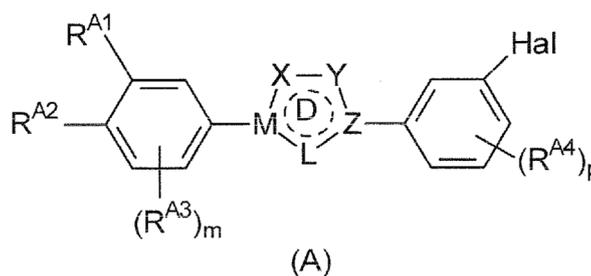
15 y



Estos compuestos se describen como los compuestos IA-44, IA-47, IA-81, IA-106 e IA-115 en la solicitud de patente internacional WO 2004/080972.

En otras realizaciones de la descripción, estos compuestos no quedan excluidos.

20 Los ejemplos preferidos del compuesto representado por la fórmula (E) incluyen los compuestos representados por la fórmula (A)



Las definiciones de X, Y, Z, M, L, anillo D, m, p y Hal dadas más arriba con respecto a la fórmula (E) se aplican de manera análoga a la fórmula (A).

5 R^{A1} y R^{A2} se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alcoxi(C₁₋₆) y $-NR^{A5}R^{A6}$, siempre y cuando al menos uno de R^{A1} y R^{A2} sea hidroxilo, alcoxi(C₁₋₆) o $-NR^{A5}R^{A6}$. Preferiblemente, R^{A1} y R^{A2} se seleccionan independientemente de hidrógeno, hidroxilo, alcoxi(C₁₋₆) y $-NR^{A5}R^{A6}$.

Como alternativa, R^{A1} y R^{A2} pueden formar juntos y no direccionalmente una estructura $-T-(CR^{E7}R^{E8})_n-V-$. Las explicaciones dadas más arriba con respecto a R^{E1} y R^{E2} forman tal estructura y en particular las definiciones de más arriba de R^{E7} , R^{E8} , T, n y V se aplican de manera análoga a R^{A1} y R^{A2} que forman esta estructura.

En una realización, R^{A1} y R^{A2} son de manera independiente hidroxilo o alcoxi.

10 En una segunda realización, R^{A1} y R^{A2} son una estructura $-T-(CR^{E7}R^{E8})_n-V-$ o una estructura correspondiente en la que está presente un doble enlace. Las definiciones preferidas de más arriba para la estructura $-T-(CR^{E7}R^{E8})_n-V-$ se aplican de manera análoga a esta realización.

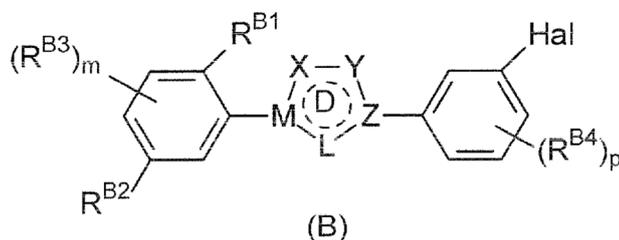
En una tercera realización, R^{A1} es $-NR^{A5}R^{A6}$ y R^{A2} es hidrógeno.

15 Otros sustituyentes R^{A3} pueden estar optativamente presentes sobre el anillo de fenilo además de R^{A1} y R^{A2} . R^{A3} puede ser un grupo alquilo(C₁₋₆) o un grupo arilo(C₅₋₁₀) (tal como un grupo fenilo o naftilo), preferiblemente un grupo alquilo(C₁₋₆), más preferiblemente un grupo alquilo(C₁₋₄).

También pueden estar presentes otros sustituyentes R^{A4} . Son típicamente un átomo de halógeno, un grupo alquilo(C₁₋₆) o un grupo arilo(C₅₋₁₀) (tal como un grupo fenilo o naftilo), preferiblemente un átomo de halógeno o un grupo alquilo(C₁₋₆), más preferiblemente un grupo alquilo(C₁₋₆), lo más preferiblemente un grupo alquilo(C₁₋₄).

20 R^{A5} y R^{A6} se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo(C₁₋₆); preferiblemente R^{A5} y R^{A6} se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo(C₁₋₄).

Los ejemplos preferidos del compuesto representado por la fórmula (E) incluyen compuestos representados por la fórmula (B)



25 Las definiciones de X, Y, Z, M, L, anillo D, m, p y Hal dadas más arriba con respecto a la fórmula (E) se aplican de manera análoga a la fórmula (B).

R^{B1} se selecciona de hidroxilo, alcoxi(C₁₋₆) y $-NR^{B5}R^{B6}$. Preferiblemente, R^{B1} es hidroxilo o alcoxi(C₁₋₆).

R^{B2} se selecciona de hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alcoxi(C₁₋₆) y $-NR^{B5}R^{B6}$, preferiblemente R^{B2} se selecciona de hidrógeno, hidroxilo, alcoxi(C₁₋₆) y $-NR^{B5}R^{B6}$.

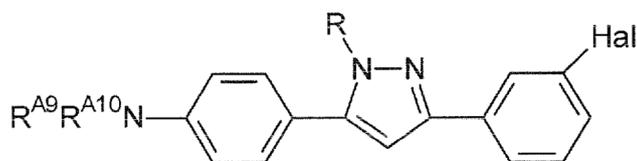
30 En una realización, R^{B1} es hidroxilo o alcoxi(C₁₋₆) y R^{B2} es hidrógeno.

R^{B5} y R^{B6} se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo(C₁₋₆), preferiblemente R^{B5} y R^{B6} se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo(C₁₋₄).

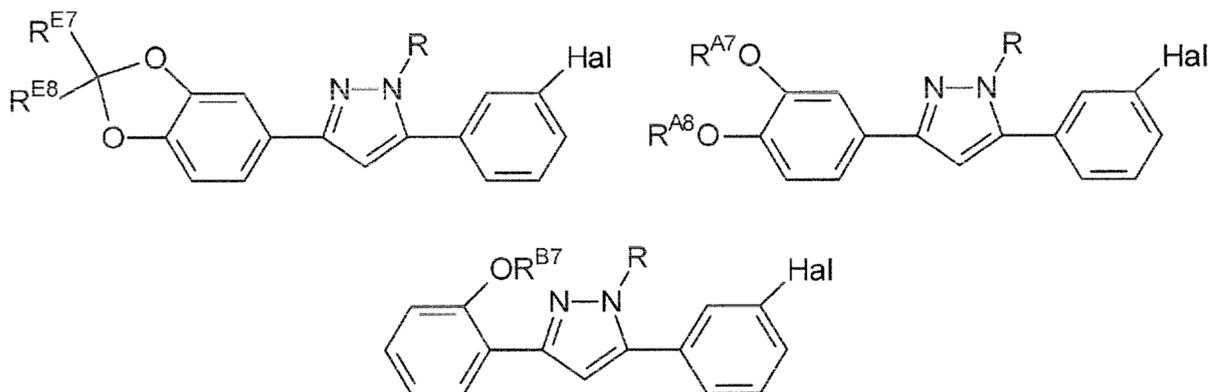
35 Otros sustituyentes R^{B3} pueden estar optativamente presentes sobre el anillo de fenilo además de R^{B1} y R^{B2} . R^{B3} puede ser un grupo alquilo(C₁₋₆) o un grupo arilo(C₅₋₁₀) (tal como un grupo fenilo o naftilo), preferiblemente un grupo alquilo(C₁₋₆), más preferiblemente un grupo alquilo(C₁₋₄).

También pueden estar presentes otros sustituyentes R^{B4} . Son típicamente un átomo de halógeno, un grupo alquilo(C₁₋₆) o un grupo arilo(C₅₋₁₀) (tal como un grupo fenilo o naftilo), preferiblemente un átomo de halógeno o un grupo alquilo(C₁₋₆), más preferiblemente un grupo alquilo(C₁₋₆), lo más preferiblemente un grupo alquilo(C₁₋₄).

Los compuestos de la presente invención son:

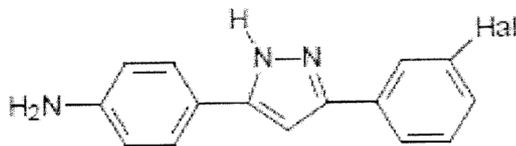


Los compuestos preferidos de la presente descripción incluyen



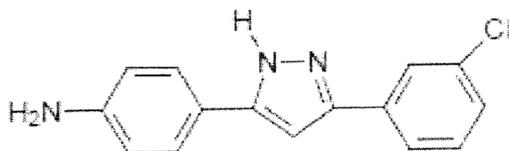
Las definiciones dadas más arriba con respecto a R^{E7}, R^{E8} y Hal se aplican de manera análoga a estos compuestos.

- 5 R se selecciona de hidrógeno; alquilo(C₁₋₄); -alquileno(C₁₋₄)-halógeno; y arilo(C₆₋₁₀) (tal como fenilo y naftilo), en donde el anillo de arilo puede optativamente estar sustituido por alquilo(C₁₋₄) o halógeno. Preferiblemente, R se selecciona de hidrógeno; alquilo(C₁₋₄); -alquileno(C₁₋₄)-halógeno. En una realización, R se selecciona de hidrógeno; y alquilo(C₁₋₄), más preferiblemente hidrógeno. En una realización alternativa, R es -alquileno(C₁₋₄)-halógeno. Tal y como se explicó más arriba, R se puede marcar de manera detectable, si se desea.
- 10 R^{A7} es H o alquilo(C₁₋₆), preferiblemente H o alquilo(C₁₋₄).
- R^{A8} es H o alquilo(C₁₋₆), preferiblemente H o alquilo(C₁₋₄).
- R^{A9} es H o alquilo(C₁₋₆), preferiblemente H o alquilo(C₁₋₄).
- R^{A10} es H o alquilo(C₁₋₆), preferiblemente H o alquilo(C₁₋₄).
- R^{B7} es H o alquilo(C₁₋₆), preferiblemente H o alquilo(C₁₋₄).
- 15 Los siguientes compuestos de la presente invención son particularmente preferidos porque se ha hallado que tienen una eficacia elevada a la hora de inhibir la agregación de una proteína o de tomar imágenes de las proteínas agregadas:



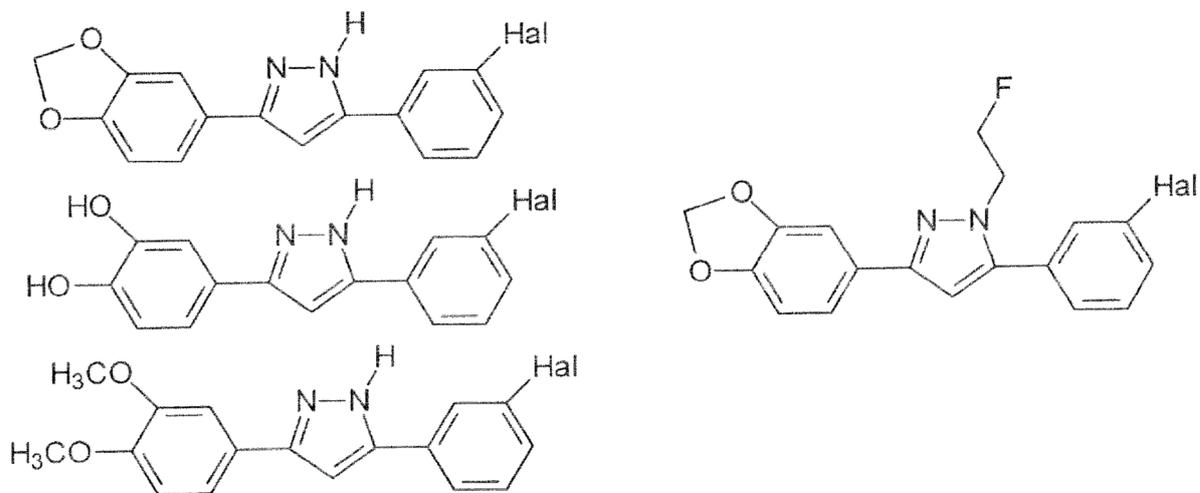
en donde Hal es Cl o Br, preferiblemente Hal es Br.

El compuesto más preferido de la presente invención es actualmente el siguiente compuesto



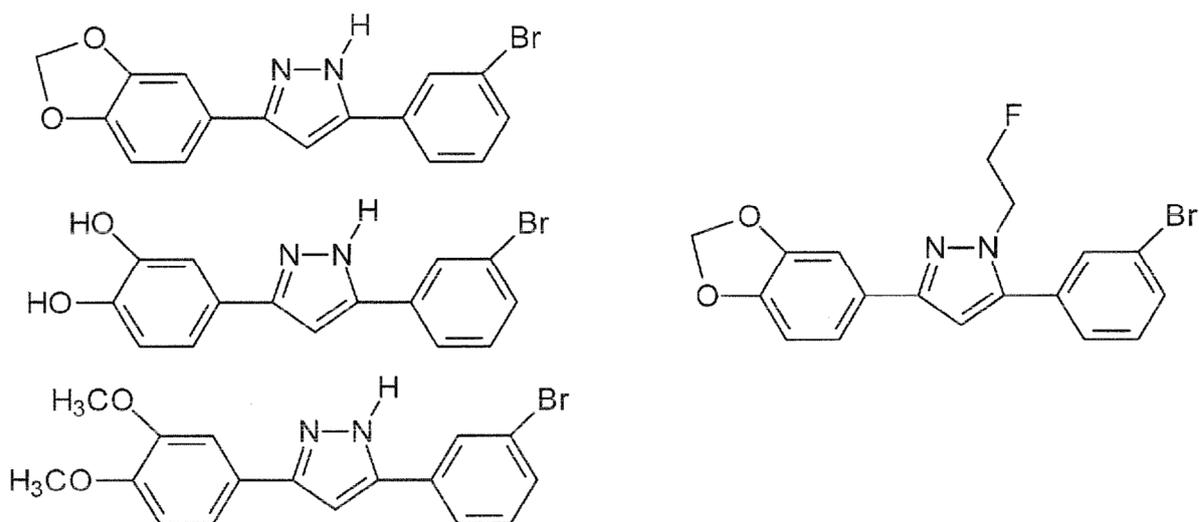
20

Los siguientes compuestos de esta descripción son particularmente preferidos porque se ha hallado que tienen una eficacia elevada a la hora de inhibir la agregación de una proteína o de tomar imágenes de proteínas agregadas:



en donde Hal es Cl o Br, preferiblemente Hal es Br.

Los compuestos más preferidos de esta descripción son en la actualidad los compuestos siguientes



- 5 Los compuestos de la fórmula (E) pueden estar también presentes en forma de profármacos, ésteres, solvatos o sales de los mismos.

Los compuestos de la fórmula (E) forman sales que están también dentro del alcance de esta invención. La referencia a un compuesto de la fórmula (E) en la presente memoria se entiende que incluye la referencia a las sales del mismo, a menos que se indique otra cosa. El término «sal» o «sales», tal y como se emplea en la presente memoria, representa sales ácidas y/o básicas formadas con ácidos y bases inorgánicas y/u orgánicas. Además, cuando un compuesto contiene tanto un resto básico como un resto ácido, se pueden formar *zwitterions* («sales internas») y están incluidos dentro del término «sal» o «sales», tal y como se utiliza en la presente memoria. Se prefieren sales farmacéuticamente aceptables (a saber, que no son tóxicas y son fisiológicamente aceptables), aunque son también útiles otras sales, p. ej., en las etapas de aislamiento o purificación que se pueden emplear durante la preparación. Las sales de los compuestos de la presente invención se pueden formar, por ejemplo, al hacer reaccionar un compuesto con una cantidad de ácido o base, tal como una cantidad equivalente, en un medio, tal como uno en el cual la sal se precipita, o en un medio acuoso y luego la liofilización.

Los compuestos que contienen un resto básico pueden formar sales con numerosos ácidos orgánicos e inorgánicos. Las sales por adición de ácido de ejemplo incluyen acetatos (tales como los formados con ácido acético o ácido trihaloacético, por ejemplo, ácido trifluoroacético), adipatos, alginatos, ascorbatos, aspartatos, benzoatos, bencenosulfonatos, bisulfatos, boratos, butiratos, citratos, canforatos, canforsulfonatos, ciclopentanopropionatos, digluconatos, dodecilsulfatos, etanosulfonatos, fumaratos, glucoheptanoatos, glicerofosfatos, hemisulfatos, heptanoatos, hexanoatos, hidroclouros, hidrobromuros, hidroyoduros, hidroxietanosulfonatos (p. ej., 2-hidroxietanosulfonatos), lactatos, maleatos, metanosulfonatos, naftalenosulfonatos (p. ej., 2-naftalenosulfonatos),

nicotinas, nitratos, oxalatos, pectinatos, persulfatos, fenilpropionatos (p. ej., 3-fenilpropionatos), fosfatos, picratos, pivalatos, propionatos, salicilatos, succinatos, sulfatos (p. ej., los formados con ácido sulfúrico), sulfonatos (p. ej., los mencionados en la presente memoria), tartratos, tiocianatos, toluenosulfonatos, tales como tosيلات, undecanoatos y similares.

- 5 Los compuestos que contienen un resto ácido pueden formar sales con numerosas bases orgánicas e inorgánicas. Las sales básicas de ejemplo incluyen sales de amonio, sales de metales alcalinos, tales como sales de sodio, litio y potasio, sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de calcio y magnesio, sales con bases orgánicas (p. ej., aminas orgánicas) tales como benzatinas, dicitohexilaminas, hidrabaminas (formadas con *N,N*-bis(deshidroabietil)etilendiamina), *N*-metil-D-glucaminas, *N*-metil-D-glucamidas, *t*-butilaminas, y sales con aminoácidos, tales como arginina, lisina y similares. Los grupos básicos que contienen nitrógeno se pueden cuaternizar con agentes tales como haluros de alquilo inferiores (p. ej., cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo), sulfatos de dialquilo (p. ej., sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo), haluros de cadena larga (p. ej., cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo), haluros de aralquilo (p. ej., bromuros de bencilo y fenetilo), y otros.
- 10
- 15 Los profármacos (referencia) y los solvatos de los compuestos de la fórmula (E) también están contemplados en la presente memoria. El término «profármaco», tal y como se emplea en la presente memoria, representa un compuesto que, tras la administración a un sujeto, sufre una conversión química mediante procesos metabólicos o químicos para producir un compuesto de la fórmula (E) o una sal y/o solvato del mismo.

Los solvatos de los compuestos de la fórmula (E) incluyen, por ejemplo, hidratos.

- 20 Los ésteres de los compuestos de la fórmula (E) incluyen ésteres de alquilo(C₁₋₆), preferiblemente de alquilo(C₁₋₄).
- Los compuestos de la fórmula (E) pueden existir en su forma tautomérica (p. ej., como un éter de amida o imino). Todas estas formas tautoméricas están contempladas en la presente memoria como parte de la presente invención o descripción, respectivamente.

- 25 Todos los estereoisómeros de los presentes compuestos (p. ej., los que pueden existir debido a carbonos asimétricos en diferentes sustituyentes), entre ellos las formas enantioméricas y las formas diastereoméricas, están contempladas dentro del alcance de esta invención o descripción, respectivamente. Cada uno de los estereoisómeros de los compuestos de la fórmula (E) pueden, por ejemplo, estar sustancialmente libres de otros isómeros (p. ej., como un isómero óptico puro o sustancialmente puro que tiene una actividad especificada) o pueden estar mezclados, por ejemplo, como racematos o con todos los otros, o solo los seleccionados, estereoisómeros. Los centros quirales de los compuestos de la fórmula (E) pueden tener la configuración *S* o *R*, tal y como se define según las recomendaciones de 1974 de la IUPAC.
- 30

- Las formas racémicas se pueden resolver mediante métodos físicos, tales como cristalización fraccionada, separación o cristalización de derivados diastereoméricos, o separación por cromatografía de columna en columna quiral. Cada uno de los isómeros ópticos se puede obtener a partir de los racematos mediante cualquier método idóneo que incluye, entre otros, la formación de sales con un ácido ópticamente activo seguida de la cristalización.
- 35

Todos los isómeros configuracionales de los compuestos de la fórmula (E) están contemplados, bien en mezcla o bien en una forma pura o sustancialmente pura. La definición de los compuestos de la fórmula (E) abarca tanto los isómeros de alqueno *cis* (*Z*) y *trans* (*E*) como los isómeros *cis* y *trans* de los hidrocarburos cíclicos o anillos de heterociclo.

- A lo largo de la especificación, los grupos y sustituyentes de los mismos se pueden elegir para dar a conocer restos estables y compuestos.
- 40

Los compuestos de la fórmula (E) se pueden dar a conocer en forma de una composición farmacéutica o diagnóstica que incluye optativamente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 45 La aplicación de un sistema de ensayo bioquímico basado en la técnica de «cribado de dianas intensamente fluorescentes (SIFT)» en combinación con ensayos celulares por cultivo celular de los modelos de enfermedades causadas por priones, los presentes inventores han cribado grandes colecciones de compuestos sintéticos *in vitro* en busca de inhibidores de los procesos de agregación que acompañan a las enfermedades neurodegenerativas y, en particular, las enfermedades causadas por los priones y las sinucleinopatías a nivel molecular. Tales inhibidores tienen la capacidad de ser nuevos tratamientos para estas enfermedades.

- 50 Este sistema de ensayo sobrepasa con mucho los sistemas de ensayo en uso para la búsqueda de nuevos fármacos que inhiban la agregación de una proteína con respecto al grado de automatización, la velocidad de medición (75 segundos por muestra), la cantidad de compuestos químicos (solo 200 picomoles por ensayo primario), así como el agente utilizado (p. ej., solo el equivalente de 0,2 mg de cerebro de un caso de ECJ por ensayo) necesarios. Solo estos requisitos relativamente bajos de recursos y tiempo permiten el cribado de tales cantidades elevadas de compuestos (a saber, 20 000). Además, el mapeo de todos los datos de cribado sobre una base de datos centralizada y su análisis automático permite la evaluación eficaz y el análisis de las relaciones entre la estructura y la actividad.
- 55 La combinación con los procedimientos de cribado en cultivo celular, que se incluyen en la presente invención, permite

la identificación de los compuestos que son activos tanto en los ensayos bioquímicos como en los ensayos con células. Así pues, se identifican compuestos que no son solo activos *in vitro*, sino también en un contexto celular, p. ej., lo que asegura la estabilidad y reactividad apropiadas de los compuestos identificados para el posterior desarrollo para aplicaciones *in vivo*.

5 Así pues, los presentes inventores identificaron una serie de compuestos activos en este cribado primario, que posteriormente se validaron con diluciones seriadas para identificar los compuestos activos incluso a concentraciones muy bajas. Los compuestos caracterizados como «activos» en el cribado primario se sometieron a un análisis de aglomeración, lo que reveló un grupo de cinco aglomeraciones cercanas (DPP_1 a DPP_5; figura 1), que comprenden compuestos muy activos, que pertenecen a la clase de compuestos químicos de los derivados del 3,5-difenilpirazol (DPP) (compárese con el motivo DPP mostrado en la figura 1).

10 Los presentes inventores sustituyeron además diferentes sustituyentes de la clase de compuestos identificados para identificar los compuestos relacionados idóneos como inhibidores de los procesos de agregación que acompañan a las enfermedades neurodegenerativas y, en particular, las enfermedades causadas por priones y las sinucleinopatías a nivel molecular. Mediante el uso de este método medicino-químico, se sintetizaron una serie de compuestos adicionales. Estos compuestos, junto con las sustancias seleccionadas del cribado inicial, se sometieron a más pruebas, entre ellas los ensayos de SIFT, ensayos con cultivos celulares, experimentos *in vivo* con ratones, así como ensayos bioquímicos dirigidos a la agregación de la α -sinucleína (véanse los ejemplos). Así pues, se verificó, la actividad de estos compuestos tanto *in vitro* como *in vivo*. El hallazgo de que estos compuestos son también capaces de inhibir con eficacia la formación de multímeros de la α -sinucleína a concentraciones micromolares bajas en los modelos *in vitro* para esta agregación patológica de proteínas hallada en las sinucleinopatías es una indicación clara de que los compuestos identificados no pueden funcionar solo como compuestos antipriónicos, sino que también tienen potencial terapéutico para las sinucleinopatías, como la enfermedad de Parkinson, DCL y AMS, al actuar selectivamente sobre el mecanismo patológico a nivel molecular. Además, la actividad inhibitoria de estos compuestos sobre ambos, agregación de proteínas priónicas y de la α -sinucleína *in vitro*, puede ser reflejo de su actividad antiagregante general contra un abanico más amplio de enfermedades por agregación de una proteína, en donde el plegamiento incorrecto de las proteínas en conformaciones en las que predominan las láminas β conforma la base para la posterior agregación de la proteína en las fibrillas de amiloide. Así pues, estos compuestos y los compuestos relacionados con los miembros de la clase de sustancias de DPP es posible que resulten útiles como tratamiento para el tratamiento causativo de un panel entero de enfermedades por agregación de una proteína (neurodegenerativas), entre ellas, pero sin limitarse a ellas, enfermedad de Parkinson, enfermedad causada por priones, enfermedad de Alzheimer, atrofia multisistémica, enfermedad difusa con cuerpos de Lewy, demencia frontotemporal, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, ataxias espinocerebelosas y otras enfermedades por poli-Q, angiopatía amiloide cerebral hereditaria, polineuropatía amiloidótica familiar, amiloidosis sistémica primaria (amiloidosis AL), amiloidosis sistémica reactiva (amiloidosis AA), diabetes de tipo 2, amiloidosis localizada por inyección, amiloidosis de microglobulina β_2 , amiloidosis no neuropática hereditaria, amiloidosis sistémica hereditaria finlandesa.

La presente invención se refiere además al compuesto de la presente invención, así como a un éster, solvato o sal del mismo, para ser usado en el tratamiento o la prevención de una enfermedad relacionada con la agregación de una proteína y/o una enfermedad neurodegenerativa. Otras realizaciones son el uso de un compuesto de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad relacionada con la agregación de una proteína y/o una enfermedad neurodegenerativa.

El término «agregación», de acuerdo con la presente invención, se refiere a la formación de complejos oligoméricos o multiméricos de típicamente uno o varios tipos de proteínas, que pueden estar acompañadas por la integración de biomoléculas adicionales, como glúcidos, ácidos nucleicos y lípidos, en los complejos.

El término «proteína implicada en una enfermedad relacionada con la agregación de una proteína y/o una enfermedad neurodegenerativa», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a las enfermedades que se caracterizan por la presencia de proteínas agregadas. Tales proteínas agregadas pueden formar depósitos en determinados tejidos, más preferiblemente en el tejido nervioso o en el tejido del cerebro. La extensión de la agregación depende de la enfermedad concreta.

La presente invención se refiere además al uso de un compuesto de la presente invención tal y como está definido más arriba para preparar una composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad relacionada con la agregación de una proteína y/o una enfermedad neurodegenerativa.

De acuerdo con la presente invención, el término «composición farmacéutica» se refiere a una composición para la administración a un paciente, preferiblemente un paciente humano. La composición farmacéutica de la invención comprende los compuestos citados más arriba y, optativamente, otras moléculas capaces de alterar las características de los compuestos de la invención, con lo que, por ejemplo, se estabiliza, se modula y/o se activa su función. La composición puede estar en forma sólida, líquida o gaseosa y puede estar, entre otros, en forma de uno o varios polvos, uno o varios comprimidos, una o varias soluciones, o uno o varios aerosoles. La composición farmacéutica de la presente invención puede, optativamente y además, comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos idóneos se conocen bien en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diferentes tipos de humectantes, soluciones

estéridos, solventes orgánicos entre ellos DMSO, etc. Las composiciones que comprenden tales vehículos se pueden formular mediante los métodos convencionales bien conocidos.

La composición farmacéutica se formulará y se dosificará en consonancia con las buenas prácticas médicas, y tendrá en cuenta la afección clínica de cada paciente, el sitio de administración de la composición farmacéutica, el método de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos por los médicos encargados del tratamiento. La «cantidad eficaz» de la composición farmacéutica para los propósitos de la presente memoria se determina, así pues, mediante tales consideraciones. El experto en la técnica sabe que la cantidad eficaz de las composiciones farmacéuticas administradas a un individuo dependerán, entre otras cosas, de la naturaleza del compuesto.

Las composiciones farmacéuticas de la invención o descripción se pueden administrar por vía oral, rectal, parenteral, intracisterna, intravaginal, intraperitoneal, tópica (tal como mediante polvos, ungüentos, gotas o parche transdérmico), bucal, o como un pulverizador oral o nasal. Con «vehículo farmacéuticamente aceptable» se quiere hacer referencia a un relleno sólido, semisólido o líquido, diluyente, material de encapsulación o formulación auxiliar de cualquier tipo que no es tóxico. El término «parenteral», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a los modos de administración que incluyen la inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea e intraarticular.

La composición farmacéutica también se administra idóneamente mediante sistemas de liberación prolongada. Los ejemplos idóneos de composiciones de liberación prolongada incluyen matrices de polímero semipermeable en forma de artículos conformados, p. ej., películas o microcápsulas. Las matrices de liberación prolongada incluyen polilactidas (patente de los EE. UU. n.º 3 773 919, patente europea EP 58 481), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato (Sidman. U et al., *Biopolymers* 22: 547-556 (1983)), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (R. Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 167-277 (1981) y R. Langer, *Chem. Tech.* 12: 98-105 (1982)), acetato de etileno y vinilo (R. Langer et al., véase más arriba) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (patente europea EP 133 988). La composición farmacéutica de liberación prolongada también incluye un compuesto atrapado en liposomas. Los liposomas que contienen la composición farmacéutica se preparan mediante los métodos conocidos de por sí: patente alemana DE 32 18 121; Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82: 3688-3692 (1985); Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*: 77: 4030-4034 (1980); patente europea EP 52 322; patente europea EP 36 676; patente europea EP 88 046; patente europea EP 143 949; patente europea EP 142 641; solicitud de patente japonesa 83-118008; patentes de los EE. UU. n.ºs 4 485 045 y 4 544 545; y patente europea EP 102 324. Habitualmente, los liposomas son de tipo unilaminar pequeño (aproximadamente 200 a 800 Å) en los que el contenido de lípidos es superior a aproximadamente el 30% en moles de colesterol, en donde la proporción seleccionada se ajusta para el tratamiento óptimo.

Para la administración parenteral, la composición farmacéutica se formula en líneas generales mezclándola al grado deseado de pureza, en una forma inyectable de dosis unitaria (solución, suspensión o emulsión), con un vehículo farmacéuticamente aceptable, a saber, uno que no es tóxico para los destinatarios en las dosis y concentraciones empleadas, y que es compatible con otros ingredientes de la formulación.

Por lo general, las formulaciones se preparan al poner en contacto los componentes de la composición farmacéutica de manera uniforme e íntima con los vehículos líquidos o con los vehículos sólidos molidos en un polvo fino, o ambos. Entonces, si es necesario, se conforma el producto en la formulación deseada. Preferiblemente, el vehículo es un vehículo parenteral, más preferiblemente una solución que es isotónica con la sangre del destinatario. Los ejemplos de tales vehículos incluyen agua, solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. Los vehículos no acuosos, tales como aceites no volátiles y oleato de etilo son también útiles en la presente memoria, así como los liposomas. El vehículo contiene idóneamente cantidades minúsculas de aditivos, tales como sustancias que refuerzan la isotonía y la estabilidad química. Tales materiales no son tóxicos para los destinatarios en las dosis y las concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, succinato, ácido acético y otros ácidos orgánicos y sus sales; antioxidantes tales como ácido ascórbico; (poli) péptidos de baja masa molecular (menos de aproximadamente diez restos), p. ej., poliarginina o tripéptidos; proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico o arginina; monosacáridos, disacáridos y otros glúcidos que incluyen la celulosa o sus derivados, glucosa, manosa o dextrinas; quelantes, tales como EDTA; glúcidos polialcohólicos, tales como manitol o sorbitol; contraiones, tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos, tales como polisorbato, poloxámeros o PEG.

Los componentes de la composición farmacéutica a ser utilizada para la administración terapéutica deben estar estériles. La esterilidad se lleva a cabo con facilidad mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles (p. ej., membranas de 0,2 μ m). Los componentes terapéuticos de la composición farmacéutica se colocan por lo general en un contenedor que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

Los componentes de la composición farmacéutica se almacenarán habitualmente en contenedores de dosis unitarias o de varias dosis, por ejemplo, ampollas o viales sellados, como una solución acuosa o como una formulación liofilizada para la reconstitución. A modo de ejemplo de una formulación liofilizada, los viales de 10 ml se llenan con 5 ml de solución acuosa al 1% (p/v) esterilizada por filtración y se liofiliza la mezcla resultante. La solución de infusión se prepara mediante la reconstitución del compuesto o compuestos liofilizados mediante el uso de agua bacteriostática para inyección.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «cantidad terapéuticamente eficaz» se refiere a una cantidad suficiente para desencadenar la respuesta biológica deseada. En la presente invención, la respuesta biológica deseada es la inhibición de la agregación de una proteína.

5 Se describe un método para identificar un compuesto con una mejora de la eficacia para inhibir la agregación de una proteína implicada en una enfermedad relacionada con la agregación de una proteína y/o una enfermedad neurodegenerativa, que comprende las etapas de (a) poner en contacto una proteína monomérica marcada y un agregado marcado de manera diferente de dicha proteína en (1) presencia y/o (2) ausencia de un candidato a inhibidor de la agregación que es un derivado de un compuesto tal y como está definido más arriba; (b) determinar la cantidad de marcaciones colocalizadas que representan la extensión de la fijación de la proteína monomérica al agregado de
10 dicha proteína; y (c) comparar el resultado obtenido en presencia o ausencia de dicho compuesto, en donde una disminución de las marcaciones colocalizadas en presencia de dicho compuesto es indicativa de la capacidad del compuesto para inhibir la agregación de dicha proteína.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «proteína monomérica» se refiere a una unidad molecular compuesta por una sola cadena (poli)peptídica con una conformación tridimensional específica de cada proteína
15 concreta que es preferiblemente soluble en las soluciones acuosas hasta concentraciones típicamente nanomolares, micromolares o milimolares, y pueden estar modificadas mediante la unión covalente de uno o varios glúcidos, derivados de glúcidos, lípidos, fosfato, sulfato, ácidos grasos y nucleótidos a determinados aminoácidos en la cadena. Preferiblemente, dicha modificación es una fosforilación, glucosilación, procesamiento proteolítico, glucación, oxidación y nitración. El término «(poli)péptido», tal y como se utiliza en la presente memoria, describe un grupo de
20 moléculas que comprende el grupo de péptidos, que consiste en 30 aminoácidos o menos, así como el grupo de polipéptidos, que consiste en más de 30 aminoácidos. Tal y como se utiliza a lo largo de la presente especificación, el término «proteína» también se refiere a (poli)péptidos.

El término «proteína agregada» significa oligómeros o multímeros unidos no covalentemente de uno o más tipos de «proteína(s) o polipéptido(s) monomérico(s)», tal y como está definido más arriba, que se caracterizan por una
25 alteración de la conformación tridimensional de las unidades de proteína con las que forman complejos con respecto a las unidades de las proteínas monoméricas y una solubilidad típicamente baja de los complejos en las soluciones acuosas.

El término «compuesto para inhibir la agregación de una proteína» se refiere a un compuesto que es capaz de impedir la formación de agregados de proteínas y/o que es capaz de desintegrar o degradar los agregados de proteína que ya existen, en donde dichos compuestos se derivan por modificación de los compuestos de la fórmula (E). Preferiblemente, tales compuestos están diseñados por modelado computacional, en donde el modelado computacional significa el uso de herramientas de cribado virtual para la búsqueda de compuestos que se fijan a la
30 forma monomérica o a la forma agregada de la proteína, o a ambas. Por lo general, estos métodos se basan en la estructura tridimensional de las proteínas, preferiblemente de las proteínas cristalizadas junto con el sustrato. Más preferiblemente, el sustrato se reemplaza por un candidato a modulador o inhibidor.

El término «proteína... marcada» se refiere a una proteína a la cual se une un marcador. Dicho marcador puede estar unido de manera directa o indirecta. La marcación indirecta hace referencia en particular a los (poli)péptidos marcados, más en concreto a anticuerpos marcados. La unión del marcador se puede realizar mediante una serie de técnicas que conoce el experto en la materia y que están descritas en los manuales de texto estándares (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, «Antibodies, A Laboratory Manual», CSH Press, Cold Spring Harbor, 1998).
40

El término «proteína marcada diferencialmente» significa que la isoforma agregada y la monomérica de la proteína llevan unidas diferentes marcadores. Un ejemplo típico es la unión de «FITC» a la proteína agregada y del «rojo Texas» a la proteína monomérica. Ya que estos marcadores son detectables con luz de diferente longitud de onda, se puede determinar la cantidad y/o la localización de las isoformas de la proteína. Más en particular, el uso de diferentes marcadores permite cuantificar la presencia de marcadores colocalizados, a saber, de marcadores que se encuentran muy cerca los unos de los otros.
45

La «determinación de la cantidad de marcadores colocalizados» se puede llevar a cabo, p. ej., con la medición por separado (a saber, específica de la longitud de onda) del número de fotones sueltos de al menos dos longitudes de onda diferentes que vienen desde el mismo elemento de volumen pequeño de típicamente menos de 1 femtolitro de una muestra en un periodo de tiempo muy breve de típicamente menos de 100 μ s seguido de la comparación computarizada del número de fotones respectivo, que se pueden representar gráficamente en un histograma multidimensional con un eje para el número de fotones de una longitud de onda concreta. En el caso de dos longitudes de onda, el número de fotones de un periodo de tiempo concreto se puede representar, así pues, como puntos únicos en un histograma de intensidad de fluorescencia bidimensional.
50

El término «comparar el resultado obtenido en presencia o ausencia de dicho compuesto» significa valorar el efecto del compuesto sobre la formación y/o la cantidad de agregados de proteína. Tal y como se utiliza en la presente memoria, una disminución de los marcadores colocalizados de más del 10%, más preferiblemente de más del 25%, incluso más preferiblemente de más del 50% y lo más preferiblemente de más del 95%, en presencia de un compuesto candidato a inhibir la agregación, es indicativa de la capacidad que tienen los compuestos para inhibir la agregación
55

de una proteína. El término «ausencia de dicho compuesto» significa que ningún inhibidor ni candidato a inhibidor es, o ha sido, añadido a la proteína agregante. En casos concretos, puede ser útil la adición de controles negativos, a saber, compuestos que no tienen ningún efecto sobre la agregación de una proteína. El término «ausencia de dicho compuesto» también hace referencia a estos casos. De igual modo, ninguno de los compuestos de la fórmula (E) que inhiben la agregación de una proteína se puede utilizar como control positivo en los ensayos para la identificación de nuevos compuestos inhibidores. Es evidente que el término «presencia» también se refiere a la cantidad. Por razones obvias, los compuestos a los que se hace referencia en la presente especificación tienen diferente concentración eficaz. Preferiblemente, la concentración eficaz es de menos de 100 μM , más preferiblemente por debajo de 10 μM e incluso más preferiblemente por debajo de 1 μM .

El método de la presente especificación es particularmente útil para identificar nuevos compuestos capaces de interferir con la agregación de una proteína con una mayor eficacia. Permite el cribado de grandes colecciones de compuestos derivados y permite identificar los compuestos que inhiben con una alta fidelidad. En un aspecto de la presente invención, el método se basa en la espectroscopia de correlación de fluorescencia. En los últimos años, la espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS, por su nombre en inglés) se ha reconocido como un método que permite el análisis muy sensible de la agregación de una proteína en las enfermedades neurodegenerativas, tales como las enfermedades causadas por los priones, a nivel molecular (Bieschke y Schwille, 1997, Bieschke et al. 2000, Giese et al., 2000, Post et al., 1998). Además, la FCS se presta por sí misma a la miniaturización y a la automatización, y se ha convertido en un método consolidado para el cribado masivo en la industria farmacéutica (Koltermann et al. 1998). La espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS) en su forma confocal actual analiza las fluctuaciones de las señales causadas por la difusión de las moléculas marcadas con una única fluorescencia a través de un elemento de volumen abierto definido por un haz de un láser de excitación enfocado a través de un objetivo de microscopio de gran apertura y que toma imágenes de manera confocal en un detector de recuento de fotones sueltos (Schwille et al. 1997). En su realización más preferida, el método se basa en esta tecnología. Este método es idóneo para el cribado masivo basándose en la inhibición de, por ejemplo, la fijación de PrP^C a agregados de PrP^{Sc} o la formación de oligómeros o protofibrillas o fibrillas de α -sinucleína.

Este sistema de ensayo para la detección de inhibidores de la agregación de una proteína se puede utilizar para la búsqueda de nuevas sustancias terapéuticas para cualquier enfermedad neurodegenerativa que está relacionada con la agregación de proteínas específicas, tales como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. Además, debe ser posible buscar sustancias con potencial terapéutico para todas las enfermedades en las que la formación de multímeros desempeña una función crucial en la patogenia, independientemente de la naturaleza química de sus componentes.

En una realización preferida de la presente descripción, dichos marcadores son marcadores fluorescentes.

Preferiblemente, el marcador se selecciona del grupo que consiste en fluorocromos, p. ej., isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, rojo Texas, Alexa 488, Alexa 647, ficoeritrina, alofocianina, 6-carboxifluoresceína (6-FAM), 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxi-2',4',7',4',7-hexaclorofluoresceína (HEX), 5-carboxifluoresceína (5-FAM) o *N,N,N',N'*-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA), marcadores radiactivos, p. ej., ³²P, ³⁵S, ³H, etc. El marcador también puede ser un sistema de dos etapas, en donde, p. ej., la proteína o el (poli)péptido o el compuesto de la presente invención está conjugado a biotina, haptenos, etc., que llevan un compañero de fijación de alta afinidad, p. ej., avidina, anticuerpos específicos, etc., en donde el compañero de fijación está conjugado a un marcador detectable.

En otra realización preferida de la presente descripción, dichos marcadores están unidos a un anticuerpo o a un fragmento de un anticuerpo que se fija específicamente a dicha proteína.

El término «fijación específica» de los anticuerpos se puede describir, por ejemplo, en términos de su reactividad cruzada. Preferiblemente, «anticuerpo que se fija específicamente a...» se refiere a los anticuerpos que no se fijan a (poli)péptidos con una identidad de menos del 98%, de menos del 95%, de menos del 90%, de menos del 85%, de menos del 80%, de menos del 75%, de menos del 70% y de menos del 65% (según se calcula con los métodos conocidos en la técnica) con un (poli)péptido codificado por la proteína agregante. No obstante, los anticuerpos pueden también describirse o especificarse en términos de su afinidad de fijación. Las afinidades de fijación preferidas incluyen las que tienen una constante de disociación o K_d de menos de 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M y 10^{-15} M.

El término «anticuerpo» se refiere a anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, humanizados, de cadena única, Fv de cadena única, o a fragmentos de anticuerpos como, entre otros, los fragmentos Fab. Los fragmentos o derivados de anticuerpos comprenden además los fragmentos F(ab')₂, Fv o scFv; véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) y (1999), *loc. cit.* En la técnica se conocen diferentes procedimientos y se pueden utilizar para la producción de tales anticuerpos y/o fragmentos. Así pues, los derivados (de anticuerpo) se pueden producir mediante peptidomimética. Además, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena única (véase, entre otras, la patente de los EE. UU. n.º 4 946 778) se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena única específicos contra uno o varios polipéptidos y proteínas de fusión de esta invención. De igual forma, los animales transgénicos se pueden utilizar para expresar anticuerpos humanizados específicos contra los polipéptidos y proteínas

de fusión de esta invención. Lo más preferiblemente, el anticuerpo de esta invención es un anticuerpo monoclonal. Para la preparación de anticuerpos monoclonales, se puede utilizar cualquier técnica que proporciona anticuerpos producidos mediante el cultivo continuo de líneas celulares. Ejemplos de tales técnicas incluyen la técnica de hibridomas (Köhler y Milstein, *Nature* 256 (1975), 495-497), la técnica de triomas, la técnica de hibridomas de linfocitos B de humano (Kozbor, *Immunology Today* 4 (1983), 72) y la técnica de hibridomas con EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc, (1985), 77-96). La resonancia de plasmones superficiales según se emplea en el sistema de BIAcore se puede utilizar para incrementar la eficacia de los anticuerpos fágicos que se fijan a un epítipo de un polipéptido de la invención (Schier, *Human Antibodies Hybridomas* 7 (1996), 97-105; Malmborg, *J. Immunol. Methods* 183 (1995), 7-13). También se contempla en el contexto de esta invención que el término «anticuerpo» comprende construcciones de anticuerpos que se pueden expresar en las células, p. ej., construcciones de anticuerpos que se pueden transfectar y/o transducir a través de, entre otros, virus o vectores plasmídicos. El experto en la técnica sabe que, en muchos casos, los anticuerpos pueden ser remplazados por otros compuestos de fijación específica, tales como los péptidos expuestos sobre la superficie de fagos (exposición en fagos) o con (poli)péptidos aislados. El anticuerpo o los (poli)péptidos pueden estar sin marcar o marcados con cualquiera de los marcadores descritos en la presente invención. Preferiblemente, los anticuerpos se pueden obtener de humano, ratón, rata, cabra o conejo.

En una realización más preferida de la presente descripción, dicho anticuerpo es capaz de discriminar entre la proteína agregada y la proteína monomérica.

El término «capaz de discriminar» se refiere a un anticuerpo que es específico de la isoforma monomérica o de la agregada de la proteína. Preferiblemente, dicho anticuerpo tiene una K_d disminuida en 5 veces por una isoforma de la proteína, más preferiblemente la K_d está disminuida 10 veces. Como consecuencia, dicho anticuerpo es capaz de fijarse a una isoforma de la proteína, mientras que es esencialmente incapaz de unirse a la otra isoforma.

En otra realización preferida de la presente descripción, la cantidad de marcador colocalizado se determina con el uso del método de «cribado de dianas intensamente fluorescentes (SIFT)» (Bieschke et al., 2000), FRET o toma confocal de imágenes de alta resolución.

Preferiblemente, dicha toma confocal de imágenes de alta resolución se realiza con un microscopio de barrido con láser confocal o con un microscopio que utiliza la tecnología de discos giratorios.

En otra realización preferida de la presente descripción, dichas proteínas monoméricas o agregantes se seleccionan del grupo que consiste en proteína priónica, proteína precursora del amiloide (PPA), α -sinucleína, superóxido dismutasa, proteína τ , inmunoglobulina, amiloide A, transtirretina, microglobulina β_2 , cistatina C, apolipoproteína A1, TDP-43, amilina, ANF, gelsolina, insulina, lisozima, fibrinógeno, huntingtina y ataxina, y otras proteínas con un tramo de poli-Q, y fragmentos o derivados de dichas proteínas. En una realización preferida, las proteínas monoméricas y agregantes se seleccionan del grupo que consiste en proteína precursora del amiloide (PPA) y α -sinucleína. En una realización más preferida, las proteínas monoméricas y agregantes son la α -sinucleína.

Preferiblemente, dichas proteínas con un tramo de poli-Q son proteínas que tienen al menos 36 restos de glutamina consecutivos. Más preferiblemente, dichas proteínas con el tramo de poli-Q se seleccionan del grupo que consiste en huntingtina y ataxina.

Preferiblemente, dichos fragmentos o derivados se seleccionan del grupo modificado por fosforilación, glucosilación, procesamiento proteolítico, glucación, oxidación y nitración. Los (poli)péptidos mencionados en la presente invención pueden contener uno o varios glúcidos, derivados de glúcidos, lípidos, fosfato, sulfato, ácidos grasos y nucleótidos unidos a aminoácidos independientes en la cadena. Preferiblemente, dicha modificación es una fosforilación, glucosilación, procesamiento proteolítico, glucación, oxidación y nitración.

La proteína puede ser una proteína de vertebrado o de invertebrado. Preferiblemente, la proteína es una proteína de mamífero o de ave. Más preferiblemente, la proteína de mamífero se selecciona de primate, humano, ratón, rata, ganado bovino (vacuno), cerdo y oveja. En casos concretos, puede ser preferible utilizar isoformas mezcladas, a saber, por ejemplo, la forma agregada de PrP^{Sc} derivada de humano y la forma monomérica derivada de ratón.

Las proteínas se pueden aislar de un animal o de un cultivo de tejidos, o se pueden preparar por medios recombinantes. Los inventores han contemplado que las proteínas puedan estar modificadas químicamente o que puedan estar tratadas con enzimas, tales como proteasas o glucosidasas, para mejorar la manipulación en el sistema de ensayo.

En otra realización más preferida de la presente descripción, la proteína monomérica es la proteína priónica y la proteína agregada es la PrP^{Sc} (Prusiner, 1998).

En otra realización más preferida de la presente descripción, la proteína monomérica es la α -sinucleína y dicha proteína agregada se selecciona del grupo que consiste en oligómeros o protofibrillas o fibrillas de la α -sinucleína.

Se describe un método para seleccionar compuestos que hayan mejorado su eficacia *in vivo* para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la agregación de una proteína y/o enfermedades neurodegenerativas, que comprende (a) administrar un compuesto candidato, que es un derivado del compuesto de la fórmula (E), a un cultivo celular o a

un animal que tiene la isoforma agregable de la proteína según se define en la presente invención; (b) cuantificar la cantidad de agregados observables; y (c) identificar y seleccionar un compuesto que es capaz de reducir los agregados o la formación de agregados de dicha proteína.

5 Este método permite analizar los compuestos candidatos *in vivo*, a saber, en el interior de las células, o *ex vivo*, a saber, fuera de un organismo vivo. El análisis de los compuestos candidatos *in vivo* y *ex vivo* se muestra, por ejemplo, en los ejemplos (véase más adelante). El análisis de los compuestos candidatos *in vivo* y *ex vivo* da una información adicional importante que incluye datos en cuanto a toxicidad, estabilidad en presencia de un complejo químico en el entorno, y la capacidad para alcanzar la ubicación donde se consigue un efecto molecular deseado.

10 Preferiblemente, el compuesto se administra a varias concentraciones para determinar una concentración en la que se puede observar un efecto sobre la agregación de una proteína y para calcular la CE_{50} , en donde el término CE_{50} se refiere a la concentración (molar) de un compuesto que produce el 50% de la respuesta máxima posible para dicho compuesto.

La presente invención o descripción también se refiere al uso de un compuesto de la fórmula (E) tal y como está definido más arriba para inhibir la agregación de una proteína en un animal (referencia), *in vitro* o *ex vivo*.

15 En una realización preferida, el animal es un animal no humano.

La presente invención o descripción se refiere además a una composición farmacéutica o diagnóstica que comprende el compuesto de la invención o descripción, respectivamente y, optativamente, un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 De acuerdo con la presente especificación, el término «composición diagnóstica» se refiere a las composiciones para diagnosticar en cada uno de los pacientes su posible respuesta o capacidad de curación debidas a las composiciones farmacéuticas de la especificación. El término «composición diagnóstica» también se refiere a las composiciones para determinar la presencia de las proteínas agregadas que subyacen en las enfermedades citadas más arriba. La composición diagnóstica comprende los compuestos citados más arriba. La composición diagnóstica puede comprender además los tampones adecuados y las enzimas, tales como la transcriptasa inversa, polimerasas termoestables, etc. Las composiciones diagnósticas se pueden empaquetar en un envase o en varios envases.

25 En una realización preferida más, la eficacia de dicho compuesto se mejora adicionalmente por derivación.

El término «derivación», de acuerdo con la presente especificación, se refiere a la generación de compuestos relacionados desde el punto de vista químico que tienen modificaciones en al menos una posición de la molécula.

30 En una realización preferida de la presente invención o descripción, dicho compuesto es detectable o está marcado de manera detectable. Se entiende que un compuesto es detectable o está marcado de manera detectable si su presencia se puede seguir mediante técnicas convencionales, tales como espectroscopia de RMN, detección óptica, tomografía de emisión de positrones (TEP), microscopia electrónica, toma de imágenes por resonancia magnética (RMN), espectrometría, cromatografía, ELISA, detección de emisión de radiactividad, preferiblemente mediante recuento de centelleo o recuento γ , preferiblemente TEP.

35 Cuando los compuestos de la fórmula (E) se han de utilizar como sondas para la toma de imágenes de proteínas agregadas, en concreto de los depósitos de amiloide, deben estar marcadas. La naturaleza específica del marcador dependerá del método que se ha de utilizar para la toma de imágenes. Típicamente, serán útiles los marcadores radiactivos que emiten positrones (TEP) y que tienen una semivida breve, tales como ^{18}F , ^{11}C , ^{125}I , ^{123}I , ^{131}I , ^{77}Br y ^{76}Br , en concreto ^{18}F y ^{11}C . Debido a su semivida breve, los compuestos marcados de la fórmula (E) se deben preparar poco antes de ser usados para el análisis.

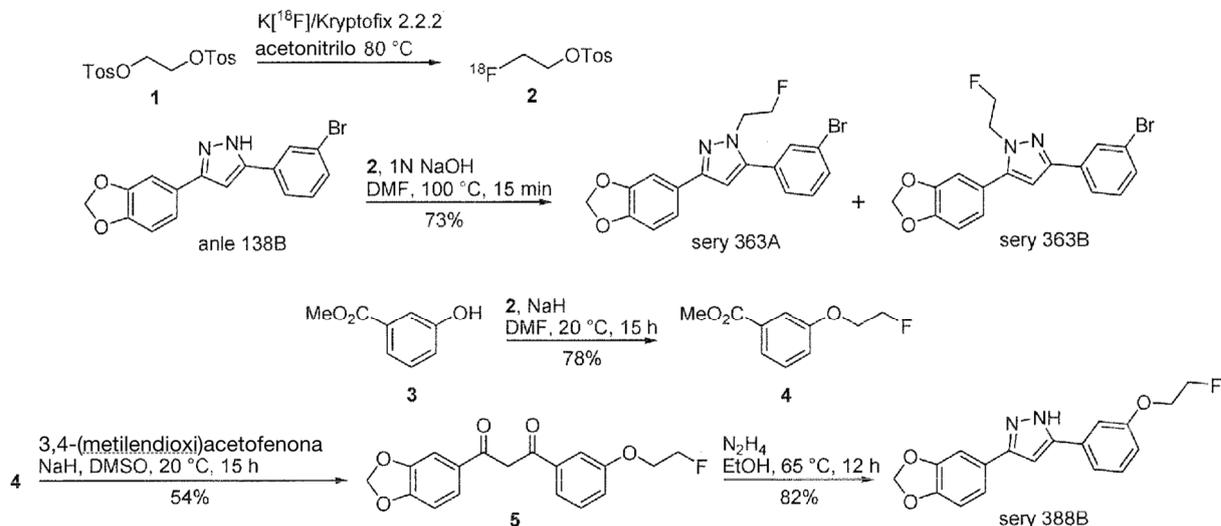
40 En consecuencia, la composición diagnóstica también se puede dar a conocer en forma de un kit, que consiste en precursores de los compuestos de la fórmula (E), que se hacen reaccionar para formar el compuesto deseado. Tal kit es particularmente cómodo, si el compuesto de la fórmula (E) contiene al menos un resto que es X, Y o L que es -N(R⁴)- y R⁴ comprende un marcador detectable.

45 En una realización preferida, el compuesto que se utiliza para tomar imágenes posee un resto -N(R⁴)- como X, Y o L, en el que R⁴ es -alquileo(C₁₋₄)-halógeno, en donde el átomo de halógeno es radiactivo. En otra realización preferida, el compuesto que se utiliza para tomar imágenes posee un resto -N(R⁴)- como X, Y o L, en el que R⁴ es -alquilo(C₁₋₄), que contiene al menos un isótopo de ^{11}C .

50 El experto en la técnica será capaz de idear métodos con los cuales el marcador detectable se puede unir a los compuestos de la fórmula (E). Los siguientes esquemas pueden servir como ejemplos ilustrativos.

El tosilato de 2-[^{18}F]fluoroetilo 2 es un precursor útil para incorporar ^{18}F (semivida de 109,8 min) a través de la fluoroetilación de los compuestos que contienen los nucleófilos oxígeno, azufre y nitrógeno, o mediante diferentes metilaciones mediadas por metales (R. Schirmacher et al., *J. Label. Compd. Radiopharm.* 2002, 45, 763-774). El tosilato de 2-[^{18}F]fluoroetilo se puede sintetizar en una síntesis de dos etapas, mediante la sustitución nucleófila directa

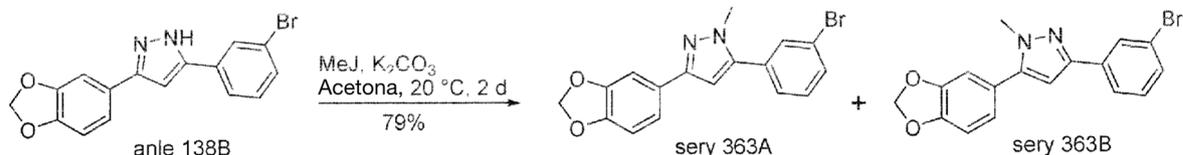
del 1,2-ditosilato de etilenglicol 1 por la sustitución nucleófila directa con $K[^{18}F]$ /Kryptofix 2.2.2 para producir el agente ^{18}F -fluoroetilante 2. El reactivo no radiactivo 2 se utilizó para la síntesis de sery 363A, sery 363B y sery 388B no radiactivos de acuerdo con el esquema A. Se pueden utilizar las mismas condiciones para la síntesis de los análogos radioactivos de estos compuestos.



Esquema A

5

Un emisor de positrones más útil, el ^{11}C (semivida de 20,38 min), se puede introducir mediante el yoduro de $[^{11}C]$ metilo (J. Eriksson et al., *J. Label. Compd. Radiopharm.* 2006, 49, 1177-1186) con el mismo tipo de sustitución nucleófila. Se utilizó el yoduro de metilo no radiactivo para la síntesis de sery 392A y sery 392B no radiactivos de acuerdo con el esquema B. Se pueden utilizar las mismas condiciones para la síntesis de análogos radioactivos de estos compuestos.



Esquema B

10

Aunque se prefiere unir el resto detectable al anillo D porque estos compuestos son particularmente fáciles de sintetizar, esto no es esencial. Es igualmente posible dar a conocer compuestos de la invención en los que el resto detectable está en una posición diferente en la molécula.

La presente descripción da a conocer un método para tomar imágenes de depósitos de proteínas agregadas, que comprende las etapas de:

(i) introducir una cantidad detectable de una composición que comprende un compuesto marcado de manera detectable de la presente invención en un sujeto;

(ii) dar el tiempo suficiente para que el compuesto se asocie a la proteína agregada; y

(iii) detectar el compuesto asociado a la proteína agregada.

En una realización preferida del método de toma de imágenes, la proteína agregada se selecciona del grupo que consiste en la proteína precursora del amiloide (PPA) y la α -sinucleína. En una realización más preferida, la proteína agregada es la α -sinucleína.

La composición que comprende el compuesto marcado de manera detectable se puede introducir en el sujeto mediante cualquiera de las administraciones descritas más arriba, tales como, por ejemplo, por vía oral o parenteral. El compuesto marcado se puede introducir en un paciente y después de un intervalo de tiempo suficiente para que el compuesto se termine asociando a la proteína agregada, el compuesto marcado se detecta de manera no invasiva dentro del paciente. Como alternativa, el compuesto marcado se puede introducir en un paciente, se deja un tiempo

suficiente para que el compuesto se termine asociando a la proteína agregada y, a continuación, se toma una muestra de tejido del paciente y se detecta el compuesto marcado en el tejido al margen del paciente. También se puede retirar una muestra de tejido de un paciente antes de introducir el compuesto marcado en la muestra de tejido. Se puede detectar el compuesto después de dejar una cantidad de tiempo suficiente para que el compuesto se termine por fijar a la proteína agregada.

Los métodos para la detección del compuesto marcado asociado a la proteína agregada se conocen bien en la técnica e incluyen, sin limitación, resonancia magnética nuclear (RMN), tomografía de emisión de positrones (TEP) o la tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT) para la detección de los compuestos radiomarcados. El marcador que se introduce en el compuesto depende del método de detección a utilizar. Así pues, por ejemplo, si se selecciona la TEP como método de detección, el compuesto debe poseer un átomo emisor de positrones, tal como ^{11}C o ^{18}F .

La toma de imágenes de las proteínas agregadas también se puede realizar de manera cuantitativa, de tal forma que se puede determinar la cantidad de proteína agregada.

En una realización preferida de la invención o descripción, dicha enfermedad relacionada con la agregación de una proteína se caracteriza por la presencia de formas agregadas de al menos una proteína o un fragmento o derivado de la misma, en donde esta proteína se selecciona del grupo que consiste en proteína priónica, proteína precursora del amiloide (PPA), α -sinucleína, superóxido dismutasa, proteína τ , inmunoglobulina, amiloide A, transtirretina, microglobulina $\beta 2$, cistatina C, apolipoproteína A1, TDP-43, amilina, ANF, gelsolina, insulina, lisozima, fibrinógeno, huntingtina y ataxina, y otras proteínas con un tramo de poli-Q. En una realización preferida, la proteína se selecciona del grupo que consiste en proteína precursora del amiloide (PPA) y α -sinucleína. En una realización más preferida, la proteína es la α -sinucleína.

Preferiblemente, dichas proteínas con un tramo de poli-Q son proteínas que tienen al menos 36 restos consecutivos de glutamina. Más preferiblemente, dichas proteínas con tramo de poli-Q se seleccionan del grupo que consiste en huntingtina y ataxina.

El experto en la técnica sabe que dichas proteínas pueden existir en diferentes isoformas, que incluyen las proteínas modificadas por fosforilación, glucosilación, procesamiento proteolítico y similares. El término «al menos un...» se refiere al hecho conocido por el experto en la técnica de que las enfermedades pueden estar relacionadas con la presencia de más de una proteína en la forma agregada. Por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer, los agregados de fragmentos de la proteína precursora del amiloide (PPA) y los agregados de τ suelen ser detectables.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «enfermedades neurodegenerativas» comprende enfermedades tales como la enfermedad de Parkinson, enfermedad causada por los priones, enfermedad de Alzheimer, atrofia multisistémica, enfermedad difusa con cuerpos de Lewy, demencia frontotemporal, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, ataxias espinocerebelosas y otras enfermedades por poli-Q, angiopatía amiloide cerebral hereditaria, polineuropatía amiloidótica familiar. Además, tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «enfermedad por agregación de una proteína» se refiere a las enfermedades que se manifiestan predominantemente fuera del sistema nervioso e incluye enfermedades tales como la amiloidosis sistémica primaria (amiloidosis AL), la amiloidosis sistémica reactiva (amiloidosis AA), diabetes de tipo 2, amiloidosis localizada por inyección, amiloidosis de la microglobulina $\beta 2$, amiloidosis no neuropática hereditaria y amiloidosis sistémica hereditaria finlandesa.

En otra realización preferida de la invención, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad causada por los priones, enfermedad de Alzheimer, atrofia multisistémica, enfermedad difusa con cuerpos de Lewy, demencia frontotemporal, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, ataxias espinocerebelosas y otras enfermedades por poli-Q, angiopatía amiloide cerebral hereditaria, polineuropatía amiloidótica familiar, amiloidosis sistémica primaria (amiloidosis AL), amiloidosis sistémica reactiva (amiloidosis AA), diabetes de tipo 2, amiloidosis localizada por inyección, amiloidosis de la microglobulina $\beta 2$, amiloidosis no neuropática hereditaria, amiloidosis sistémica hereditaria finlandesa. En una realización más preferida, la enfermedad es la enfermedad de Parkinson.

En una realización preferida de la invención o descripción, dicha enfermedad causada por los priones se selecciona de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad genética humana causada por priones, encefalopatía espongiiforme bovina (EEB) y tembladera de las ovejas.

Finalmente, se describe un kit que comprende el compuesto de la fórmula (E) y, además, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se fija específicamente a dicho compuesto; y/o proteína monomérica o agregada tal y como está definido más arriba; y/o proteína monomérica o agregada tal y como está definido más arriba, optativamente formando un complejo con dicho compuesto e instrucciones para el uso, en uno o más envases.

Procedimientos experimentales generales

Los compuestos de la fórmula (E) se pueden preparar mediante cualquiera de las técnicas aplicables de la síntesis orgánica. Muchas de tales técnicas aparecen elaboradas en L. F. Tietze, Th. Eicher «Reaktionen und Synthesen», 2.

Auflage (Georg Thieme Verlag, Stuttgart, NY, 1991), T. W. Greene, P. G. M. Wuts «Protective Groups in Organic Synthesis», tercera edición (John Wiley & Sons, NY, 1999), así como J. March «Advanced Organic Chemistry», tercera edición (John Wiley & Sons, NY, 1985).

5 A continuación, se dan a conocer una serie de métodos de ejemplo para preparar los compuestos de la fórmula (E). Estos métodos están destinados a ilustrar la naturaleza de tales preparaciones y no están destinados a limitar el alcance de los métodos aplicables.

10 Por lo general, las condiciones de reacción, tales como temperatura, tiempo de reacción, solventes, procedimientos de aislamiento y purificación, y similares, serán los habituales en la técnica para realizar en concreto esta reacción. El material de referencia citado, junto con el material citado en él, contiene descripciones detalladas de tales condiciones. Típicamente, las temperaturas serán de -80 °C a 150 °C, los solventes serán apróticos o próticos, y los tiempos de reacción serán de 10 segundos a 10 días. El aislamiento y la purificación típicamente consisten en extinguir cualquier reactivo que no haya reaccionado seguido del reparto entre un sistema de capas de agua/orgánico (extracción), y la separación de la capa que contiene el producto.

15 Las técnicas sintéticas estándares, tales como el uso de las condiciones de reacción anhidras (p. ej., entornos de gas inerte) son frecuentes en la técnica y se aplicarán cuando sea aplicable.

Las modificaciones de cada uno de los esquemas que vienen a continuación conduce a diferentes análogos de los materiales de ejemplo específicos que se producen a continuación. Las citas dadas más adelante que describen métodos idóneos de síntesis orgánica son aplicables a tales modificaciones.

20 En cada uno de los esquemas de ejemplo que aparecen más abajo, puede ser ventajoso separar los productos de reacción los unos de los otros y/o de los materiales de partida. Los productos deseados de cada etapa se separan y/o purifican (a partir de ahora, se separan) hasta el grado deseado de homogeneidad mediante las técnicas habituales en el campo. Típicamente, tales separaciones implican extracciones multifásicas, la cristalización desde un solvente o una mezcla de solventes, destilación, sublimación o cromatografía. La cromatografía puede conllevar cualquier cantidad de métodos, entre ellos, por ejemplo, la cromatografía de exclusión por tamaños o la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de alta, media o baja presión, la cromatografía preparativa y a pequeña escala en capa fina o gruesa, así como técnicas de cromatografía a pequeña escala rápida y en capa fina.

25 Otra clase de métodos de separación conlleva el tratamiento de una mezcla con un reactivo seleccionado por fijarse, o si no por producir en forma separable, un producto deseado, material de partida sin reaccionar, producto secundario de la reacción, o similares. Tales reactivos incluyen absorbentes, tales como carbón activado, tamices moleculares, medios de intercambio iónico o similares. Como alternativa, los reactivos pueden ser ácidos en el caso de un material básico, bases en el caso de un material ácido, reactivos de fijación tales como anticuerpos, proteínas de fijación, quelantes selectivos tales como éteres de corona, extracción de iones líquido/líquido, o similares.

30 La selección de métodos de separación apropiados depende de la naturaleza de los materiales implicados. Por ejemplo, el punto de ebullición y la masa molecular en la destilación y la sublimación, la presencia o ausencia de grupos funcionales polares en la cromatografía, la estabilidad de los materiales en los medios ácidos y básicos en la extracción multifásica, y similares. El experto en la técnica aplicará las técnicas que con más probabilidad consigan la separación deseada.

35 En concreto, los compuestos de la fórmula (E) se pueden preparar de una manera que es análoga a los procedimientos que se describen, por ejemplo, en M. Ono et al. (*Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16 (2008) 6867-6872), solicitudes de patente internacional WO 2008/131148, WO 2004/080972, 2004/072050 y WO 98/17652. Las vías alternativas se ejemplifican también en el apartado de los ejemplos de la presente especificación.

Los siguientes ejemplos tienen el propósito de ilustrar. Sin embargo, no se han de considerar como limitantes.

Los compuestos o realizaciones que no formen parte de la invención tal y como se define en las reivindicaciones se han de considerar solo a modo de ilustración.

45 Ejemplos

Ejemplo 1: Identificación de una nueva clase de compuestos para inhibir la agregación de una proteína.

50 Dos subconjuntos de la colección de compuestos comerciales DIVERSet (ChemBridge Corp., San Diego, CA, USA), cada uno con 10 000 compuestos, y llamados DIVERSet 1 y 2 por nosotros, se han cribado en busca de los inhibidores de la propagación de los priones mediante el uso del ensayo antiprionico de SIFT bidimensional (Bertsch et al., 2005) y un modelo de cultivo celular de la enfermedad causada por los priones. En ambos ensayos, se obtuvieron positivos primarios al analizar los compuestos a una sola concentración y posteriormente se verificaron en diluciones seriadas. Además, los positivos del cultivo celular se analizaron con otra línea celular.

Cribado por SIFT bidimensional

Para analizar el efecto inhibitor de los fármacos sobre la asociación entre PrP^C y PrP^{Sc} en un ensayo de cribado

masivo y de alto contenido, aplicamos la técnica de «cribado de dianas intensamente fluorescentes» (SIFT, por su nombre en inglés), que utiliza una configuración del microscopio confocal de dos colores invertido con detectores de fotones únicos para dos colores de luz fluorescente. Se preparan las muestras en placas de microtitulación de 96 y 384 pocillos con fondo de portaobjetos de cristal. La mezcla del ensayo consiste en la PrP recombinante de ratón (rPrP), el anticuerpo monoclonal (Acm) L42, que no reconoce la PrP de ratón sino la PrP de humano, y agregados de PrP^{Sc} preparados a partir del cerebro de humano con ECJ. Las moléculas de rPrP y del Acm se marcan con fluoróforos verde y rojo, respectivamente. La fijación de varias moléculas de rPrP y del Acm a los agregados de PrP^{Sc} dará lugar a la formación de complejos terciarios que muestran muchos fluoróforos unidos rojos y verdes. Tales agregados se pueden identificar y analizar mediante el método de SIFT, porque dan lugar simultáneamente a intensidades elevadas en ambos canales de fluorescencia. La distribución de las intensidades de fluorescencia roja y verde se puede valorar mediante un histograma bidimensional de intensidad de la fluorescencia. Siempre y cuando se incluya en el ensayo un inhibidor de la asociación entre rPrP y PrP^{Sc}, debe disminuir la intensidad de fluorescencia verde de los agregados terciarios. La distribución del color de los agregados en el histograma bidimensional cambiará entonces hacia los sectores «rojos» de dicho histograma.

Cribado primario por SIFT de 20 000 compuestos

El sistema de ensayo descrito más arriba se aplicó a dos colecciones, cada una con 10 000 compuestos diferentes de tipo fármaco (ChemBridge; «DIVERSet1» y «DIVERSet2») en placas de microtitulación de 96 pocillos para un cribado primario que incluye controles negativos sin ningún compuesto adicional y controles positivos que contienen 17 µM de DOSPA, así como controles sin cilindros de ECJ ni compuestos (que sirven para comprobar la ausencia de agregación en la mezcla de anticuerpo y de rPrP).

Las muestras que contienen DOSPA mostraron una reducción de la señal de SIFT en los sectores que vigilan las señales de los agregados predominantemente marcados con rPrP en verde. Esto indica que en estos controles se había fijado menos rPrP a los cilindros de priones de la ECJ. Ya que los cilindros de priones están marcados por los anticuerpos marcados en rojo, su fluorescencia todavía genera una señal de SIFT en los sectores «rojos». La mayoría de los compuestos no influyen en la distribución de la señal de SIFT. Pero algunos de los compuestos de DIVERSet hicieron disminuir el número de agregados detectados en los sectores «verdes». Las curvas de SIFT de estas muestras están desplazadas hacia los controles de DOSPA. Así pues, los compuestos correspondientes se pueden considerar que son positivos primarios de posibles fármacos antipriónicos. De vez en cuando, algunos problemas técnicos generaron artefactos, que obscurecieron toda una medición de una placa de microtitulación entera. Aparte de esto, solo aproximadamente el 7% de las mediciones sin alterar se habían de tratar como valores extremos y no eran idóneas para el análisis de SIFT automático, principalmente debido a la fluorescencia intrínseca de los compuestos analizados. No se esperaba este porcentaje más bien bajo de compuestos que no se podían tratar en el ensayo de SIFT y acentuó la versatilidad y la robustez del ensayo. La identificación de las mediciones problemáticas y de los compuestos está facilitado por la naturaleza de alto contenido de los datos del ensayo de SIFT. Para cada muestra se registran simultáneamente varios parámetros de fluorescencia, como por ejemplo la intensidad media de la fluorescencia para cada canal de color. Estos se presentan junto con la suma de los acontecimientos de alta intensidad en cada sector del histograma de distribución de colores. Por lo tanto, las muestras con una fluorescencia intrínseca alta se pueden clasificar con facilidad.

Positivos primarios por SIFT y validación mediante diluciones seriadas

Para que un compuesto se clasifique como un positivo primario, analizamos la suma de la posición esperada de los picos en los sectores «verdes» 1 a 5 y definimos un valor de corte de aproximadamente el 50% del efecto de DOSPA en comparación con los controles sin tratar como el efecto mínimo necesario. Los compuestos de DIVERSet se asignaron a valores de actividad de SIFT escalonables (tp1_sift) a partir de los datos de cribado por SIFT que caracterizan su efecto inhibitor sobre la agregación de priones tal y como describieron Bertsch et al. en 2005. Los valores de actividad menores que cero no reflejan ningún efecto inhibitor, mientras que los valores mayores que cero reflejan un efecto inhibitor. Aquí, los valores en torno a 1 indican un efecto inhibitor igualmente grande que el de las mediciones de los controles positivos en una placa dada.

En los positivos primarios se comprobó la inhibición dependiente de la dosis sobre la asociación entre PrP^C y PrP^{Sc} mediante el uso de seis series de diluciones por duplicado (de 0,1 a 100 µM) de cada compuesto en el ensayo por SIFT. Las curvas de respuesta de la dosis confirmaron la actividad inhibitor dependiente de la concentración que presentaban estos compuestos. En comparación con el efecto de DOSPA a 17 µM, la inhibición semimáxima de la fijación de rPrP a los cilindros con los priones se observó a valores de CE₅₀ en el margen de 0,3 a 60 µM.

Positivos primarios por cultivo celular y validación mediante diluciones seriadas

Además del ensayo por SIFT, las colecciones de DIVERSet también se cribaron en modelos de cultivo celular de enfermedades causadas por los priones. En estos ensayos, la actividad antipriónica de los compuestos de DIVERSet se analizó inicialmente a una concentración de 20 µM. Los resultados del cribado primario del cultivo de células (en las células SMB a 20 µM) están codificados por una variable binaria (tp3_reduktion), donde un valor de «1,0» codifica «activo» y «0,0» codifica «inactivo». Se validaron los compuestos activos identificados en el cribado primario, en donde el objetivo era identificar los compuestos activos incluso a concentraciones muy bajas. La verificación de los positivos

primarios de los cultivos celulares se realizó en series de diluciones a cuatro concentraciones (1 μM , 4 μM , 10 μM , 40 μM) para DIVERSet 1 y solo a dos concentraciones (0,2 μM , 2 μM) para DIVERSet 2. Los resultados (tp3_reduktion_mue) se anotan mediante «1,0» para activo a 1 μM (DS1) o a 0,2 μM (DS2) y mediante «0,5» para activo a 2 μM (DS2). Los compuestos inactivos a concentraciones por encima de 20 μM se anotan mediante «0,0» (DS1 + 2). Además, los positivos primarios del cultivo de las células SMB se validaron a concentraciones únicas en las células ScN2a (tp3_scn2a), donde de nuevo «0,0» y «1,0» señalan los compuestos inactivos y activos, respectivamente.

Difenilpirazoles (DPP) y compuestos relacionados a modo de compuestos antipirónicos nuevos

Generación del mapa de REA

Los compuestos de DIVERSet caracterizados como «activos» en el cribado primario del cultivo de células se sometieron a un análisis de aglomeración con el uso del paquete informático Benchware HTS DataMiner (DM; Tripos Inc., St. Louis, MO, EE. UU.) que da lugar al mapa de REA que se muestra en la figura 1. Ya que la gran cantidad de compuestos contenidos en las dos colecciones (20 000) es demasiado grande como un punto de partida para el análisis de aglomeración utilizando DataMiner, el análisis se limitó inicialmente a los positivos primarios (837 compuestos) del cribado en cultivo de células de DIVERSet 1 y 2. Así pues, los aglomerados se determinaron solo para los compuestos activos. Aquí, el programa DataMiner agrupó en aglomerados los compuestos que tenían similitud estructural y eran activos, y es, por lo tanto, idóneo para identificar nuevas estructuras prototípicas potencialmente relevantes. En una segunda etapa, la clasificación así establecida se aplicó al resto de la colección que cubre los compuestos inactivos en el cultivo celular. Aquí, el programa DataMiner añadió más compuestos (inactivos) a las aglomeraciones generadas, si la medición empleada indicaba una similitud estructural elevada.

El resultado del análisis de aglomeración se muestra gráficamente mediante DataMiner en forma de un mapa de REA, en el cual las aglomeraciones de sustancias S están representadas mediante símbolos. El DataMiner ordena los símbolos de tal manera que están localizados cerca si las aglomeraciones representadas son similares desde el punto de vista estructural. El tamaño, la forma y el color de los símbolos está distribuido en función las propiedades específicas de la aglomeración, y los puede seleccionar el usuario.

Así pues, se seleccionó que el tamaño de los símbolos es proporcional al tamaño de la aglomeración |S|, a saber, al número de compuestos C contenidos en esta. La forma de los símbolos se determinó en función de la fracción

$$P_{\text{SIFT}}(S) = \frac{|\{C \in S \mid a(C) \geq a_{\text{min}}\}|}{|S|}$$

de dichas sustancias C en las correspondientes aglomeraciones S, cuya actividad primaria a(C) que se determinó según el cribado por SIFT estaba por encima de un umbral seleccionado de $a_{\text{min}} = 0,25$. Así pues, las aglomeraciones cuya fracción $P_{\text{SIFT}}(S)$ está por encima del 50% se muestran como estrellas mientras que el resto, principalmente aglomeraciones inactivas, se muestran como cuadrados. De manera análoga, el color de los símbolos codifica las fracciones de las aglomeraciones

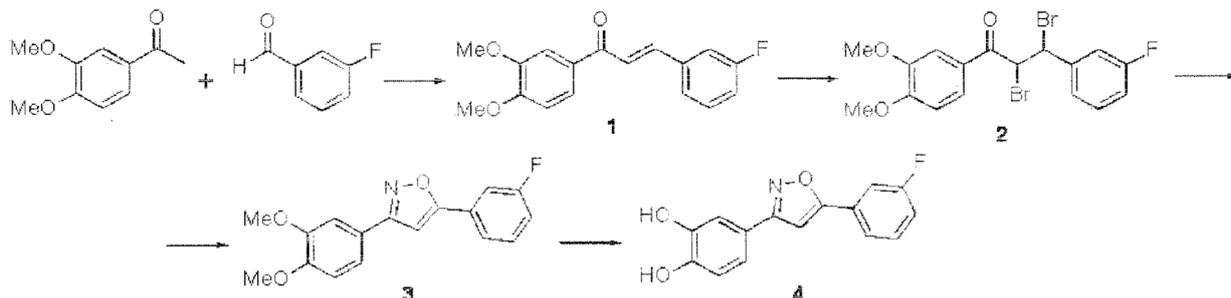
$$P_{\text{ZK}}(S) = \frac{|\{C \in S \mid C \text{ es positivo primario}\}|}{|S|}$$

de acuerdo con los positivos primarios del cribado basado en el cultivo celular, en donde los símbolos de las aglomeraciones con más del 50% de sustancias activas son rojas y las aglomeraciones restantes son grises. En la figura 1 se muestra el mapa de REA que se obtiene del análisis de aglomeración descrito más arriba. Las estrellas rojas grandes simbolizan las aglomeraciones con una alta proporción de sustancias positivas por SIFT y en el cultivo celular. Estas aglomeraciones representan las posibles estructuras prototípicas. Con el DataMiner, las aglomeraciones de interés se analizaron adicionalmente y se identificó un grupo de cinco aglomeraciones vecinas (denominadas DPP_1 a DPP_5), que se muestran en la figura 1 en negrita. Todos los compuestos clasificados en estas aglomeraciones se muestran en la figura 2 junto con su actividad en los diferentes ensayos. El hecho de que estas aglomeraciones estén localizadas en una posición cercana las unas con las otras indica que contienen sustancias que tienen una estructura similar, a saber, todos pertenecen a la clase de compuestos químicos de derivados del 3,5-difenilpirazol (DPP) (compárese con el motivo de DPP que se muestra en la figura 1).

Ejemplo 2: Síntesis de nuevos fármacos para inhibir la agregación bajo los aspectos médico-químicos

Sobre la base del descubrimiento de la nueva estructura prototípica que se describió más arriba, se sintetizaron una serie de sustancias adicionales mediante la sustitución selectiva de diferentes sustituyentes, tal y como se esboza más abajo. En lo que viene a continuación, los compuestos que no caen dentro del alcance de las reivindicaciones se han de considerar como compuestos de referencia.

Esquema 1: Síntesis de isoxazoles



(E)-1-(3,4-Dimetoxifenil)-3-(3-fluorofenil)-2-propeno-1-ona (1) [Nam et al., 2004]

5 Se agitó a temperatura ambiente durante 24 h una solución de 3,4-dimetoxiacetofenona (1,8 g, 10 mmol), 3-fluorobenzaldehído (1,24 g, 10 mmol), NaOH (50 mg, 1,25 mmol) y Ba(OH)₂·8H₂O (100 mg, 0,32 mmol) en metanol (10 ml). La reacción se enfrió a +4 °C, lo que dio lugar a que el precipitado se recogiese por filtración, se retrocristalizara a partir de metanol y se secara para producir 1 (1,65 g, 58%) como un polvo amarillento.

2,3-Dibromo-1-(3,4-dimetoxifenil)-3-(3-fluorofenil)-propán-1-ona (2) [Harris et al., 1977]

10 A una solución de 1 (715 mg, 2,5 mmol) en cloroformo (11 ml) se le añadió gota a gota una solución de bromo (400 mg, 2,5 mmol) en cloroformo (4 ml) a 0 °C. Después de agitarla durante 2 h a 0 °C, la reacción se diluyó con bencina de petróleo (20 ml) y la mezcla se refrigeró (-24 °C) durante 10 horas, tras lo cual el precipitado se recogió por filtración, se lavó con *n*-hexano (10 ml) y se secó para dar 2 (780 mg, 70%) como un polvo blanco.

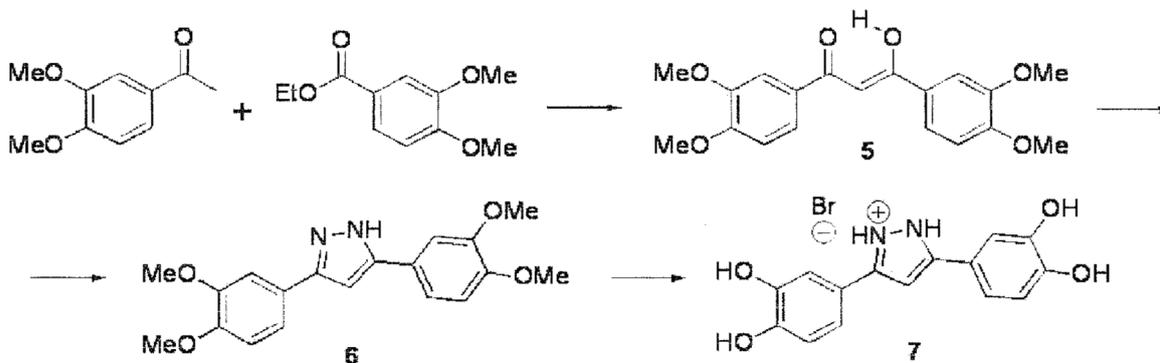
3-(3,4-Dimetoxifenil)-5-(3-fluorofenil)isoxazol (3) [Harris et al., 1977]

15 A una solución de 2 (450 mg, 1 mmol) en etanol (6 ml) se la trató con hidrocloreto de hidroxilamina (306 mg, 4,4 mmol) seguido de una solución de NaOH (460 mg, 11,5 mmol) en agua (1,5 ml). La mezcla se calentó a reflujo durante 2 h, se enfrió y se trató con agua (3 ml). Después de la refrigeración (4 °C) durante una noche, el producto se recogió por filtración, se lavó con agua (5 ml) y se secó para dar 3 (180 mg, 60%) como un polvo blanco.

3-(3,4-Dihidroxifenil)-5-(3-fluorofenil)isoxazol (4) [Vanelle et al., 2000]

20 Una solución de 3 (100 mg, 0,33 mmol) en diclorometano (5 ml) se enfrió a -78 °C tratada con tribromuro de boro (0,16 ml, 1,7 mmol), se agitó a -78 °C durante 3 h y a continuación durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla se enfrió a -78 °C y se paró con metanol (5 ml). Después de la agitación durante 3 h a temperatura ambiente, los disolventes se evaporaron a presión reducida, y el residuo se coevaporó cuatro veces con metanol (10 ml). El precipitado resultante se sometió a reflujo en 5 ml de cloroformo, después de enfriar el producto, se recogió por filtración y se secó para dar 4 (60 mg, 67%) como un polvo blanco.

25 Esquema 2: Síntesis de pirazoles



1,3-Bis(3,4-dimetoxifenil)-propán-1,3-diona (5) [Anselme, 1967]

30 Una suspensión al 60% de hidruro de sodio en aceite mineral (0,4 g, 10 mmol) se lavó con bencina de petróleo (20 ml) dos veces, y se le añadió DMSO anhidro (10 ml). Después de la agitación durante 30 min a temperatura ambiente en argón, se le añadió THF (5 ml), se enfrió el matraz a 15 °C y se le añadió 3,4-dimetoxibenzoato (2,1 g, 10 mmol). La temperatura se dejó descender hasta 10 °C y se le añadió una solución de 3,4-dimetoxiacetofenona (1,08 g, 6 mmol) en DMSO (4 ml) a tal velocidad que la temperatura no aumentó por encima de los 15 °C. Después de completar la

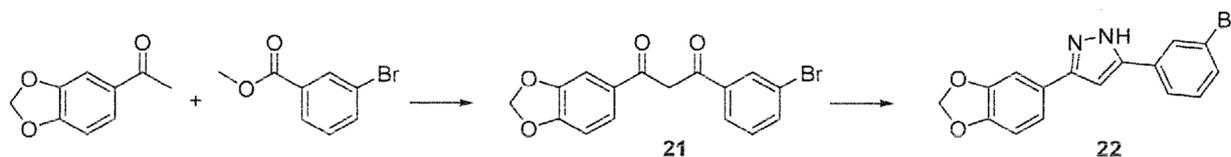
adición, la mezcla de reacción se agitó 72 h a temperatura ambiente, y a continuación se vertió lentamente en hielo picado (250 g) que contenía ácido fosfórico al 85% (1 ml). El precipitado resultante se recogió por filtración, se lavó con agua (50 ml) y se secó para dar 5 (2,1 g, 99%) como un polvo amarillento.

3,5-Bis(3,4-dimetoxifenil)pirazol (6) [Hauser et al., 1957]

- 5 Una solución de 5 (1,0 g, 2,9 mmol) e hidrato de hidrazina (218 mg, 4,4 mmol) en etanol (15 ml) se calentó a reflujo durante 3 h con agitación. La solución amarilla transparente se evaporó a presión reducida, se le añadió agua y el precipitado resultante se recogió por filtración, se lavó con agua y se secó para dar 6 (960 mg, 97%) como un polvo amarillento.

Hidrobromuro de 3,5-bis(3,4-dihidroxiifenil)pirazol (7) [Vanelle et al., 2000]

- 10 Una solución de 6 (120 mg, 0,35 mmol) en diclorometano (5 ml) se enfrió a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, se trató con tribromuro de boro (0,34 ml, 3,5 mmol), se agitó a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 h y a continuación durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla se enfrió a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se paró con metanol (5 ml). Después de la agitación durante 3 h a temperatura ambiente, los solventes se evaporaron a presión reducida, y el residuo se coevaporó cuatro veces con metanol (10 ml). El precipitado resultante se sometió a reflujo en 5 ml de cloroformo, después de enfriar el producto, se recogió por filtración y se secó para dar 7 (108 mg, 85%) como un polvo amarillo.



1-(1,3-Benzodioxol-5-il)-3-(3-bromofenil)-propán-1,3-diona (21) [Anselme, 1967]

1. Procedimiento

- 20 Un matraz de tres cuellos de 500 ml seco se equipó con una barra de agitación magnética revestida con Teflon®, un tabique de goma, un termómetro y un condensador de reflujo al cual estaba unido un tubo de tipo T conectado a una fuente de nitrógeno puro. La junta restante del tubo T estaba conectada a un dispositivo de burbujeo de tal manera que la tasa de flujo del nitrógeno se puede observar a lo largo de la reacción. El aparato está organizado de tal manera que el matraz se puede enfriar intermitentemente con un baño de María. Después de que el recipiente de reacción se haya enjuagado con nitrógeno, se mantiene en el recipiente de reacción una atmósfera de nitrógeno estática durante el resto de la reacción. El matraz de carga con aproximadamente el 60% de la dispersión de hidruro de sodio (5 g, 0,125 mol) en aceite mineral (nota 1). El aceite mineral se lava desde el hidruro con bencina de petróleo 40/60 (3 x 40 ml) (nota 2). La capa de bencina de petróleo del sobrenadante se retira mediante el uso de una jeringuilla hipodérmica con conector Luer-lock con una aguja de acero inoxidable insertada a través del tabique de goma. El hidruro de sodio residual se mezcla con 80 ml de sulfóxido de dimetilo (nota 3) y el tabique de goma se reemplaza por un embudo de goteo igualador de la presión. Una solución de 16,4 g (0,1 mol) de 1-(1,3-benzodioxol-5-il)etanona (nota 4) y 26,9 g (0,125 mol) de 3-bromobenzoato de metilo (nota 5) en 60 ml de sulfóxido de dimetilo se coloca en el embudo de goteo. El embudo se tapa, se comienza la agitación y el contenido del matraz se enfría en un baño de María a $15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se le añade lentamente la solución de 1-(1,3-benzodioxol-5-il)etanona y 3-bromobenzoato de metilo de tal manera que la evolución del hidrógeno se mantiene a una velocidad controlable y la temperatura no aumenta por encima de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un periodo de 60 minutos (nota 6). Se retira el baño una vez completada la adición, y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente ($23\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 15 horas. La mezcla de reacción homogénea resultante de color rojo oscuro se vierte lentamente en 500 ml de hielo y agua que contiene 5 ml de ácido ortofosfórico al 85% (nota 7) con agitación. Al cabo de 1 hora de agitación, el producto se retira por filtración (nota 8), se lava por filtración con succión con agua (2 x 100 ml) y se seca al vacío hasta que el peso es constante a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 6 horas para dar 34,4 g del producto bruto (nota 9). Se retrocristaliza desde 200 ml de etanol al 99,9% y 200 ml de acetato de etilo (nota 10) y se seca al vacío hasta que el peso es constante a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 6 horas para dar 28,5 g (rendimiento del 82%) de 1-(1,3-benzodioxol-5-il)-3-(3-bromofenil)propano-1,3-diona pura (nota 11), p. f. $136\text{-}137\text{ }^{\circ}\text{C}$. El filtrado se concentra a presión reducida hasta un volumen de aproximadamente 30 ml, el sólido cristalino que se separa se recoge en un filtro, se lava por filtración con succión con etanol (2 x 10 ml) y se seca al vacío hasta que el peso es constante a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 6 horas, lo que produce una masa adicional (3,15 g) del producto bruto. El producto bruto se retrocristaliza dos veces desde 20 ml de etanol al 99,9% y 20 ml de acetato de etilo, y se seca al vacío hasta que el peso es constante a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 6 horas para dar 1,8 g adicionales (rendimiento del 5%) de 1-(1,3-benzodioxol-5-il)-3-(3-bromofenil)propano-1,3-diona pura (nota 12). El rendimiento total del producto es de 30,3 g (87%).

2. Notas

- 50 1. Se utilizó hidruro de sodio, dispersión de aceite al 57-63%, número de orden 13431 disponible de Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe.
2. Se utilizó bencina de petróleo de calidad para el análisis, el hervido oscila entre $40\text{-}60\text{ }^{\circ}\text{C}$, número de orden 101775

de Merck KGaA, Darmstadt.

3. Se utilizó sin más purificación sulfóxido de dimetilo de calidad para el análisis, número de orden 102952 de Merck KGaA, Darmstadt.

5 4. Se utilizó 1-(1,3-benzodioxol-5-il)etanona, 98%, número de orden A13597 disponible de Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe.

5. Se utilizó 3-bromobenzoato de metilo, 98%+, número de orden A16174 disponible de Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe.

6. Se observa la formación de espuma durante la adición de la solución. El uso del agitador mecánico y un antiespumante, como el éter de polietilenglicol y dimetilo, puede ser necesario cuando se escale.

10 7. Se utilizó ácido ortofosfórico, 85% (p/p) en solución acuosa, de calidad para el análisis, número de orden 100573 de Merck KGaA Darmstadt.

8. El valor del pH de la mezcla de reacción es pH = 7. Mediante la acidificación con 15 ml más de ácido ortofosfórico a pH = 2, se pueden obtener 1,3 g de ácido 3-bromobenzoico.

9. La pureza del producto que se determinó por HPLC es del 96,3%.

15 10. Se utilizó etanol al 99,9% absoluto, de calidad para análisis, número de orden 100983 y acetato de etilo de calidad para análisis, número de orden 109623 disponibles de Merck KGaA, Darmstadt.

20 11. La pureza del producto determinada por HPLC es del 99,3%. La HPLC analítica se realiza con un sistema de HPLC de Waters con un detector de fotodiodos ordenados Waters 996. Todas las separaciones implicaban una fase móvil de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% (p/p) en agua (solvente A) y TFA al 0,1% (v/v) en acetonitrilo (solvente B) mediante el uso de una columna de fase inversa (RP) Eurospher RP 18, 100 Å, 5 µm, 250 × 4,6 mm a una velocidad de flujo de 1 ml/min. El compuesto se disolvió en acetonitrilo de calidad para HPLC a una concentración de 1 mg/ml. Los picos con los tiempos de retención (TR) 20,9 y 10,3 son las formas enol y ceto, respectivamente, del ANLE 138A. La reinyección de los picos recogidos por separado de 20,9 y 10,3 min da de nuevo los mismos dos picos con los mismos TR.

25 12. La pureza del producto determinada por HPLC es del 98,4%.

3-(1,3-Benzodioxol-5-il)-5-(3-bromofenil)-1*H*-pirazol (22) [Hauser et al., 1957]

1. Procedimiento

30 Una mezcla de 28,4 g (81,8 mmol) de 1-(1,3-benzodioxol-5-il)-3-(3-bromofenil)propano-1,3-diona (nota 1) y 200 ml de alcohol de *n*-butilo (nota 2) se coloca en un matraz con fondo redondo de 500 ml equipado con una barra de agitación magnética revestida de Teflon®, un condensador de reflujo y un manto de calentamiento eléctrico. Se comienza la agitación y el calentamiento, se le añaden 6 ml (6,2 g, 123,4 mmol) de monohidrato de hidrazina (nota 3) después de la disolución del sólido y la mezcla de reacción se calienta a reflujo con agitación durante 4 horas. La mezcla de reacción se enfría a 20 °C, se almacena 1 hora a 0 °C y el producto que se separa se recoge por filtración con succión. El lavado con agua (100 ml) y el secado al vacío hasta alcanzar una masa constante a 40 °C durante 36 horas da 26,8 g (rendimiento del 95%) de 3-(1,3-benzodioxol-5-il)-5-(3-bromofenil)-1*H*-pirazol (nota 4), punto de fusión 195-197 °C.

2. Notas

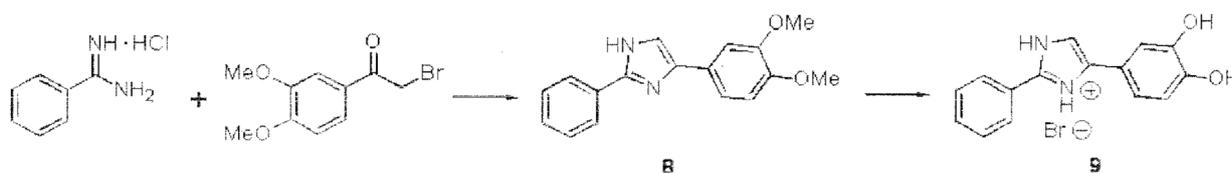
1. El 1-(1,3-benzodioxol-5-il)-3-(3-bromofenil)propano-1,3-diona se prepara de acuerdo con el protocolo para ANLE 138A.

40 2. Se utilizó el alcohol de *n*-butilo, 99,4% de calidad «Baker analyzed™», número de orden 8017 disponible de J. T. Baker B. V., Deventer, Holanda.

3. Se utilizó el monohidrato de hidrazina, de calidad pura, número de orden 53850 disponible de Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen.

45 4. La pureza del producto determinada por HPLC es del 99,3%. La HPLC analítica se realiza con un sistema de HPLC de Waters con un detector de fotodiodos ordenados Waters 996. Todas las separaciones implicaron una fase móvil de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% (v/v) en agua (solvente A) y TFA al 0,1% (v/v) en acetonitrilo (solvente B) con el uso de una columna de fase inversa (RP) Eurospher RP 18, 100 Å, 5 µm, 250 × 4,6 mm a una velocidad de flujo de 1 ml/min. El compuesto se disuelve en acetonitrilo de calidad para HPLC a una concentración de 1 mg/ml.

Esquema 3: Síntesis de imidazoles



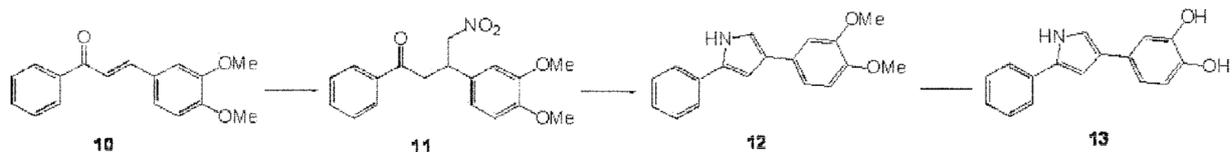
4-(3,4-Dimetoxifenil)-2-fenilimidazol (8) [Li et al., 2000]

Se calentó a reflujo una mezcla de hidrocloreuro de benzamidina (313 mg, 2 mmol) y bicarbonato de sodio (672 mg, 8 mmol) en THF (6 ml) y agua (15 ml). Se le añadió una solución de α -bromo-3,4-dimetoxiacetofenona (518 mg, 2 mmol) en THF (1,5 ml) durante un periodo de 30 min, mientras se mantenía la reacción a reflujo. Después de la adición, la reacción se calentó a reflujo durante 2 h, y el THF se evaporó a presión reducida. Se le añadió acetato de etilo (20 ml) a la mezcla, se separó la fase orgánica, se lavó con salmuera (5 ml), se secó con sulfato de sodio y se evaporó a presión reducida. El producto bruto resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo/metanol 100:1) para dar 8 (470 mg, 84%) como un sólido.

Hidrobromuro de 4-(3,4-dihidroxiifenil)-2-fenilimidazol (9) [Vanelle et al., 2000]

Una solución de 8 (190 mg, 0,68 mmol) en diclorometano (5 ml) se enfrió a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, se trató con tribromuro de boro (0,32 ml, 3,4 mmol), se agitó a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 h y a continuación durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla se enfrió a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se paró con metanol (5 ml). Después de agitar durante 3 h a temperatura ambiente, los solventes se evaporaron a presión reducida, y el residuo se coevaporó cuatro veces con metanol (10 ml). El precipitado resultante se sometió a reflujo en 5 ml de cloroformo y, después de enfriarlo, el producto se recogió por filtración y se secó para dar 9 (192 mg, 85%) como un polvo.

Esquema 4: Síntesis de pirroles



(E)-1-Fenil)-3-(3,4-dimetoxifenil)-2-propeno-1-ona (10)

El compuesto 10 se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito para la preparación de 1. Rendimiento del 90%.

3-(3,4-Dimetoxifenil)-4-nitro-1-fenilbután-1-ona (11) [Hall et al., 2005]

Una solución de 10 (774 mg, 2,9 mmol) en MeOH (30 ml) se trató con dietilamina (1,55 ml, 15 mmol) y nitrometano (0,81 ml, 15 mmol) y se calentó a reflujo durante 24 h. La solución se enfrió, se repartió entre diclorometano (60 ml) y agua (50 ml), y se acidificó con ácido clorhídrico a 1 M. Se separó la capa orgánica, y se extrajo la capa acuosa con diclorometano (20 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (50 ml) y salmuera (50 ml), y se secaron con sulfato de sodio. El solvente se retiró a presión reducida y el aceite resultante se purificó por cromatografía en columna de un gel de sílice (*n*-hexano/acetato de etilo 3:2) para dar 11 (780 mg, 82%) como un sólido.

4-(3,4-Dimetoxifenil)-1-fenilpirrol (12) [Hall et al, 2005]

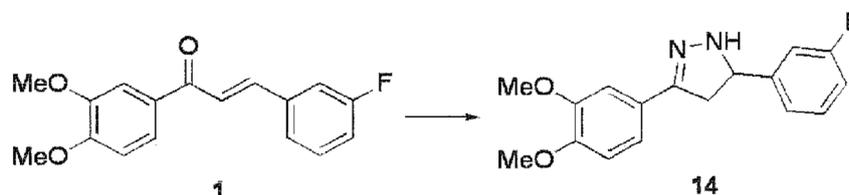
Una solución agitada de 11 (400 mg, 1,22 mmol) en metanol (13 ml) y THF (26 ml) a temperatura ambiente se trató con hidróxido de potasio (343 mg, 6,1 mmol). Al cabo de 1 h, la mezcla de reacción se añadió gota a gota a una solución de ácido sulfúrico (2,44 ml) en metanol (13 ml) a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se agitó 1 h a temperatura ambiente. Se le añadieron agua (20 ml) y hielo (20 ml), y la mezcla se neutralizó con hidróxido de sodio acuoso a 1 M y se extrajo con diclorometano (2×50 ml). Las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (25 ml), se secaron sobre sulfato de sodio y se evaporaron a presión reducida. El aceite resultante se trató con ácido acético (8 ml) y cloruro de amonio (470 mg), y la solución se calentó a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h. Se enfrió la mezcla de reacción, se le añadió hielo (50 ml) y la mezcla se neutralizó con hidróxido de sodio acuoso a 1 M. La solución se extrajo con diclorometano (2×50 ml). Las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (25 ml), se secaron sobre sulfato de sodio y se evaporaron a presión reducida. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (*n*-hexano/acetato de etilo 3:1) y a continuación se retrocristalizó a partir de una mezcla de *n*-hexano/acetato de etilo (2:1) para dar 12 (150 mg, 44%) como un sólido.

4-(3,4-Dihidroxiifenil)-1-fenilpirrol (13) [Vanelle et al., 2000]

Una solución de 12 (80 mg, 0,29 mmol) en diclorometano (5 ml) se enfrió a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, se trató con tribromuro de boro (0,13 ml, 1,4 mmol), se agitó a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 h y a continuación durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla se enfrió a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se paró con metanol (5 ml). Después de la agitación durante 3 h a temperatura ambiente,

los solventes se evaporaron a presión reducida, y el residuo se coevaporó cuatro veces con metanol (10 ml). El producto bruto resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo/metanol 95:5) y a continuación se retrocristalizó desde cloroformo con unas pocas gotas de acetonitrilo para dar 13 (36 mg, 50%) como un sólido.

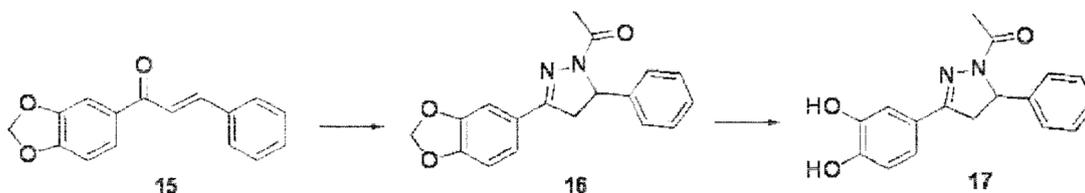
5 Esquema 5: Síntesis de pirazolinas



3-(3,4-Dimetoxifenil)-5-(3-fluorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol (14)

Una suspensión de 1 (57 mg, 0,2 mmol) e hidrato de hidrazina (0,5 ml, 10 mmol) en agua (0,14 ml) se calentó a 100 °C durante 1,5 h con agitación. Se enfrió la mezcla de reacción, se le añadió agua (0,2 ml) y el precipitado resultante se recogió por filtración, se lavó con agua y se secó para dar 14 (37 mg, 62%) como un sólido blanco.

Esquema 6: Síntesis de N-Ac-pirazolinas



(E)-1-(3,4-Metilendioxifenil)-3-fenil-2-propeno-1-ona (15)

El compuesto 15 se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito para la preparación de 1. Rendimiento del 64%.

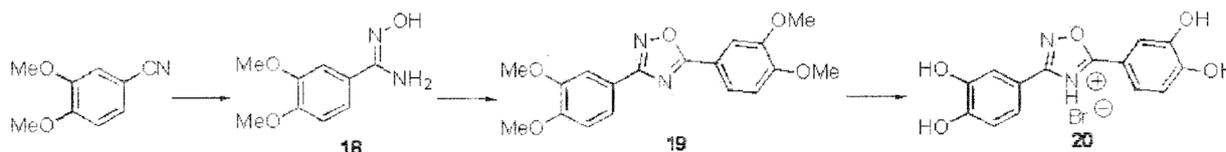
15 1-Acetil-3-(3,4-metilendioxifenil)-5-fenil-4,5-dihidropirazol (16) [Chimenti et al., 2004]

Una solución de 15 (504 mg, 2 mmol) e hidrato de hidrazina (250 mg, 5 mmol) en ácido acético (12 ml) se calentó a 120 °C durante 24 h con agitación. La mezcla de reacción se enfrió, se le añadió agua fría (40 ml) y el precipitado resultante se recogió por filtración, se retrocristalizó a partir de etanol y se secó para dar 16 (458 mg, 74%) como un sólido blanco.

20 1-Acetil-3-(3,4-dihidroxfenil)-5-fenil-4,5-dihidropirazol (17) [Vanelle et al., 2000]

Una solución de 17 (70 mg, 0,23 mmol) en diclorometano (3 ml) se enfrió a -78 °C, se trató con tribromuro de boro (0,11 ml, 1,16 mmol), se agitó a -78 °C durante 3 h y a continuación durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla se enfrió a -78 °C y se paró con metanol (5 ml). Después de la agitación durante 3 h a temperatura ambiente, los solventes se evaporaron a presión reducida, y se coevaporó el residuo cuatro veces con metanol (10 ml). El producto bruto resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (*n*-hexano/acetato de etilo 1:1) para dar 17 (25 mg, 37%) como un sólido.

Esquema 7: Síntesis de 1,2,4-oxadiazoles



3,4-Dimetoxibenzamidoxima (18) [Chalquest, 2001]

Una solución de 3,4-dimetoxibenzonitrilo (4,0 g, 24,5 mmol), hidrocloreto de hidroxilamina (2,0 g, 28,8 mmol), *N,N*-diisopropiletilamina (5,0 ml, 29,2 mmol) en etanol (70 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 48 h. El etanol se evaporó a presión reducida, se le añadió agua fría (60 ml) y el precipitado resultante se recogió por filtración y se secó para dar 18 (3,4 g, 71%) como un polvo blanco.

3,5-Bis-(3,4-dimetoxifenil)-1,2,4-oxadiazol (19) [Korbonits, 1982]

A una solución de 18 (700 mg, 3,57 mmol) y 3,4-dimetoxibenzoato de etilo (834 mg, 3,97 mmol) en etanol (12 ml), se le añadió *tert*-butóxido de potasio (425 mg, 3,79 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 12 h. La mezcla se enfrió y el precipitado se recogió por filtración, se lavó con etanol caliente y se secó para dar 19 (540 mg, 44%) como un polvo blanco.

Hidrobromuro de 3,5,-bis-(3,4-dihidroxifenil)-1,2,4-oxadiazol (20) [Vanelle et al., 2000]

Una solución de 19 (220 mg, 0,64 mmol) en diclorometano (6 ml) se enfrió a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, se trató con tribromuro de boro (0,59 ml, 6,1 mmol), se agitó a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 h y a continuación durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla se enfrió a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se paró con metanol (5 ml). Después de la agitación durante 3 h a temperatura ambiente, los solventes se evaporaron a presión reducida, y el residuo se coevaporó cuatro veces con metanol (10 ml). El precipitado resultante se sometió a reflujo en 5 ml de cloroformo, después de enfriarlo, se recogió el producto por filtración y se secó para dar 20 (190 mg, 81%) como un polvo.

Los ejemplos de más arriba representan ejemplos de cómo sintetizar o modificar los compuestos deseados. Los compuestos restantes mostrados en la figura 3 se sintetizaron de acuerdo con esto. Estas sustancias sintetizadas por medios químicos, junto con las sustancias seleccionadas del cribado inicial, se sometieron a más análisis, entre ellos ensayos de SIFT, ensayos basados en cultivo de células, experimentos *in vivo* con ratones, así como ensayos bioquímicos dirigidos a la agregación de la α -sinucleína (véase más abajo). En la figura 3 se da a conocer una lista de las sustancias analizadas.

Ejemplo 3: Material y métodos utilizados

Colecciones de compuestos

Las colecciones cribadas contienen 10 000 compuestos cada una y las llamamos DIVERSet 1 y DIVERSet 2 porque cubren solo una parte de la colección DIVERSet más grande (ChemBridge Corp., San Diego, CA). DIVERSet es una colección de moléculas pequeñas diferentes de tipo fármaco, seleccionadas con criterios racionales. Los compuestos se suministraron en una solución de sulfóxido de dimetilo (DMSO) y en placas de microtitulación de 96 pocillos. Una base de datos que contiene estructuras moleculares y algunos datos físico-químicos para cada uno de los compuestos está disponible en www.chembridge.cam.

Producción de PrP 23-231 recombinante de ratón

Se produjo la PrP 23-231 recombinante y se purificó esencialmente como está descrito en Liemann et al., (1998), salvo que, para la expresión en bacterias, las células de *E. coli* BL21DE3 RIL (Novagen) se transformaron con el plásmido pET17b-MmPrP23-231WT31 para la PrP 23-231 de ratón. De igual forma, las bacterias se hicieron crecer hasta una densidad óptica de 0,5 antes de inducir la producción de la proteína con la adición de IPTG a 1 mM, y las células se recogieron dos horas después. A continuación, se lisaron las bacterias con la adición de Triton X-100 al 0,5% al tampón de lisis y la incubación durante 30 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en vez de utilizar una prensa francesa. Además, la filtración en gel fue reemplazada por una etapa de cromatografía de afinidad con quelatos de níquel. También se omitió la etapa final de cromatografía de intercambio de cationes después del replegamiento.

En concreto, la PrP previamente purificada por cromatografía de intercambio iónico se sometió a la oxidación tal y como está descrito, y la oxidación se terminó con la adición de EDTA a 0,1 mM y el ajuste del pH a aproximadamente 6. Después de la adición de NiCl_2 a 0,1 mM, hasta 50 mg de PrP se aplicaron a 2 ml de la Sepharose quelante (Pharmacia), cargada previamente con NiCl_2 de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes, y se equilibró previamente con el tampón A (urea a 8 M, MOPS a 10 mM, pH 7,0). La fijación de la PrP a la matriz de Ni-quelato se realizó durante al menos 3 h a temperatura ambiente mediante la inversión continua de la mezcla. Se transfirió la matriz a una columna Polyprep (BioRad) y se drenó con circulación directa. La columna se lavó dos veces con 5 ml del tampón B (urea a 8 M, MOPS a 10 mM, pH 7,0, NaCl a 500 mM) y a continuación se eluyó secuencialmente con 6×5 ml del tampón D (urea a 7,2 M, MOPS a 10 mM, pH 7,0, NaCl a 150 mM, imidazol a 50 mM). Se agruparon las fracciones que contenían la PrP purificada, se concentraron con un dispositivo centriprep y finalmente se diluyeron a 1:50 para volverlas a plegar en MES a 10 mM, pH 6,0.

Marcación fluorescente de anticuerpos y PrP recombinante

El anticuerpo monoclonal L42 (r-biopharm, Darmstadt, Alemania) se marcó con Alexa Fluor 647 (Alexa-647; Invitrogen, Eugene) de acuerdo con el manual del fabricante. La PrP 23-231 recombinante de ratón se marcó con Alexa Fluor 488 (Alexa-488; Invitrogen, Eugene) en el tampón de fosfato de potasio a 20 mM, pH 6, Nonidet P40 al 0,1%, tampón de bicarbonato de sodio a 40 mM, pH 8,3. Los fluoróforos sin fijar se separaron por filtración en gel con columnas PD10 (GE Healthcare, Freiburg, Alemania) equilibradas con el tampón de fosfato de potasio a 20 mM, pH 6, Nonidet P40 al 0,1%. El control de calidad de la reacción y la razón de marcación se realizó mediante mediciones de espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS) en un lector Insight (Evotec Technologies, Hamburgo, Alemania). La razón de marcación fue de aproximadamente 1,3 fluoróforos por molécula de rPrP.

Ensayo para la asociación entre PrP^C y PrP^{Sc}

Se preparó la PrP^{Sc} del cerebro de pacientes con ECJ de acuerdo con Safar et al., (Safar et al., (1998)) y alícuotas del sedimento final resuspendidas en la solución de PBS 1× más sarcosil al 0,1% se diluyeron cinco veces en el tampón A (tampón de fosfato de potasio a 20 mM a pH 6,0, Nonidet P40 al 0,1%) y se trataron con ultrasonidos en un
5 homogeneizador ultrasónico de baño de María durante 60 s. Después de la centrifugación a 1000 rpm durante 1 min, el sobrenadante se diluyó 100 veces en el tampón A para el ensayo.

Una mezcla de rPrP de ratón marcada y del anticuerpo monoclonal L42 marcado se preparó en el tampón de fosfato de potasio a 20 mM, pH 6, Nonidet P40 al 0,1%, para que las moléculas marcadas fueran aproximadamente igual de abundantes a 2-6 nM. En un volumen de ensayo de 20 µl, se mezclaron 8 µl de la mezcla rPrP/anticuerpo, 2 µl del compuesto y 10 µl de la preparación de PrP^{Sc} diluida. Las muestras se cargaron en placas de 96 pocillos con un fondo de cubreobjetos de cristal (Evotec-Technologies, Hamburgo, Alemania) y se midió en un lector Insight.
10

Medición y análisis de partículas sueltas

Las mediciones de FIDA se realizaron a energías de excitación de 200 µW para el láser de 488 nm y de 300 µW para el láser de 633 nm. Los parámetros de barrido se establecieron en una longitud de paso del barrido de 100 µm, frecuencia del haz de barrido de 50 Hz, y movimiento del soporte de posicionamiento de 2000 µm. El tiempo de medición fue de 10 s. La fluorescencia desde los dos fluoróforos se grabó por separado con detectores de fotones sueltos, y los fotones se sumaron en intervalos de tiempo de longitud constante (compartimentos) con el uso de una longitud de compartimento de 40 µs. Se midió el número de fotones fluorescentes rojos y verdes, y se analizó en un histograma de distribución de intensidad bidimensional, tal y como se describió anteriormente (Bieschke et al., 2000).
15

Los datos de intensidad de la fluorescencia se evaluaron con un módulo del programa informático 2D-SIFT (Evotec-Technologies, Hamburgo, Alemania) al sumar los compartimentos de alta intensidad en los sectores. Los valores de corte para las intensidades de los compartimentos para cada serie de mediciones se ajustaron manualmente de acuerdo con las mediciones de control.
20

Ejemplo 4: Aplicación terapéutica de los posibles nuevos compuestos antipríónicos en los ratones infectados con la cepa de la tembladera de las ovejas transcurridos 80 días desde la infección
25

Para demostrar la eficacia de estos nuevos posibles compuestos antipríónicos a la hora de combatir las encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET) o las enfermedades causadas por los priones, se realizaron experimentos con animales, en los que los compuestos que tienen actividad antipríónica en el SIFT y/o en el análisis de cultivo de células con la tembladera de las ovejas se utilizaron para tratar los ratones infectados con la cepa RML de la tembladera de las ovejas en una etapa tardía del periodo de incubación. Elegimos la aplicación intraperitoneal de los compuestos en un intervalo de tiempo de 14 días 80 días después de la infección porque es típicamente el momento en el que aparecen los primeros síntomas subclínicos en los animales infectados con esta cepa de prión. Esto correspondería al tiempo más temprano en el que un humano afectado con EET que muestra los primeros síntomas de la enfermedad recibiría realmente un tratamiento terapéutico. Al elegir estas condiciones muy rigurosas para el tratamiento, quisimos valorar la funcionalidad de los compuestos analizados como tratamientos contra los priones en un contexto realista. Típicamente, los tratamientos de las EET hasta la fecha solo se han analizado por la profilaxis tras la exposición en los experimentos con animales, cuando se aplican en torno al momento de infección con los priones. En la vida real, hay muy pocas ocasiones en las que tal tratamiento terapéutico es factible para los individuos afectados con EET. Para la mayoría de los pacientes con EET, se desconoce y no se pueden detectar el momento de la infección o el comienzo del tiempo de incubación para los casos familiares y esporádicos (que son la inmensa mayoría). Por lo tanto, la mayoría de los pacientes con EET solo podrán recibir el tratamiento después de la aparición de los primeros síntomas de las EET.
30
35
40

Procedimientos experimentales:

Las ratonas C57Bl6 hembra de 6 a 7 semanas de edad se inocularon con la cepa RML de la tembladera de las ovejas mediante una inyección intracerebral con 30 µl del homogeneizado estéril de cerebro al 1% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) de los ratones enfermos terminales con la cepa RML de la tembladera de las ovejas. A los 80 días de la infección, estos ratones se trataron con una selección de los posibles compuestos antipríónicos nuevos o con el vehículo acuoso sulfóxido de dimetilo (DMSO). Cinco posibles compuestos antipríónicos se han seleccionado de acuerdo con su actividad antipríónica en un modelo de cultivo celular para este tratamiento, que se denominaron 10353F11 de acuerdo con la posición de la placa en la colección de compuestos químicos DIVERSet (Chembridge Corp., San Diego, EE. UU.) y anle138b, anle143b, sery106 y sery149. El tratamiento con estos compuestos se realizó durante 14 días consecutivos mediante inyección por vía intraperitoneal de 50 µl al día de la dilución del compuesto 10353F11 con los correspondientes 25 µl de los otros compuestos en el vehículo (DMSO). Se utilizó el compuesto 10353F11 a una concentración de 10 mM y para los compuestos anle138b, anle143b, sery106 y sery149, se inyectaron a 100 mM a lo largo de todo el periodo. Los cuidadores de animales con la formación correspondiente vigilaron en los animales todos los días los signos de la enfermedad a partir del día 80 de la infección. Se sacrificaron los animales cuando habían alcanzado la etapa terminal de la enfermedad, marcada por los síntomas clínicos, que son ataxia, temblores, dificultad para ponerse de pie desde una posición en la que yacen sobre la espalda
45
50
55

y rigidez de la cola, y estaban moribundos. Típicamente, el progreso de la enfermedad hasta el final de la etapa terminal de la enfermedad conducirá a la muerte del animal en uno o dos días. De los animales sacrificados, se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ un hemisferio y una mitad del bazo para el análisis de inmunotransferencia, mientras que el segundo hemisferio y la segunda mitad del bazo así como todos los órganos internos se fijaron en una solución de formaldehído al 4% para la (inmuno)histología.

Resultados

Tal y como se muestra en la figura 4, el tratamiento de los ratones, que se habían infectado por vía intracerebral con la cepa RML de la tembladera de las ovejas, en una última etapa del tiempo de incubación (a los 80 días de la infección) mediante la aplicación intraperitoneal diaria de los posibles fármacos antipríónicos seleccionados dio lugar a una prolongación del tiempo de incubación, hasta alcanzar la etapa terminal de la infección de la tembladera de las ovejas, para 10353F11 (figura 4A) y anle138b y sery149 (figura 4B). El tiempo de supervivencia medio que se determinó para los compuestos anle138b y sery149 para los grupos de siete y ocho animales cada uno se prolongó hasta 14,9 y 11,5 días, respectivamente, en comparación con un grupo de 12 animales que había recibido solo el vehículo de DMSO al 100%. Para los compuestos sery106 y anle143b, la prolongación del tiempo de supervivencia en un grupo de ocho animales tratados en comparación con el mismo grupo de control con DMSO estaba por debajo del nivel de significación estadística. Para el compuesto 10353F11, el tiempo de supervivencia determinado para un grupo de ocho animales cada uno se prolongó hasta 11 días en comparación con el grupo de control. La prolongación observada del tiempo de supervivencia en los experimentos corresponde aproximadamente a la duración del tratamiento. Esto puede implicar que el tratamiento con estos fármacos ha detenido la progresión de la enfermedad, siempre y cuando se administraran los fármacos. En este caso, el tratamiento con estos fármacos conduciría a una prolongación de la vida de los individuos infectados con EET y a una estabilización de su estado de salud, lo que los protege de un deterioro adicional al detener el progreso de la enfermedad.

Ejemplo 5: Aplicación terapéutica de un posible compuesto antipríónico en los ratones infectados con la cepa de la tembladera de las ovejas después de la infección intraperitoneal

Para demostrar la eficacia de este nuevo compuesto antipríónico a la hora de combatir las encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET) o las enfermedades causadas por los priones, se realizó un experimento más con animales. Para este experimento, los ratones se infectaron por vía intraperitoneal con la cepa RML de la tembladera de las ovejas y se trataron con el compuesto anle138b, cuya actividad antipríónica estaba demostrada en un modelo animal para las últimas etapas de la enfermedad causada por los priones (ejemplo 4). Elegimos una combinación de aplicación intraperitoneal y oral del compuesto, y comenzamos el tratamiento justo después de la infección.

Procedimientos experimentales:

Infección con la cepa de la tembladera de las ovejas y tratamiento de los ratones

Las ratonas C57BL/6 hembra de 6 a 7 semanas de edad se inocularon con la cepa RML de la tembladera de las ovejas mediante la inoculación intraperitoneal con $100\text{ }\mu\text{l}$ de homogeneizado estéril de cerebro al 1% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) de ratones enfermos en fase terminal con la cepa RML de la tembladera de las ovejas. El tratamiento de estos ratones con el compuesto anle138b o con el vehículo acuoso sulfóxido de dimetilo (DMSO) comenzó justo después de la infección. El tratamiento con este compuesto se llevó a cabo durante 14 días consecutivos mediante la inyección intraperitoneal de $25\text{ }\mu\text{l}$ al día del compuesto diluido en el vehículo (DMSO) seguido de 4 y 5 días de administración oral de $50\text{ }\mu\text{l}$ al día del compuesto en una mezcla de aceite vegetal/DMSO mediante alimentación por sonda nasogástrica oral (figura 5A). El compuesto anle138b se utilizó a una concentración de 100 nM para la aplicación intraperitoneal y a 50 mg/kg para la administración oral. Los animales se sacrificaron a los 35 días de la infección, cuando la PrP^{Sc} se detecta con claridad en el bazo de los ratones infectados por vía intraperitoneal. De los animales sacrificados, una mitad del bazo se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el análisis de inmunotransferencia, mientras que la segunda mitad del bazo así como todos los órganos internos se fijaron en una solución de formaldehído al 4% para la inmunohistología.

Transferencia de TIP

El tejido de cerebro fijado en formol se cortó en bloques de tejido con un grosor de 2 mm, se descontaminó en ácido fórmico concentrado durante 1 hora, se fijó posteriormente en formol tamponado con solución salina tamponada con fosfato al 4% durante 48 horas siguiendo el protocolo de Brown et al., 1990 y se incluyó en parafina. Se cortaron cortes de 5 a 7 μm en un microtomo, se colocaron en un baño de María ($55\text{ }^{\circ}\text{C}$), se recogieron en una membrana de nitrocelulosa con poros de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ humedecida previamente (Bio-Rad, Richmond, CA) y se secaron durante al menos 30 minutos a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$. La membrana de nitrocelulosa se desparafinó con xileno. El xileno se reemplazó por isopropanol, seguido de una rehidratación escalonada. Se añadió Tween 20 a una concentración final del 0,1% a la última etapa de rehidratación en H_2O destilada. Se secaron las membranas y se conservaron a temperatura ambiente durante meses sin pérdida de la calidad de la posterior tinción de PrP^{Sc}.

Después de humedecer previamente con TBST (Tris-HCl a 10 mmol/l, pH 7,8; NaCl a 100 mmol/l; Tween 20 al 0,05%), se realizó la digestión con 250 $\mu\text{g/ml}$ de proteinasa K (Boehringer) en el tampón de PK (Tris-HCl a 10 mmol/l; pH 7,8; NaCl a 100 mmol/l; Brij 35 al 0,1%) durante 8 horas a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$. Con esta etapa, las proteínas pegadas a la membrana

se fijaron a la membrana. Después de lavar tres veces con TBST, las proteínas en las membranas se desnaturalizaron con isotiocianato de guanidina a 3 mol/l en Tris-HCl a 10 mmol/l (pH 7,8) durante 10 minutos. La guanidina se eliminó con tres lavados con TBST. La inmunodetección se realizó después de la preincubación en la solución de bloqueo (caseína al 0,2% en TBST) durante 30 minutos. Como anticuerpo primario, se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo contra la PrP recombinante de ratón, denominado CDC1, a una dilución de 1:500 en la solución de diluyente de anticuerpo (Ventana). La incubación duró al menos 1 hora. Después de tres lavados en TBST, la incubación durante al menos 1 hora se realizó con un anticuerpo antimurino de conejo conjugado a la fosfatasa alcalina (Dako, Hamburgo) a una dilución de 1:500. Después de cinco lavados en TBST durante 10 minutos, las membranas se ajustaron a pH alcalino al incubarlas dos veces durante 5 minutos en NTM (Tris-HCl a 100 mmol/l, pH 9,5; NaCl a 100 mmol/l; MgCl₂ a 50 mmol/l). La visualización de la reacción del anticuerpo se proporcionó mediante la reacción de formazán con el uso de NBT/BCIP. Las transferencias se evaluaron con un microscopio disector Olympus.

Resultados

El tejido de bazo extraído después de la muerte de los ratones tratados con el fármaco y tratados con el vehículo se tiñó para la detección inmunohistoquímica de la presencia de depósitos de PrP^{Sc} y se analizó la cantidad de PrP^{Sc} esplénica por inmunotransferencia. Tal y como se muestra en la figura 5B, la cantidad de PrP^{Sc} en el bazo de los animales tratados disminuye significativamente en comparación con los ratones tratados con el vehículo. El examen del tejido del bazo de los ratones infectados muestra que los depósitos de PrP^{Sc} se redujeron después del tratamiento con el compuesto anle138b. Se incrementa el porcentaje de bazos con poco depósito de PrP^{Sc} y se reduce el de los depósitos intensos de PrP^{Sc} (figura 5C). En la figura 5D se muestran ejemplos de dos transferencias de TIP, depósitos de PrP^{Sc}. Los resultados indican una clara eficacia antiPrP^{Sc} de este compuesto en los tejidos periféricos por la configuración experimental y la pauta terapéutica elegidas.

Ejemplo 6: Aplicación terapéutica de nuevos compuestos antiPrP^{Sc} en los ratones infectados con depa de la tembladera de las ovejas a los días 80 de la infección

Para demostrar la observación del ejemplo 4 de que la prolongación del tiempo de supervivencia corresponde a la duración del tratamiento, se realizó un experimento con animales, en el que los compuestos se administraron a una dosis mayor y durante más tiempo para tratar a los ratones infectados con la cepa RML de la tembladera de las ovejas en una etapa tardía del periodo de incubación. Elegimos una combinación de la aplicación intraperitoneal y oral de los compuestos a los 80 días de la infección porque este es típicamente el momento en el que aparecen los primeros síntomas subclínicos en los animales infectados con esta cepa de priones.

Procedimientos experimentales:

Las ratonas C57BL/6 hembra de 6 a 7 semanas de edad se inocularon con la cepa RML de la tembladera de las ovejas mediante una inyección intracerebral con 30 µl de homogeneizado estéril de cerebro al 1% en la solución salina tamponada con fosfato (PBS) de ratones enfermos terminales con la cepa RML de la tembladera de las ovejas. Estos ratones se trataron a los días 80 de la infección con los nuevos compuestos antiPrP^{Sc} o con el vehículo DMSO. Se utilizaron los dos compuestos antiPrP^{Sc} en potencia anle138b y anle186b. El tratamiento con estos compuestos se llevó a cabo durante 14 días consecutivos mediante la inyección intraperitoneal de 25 µl al día del compuesto diluido en el vehículo DMSO seguido de dos administraciones orales durante 5 días de 50 µl al día del compuesto en una mezcla de aceite vegetal/DMSO a través de sonda nasogástrica oral (figura 6A). En 3 ratones de control y 2 ratones tratados con el anle138b, el compuesto se administró además por vía oral desde el día 109 al día 136 al darle gránulos alimenticios de mantequilla de cacahuete mezclados con soluciones de reserva de compuesto en DMSO. Los compuestos se utilizaron a una concentración de 100 mM para la aplicación intraperitoneal y de 50 mg/kg para la administración oral. Cuatro animales de cada grupo de tratamiento se sacrificaron en los puntos de tiempo indicados (figura 6A). Los cuidadores de animales con la formación necesaria vigilaron los signos de la enfermedad en ocho animales de cada grupo de tratamiento desde el día 80 después de la infección. Se sacrificaron los animales cuando habían alcanzado la fase terminal de la enfermedad, marcada por los síntomas clínicos, que son ataxia, temblores, dificultad para ponerse de pie desde una posición en la que descansan sobre la espalda y rigidez en la cola, y estaban moribundos. Típicamente, el progreso de la enfermedad hasta el final de la etapa terminal de la enfermedad conducirá a la muerte del animal en uno o dos días. De los animales sacrificados, un hemisferio y una mitad del bazo se congelaron a -80 °C recién tomados para el análisis por inmunotransferencia, mientras que el segundo hemisferio y la segunda mitad del bazo así como todos los órganos internos se fijaron en una solución de formaldehído al 4% para la histología.

Resultados

Cantidad de PrP^{Sc} en los homogeneizados de cerebro y la muerte celular por apoptosis después de la infección

En los homogeneizados de cerebro de los ratones tratados con el fármaco y de los tratados con el vehículo se analizó la cantidad de PrP^{Sc} mediante análisis de inmunotransferencia. Tal y como se muestra en la figura 6B, la cantidad de PrP^{Sc} en el cerebro de todos los animales examinados en los puntos de tiempo indicados del grupo de anle138b se puede mantener en el nivel de los ratones sin tratar el día 80, mientras que se incrementa la cantidad de PrP^{Sc} en el grupo de control. Los resultados de anle186b aparecen entre el grupo de control y anle138b. El incremento de PrP^{Sc}

se podía enlentecer (figura 6B). En la figura 6C se muestra el cambio de la cantidad relativa de PrP^{Sc} después del tratamiento con los compuestos en comparación con el control sin tratar en el día 80. La cantidad de PrP^{Sc} en el cerebro disminuye ligeramente después del tratamiento con anle138b. Después de la evaluación histológica de los cortes de cerebro teñidos con HE en los puntos de tiempo indicados, los ratones tratados con anle138b y anle186b mostraban una reducción de los cambios patológicos. El número de células apoptóticas en la capa celular de los gránulos cerebelosos de los ratones infectados de los grupos tratados disminuye en comparación con el grupo de control (figura 6D). Estos resultados indican que ambos compuestos pueden atravesar la barrera hematoencefálica. Por lo tanto, el tratamiento fue capaz de prevenir más depósitos de PrP^{Sc} y la progresión de la enfermedad en el cerebro de los animales durante el tratamiento. Estos resultados implican que el tratamiento con el compuesto anle138b había detenido la progresión de la enfermedad siempre y cuando se administran los fármacos. Estos resultados indican que cabe la posibilidad de modificar el progreso de la enfermedad mediante un tratamiento que utilice este compuesto que interfiere con la formación de PrP^{Sc}. En este caso, el tratamiento conduciría a una prolongación de la vida de los individuos infectados con la EET y a la estabilización o quizás a una mejoría en su estado de salud al protegerlos de un deterioro adicional y detener el progreso de la enfermedad.

15 Prolongación del tiempo de incubación

Tal y como se muestra en la figura 7, el tratamiento de los ratones, que se habían infectado por vía intracerebral con la cepa RML de la tembladera de las ovejas, en una etapa tardía del tiempo de incubación (a los 80 días de la infección) mediante la administración diaria de los compuestos dio lugar a una prolongación del tiempo de supervivencia, hasta alcanzar la fase terminal de la infección de la tembladera de las ovejas (figura 7). Además, el mayor tiempo de supervivencia en los dos ratones que recibieron un tratamiento adicional desde el día 109 al día 136 por la alimentación con anle138b mezclado con mantequilla de cacahuete indica que i) la supervivencia está correlacionada con la duración de tratamiento, ii) el compuesto es eficaz cuando se administra por vía oral, y iii) el compuesto atraviesa la barrera hematoencefálica.

Ejemplo 7: Supresión de la agregación de la α -sinucleína *in vitro*

25 Las sinucleinopatías son enfermedades (neurodegenerativas) caracterizadas por la acumulación intracelular de agregados y fibrillas compuestos principalmente de la proteína α -sinucleína (para una revisión, véase: Goedert, 2001). Las sinucleinopatías neurodegenerativas más prominentes son la enfermedad de Parkinson (EP), la demencia con cuerpos de Lewy (DCL) y la atrofia multisistémica (AMS).

30 Se ha demostrado que la agregación de la α -sinucleína *in vitro* se produce en presencia de sustancias, tales como solventes orgánicos, que imitan las condiciones dieléctricas que existen de forma natural en la proximidad de las membranas biológicas (Munishkina et al., 2003). Se han desarrollado ensayos de agregación *in vitro* que proporcionan sistemas modelo para la investigación de los aspectos centrales del plegamiento erróneo y la agregación de la α -sinucleína, y para la formación de especies de agregados tóxicos durante el proceso de la enfermedad (Kostka et al., 2008).

35 Para analizar los compuestos seleccionados por su capacidad para suprimir la agregación de la α -sinucleína, hemos utilizado un sistema *in vitro*, en donde el solvente orgánico sulfóxido de dimetilo (DMSO) a concentraciones bajas (<3%) y, en algunos experimentos, el hierro férrico se utilizaron para inducir la agregación de la α -sinucleína *in vitro*. La formación de multímeros se vigiló con un equipo de correlación de fluorescencia de partículas sueltas mediante el análisis de correlación cruzada y el análisis de SIFT aplicados a las mezclas de monómeros de α -sinucleína marcados con los fluoróforos Alexa488 verde o Alexa647 rojo, respectivamente. Tales mezclas de α -sinucleína se agregaron en paralelo a las muestras en las que se añadió un compuesto a la reacción.

40 Procedimientos experimentales:

Marcación de la α -sinucleína con fluorescencia

45 La α -sinucleína recombinante se marcó con los colorantes fluorescentes con aminos reactivos, bien con el éster de O-succinimidilo con Alexa Fluor 488 o con el éster de O-succinimidilo con Alexa Fluor 647 (Molecular Probes, EE. UU.), respectivamente. Después de completarse la reacción, las moléculas de colorante sin fijar se separaron de las mezclas de reacción por cromatografía de exclusión por tamaños a través de dos columnas PD10 sucesivas (Amersham Bioscience, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La eficacia de la marcación y de la retirada del colorante sin fijar se determinó mediante mediciones de FCS con las diluciones idóneas de las fracciones que contienen los monómeros de la α -sinucleína marcados.

50 Mediciones de correlación de la fluorescencia de partículas sueltas

55 En un volumen de 20 μ l en los pocillos de una placa de microtitulación especial equipada con un fondo de cubreobjetos de cristal para las mediciones de correlación de la fluorescencia (Evotec-Technologies, Alemania), se realizó la agregación de la α -sinucleína en un tampón que contenía Tris a 50 mM a pH 7,0 y una mezcla de monómeros de la α -sinucleína marcados con los fluoróforos Alexa-488 o bien Alexa-647, respectivamente, a una concentración final de aproximadamente 5 a 10 nM de cada especie de α -sinucleína. Las mediciones se realizaron en un instrumento de correlación de fluorescencia Insight (Evotec-Technologies, Alemania) con el uso de un objetivo de microscopio a 40 \times

de 1,2 NA (Olympus, Japón) con ajustes ópticos de FIDA, un diámetro estenopeico de 70 μm y una excitación de 200 μW con el láser de 488 nm, así como una excitación de 300 μW con el láser de 633 nm. El tiempo de medición fue de 10 s, durante el cual el foco del láser se movió a lo largo del pocillo mediante un dispositivo de barrido de haces con el uso de una longitud de trayectoria del escáner de 100 μm a una frecuencia de barrido de 50 Hz y un movimiento de la mesa de posicionamiento de 2000 μm . Esto es equivalente a una velocidad de barrido de aproximadamente 10 mm/s. Se generaron histogramas bidimensionales de distribución de la intensidad y se analizaron con el programa informático 2D-SIFT (Evotec OAI, Alemania).

Resultados: Supresión de la agregación de la α -sinucleína debida a los compuestos

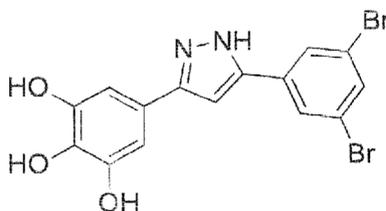
La agregación de la α -sinucleína ocasionada por DMSO y DMSO/ Fe^{3+} queda reflejada mediante una formación de complejos multiméricos de la α -sinucleína que contienen unidades de la α -sinucleína marcadas tanto en rojo como en verde en cantidades más elevadas. Así pues, la reacción de control sin la adición de compuestos inhibidores muestra la presencia de un gran número de complejos que emiten grandes cantidades de fotones. La adición del compuesto 351F11 de tipo DPP a la solución del análisis es capaz de inhibir en gran medida la formación de complejos multiméricos de la α -sinucleína de un modo dependiente de la dosis, como se puede observar en la figura 8A. Por lo tanto, el compuesto 351F11 es capaz de inhibir de manera eficaz la formación de multímeros de la α -sinucleína a una concentración micromolar baja en este modelo *in vitro* para la agregación patológica de la proteína hallada en las sinucleinopatías. Esto es una clara indicación de que el compuesto 351F11 no solo puede funcionar como un compuesto antipriónico, sino que también tiene la capacidad de convertirse en un compuesto terapéutico contra las sinucleinopatías, como la enfermedad de Parkinson, DCL y AMS, ya que interfiere con el mecanismo patológico a nivel molecular. También se puede detectar un efecto inhibitor dependiente de la dosis sobre la agregación de la α -sinucleína en otros compuestos relacionados con DPP que se han investigado (figura 8B, C). Por lo tanto, estos compuestos representan un nuevo grupo de sustancias con una capacidad probada para inhibir la agregación *in vitro* de la α -sinucleína, lo que permitirá el desarrollo de un tratamiento causativo contra la enfermedad de Parkinson y otras sinucleinopatías.

Además, la actividad inhibitora de estos compuestos sobre ambas agregaciones *in vitro*, la de la proteína priónica y la de la α -sinucleína, puede ser el reflejo de su actividad antiagregante general contra un abanico más amplio de enfermedades por agregación de una proteína, en las que el plegamiento erróneo de la proteína en conformaciones en las que predomina la lámina β forma la base para la posterior agregación de la proteína en las fibrillas del amiloide. Por lo tanto, estos compuestos y otros miembros de la clase de sustancias de tipo DPP tienen la capacidad de ser útiles como fármacos para el tratamiento causativo de todo un conjunto completo de enfermedades por agregación de una proteína (neurodegenerativas), entre ellas por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, enfermedad causada por los priones, enfermedad de Parkinson, atrofia multisistémica, enfermedad difusa con cuerpos de Lewy, demencia frontotemporal, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, ataxias espinocerebelosas y otras enfermedades por poli-Q, angiopatía amiloide cerebral hereditaria, polineuropatía amiloidótica familiar, amiloidosis sistémica primaria (amiloidosis AL), amiloidosis sistémica reactiva (amiloidosis AA), diabetes de tipo 2, amiloidosis localizada por inyección, amiloidosis de la microglobulina β_2 , amiloidosis no neuropática hereditaria, amiloidosis sistémica hereditaria finlandesa.

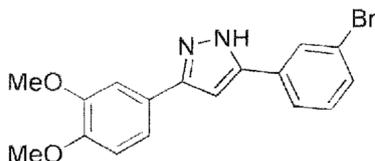
Ejemplo 8: Inhibición de PrP^{Sc} en el cultivo celular

Procedimientos experimentales:

Los cultivos de células infectados con priones se trataron con los compuestos recién sintetizados tal y como se describe para el cribado primario que está descrito más arriba. Los compuestos se añadieron a las concentraciones indicadas en la figura 9. La estructura de los compuestos se muestra a continuación y en la figura 3.



5-(3,5-Dibromofenil)-3-(3,4,5-trihidroxifenil)pirazol (anle145d)



5-(3-Bromofenil)-3-(3,4-dimetoxifenil)pirazol (sery255b)

Resultados:

- 5 Una proporción muy alta de compuestos relacionados con DPP mostraban una reducción fuerte de PrP^{Sc} en el cultivo celular a concentraciones micromolares bajas e incluso a concentraciones submicromolares. Esto indica que estos compuestos representan un grupo de sustancias químicas relacionadas con actividad antiiprónica.

Ejemplo 9: Efecto inhibitor de diferentes derivados de DPP sobre la acumulación de PrP^{Sc} en el cerebro y en el bazo

- 10 Los compuestos se analizaron con respecto a su efecto inhibitor sobre la acumulación de PrP^{Sc} *in vivo* mediante tres protocolos experimentales:

a) Los ratones C57BL/6 se inocularon por vía intracerebral (i.c.) con 30 µl de homogeneizado de cerebro al 1% (cepa RML de la tembladera de las ovejas). El tratamiento comenzó a los 80 días de la infección con 1 mg del compuesto al día aplicado por vía oral mezclado con DMSO más mantequilla de cacahuete. La cantidad de PrP^{Sc} en el cerebro se midió a los 120 días de la infección mediante análisis de inmunotransferencia.

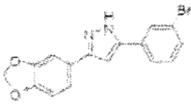
- 15 b) Los ratones C57BL/6 se inocularon por vía intracerebral (i.c.) con 30 µl de homogeneizado de cerebro al 1% (cepa RML de la tembladera de las ovejas). El tratamiento comenzó a los 80 días de la infección con 0,84 mg del compuesto (en DMSO) al día aplicado por inyección intraperitoneal durante 14 días seguido de 2 × 5 días (con 2 días sin tratamiento entre ellos) de 1 mg del compuesto (en DMSO más aceite vegetal) aplicado por vía oral mediante sonda nasogástrica. La cantidad de PrP^{Sc} en el cerebro se midió a los 106 días de la infección.

- 20 c) Los ratones C57BL/6 se inocularon por vía intraperitoneal (i.p.) con 100 µl de homogeneizado de cerebro al 1% (cepa RML de la tembladera de las ovejas). La cantidad de PrP^{Sc} en el bazo se determinó a los 35 días de la infección tras 34 días de tratamiento con 1 mg del compuesto al día mezclado con DMSO y mantequilla de cacahuete.

- 25 La inhibición relativa de la acumulación de PrP^{Sc} en comparación con los grupos tratados con DMSO se muestra en la tabla 1 (el valor medio de los animales tratados con DMSO al final del periodo de tratamiento se definió como el 0% de inhibición, el valor medio de los animales de control al comienzo del periodo de tratamiento se definió como el 100% de inhibición).

Tabla 1: Efecto inhibitor de los diferentes derivados de DPP sobre la acumulación de PrP^{Sc} en el cerebro y en el bazo (a, b, c indican el protocolo experimental (tal y como está descrito más arriba) que se utilizó).

Compuesto	R1 R2 R3	Inhibición [%]**

anle138b		69 ^a ; 108 ^b ; 62 ^c ;
sery255b		40 ^a ; <10 ^c
anle138c		< 10 ^a
sery338b		27 ^a
sery345		<10 ^a
sery378b		40 ^a
anle234b		<10 ^a
sery335b		60 ^a ; 46 ^c
anle186b		31 ^b
anle197b		<10 ^c
anle236b		<10 ^a
sery313		37 ^c
anle232b		<10 ^a
anle233b		17 ^a

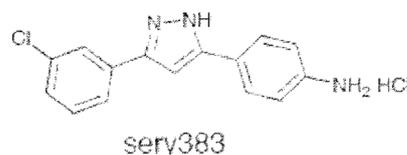
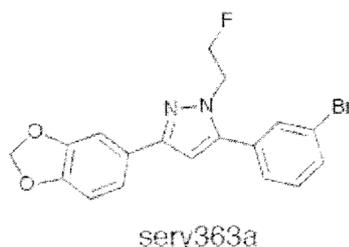
Los resultados de estos experimentos indican que bajo estas condiciones experimentales i) el compuesto anle138b y los compuestos químicamente relacionados proporcionan una fuerte inhibición de la amplificación priónica *in vivo*, ii) hay una relación entre la estructura y la actividad que indica que, para esta aplicación en estas condiciones experimentales, el anle138b represente un óptimo relativo de actividad.

5

Ejemplo 10: Se puede atravesar la barrera hematoencefálica y se observa una interacción con los agregados patológicos de la proteína

Los ratones C57BL/6 se inocularon por vía intracerebral (i.c.) con 30 μ l de homogeneizado de cerebro al 1% (cepa RML de la tembladera de las ovejas). El tratamiento comenzó a los 80 días de la infección con 1 mg del compuesto (sery383) o 3 mg del compuesto (sery363a) al día aplicado por vía oral mezclado con DMSO y mantequilla de cacahuete. Se midió la cantidad de PrP^{Sc} en el cerebro a los 120 días de la infección mediante análisis de inmunotransferencia.

10



En comparación con los controles tratados con DMSO, sery363a dio lugar a una reducción de la acumulación de PrP^{Sc} del 35%, y sery383 dio lugar a una reducción de la acumulación de PrP^{Sc} del 30%.

5 El sery363a se sintetizó y se analizó en estos experimentos porque proporciona una modificación de anle138b que está bien adaptada para la marcación con isótopos, lo que se necesita para ser usado como un trazador diagnóstico para la toma de imágenes por TEP.

10 El sery383 se analizó en este ensayo porque este compuesto, así como los compuestos similares desde el punto de vista estructural que contienen un grupo -NH₂ y un átomo de halógeno, se halló que eran muy activos a la hora de inhibir la agregación de la α -sinucleína (véase el ejemplo 16, «Inhibición de la formación de agregados de α -sinucleína con diferentes compuestos»).

Los resultados de estos experimentos indican que ambos compuestos pueden atravesar la barrera hematoencefálica e interactuar con los agregados patológicos de la proteína, lo que demuestra que estos compuestos tienen propiedades que se pueden explotar mediante el uso como compuesto terapéutico, así como un compuesto diagnóstico.

15 Ejemplo 11: Influencia del tratamiento diario con anle138b sobre la acumulación de PrP^{Sc} y sobre la enfermedad causada por los priones en los ratones infectados con la cepa RML de la tembladera de las ovejas.

20 Los ratones C57BL/6 se inocularon por vía intracerebral (i.c.) con 30 μ l de homogeneizado de cerebro al 1% (cepa RML de la tembladera de las ovejas). El tratamiento comenzó a los 80 días o a los 120 días de la infección, respectivamente, con 5 mg del compuesto cada día aplicado por vía oral mezclado con DMSO y mantequilla de cacahuete (figura 10).

25 Los cortes de cerebro teñidos para PrP^{Sc} (figura 10A) muestran que el tratamiento con anle138b reduce la acumulación de PrP^{Sc} en comparación con los animales tratados con DMSO. La cuantificación de la cantidad de PrP^{Sc} en los homogeneizados de cerebro de los ratones inoculados con priones en diferentes momentos demuestra que la acumulación de PrP^{Sc} en los ratones tratados con anle138b se reduce enormemente, incluso después de comenzar el tratamiento en la fase tardía de la enfermedad (120 dpi; figura 10B). La cuantificación histológica de las células apoptóticas en el cerebelo en los cortes de cerebro teñidos con HE demuestra que la inhibición de la acumulación de PrP^{Sc} da lugar a la inhibición de la muerte celular neuronal (figura 10C). Los ratones de control tratados con DMSO y mantequilla de cacahuete sin compuesto muestran un adelgazamiento progresivo (figura 10D). El tratamiento con anle138b desde los 80 dpi hacia adelante impide el adelgazamiento durante aproximadamente 100 días. El tratamiento desde los 120 dpi impide el adelgazamiento durante aproximadamente 70 días.

Estos hallazgos experimentales indican que el tratamiento con el compuesto inhibe la acumulación de PrP^{Sc}, la muerte de las células neuronales y la progresión de los signos clínicos de la enfermedad, incluso cuando el tratamiento se comienza tarde después de que aparezcan los signos obvios de la enfermedad.

Ejemplo 12: Comparación de los diferentes protocolos de tratamiento

35 Los ratones C57BL/6 se inocularon por vía intracerebral (i.c.) con 30 μ l de homogeneizado de cerebro al 1% (cepa RML de la tembladera de las ovejas). El tratamiento con anle138b en diferentes momentos y pautas (tal y como se indica en la leyenda de de la figura 11) prolongó significativamente los tiempos de supervivencia después de la provocación con la cepa RML de la tembladera de las ovejas ($p < 0,01$). La media de los tiempos de supervivencia se expresa en días \pm desviación estándar.

40 Tal y como se muestra en la figura 11, estos hallazgos experimentales indican que i) el tratamiento con el compuesto es eficaz también después de la aplicación oral del compuesto, ii) el tratamiento también es eficaz cuando se comienza en una fase clínica tardía de la enfermedad, y iii) que la prolongación del tratamiento da lugar a una supervivencia más duradera.

Ejemplo 13: Efecto dependiente de la dosis de la administración de anle138b sobre la cantidad de PrP^{Sc} en el cerebro

45 Los ratones C57BL/6 se inocularon por vía intracerebral (i.c.) con 30 μ l de homogeneizado de cerebro al 1% (cepa RML de la tembladera de las ovejas). El tratamiento comenzó a los 80 días de la infección con diferentes cantidades de anle138b (tal y como se muestra en la figura 12) aplicado por vía oral y mezclado con DMSO y mantequilla de

cacahuete. A los 120 días de la infección, se sacrificaron los animales, y la cantidad de PrP^{Sc} en el cerebro se cuantificó en comparación con los animales sacrificados a los 80 días de la infección.

Los datos dados a conocer en la figura 12 demuestran que anle138b redujo la acumulación de PrP^{Sc} en el cerebro de una manera dependiente de la dosis.

5 Ejemplo 14: Cuantificación de PrP^C por inmunotransferencia de tejido de cerebro de los ratones sin infectar tratados con 1 mg al día de anle138b mezclado con DMSO y mantequilla de cacahuete durante 1 semana. Tal y como se muestra en la figura 13, no se observó ninguna reducción de la cantidad de PrP^C en los ratones tratados con anle138b cuando se comparó con los ratones de control.

10 Estos hallazgos experimentales indican que el efecto terapéutico en los ratones infectados con la cepa de la tembladera de las ovejas no se debe a una reducción de la expresión de PrP^C sino a una inhibición de la formación de especies patológicas agregadas de la proteína.

Ejemplo 15: Análisis farmacocinético de anle138b

15 Se aplicó una dosis única de anle138b a los ratones C57BL/6 sin infectar tal y como se indica en la figura 14. En diferentes momentos después de la aplicación, la cantidad del compuesto en el cerebro y en el suero se midió en 2 animales por punto temporal y grupo experimental mediante LC-MS.

Estos hallazgos experimentales indican que hay una buena biodisponibilidad oral y una buena penetración en el cerebro. El anle138c se detectó en la sangre de los ratones, por lo que se supone que es un metabolito de anle138b.

Ejemplo 16: Inhibición de la formación de agregados de la α -sinucleína mediante diferentes compuestos

20 La agregación de la α -sinucleína se indujo mediante DMSO y 10 μ M de FeCl₃, y se analizó por espectroscopia confocal de moléculas sueltas, tal y como está descrito en Kostka et al (*J. Biol. Chem.* (2008) 283: 10992-11003). El efecto de diferentes compuestos añadidos a una concentración de 10 μ M sobre el efecto de la formación de los oligómeros del intermedio II se estudió en comparación con los controles sin el compuesto, tal y como se muestra en la tabla 2. La estructura de los compuestos correspondientes se muestra en la figura 15.

Tabla 2. Inhibición de la formación de agregados de α -sinucleína mediante diferentes compuestos.

Compuesto	Intermedio II	Compuesto	Intermedio II	Compuesto	Intermedio II
anle138c	< 5%	sery85	< 25%	sery145	< 50%
sery117	< 5%	sery335b	< 25%	sery345	< 50%
sery384	< 5%	sery275b	< 25%	sery256b	< 50%
sery383	< 5%	sery140	< 25%	sery161	< 75%
sery109	< 5%	anle138b	< 25%	sery315b	< 75%
sery320c	< 5%	sery363b	< 25%	sery316b	< 75%
		sery319	< 25%	sery292b	< 75%
				sery329	< 75%

25 Los hallazgos experimentales indican que estos compuestos inhiben la formación de agregados tóxicos de α -sinucleína, lo que indica que estos compuestos con relación estructural tienen la capacidad de ser utilizados para el tratamiento de las enfermedades de la proteína con la agregación de una proteína y, en particular, también para el tratamiento de enfermedades en las que se puede observar la agregación de la α -sinucleína.

30 Ejemplo 16: Efecto de los compuestos en un modelo de ratón *in vivo* de la enfermedad de Parkinson

Las pruebas experimentales sugieren que en los modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson que utilizan toxinas mitocondriales tales como MPTP y rotenona a las concentraciones idóneas, se puede observar la formación de agregados de α -sinucleína y contribuye a la muerte celular neuronal. Los ratones se trataron con MPTP (30 mg/kg de masa corporal al día) por inyección intraperitoneal los días 1 a 5 para inducir la degeneración de las neuronas

5 dopaminérgicas de la sustancia negra. Los animales (de 3 a 10 por grupo experimental) se trataron con diferentes compuestos o con el vehículo (250 mg/kg de masa corporal al día, aplicación oral (alimentación por sonda del compuesto en 12,5 µl de DMSO mezclado con 487,5 µl de aceite de oliva) los días 0 a 12). El día 12 se cuantificó la pérdida de neuronas en comparación con los ratones tratados sin MPTP (control, definidos como el 0% de muerte celular) y los ratones tratados con MPTP que se trataron solo con el vehículo (DMSO, definido como el 100% de muerte celular). Para la cuantificación de las células de la sustancia negra compacta (SNc) positivas para la tirosina hidroxilasa (TH), se inmunotifieron cortes de 50 µm con un anticuerpo anti-TH. Se analizaron los cortes alternos a lo largo de la SNc con el uso del programa Stereo Investigator (MicroBrightfield, Colchester, VT, EE. UU.). Las células inmunotefidas se contaron con el método del fraccionador óptico y un objetivo 20×. Los recuentos estereológicos los realizaron dos investigadores independientes con anonimato.

Los hallazgos experimentales que se muestran en la figura 16 indican que los compuestos analizados reducen la muerte celular en un modelo *in vivo* de la enfermedad de Parkinson.

Ejemplo 17: Efecto de anle138c sobre la agregación de Aβ

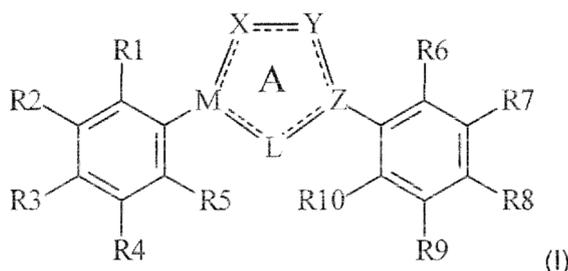
15 La Aβ40 a una concentración de 50 µM se incubó en la siguiente condición durante 30 horas: fosfato de sodio a 50 mM, cloruro de sodio a 50 mM, azida de sodio al 0,01%, pH 7,4, 37 °C, agitado con barras magnéticas delgadas, con o sin anle138c a 50 µM. Se le añadió DMSO a la muestra de control a la misma concentración que la muestra problema. La concentración de DMSO era del 2% (v/v) y la solución de reserva de anle138c era de 3 mM. La solución del péptido se centrifugó a 16 000g durante 15 minutos antes de los experimentos de DLD.

20 Mientras que el pico más grande en la Aβ40 monomérica se correspondía con un radio hidrodinámico de aproximadamente 1,5 nm y un pico de oligómero a aproximadamente 30 nm (panel superior), el estado de agregación de Aβ40 en presencia de anle138c (panel central) mostró un pico de oligómero en torno a 20 nm además del pico de monómero. El panel inferior muestra la distribución según el tamaño del estado de la Aβ40 en fibrillas amiloides, medido después de centrifugar la muestra. La agregación de Aβ40 se analizó mediante dispersión de luz dinámica. Las mediciones de DLD se realizaron por duplicado a 25 °C, en un instrumento DynaPro Titan (Wyatt Technology Corp., CA), con un láser de 827,08 nm. El ángulo de dispersión era de 90°. La medición de DLD consistió en 20 adquisiciones de 10 s de duración. El índice refractivo (IR) de la solución se estableció en 1,333 a 589 nm y 20 °C, y el IR a la longitud de onda estudiada se obtuvo mediante la ecuación de la Cauchy, con un coeficiente de 3 119 nm². La viscosidad era de 1,019 cp a 20 °C y las variaciones dependientes de la temperatura se calcularon mediante un modelo acuoso. La distribución según el tamaño se determinó mediante un método de regularización constreñido.

30 Estos hallazgos experimentales tal y como se muestran en la figura 17 indican que anle138c inhibe la formación de grandes oligómeros de Aβ40, lo que indica que el anle138c y los compuestos relacionados también pueden interferir con la agregación de Aβ, lo que se puede utilizar con propósitos terapéuticos y diagnósticos en enfermedades tales como la enfermedad de Alzheimer que se caracterizan desde el punto de vista neuropatológico por depósitos de Aβ agregados.

35 Una realización alternativa de los compuestos de la presente descripción se resume en los siguientes puntos. Estos compuestos se pueden utilizar de una manera idéntica a los compuestos de la invención mencionados más arriba.

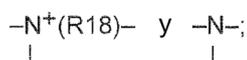
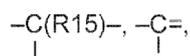
1. Un compuesto representado por la fórmula (I)



en donde

40 X, Y y L se seleccionan de manera independiente y no direccional de -C(R11)(R12)-, -C(R13)=, -N(R14)-, -N=, N⁺(R17)=, -O- y -S-;

M y Z se seleccionan de manera independiente y no direccional de

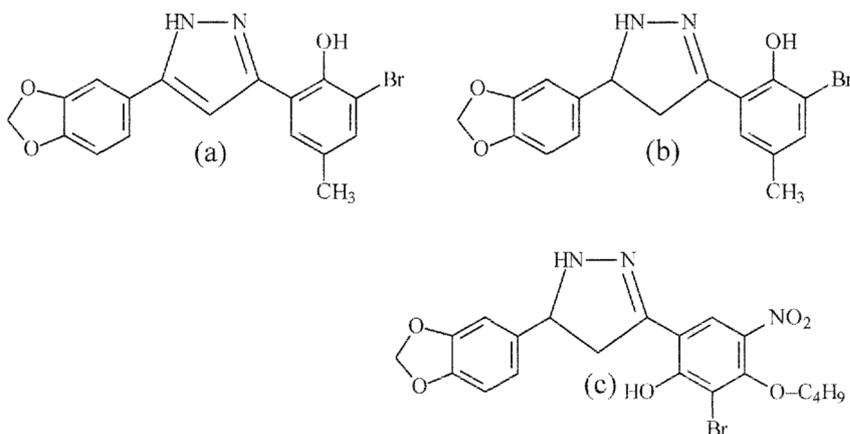


---- representa un doble enlace optativo;

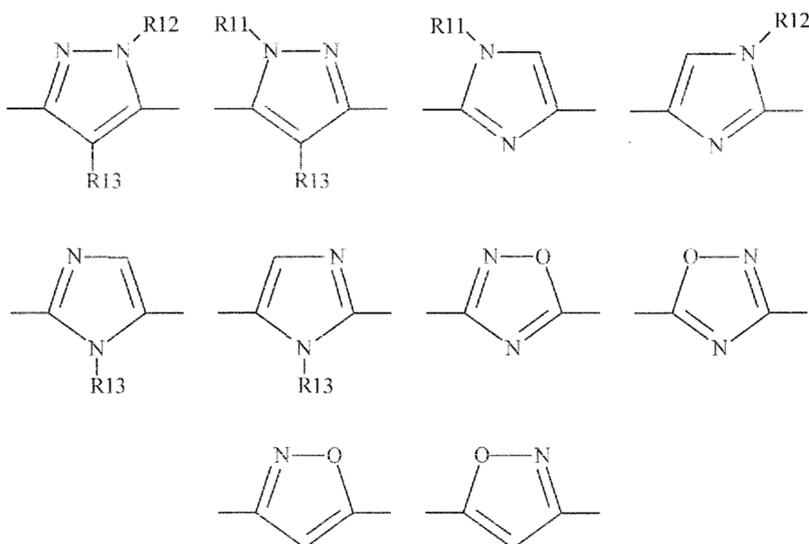
5 R1 a R15 o R17 o R18 se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo, ciano, hidroxilo, nitro, amino, azido, sulfonilo, tío, fosfonilo, carboxi, carbonilamido, alquilo, alqueno, alquino, alcoxi, acilo, aciloxi, acilamino, un grupo carbocíclico, carboxicooxi, carbocicloalquilo, carbocicloalqueno, arilo, arilalquilo, arilalqueno, arilalquino, ariloxi, arilalcoxi, un grupo heterocíclico, heterociclooxi, heterocicloalquilo, un grupo heteroarilo, heteroariloxi, heteroarilalquilo, heteroarilalqueno y heteroarilalcoxi, o dos grupos adyacentes pueden estar unidos para formar un grupo de puente que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, en donde uno o dos átomos de carbono pueden estar remplazado por -O-, -S- o -N(R')-, en donde R' se selecciona de H y alquilo(C₁₋₄); cada uno de los cuales está sustituido optativamente;

10 así como un profármaco, éster, solvato o sal del mismo;

siempre y cuando el compuesto no sea uno de los siguientes compuestos (a), (b) o (c)



15 2. El compuesto de acuerdo con el punto 1, en donde el anillo A se selecciona de manera direccional de las siguientes estructuras:

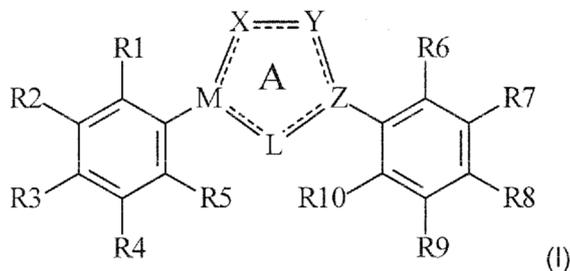


3. El compuesto de acuerdo con el punto 1 o 2, en donde R7 es halo, ciano, hidroxilo, nitro, azido, alcoxi, tío, alquiltío, amino, haloalcoxi, alquilo o haloalquilo.

4. El compuesto de acuerdo con cualquiera de los elementos 1 a 3, en donde R2 y R3 cada uno se selecciona

independientemente de hidroxilo y alcoxi(C₁₋₆); o R₂ y R₃ juntos forman una estructura -O-(CH₂)_n-O-, en donde n es de 1 a 3, preferiblemente n es 1.

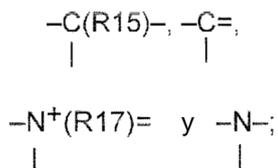
5. Un compuesto representado por la fórmula (I)



5 en donde

X, Y y L se seleccionan de manera independiente y no direccional de -C(R₁₁)(R₁₂)-, -C(R₁₃)=, -N(R₁₄)-, -N=, -N⁺(R₁₇)=, -O- y -S-;

M y Z se seleccionan de manera independiente y no direccional de



10

--- representa un doble enlace optativo;

R₁ a R₁₅ o R₁₇ o R₁₈ se seleccionan independientemente de hidrógeno, halo, ciano, hidroxilo, nitro, amino, azido, sulfonilo, tío, fosfonilo, carboxilo, carbonilamido, alquilo, alqueno, alquino, alcoxi, acilo, aciloxi, acilamino, un grupo carbocíclico, carboxiciclooxi, carbocicloalquilo, carboxicicloalqueno, arilo, arilalquilo, arilalqueno, arilalquino, ariloxi, arilalcoxi, un grupo heterocíclico, heterociclooxi, heterocicloalquilo, un grupo heteroarilo, heteroariloxi, heteroarilalquilo, heteroarilalqueno y heteroarilalcoxi o dos grupos adyacentes pueden estar unidos para formar un grupo de puente que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, en donde uno o dos átomos de carbono puede estar reemplazado por -O-, -S-, o -N(R')-,

15

en donde R' se selecciona de H y alquilo(C₁₋₄); cada uno de los cuales está optativamente sustituido;

20

así como un profármaco, éster, solvato o sal del mismo;

para ser usado en el tratamiento o la prevención de una enfermedad relacionada con la agregación de una proteína y/o una enfermedad neurodegenerativa.

25

6. Uso de un compuesto representado por la fórmula (I) tal y como está definido en el punto 5 para preparar una composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad relacionada con la agregación de una proteína y/o una enfermedad neurodegenerativa.

30

7. Un método para tratar o prevenir una enfermedad relacionada con la agregación de una proteína y/o una enfermedad neurodegenerativa que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto representado por la fórmula (I), tal y como está definido en el punto 5, que se aplica a un paciente que lo necesita.

35

8. Un método de identificación de un compuesto para inhibir la agregación de una proteína implicada en una enfermedad relacionada con la agregación de una proteína y/o una enfermedad neurodegenerativa, que comprende las etapas de:

poner en contacto una proteína monomérica marcada y un agregado de dicha proteína marcado de manera diferente en (1) presencia y/o (2) ausencia de un candidato a inhibidor de la agregación que es un compuesto tal y como está definido en el punto 5;

determinar la cantidad de los marcadores colocalizados que representan la extensión de la fijación de la proteína monomérica al agregado de dicha proteína; y

comparar el resultado obtenido en presencia y ausencia de dicho compuesto, en donde una disminución de los

marcadores colocalizados en presencia de dicho compuesto es indicativo de la capacidad del compuesto para inhibir la agregación de dicha proteína.

9. El método de acuerdo con el punto 8, en donde dichos marcadores son marcadores fluorescentes.

5 10. El método de acuerdo con el punto 8 o 9, en donde dichos marcadores están unidos a un anticuerpo o a un fragmento de un anticuerpo específicamente fijado a dicha proteína.

11. El método de acuerdo con el punto 10, en donde dicho anticuerpo o fragmento de un anticuerpo es capaz de discriminar entre la proteína agregada y la proteína monomérica.

10 12. El método acuerdo con de cualquiera de los puntos 8 a 11, en donde la cantidad de marcadores colocalizados se determina con el uso del método de «cribado de dianas intensamente fluorescentes (SIFT)» o transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) o toma de imágenes confocales de alta resolución.

15 13. El método acuerdo con de cualquiera de los puntos 8 a 12, en donde dichas proteínas monoméricas y agregadas se seleccionan del grupo que consiste en proteína priónica, proteína precursora del amiloide (PPA), α -sinucleína, superóxido dismutasa, proteína τ , inmunoglobulina, amiloide A, transtirretina, microglobulina β 2, cistatina C, apolipoproteína A1, TDP-43, amilina, ANF, gelsolina, insulina, lisozima, fibrinógeno, huntingtina y ataxina, y otras proteínas con un tramo de poli-Q, y fragmentos o derivados de dichas proteínas.

14. El método de acuerdo con el punto 13, en donde dicha proteína monomérica es la proteína priónica y dicha proteína agregada es la PrP^{Sc}.

15. El método de acuerdo con el punto 13, en donde dicha proteína monomérica es la α -sinucleína y dicha proteína agregada se selecciona del grupo que consiste en oligómeros o protofibrillas o fibrillas de la α -sinucleína.

20 16. Un método para seleccionar compuestos con eficacia *in vivo* para el tratamiento o la prevención de una enfermedad relacionada con la agregación de una proteína y/o una enfermedad neurodegenerativa, que comprende:

(a) administrar un compuesto candidato tal y como está definido en el punto 5 a un cultivo celular o a un animal no humano que tiene la isoforma agregable de la proteína, tal y como está definido en cualquiera de los puntos 13 a 15;

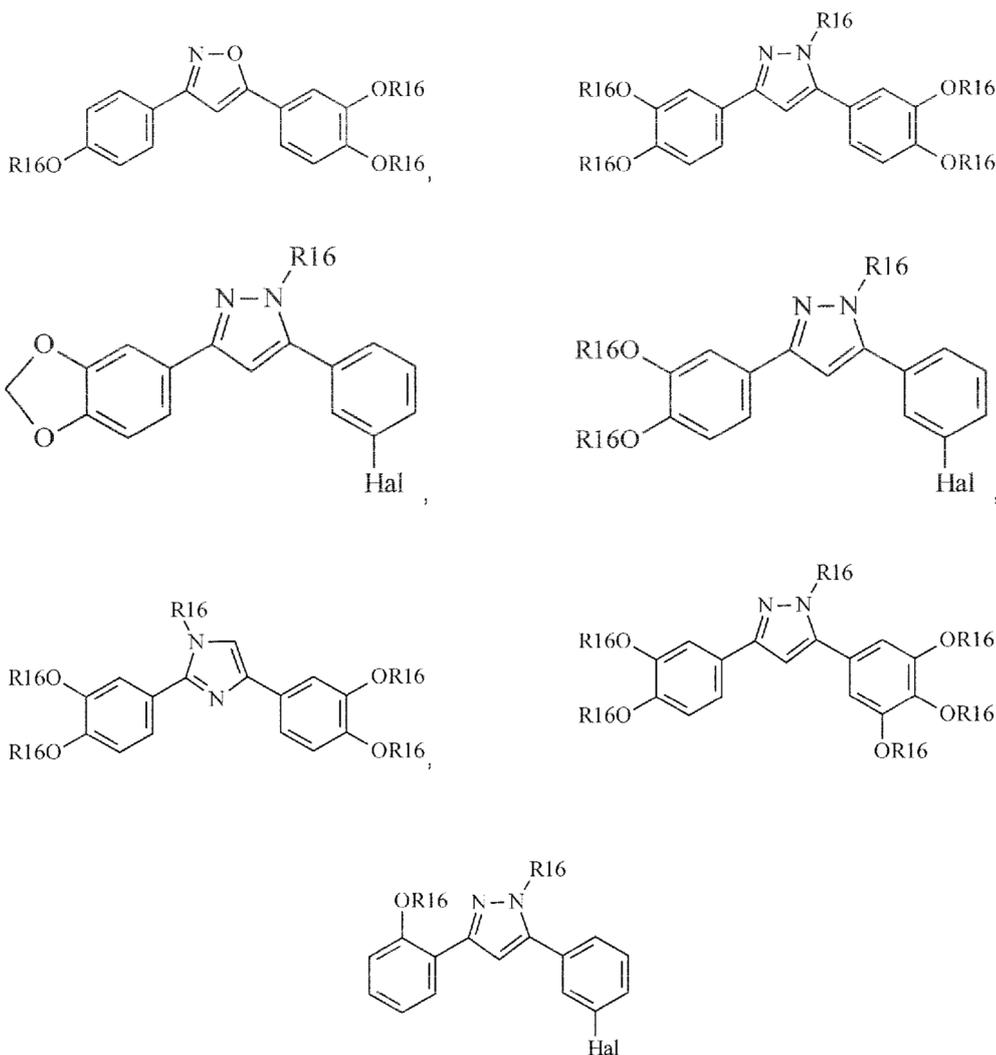
(b) cuantificar la cantidad de agregados observables; y

25 (c) identificar y seleccionar un compuesto que es capaz de reducir los agregados o la formación de agregados de dicha proteína o de incrementar el tiempo de supervivencia del cultivo celular o el animal no humano.

17. Uso de un compuesto tal y como está definido en el punto 5 para inhibir la agregación de una proteína *in vitro*, en un animal o *ex vivo*.

30 18. Una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende un compuesto, tal y como está definido en el punto 5, y optativamente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

19. El compuesto de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 o 5 o el uso de acuerdo con el punto 6 o el método de acuerdo con cualquiera de los puntos 7 a 16 o el uso de acuerdo con el punto 17 o la composición de acuerdo con el punto 18, en donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



y

- 5 en donde cada R16 se selecciona independientemente de H y alquilo(C₁₋₄); o dos grupos R16 adyacentes pueden estar unidos para forma un grupo de puente que tiene de 1 a 3 átomos de carbono; así como un profármaco, éster, solvato o sal del mismo.
20. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 16 o 19, o el uso de acuerdo con cualquiera de los puntos 17 o 19, la composición de diagnóstico de acuerdo con cualquiera de los puntos 18 o 19, en donde dicho compuesto está marcado de manera detectable.
- 10 21. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 16, 19 a 20, o el uso de acuerdo con cualquiera de los puntos 17, 19 a 20, en donde dos o más de dichos compuestos se utilizan simultáneamente.
- 15 22. El compuesto de acuerdo con cualquiera de los puntos 5 o 19, en donde dicha enfermedad relacionada con la agregación de una proteína se caracteriza por la presencia de una forma agregada de al menos una proteína o un fragmento o derivado del mismo, en donde la proteína se selecciona del grupo que consiste en proteína priónica, proteína precursora del amiloide (PPA), α -sinucleína, superóxido dismutasa, proteína τ , inmunoglobulina, amiloide A, transtirretina, microglobulina β 2, cistatina C, apolipoproteína A1, TDP-43, amilina, ANF, gelsolina, insulina, lisozima, fibrinógeno, huntingtina y ataxina, y otras proteínas con un tramo de poli-Q.
- 20 23. El compuesto de acuerdo con cualquiera de los puntos 5, 19 o 22, en donde dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad causada por los priones, enfermedad de Parkinson, atrofia multisistémica, enfermedad difusa con cuerpos de Lewy, demencia frontotemporal, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, ataxias espinocerebelosas y otras enfermedades por poli-Q, angiopatía amiloide cerebral hereditaria, polineuropatía amiloidótica familiar, amiloidosis sistémica primaria (amiloidosis AL), amiloidosis sistémica reactiva (amiloidosis AA), diabetes de tipo 2, amiloidosis localizada por inyección, amiloidosis de la microglobulina β 2, amiloidosis no neuropática hereditaria y amiloidosis sistémica hereditaria finlandesa.
- 25 24. El compuesto de acuerdo con el punto 23, en donde dicha enfermedad causada por los priones se selecciona de

la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad genética humana causada por los priones, encefalopatía espongiforme bovina (EEB) y tembladera de las ovejas.

5 25. Un kit que comprende el compuesto tal y como está definido en cualquiera de los puntos 5 y 18 a 24 y, además, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo específicamente fijado a dicho compuesto; y/o proteína monomérica o agregada tal y como está definido en los puntos 13 a 15; y/o proteína monomérica o agregada tal y como está definido en los puntos 13 a 15 optativamente formando complejo con dicho compuesto; e instrucciones para el uso, en uno o varios envases.

El término «halo», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un átomo de halógeno seleccionado de flúor, cloro, bromo y yodo, preferiblemente bromo.

10 El término «carboxi», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere al grupo -COOH.

El término «alquilo» y «alq» se refiere a un radical de alcano (hidrocarburo) de cadena lineal o ramificada que contiene de 1 a 12 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 6 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono. Tales grupos de ejemplo incluyen, pero sin limitarse a ellos, metilo, etilo, propilo, isopropilo, *n*-butilo, *t*-butilo, isobutilo, pentilo, hexilo, isohexilo, heptilo.

15 El término «alqueno» se refiere a un radical de hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que contiene de 2 a 12 átomos de carbono, preferiblemente de 2 a 6 átomos de carbono y al menos un doble enlace de carbono a carbono. Tales grupos de ejemplo incluyen etenilo o alilo.

20 El término «alquino» se refiere a un radical de hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que contiene de 2 a 12 átomos de carbono, preferiblemente de 2 a 6 átomos de carbono, y al menos un triple enlace de carbono a carbono. Tales grupos de ejemplo incluyen etinilo.

El término «alcoxi» se refiere a un grupo alquilo tal y como está descrito más arriba unido a través de un enlace de oxígeno (-O-).

25 Un «grupo acilo» de acuerdo con la presente invención es un grupo funcional en el que un alquilo, arilo, heterociclo o heteroarilo está unido a un grupo carbonilo. Los ejemplos de grupos acilo son grupo formilo; grupo alquil(C₁₋₆)-carbonilo, tal como grupo acetilo, grupo propionilo, grupo butirilo y grupo pivaloilo; grupo alquenoil(C₂₋₆)-carbonilo tal como grupo etenoilo, grupo propenoilo y grupo butenoilo; grupo aroilo, tal como grupo benzoilo, y similares, preferiblemente grupo acetilo.

El término «aciloxi», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un grupo acilo que está unido a -O-. De igual forma, «acilamino» es un grupo acilo que está unido a -N(R'')-, en donde R'' es H o alquilo(C₁₋₆).

30 El término «grupo carbocíclico» se refiere a un grupo de hidrocarburo cíclico totalmente saturado que contiene de 1 a 4 anillos, preferiblemente 1 anillo, y de 3 a 8 carbonos por anillo. Tales grupos de ejemplo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, etc.

El término «carbociclooxi» se refiere a un grupo carbocíclico tal y como está descrito más arriba unido a través de un enlace de oxígeno (-O-).

35 El término «carbocicloalquilo» se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo carbocíclico, en donde el carbociclo y el alquilo son tal y como están esbozados más arriba.

El término «carbocicloalqueno» se refiere a un grupo alqueno sustituido con un grupo carbocíclico, en donde el grupo carbocíclico y el alqueno están definidos tal y como está esbozado más arriba.

40 El término «arilo» se refiere a grupos de hidrocarburo aromático cíclicos que tienen de 6 a 20, preferiblemente 6 a 10, átomos de carbono en el esqueleto, y tienen de 1 a 3 anillos aromáticos, sobre todo grupos monocíclicos o bicíclicos, tales como fenilo, bifenilo o naftilo. Cuando contienen dos o más anillos aromáticos (bicíclicos, etc.), los anillos aromáticos del grupo arilo pueden estar unidos por un solo punto (p. ej., bifenilo) o pueden estar fusionados (p. ej., naftilo, fenantrenilo y similares).

45 El término «arilalquilo» se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo arilo, en donde el arilo y el alquilo están definidos tal y como está esbozado más arriba.

El término «arilalqueno» se refiere a un grupo alqueno sustituido con un grupo arilo, en donde el arilo y el alqueno están definidos tal y como está esbozado más arriba.

El término «arilalquino» se refiere a un grupo alquino sustituido con un grupo arilo, en donde el arilo y el alquino están definidos tal y como está esbozado más arriba.

50 El término «ariloxi» se refiere a un grupo arilo tal y como está descrito más arriba unido a través de un enlace de oxígeno (-O-), por ejemplo, grupo fenoxi, grupo antriloxi, grupo bifeniloxi y similares, preferiblemente un grupo fenoxi.

El término «arilalcoxi» se refiere a un grupo alcoxi sustituido con un grupo arilo, en donde el arilo y el alcoxi están definidos tal y como está esbozado más arriba.

El término «grupo heterocíclico» se refiere a los grupos cíclicos totalmente saturados, o parcial o totalmente insaturados (por ejemplo, sistemas de anillos monocíclicos con 3 a 7 miembros, bicíclicos con 7 a 11 miembros, o tricíclicos con 10 a 16 miembros) que tienen al menos un heteroátomo en al menos un anillo que contiene átomos de carbono. Cada anillo del grupo heterocíclico que contiene un heteroátomo puede tener 1, 2, 3 o 4 heteroátomos seleccionados de átomos de nitrógeno, átomos de oxígeno y/o átomos de azufre, en donde los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar optativamente oxidados y los heteroátomos de nitrógeno pueden estar optativamente cuaternizados (el término «heteroarilio» se refiere a un grupo heteroarilo que lleva un átomo de nitrógeno cuaternario y así una carga positiva). El grupo heterocíclico puede estar unido al resto de la molécula en cualquier heteroátomo o átomo de carbono del anillo o del sistema de anillos. Los grupos heterocíclicos monocíclicos de ejemplo incluyen óxido de etileno, azetidino, pirrolidino, pirrolo, pirazolo, oxetano, pirazolino, imidazolilo, imidazolidino, oxazolilo, oxazolidino, isoxazolilo, isoxazolilo, tiazolo, tiadiazolilo, tiazolidino, isotiazolilo, isotiazolidino, furilo, tetrahydrofurilo, tienilo, oxadiazolilo, piperidino, piperazino, 2-oxopiperazino, 2-oxopiperidino, 2-oxopirrolidino, 2-oxoazepino, azepino, hexahidrodiazepino, 4-piperidono, piridilo, pirazino, pirimidino, piridazino, triazino, triazolilo, tetrazolilo, tetrahydropirano, morfolino, tiamorfolino, sulfóxido de tiamorfolino, tiamoifolinilsulfona, 1,3-dioxolano y tetrahydro-1,1-dioxotieno y similares. Los grupos heterocíclicos bicíclicos de ejemplo incluyen indolilo, isoindolilo, benzotiazolilo, benzodioxolilo, benzoxazolilo, benzoxadiazolilo, benzotieno, quinuclidino, quinolino, tetrahydroisoquinolino, isoquinolino, bencimidazolilo, benzopirano, indolizino, benzofurilo, benzofurazano, cromono, cumarino, benzopirano, cinolino, quinoxalino, indazolilo, pirrolopiridilo, furopiridino (tal como furo[2,3-c]piridino, furo[3,2-b]piridino o furo[2,3-b]piridino), dihydrobenzodioxino, dihydrodioxidobenzotiofenilo, dihydroisoindolilo, dihydroindolilo, dihydroquinolino, dihydroquinazolino (tal como 3,4-dihydro-4-oxoquinazolino), triazinilazepino, tetrahydroquinolino y similares. Los grupos heterocíclicos tricíclicos de ejemplo incluyen carbazolilo, benzidolilo, fenantrolino, dibenzofurano, acridino, fenantridino, xanteno y similares.

El término «heterociclooxi» se refiere a un grupo heterocíclico tal y como está descrito más arriba unido a través de un enlace de oxígeno (-O-).

El término «heterocicloalquilo» se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo heterocíclico, en donde el heterociclo y el alquilo están definidos tal y como está esbozado más arriba.

El término «heteroarilo», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un anillo aromático de 5 a 6 miembros que puede contener, como heteroátomos, oxígeno, azufre y/o nitrógeno, y al cual se puede fusionar un anillo aromático más. Los ejemplos no limitantes y sin limitación de grupos heteroarilo son benzofurano, furilo, tienilo, benzotieno, tiazolilo, imidazolilo, oxazolilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, benzotiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, pirrolo, pirano, tetrahydropirano, pirazolo, piridilo, quinolino, isoquinolino, purino, carbazolilo, benzoxazolilo, benzamidazolilo, indolilo, isoindolilo, pirazino, diazino, pirazina, triaziniltriazina, tetrazino, tetrazolilo, benzotiofenilo, benzopiridilo y bencimidazolilo.

El término «heteroariloxi» se refiere a un grupo heteroarilo tal y como está descrito más arriba unido a través de un enlace de oxígeno (-O-).

Los términos «heteroarilalquilo», «heteroarilalqueno» y «heteroarilalquino» se refieren a grupos en los que un grupo alquilo, alqueno o alquino está sustituido con un grupo heteroarilo, en donde el heteroarilo y el alquilo, alqueno y alquino están definidos tal y como se esbozó más arriba.

El término «heteroarilalcoxi» se refiere a un grupo alcoxi con un grupo heteroarilo, en donde el heteroarilo y el alcoxi están definidos tal y como se esbozó más arriba.

«Sustituido», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un grupo sustituido con uno o más sustituyentes, preferiblemente de 1 a 4 sustituyentes, en cualquier punto de unión disponible. Los sustituyentes de ejemplo incluyen, pero sin limitarse a ellos, uno o varios de los grupos siguientes: alquilo, alcoxi, halo, hidroxi, carboxi (a saber, -COOH), alcoxycarbonilo, alquilcarbonilo, amino (a saber, -NH₂), tiol y nitro.

En una realización alternativa preferida, R1 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo, más preferiblemente hidrógeno.

En una realización alternativa preferida, R2 se selecciona del grupo que consiste en hidroxi y alcoxi.

En una realización alternativa preferida, R3 se selecciona del grupo que consiste en hidroxi y alcoxi.

En otra realización alternativa preferida, R2 y R3 están enlazados entre sí y forman una estructura -O(CH₂)_nO-, en donde n es de 1 a 3, preferiblemente n es 1.

En una realización alternativa preferida, R4 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxi y alcoxi, más preferiblemente hidrógeno.

En una realización alternativa preferida, R5 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo, más preferiblemente hidrógeno.

En una realización alternativa preferida, R6 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo, más preferiblemente hidrógeno.

5 En una realización alternativa preferida, R7 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halo, ciano, nitro, hidroxilo y alcoxi, más preferiblemente R7 es hidrógeno, halo, hidroxilo o alcoxi, incluso más preferiblemente R7 es halo.

En una realización alternativa preferida, R8 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo y alcoxi.

En una realización alternativa preferida, R9 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halo, hidroxilo y alcoxi.

10 En una realización alternativa preferida, R10 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo, más preferiblemente hidrógeno.

En una realización alternativa preferida, R11 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo.

En una realización alternativa preferida, R12 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo.

En una realización alternativa preferida, R13 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo.

En una realización alternativa preferida, R14 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo.

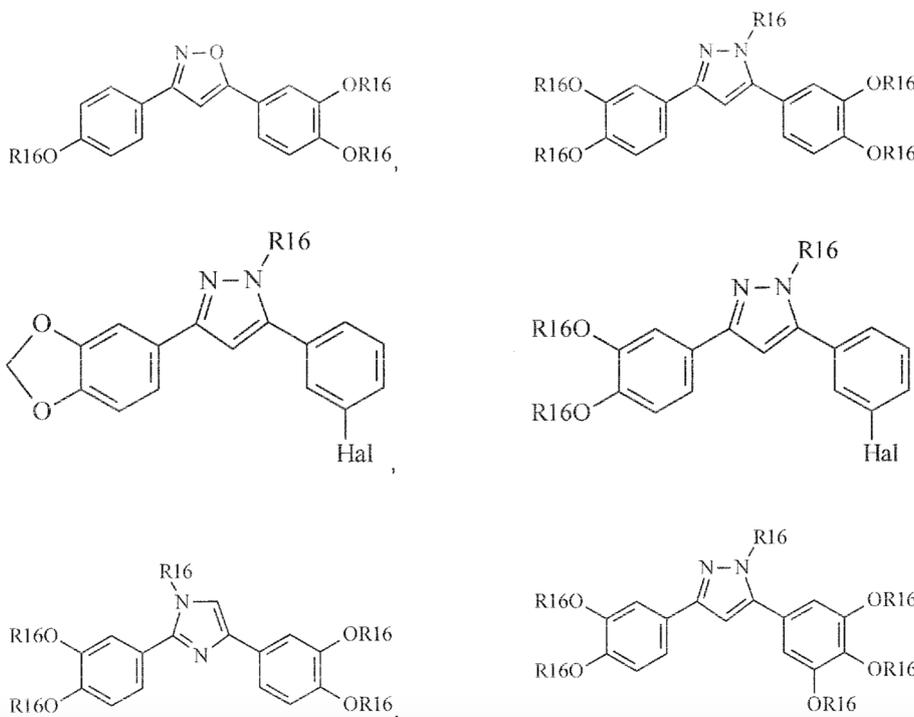
15 En una realización alternativa preferida, R15 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo.

En otra realización alternativa preferida del compuesto de la invención, R7 es halo, ciano, hidroxilo o nitro, azido, alcoxi, tío, alquiltío, amino, haloalcoxi, alquilo o haloalquilo.

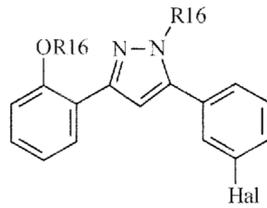
En una realización alternativa preferida, R7 es halo, ciano, hidroxilo o nitro, más preferiblemente halo.

20 En otra realización alternativa preferida, R2 y R3 se seleccionan cada uno independientemente de hidroxilo y alcoxi(C₁₋₆); o R2 y R3 juntos forman una estructura -O-(CH₂)_n-O-, en donde n es de 1 a 3, preferiblemente n es 1.

En una realización alternativa preferida, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en

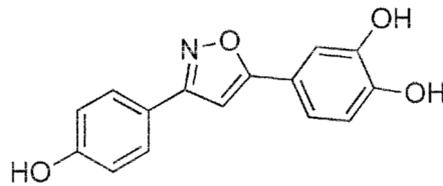


y

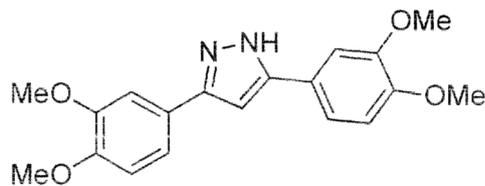


en donde cada R16 se selecciona independientemente de H y alquilo(C₁₋₄); o dos grupos R16 adyacentes pueden estar enlazados para formar un grupo de puente que tiene de 1 a 3 átomos de carbono; así como profármacos, ésteres, solvatos o sales de los mismos.

5 En una realización alternativa más preferida, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

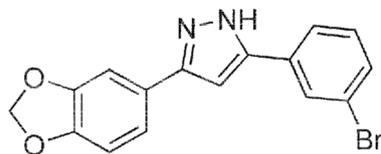


3-(4-Hidroxifenil)-5-(3,4-dihidroxifenil)isoxazol

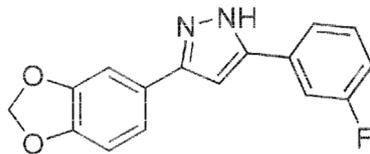


3,5-Bis(3,4-dimetoxifenil)pirazol

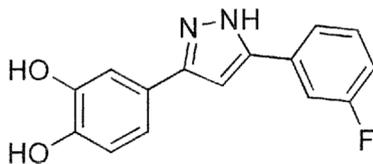
10



5-(3-Bromofenil)-3-(3,4-metilendioxfenil)pirazol



5-(3-Fluorofenil)-3-(3,4-metilendioxfenil)pirazol

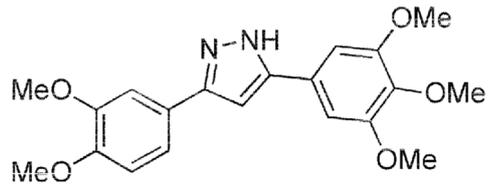


15

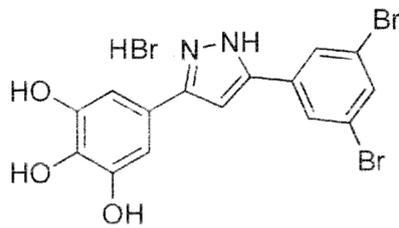
3-(3,4-Dihidroxifenil)-5-(3-fluorofenil)pirazol



Hidrobromuro de 2,4-bis(3,4-dihidroxfenil)imidazol

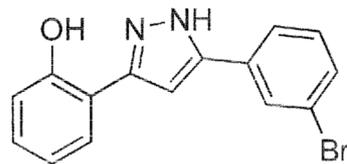


3-(3,4-Dimetoxifenil)-5-(3,4,5-trimetoxifenil)pirazol



5

Hidrobromuro de 5-(3,5-dibromofenil)-3-(3,4,5-trihidroxfenil)pirazol



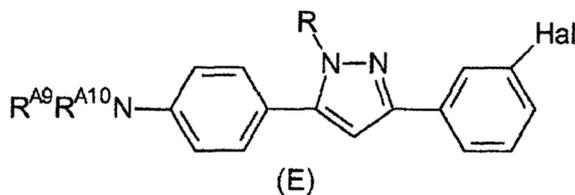
5-(3-Bromofenil)-3-(2-hidroxfenil)pirazol (10353_F11)

Los compuestos de la realización alternativa se pueden marcar de manera detectable.

10

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la fórmula (E):

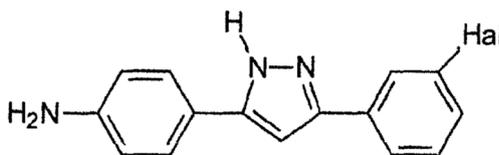


en donde:

- 5 R se selecciona de hidrógeno; alquilo(C₁₋₄); y -alquilenos(C₁₋₄)-halógeno; y
 Hal se selecciona de F, Cl, Br e I;
 R^{A9} es H o alquilo(C₁₋₄); y
 R^{A10} es H o alquilo(C₁₋₄);

o un solvato o sal de estos compuestos.

10 2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto es:



en donde Hal es Cl o Br;

o un solvato o sal de estos compuestos.

15 3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el compuesto está marcado de manera detectable, en donde el marcador detectable se selecciona de ¹⁸F, ¹¹C, ¹²⁵I, ¹³¹I, ⁷⁷Br y ⁷⁶Br.

4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el marcador detectable se selecciona de ¹⁸F y ¹¹C.

5. Una composición farmacéutica o diagnóstica que comprende un compuesto según está definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un solvato o sal del mismo, y optativamente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 6. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un solvato o sal del mismo, para ser usado en el tratamiento o la prevención de una enfermedad relacionada con la agregación de una proteína y/o una enfermedad neurodegenerativa.

25 7. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la enfermedad relacionada con la agregación de una proteína se caracteriza por la presencia de una forma agregada de al menos una proteína o un fragmento o derivado de la misma, en donde la proteína se selecciona del grupo que consiste en proteína priónica, proteína precursora del amiloide (PPA), α-sinucleína, superóxido dismutasa, proteína τ, inmunoglobulina, amiloide A, transtirretina, microglobulina β2, cistatina C, apolipoproteína A1, TDP-43, amilina, ANF, gelsolina, insulina, lisozima, fibrinógeno, huntingtina y ataxina, y otras proteínas con un tramo de poli-Q.

30 8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad causada por los priones, enfermedad de Alzheimer, atrofia multisistémica, enfermedad difusa con cuerpos de Lewy, demencia frontotemporal, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, ataxias espinocerebelosas y otras enfermedades por poli-Q, angiopatía amiloide cerebral hereditaria, polineuropatía amiloidótica familiar, amiloidosis sistémica primaria (amiloidosis AL), amiloidosis sistémica reactiva (amiloidosis AA), diabetes de tipo 2, amiloidosis localizada por inyección, amiloidosis de la microglobulina β2, amiloidosis no neuropática hereditaria y amiloidosis sistémica hereditaria finlandesa.

35 9. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la enfermedad causada por los priones se selecciona de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad genética humana causada por priones, encefalopatía espongiiforme bovina (EEB) y tembladera de las ovejas.

10. Uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un solvato o sal del mismo, para

la preparación de una composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad relacionada con la agregación de una proteína y/o una enfermedad neurodegenerativa.

5 11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la enfermedad relacionada con la agregación de una proteína se caracteriza por la presencia de una forma agregada de al menos una proteína o un fragmento o derivado de la misma, en donde la proteína se selecciona del grupo que consiste en proteína priónica, proteína precursora del amiloide (PPA), α -sinucleína, superóxido dismutasa, proteína τ , inmunoglobulina, amiloide A, transtirretina, microglobulina β 2, cistatina C, apolipoproteína A1, TDP-43, amilina, ANF, gelsolina, insulina, lisozima, fibrinógeno, huntingtina y ataxina, y otras proteínas con un tramo de poli-Q.

10 12. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad causada por los priones, enfermedad de Alzheimer, atrofia multisistémica, enfermedad difusa con cuerpos de Lewy, demencia frontotemporal, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, ataxias espinocerebelosas y otras enfermedades por poli-Q, angiopatía amiloide cerebral hereditaria, polineuropatía amiloidótica familiar, amiloidosis sistémica primaria (amiloidosis AL), amiloidosis sistémica reactiva (amiloidosis AA), diabetes de tipo 2, amiloidosis localizada por inyección, amiloidosis de microglobulina β 2, amiloidosis no neuropática hereditaria y amiloidosis sistémica hereditaria finlandesa.

15 13. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la enfermedad causada por los priones se selecciona de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad genética humana causada por priones, encefalopatía esponjiforme bovina (EEB) y tembladera de las ovejas.

20 14. Uso de un compuesto tal y como está definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un solvato o sal del mismo, para inhibir la agregación de una proteína *in vitro* o *ex vivo*.

25 15. Un kit que comprende el compuesto tal y como está definido en la reivindicación 3 o 4 o un solvato o sal del mismo, y, además, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se fija específicamente al compuesto; y/o una proteína monomérica o agregada tal y como está definido en la reivindicación 11; y/o una proteína monomérica o agregada tal y como está definido en la reivindicación 11 que forma optativamente un complejo con el compuesto; e instrucciones de uso, en uno o varios envases.

16. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, o un solvato o sal del mismo, para ser usado en un método de toma de imágenes de los depósitos de la proteína agregada, en donde el método comprende las etapas de:

30 (i) introducir una cantidad detectable de una composición que comprende un compuesto marcado de manera detectable tal y como está definido en la reivindicación 3 o 4, o un solvato o sal del mismo, en un sujeto, en donde el marcador detectable se selecciona de ^{18}F , ^{11}C , ^{125}I , ^{123}I , ^{131}I , ^{77}Br y ^{76}Br ;

(ii) dejar el tiempo suficiente para que el compuesto se asocie a la proteína agregada; y

(iii) detectar el compuesto asociado a la proteína agregada.

35 17. El compuesto para ser usado de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el marcador detectable se selecciona de ^{18}F y ^{11}C .

18. Un kit para preparar un compuesto marcado de manera detectable tal y como está definido en la reivindicación 3 o 4 o un solvato o sal del mismo, en donde el kit comprende al menos dos compuestos precursores que, tras la reacción, forman el compuesto tal y como está definido en la reivindicación 3 o 4 o un solvato o sal del mismo, en donde R comprende un marcador detectable seleccionado de ^{18}F , ^{11}C , ^{125}I , ^{123}I , ^{131}I , ^{77}Br y ^{76}Br .

40 19. El kit de acuerdo con la reivindicación 18, en donde el marcador detectable se selecciona de ^{18}F y ^{11}C .

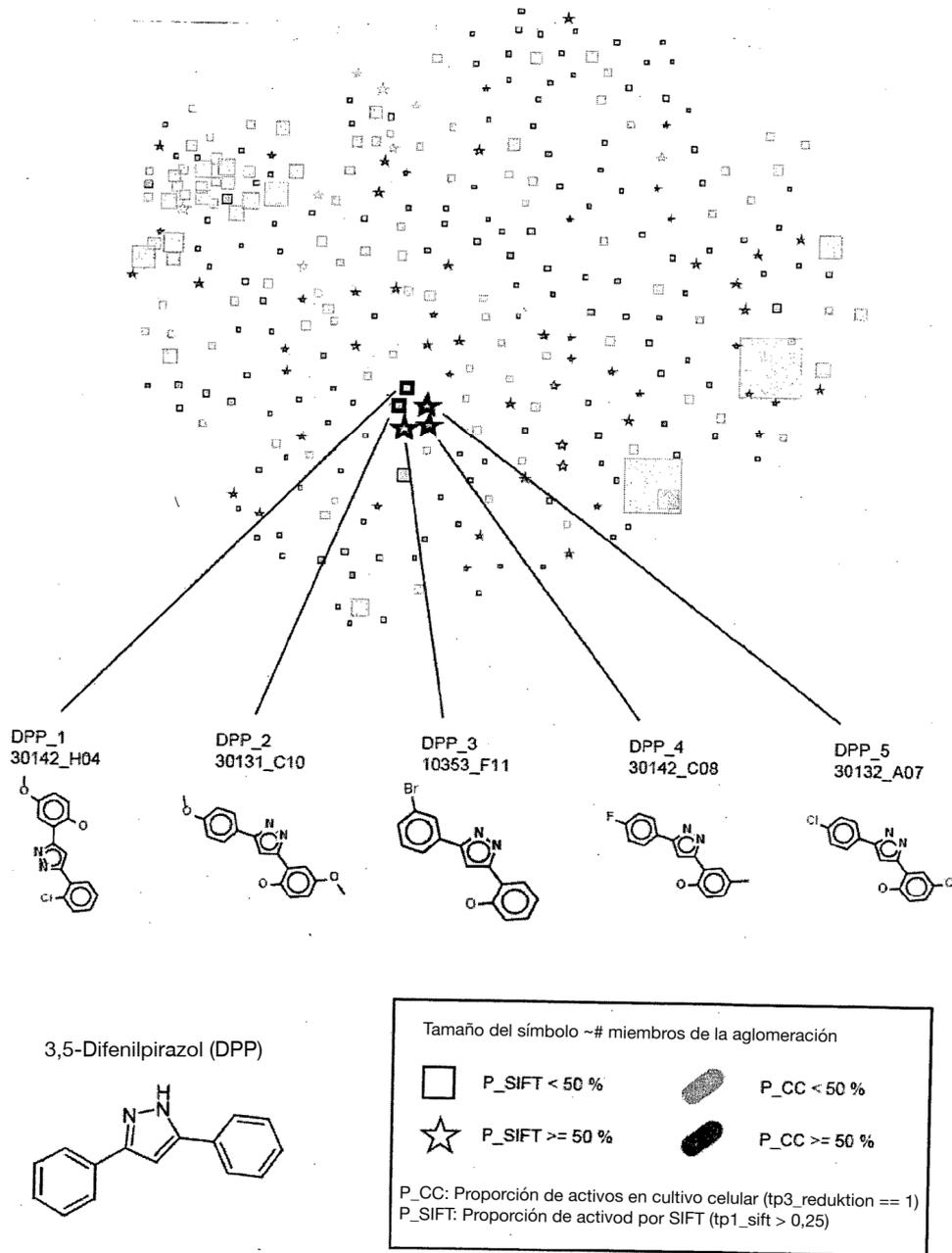
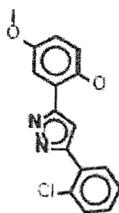


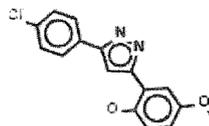
Figura 1

A)

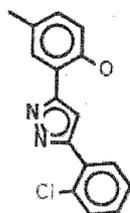
DPP_1



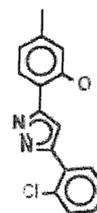
substance_id: 30142_H04
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 0.5
 tp3_scn2a: 1.0



substance_id: 30136_B06
 tp1_sift: 0.318
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 0.0
 tp3_scn2a: 1.0



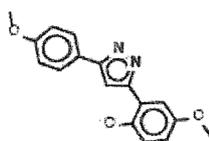
substance_id: 30131_A02
 tp1_sift: -0.341
 tp3_reduktion: 0.0
 tp3_scn2a: 0.0



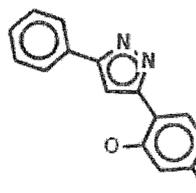
substance_id: 30143_D02
 tp1_sift: -0.685
 tp3_reduktion: 0.0
 tp3_scn2a: 0.0

B)

DPP_2

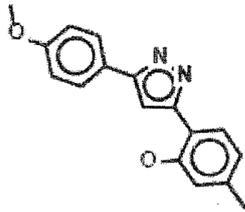


substance_id: 30131_C10
 tp1_sift: 0.049
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 1.0
 tp3_scn2a: 0.5

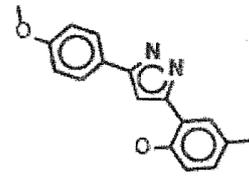


substance_id: 30139_H04
 tp1_sift: -0.809
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 1.0
 tp3_scn2a: 1.0

Figura 2

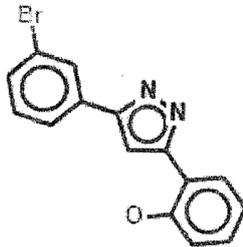


substance id: 30142_E08
 tp1_sift: 0.304
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion mue: 1.0
 tp3_scn2a: 0.5

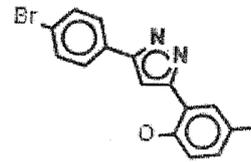


substance id: 30139_E02
 tp1_sift: 0.067
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion mue: 0.5
 tp3_scn2a: 1.0

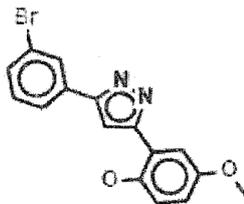
c)



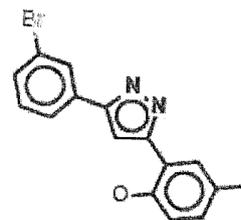
substance id: 10353_F11
 tp1_sift: 1.039
 tp1_sift validation: -1.0
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion mue: 1.0
 tp3_scn2a: 1.0



substance id: 30134_F02
 tp1_sift: -0.587
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion mue: 0.5
 tp3_scn2a: 0.5

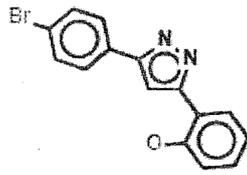


substance id: 10353_B07
 tp3_reduktion: 0.0

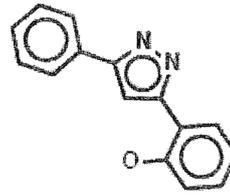


substance id: 10353_C08
 tp1_sift: 0.964
 tp3_reduktion: 0.0

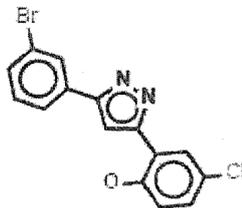
Figura 2 continuación



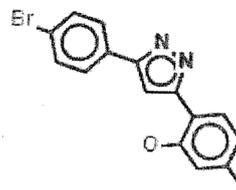
substance id: 30135_G10
tp1_sift: 0.505
tp3_reduktion: 1.0
tp3_reduktion_mue: 0.5
tp3_scn2a: 0.0



substance id: 30131_A08
tp1_sift: -0.141
tp3_reduktion: 1.0
tp3_reduktion_mue: 0.0
tp3_scn2a: 0.0



substance id: 10353_H11
tp1_sift: 0.76
tp3_reduktion: 0.0

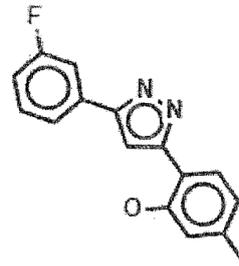


substance id: 30140_A08
tp1_sift: -0.324
tp3_reduktion: 0.0
tp3_scn2a: 0.0

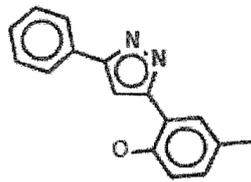
Figura 2 continuación

D)

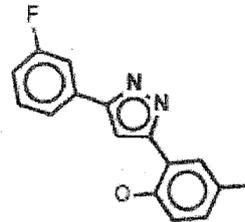
DPP_4



substance id: 10353_G08
tp1_sift: 0.675
tp3_reduktion: 1.0
tp3_reduktion_mue: 1.0
tp3_scr2a: 1.0

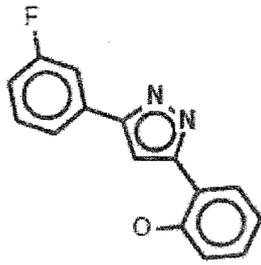


substance id: 30139_B02
tp1_sift: 0.071
tp3_reduktion: 1.0
tp3_reduktion_mue: 0.5
tp3_scr2a: 1.0

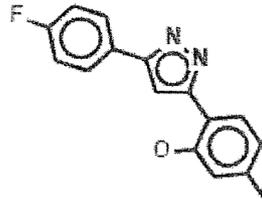


substance id: 10353_E03
tp1_sift: 1.303
tp1_sift_validation: -1.0
tp3_reduktion: 1.0
tp3_reduktion_mue: 0.0

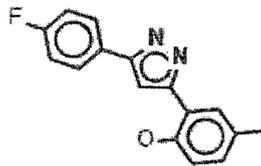
Figura 2 continuación



substance_id: 10354_H03
tp1_sift: -0.093
tp3_reduktion: 1.0
tp3_reduktion_mue: 1.0
tp3_scn2a: 1.0



substance_id: 30137_A03
tp1_sift: 0.153
tp3_reduktion: 1.0
tp3_reduktion_mue: 1.0
tp3_scn2a: 0.5

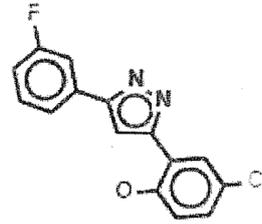


substance_id: 30142_C08
tp1_sift: 0.349
tp3_reduktion: 1.0
tp3_reduktion_mue: 0.0
tp3_scn2a: 1.0

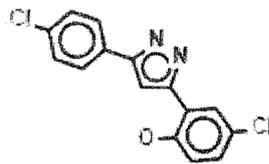
Figura 2 continuación

E)

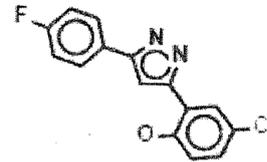
DPP_5



substance_id: 10353_C11
tp1_sift: 0.717
tp3_reduktion: 1.0
tp3_reduktion_mue: 1.0
tp3_scn2a: 0.0

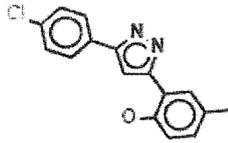


substance_id: 30132_A07
tp1_sift: 0.718
tp3_reduktion: 1.0
tp3_reduktion_mue: 0.5
tp3_scn2a: 0.5

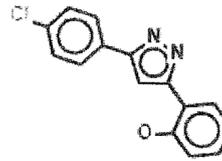


substance_id: 30134_F11
tp1_sift: -0.107
tp3_reduktion: 1.0
tp3_reduktion_mue: 0.0
tp3_scn2a: 0.5

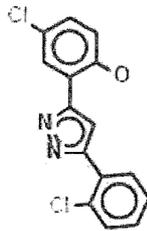
Figura 2 continuación



substance_id: 30133_D04
 tp1_sift: 0.273
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 1.0
 tp3_scn2a: 0.5



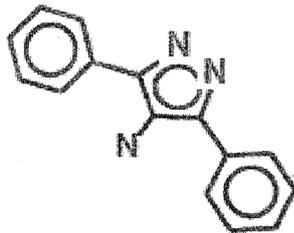
substance_id: 30138_F05
 tp1_sift: -0.154
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 1.0
 tp3_scn2a: 1.0



substance_id: 30136_B07
 tp1_sift: 0.4
 tp3_reduktion: 1.0
 tp3_reduktion_mue: 0.0
 tp3_scn2a: 1.0

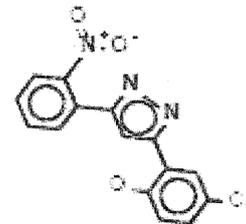
F)

DPP_6



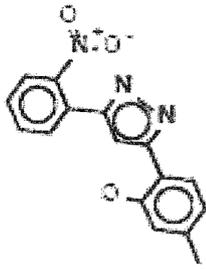
substance_id: 30165_G11
 tp3_reduktion: 1.0

Sin clasificar

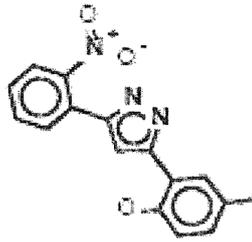


substance_id: 30142_D07
 tp1_sift: -0.034
 tp2_reduktion: 0.0
 tp2_scn2a: 0.0

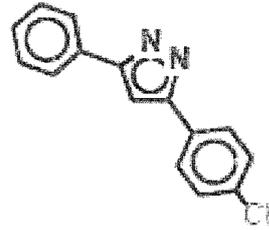
Figura 2 continuación



substance_id: 30141_A07
tp1_sift: -0.183
tp3_reduktion: 0.0
tp3_sch2a: 0.0



substance_id: 30132_G10
tp1_sift: 0.143
tp3_reduktion: 0.0
tp3_sch2a: 0.0



substance_id: 30233_E03
tp1_sift: -0.517

Figura 2 continuación

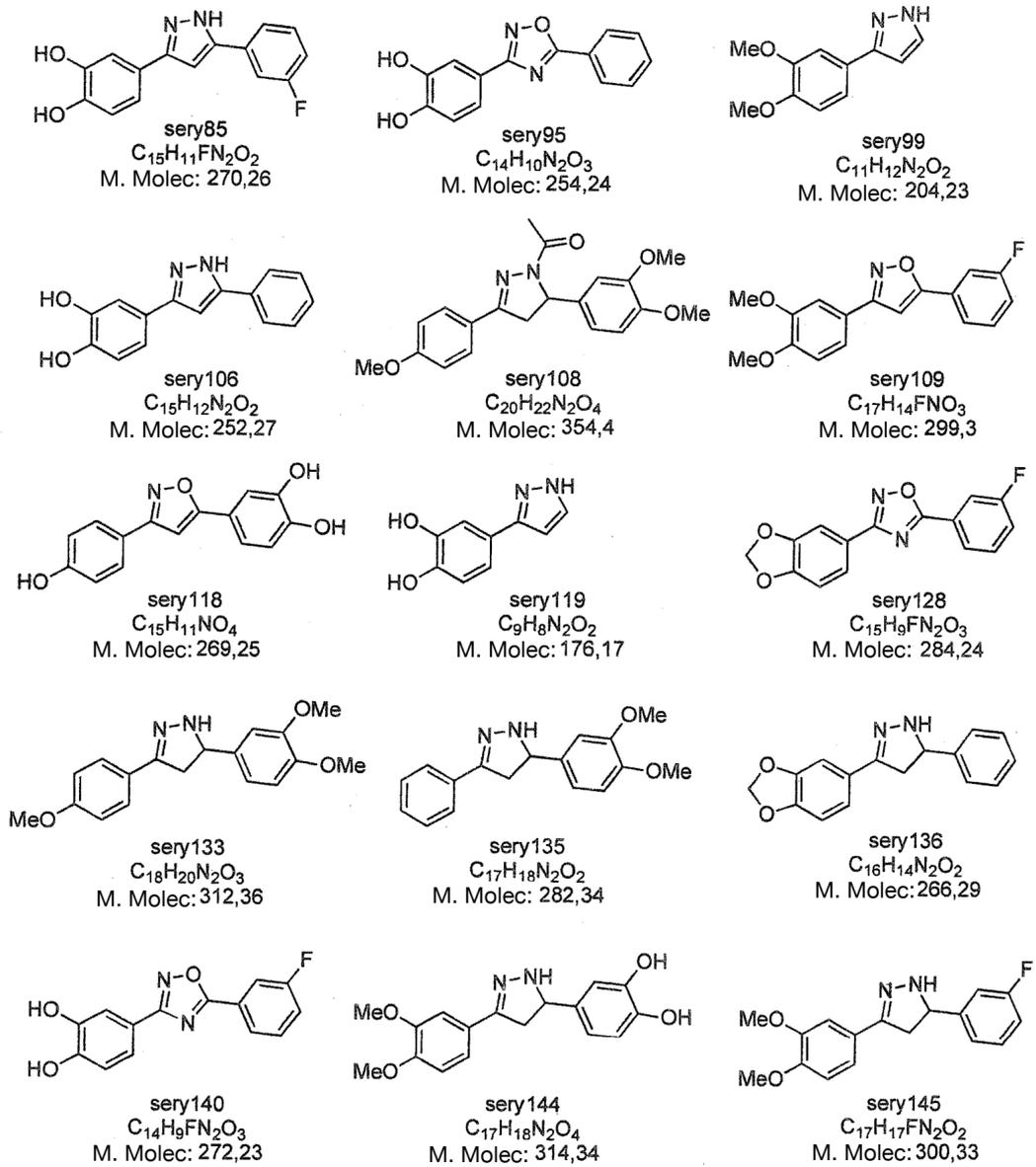
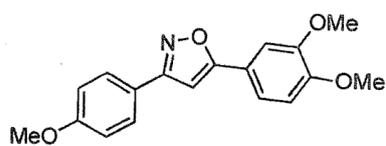
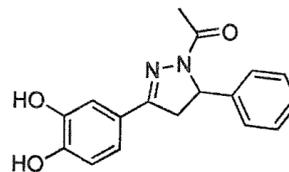


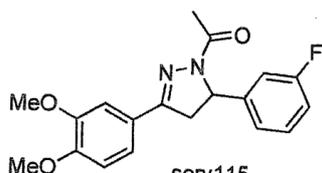
Figura 3



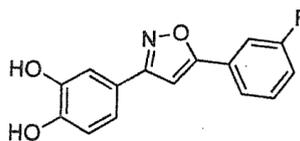
sery103
 $C_{18}H_{17}NO_4$
 M. Molec.: 311,33



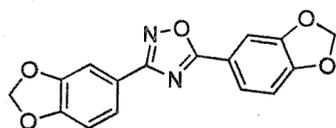
sery105
 $C_{17}H_{16}N_2O_3$
 M. Molec.: 296,32



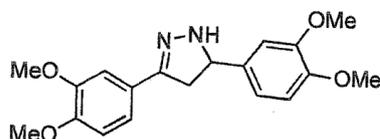
sery115
 $C_{19}H_{19}FN_2O_3$
 M. Molec.: 342,36



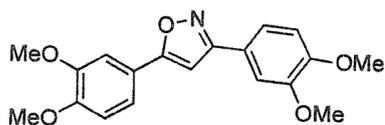
sery117
 $C_{15}H_{10}FNO_3$
 M. Molec.: 271,24



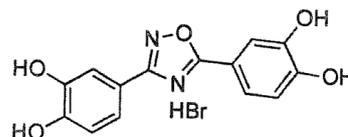
sery129
 $C_{16}H_{10}N_2O_5$
 M. Molec.: 310,26



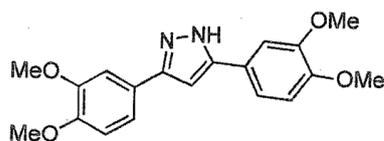
sery132
 $C_{19}H_{22}N_2O_4$
 M. Molec.: 342,39



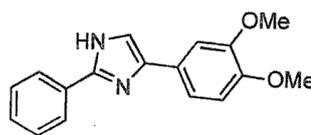
sery137
 $C_{19}H_{19}NO_5$
 M. Molec.: 341,36



sery139
 $C_{14}H_{11}BrN_2O_5$
 M. Molec.: 367,15



sery149
 $C_{19}H_{20}N_2O_4$
 M. Molec.: 340,37



sery152
 $C_{17}H_{16}N_2O_2$
 M. Molec.: 280,32

Figura 3 continuación

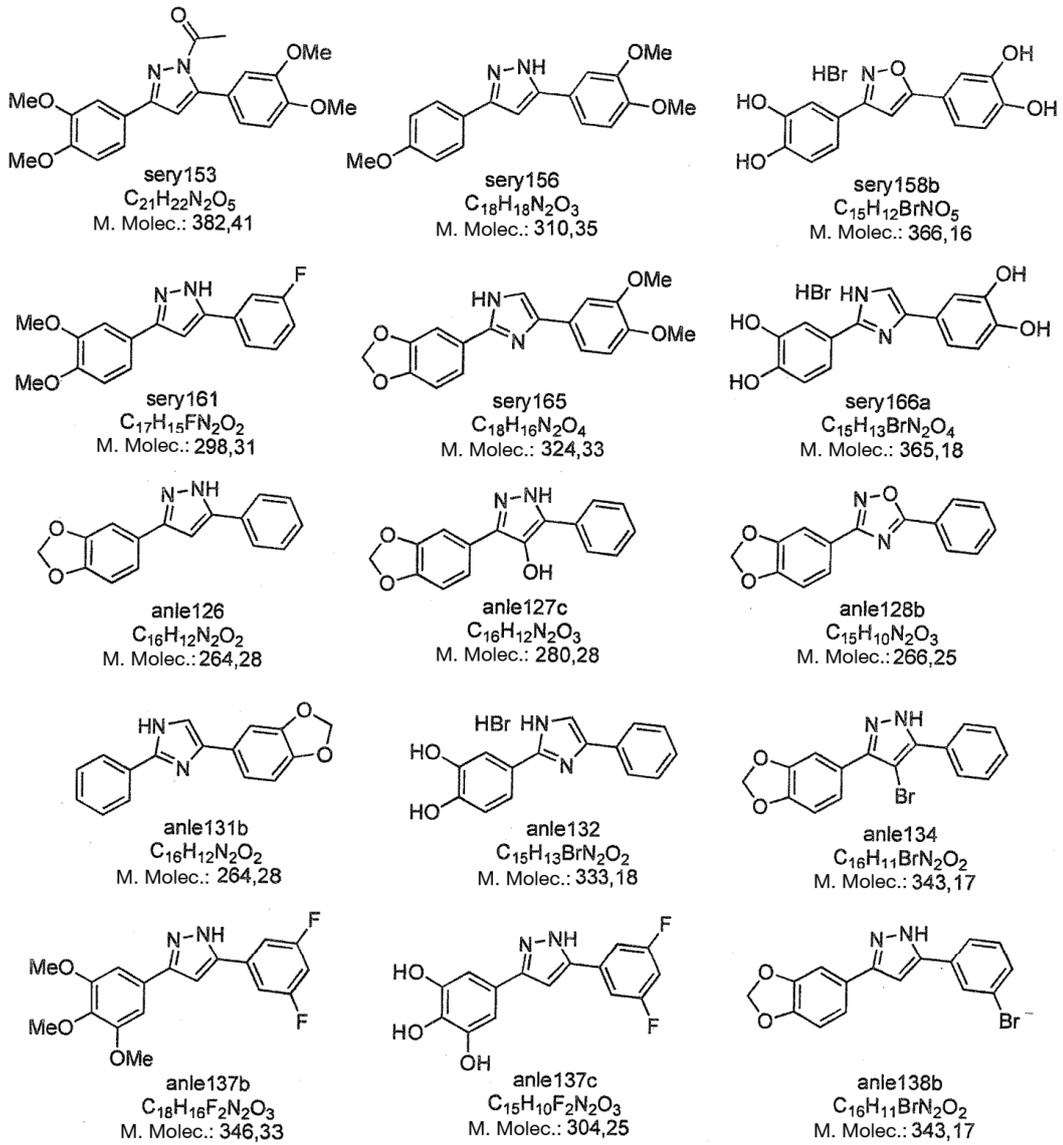
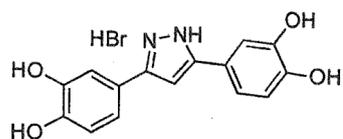
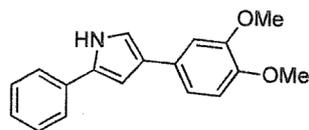


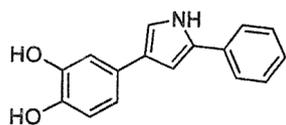
Figura 3 continuación



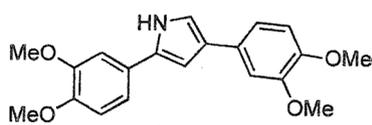
sery159a
 $C_{15}H_{13}BrN_2O_4$
 M. Molec.: 365,18



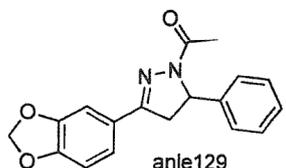
sery160
 $C_{18}H_{17}NO_2$
 M. Molec.: 279,33



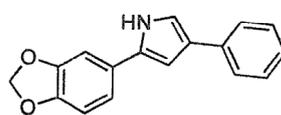
sery166b
 $C_{16}H_{13}NO_2$
 M. Molec.: 251,28



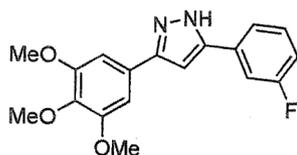
sery167
 $C_{20}H_{21}NO_4$
 M. Molec.: 339,39



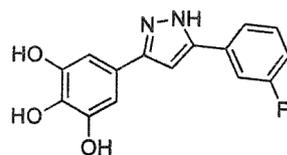
anle129
 $C_{18}H_{16}N_2O_3$
 M. Molec.: 308,33



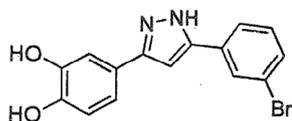
anle130b
 $C_{17}H_{13}NO_2$
 M. Molec.: 263,29



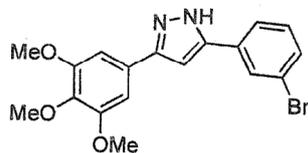
anle136b
 $C_{18}H_{17}FN_2O_3$
 M. Molec.: 328,34



anle136c
 $C_{15}H_{11}FN_2O_3$
 M. Molec.: 286,26

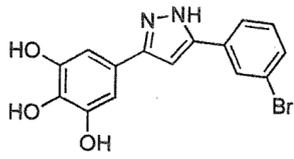


anle138c
 $C_{15}H_{11}BrN_2O_2$
 M. Molec.: 331,16

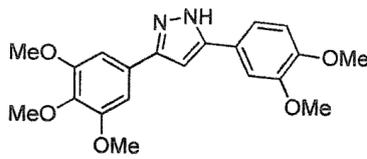


anle142b
 $C_{18}H_{17}BrN_2O_3$
 M. Molec.: 389,24

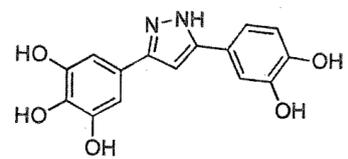
Figura 3 continuación



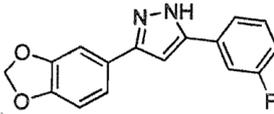
anle142c
 $C_{15}H_{11}BrN_2O_3$
 M. Molec.: 347,16



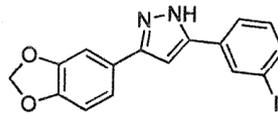
anle143b
 $C_{19}H_{19}BrN_2O_4$
 M. Molec.: 419,27



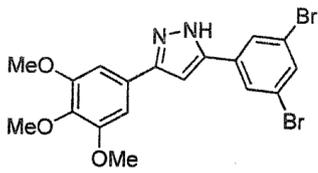
anle143c
 $C_{15}H_{12}N_2O_5$
 M. Molec.: 300,27



anle186b
 $C_{16}H_{11}FN_2O_2$
 M. Molec.: 282,27



anle197b
 $C_{16}H_{11}IN_2O_2$
 M. Molec.: 390,18



anle145b
 $C_{18}H_{16}Br_2N_2O_3$
 M. Molec.: 468,14



anle145c
 $C_{15}H_{11}Br_3N_2O_3$
 M. Molec.: 506,97

Figura 3 continuación

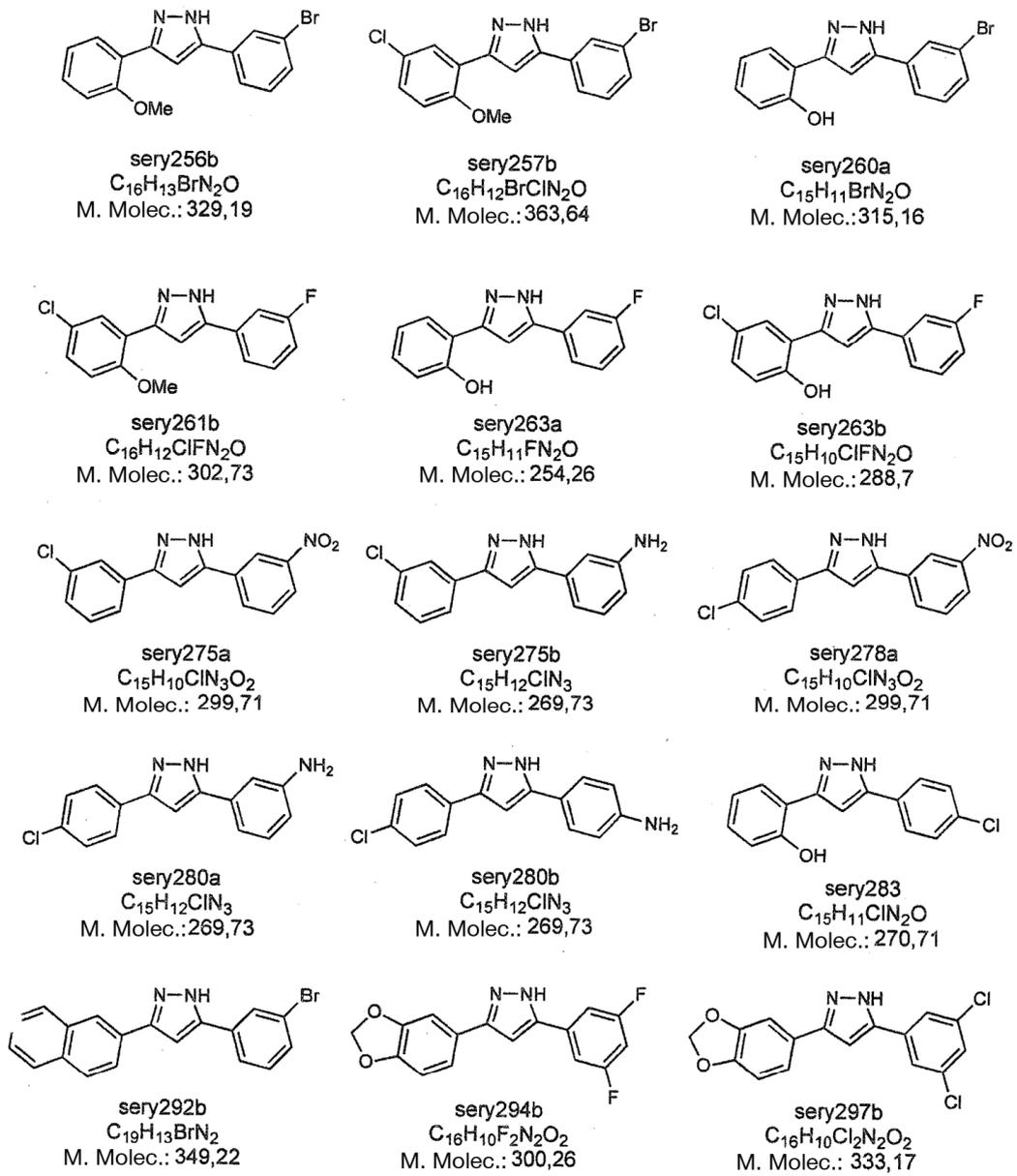
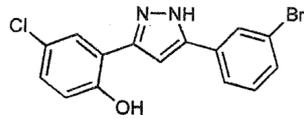
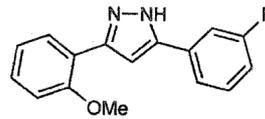


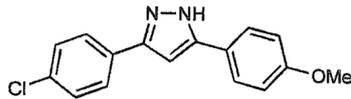
Figura 3 continuación



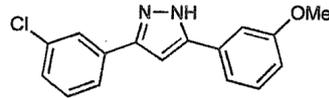
sery260b
 $C_{15}H_{10}BrClN_2O$
 M. Molec.: 349,61



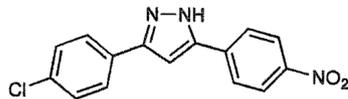
sery261a
 $C_{78}H_{59}Br_4Cl_2FN_{10}O_5$
 M. Molec.: 1625,89



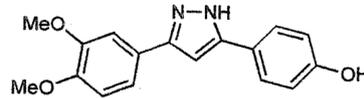
sery269b
 $C_{16}H_{13}ClN_2O$
 M. Molec.: 284,74



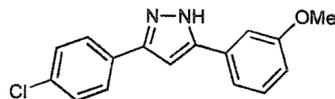
sery301
 $C_{16}H_{13}ClN_2O$
 M. Molec.: 284,74



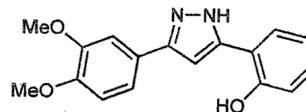
sery278b
 $C_{15}H_{10}ClN_2O_2$
 M. Molec.: 299,71



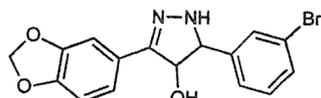
sery279b
 $C_{17}H_{16}N_2O_3$
 M. Molec.: 296,32



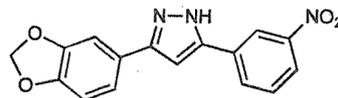
sery289
 $C_{16}H_{13}ClN_2O$
 M. Molec.: 284,74



sery290b
 $C_{17}H_{16}N_2O_3$
 M. Molec.: 296,32

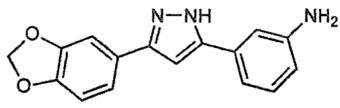


sery300a
 $C_{16}H_{13}BrN_2O_3$
 M. Molec.: 361,19

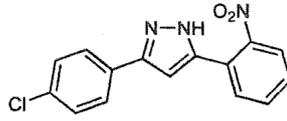


sery302c
 $C_{16}H_{11}N_3O_4$
 M. Molec.: 309,28

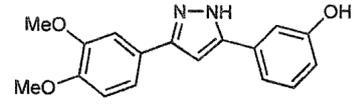
Figura 3 continuación



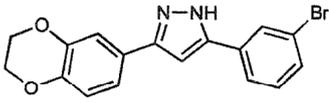
sery308
 $C_{16}H_{13}N_3O_2$
 M. Molec.: 279,29



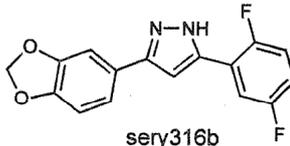
sery309
 $C_{15}H_{11}ClN_3O_2$
 M. Molec.: 299,71



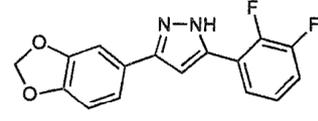
sery310b
 $C_{17}H_{16}N_2O_3$
 M. Molec.: 296,32



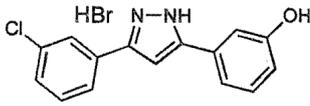
sery315b
 $C_{17}H_{13}BrN_2O_2$
 M. Molec.: 357,2



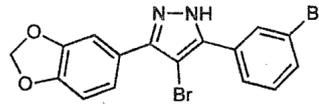
sery316b
 $C_{16}H_{10}F_2N_2O_2$
 M. Molec.: 300,26



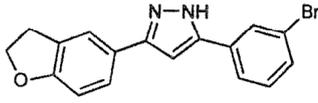
sery319
 $C_{16}H_{10}F_2N_2O_2$
 M. Molec.: 300,26



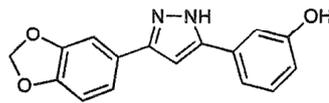
sery320c
 $C_{15}H_{12}BrClN_2O$
 M. Molec.: 351,63



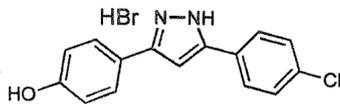
sery330
 $C_{16}H_{10}Br_2N_2O_2$
 M. Molec.: 422,07



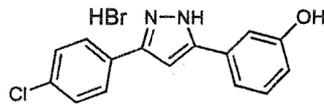
sery312b
 $C_{17}H_{13}BrN_2O$
 M. Molec.: 341,2



sery313b
 $C_{16}H_{12}N_2O_3$
 M. Molec.: 280,28



sery320a
 $C_{15}H_{12}BrClN_2O$
 M. Molec.: 351,63



sery320b
 $C_{15}H_{12}BrClN_2O$
 M. Molec.: 351,63

Figura 3 continuación

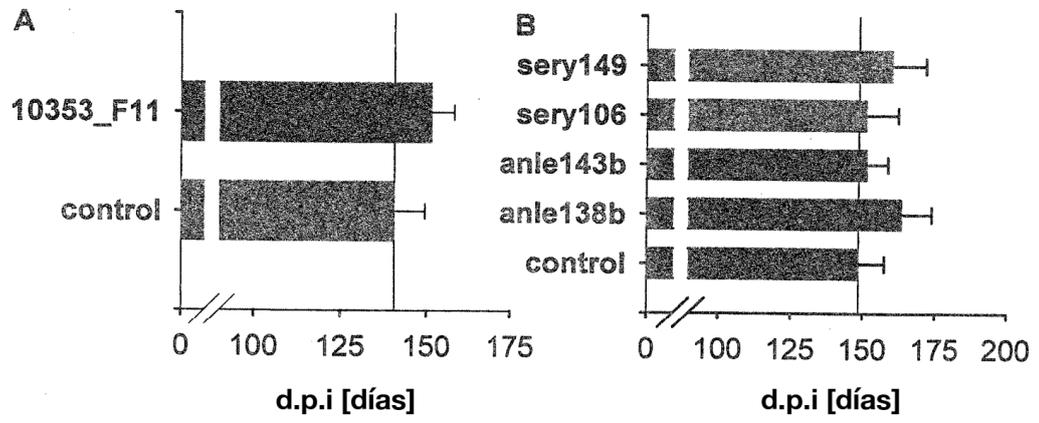


Figura 4

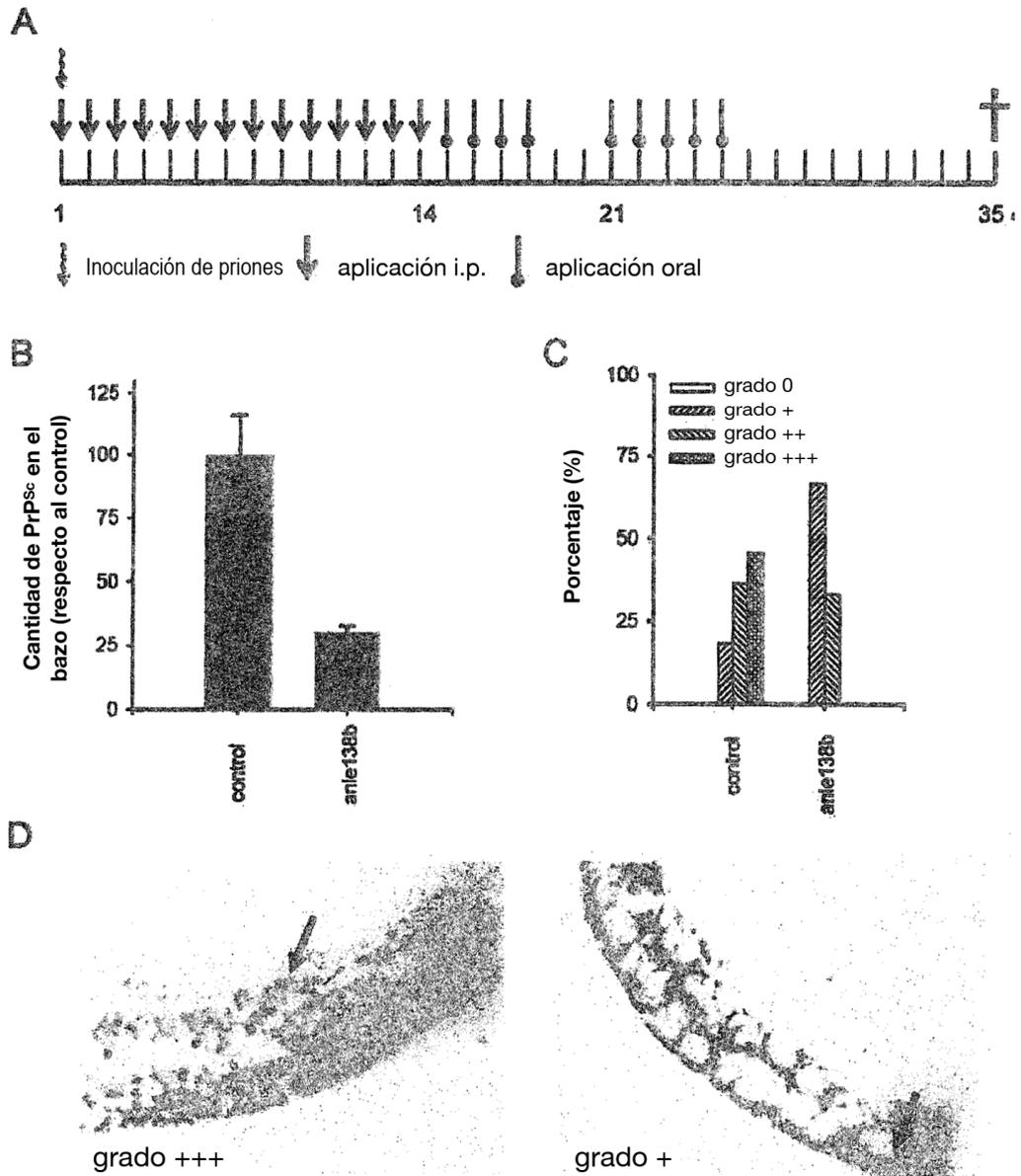


Figura 5

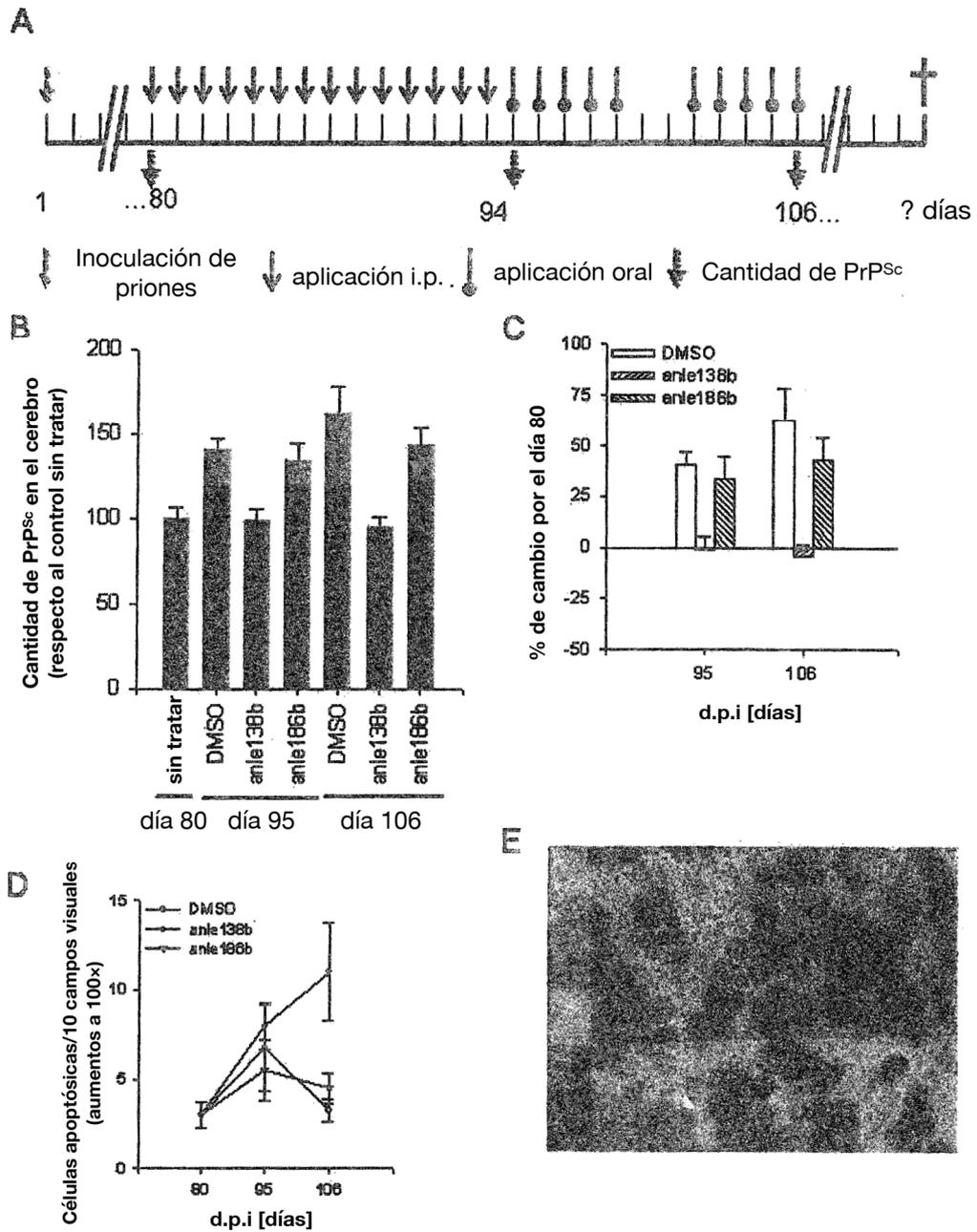


Figura 6

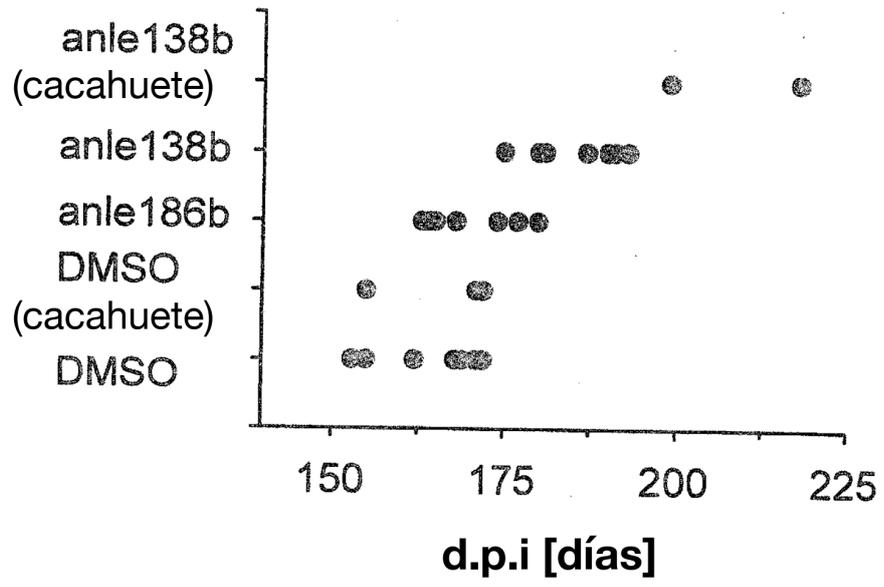


Figura 7

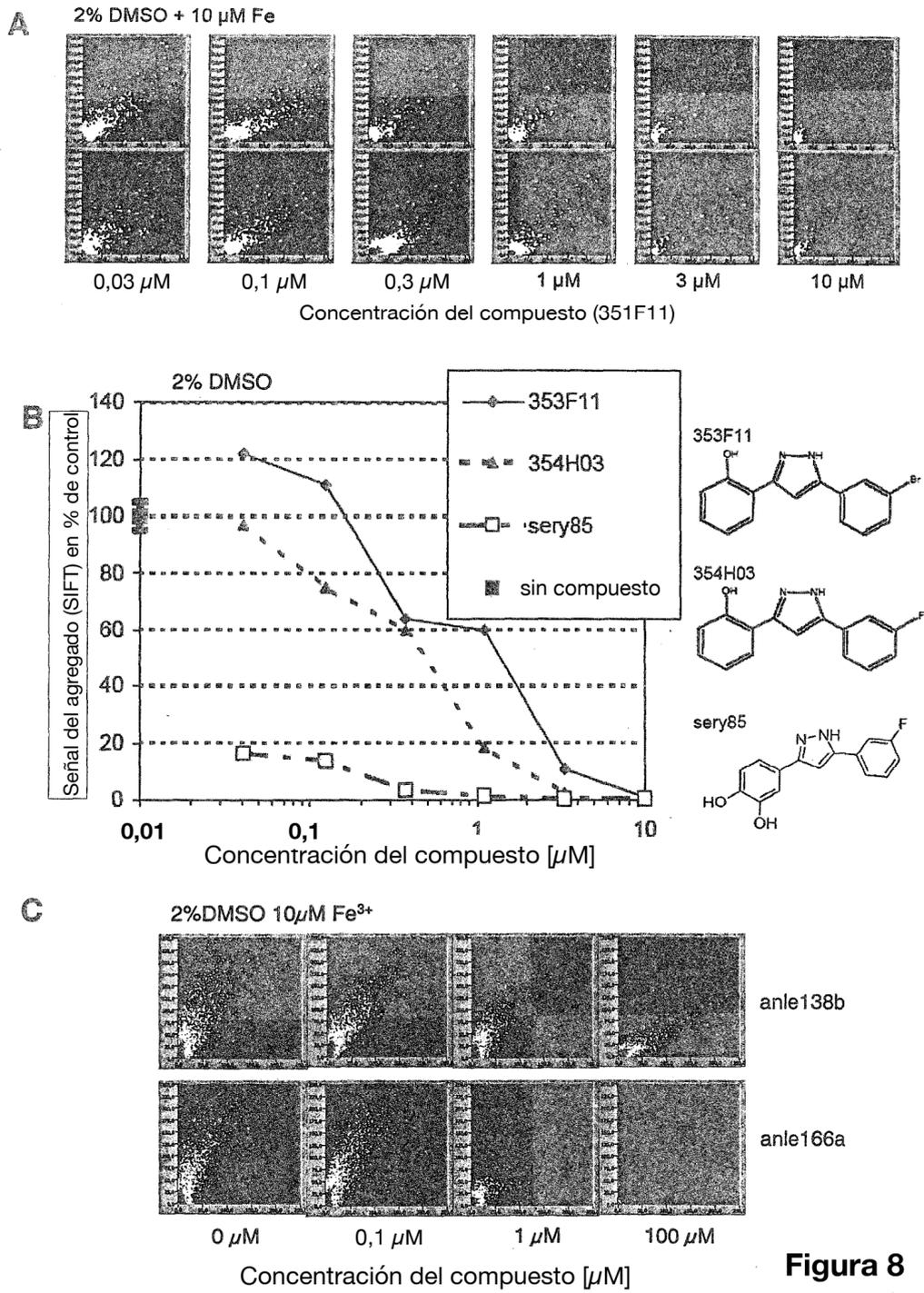


Figura 8

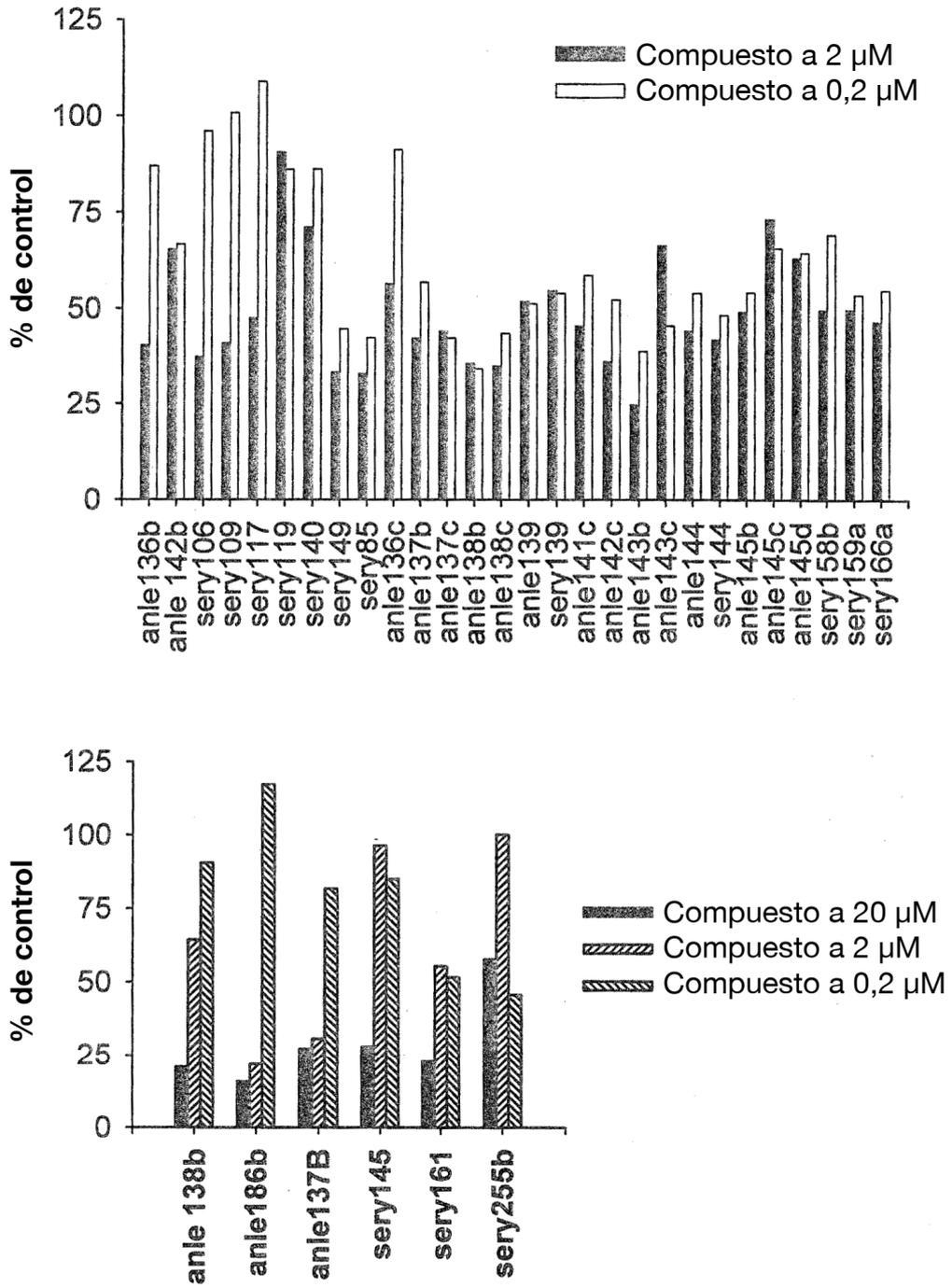


Figura 9

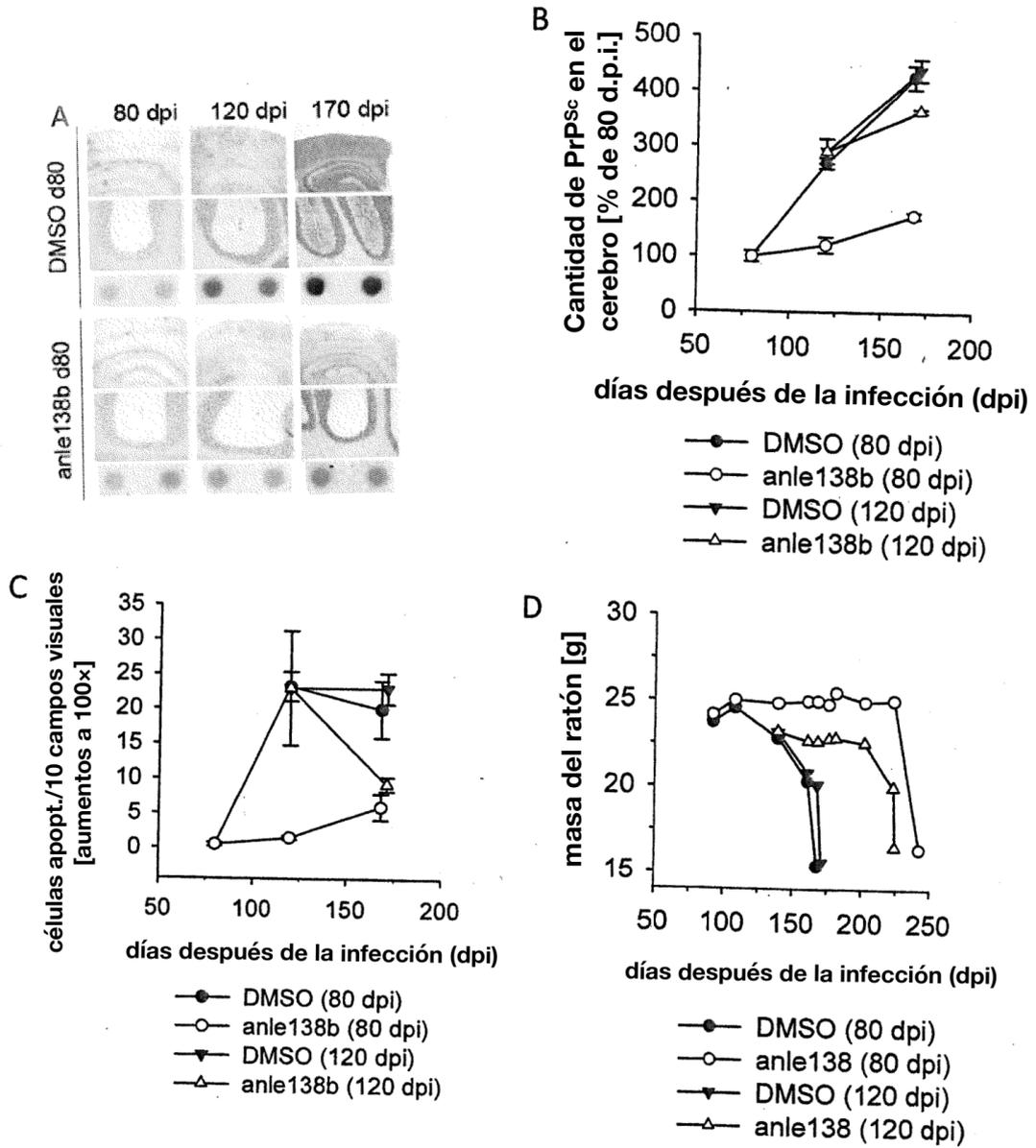


Figura 10

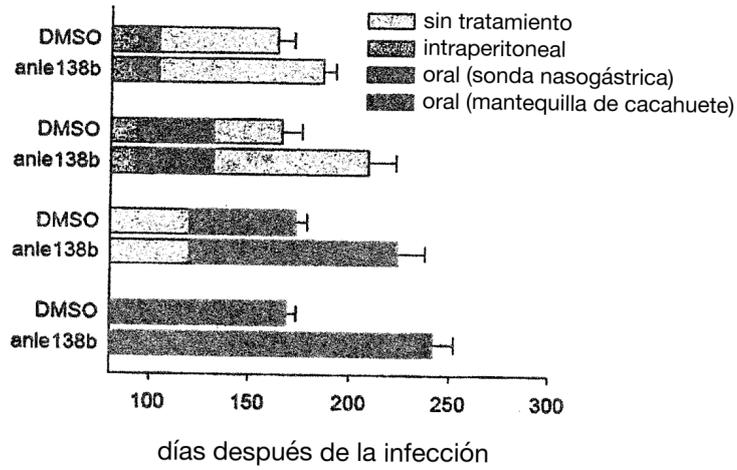


Figura 11

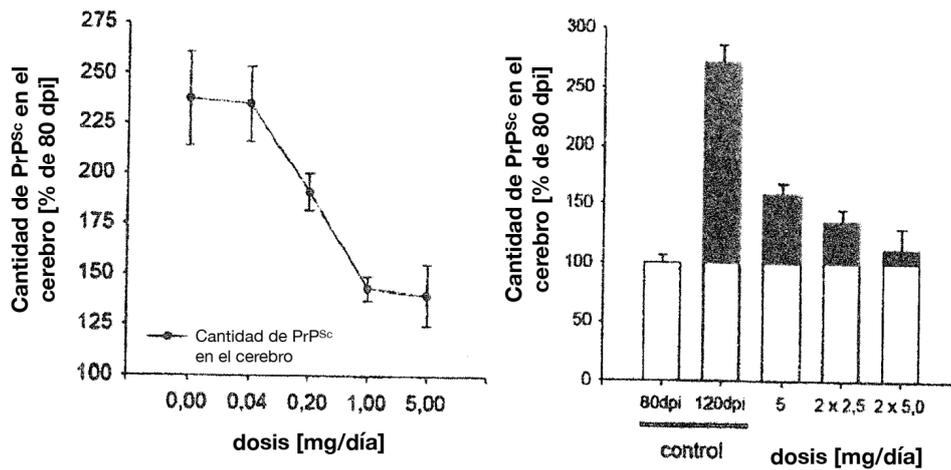


Figura 12

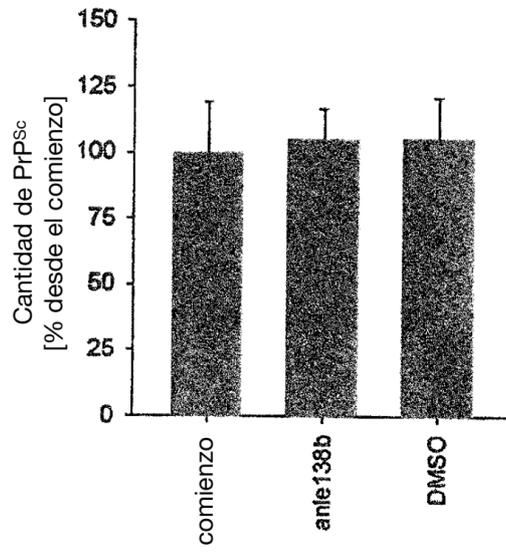


Figura 13

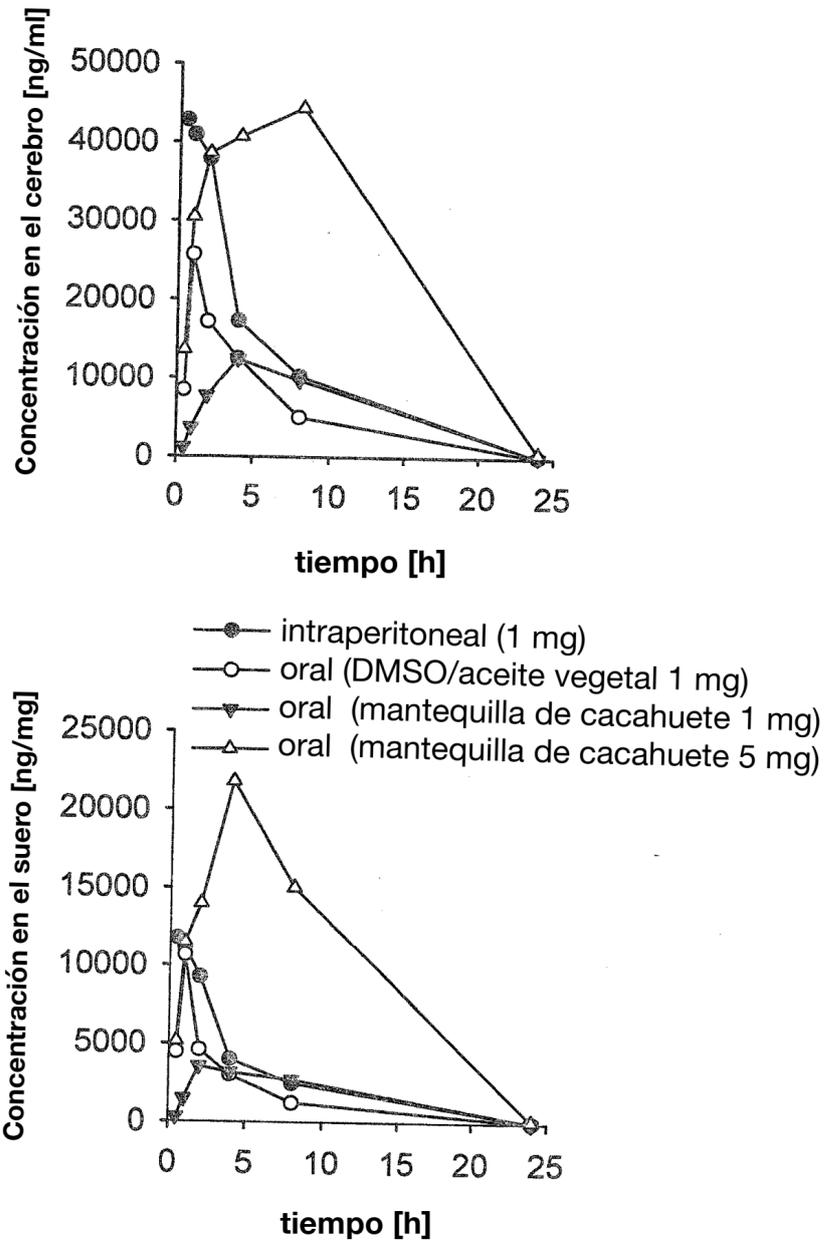


Figura 14

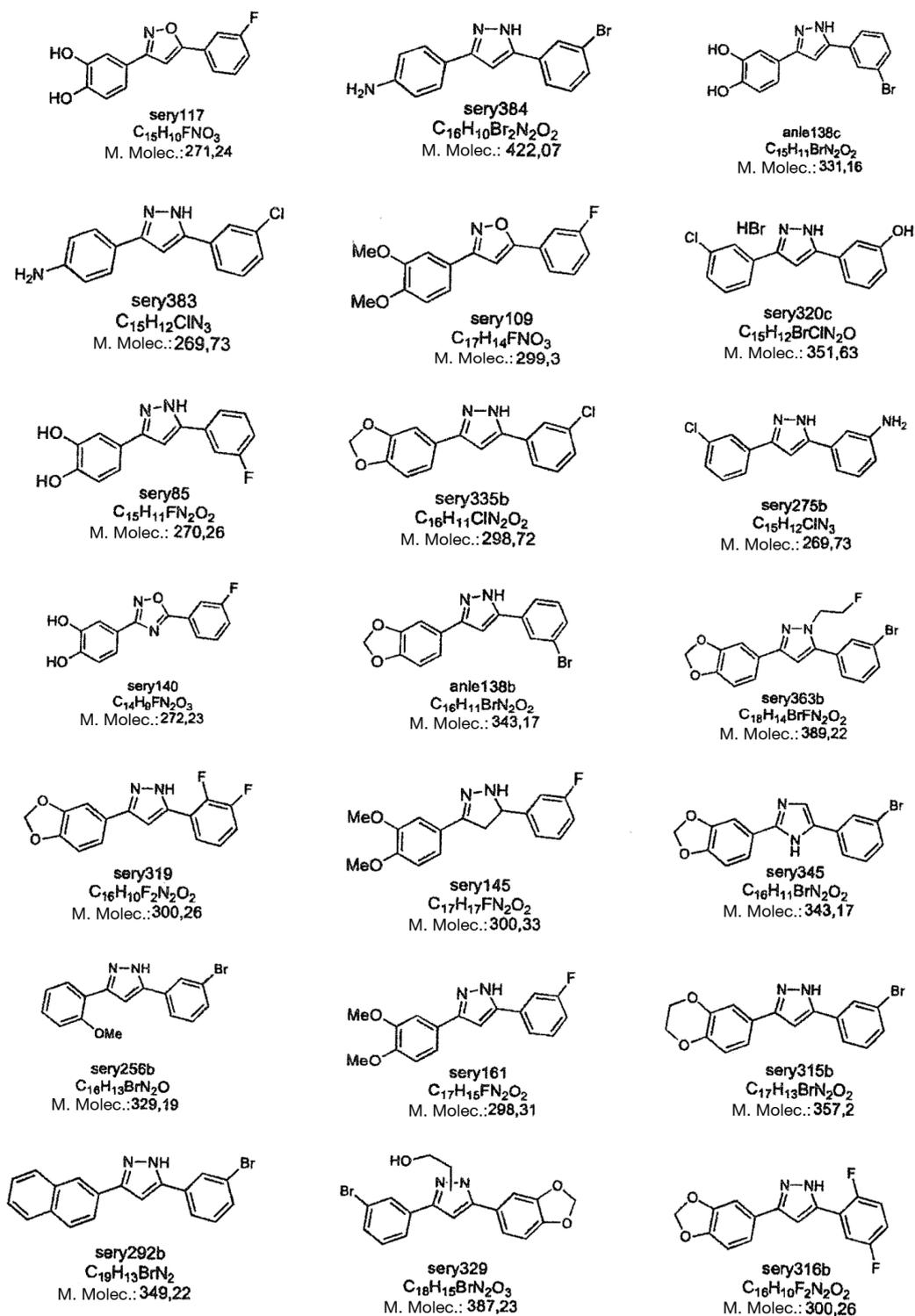


Figura 15

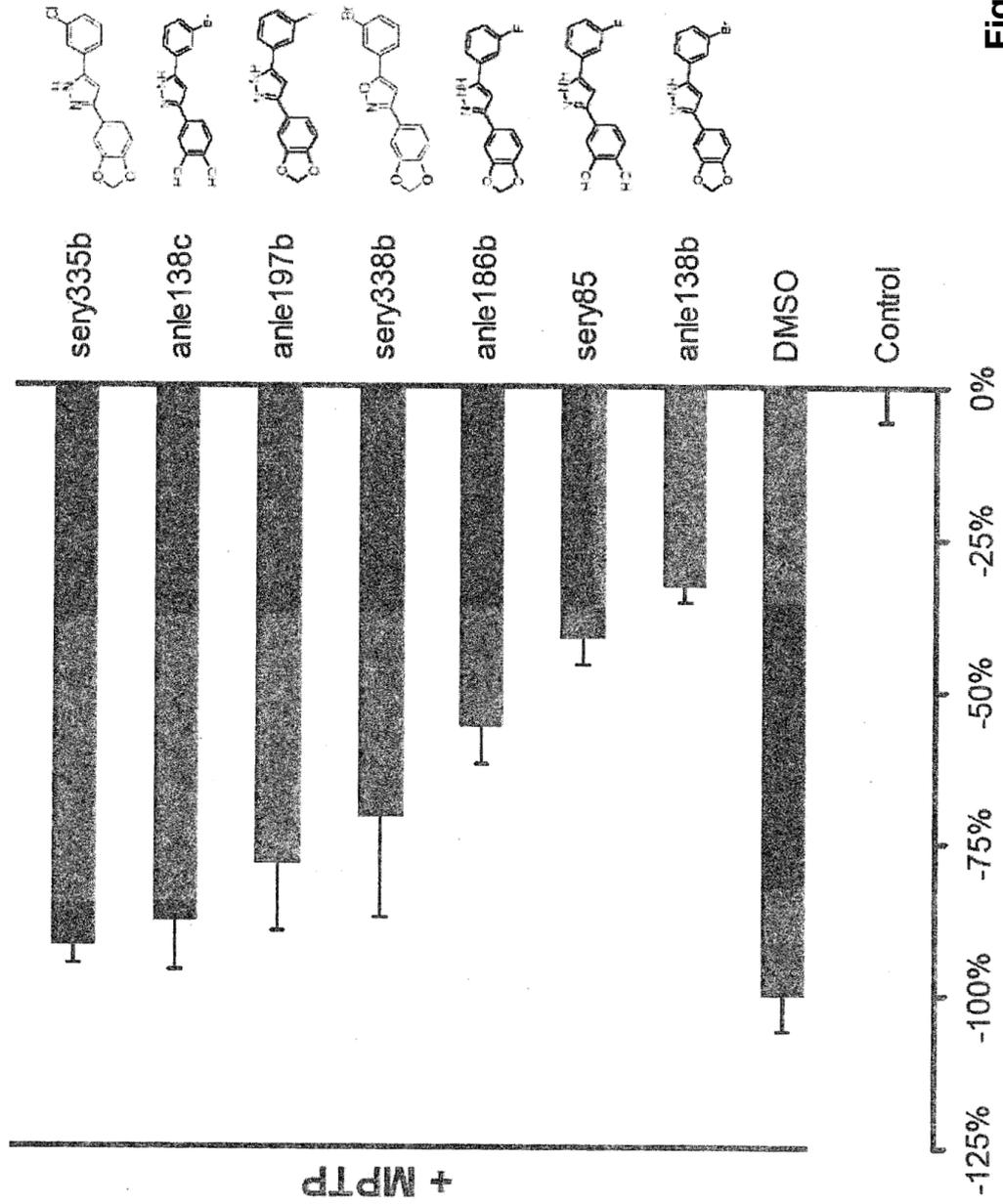


Figure 16

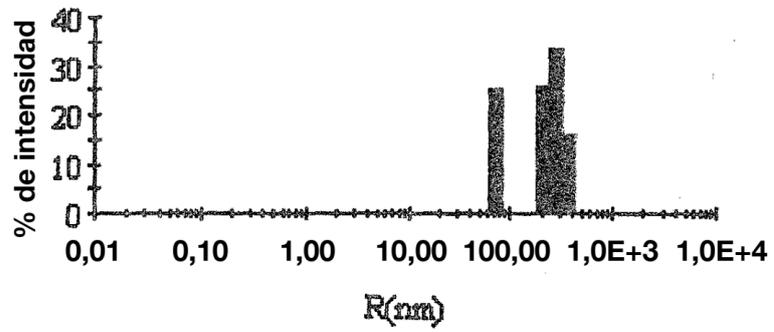
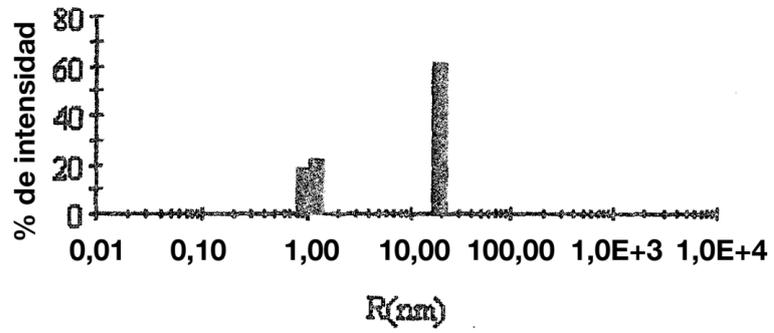
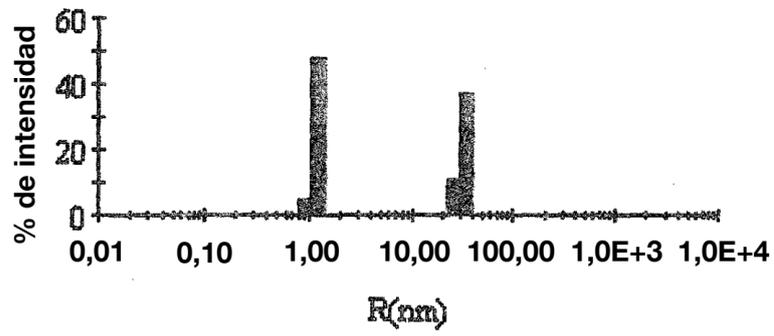


Figura 17